



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Supresor del silenciamiento génico HC-Pro de los *Potyvirus* y su posible papel en la biotecnología

*Potyvirus* HC-Pro gene silencing suppressor and its possible role on biotechnology

Lázaro Javier de León-Batista<sup>1</sup>, Annia Hernández-Rodríguez<sup>1</sup> , Alejandro Fuentes-Martínez<sup>2</sup>, Acela Díaz-de la Osa<sup>1\*</sup> 

### RESUMEN

HC-Pro es una proteína multifuncional presente en los miembros del género *Potyvirus* y otros virus dentro de la familia *Potyviridae*. Hasta el momento, se han identificado al menos tres funciones principales para esta proteína: i) actúa como factor de transmisión del virus por insectos; ii) suprime el silenciamiento de ARN en la planta y iii) participa en la maduración de la poliproteína viral. Existen evidencias que demuestran que podría estar involucrada en otras funciones durante el ciclo viral., HC-Pro es utilizada en estudios biotecnológicos relacionados con diversos procesos celulares que se activan durante la interacción planta-patógeno, así como para la potenciación de la expresión de proteínas recombinantes en plantas. Este trabajo tuvo como objetivos realizar un análisis de la literatura relacionada con el papel de la proteína HC-Pro aislada del *Virus del grabado del tabaco* (TEV) como supresor del silenciamiento génico en plantas y su posible empleo en la biotecnología.

**Palabras clave:** HC-Pro, TEV, Potyvirus, PTGS, supresores virales, proteinasa, *Nicotiana benthamiana*, producción de proteínas recombinantes

### ABSTRACT

*HC-Pro is a remarkable multifunctional protein of the genera Potyvirus and other viruses within the family Potyviridae. At least three main functions have been identified for this protein i) helper component of insect transmission; ii) RNA silencing suppressor and iii) viral polyprotein maturation. Evidence shows that this protein could be involved in other functions during the viral cycle. Due to its activity HC-Pro is widely used in biotechnological studies related to different cellular process activated during plant-pathogen interaction. This protein is also employed in recombinant proteins production enhancement using plants as expression system. The aim of this work is to analyze the role reported in literature of HC-Pro from Tobacco etch virus as gene silencing suppressor in plants and to establish its possible applications in biotechnology.*

**Keywords:** HC-Pro, TEV, Potyvirus, PTGS, viral suppressors, proteinase, *Nicotiana benthamiana*, recombinant proteins production

1 Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba

2 Laboratorio de Virología Vegetal. División de Plantas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

\*Autor para correspondencia:  
[acela@fbio.uh.cu](mailto:acela@fbio.uh.cu)

Recibido: 2021-11-13

Aceptado: 2022-04 -22

## INTRODUCCIÓN

Las plantas representan un sistema de expresión empleado para la obtención de proteínas recombinantes (Fulton *et al.*, 2015). Estas son consideradas una alternativa atractiva de producción de proteínas complejas respecto a los sistemas de cultivo de levaduras y células de mamíferos debido a la generación de grandes volúmenes de biomasa, los bajos costos de su escalado y lo relativamente sencillo de la tecnología para su producción (Nogueira y Fermín, 2013). En sus inicios, la producción de proteínas heterólogas en sistemas vegetales se llevó a cabo mediante el desarrollo de plantas transgénicas (Gleba *et al.*, 2005). Sin embargo, el tiempo requerido para generar una planta transformada de manera estable es relativamente largo (Cañizares *et al.*, 2005) por lo que la producción de moléculas en sistemas expresión transitorios se ha convertido en una herramienta de gran impacto en la solución de requerimientos productivos de importancia global (Fulton *et al.*, 2015). La rapidez, flexibilidad y facilidad para ser empleada en tejidos completamente diferenciados permitieron su fácil introducción en las ciencias básicas y aplicadas.

En comparación con los sistemas estables, el sistema transitorio ofrece mayores rendimientos de la proteína de interés, el gen a expresar no se inserta en el cromosoma de la planta y, por tanto, no está sujeto al efecto de posición cromosomal, y es posible su escalado en menor tiempo. En este marco, surgieron metodologías para la expresión de proteínas mediante vectores virales y el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. Los vectores virales permiten la expresión de genes foráneos en niveles muy superiores a los obtenidos en una planta transformada de manera estable (Yusibov *et al.*, 1999). *Agrobacterium tumefaciens* permite la introducción de transgenes mediante la infiltración en el tejido de las hojas. Estos sistemas, aunque no conllevan a una expresión sistémica del transgen, permiten la alta acumulación local de proteínas recombinantes (Porta *et al.*, 1996). Además, facilitan la transformación de una misma célula con más de un transgen, lo que posibilita la expresión y ensamblaje de proteínas multiméricas como los anticuerpos (Vaquero *et al.*, 1999). A pesar de las ventajas que presenta el uso de la expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens*, existen diversos ejemplos donde se observó la disminución de la expresión del transgen entre los 3 y 4 días

posteriores a la infiltración, probablemente debido al efecto del mecanismo de silenciamiento génico (Johansen y Carrington, 2001; Martínez, 2006; Nova-López *et al.*, 2017). En tal sentido, los supresores de silenciamiento se promueven como potenciadores de la expresión en los sistemas transitorios (Huang *et al.*, 2018).

Los supresores virales son proteínas codificadas por el virus que le permiten evadir el mecanismo del silenciamiento génico. En las plantas, el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) opera como un mecanismo de defensa antiviral (Ratcliff *et al.*, 1999; Voinnet, 2001). Por esta razón, la mayoría de los virus han evolucionado y codifican para proteínas con actividad supresora (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998; Voinnet, 2001). Hasta el momento se han descrito más de 20 supresores virales que abarcan casi todas las familias de virus que infectan plantas (Anand *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018).

