

Roger Kornberg y la RNAPol II: El mecanismo de síntesis del ácido ribonucleico desvelado al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa

RAFAEL GIRALDO SUÁREZ*

*Científico Titular. Centro de Investigaciones Biológicas,
CSIC, Madrid*

RESUMEN

El premio Nobel de Química, en su edición de 2006, ha sido otorgado al Profesor Roger Kornberg, del Departamento de Biología Estructural de la californiana Universidad de Stanford. El Profesor Kornberg ha desarrollado durante años un exhaustivo y riguroso trabajo sobre el complejo de proteínas responsable de la síntesis del ARN mensajero en las células eucarióticas, la RNA polimerasa II. Aplicando metodologías biofísicas, en particular la cristalografía de rayos-X, su trabajo muestra cómo diez de las doce subunidades proteicas del enzima se coordinan para separar las dos hebras de la molécula de ADN, reconocer el primer ribonucleótido que debe incorporarse sobre el molde de la cadena que ha de ser transcrita y catalizar la polimerización de sucesivos nucleótidos con gran fidelidad y procesividad. Cerca de medio siglo después de que Severo Ochoa realizase la primera síntesis bioquímica del ARN en un tubo de ensayo, el trabajo del ahora galardonado desentraña, en sus detalles más íntimos, el funcionamiento de la maquinaria macromolecular esencial para la expresión de los genes.

Palabras clave: Premio Nobel Química 2006.—Roger Kornberg.—RNAPol II.—Síntesis ARNm.—Cristalografía rayos-X.

* Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC. C/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid. España. Teléfono: 91 837 31 12 (ext. 4348). Fax: 91 536 04 32. E-mail: rgiraldo@cib.csic.es

ABSTRACT

Roger Kornberg and RNAPol II: unveiling the mechanism of ribonucleic acid synthesis half a century after Severo Ochoa and his polynucleotide phosphorylase

The Nobel Prize in Chemistry 2006 has been awarded to Prof. Roger Kornberg, Head of the Department of Structural Biology, Stanford CA, USA. Prof. Kornberg has been leading along years an exhaustive and rigorous research effort on RNAPol II, the protein complex responsible for the synthesis of messenger RNA in eukaryotic cells. By means of biophysical approaches, X-ray crystallography in particular, his work shows how ten of the twelve protein subunits of the whole enzyme are coordinated in order to melt the two DNA strands, recognize the first ribonucleotide to be incorporated on the template chain to be transcribed and catalyze polymerization of successive nucleotide building blocks with astonishing fidelity and processivity. Nearly half a century after the pioneering *in vitro* synthesis of RNA by Severo Ochoa, the work now awarded unveils, with a wealth of intimate details, the function of the macromolecular machinery essential for gene expression.

Keywords: Nobel Prize Chemistry 2006.—Roger Kornberg.—RNAPol II.—mRNA synthesis.—X-ray crystallography.

INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA BIOLÓGICO

La transmisión de la información genética es, junto con el establecimiento de un metabolismo energético y la compartimentalización mediante membranas, uno de los principios definitorios de la vida (1). El llamado «dogma central» de la Biología Molecular, formulado por vez primera por Francis Crick para establecer el flujo de información entre biomoléculas (para una perspectiva histórica, véase ref. 2), asigna una posición central al ácido ribonucleico (ARN). En su formulación más simple:



Es decir, la información almacenada en las porciones codificantes (genes) del ácido desoxirribonucleico (ADN) es transferida a una macromolécula intermedia (el ARN mensajero, ARNm) que es finalmen-

te decodificada a proteínas, las protagonistas principales de los procesos celulares. Mientras que la perpetuación de la información contenida en el ADN (mediante el proceso de *replicación*) y su expresión en ARN (*transcripción*) están fundadas en la complementariedad inherente a los pares de bases A-T/U y G-C, en el último paso (*traducción*) el principio de complementariedad entre nucleótidos y aminoácidos no es satisfecho de una manera directa. Requiere pues de macromoléculas adaptadoras (los ARN de transferencia, ARNt) y de otras estructurales-catalíticas (ARN ribosómicos, ARNr), asociadas en sí mismas a proteínas (en ARNt sintetetasas y ribosomas). En la simplicidad del esquema conceptual arriba comentado subyace una extraordinaria complejidad en el nivel molecular, al participar en cada uno de dichos procesos decenas de proteínas y largas cadenas de ácidos nucleicos, ensamblados y coordinados de manera precisa para ejercer sus respectivas catálisis con gran eficiencia y fidelidad. Tres son las maquinarias macromoleculares responsables de los procesos de transmisión y expresión de la información genética: el replisoma, la ARN polimerasa (en lo sucesivo, RNAPol) y el ribosoma.

