

Silenciamiento génico postranscripcional: Mecanismo de defensa antiviral en plantas

Elvira Fiallo Olivé

Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Correo electrónico: elvira@censa.edu.cu

RECIBIDO: 06/2007

ACEPTADO: 12/2007

Silenciamiento génico postranscripcional. Características generales

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, del inglés *postranscriptional gene silencing*) es un fenómeno natural que ocurre en plantas, nemátodos (*Caenorhabditis elegans*), moscas (*Drosophila melanogaster*) y, aunque ha emergido como un tópico de interés general en los últimos años, la primera evidencia de este fenómeno se tuvo en 1928 cuando plantas de tabaco infectadas con *Tobacco ringspot virus* se recuperaron de la infección, sin que en aquel momento se supiera cuál era el mecanismo por el cual la planta había logrado recobrar. En plantas, han sido descubiertas tres rutas del silenciamiento según los análisis genéticos y moleculares. Todas estas vías involucran el corte del ARN doble cadena (ARNdc) en ARNs pequeños de 21 a 26 nucleótidos por una enzima ARNasa tipo III nombrada Dicer. Estos ARNs son conocidos como ARNs pequeños interferentes (siRNAs, del inglés *short interfering RNAs*) y microARNs (miRNAs, del inglés *microRNAs*). Además, las pequeñas moléculas de ARN simple cadena son incorporadas en complejos efectores del silenciamiento, provocando la degradación de todo ARN que complemente con las moléculas de 21 a 26 nucleótidos (Baulcombe, D., 2004).

Una de las tres rutas es la del silenciamiento por siRNA en el citoplasma (Hamilton y Baul-

combe, 1999). Esta vía es importante en células de plantas infectadas con virus donde el ARNdc puede ser un intermediario replicativo o una estructura secundaria característica de virus con genoma ARN. En el caso de los virus ADN de plantas, el ARNdc puede ser formado por unión de transcriptos complementarios que se superponen.

La segunda ruta es la del silenciamiento de ARNs mensajeros endógenos por miRNAs. Estos miRNAs regulan negativamente la expresión génica por apareamiento de bases a ARNs mensajeros específicos, que resulta tanto en el corte como en la detención de la traducción. Como los siRNAs, los miRNAs son ARNs pequeños de 21 a 24 nucleótidos producidos por el corte por Dicer de un precursor. Los miRNAs en plantas se identificaron como un subconjunto de la población de ARNs pequeños, con las características moleculares de los ARNs *let-7* y *lin-4* en *Caenorhabditis elegans* (Bartel, 2004): «Los miRNAs son derivados de un precursor de ARN con secuencias repetidas invertidas con regiones de doble cadena parcial, y ellos hacen diana en un ARNm complementario de simple cadena. Sin embargo, existen diferencias entre los miRNAs de plantas y animales (Baulcombe, 2004).

La tercera ruta de silenciamiento de ARN en plantas está asociada con la metilación del ADN y la represión de la transcripción. La primera

evidencia de este tipo de silenciamiento fue el descubrimiento en plantas de que la introducción de secuencias foráneas y ARNs virales guía a la metilación del ADN en secuencias nucleotídicas específicas (Mette *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001; Wassenegger *et al.*, 1994): «Además, la metilación del ADN promovida por los siRNAs en plantas está asociada a modificación de histonas y, en levaduras de fisión, a la formación de heterocromatina y límite del centrómero (Volpe *et al.*, 2002; Zilberman *et al.*, 2003). El papel del silenciamiento del ARN a nivel de cromatina es probablemente proteger el genoma contra daños causados por transposones (Baulcombe, 2004).

Proteínas hospedantes involucradas en el silenciamiento

En plantas, animales y hongos, las proteínas AGO han sido implicadas en los tres tipos de rutas de silenciamiento. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, mutantes de AGO1 tienen afectaciones en las rutas de silenciamiento de ARN citoplasmático y miRNA, y mutantes de AGO4 presentan problemas con el silenciamiento de la cromatina. Parece ser que las proteínas AGO son componentes del complejo efector del silenciamiento que une siRNA y miRNA (Baulcombe, 2004). Así, la proteína AGO2 de *Drosophila melanogaster* une siRNA por medio de su dominio PAZ (siglas del inglés *piwi-argonaute-zwille*), y está en el complejo ribonucleasa RISC («complejo de silenciamiento inducido por ARN», del inglés *RNA-induced silencing complex*) que corta el ARNm diana (Hammond *et al.*, 2001; Lingel *et al.*, 2003). Se piensa que esta proteína es la ribonucleasa «slicer» en RISC, según experimentos con la proteína AGO2 de ratones (Liu *et al.*, 2004). AGO1 es probablemente un componente de RISC en *A. thaliana* porque mutantes hipomórficos retienen la habilidad de acumular miRNA; pero el correspondiente ARNm blanco no es cortado (Vaucheret *et al.*, 2004). En levaduras de fisión, una proteína AGO es encontrada en el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS, del inglés *RNA-induced transcriptional silencing complex*) que interviene en la heterocromatinización (Verdel *et al.*, 2004). En *Tetrahymena*, los siRNAs y un homólogo de

AGO se han encontrado en un complejo implicado en un mecanismo relacionado con el silenciamiento que guía al reordenamiento del genoma (Mochizuki *et al.*, 2002; Taverna *et al.*, 2002).