Debido a su papel inhibitorio del silenciamiento del ARN, los supresores virales son utilizados de manera satisfactoria para potenciar la expresión de transgenes, tanto de manera estable como transitoria, dentro de los cuales se destacan las proteínas p19 y HC-Pro, pertenecientes a los géneros *Tombusvirus* y *Potyvirus*, respectivamente (Anand *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018). Particularmente, la proteína HC-Pro codificada por el Virus del grabado del tabaco (TEV), ha sido ampliamente caracterizada por lo que constituye una candidata ideal para estudios de expresión transitoria de genes en plantas.

Este trabajo tuvo como objetivo analizar la literatura relacionada con la proteína HC-Pro aislada del *Virus del grabado del tabaco* como supresor del silenciamiento génico en plantas y su posible empleo en la biotecnología.

## DESARROLLO

### Estructura y funciones de la proteína HC-Pro

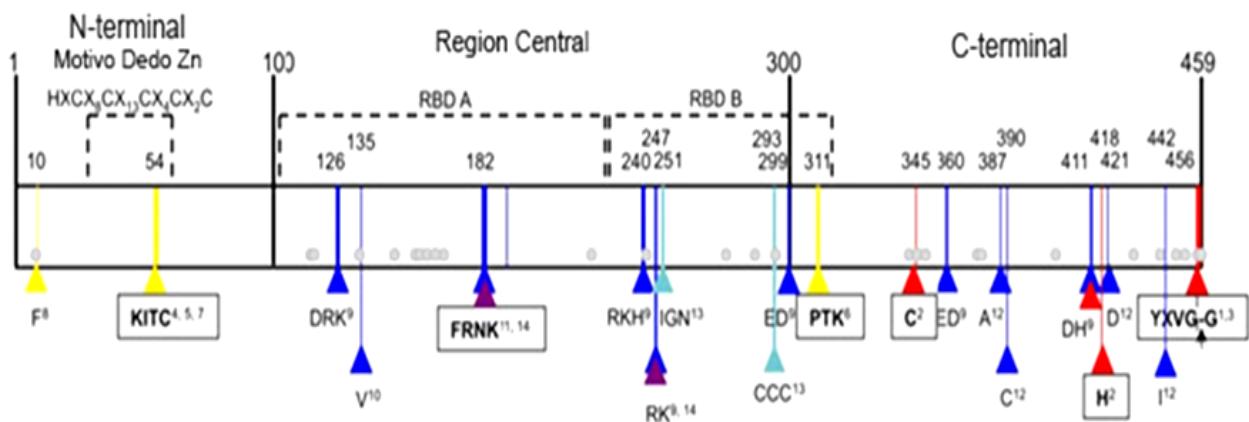
H-CPro es una proteinasa que actúa en *cis* y reconoce su sitio de corte en un di- péptido de glicina en su extremo C-terminal (Carrington *et al.*, 1989a, b) (Guo *et al.*, 2011). Alrededor de este sitio se estableció la secuencia consenso YXVGG que es reconocida por HC-Pro (Carrington y Herndon, 1992). Mediante la técnica de mutagénesis dirigida identificaron dos residuos en su secuencia -una

cisteína y una histidina-, responsables de su actividad proteolítica. Estos hallazgos permitieron ubicar a HC-Pro en la familia de las proteasas de tipo cisteína (Oh y Carrington, 1989).

Esta proteína se puede dividir en tres dominios (Fig. 1). Las posiciones indicadas corresponden a HC-Pro del Virus del grabado del tabaco: una región N-Terminal (aminoácidos 1-100) requerida para la transmisión por áfidos; una región central (aminoácidos 101-299) que participa en la supresión del silenciamiento del ARN y una región C-Terminal (aminoácidos 300-459) que alberga la actividad proteolítica (Hasiow-Jaroszewska *et al.*, 2014). Está descrita, además, la presencia de un dominio del tipo dedos de zinc (del inglés “zinc fingers domain”) que incluye un motivo KITC asociado a la

transmisión mediada por áfidos (Atreya y Pirone, 1993). En la región central se localizan dos motivos relevantes para el movimiento viral (Cronin *et al.* (1995). En esta región, también se localizan los aminoácidos que intervienen en la amplificación del genoma y en el movimiento viral (Valli *et al.* 2014).

Las actividades supresoras del silenciamiento y proteolítica, funcionan de manera independiente, aunque una mutación en el extremo C-terminal de la proteína afecta ambas funciones. Esto enmarca a la región con actividad proteolítica como necesaria para la supresión del silenciamiento, probablemente, por estar involucrada en el plegamiento de la proteína (Kasschau y Carrington, 2001).



**Figura 1.** Representación esquemática de HC-Pro de TEV, dividida en los dominios N terminal, región central y C terminal. Los aminoácidos relevantes para una función dada están marcados con triángulos en sus posiciones correspondientes (azul para actividad RSS, amarillo para transmisión por áfidos, naranja para actividad proteolítica y violeta para potenciación del rendimiento de la producción de partículas virales). Los aminoácidos necesarios para el movimiento viral (azul claro) fueron descritos antes de caracterizar la actividad supresora del silenciamiento génico. Los círculos grises representan inserciones de pentapéptidos que originaron una HC-Pro de Plum pox virus (PPV) no funcional en cuanto a la actividad supresora del silenciamiento; están colocados en las posiciones equivalentes para TEV. Modificado de Valli *et al.* (2018).

**Figure 1.** Schematic representation of HCPro of TEV, divided into three main regions. Amino acids relevant to a given function are highlighted with triangles in their corresponding positions (blue for RSS activity, yellow for aphid transmission, orange for proteolytic activity, and violet for enhancing the yield of viral particle production). Necessary aminoacids for viral movement (light blue) were described before characterizing gene silencing suppression activity. The gray circles represent pentapeptide insertions that resulted in a Plum pox virus (PPV) HCPro not functional in terms of suppressing silencing activity; they are placed in the equivalent positions for TEV. Modified from Valli *et al.*, 2018.