No es pues de extrañar que, dadas su esencialidad y complejidad, los procesos de replicación, transcripción y traducción, atraigan de manera continuada el interés de la comunidad científica y que muchos de los avances significativos en tales campos hayan recibido el reconocimiento de los principales galardones científicos, con los Premios Nobel a la cabeza.

LOS KORNBERG, UNA SAGA FAMILIAR FOR THE LOVE OF ENZYMES

Las primeras síntesis de ácidos nucleicos en un tubo de ensayo fueron realizadas por los grupos de Severo Ochoa (ARN) y Arthur Kornberg (ADN), lo que les valió el compartir el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1959. Ambos investigadores publicaron en su día unas excelentes anotaciones autobiográficas (3, 4) en las que narran con trazos muy vivos la cadena de acontecimientos que les llevaron a aislar enzimas capaces de realizar dichos procesos. En lo que se refiere al ARN, nuestro Nobel describe cómo la por él bautizada polinucleótido fosforilasa, purificada de *Azotobacter vinelandii*,

era capaz de realizar la reacción reversible (5): $n\text{NDP} \rightleftharpoons (\text{NMP})_n + n\text{Pi}$, pudiendo pues polimerizar cualquier nucleósido difosfato (NDP) en ARN, con la liberación de fosfato inorgánico. Si bien dicho enzima fue la herramienta clave en la síntesis de copolímeros que condujeron al desciframiento del código genético (2), los hechos pronto mostraron que la biosíntesis celular del ARN era realizada por otro enzima mucho más complejo: la RNAPol (6). En los microorganismos procarióticos existe un único holoenzima RNAPol, mientras que en los eucariotas se ensamblan hasta tres versiones del mismo, evolutivamente relacionadas y especializadas en la transcripción de cada uno de los tipos de ARN: RNAPol I (ARNr), II (ARNm) y III (ARNt).

Para el propósito de este artículo, baste añadir que el interés de Ochoa y Kornberg por la enzimología de los procesos de transferencia de la información genética supuso la coronación del trabajo sobre el metabolismo energético (fosforilación oxidativa) de una larga genealogía de investigadores, todos ellos asimismo premiados con el Nobel: O. Meyerhof (1922), O. Warburg, (1931), C. y G. Cori (1947), F. Lipmann (1953), P. Boyer (1997) ... Esta saga se ha visto continuada en 2006 con el galardón recibido, en su modalidad de Química, por el estadounidense Roger Kornberg (nacido en 1947, hijo de Arthur), por su contribución, pionera y abrumadora, a la comprensión de los mecanismos moleculares de la transcripción en eucariotas. Más allá del hecho anecdótico de tratarse del sexto caso de pareja padre/madre-hijo/a galardonados con «el Premio entre los premios», es consecuencia de la profunda pasión por la Bioquímica que A. Kornberg transmitió a sus hijos desde una edad muy temprana (4) y de la determinación invencible de Roger de abordar aproximaciones biofísicas que su padre no había llegado a explorar. R. Kornberg se inició en ellas durante su formación posdoctoral en Cambridge, en el laboratorio de Aaron Klug (a su vez también premiado con el de Química en 1982).

ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE LA RNAPOL II: RESOLUCIÓN Y COMPLEJIDAD VAN DE LA MANO

Fiel al segundo de «los diez mandamientos» del bioquímico formulados por su padre (7), un microorganismo, la levadura *Saccharomy-*

ces cerevisiae ha sido el sistema modelo que le ha permitido a R. Kornberg el obtener una perspectiva universalmente válida sobre un proceso esencial. Su primera aproximación al problema de la transcripción se deriva de aportaciones pioneras sobre la estructura de la cromatina eucariótica, más en concreto sobre el desplazamiento de los nucleosomas, las partículas nucleoproteicas que la constituyen (8, 9), al paso de la maquinaria transcripcional (10). El laboratorio de Kornberg impactó a la comunidad científica con una primera descripción de la estructura de la RNAPol II a baja resolución (16 Å) mediante técnicas de difracción de electrones (microscopía electrónica) (11). A una resolución tal, típica del rango accesible para dicha técnica (debido a limitaciones en el orden de los especímenes), se distinguen con claridad el volumen y la forma del holoenzima, en los que destaca la presencia de distintos lóbulos, pero sin que se puedan inferir ni la estructura fina ni la función de cada uno de ellos.

