



Silenciamiento génico en plantas (ARNi)

Lic. Paula Bey

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA
2007

Introducción

El término “silenciamiento génico” se utiliza habitualmente para describir el “apagado” de un determinado gen, y es un mecanismo general que ocurre durante la regulación de la expresión génica. A través de este mecanismo, la maquinaria celular impide la expresión de un gen que debería estar “encendido” en circunstancias normales.

La expresión génica se puede regular tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. El Silenciamiento Génico Transcripcional (en inglés, Transcriptional Gene Silencing o TGS) es el resultado de la modificación de las histonas. Esta modificación crea un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen, que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.). El Silenciamiento Génico Post Transcripcional (en inglés, Post-Transcriptional Gene Silencing o PTGS), en cambio, es un mecanismo que implica la degradación de un determinado ARN mensajero. La destrucción de este ARNm impide su normal traducción y consecuentemente no se sintetiza la proteína correspondiente.

Tanto el silenciamiento transcripcional como el post transcripcional son mecanismos que regulan la expresión de genes endógenos, pero además son empleados por los organismos para protegerse de transposones y virus. Es por eso que se cree que el silenciamiento génico forma parte de un sistema de defensa ancestral que resguarda a algunos organismos de la invasión de ácidos nucleicos infecciosos.

Silenciamiento génico post transcripcional

Un poco de historia

El PTGS es un mecanismo descrito en plantas y mediante el cual la maquinaria celular desencadena la degradación de un ARNm. Se dice que esta degradación es “específica de secuencia”, ya que sólo serán degradadas las moléculas de ARNm que contengan una secuencia en particular, y no otros. Este fenómeno también se conoce como ARN de interferencia o ARNi.

El mecanismo se describió por primera vez en petunias transgénicas, en las que se pretendía mejorar el color de las flores. Para eso se introdujeron copias adicionales de un gen que codifica para una enzima clave para la producción de pigmentos en los pétalos. Sorprendentemente, muchas de las plantas que tenían copias extra de dicho gen no mostraron el color violeta o rojo intenso esperado. Por el contrario, aparecieron flores completamente blancas o con zonas blancas (Fig. 1). Los investigadores notaron que en las plantas transgénicas tanto el gen endógeno como el introducido habían sido “apagados”, y aunque desconocían el mecanismo molecular involucrado, llamaron a este fenómeno como “co-supresión de la expresión génica”.



Figura 1: Fenotipo de las flores de petunias a las que se les agregó copias extra del gen clave para la producción de pigmentos. Izquierda: flor de la planta no transgénica; centro y derecha: distintas líneas transgénicas. Extraído del artículo de Matzke MA y col. 2004, PLoS Biol 2 (5): e133.

Algunos años más tarde un grupo de virólogos vegetales observó un fenómeno similar. El objetivo de su trabajo era mejorar la resistencia de las plantas al ataque de ciertos virus. En ese tiempo ya se sabía que las plantas que fabricaban proteínas virales eran más resistentes a la infección. Sin embargo, en este caso los virólogos observaron que las plantas que contenían sólo un pequeño segmento del ARN viral, y que no codificaban ninguna proteína, eran igualmente resistentes. Concluyeron que el ARN viral producido a partir de transgenes también podía proteger a la planta de nuevas infecciones virales, evitando la multiplicación y propagación del virus en cuestión. Luego realizaron el experimento inverso: insertaron secuencias cortas de genes de la planta en el genoma del virus. Infectaron plantas con el virus modificado y observaron que la expresión de ese gen de la planta era suprimida. Este fenómeno se llamó “Silenciamiento Génico Inducido por Virus” (en inglés, Virus-Induced Gene Silencing o VIGS).

Algunas diferencias entre organismos

Las vías de silenciamiento varían según las especies. En plantas y en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, el silenciamiento puede movilizarse a sitios lejanos del punto de inicio y heredarse, lo que no ocurre en la mosca *Drosophila* ni en mamíferos. Esto se debe, se cree, a que el silenciamiento se propaga de una célula a otra mediante la transferencia de los siRNA (ARNi pequeños, ver más abajo) a través de los plasmodesmos. También se ha descrito silenciamiento por ARNi en algunos protozoarios, como *Trypanosoma brucei*, aunque se sabe que otros, como *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, no poseen la vía completa de RNAi. En hongos filamentosos, como *Neurospora crassa*, el fenómeno de silenciamiento se conoce como *quelling*.