Yap *et al.* (2009) realizaron un estudio en Papaya ringspot virus (PRSV) y demostraron que la región amino terminal también está involucrada en la infección sistémica del calabazín calabacín. Mediante la utilización de mutantes, también se informó que la región central tiene afinidad por ARN de manera inespecífica (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000) se propuso que esta región (central) de la proteína tiene dos dominios (A y B) que se unen al ARN de manera independiente. Además, que existe otro motivo denominado FRNK que se sobrepone con el dominio A que está involucrado en la actividad supresora del silenciamiento de ARN (Shiboleth *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). Ambos dominios son ricos en hélices  $\alpha$  y están separados por una constricción flexible de alrededor de 95 residuos aminoacídicos y un dominio de bisagra compuesto por hojas  $\beta$ , fundamentalmente (Plisson *et al.*, 2003).

HC-Pro normalmente adopta una estructura cuaternaria compleja (Thornbury *et al.*, 1985). Estudios bioquímicos que incluyeron experimentos de transmisión por áfidos demostraron que esta proteína se encuentra activa en forma de dímero o trímero (Plisson *et al.*, 2003; Thornbury *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1999). Además, se confirmó la presencia de tetrámeros u oligómeros de mayor orden en solución. En HC-Pro de TEV, purificada de plantas infectadas, se confirmaron estos estados de oligomerización mediante microscopía electrónica. Paralelamente a las observaciones de dímeros, tetrámeros y hexámeros en solución, se propuso un modelo ajustado que propone una orientación antiparalela de los monómeros en forma de V, al menos en el caso de TEV (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005).

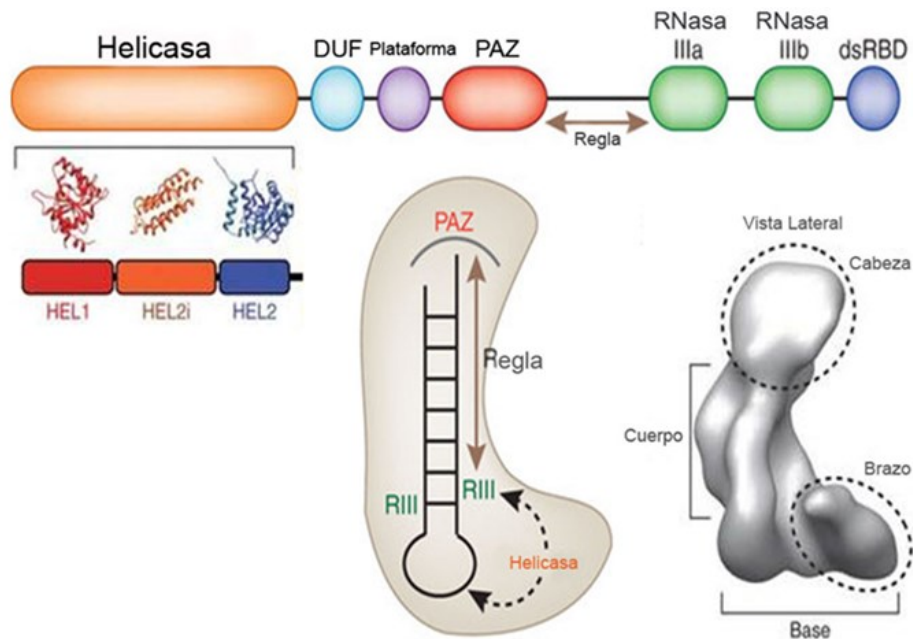
### El silenciamiento del ARN y la actividad supresora de HC-Pro

El silenciamiento de ARN es un mecanismo regulatorio secuencia-específico altamente conservado que desaparezca la expresión de genes en los niveles transcripcional, post transcripcional y traduccional (Castel y Martienssen, 2013). Inicialmente, este mecanismo se identificó en plantas como un sistema de defensa contra los virus y transposones. Sin embargo, se ha demostrado que desempeña un papel importante en el desarrollo

animal y de las plantas por su relación con el control de la expresión génica (Agris, 2005). Toda su maquinaria está formada por módulos que se sobrepone parcialmente y se activan en presencia de moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). Estos ARNdc pueden generarse a partir de transgenes, de genes endógenos o por la infección de virus (Bologna y Voinnet, 2014; Castel y Martienssen, 2013; Chang *et al.*, 2012). Este mecanismo puede guiar la modificación epigenética en el ADN cromosomal por el mecanismo de metilación del ADN (RdDM, por sus siglas en Inglés RNA-directed DNA methylation), regulando la formación de la heterocromatina, fenómeno que se conoce como silenciamiento génico transcripcional (TGS, por sus siglas en Inglés).

En el caso de las plantas, por ejemplo, está bien establecido que los virus generan ARNdc como consecuencia de: (i) la replicación viral; (ii) la tendencia del ARN a plegarse formando estructuras de tipo horquilla; y (iii) producto de la transcripción bidireccional de los ARN mensajeros. Primero estos ARNdc son reconocidos y procesados por enzimas RNasa tipo III pertenecientes a la familia DICER (Figura 2), que los corta en fragmentos (viARN) de 21-24 nucleótidos. Otra tanda de viARNs se deriva de los ARNdc sintetizados de novo por la acción de ARN polimerasas ARN-dependientes (RDRs). Estos, después de ser estabilizados vía HUA enhancer 1 (HEN1), que metila los extremos 3' de estos viARNs, son reclutados por los complejos Argonauta (AGO), donde solo la denominada "cadena guía" es retenida para dirigir el complejo hacia secuencias de ARN complementarias. Estos ARN complementarios son degradados por el complejo proteico RISC (Complejo inducido de silenciamiento) (Bronkhorst y van Rij, 2014; Chang *et al.*, 2012; Szittyá y Burgyan, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

Durante su evolución, los virus desarrollaron diversas funciones para contrarrestar el silenciamiento del ARN viral. La función más efectiva es la de supresor del silenciamiento de ARN (RSS), con la capacidad de bloquear o interferir con este mecanismo. Se demostró que la actividad supresora de algunas proteínas virales coexiste con otras funciones que potencian la capacidad del virus de contrarrestar el mecanismo de silenciamiento.