El papel de AGO en los complejos efectores del silenciamiento hace pensar que tal proteína se involucra en todos los mecanismos de ese tipo. Es probable que muchas, si no todas las proteínas AGO, estén relacionadas con el silenciamiento. Si este fuera el caso, al menos algunas de las diez homólogas de AGO en el genoma de *Arabidopsis thaliana* deben estar asociadas con complejos efectores de silenciamiento de ARN. Es probable que RICS o RITS, que contienen proteínas AGO, silencien genes en células especializadas o en estadios particulares de desarrollo (Hunter *et al.*, 2003).

Las diversas rutas de silenciamiento de ARN no deben estar completamente separadas. Algunas proteínas, por ejemplo AGO1 y zwill (AGO10), actúan en más de una ruta. Los mutantes de AGO1 en *A. thaliana* tienen un fenotipo que indica defectos en las rutas citoplasmáticas de miRNA y siRNA (Fagard *et al.*, 2000; Vaucheret *et al.*, 2004). Las mutaciones en otro gen (*hen1*) relacionado con el silenciamiento indican superposición en las diferentes rutas del silenciamiento. Mutantes de *hen1* son defectuosos tanto en el silenciamiento de miRNA como siRNA citoplasmático (Boutet *et al.*, 2003).

La familia génica Dicer en *A. thaliana* tiene solo cuatro miembros, por tanto, si hay más de cuatro rutas de silenciamiento que involucran proteínas AGO, algunas Dicer estarán activas en más de una de ellas (Schauer *et al.*, 2002; Baulcombe, 2004). Se conoce la función de dos proteínas Dicer: Dicer-like (DCL) 1 es requerida para la biogénesis de miRNA (Finnegan *et al.*, 2003; Papp *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004); DCL3, por su parte, produce siRNAs a partir de retroelementos y retrotransposones y es requerida para el silenciamiento de la cromatina (Xie *et al.*, 2004). Los productos de DCL3 corresponden a una clase de siRNA que está asociada con transposones y son más largos (24 en lugar de 21 nucleótidos) que los productos DCL1 típicos (Hamilton *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). El papel de otras dos proteínas

Dicer, DCL2 y DCL4 ha sido más difícil de definir. La primera ha sido involucrada en la producción de siRNA viral, pero el fenotipo de pérdida de función es sólo una reducción transiente en el nivel de siRNA en uno de varios virus probados (Xie *et al.*, 2004). Por tanto, es probable que exista una redundancia funcional y que otras proteínas Dicer de *A. thaliana* estén involucradas en la producción de siRNA. La función de DCL4 no se conoce.

Iniciación y amplificación de la señal de silenciamiento

Las ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRps, del inglés *RNA dependent RNA polymerases*) son requeridas para la ruta citoplasmática de silenciamiento de ARN y de la cromatina en *Caenorhabditis elegans*, hongos y plantas (Cogoni y Macino, 1999; Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000; Smardon *et al.*, 2000; Sijen *et al.*, 2001; Volpe *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2004), pero no, aparentemente, para la misma ruta en insectos o animales. Las RdRp muestran un motivo secuencia común que está lejanamente relacionado con el dominio catalítico de las ARN polimerasas ADN dependientes y es por eso probable que ellas sean un grupo antiguo de proteínas (Iyer *et al.*, 2003). *A. thaliana*, *C. elegans* y *Neurospora crassa* tienen pequeñas familias génicas de RpRds que, como las proteínas AGO, indican diversificación funcional de las rutas de silenciamiento. En *A. thaliana*, las RpRds RDR1 y RDR6 (conocidas como SDE1 y SGS2, respectivamente) son utilizadas en la ruta de silenciamiento citoplasmática de ARN que silencia transgenes y virus. Sin embargo, parece que esas proteínas tienen especificidad por diferentes ARN virales: mutantes de RDR6 en *A. thaliana* son hipersusceptibles a Cucumber mosaic virus; mientras que plantas de tabaco con reducidos niveles de RDR1 muestran incrementada susceptibilidad a Tobacco mosaic virus (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001). Mutantes de RDR2 son defectuosos para la producción de siRNA endógenos, incluyendo a aquellos que se corresponden con retroelementos. De tal forma, se ha propuesto que la proteína RDR2 podría ser parte de la ruta de silenciamiento de la cromatina (Xie *et al.*, 2004).