Mecanismo molecular

A pesar de que el fenómeno de silenciamiento génico fue descrito por primera vez hace más de 15 años, aún no se conoce con precisión su mecanismo molecular. Sin embargo, se ha avanzado mucho en estudios que lo describen parcialmente.

Utilizando análisis bioquímicos y genéticos se ha podido establecer un modelo que describe cómo se produce el PTGS. En este modelo, el silenciamiento puede dividirse en una etapa de iniciación y en otra etapa efectora y de mantenimiento (Fig. 2).

La etapa de iniciación comienza con la presencia de un ARN doble cadena (“double-stranded RNA” o dsRNA). Este dsRNA puede ser un intermediario de replicación de un virus, puede haber sido introducido artificialmente o puede provenir de un transgén. El ARNdc es reconocido y es digerido por la enzima Dicer, que posee dominios de ARNasa tipo III (enzimas que degradan moléculas de ARN), para formar moléculas de ARN pequeñas (“small interference RNAs” o siRNAs) de 21-26 nucleótidos de longitud, también llamados “ARN guía”.

En la etapa efectora, el siRNA se une a un complejo con actividad de nucleasa (enzimas que degradan ácidos nucleicos) para formar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). La actividad helicasa de RISC separa las dos hebras del siRNA, y sólo una de ellas permanece unida al complejo. Una vez que RISC está activado, tiene como blanco la degradación de los ARN mensajeros homólogos a dichos siRNAs.

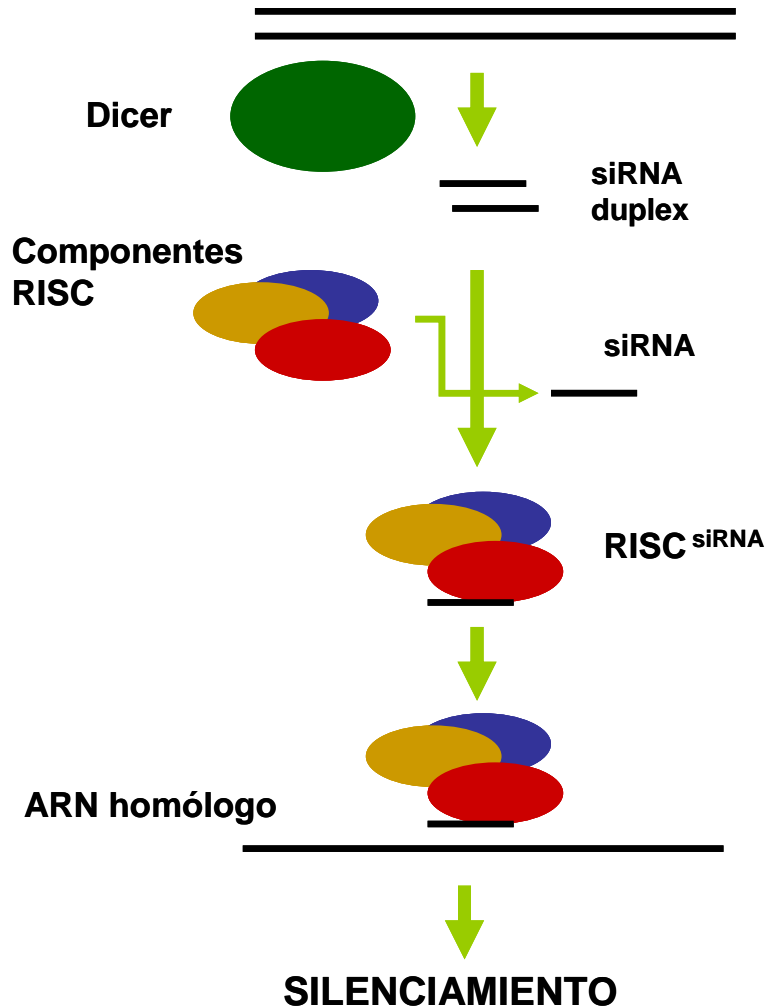


Figura 2: Esquema de los principales pasos de la vía del silenciamiento por ARNi o PTGS.