**Figura 2.** Modelo que representa la estructura de la enzima DICER. El dominio PAZ reconoce dos nucleótidos protuberantes en el extremo 3' de un ARNdc. Los dominios RNAasa III forman un pseudodímero. Cada dominio RNAasa III hidroliza una cadena del ARN. El sitio de unión de dsRBD al ARNdc no está definido. La función del dominio helicasa no se conoce. Modificado de Sawh *et al.*, 2012.

**Figure 2.** DICER enzyme structure representing model. PAZ domain recognizes two protruding nucleotides at the 3' end of a dsRNA. The RNAase III domains form a pseudodimer. Each RNAase III domain hydrolyzes a strand of RNA. The binding site of dsRBD to dsRNA is undefined. The function of the helicase domain is not known. Modified from Sawh *et al.*, 2012

Los supresores del silenciamiento se describieron en numerosos genomas virales, sin embargo, estas proteínas son estructuralmente diversas y sin motivos comunes, lo que podría estar relacionado con la función que debe desarrollar dentro del ciclo de replicación viral. Este comportamiento indican que evolucionaron de manera independiente en los diferentes grupos virales (Voinnet, 2005).

En teoría, los virus pueden contrarrestar el silenciamiento génico de tres maneras diferentes: previendo la generación de ARNi, inhibiendo la incorporación de ARNi en el complejo efector e interactuando con uno de los componentes del complejo efector (Agrios, 2005). Hasta el momento, se conoce poco sobre el mecanismo de acción de los supresores de origen viral. Uno de los supresores más estudiados es la proteína **P19** de *Tombovirus*. El mecanismo molecular de la actividad supresora de P19 está relacionada con la unión a los ARNi de 21 nucleótidos impidiendo la incorporación de estos al

complejo RISC (Danielson *et al.*, 2016). La estructura tridimensional de este modelo fue dilucidada por cristalografía de rayos X, demostrándose que el complejo P19-ARNi es un dímero que actúa como un calibrador de ARNdc, uniendo los extremos del dúplex de ARNi (Jiang *et al.*, 2012).

Otro de los supresores mejores descritos es el **P21** de *Beet yellow virus* (BYV) que actúa de manera similar a P19 (Sinha, 2017). Por otra parte, Po de *Poleovirus* interactúa con la proteína AGO1 del complejo RISC, activando componentes celulares de la cascada de las ubiquitinas que la marcan para la degradación por los proteosomas (Zhou *et al.*, 2017).

El primer RSS que se describió fue HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998). Varios estudios revelan que esta proteína puede contrarrestar la defensa de la planta basada en el silenciamiento, actuando en múltiples pasos de la cascada de señales. Un dato interesante es que solo HC-Pro de *Potyvirus* y *Rymovirus* parecen tener

actividad supresora, por lo que en miembros de los restantes géneros esta función pudiera recaer en otra proteína (Giner *et al.*, 2010; Mingot *et al.*, 2016; Tatineni *et al.*, 2012; Untiveros *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2012). En 2006, Lakatos *et al.* describieron que HC-Pro actúa de manera similar a P19 de *Tombusvirus*, impidiendo la carga de los viARN en el complejo efector del silenciamiento, ya que se une directamente a estas moléculas de manera talla-específica. Sin embargo, aunque el secuestro de viARNs parece ser un mecanismo muy común en las HC-Pro de diversos potyvirus, existen otras propuestas alternativas. Por ejemplo, se descubrió que interfiere en la metilación de los extremos 3' de los viARN, tanto inhibiendo la producción de grupos metilo a través de la interrupción del ciclo de la metionina (Ivanov *et al.*, 2016; Soitamo *et al.*, 2011), o por interacción directa e inhibición de HEN1 (Jamous *et al.*, 2011). Se describió, también, que HC-Pro interfiere con los complejos efectores que contienen AGO en infecciones de TEV y *Potato virus A* (PVA). En el primer caso aumenta la expresión de miR168 que tiene dentro de sus dianas al ARNm de AGO1 (Varallyay y Havelda, 2013). En el segundo caso interactúa directamente con AGO1 en el complejo ribosomal (Ivanov *et al.*, 2016). Además, se describió que HC-Pro de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) puede interferir con el paso de amplificación mediado por las RDR, inhibiendo la transcripción de los ARNm de RDR6 (Zhang *et al.*, 2008). Por último, también se observó que HC-Pro bloquea una señal de silenciamiento a larga distancia generada por la infección viral (Delgadillo *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2002; Pfeffer *et al.*, 2002) (Figura 3). Teniendo en cuenta resultados precedentes (Lewsey *et al.*, 2016; Melnyk *et al.*, 2011; Molnar *et al.*, 2010), se podría plantear la hipótesis que los viARNs se mueven por toda la planta a través del sistema vascular, y que HC-Pro bloquea esta señal de silenciamiento sistémico interactuando directamente con los viARNs y secuestrándolos en el tejido infectado. Sin embargo, determinados factores del hospedante también son relevantes para la supresión del silenciamiento mediada por HC-Pro.