En principio, la RpRd podría mediar los mecanismos de silenciamiento de ARN dependiente e independiente del cebador. El proceso independiente del cebador puede ser importante para la producción de ARNdc a partir del molde de simple cadena, así el silenciamiento puede ser iniciado con virus que infectan plantas o con ARNs transgénicos. Consecuentemente con este mecanismo independiente del cebador, ensayos *in vitro* con enzimas de tomate y *Neurospora crassa* demostraron que la RpRd cataliza la síntesis de ARNdc a partir de un molde de simple cadena (Schiebel *et al.*, 1993; Makeyev y Bamford, 2002). De forma similar, en extractos de germen de trigo, el ARNsc puede ser copiado a ARNdc por una enzima no identificada, presumiblemente una RpRd (Tang *et al.*, 2003). Sin embargo, no está claro como la RpRd puede diferenciar el ARN transgénico blanco de los ARNs endógenos no silenciados. Quizás el ARN que es objeto del silenciamiento contiene características «aberrantes» que estén ausentes de los ARNs «normales» no silenciados. También se ha propuesto que el reconocimiento de un ARN aberrante podría estar dado por la carencia de características que están presentes en los ARNs normales (caperuza en 5' o cola de poli A en 3') (Baulcombe, 2004). En *A. thaliana*, la ausencia de la estructura caperuza en 5' proporciona un ARN que probablemente sea degradado por el mecanismo de silenciamiento causado por la RpRd (Baulcombe, 2004).

El segundo mecanismo de RdRp requiere que los siRNAs primarios de un virus, transposón o transgen, sean los cebadores en la síntesis de ARNdc dirigida por RpRd. La proteína RpRd QDE1 de *N. crassa* incorpora *in vitro* un ARN antisentido marcado de 20 nucleótidos en la cadena complementaria de ARNsc (Makeyev y Bamford, 2002). Este proceso dependiente del cebador es apoyado por evidencias genéticas indirectas en *C. elegans* y plantas, en los cuales el iniciador del silenciamiento proviene de parte del gen blanco. En estos sistemas, los siRNAs secundarios que se acumulan en el tejido silenciado son dependientes de proteínas RpRds y son derivados no sólo de la región iniciadora sino, además, de regiones adyacentes en la secuencia blanco (Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002).

Además, los siRNAs en *C. elegans* corresponden solamente al extremo 5' del ARNsc, como debe esperarse si el siRNA primario antisentido ha sido extendido por la RpRd a su extremo 3'. Sin embargo, en *Nicotiana benthamiana* los siRNAs son tanto del extremo 5' como del 3' del iniciador sobre el ARNsc, por tanto, no pueden ser producidos por un mecanismo simple de comienzo sobre una única especie de ARN (Voinnet *et al.*, 1998; Vaistij *et al.*, 2002). La explicación más probable es que el blanco del silenciamiento, como muchas partes del genoma de *A. thaliana*, es transcrito a partir de ambas cadenas (Yamada *et al.*, 2003). Los siRNAs 3' secundarios podrían entonces resultar de la extensión de un cebador siRNA sobre un molde ARN antisentido (Baulcombe, 2004).

Como resultado de los mecanismos mediados por la RpRd, una única especie de ARN aberrante o molécula de siRNA primaria podría generar muchos ARNdc, los cuales podrían entonces silenciar incluso más moléculas blancas. Este proceso de amplificación es probablemente esencial en la defensa antiviral porque podría asegurar que la señal de silenciamiento se mantenga al ritmo de la replicación y acumulación del ARN viral. De manera similar, en la defensa del genoma, los pasos de amplificación podrían asegurar que unas pocas moléculas de ARN del transposón activen la ruta del silenciamiento de la cromatina con la fortaleza suficiente para suprimir todas las copias del elemento a ser transpuesto. Además, las proteínas RpRd podrían ayudar al mecanismo de silenciamiento de ARN a transposones porque transcriptos con secuencias invertidas repetidas son fácilmente amplificados (Martienssen, 2003).

Movilidad de la señal de silenciamiento

Junto con la amplificación de la RpRd, la movilidad de la señal de silenciamiento es, probablemente, una característica decisiva de un sistema de defensa antiviral. Una señal de silenciamiento móvil podría moverse con el virus, o delante de él, para silenciar el ARN viral antes, o al mismo tiempo, con respecto al movimiento del virus dentro de la célula (Voinnet *et al.*, 2000). En efecto, en plantas y *C. elegans*, los efectos de la señal de silenciamiento se extienden más allá de aquellas células en las

cuales la señal es iniciada y puede diseminarse sistémicamente a través del organismo (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet y Baulcombe, 1997; Timmons y Fire, 1998). Este efecto sistémico tiene especificidad en la secuencia nucleotídica correspondiente al ARNdc iniciador, indicando que la señal es o bien un ARN o tiene un componente de ARN. Se ha encontrado una evidencia en *C. elegans* que apoya esta idea: la proteína SID1, la cual es requerida para el ARNi (forma de nombrar el silenciamiento en animales), es un transportador de ARNdc a través de la membrana (Winston *et al.*, 2002; Feinberg y Hunter, 2003).