En plantas existe además una etapa de amplificación que ocurre mediante la producción de copias del dsRNA que originó el silenciamiento, generando más moléculas de siRNAs; o directamente mediante la replicación de los siRNAs. En estos fenómenos interviene una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP, capaz de sintetizar moléculas de ARN empleando ARN como molde). Por otro lado, el silenciamiento desencadenado en un punto particular de la planta genera una señal móvil que es capaz de gatillar el fenómeno en tejidos alejados del sitio de inicio. Si bien todavía no se conoce con exactitud la naturaleza de esta señal, existen pruebas contundentes que involucran a los siRNAs como participantes en este proceso.

Aplicaciones biotecnológicas

Más allá de las funciones fisiológicas que se le atribuyen al silenciamiento génico, como la defensa antiviral y la regulación de la expresión génica, este fenómeno puede ser utilizado además como herramienta para identificar genes “blanco” para el desarrollo de nuevas drogas, eliminar la función de un gen en particular, y hasta potencialmente eliminar la expresión de un gen responsable de una cierta enfermedad. También es posible utilizar el silenciamiento génico como una herramienta para generar mejores cultivos y alimentos, como por ejemplo, plantas resistentes a virus, mejoras en la calidad de los aceites, y otras mejoras nutricionales en granos y tubérculos.

La rosa azul

La obtención de rosas azules fue anhelada durante siglos, y aunque parecía imposible de lograr por las técnicas tradicionales de mejoramiento, las nuevas técnicas biotecnológicas han permitido cumplir con este ambicioso objetivo. En Australia, una organización de investigación científica e industrial (CSIRO) fue capaz de obtener exitosamente rosas azules, en conjunto con un grupo japonés. Para hacerlo recurrieron a la siguiente estrategia (Fig. 3):



1. “Apagaron” la producción del pigmento rojo silenciando el gen de la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) original de la rosa.
2. Insertaron un gen de pensamiento para la producción del pigmento azul (o delfinidina).
3. Restituyeron la actividad de la enzima DFR por introducción del gen de la DFR del lirio azul.

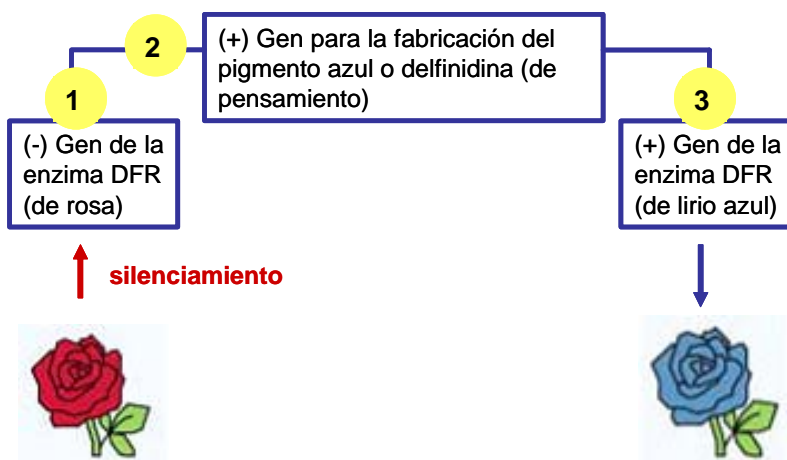


Figura 3: Etapas en el desarrollo para obtener una rosa azul.

Plantas de tomates resistentes a la enfermedad de agalla de la corona

La agalla de la corona es una enfermedad causada por la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que tiene la habilidad de transferir su propio ADN al genoma de la planta infectada, en un proceso conocido como “transferencia horizontal”. Una vez que los genes bacterianos son incorporados al genoma de la planta, se expresan y producen proteínas que desencadenan la formación de tumores. Estos tumores sirven de hábitat y proveen alimento a las bacterias, pero a su vez dañan la planta bloqueando el transporte de nutrientes y agua a lo largo del tallo, disminuyendo el rendimiento, la productividad y la calidad de los frutos.

Un grupo de investigadores de la Universidad de California empleó el silenciamiento génico para bloquear la expresión de dos genes bacterianos clave para la formación de los tumores. Mediante esta técnica, obtuvieron plantas de tomate que eran infectadas por la bacteria, pero que no producían las hormonas necesarias para la formación de tumores (Fig. 4).