Por ejemplo: rgs-CaM de tabaco, una proteína relacionada con la calmodulina, interactúa directamente con HC-Pro de TEV y funciona como un RSS endógeno (eRSS) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Además, se descubrió que el factor de la transcripción relacionado con ABI3/VP1.2 (RAV2) etileno-inducido de *Arabidopsis thaliana* es

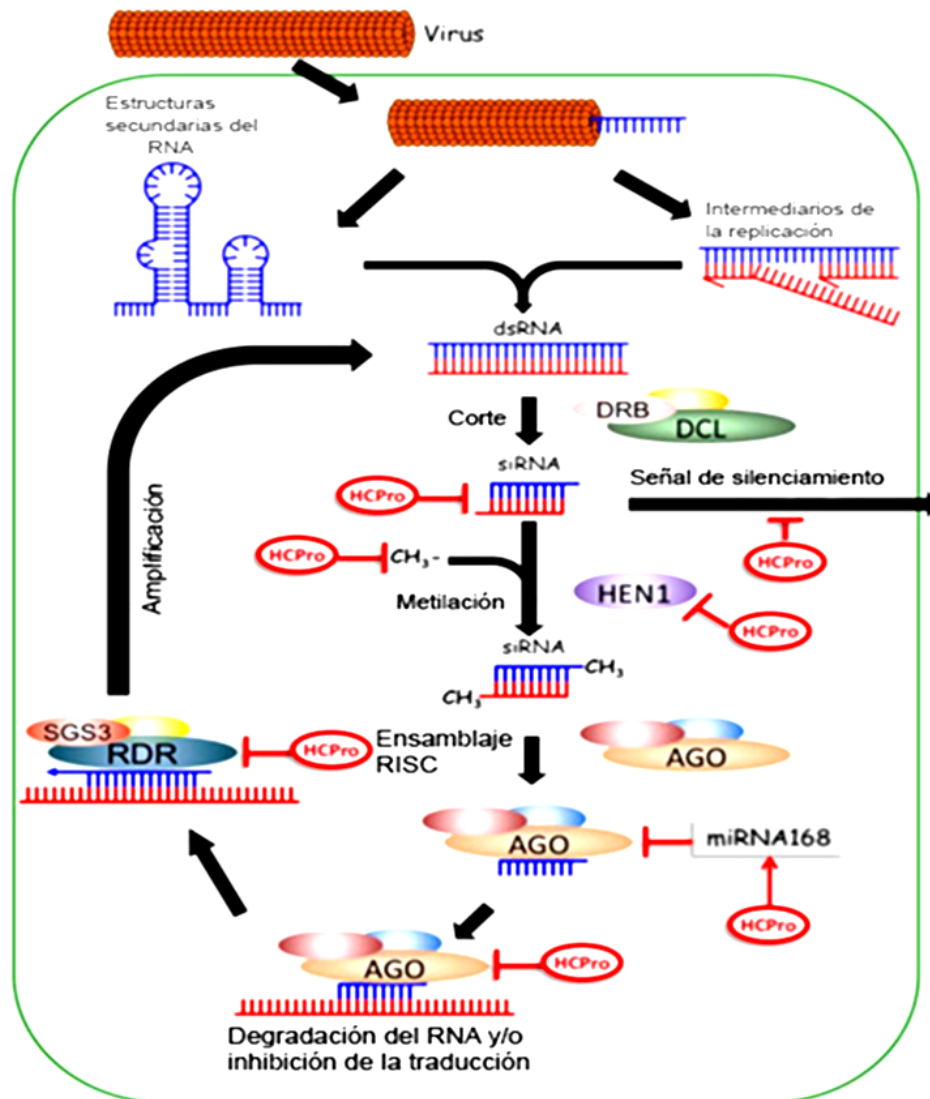
requerido para la actividad RSS de HC-Pro de *Turnip mosaic virus* (TuMV); ambas proteínas interactúan e inducen la transcripción de ciertos eRSS, incluyendo CML38, que parece ser el homólogo de rgs-CaM en *A. thaliana* (Endres *et al.*, 2010).

### Otras funciones de HC-Pro

Además de sus actividades proteolíticas y RSS, y de constituir un factor de transmisión por afidos, HC-Pro cumple otras funciones durante el ciclo de replicación de los potyvirus. Por ejemplo, se demostró que HC-Pro de muchos potyvirus inhibe la actividad del proteosoma 20S (Ballut *et al.*, 2005). Además, esta proteína altera la morfología y el número de cloroplastos, lo que conlleva a una disminución en los niveles de la fotosíntesis en los tejidos infectados (Tu *et al.*, 2015). En el caso de *Papaya ring spot virus* (PRSV), HC-Pro interactúa con la calreticulina de papaya (PaCTR) disminuyendo la capacidad de unirse al calcio, interrumpiendo así numerosas vías de defensa de la planta que dependen de este ion como segundo mensajero (Shen *et al.*, 2010). Existe evidencia de que HC-Pro de diferentes potyvirus como PVA, PVY y TEV posee un dominio en la región C terminal que interactúa con los factores de iniciación de la traducción eIF(iso)4E y eIF4E de papa y tabaco por lo que podría estar involucrada en la formación del complejo de iniciación de la traducción (Ala-Poikela *et al.*, 2011). La inducción de mutaciones en esta región produce una disminución de la actividad supresora del silenciamiento de ARN (Hafren *et al.*, 2015).

### Aplicaciones de HC-Pro en la Biotecnología

El silenciamiento de ARN tiene un alto impacto en la expresión de transgenes y hace más complejo el análisis de los fenotipos. Diversos estudios han planteado la ocurrencia de silenciamiento de transgenes en la etapa de desarrollo y en las generaciones subsecuentes (Butaye *et al.*, 2004; Birch, 1997; Bhat, 2002). Muchas líneas transgénicas seleccionadas a menudo producen poca o ninguna proteína recombinante, a pesar de ser positivas en las técnicas de *blotting* (Scholthof *et al.*, 2007). Una de las estrategias que buscan solucionar este problema es la co-expresión de supresores virales para prevenir esta respuesta adversa e incrementar los niveles de expresión de transgenes (Huang *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Representación esquemática simplificada del silenciamiento génico y los pasos de la cascada en los que actúa HC-Pro para bloquear la respuesta de defensa de la planta. AGO: proteína argonauta; DCL: proteínas tipo DICER; DRB: proteínas de unión al ARNdc; HEN1: potenciador HUA; RDR: ARN polimerasa ARN dependiente; RISC: complejo inducido de silenciamiento de ARN; SGS3: supresor del silenciamiento génico 3. Tomado de Valli *et al.* (2018).