Los años siguientes fueron quizá los más arduos para el grupo de Stanford. El llevar la resolución de sus estudios estructurales a niveles en los que fuera posible una interpretación funcional implicaba recurrir a la cristalografía de rayos-X (12). Como el nombre de dicha técnica indica, se requería la obtención de cristales tridimensionales, es decir, la deposición de moléculas del enzima en las tres direcciones del espacio con un orden tal que difractasen los rayos-X de manera coherente. De las doce subunidades de la RNAPol II (Rpb1-12), la cristalización del holoenzima requirió la eliminación de dos de ellas (Rpb4 y 7, no esenciales). El tamaño de la celdilla unidad (aquel elemento mínimo cuya repetición espacial constituye el cristal), como era de esperar siendo la RNAPol II un complejo cuya masa molecular ronda el medio millón de Daltons (Da), era muy grande (dimensión mayor, 370 Å). Esto impuso el uso de radiación sincrotrón de gran intensidad y resolución espacial. Este tipo de fuente de rayos-X, accesible en grandes instalaciones gestionadas por consorcios internacionales (pronto también en España: el sincrotrón ALBA, en Barcelona), es uno de los avances que han impulsado de manera decisiva el desarrollo presente de la cristalografía de macromoléculas biológicas, haciendo factibles proyectos de tamaño y complejidad crecientes, como el que aquí nos ocupa.

Los cristales inicialmente obtenidos por Kornberg y sus colaboradores difractaban los rayos-X a una resolución máxima de 3.5 Å,

lo que habría sido suficiente para trazar un modelo de la estructura del holoenzima en el que se distinguiera el esqueleto polipeptídico de las diez subunidades. Sin embargo, la reconstrucción matemática, mediante transformadas de Fourier, de la densidad electrónica de los átomos que componen la RNAPol II requería no sólo las amplitudes de cada reflexión (obtenidas de manera directa de los datos del experimento de difracción) sino también sus fases, que podrían ser inferidas de la localización de átomos pesados en la red cristalina (12). Los primeros empleados con éxito fueron 18 átomos de wolframio, agrupados en un *clúster*, que se incorporaron a los cristales por difusión. Las fases obtenidas, hasta 5 Å de resolución, permitieron localizar diversos lóbulos en el enzima (13), que podían ser superpuestos sobre el volumen previamente obtenido mediante microscopía electrónica. La posición de uno de ellos difería entre ambas estructuras, lo que sugería que podría desplazarse para abrazar el ADN molde, como se discutirá más adelante.

No había pasado aún un año, cuando condiciones de cristalización mejoradas permitieron reducir ligeramente el tamaño de la celdilla e incluir otros grupos de átomos pesados en la red cristalina. Como resultado, se obtuvieron fases fiables hasta una resolución de 3.1 Å, a la que fue ya posible el trazar las cadenas polipeptídicas y así distinguir α -hélices y láminas- β (14). La sustitución de los iones de Mg^{2+} , presentes en los cristales, por Zn^{2+} condujo a determinar su posición y así postular la localización del centro activo en el holoenzima. Por último, la más nítida definición de lóbulos y dominios asociada al aumento en la resolución trajo consigo el modelado de una localización plausible tanto para el ADN molde como para el ARN naciente.

Una ulterior mejora en las condiciones de cristalización y la sustitución de las 94 metioninas presentes en la RNAPol II por su análogo Se-Met permitieron extender la resolución hasta 2.8 Å y con ello proceder al trazo de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos sin ambigüedades notorias y con una buena estereoquímica (15). En dicho modelo se caracterizaron los residuos que participan en los contactos entre las diez subunidades presentes (Fig. 1A). Quedó así perfectamente definida la existencia de cuatro grandes módulos, potencialmente móviles en respuesta a la unión del holoenzima al ADN. Otro elemento entonces identificado de manera inequívoca

fue un ion Mg^{2+} (A) en el posible centro activo. La densidad de un posible segundo Mg^{2+} (B) no quedaba, sin embargo, tan claramente definida. En aquel momento era ya claro que la subunidad mayor, Rpb1 (1.733 residuos aminoácidos), contenía los residuos catalíticos y, junto con Rpb2, la mayoría de los que determinan la interacción de la RNAPol II con el ADN molde y canalizan al ARN naciente. Asimismo, se pudo modelar la RNAPol II humana sobre la de levadura, como la identidad de secuencia entre ambas (53%) permitía inferir. En cuanto a la similitud estructural con las cinco subunidades (α_2 , β , β' , σ) del holoenzima RNAPol bacteriano (16, 17), el dímero de α está relacionado con el subcomplejo Rpb3-Rpb11, β con Rpb2 y β' lo está con Rpb1, mientras que los factores σ de selección de promotor encuentran su análogo funcional en el factor general de transcripción TFIID, cuya masa molecular y número de componentes superan los de la propia RNAPol II.