Es improbable que el mecanismo de silenciamiento sistémico sea el mismo en plantas que en *C. elegans*. La señal de silenciamiento en plantas no tiene que cruzar ninguna membrana, porque la mayoría de las células en plantas, incluyendo las células del floema en el sistema vascular, están conectadas por los plasmodesmos que son una continuación del retículo endoplasmático (Haywood *et al.*, 2002). Además, no se han identificado ninguna de las proteínas del hospedante que deben estar involucradas en el movimiento de esta señal de silenciamiento. Sin embargo, un análisis de la señal sistémica de un transgénico de la proteína verde fluorescente acoplada a un promotor específico de floema indicó que el mecanismo señal en plantas puede ser dividido en señal de corto alcance (hasta 15 células) y fases de alcance mayor extendiéndose hasta algunos centímetros (Himber *et al.*, 2003).

El movimiento de largo alcance, a diferencia de la señal de corto alcance, no es afectado por mutantes de pérdida de función de RDR6 y es probable que la señal móvil esté conformada por siRNAs de 21 nucleótidos (Himber *et al.*, 2003). En el caso de células infectadas con un virus se conoce que el siRNA está presente tanto como ARN libre, como en complejos de bajo peso molecular que bien pueden estar debajo del límite de exclusión normal del plasmodesmo. Lo anterior apoya la idea de que los ARNs pequeños sean la señal móvil para la señalización a corto alcance (Lakatos *et al.*, 2004).

Una clase de siRNA mayor, 24 nucleótidos posiblemente generados por DCL3, ha sido

propuesta como candidata para la señal de largo alcance de entrada al floema, porque las proteínas virales que bloquean el silenciamiento sistémico impiden, además, la acumulación de siARN de 24 nucleótidos (Hamilton *et al.*, 2002). Sin embargo, el silenciamiento sistémico es transmitido de plantas injertadas, en las cuales, tanto los siRNAs de 21 como los de 24 nucleótidos, son suprimidos por el supresor viral del silenciamiento HC-Pro (Mallory *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible que otros ARNs del silenciamiento incluyendo ARNsc largos, ARNdc o siRNA, puedan ser moléculas señal, ya que alguno de ellos puede iniciar el silenciamiento si son introducidos en una célula con un blanco adecuado (Baulcombe, 2004). El límite de exclusión del plasmodesmo puede ser una barrera para el movimiento intercelular de complejos de alto peso molecular que contengan estos ARNs; pero es posible que ARNs libres o ARNs en complejos de bajo peso molecular sean móviles (Haywood *et al.*, 2002). Se conoce que los viroides y el transcripto correspondiente a un ARNm para una proteína endógena son ARNs móviles en el floema de plantas (Ding *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que el movimiento de miRNAs y siRNAs endógenos puede jugar un papel en la regulación de genes endógenos (Baulcombe, 2004). Por ejemplo, durante el desarrollo de la hoja los miRNAs miR165 y miR166 son reguladores negativos de genes que influyen en la polaridad de la hoja, y su distribución y posible gradiente de expresión concuerdan con el de una señal móvil (Emery *et al.*, 2003; Juárez *et al.*, 2004; Kidner y Martienssen, 2004). La existencia de muchos miRNAs y siRNAs en la savia floemática de la calabaza es una evidencia a favor de que muchos ARNs del silenciamiento endógenos son señales móviles (Yoo *et al.*, 2004), y se ha detectado que una proteína del floema se une específicamente a la forma de simple cadena de estos ARNs.

Proteínas virales supresoras del silenciamiento

El silenciamiento de ARN en plantas previene la acumulación de virus y, por tanto, estos últimos han desarrollado varias estrategias para contrarrestar tal mecanismo de defensa. La medida de

defensa primaria involucra proteínas supresoras del silenciamiento que son codificadas, tanto por virus con genoma ADN, como ARN (Voinnet *et al.*, 1999). Estas proteínas probablemente evolucionaron independientemente en diferentes grupos de virus, puesto que son estructuralmente diversas y no presentan motivos de secuencia comunes. Un mecanismo secundario para contrarrestar el silenciamiento es ilustrado por la aparente resistencia de los ARN satélites y defectivos interferentes a la degradación por siRNAs (Szittyá *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Parece que estos ARNs tienen estructuras secundarias protectoras, o están compartimentados de tal forma que se ocultan del mecanismo de silenciamiento de ARN (Baulcombe, 2004).