**Figure 3.** Simplified schematic representation of gene silencing and the cascade steps in which HCPro acts to block the defense response of the plant. AGO: argonaut protein; DCL: DICER-like proteins; DRB: dsRNA binding proteins; HEN1: HUA enhancer; RDR: RNA dependent RNA polymerase; RISC: induced RNA silencing complex; SGS3: gene silencing suppressor 3. From Valli *et al.*, 2018.

Por ejemplo, en 2002, Mallory *et al.* cruzaron plantas transgénicas que expresaban HC-Pro de TEV con líneas que contenían el amplión de PVX, un vector de replicación independiente que portaba el gen reportero *uidA*. Para las líneas del amplicón se esperaba que acumularan altos niveles de la proteína reportera debido a la replicación viral, sin embargo, esto no ocurría así debido al PTGS. Contrastando con este resultado, las plantas resultantes del cruce mostraron un drástico aumento en la replicación viral y, por tanto, en la expresión de *uidA*, que llegó a constituir hasta un 3% de la proteína total soluble.

Estrategias similares a la anterior fueron utilizadas para aumentar el rendimiento en la expresión transitoria de transgenes en plantas, mediada por *Agrobacterium*. Este método constituye un enfoque rápido, flexible y reproducible para expresar proteínas biológicamente activas. Para ello se realiza la infiltración en las hojas de la planta de una cepa recombinante de *Agrobacterium tumefaciens*, que porta en la región T-DNA del plasmidio Ti el transgen de interés (McCullen y Binns, 2006).

Una de las ventajas de este sistema es su capacidad de transferir muchos transgenes a una misma célula, lo cual permite que proteínas éútméricas como anticuerpos puedan ser expresados y ensamblados (Vaquero *et al.*, 1999). En principio, este sistema debe permitir altos niveles de expresión, sin embargo, su utilidad se encuentra limitada, y generalmente la expresión de las proteínas de interés cesa a los dos o tres días debido a la activación del silenciamiento de ARN. Por tanto, la co-infiltración con un supresor de origen viral aumenta considerablemente los niveles de expresión (Johansen y Carrington, 2001; Voinnet *et al.*, 2000).

#### Desventajas de la utilización de HC-Pro

Debido a que los diferentes módulos del silenciamiento de ARN en plantas se superponen parcialmente, a menudo los RSS interfieren no solo con la parte antiviral del proceso, sino también con los módulos que controlan el desarrollo de la planta. Esta idea está sustentada en el hecho de que las plantas que expresan HC-Pro de manera constitutiva usualmente presentan defectos pleiotropicos del desarrollo asociados con problemas en la función de los miARN (Chapman *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2002).

En 2005, Mlotshwa *et al.* observaron que la sobreexpresión de la proteína Dicer 1, encargada de la síntesis de los miARNs, disminuía las anomalías en el desarrollo causadas por HC-Pro, pero no corregía los efectos de los miARNs. Esto sugiere que el papel de HC-Pro en la interrupción del desarrollo normal de la planta recae en uno o unos pocos factores controlados por miARNs. En concordancia con esto se concluyó que la interrupción del Factor de Respuesta por Auxina 8, regulado por miR167 es la principal causa de las anomalías en el desarrollo de las plantas transgénicas (Jay *et al.*, 2011).

No se puede asegurar todavía si la interferencia de HC-Pro con los distintos módulos del silenciamiento de ARN es un efecto colateral de la supresión del silenciamiento o una estrategia viral para favorecer el proceso infeccioso. Para analizar estas opciones se diseñaron experimentos que intentaron aclarar este tema. Por ejemplo, se introducen numerosas mutaciones en HC-Pro de TEV y se evaluaron no solo los efectos de estos cambios en la actividad supresora, (Torres- Barceló *et al.*, 2008) sino, también, en la capacidad infectiva en plantas de tabaco, el hospedante natural de TEV. Esta investigación demostró que las variantes hipersupresoras de HC-Pro rápidamente evolucionaron hacia unas variantes con actividad moderada, tipo salvaje, lo que sugiere que la actividad de HC-Pro se ajusta durante la infección por TEV para minimizar los efectos colaterales del bloqueo de las vías del silenciamiento (Torres-Barceló *et al.*, 2010).

#### Consideraciones generales

El silenciamiento génico constituye un mecanismo modulador de la expresión génica. Su efecto es relevante en los estudios relacionados con la introducción de genes foráneos en plantas. El análisis de la actividad de supresores de origen viral pudiera contribuir a diseñar nuevas estrategias para la producción de proteínas recombinantes en plantas. Por otra parte, el uso de estas proteínas como herramienta de regulación pudiera aportar al estudio de la interacción virus-planta.

#### LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2005. Plant Diseases caused by Viruses. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academia Press: 724-820  
Ala-Poikela M., E. Goytia, T.Haikonen, M.L. Rajamaki y J.P.T.

