

LINDAHL Y LA REPARACIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN

Lindahl and enzymatic DNA repair

JORGE ARÉVALO ZELADA ¹



RESUMEN

El autor nos relata cómo Tomas Lindahl resolvió la paradoja presentada por sus observaciones: la poca estabilidad del ADN versus la gran estabilidad de la información genética. Esto lo llevó a proponer la existencia de mecanismos enzimáticos reparadores del ADN. Asimismo, las contribuciones de Aziz Sancar y Paul Modrich, quienes trabajando con estos mecanismos reparadores del ADN en la *Escherichia coli* hallaron que también son válidos en los humanos.

Palabras claves: ADN, enzimas, reparación, genoma.

ABSTRACT

The author tells us how Tomas Lindahl resolved the paradox presented by observations: the low stability of DNA versus the great stability of the genetic information. This led him to propose the existence of DNA repair enzyme mechanisms. Likewise, the contributions of Aziz Sancar and Paul Modrich, who working with these repair mechanisms of DNA in *Escherichia coli* found that they are also valid in humans.

Key words: enzymes, DNA, repair, genome.

“En conjunto, nuestros tres laureados con el premio Nobel han explicado los mecanismos celulares básicos, a nivel molecular, que ayudan a resguardar la integridad de nuestros genomas”.

Fueron las palabras con las que el profesor Claes Gustafsson, miembro del comité de selección de los laureados del Premio Nobel de Química, finalizaba la presentación de los logros y contribuciones científicas de Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz

Sancar. Cada uno de ellos descubrieron por separado distintas moléculas y sus mecanismos por los cuales ellas reparan el ADN que es alterado químicamente de manera espontánea o por los insultos ambientales. Esos daños del ADN cambian la información contenida en la secuencia del ADN y son la base del envejecimiento y del cáncer.

La presente reseña es sobre uno de ellos, Tomas Robert Lindahl, científico nacido en Kungsholmen, Estocolmo, Suecia, el 28 de enero de 1938.

Lo que distingue al Dr. Lindahl entre los tres laureados es que además de haber identificado y caracterizado las moléculas que realizan procesos de reparación del ADN, fue el primero de todos en proponer que los ácidos nucleicos, RNA y ADN, se degradan de manera espontánea y constante, sin intervención de enzima alguna y a una velocidad incompatible con la vida. A partir de ello Lindahl predice que deben existir mecanismos biológicos de reparación del ADN. Consecuencia de ello, él y otros pioneros empezaron a definir los distintos tipos de reparación y los mecanismos moleculares que los sustentan. Esa idea fue revolucionaria en aquél entonces, mediados de los 1960s y 1970s del siglo XX, y sonaba a herejía ante los científicos que consideraban la

¹ Profesor principal, doctor en Ciencias. Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri, UPCH.

estructura del ADN inmutable intrínsecamente y que si existían mutaciones éstas ocurrían muy lentamente por razones aleatorias y en escalas de tiempo evolutivas. Era inconcebible que la frecuencia de cambios independientes del entorno fuese tan alta y, por lo tanto, la existencia de mecanismos de reparación eran impensables. ¿Como surgió esta idea revolucionaria?

Tomas Lindahl desde su época del Gymnasium, el equivalente a los últimos años de los estudios de secundaria en el Perú, había decidido tempranamente ingresar al Karolinska Medical School. Ya en la universidad Lindahl refiere que “se dio cuenta en una etapa temprana que podría no llegar a ser un buen doctor (médico) pero estaba fascinado por los temas teóricos, en particular Química Médica.” Como resultado de ello empezó como un estudiante graduado con el legendario químico del ADN, Einar Hammarsten. Este fue el primer científico que demostró que el ADN es una molécula muy grande y creó una escuela sueca importante. Personalmente, “él era como un gato, con intensos ojos verdes y, totalmente, temperamental e inspiracional.”⁽¹⁾

Es posible que el interés despertado en Lindahl por los ácidos nucleicos y lo reducido del mundo de investigadores dedicados a esas macromoléculas lo condujeran a realizar un post doctorado en 1965 en Princeton, EE.UU de N.A., bajo la jefatura del Dr. Jacques Fresco. Fue allí que al trabajar sobre la caracterización de la desnaturalización por temperatura de lo que se conocía como sRNA o tRNA. Como se sabe, estas moléculas de RNA son muy pequeñas y participan en la síntesis de proteínas. Su caracterización demandaba a Lindahl la purificación de esas moléculas a partir de cultivos de *E. coli*. Experimento tras experimento, al purificar el tRNA para realizar sus ensayos de desnaturalización, observó

que una proporción importante se degradaba a pesar que el preparado tenía un grado de pureza extremo y por lo tanto libre de enzimas. Este fenómeno se reproducía una y otra vez, con tasas de degradación similar del tRNA. Los recuerdos de Tomas Lindahl, expresados en el libro *Blue Skies and Bench Space. Adventures in Cancer Research*, son una época muy dura para un joven médico e investigador de 27 años trabajando en un laboratorio notable de trayectoria internacional.⁽¹⁾