El mecanismo de acción de dos proteínas virales supresoras del silenciamiento en plantas se conoce de forma exacta: p21 codificado por Beet western yellow virus (BWYV) y p19 codificado por Tomato bushy stunt virus (TBSV) (Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2004). En ambos casos, la proteína supresora viral se une y presumiblemente inactiva los siRNAs de tal forma que no puedan hacer diana en el correspondiente ARN viral. Para el caso de p19, la estructura cristalina de alta resolución de proteínas de dos grupos diferentes de TBSV, combinada con datos moleculares y bioquímicos, indica de forma precisa como el silenciamiento es bloqueado. En forma de homodímero p19 se une a los ARN de pequeño tamaño y, consecuentemente, los siRNAs o miRNAs no pueden ser incorporados en un RISC activo (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003; Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2004). En plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan p19, tanto miRNA como su complementario se acumulan; mientras que en las plantas control sin p19, el miRNA complementario es indetectable (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Se piensa que el *duplex* de miRNA (miRNA y su complementario) es normalmente un precursor de corta vida de miRNA-RISC, pero es estabilizado en la presencia de p19 (Schwarz *et al.*, 2003).

Existen otras proteínas virales supresoras del silenciamiento en plantas, pero no está muy claro cuál es el mecanismo de acción de las mismas. Se

ha demostrado que la proteína HC-Pro de Tobacco etch virus es un factor contra el silenciamiento que interactúa con rgs-CaM, una proteína de tabaco parecida a la calmodulina que, cuando es sobreexpresada en plantas, suprime el silenciamiento (Anandalakshmi *et al.*, 1998, 2000). La proteína 2b de cucumovirus ha sido reconocida como supresora del silenciamiento y se ha sugerido que dicha proteína previene la diseminación sistémica de la señal de silenciamiento (Brigneti *et al.*, 1998; Guo y Ding, 2002).

Para el caso de p25 de Potato virus X (PVX), se conoce que esta proteína es un supresor del silenciamiento que impide el movimiento de la señal fuera de la primera célula infectada, en la cual la iniciación del silenciamiento tiene lugar. Además, como p25 ha sido capaz de suprimir débilmente el silenciamiento en experimentos de agroinfiltración, se ha sugerido que la inhabilidad del silenciamiento para diseminarse sistémicamente resultó de la habilidad de p25 para interferir con la producción de la señal móvil, paso que requiere de una ARN polimerasa ARN dependiente (Voinnet *et al.*, 2000). Sin embargo, p25 de PVX es un supresor del silenciamiento relativamente débil comparado con los equivalentes de esta proteína en otros tres potexvirus Narcissus mosaic virus (NMV), Nandina virus X (NaMV) y Viola mosaic virus (VMV), todos los cuales fueron capaces de reactivar la traducción de un transgen para la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) previamente silenciado (Voinnet *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la proteína CP de carmovirus actúa contra el silenciamiento (Qu y Morris, 2002). Mediante ensayos de agroinfiltración se demostró que la supresión del silenciamiento por la CP de Turnip crinkle virus (TCV) previene la acumulación de niveles de siRNAs detectables en las hojas infiltradas, sugiriendo que la CP de TCV funciona interfiriendo con el procesamiento de ARN de doble cadena (Qu *et al.*, 2003).

Para el caso del begomovirus Tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV), se ha demostrado que la proteína TrAP media la supresión del silenciamiento génico postranscripcional. Además, las mutaciones individuales en los resi-

duos de cisteína 36, 38 y 46 eliminan la función supresora de TrAP. Se piensa que los tres residuos de cisteína dentro del posible motivo dedo de zinc son esenciales en TrAP para inducir necrosis y para actuar como supresor del PTGS (Van Wezel *et al.*, 2002): «Además, se ha encontrado que la proteína TrAP de ACMV actúa como supresora del mantenimiento del silenciamiento en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Voinnet *et al.*, 1999).

En Citrus tristeza virus (CTV) existen tres proteínas supresoras del silenciamiento: p20, p23 y la CP. Tanto p20 como p23, pero no la CP, suprimen el silenciamiento en experimentos de agroinfiltración, y fueron capaces de revertir el silenciamiento transgénico. La CP y p20, pero no p23, impiden la señal intracelular del silenciamiento de ARN. Esto sugirió que la supresión del silenciamiento en múltiples pasos de la ruta de silenciamiento debe ser esencial para virus con grandes genomas como CTV (Lu *et al.*, 2004).

Recientemente, se ha reportado por primera vez la identificación de una proteína supresora del silenciamiento (Pns 10) codificada por un virus con genoma ARN de doble cadena, Rice dwarf phyto-reovirus (perteneciente a la familia Reoviridae) (Cao *et al.*, 2005). Además, la acción supresora de algunas proteínas de virus que infectan plantas ha sido probada en cultivos de células animales, y se ha demostrado que p19 de TBSV, la CP de TCV y p15 de Peanut clump virus (PCV), a diferencia de p25 de PVX, ejercen su función supresora (Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2004).