La estructura de la RNAPol II pudo ser finalmente extendida hasta 2.3 Å, tras difundir en los cristales diversos NTPs, lo que permitió elucidar el mecanismo catalítico, tal y como se discutirá más abajo. En paralelo, otra serie de estructuras iba a permitir al grupo de Kornberg el definir las interacciones del ADN molde y el ARN naciente con el holoenzima.

INTERACCIONES DE LA RNAPOL II CON LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Aunque las sucesivas estructuras de la RNAPol II habían dado lugar a modelos de fiabilidad creciente sobre la situación de ADN molde y ARN en complejo con el holoenzima (11, 13-15), la comprensión de esta máquina macromolecular requería co-cristalizarla con ácidos nucleicos. El primer hito en dicha dirección fue publicado por Kornberg de manera simultánea a la estructura del holoenzima a 2.8 Å de resolución, sirviéndose de ésta para la obtención de fases, si bien a unos más modestos 3.3 Å impuestos en parte por la complejidad del sustrato (18): una doble hélice de ADN de 30 pb, con una prolongación de cadena sencilla en uno de sus extremos 5' para la carga de la RNAPol II, de los que catorce habían sido desplazados por el enzima al transcribir *in vitro* un ARN cuya síntesis se había

detenido ante la primera base de adenina del molde, al no haber sido incluido en la reacción el UTP complementario.

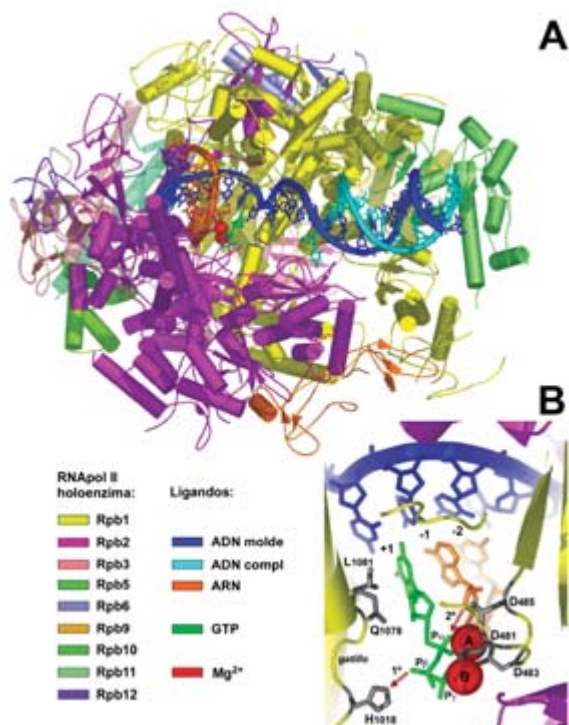


FIGURA 1. (A) **Estructura de la RNApol II en elongación** (asociada a un híbrido ADN-ARN). En diversos colores se indican las subunidades proteicas (Rpb) visibles en la orientación presentada. Las α -hélices se esquematizan como cilindros y la hebras- β como flechas. El nucleótido (GTP), sito en el centro activo, se muestra en forma de varillas, así como las bases en los ácidos nucleicos. Los dos iones Mg^{2+} catalíticos se representan como esferas. (B) **Una sección ampliada del centro activo** (rotada unos 180° en torno al eje Y). Los residuos relevantes para la catálisis nucleófila (flechas granates) se representan en color gris. Modelo basado en el fichero PDB con código 2E2H (21) y representado por medio del programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

En cuanto a la estructura del holoenzima en el complejo (Fig. 1A), la mayor diferencia con la de su forma libre estriba en la posición del lóbulo móvil que, como ya se había propuesto (13-15), abraza el ADN molde tras rotar unos 30° y acomodar cambios estructurales en cinco

regiones distribuidas entre las subunidades Rpb1 y 2. Por lo que respecta al ADN que ha de ser aún transcrito, yace en un surco con potencial electrostático positivo (15) entre dicho módulo y Rpb2-Rpb5. En la región que lo precede, el ADN desapareado en la horquilla muestra una gran flexibilidad, mientras que los residuos en la hebra molde interaccionan con aminoácidos de la llamada « α -hélice puente», que forma parte también de Rpb1. El híbrido ADN-ARN permanece apareado a lo largo de 9 pb, presentando una conformación intermedia entre las canónicas de A y B-DNA. Los contactos observados entre subunidades Rpb y ADN/ARN se establecen con los esqueletos azúcar-fosfato de éstos y no con las bases, lo que explica la ausencia de especificidad de secuencia que caracteriza la interacción entre polimerasas y ácidos nucleicos. Es de destacar que se cumple otra de las predicciones hechas sobre los modelos previos (13-15): la porción de ADN ya transcrita y re-apareada se sitúa en ángulo recto con respecto a la que queda por transcribir, desviada por acción de una «pared» establecida por un dominio de Rpb2, mientras que el ARN sintetizado se separa del ADN y se posiciona en un canal de salida que atraviesa el holoenzima. El mecanismo de separación del ARN fue revelado en otra estructura cristalina adicional (a 3.6 Å de resolución), en la que éste no era formado por transcripción sino sintetizado químicamente, incluyendo un nucleótido 3'-desoxi terminador, e hibridado después al ADN: dos lazos provenientes de Rpb1 y uno de Rpb2 interaccionan entre sí para actuar como una cuña y guiar el ARN hacia aquél canal (19).