Los aparentes bajos rendimientos eran atribuidos por sus compañeros a la degradación por contaminaciones enzimáticas, por la propia manipulación durante el proceso o provenían del ambiente. Tomas Lindahl menciona “Por lo tanto, el laboratorio de Fresco consideraba que los fracasos del nuevo post doc para lograr que sus experimentos eran signos de incompetencia, probablemente basadas en un doble discapacidad, el de ser sueco y el de ser un médico. El nuevo, ese joven post doc, tenía otras ideas. Yo había preparado el RNA y sabía que no estaba contaminado. Yo hice los experimentos una y otra vez e hice la trivial observación que el tRNA siempre se descomponía a la misma tasa. Si hubiese sido una nucleasa contaminante de manera accidental entonces las diferentes preparaciones serían diferentes, pero todas ellas se descomponían siempre a la misma tasa. Incluso escribí un artículo breve sobre ello, el cual fue tan aburrido para mi jefe que él no puso su nombre en ese reporte.” Esta narración explica de manera concreta la publicación solitaria de Tomas Lindahl en la prestigiosa revista *Journal of Biological Chemistry*, donde no aparece el nombre de J. Fresco.⁽²⁾ Estas experiencias lejanas en el tiempo fueron el origen de la llave que abriría años después el campo de la reparación del ADN.

Luego de su retorno a Suecia, utiliza sus resultados para escribir la tesis para optar el grado de doctor en 1967. Tres años después

de su doctorado en ciencias obtiene el grado de doctor en medicina. Ya encaminado como joven investigador con su propio grupo retoma la investigación de la inestabilidad de ácidos nucleicos en el Karolinska Institut, esta vez con la molécula responsable del almacenamiento estable de la información genética, el ADN. Su pregunta es simple: si el RNA es intrínsecamente inestable, ¿lo será también el ADN? No era un tema trivial. A diferencia del RNA, que tiene un tiempo de vida corto y cumple así su rol de portar información transitoria, el ADN debe portar una información estable a lo largo del tiempo, que perdure generación tras generación.

En 1972, Tomas Lindahl publica junto con Barbro Nyberg un artículo notable que debe ser considerado como referente del método científico. ⁽³⁾ Utilizando un enfoque cuantitativo impecable Lindahl demostró que la depurinación del ADN purificado ocurre a una tasa constante, que ella es independiente de la secuencia, que además puede ocurrir en condiciones presentes en la célula viva y, por último, que la tasa de pérdida de información biológica posee la misma cinética que la tasa de depurinación. Lo más notable de todo, que la magnitud es tal que de no existir un mecanismo de reparación del ADN la estabilidad de la información genética no sería posible. En ese texto declara *“Estos datos indican fuertemente que la depurinación del ADN ocurre a una tasa significativa desde el punto de vista fisiológico en condiciones in vivo y consecuentemente que las lesiones que se presentan de esta manera deben ser reparadas.”*

El intelecto de Tomas Lindahl responde a la paradoja presentada por sus observaciones, poca estabilidad del ADN versus la gran estabilidad de la información genética, con la propuesta de la existencia de mecanismos que reparan el ADN. Esa predicción lo lleva

a buscar fracciones celulares con actividad reparadora, a demostrar la existencia de esas enzimas y, posteriormente, a purificarlas e identificar los genes que las codifican. ⁽⁴⁾ El largo recorrido de esa aventura científica que mantuvo el foco en una pregunta esencial es resumido en varios artículos de revisión. ⁽⁵⁻⁸⁾