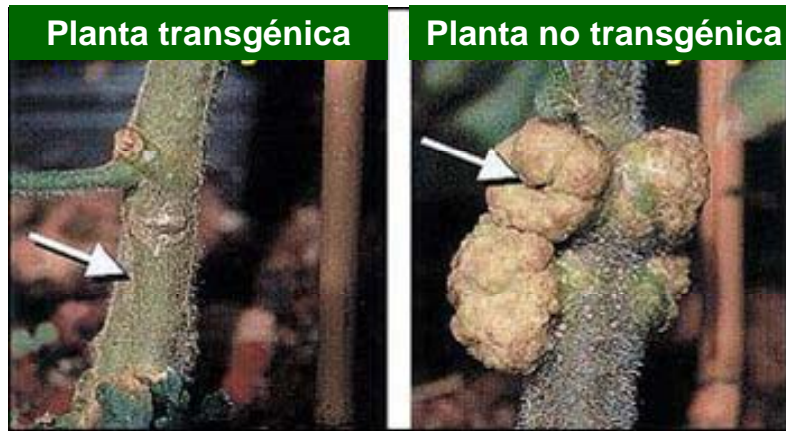


Figura 4: Obtención de plantas de tomate resistentes a la agalla de la corona. Tomado de Matthew et al, PNAS, 2001 vol. 98 (23) 13437–13442.

Papas resistentes al pardeamiento

Durante la cosecha mecánica de la papa se pierde cerca del 20% de la producción, debido a la oxidación. Una vez que las papas se oxidan cambian su sabor y aspecto, y disminuye la cantidad de materia aprovechable. Este problema no es solamente estético, sino también nutricional, e inclusive pasa a ser un problema sanitario para productos derivados. Para evitar el pardeamiento, las papas son tratadas con antioxidantes y conservantes, algunos de los cuales pueden dañar la salud y no son aceptados en todos los países.

En el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI – CONICET), el grupo de investigadores conformado por Briardo Llorente, Guillermo Alonso, Fernando Bravo Almonacid, Héctor Torres y Mirtha Flawiá, desarrolló plantas de papa que expresan un ARNi destinado a silenciar el gen de una enzima llamada polifenol oxidasa (PPO), responsable del fenómeno de oxidación o pardeamiento. Los tubérculos provenientes de las plantas genéticamente modificadas no sufren el “pardeamiento” debido a la oxidación al ser cortados o golpeados. Gracias a dicha modificación estas papas se pueden exponer al aire durante tiempos prolongados y en comparación con una papa común, también resultan resistentes al proceso de oxidación enzimática (Fig. 5).

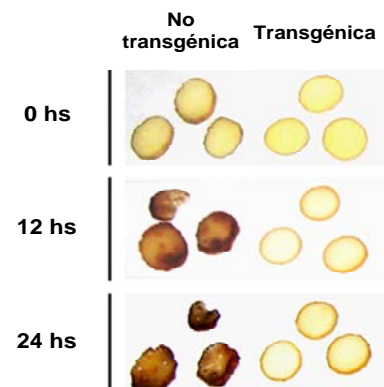


Figura 5: Rodajas de papas expuestas al aire durante 0, 12, y 24 hs. Luego de 12 hs se observa oxidación en las rodajas de papa provenientes de plantas no transgénicas, mientras que las rodajas de papas transgénicas resisten más de 24 hs sin sufrir pardeamiento.

Reconocimiento

En 2006, Andrew Fire y Craig C. Mello fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por su trabajo sobre ARNi en el gusano *C. elegans*, publicado en 1998 (Fire A et al., 1998; Nature 391 (6669): 806-11).

Bibliografía y sitios recomendados

1. http://en.wikipedia.org/?title=RNA_interference
2. Napoli et al, Plant Cell 1990
3. <http://www.csiro.au/files/files/p29z.pdf>
4. <http://www.pnas.org/cgi/reprint/98/23/13437>
5. <http://www.nature.com/focus/rnai/animations/>
6. RNA silencing pathways in plants. Herr AJ, Baulcombe DC. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2004; 69:363-70.
7. RNA silencing. Baulcombe D. Trends Biochem Sci. 2005 Jun; 30(6):290-3.
8. RNA silencing in plants. Baulcombe D. Nature. 2004 Sep 16; 431(7006):356-63. Review.