Ingeniería genética para inducir silenciamiento

Desde que el fenómeno de silenciamiento génico postranscripcional fue descubierto se ha convertido en la forma más exitosa de promover resistencia mediante el empleo de la ingeniería genética (Goldbach *et al.*, 2003).

La introducción de transgenes o ARNdc en diferentes hospedantes puede activar el silenciamiento postranscripcional de genes homólogos y/o transgénicos. Transgenes que inducen silenciamiento génico postranscripcional han sido reportados en plantas, donde es nombrado «cosupresión», y en hongos, donde se conoce como «quelling». La característica común es que guían a una disminución

específica de los niveles de ARNm, tanto del gen homólogo como del transgen introducido. De hecho, la mayoría de los fenómenos de silenciamiento fueron identificados por la característica pérdida de función del gen endógeno. En plantas, por ejemplo, la introducción de un transgen para la chalcona sintasa o para la dihidroflavonol-4-reductasa produce plantas con reducida/carente pigmentación floral (Chicas y Macino, 2001).

En plantas, se han empleado diferentes construcciones genéticas para inducir silenciamiento, tanto de genes propios como foráneos. En *Arabidopsis thaliana*, se ha probado el efecto del silenciamiento para los genes *agamous*, *clavata3*, *apetala1* y *perianthia*, todos involucrados en la floración. Estos genes se han introducido en la planta mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en construcciones con la secuencia del gen a silenciar en el sentido de la transcripción, en orientación antisentido, y con el gen en los dos sentidos separados por un segmento de ADN. Para los cuatro genes quedó demostrado que la construcción genética con el gen en sentidos opuestos separados por un espaciador es la más eficaz para la inducción de silenciamiento, variando el porcentaje de plantas silenciadas transgénicas, en dependencia del gen en cuestión (Chuang y Meyerowitz, 2000). Más recientemente, se ha demostrado que el empleo de un intrón funcional como espaciador potencia el efecto de esta construcción. Cada una de las cuatro construcciones genéticas capaces de inducir PTGS se han introducido en diferentes plantas de tabaco, *A. thaliana*, algodón y arroz con el objetivo de comparar su potencial como inductoras del silenciamiento, tanto de genes endógenos como foráneos, por ejemplo, gen viral. En todos los casos, las construcciones que contienen el intrón resultaron ser las más efectivas, logrando el silenciamiento de genes propios e inmunidad, en plantas de tabaco, a PVY. El empleo de un intrón como espaciador generalmente proporciona de un 90 a un 100 % de plantas transgénicas independientes silenciadas (Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001).

El empleo de una construcción genética con la presencia de un intrón ha demostrado ser efectiva también para lograr resistencia, en plantas de tomate, a Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV),

virus que ocasiona las mayores pérdidas económicas en este cultivo a nivel mundial. Para una de las líneas transgénicas, las plantas de tomate mostraron ser inmunes a la infección con el virus, con ausencia de síntomas y replicación viral (Fuentes *et al.*, 2006). De esta forma, el silenciamiento génico postranscripcional, además de ser un mecanismo para la regulación de genes endógenos y de defensa antiviral en plantas, puede ser empleado en la obtención de plantas resistentes a enfermedades virales.

Literatura citada

- ANANDALAKSHMI, R. *et al.* (2000): «A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants», *Science*, vol. 29, pp. 42-144.
- ANANDALAKSHMI, R. *et al.* (1998): «A viral suppressor of gene silencing in plants», *PNAS*, vol. 95, pp. 13079-13084.
- BARTEL, D.P. (2004): «MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function», *Cell*, vol. 116, pp. 281-297.
- BAULCOMBE, D. (2004): «RNA silencing in plants», *Nature*, vol. 431, pp. 356-363.
- BOUTET, S. *et al.* (2003): «Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance», *Current Biology*, vol. 13, pp. 843-848.
- BRIGNETI, G. *et al.* (1998): «Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana Benthamiana*», *EMBO Journal*, vol. 17, pp. 6739-6746.
- CAO, X. *et al.* (2005) Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus», *Journal of Virology*, vol. 79, pp. 13018-13027.
- CHAPMAN, E.J. *et al.* (2004): «Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step», *Genes & Development*, vol. 18, pp. 1179-1186.
- CHICAS, A. y G. MACINO (2001): «Characteristics of post-transcriptional gene silencing», *EMBO Rep.*, vol. 2, pp. 992-996.
- CHUANG, C.F. y E.M. MEYEROWITZ (2000): «Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*», *PNAS*, vol. 97, pp. 4985-4990.
- COGONI, C. y G. MACINO (1999): «Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase», *Nature*, vol. 399, pp. 166-169.