En base a la lectura de los hitos de los descubrimientos de Lindahl, y analizados de manera retrospectiva, uno piensa que la vida progresa de manera lineal. Sin embargo, cuando se considera el contexto, los eventos narrados con más detalle, el avance de esos descubrimientos ocurren de manera algo desordenada. Es evidente que a mediados de los 1970's el tema de reparación de ADN aún era imperceptible y que para poder acceder a soporte económico para sus proyectos de investigación era necesario trabajar en otras áreas “importantes”. Tomas Lindahl recuerda “Yo estaba realizando dos carreras en paralelo porque yo estaba haciendo el trabajo que me gustaba, reparación de ADN y metabolismo del ADN; y, mi jefe en Estocolmo, Peter Reichard, vino y dijo que todo está bien pero nadie más en Suecia lo está haciendo, por lo que sería bueno si hicieras algo más de tal forma que puedas hablar con gente.” Reichard sugirió la colaboración con la eminencia en virología Georg Klein, un miembro del Karolinska Institut, quien trabajaba en virus Epstein-Barr (EBV) y pensaba que el tiempo estaba maduro para que alguien empezara algo de biología molecular en EBV. La colaboración rápidamente rindió frutos, con Lindahl haciendo el enorme descubrimiento que el EBV se replicaba como un círculo discreto en vez de integrarse al genoma como la estrategia del SV40 y el poliovirus. ⁽⁹⁾ Esta contribución en el área de virología le dio una buena fama y atrajo la atención de otros investigadores.

Con el fortalecimiento de su carrera, y como

una etapa necesaria para lograr una posición permanente, Lindahl deja el Karolinska Institutet en 1978 y se muda a la Universidad de Gothenburg como profesor de medicina y química fisiológica. Fueron sus trabajos con el EBV que le llevaron a conocer a Beverly Griffin, investigadora del Imperial Cancer Research Fund (ICRF) del Reino Unido, quien también investigaba sobre el mismo virus. Ese encuentro, inicialmente profesional, derivó en un romance que llevó a Tomas Lindahl a mudarse al Reino Unido para trabajar junto a ella en 1981. En ese año fue nombrado jefe del Laboratorio de Mutagénesis del ICRF Mill Hill Laboratories en Londres. Su experticia en mutaciones calzaba perfectamente con la investigación en cáncer, donde para algunos científicos era clara la asociación entre la enfermedad y las mutaciones somáticas que se observaban en la secuencia del ADN. Es en ese momento que toma la decisión de dedicarse exclusivamente al tema de reparación del ADN y deja de lado los estudios del EBV.

Es en estos laboratorios de Mill Hill donde Tomas Lindahl produce otro hallazgo notable y que da origen a lo que él considera su artículo científico máspreciado. (10) No solo se trataba de la enzima O6-methylguanine-DNA methyltransferase, una enzima que removía los grupos metilo del ADN sino que ella misma unía covalentemente ese grupo a su propia estructura causando su autoinactivación. Más notable aún, esa actividad suicida la convertía en un factor de transcripción activado que estimulaba la síntesis de RNA de su propio gen. Como resultado de ello, el número de moléculas de la enzima aumentaba mientras durase el insulto alquilante del ADN.

Esa época de intensa investigación, coincide también con una expansión del ICRF que determina una mudanza de los investigadores de Biología del Desarrollo del Mill Hill hacia

un nuevo laboratorio en la Universidad de Oxford. El Dr. Walter Bodmer, jefe de Tomas Lindahl, estaba preocupado por conseguir una posición que se favoreciese el potencial de este notable investigador. Bodmer consideraba que las facilidades del edificio Lincoln's Inn Fields del ICRF ubicado en el centro de Londres no sería el ideal para el temperamento de Tomas. Coincidentemente las facilidades de servicios y el bioterio del Mill Hill y del Lincoln's Inn Fields se estaban unificando y se mudarían en 1986 a los Laboratorios Clare Hall en South Mimms, Hertfordshire, en las afueras de Londres, a una edificación abandonada que fuera un hospital para tuberculosis y viruela, y en un ambiente casi rural. Debido a las regulaciones locales de esa zona, las edificaciones no podían tener más de dos plantas. Ello calzaba perfectamente con la manera de hacer ciencia de Tomas Lindahl. En una entrevista, él afirmaba haber notado que, en Suecia, *“por alguna loca razón los científicos se comunican muy bien horizontalmente pero de manera muy pobre verticalmente. . Parece tonto pero, por alguna razón, un conjunto de escaleras es verdaderamente una barrera efectiva y que, caminando a lo largo de un corredor es mucho mas fácil. Y eso lo puedes ver en Lincoln's Inn Fields -el quinto, y el cuarto y el sexto piso eran diferentes imperios que no conversaban. La gente del mismo piso interactuaba estrecha y agresivamente pero al menos interactúan!”*

Es por eso que, desde 1984 y hasta el 2005, Tomas Lindahl es nombrado Director de Investigación del Clare Hall y decide que el trabajo científico se concentraría en la bioquímica y el metabolismo del ADN, basados en las tres erres: reparación, recombinación y replicación. Esta época fue muy rica en producción científica y bajo su conducción se proyecta como una institución renombrada a nivel internacional. Allí se produce en el 2001 su primer Nobel en Medicina o Fisiología, el