EL MECANISMO CATALÍTICO DE LA RNAPOL II

La difusión de diversos NTPs en la red cristalina de la RNAPol II y la co-cristalización con un híbrido sintético ADN-ARN permitió apreciar con gran detalle el discurrir de los ácidos nucleicos en el centro activo (20) y proponer un mecanismo catalítico fiable (21), ya esbozado sobre las estructuras preexistentes (Fig. 1).

El centro activo del enzima se localiza alrededor del extremo 3' de la cadena naciente de ARN y es aportado, una vez más, por Rpb1. La presencia de un nucleótido terminador en dicho extremo del ARN permitió situar un NTP complementario al residuo $i+1$ del ADN

molde sin que su fosfato- α experimentara la catálisis (Fig. 1B). De los dos iones metálicos Mg^{2+} identificados en la estructura del holoenzima libre (15), el mejor definido de ellos (A) es coordinado por el fosfato- α y por una triada de aspartatos (D481/483/485), mientras que el segundo (B) lo es por los fosfatos- β y γ del ligando NTP. Dado que en ausencia de nucleótido la presencia del metal en B apenas se intuía, se infiere que éste debe acompañar al NTP entrante. ¿Cómo evita la RNAPol II la incorporación de un NTP desapareado? El estudio de los cristales de varios de tales complejos conllevó la sorpresa de que un nucleótido no complementario se encuentra rotado unos 180° , coordinados aún sus fosfatos- β y γ por el metal B, pero estableciendo contactos adicionales, mientras que la base se proyecta hacia un poro bajo el centro activo del enzima. El sitio en el que se unen los nucleótidos no complementarios constituiría, en realidad, el punto primario de entrada (E) de cualquier nucleótido que, cuando es el correcto, rotaría en torno al metal B para formar el par de bases y disponerse en A para la catálisis. Las interacciones proteína-NTP durante la rotación contribuirían a evitar la incorporación de dNTPs, si bien esta selectividad parece tener una base más cinética que estructural.

Con una gran intuición, otro grupo había propuesto independientemente una configuración similar para los nucleótidos no apareados en la RNAPol bacteriana (22). Además, dichos investigadores utilizaron el modelo de Kornberg sobre los dos metales del centro activo de la RNAPol II para explicar dos reacciones colaterales que dicha enzima puede realizar *in vitro*: nucleolisis y pirofosforolisis, viniendo a cerrar así el círculo de la reversibilidad de las reacciones de síntesis y degradación del ARN, como ya fuera mostrado en sentido inverso por Severo Ochoa con la polinucleótido fosforilasa (5). Aunque las RNAPol virales, no homólogas con las RNAPol celulares, presentan un mecanismo catalítico que implica también dos metales, en aquéllas ambos iones entran con los NTPs (23-25). Además, la topología relativa de los centros activos y de los híbridos ADN-ARN es distinta, permitiendo en el caso de la RNAPol II el retroceso del enzima, relevante en caso de pausa transcripcional y que permite la edición del ARN (20).

En el más reciente de sus trabajos, cuya publicación coincidió con la ceremonia de entrega del Nobel de Química a Kornberg, el grupo

de Stanford ha llegado a definir, sobre complejos ternarios que incluyen RNAPol II, el híbrido ADN-ARN y NTPs, el conjunto de interacciones que acompañan a la formación del enlace fosfodiéster (21) (Fig. 1B). Dos son los elementos que participan directamente en la catálisis, denominados la α -hélice «puente» y el lazo «gatillo». Están en contacto estrecho y sus movimientos acoplados contribuirían al movimiento de translocación de la RNAPol II. Cuando el sitio A se encuentra ocupado con el NTP complementario, el gatillo se dispone en múltiples conformaciones, predominando aquellas próximas al metal. A altas concentraciones de Mg^{2+} , el segundo metal (B) se localiza en una nueva posición (C), siendo desplazados en paralelo los NTPs desde el sitio A al E, inhibiendo la catálisis. El residuo Leu1081 en el gatillo establece contactos hidrofóbicos con la base del nucleótido, a la par que Gln1078 interacciona con el grupo 3'-OH del anillo de ribosa. A su vez, el residuo His1085 establece un puente, bien sea de hidrógeno o salino, con el fosfato- β del NTP a través de su nitrógeno imidazólico protonado. Éste atraería hacia sí parte de la densidad electrónica del fosfato, facilitando el ataque nucleófilo (S_N2) del grupo terminal 3'-OH del ARN, que resultaría en la formación del nuevo enlace fosfodiéster (Fig. 1B). Dado su papel central en la catálisis, no resulta extraño que el gatillo sea la diana de factores reguladores (en la RNAPol bacteriana, NusA y NusG) e inhibidores. Entre estos últimos, el grupo de Kornberg determinó la estructura cristalina de la α -amanitina en complejo con la RNAPol II (26). Esta potente toxina se une junto a la hélice puente, bloqueando el movimiento del gatillo hacia el nucleótido unido en el sitio A. Un papel análogo sobre la RNAPol bacteriana lo ejerce la estreptolidigina (27).