- Valkonen (2011). Helper component proteinase of genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E that contains a 4E binding motif. *J. Virol.* 85, 6784–6794.
- Anand A., S. Murkherjee y N. Mishra (2013). Tools for pathogenicity: virus encoded RNA silencing suppressors. *Biology*.
- Anandalakshmi R., G.J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, A.C. Mallory, T.H. Smith y V.B. Vance (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13 079–13 084.
- Anandalakshmi R., R. Marathe, X. Ge, J.M. Jr Herr, C. Mau, A. Mallory, G. Pruss, L. Bowman y V.B. Vance (2000). A calmodulin-related protein that suppresses postranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 290, 142–144.
- Atreya C.D. y T.P. Pirone (1993) Mutational analysis of the helper component proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11 919–11 923.
- Ballut L., M. Drucker, M. Pugniere, F. Cambon, S. Blanc, F. Roquet, T. Candresse, H.P. Schmid, P. Nicolas, O. Le Galland, S. Badaoui (2005) HC-Pro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J. Gen. Virol.* 86, 2595–2603.
- Bhat S.R., S. Srinivasan (2002) Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Sci.* 163:673-681.
- Birch R.G. (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:297–326.
- Bologna N.G. y O. Voinnet (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 473–503.
- Butaye K.M., I. Goderis, P.F. Wouters, J.M. Poes, *et al.* (2004) Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *The Plant J.* 39:440–449.
- Brigneti G., O. Voinnet, W.X. Li, L.H. Ji, S.W. *et al.* (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17, 6739–6746.
- Bronkhorst A.W. y R.P. van Rij (2014) The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr. Opin. Virol.* 7, 19–28.
- Cañizares M. C., L. I. Z. Nicholson y G. P. Lomonosoff (2005) Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and cell biology.* 83(3): 263-270.
- Carrington J.C. y K.L. Herndon (1992) Characterization of the potyviral HC-Pro autoproteolytic cleavage site. *Virology*, 187, 308–315.
- Carrington J.C., S.M. Cary, T.D. Parks y W.G. Dougherty (1989a) A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8, 365–370.
- Carrington J.C., D.D. Freed y T.C. Sanders (1989b) Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J. Virol.* 63, 4459–4463.
- Castel S.E. and R.A. Martienssen (2013) RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 14, 100–112.
- Chang S.S., Z. Zhang y Y. Liu (2012) RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 305–323.
- Chapman E.J., A.I. Prokhnovsky, K. Gopinath, V.V. Dolja *et al.* (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18: 1179–1186
- Cronin S., J. Verchot, R. Haldeman-Cahill, M.C. Schaad *et al.* (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*, 7, 549–559.
- Danielson D. C., N. Sachrajda, W. Wang, R. Filip, *et al.* (2016). A novel p19 fusion protein as a delivery agent for short-interfering RNAs. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5, e303.
- Delgadillo M.O., P. Saenz, B. Salvador, J.A. Garcia *et al.* (2004) Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J. Gen. Virol.* 85, 993–999.
- Endres M.W., B.D. Gregory, Z., Gao, A.W. Foreman, *et al.* (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* 6, e1000729.
- Fulton A., H. Lai, Q. Chen y C. Zhang (2015). Purification of monoclonal antibody against Ebola GP1 protein expressed in *Nicotiana benthamiana*. *J Chromatogr A.* 1389:128-132.
- Giner A., L. Lakatos, M. Garcia-Chapa, J.J. Lopez-Moya y J. Burguan (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.* 6, e1000996.
- Gleba Y., V. Klimyuk y S. Marillonet (2005) Magniffection: a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23 (17):2042-2048.
- Guo B.H., J.Z. Lin, K.Q. Ye (2011). Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *J. Biol. Chem.* 286, 21937–21943.
- Hafren A., A. Lohmus y K. Makinen (2015) Formation of Potato Virus A induced RNA granules and viral translation are interrelated processes required for optimal virus accumulation. *PLoS Pathog.* 11
- Hamilton A., O. Voinnet, L. Chappell y D. Baulcombe (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671–4679.
- Hasiow-Jaroszewska B., M.A. Fares y S.F. Elena (2014) Molecular evolution of viral multifunctional proteins: the case of Potyvirus HC-Pro. *J.Mol. Evol.* 78, 75–86.
- Huang T.K., W. Bryce, M. Abhaya, M. Karen (2018) Enhancement of Recombinant Protein Production in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plant Cell Suspension Cultures with Co-Cultivation of Agrobacterium Containing Silencing Suppressors. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1561
- Ivanov K.I., K. Eskelin, M. Basic, S. De, A. Lohmus, *et al.* (2016) Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HC-Pro. *Plant J.* 85, 30–45.
- Jamous R.M., K. Boonrod, M.W. Fuellgrabe, M.S. Ali-Shtayeh, G. Krczal *et al.* (2011) The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 92, 2222–2226.
- Jay F., Y. Wang, A. Yu, L. Taconnat, *et al.* (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog.* 7, e1002035.