Dr. Tim Hunt, por su contribución sobre las ciclinas como factores claves que regulan el ciclo celular. Tim Hunt dice de Tomas Lindahl: *“Tomas era de una frescura cuando se comparaba con los profesores de bioquímica que él había conocido; estábamos ante un bioquímico verdadero quien se preocupaba y conocía de todo lo que pasaba. Toda su filosofía era tratar de reducir la barrera energética para hacer los experimentos. Él no era nada manipulador o intrigante. Él se complacía enormemente si tenías un buen resultado, aunque él era muy duro con la gente que no lo obtenía. La gente no duraba en el Clare Hall si ellos no podían alcanzar las metas.”*

Tomas Lindahl dejó la dirección en el 2005 a edad de los 67 años pero continuó con su laboratorio hasta el 2009. A partir de entonces, fue nombrado Líder Emérito de Grupo del Francis Crick Institute, conocido antes de marzo del 2015 como el London Research Institute, la institución de mayor financiamiento de investigación sobre cáncer en el Reino Unido y que se construyó sobre las bases del ICRF.

El premio Nobel otorgado a Tomas Lindahl fue precedido de reconocimientos notables, como la Royal Society's Royal Medal in 2007, el INSERM Prix Etranger in 2009 y la Copley

Medal de la Royal Society in 2010. Este último premio es el más antiguo en el mundo y entre los distinguidos se cuenta a Michael Faraday, Charles Darwin y, últimamente, Stephen Hawking, lo que nos dice de la magnitud de la obra de Tomas Lindahl.

A lo largo de esta semblanza de Tomas R. Lindahl se rescata el valor de la observación y la capacidad experimental cuantitativa para proponer una respuesta que rompe las creencias de toda una época. También nos permite apreciar el valor de la ciencia básica para dotar al ser humano de herramientas para mejorar su calidad de vida. Notamos, además, lo importante que son la persistencia y el enfoque para poder abordar un problema que inicialmente parece insuperable. Persistencia y enfoque que es llevado mas allá de la esfera individual para así poder construir equipos dedicados a la ciencia. Finalmente, la vida de Tomas Lindahl destaca por valorar el poder de la comunicación basada en hechos y a partir de allí construir una percepción cercana a la realidad del mundo biológico.

Si bien la presente reseña trata sobre Tomas Lindahl y su trabajo, no podemos dejar de mencionar brevemente los aportes de los



De izquierda a derecha: Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sanchar.

otros dos laureados con el premio Nobel. Aziz Sancar, investigador de origen turco y ciudadano norteamericano, quien trabajó desde inicios de los ochenta del siglo XX en la purificación y caracterización de las diferentes proteínas de *Escherichia coli* que eran responsables de la reparación mediante el mecanismo NER (de las siglas en inglés Nucleotide Excision Repair), continuado en los años noventa por el descubrimiento del modelo secuencial detallado del NER. El otro laureado con el Nobel, Paul Modrich, norteamericano, publicó en 1989 un artículo clásico donde demostró que era capaz de reconstituir un sistema purificado que cuando se ensamblaba con 10 actividades moleculares este era capaz de llevar a cabo la reparación del mal apareamiento o “mismatch repair”. Tanto Sancar como Modrich confirmaron que esos mecanismos en el modelo bacteriano de *E. coli* eran similares a los que están presentes en las células humanas y que son objeto de sus investigaciones actuales. ⁽¹¹⁾

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weston, Kathleen. Blue Skies and Bench Space. Adventures in Cancer Research. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014.
2. Lindahl T. (1967). Irreversibly heat inactivation of transfer ribonucleic acids. *J Biol Chem.* 242:1970-3.
3. Lindahl T & Nyborg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972;19: 3610-17.
4. Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974; 71: 3649-53.
5. Lindahl T. Inroads into base excision repair. I. The discovery of apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease. *DNA Repair.* 2004;3:1522-30.
6. Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T. Repair of alkylated DNA: Recent advances. *DNA Repair.* 2007;6: 429-442.
7. Joke Baute & Anne Depicker. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2008; 43:4, 239-276.
8. Lindahl T. My Journey to ADN Repair. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2013; 11: 2-7.
9. Adams A. & Lindahl T. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 1477-81.
10. Teo I, Sedgwick B, Kilpatrick MW, McCarthy TV & Lindahl T. The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. *Cell.* 1986; 45:315-24.
11. The Nobel Prize in Chemistry 2015. URL disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/

CORRESPONDENCIA:

Dr. Jorge Arévalo Zelada

e-mail: jorge.arevalo@upch.pe