HACIA LA ESTRUCTURA DE LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL AL COMPLETO

Los esfuerzos del grupo de Kornberg por entender la transcripción en su conjunto no se han detenido en la RNAPol II. El ensamblaje macromolecular responsable de todo el proceso comprende unas 60 proteínas distintas, con una masa molecular que excede los 2,5 millones de Da, dimensiones que le acercan a las del ribosoma. El primero de los factores generales de transcripción en unirse al ADN es TFIID, compuesto por unas 15 proteínas distintas de las cuales TBP

desempeña una misión estratégica al reconocer las secuencias TATA que caracterizan a los promotores eucarióticos. Muy poco después de que otros dos grupos resolvieran la estructura de los dominios C-terminales de las TBPs de *Arabidopsis* y humana, Kornberg resolvió la homóloga de *S. cerevisiae* (28). TBP se reveló como un monómero plegado en torno a una extensa lámina- β antiparalela curvada y con simetría binaria interna, asemejándose en su forma global a una silla de montar. TBP se une, a través de su superficie cóncava, al ADN disponiéndose a lo largo del surco menor de éste e introduciendo en él una curvatura próxima a los 90° . El ADN quedaría así plegado en torno a la RNAPol II, estableciendo un puente entre ésta y TBP, al que se une como una grapa de refuerzo aún otro factor transcripcional general: TFIIB. De este modo se determina la distancia característica que separa, en los promotores eucarióticos, la secuencia TATA promotora del sitio de entrada del primer NTP (+1).

Precisamente fue TFIIB el siguiente objetivo de los estudios del grupo de Stanford, al co-cristalizar un complejo entre la RNAPol II y TFIIB, resolviendo su estructura a una resolución de 4.5 \AA , suficiente para trazar el esqueleto polipeptídico de las proteínas (29). En su mitad N-terminal, compuesta por un dominio de unión a Zn^{2+} y un lóbulo a guisa de «dedo», TFIIB interacciona con el extremo C-terminal de Rpb1, situándose próximo al túnel de salida del ARN y «poniendo su dedo» en el propio centro activo del holoenzima, donde estabilizaría el híbrido ADN-ARN en los momentos iniciales de la síntesis de este último. Por su parte, la mitad C-terminal de TFIIB, de estructura fundamentalmente α -helicoidal, pudo modelarse en interacción con TBP. Cuando el ARN sintetizado por el holoenzima sobrepasa el tamaño de unos diez nucleótidos desplazaría a TFIIB, quedando la RNAPol II libre de su anclaje a TBP-TATA para así recorrer el resto del ADN a transcribir.

El modelo actual de inicio de la transcripción, además de la RNAPol II, ADN/ARN, TBP y TFIIB, incluye otros factores generales cuyas estructuras han sido ya esbozadas mediante microscopía electrónica, tales como TFIIE-H, cuya actividad helicasa contribuye a la apertura de la doble hélice del ADN en el promotor, o TFIIF, que captura transitoriamente la hebra de ADN complementaria al molde (29). En los próximos años cabe esperar una eclosión de los estudios sobre el llamado *complejo mediador*, sobre cuya bioquímica

lleva años trabajando el grupo de Stanford. Recibe su nombre de su función de intermediario entre el holoenzima y la pléyade de factores transcripcionales que regulan específicamente la expresión de cada familia génica. Su primera descripción estructural a baja resolución simplemente muestra cómo envuelve, a modo de media luna, la RNAPol II (30). Vista la trayectoria científica de Roger Kornberg, podemos apostar que, para nuestro deleite, su curiosidad le llevará mucho más allá en el análisis de la estructura y función de este nuevo gigante macromolecular (20 subunidades, 1 millón de Da).