- Jiang L., C. Wei y Y. Li (2012). Viral suppression of RNA silencing. *Science China Life Sciences*, 55(2), 109-118.
- Johansen L.K. y J.C. Carrington (2001) Silencing on the spot: Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium* mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126:930–938.
- Kasschau K.D. y J.C. Carrington (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95, 461–470.
- Kasschau K.D. y J.C. Carrington (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology*, 285, 71–81.
- Kasschau K.D., Z.X. Xie, E. Allen, C. Llave, E.J. Chapman, K.A. Krizan y J.C. Carrington (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell*, 4, 205–217.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., *et al.* (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768–2780.
- Lewsey M.G., T.J. Hardcastle, C.W. Melnyk, A. Molnar, *et al.* (2016) Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, E801–E810.
- Mallory A.C., B.J. Reinhart, D. Bartel, V.B. Vance, *et al.* (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:15228–15233.
- Martínez W. M. (2006) El silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional y la producción de anticuerpos en plantas. Tesis en opción al título de licenciado. Universidad de La Habana
- McCullen C.A., A.N. Binns (2006) *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 101–127
- Melnyk C.W., A. Molnar, A. Bassett y D.C. Baulcombe (2011) Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 21, 1678–1683.
- Mingot A. A. Valli, B. Rodamilans, D. San Leon, Baulcombe D.C., J.A. Garcia y J.J. Lopez-Moya (2016) The P1N-PISPO trans-frame gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor. *J. Virol.* 90, 3543–3557.
- Mlotshwa S., S.E. Schauer, T.H. Smith, A.C. Mallory, *et al.* (2005) Ectopic DICERLIKE1 expression in P1/HCPro *Arabidopsis* rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *Plant Cell*, 17:2873–2885.
- Molnar, A., C.W. Melnyk, A. Bassett, T.J. Hardcastle, *et al.* (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328, 872–875.
- Noguera A. y G. Fermín (2013) Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. *Avances en Biomedicina Volumen 2(3)*, p 137-53.
- Nova-López C. J., J. M. Muñoz-Pérez, L. F. Granger-Serrano, M. E. Arias-Zabala, *et al.* (2017). Expresión de la proteína recombinante Cry 1Ac en cultivos de células de papa en suspensión: Establecimiento del cultivo y optimización de la producción de la biomasa y la proteína mediante la adición de nitrógeno. *Dyna*, 84 (201).
- Oh C.S. y J.C. Carrington (1989) Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology*, 173, 692–699.
- Pfeffer S., P. Dunoyer, F. Heim, K.E. Richards, G. *et al.* (2002) P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 6815–6824.
- Plisson C., M. Drucker, S. Blanc, S. German-Retana, *et al.* (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J. Biol. Chem.* 278, 23753–23761.
- Porta C., V.E. Spall, T. Lin, J.E. Johnson *et al.* (1996) The development of cowpea mosaic virus as a potential source of novel vaccines. *Intervirology*, 39, 79-84
- Ratcliff F., S. MacFarlane and D.C. Baulcombe (1999) Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell*, 11, 1207–1215.
- Ruiz-Ferrer V., J. Boskovic, C. Alfonso, G. Rivas, *et al.* (2005) Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. *J. Virol.* 79, 3758–3765.
- Sawh A. y T. Duchaine (2012) Turning Dicer on its head. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19(4):365-6.
- Shen W., P. Yan, L. Gao, X. Pan, J. Wu y P. Zhou (2010) Helper component proteinase (HC-Pro) protein of *Papaya* ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Mol. Plant Pathol.* 11, 335–346.
- Shibolet Y.M., E. Haronsky, D. Leibman, T. Arazi, *et al.* (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* 81, 13 135–13 148.
- Soitamo A.J., B. Jada y K. Lehto (2011) HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biol.* 11, 68.
- Szitty G. y Burgyan, J. (2013) RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 371, 153 –181.
- Tatineni S., F. Qu, R. Li, T.J. Morris, *et al.* (2012) Triticum mosaic poacevirus enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology*, 433, 104–115.
- Thornbury D.W., G.M. Hellmann, R.E. Rhoads y T.P. Pirone (1985) Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology*, 144, 260–267.
- Torres-Barcelo C., J.A. Daros y S.F. Elena (2010) Compensatory molecular evolution of HC-Pro, an RNA-silencing suppressor from a plant RNA virus. *Mol. Biol. Evol.* 27, 543–551.
- Torres-Barcelo C., S. Martin, J.A. Daros y S.F. Elena (2008) From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the Tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics*, 180, 1039–1049.
- Tu Y., Z. Zhang, D. Li, H. Li, J. Dong y T. Wang (2015) Potato virus Y HC-Pro reduces the ATPase activity of NtMinD, which results in enlarged chloroplasts in HC-Pro transgenic tobacco. *PLoS One*, 10, e0136210.
- Untiveros M., A. Olsper, K. Artola, A.E. Firth, *et al.* (2016) A novel sweet potato potyvirus ORF is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1111–1123.
- Urcuqui-Inchima S., I.G. Maia, P. Arruda, A.L. Haenni *et al.* (2000) Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology*, 268, 104–111.

- Valli A., A. Gallo, B. Rodamilans, J. Lopez-Moya, *et al.* (2018) The HC-Pro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular Plant Pathology* 19(3), 744–763
- Valli A., A. Gallo, M. Calvo, J.J. Perez *et al.* (2014) A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. *J. Virol.* 88, 9808–9818.
- Vaquero C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, *et al.* (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11128–11133
- Varallyay E. y Z. Havelda (2013) Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* 14, 567–575.
- Voinnet O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), 206-220.
- Voinnet O., C. Lederer, D.C. Baulcombe (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*.103:157–167.
- Voinnet O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449–459
- Wang R.Y., T.P. Pirone (1999). Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology* 89, 564-567.
- Wu H.W., S.S. Lin, K.C. Chen, S.D. Yeh, *et al.* (2010) Discriminating mutations of HC-Pro of Zucchini yellow mosaic virus with differential effects on small RNA pathways involved in viral pathogenicity and symptom development. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 23, 17–28.
- Yap Y.K., J. Duangjit y S. Panyim (2009) N-terminal of Papaya ringspot virus type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes*, 38, 461–467.
- Young B.A., D.C. Stenger, F. Qu, T.J. Morris, *et al.* (2012) Tritimovirus P1 functions as a suppressor of RNA silencing and an enhancer of disease symptoms. *Virus Res.* 163, 672–677.
- Yusibov V., S. Shivprasad, T.H. Turpen, W. Dawson *et al.* (1999) Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 240, 81–94.
- Zhang C., Z. Wu, Y. Li y J. Wu (2015) Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. *Front. Microbiol.* 6, 1237.
- Zhang X., P. Du, L. Lu, Q. Xiao, *et al.* (2008) Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology*, 374, 351–360.
- Zhou B., F. Wang, X. Zhang, L. Zhang, *et al.* (2017). Sequencing and phylogenetic analysis of tobacco virus 2, a polerovirus from *Nicotiana tabacum*. *Archives of Virology*, 1-4.

● ● ●