- DALMAY, T.; R. HORSEFIELD; T.H. BRAUNSTEIN y D.C. BAULCOMBE (2001): «SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*», *EMBO Journal*, vol. 20, pp. 2069-2078.
- DALMAY, T. *et al.* (2000): «An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus», *Cell*, vol. 101, pp. 543-553.
- DING, B.; M.O. KWON; R. HAMMOND y R. OWENS (1997): «Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid», *Plant Journal*, vol. 12, pp. 931-936.
- DUNOYER, P. *et al.* (2004): «Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing», *Plant Cell*, vol. 16, pp. 1235-1250.
- EMERY, J. *et al.* (2003): «Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes», *Current Biology*, vol. 13, pp. 1768-1774.
- FAGARD, M. *et al.* (2000): «AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals», *PNAS*, vol. 97, pp. 11650-11654.
- FEINBERG, E.H. y C.P. HUNTER (2003): «Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1», *Science*, vol. 301, pp. 1545-1547.
- FINNEGAN, E.J.; R. MARGIS y P.M. WATERHOUSE (2003): «Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila*», *Current Biology*, vol. 13, pp. 236-240.
- FUENTES, A. *et al.* (2006): «Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to Tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants», *Transgenic Research*, vol. 15, pp. 291-304.
- GOLDBACH, R.; E. BUCHER y M. PRINS (2003): «Resistance mechanisms to plant viruses: an overview», *Virus Research*, vol. 92, pp. 207-212.
- GUO, H.S. y S.W. DING (2002): «A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal», *EMBO Journal*, vol. 21, pp. 398-407.
- HAMILTON, A.J. y D.C. BAULCOMBE (1999): «A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants», *Science*, vol. 286, pp. 950-952.
- HAMILTON, A.; O. VOINET; L. CHAPPELL y D. BAULCOMBE (2002): «Two classes of short interfering RNA in RNA silencing», *EMBO Journal*, vol. 21, pp. 4671-4679.
- HAMMOND, S.M. *et al.* (2001): «Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi», *Science*, vol. 293, pp. 1146-1150.
- HAYWOOD, V.; F. KRAGLER y W.J. LUCAS (2002): «Plasmodium: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling», *Plant Cell*, vol. 14, pp. 303-325.
- HIMBER, C. *et al.* (2003): «Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing», *EMBO Journal*, vol. 22, pp. 4523-4533.
- HUNTER, C.; H. SUN y R.S. POETHIG (2003): «The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member», *Current Biology*, vol. 13, pp. 1734-1739.
- IYER, L.M.; E.V. KOONIN y L. ARAVIND (2003): «Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. BMC», *Journal of Structural Biology*, vol. 3, p. 1.
- JONES, L.; F. RATCLIFF y D.C. BAULCOMBE (2001): «RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance», *Current Biology*, vol. 11, pp. 747-757.
- JUAREZ, M.T. *et al.* (2004): «microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity», *Nature*, vol. 428, pp. 84-88.
- KIDNER, C.A. y R. MARTIENSSEN (2004): «Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1», *Nature*, vol. 428, pp. 81-84.
- KIM, M.; W. CANIO; S. KESSLER y N. SINHA (2001): «Developmental changes due to long-distance movement of homeobox fusion transcript in tomato», *Science*, vol. 293, pp. 287-289.
- LAKATOS, L.; G. SZITTYA; D. SILHAVY y J. BURGYAN (2004): «Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses», *EMBO Journal*, vol. 23, pp. 876-884.
- LINGEL, A.; B. SIMON; E. IZAURRALDE y M. SATTLER (2003): «Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* argonaute 2 PAZ domain», *Nature*, vol. 426, pp. 465-469.
- LIU, J. *et al.* (2004): «Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi», *Science*, vol. 305, pp. 1437-1441.
- LU, R. *et al.* (2004): «Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome», *PNAS*, vol. 101, pp. 15742-15747.
- MAKEYEV, E.V. y D.H. BAMFORD (2002): «Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes», *Molecular Cell*, vol. 10, pp. 1417-1427.
- MALLORY, A.C. *et al.* (2001): «HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal», *Plant Cell*, vol. 13, pp. 571-583.