EPÍLOGO

En su conjunto, el trabajo de R. Kornberg ilumina con gran detalle la transcripción eucariótica, desde el reconocimiento de las secuencias promotoras por la proteína TBP, su interacción con factores transcripcionales generales y de éstos, a su vez, con la RNAPol II y, sobre todo, cómo actúan las subunidades del holoenzima en la incorporación y edición de ribonucleótidos complementarios a la hebra de ADN a transcribir, sin olvidar su actividad en la separación de las cadenas del ADN o la elucidación del mecanismo inhibitorio de una toxina clásica (α -amanitina).

Como es habitual ante el fallo de un premio del impacto social y con el prestigio científico del Nobel, no ha faltado en este caso la polémica. Por un lado, están quienes se han extrañado de que no hubiese un segundo galardonado, e incluso un tercero. A juicio de quien escribe estas líneas, aunque otros laboratorios han contribuido con estudios sobre la estructura de las RNAPol bacterianas (16, 17) y virales (23-25), una posible razón para su no inclusión habría sido que éstos no han alcanzado ni la profundidad ni la extensión del trabajo realizado por R. Kornberg, habiendo formulado hipótesis menos precisas sobre el mecanismo catalítico. Por otro lado, investigadores que han desbrozado con gran detalle la biología molecular de la activación transcripcional, sin embargo no llegaron a incluir la RNAPol como objeto principal de sus estudios (31, 32). En otro orden de cosas, desde alguna de las áreas más tradicionales de la Química se han escuchado voces reclamando la creación de una modalidad del Premio Nobel en Biología, reflejando el hecho de que

cuatro de los Nobel de Química de los últimos cinco años han reconocido hallazgos de naturaleza biológica. En palabras de nuestro común maestro, A. Klug, «*The whole way he (R. Kornberg) handled RNAPol material is beautiful Chemistry... The question is whether large molecules are part of Chemistry, and of course they are*» (33).

Aventurando una predicción, no sería de extrañar que los estudios sobre otro de los tres procesos esenciales en la transmisión de la información genética, la traducción del ARNm por los ribosomas, se vean reconocidos, en un futuro no muy distante, con el Premio Nobel. La estructura del ribosoma, una gigantesca maquinaria macromolecular que entronca directamente con el mundo prebiótico, ha sido desvelada (de nuevo mediante cristalografía de rayos-X, pero también con aportaciones de microscopía electrónica y bioquímicas) en los albores del nuevo siglo, incluyendo diversos estados funcionales y en interacción con ARNm, ARNt, cofactores proteicos y antibióticos de gran interés farmacológico (34-39). Sin embargo, en tal caso la decisión será aún más difícil para el comité Nobel de la Academia Sueca, pues los investigadores que han realizado una contribución relevante superan el número límite de tres fijado en los estatutos del galardón.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GIRALDO, R. (2003): Common domains in the initiators of DNA replication in *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*: Combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 533-554.
- (2) FREELAND JUDSON, H. (1995): *The eight day of Creation: Makers of the revolution in Biology*. Penguin books, Londres.
- (3) OCHOA, S. (1999): «La persecución de un hobby». En: *Escritos* (Gómez Santos, M., Ed), págs. 50-92. CSIC, Madrid.
- (4) KORNBERG, A. (1989): *For the love of enzymes: The Odissey of a biochemist*. Harvard U. Press, USA.
- (5) GRUNBERG-MANAGO, M. and OCHOA, S. (1955): Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 3165-3166.
- (6) FURTH, J. J.; HURWITZ, J. and ANDERS, M. (1962): The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. I: The purification and properties of ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 237: 2611-2619.
- (7) KORNBERG, A. (2000): Ten Commandments: Lessons from the enzymology of DNA replication. *J. Bacteriol.* 182: 3613-3618.