- MARTIENSSSEN, R.A. (2003): «Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats», *Nature Genetics*, vol. 35, pp. 213-214.
- METTE, M.F. *et al.* (2000): «Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA», *EMBO Journal*, vol. 19, pp. 5194-5201.
- MOCHIZUKI, K.; N.A. FINE; T. FUJISAWA y M.A. GO-ROVSKY (2002): «Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena», *Cell*, vol. 110, pp. 689-699.
- MOURRAIN, P. *et al.* (2000): «*Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance», *Cell*, vol. 101, pp. 533-542.
- PALAUQUI, J.C.; T. ELMAYAN; J.M. POLLIEN y H. VAUCHERET (1997): «Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions», *EMBO Journal*, vol. 16, pp. 4738-4745.
- PAPP, I. *et al.* (2003): «Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors», *Plant Physiology*, vol. 132, pp. 1382-1390.
- QU, F. y T.J. MORRIS (2002): «Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing», *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 15, pp. 193-202.
- QU, F.; T. REN y T.J. MORRIS (2003): «The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step», *Journal of Virology*, vol. 77, pp. 511-522.
- SCHAUER, S.E.; S.E. JACOBSEN; D.W. MEINKE y A. RAY (2002): «DICER-LIKE1: Blind men and elephants in *Arabidopsis* development», *Trends in Plant Science*, vol. 7, pp. 487-491.
- SCHIEBEL, W. *et al.* (1993): «RNA-directed RNA polymerase from tomatoes leaves. II. catalytic in vitro properties», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, pp. 11858-11867.
- SCHWARZ, D.S. *et al.* (2003): «Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex», *Cell*, vol. 115, pp. 199-208.
- SIJEN, T. *et al.* (2001): «On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing», *Cell*, vol. 107, pp. 465-476.
- SMARDON, A. *et al.* (2000): «EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*», *Current Biology*, vol. 10, pp. 169-178.
- SMITH, N.A. *et al.* (2000): «Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs», *Nature*, vol. 407, pp. 319-320.
- SZITTYA, G. *et al.* (2002): «Short defective interfering RNAs of tombus viruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus», *Plant Cell*, vol. 14, pp. 359-372.
- TANG, G.; B.J. REINHART; D.P. BARTEL y P.D. ZAMORE (2003): «A biochemical framework for RNA silencing in plants», *Genes & Development*, vol. 17, pp. 49-63.
- TAVERNA, S.D.; R.S. COYNE y C.D. ALLIS (2002): «Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena», *Cell*, vol. 110, pp. 701-711.
- TIMMONS, L. y A. FIRE (1998): «Specific interference by ingested dsRNA», *Nature*, vol. 395, pp. 854.
- VAISTIJ, F.E.; L. JONES y D.C. BAULCOMBE (2002): «Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase», *Plant Cell*, vol. 14, pp. 857-867.
- VAN WEZEL, R. *et al.* (2002): «Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression», *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 15, pp. 203-208.
- VARGASON, J.M.; G. SZITTYA; J. BURGYAN, J. y T.M. TANAKA HALL (2003): «Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor», *Cell*, vol. 115, pp. 799-811.
- VAUCHERET, H.; F. VAZQUEZ; P. CRETE y D.P. BARTEL (2004): «The Action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development», *Genes & Development*, vol. 18, pp. 1187-1197.
- VERDEL, A. *et al.* (2004): «RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex», *Science*, vol. 303, pp. 672-676.
- VOINNET, O. y D.C. BAULCOMBE (1997): «Systemic signalling in gene silencing», *Nature*, vol. 389, p. 553.
- _____; C. LEDERER y D.C. BAULCOMBE (2000): «A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*», *Cell*, vol. 103, pp. 157-167.
- _____; Y.M. PINTO y D.C. BAULCOMBE (1999): «Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants», *PNAS*, vol. 96, pp. 14147-14152.
- _____; P. VAIN; S. ANGELL y D.C. BAULCOMBE (1998): «Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA», *Cell*, vol. 95, pp. 177-187.
- VOLPE, T.A. *et al.* (2002): «Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi», *Science*, vol. 297, pp. 1833-1837.
- WANG, M.B. *et al.* (2004): «On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites», *PNAS*, vol. 101, pp. 3275-3280.
- WASSENEGGER, M.; S. HEIMES; L. RIEDEL y H.L. SANGER (1994): «RNA-directed de novo methylation

- of genomic sequences in plants», *Cell*, vol. 76, pp. 567-576.
- WESLEY, S.V. *et al.* (2001): «Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants», *Plant Journal*, vol. 27, pp. 581-590.
- WINSTON, W.M.; C. MOLODOWITCH y C.P. HUNTER (2002): «Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1», *Science*, vol. 295, pp. 2456-2459.
- XIE, Z.; B. FAN; C.H. CHEN y Z. CHEN (2001): «An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense», *PNAS*, vol. 98, pp. 6516-6521.
- XIE, Z. *et al.* (2004): «Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants», *PLoS. Biology*, vol. 2, pp. 0642-0652.
- YAMADA, K. *et al.* (2003): «Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome», *Science*, vol. 302, pp. 842-846.
- YE, K.; L. MALININA y D.J. PATEL (2003): «Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing», *Nature*, vol. 426, pp. 874-878.
- YOO, B.C. *et al.* (2004): «A systemic small RNA signaling system in plants», *Plant Cell*, vol. 16, pp. 1979-2000.
- ZILBERMAN, D.; X. CAO y S.E. JACOBSEN (2003): «ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation», *Science*, vol. 299, pp. 716-719.