- (8) KORNBERG, R. D. (1974): Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*. 184: 868-871.
- (9) KORNBERG, R. D. and LORCH, Y. (1999): Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 98: 285-294.
- (10) LORCH, Y.; LAPOINTE, J. W. and KORNBERG, R. D. (1987): Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*. 49: 203-210.
- (11) DARST, S. A.; EDWARDS, A. M.; KUBALEK, E. W. and KORNBERG, R. D. (1991): Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16Å resolution. *Cell* 66: 121-128.
- (12) BLOW, D. (2002) Outline of Crystallography for Biologists. Oxford U. Press. UK.
- (13) FU, J.; GNATT, A. L.; BUSHNELL, D. A., JENSEN, G. J.; THOMPSON, N. E.; BURGUESS, R. R.; DAVID, P. R. and KORNBERG, R. D. (1999): Yeast RNA polymerase II at 5 Å resolution. *Cell*. 98: 799-810.
- (14) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A.; FU, J.; GNATT, A. L.; MAIER-DAVIS, B.; THOMPSON, N. E.; BURGUESS, R. R.; EDWARDS, A. M.; DAVID, P. R. and KORNBERG, R. D. (2000): Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*. 288: 640-649.
- (15) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*. 292: 1863-1876.
- (16) ZHANG, G.; CAMPBELL, E. A.; MINAKHIN, L., RICHTER, C., SEVERINOV, K. and DARST, S. A. (1999): Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*. 98, 811-824.
- (17) VASSYLYEV, D. G.; SEKINE, S.; LAPTENKO, O.; LEE, J.; VASSYLYEVA, M. N.; BORUKHOV, S. and YOKOHAMA, S. (2002): Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*. 417: 712-719.
- (18) GNATT, A. L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. 292: 1876-1882.
- (19) WESTOVER, K. D.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: Separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*. 303, 1014-1016.
- (20) WESTOVER, K. D.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: Nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*. 119: 481-489.
- (21) WANG, D.; BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D.; KAPLAN C. D. and KORNBERG, R. D. (2006): Structural basis of transcription: Role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*. 127: 941-954.
- (22) SOSUNOV, V.; SOSUNOVA, E.; MUSTAEV, A.; BASS, I.; NIKIFOROV, V. and GOLDFARB, A. (2003): Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J*. 22: 2234-2244.
- (23) TAHIROV, T. H.; TEMIAKOV, D.; ANIKIN, M.; PATIAN, V.; McALLISTER, W. T.; VASSYLYEV, D. G. and YOKOHAMA, S. (2002): Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature*. 420: 43-50.

- (24) TEMIAKOV, D.; PATIAN, V.; ANIKIN, M.; McALLISTER, W. T.; YOKOHAMA, S. and VASSYLYEV, D. G. (2004): Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase. *Cell*. 116: 381-391.
- (25) YIN, Y. W. and STEITZ, T. A. (2004): The structural mechanism of translocation and helicase activity of T7 RNA polymerase. *Cell*. 116: 393-404.
- (26) BUSHNELL, D. A.; CRAMER, P. and KORNBERG, R. D. (2002): Structural basis of transcription: Alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 1218-1222.
- (27) TEMIAKOV, D.; ZENKIN, N.; VASSYLYEVA, M. N.; PEREDERINA, A.; TAHIROV, T. H.; KASHKINA, E.; SAVKINA, M.; ZOROV, S.; NIKIFOROV, V.; IGARASHI, N.; MATSUGAKI, N.; WAKATSUKI, S.; SEVERINOV, K. and VASSYLYEV, D. G. (2005): Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Mol. Cell*. 19: 655-666.
- (28) CHASMAN, D. J.; FLAHERTY, K. M.; SHARP, P. A. and KORNBERG, R. D. (1993): Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 8174-8178.
- (29) BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D.; DAVIS, R. E. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Ångstroms. *Science*. 303: 983-988.
- (30) ASTURIAS, F. J.; JIANG, Y. W.; MYERS, L. C.; GUSTAFSSON, C. M. and KORNBERG, R. D. (1999): Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science*. 283: 985-987.
- (31) ROEDER, R. G. (2003): The eukaryotic transcriptional machinery: Complexities and mechanisms unforeseen. *Nat. Med*. 9: 1239-1244.
- (32) NAAR, A. M.; LEMON, B. D. and TJIAN, R. (2001): Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem*. 70: 475-501.
- (33) SANDERSON, K. (2006): Nobel Prize blurs boundaries. *Nature*. 443: 615.
- (34) WIMBERLY, B. T.; BRODERSEN, C. E.; CLEMONS, W. M.; MORGAN-WARREN, R. J.; CARTER, A. P.; VONRHEIN, C., HARTSCH, T. and RAMAKRISHNAN, V. (2000): Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407: 327-339.
- (35) BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; MOORE, P. B. and STEITZ, T. A. (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920.
- (36) SCHLUENZEN, F.; TOCILJ, A.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; GLUEHMANN, M.; JANELL, D.; BASHAN, A.; BARTELS, H.; AGMON, I.; FRANCESCHI, F. and YONATH, A. (2000): Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Ångstroms resolution. *Cell*. 102: 615-623.
- (37) ALLEN, G. S.; ZAVIALOV, A.; GURSKY, R.; EHRENBERG, M. and FRANK, J. (2005): The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. *Cell*. 121: 703-712.
- (38) SELMER, M.; DUNHAM, C. M.; MURPHY, F. V.; WEIXLBAUMER, A.; PETRY, S.; KELLEY, A. C.; WEIR, J. R. and RAMAKRISHNAN, V. (2006): Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.
- (39) KOROSTELEV, A.; TRAKHANOV, S.; LAURBERG, M. and NOLLER, H. F. (2006): Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell*. 126: 1065-1077.