



## Silenciamiento génico en plantas (ARNi)

Dra. Paula Bey

Actualizado en 2014

### Introducción

Los términos “silenciamiento génico” y “silenciamiento génico mediado por ARN” son utilizados habitualmente para describir el “apagado” de un determinado gen, y es un mecanismo general que ocurre durante la regulación de la expresión génica.

La expresión génica puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. El silenciamiento génico transcripcional (en inglés, *Transcriptional Gene Silencing o TGS*) es el resultado de la modificación del ADN o de las histonas presentes en la cromatina. Estas modificaciones crean un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen, que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.) reprimiendo la expresión de dicho gen. El silenciamiento génico post transcripcional (en inglés, *Post-Transcriptional Gene Silencing o PTGS*), en cambio, es un mecanismo que implica la degradación de un ARN mensajero específico (ARNm). La destrucción de este ARNm impide su normal traducción y consecuentemente no se sintetiza la proteína correspondiente.

Tanto el TGS como el PTGS son mecanismos que se encuentran involucrados en la regulación de la expresión de genes endógenos que participan en los procesos celulares, así como también en las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos.

### Un poco de historia

En un principio, el silenciamiento génico fue descrito en plantas como un mecanismo mediante el cual la maquinaria celular desencadenaba la degradación de un ARNm determinado. Se demostró que esta degradación era “específica de secuencia”, ya que sólo eran degradadas las moléculas de ARN que contenían una secuencia en particular, y no otras. Posteriormente, este fenómeno también se denominó 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 codificaba una enzima clave para la producción de pigmentos en los pétalos. Sorprendentemente, muchas de las plantas que tenían copias extras de dicho gen no mostraron el color violeta o rojo intenso esperado. Por el contrario, aparecieron flores parcialmente o completamente 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 extras 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 expresaban proteínas virales eran más resistentes a la infección. Dichos científicos observaron que las plantas que contenían sólo un pequeño segmento del ARN viral, y que no codificaba ninguna proteína, eran igualmente resistentes al ataque del virus. De esta manera, concluyeron que el ARN viral producido a partir de transgenes también podía proteger a la planta de nuevas infecciones virales. 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*).

El experimento clave que clarificaría los resultados contradictorios obtenidos con las petunias y las plantas infectadas con virus fue realizado por los investigadores Andrew Fire y Craig Mello (premios NOBEL en Fisiología y Medicina en 2006). Los investigadores buscaban un modo eficiente de silenciar genes como estrategia para estudiar la función de los mismos en el desarrollo del gusano *C. elegans*. El experimento crucial consistió en introducir, mediante inyecciones, ARN del gen *unc-22*, implicado en el proceso de contracción muscular. Al inyectar el ARN mensajero simple cadena, no se obtenía ningún efecto visible, y la contracción muscular de los gusanos era normal. Sin embargo, al inyectar ARN doble cadena, los gusanos presentaban grandes espasmos, tal como también ocurría en aquellos gusanos que carecían del gen *unc-22*. En esta publicación, Fire y Mello demostraron que es posible el silenciamiento específico de un gen mediante la introducción en la célula de ARN doble cadena (ARNdc) con secuencia homóloga al gen. Además, propusieron que este fenómeno era mediado por un mecanismo endógeno natural, que tenía como consecuencia la degradación del ARNm y que era usado por la célula para controlar la expresión génica. Finalmente, sugirieron una conexión entre este mecanismo y el fenómeno descrito en plantas.

### **Algunas diferencias entre organismos**

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

## Vías del silenciamiento génico en plantas

Desde que se descubrió este mecanismo, diferentes trabajos científicos han demostrado las bases moleculares que controlan la expresión de secuencias endógenas y exógenas en plantas.

En las plantas, como en otros organismos, el silenciamiento es gatillado por la presencia de ARNdc y mediado por ARN pequeños de interferencia (siARN). El ARNdc puede generarse por la presencia de transgenes, la expresión de genes endógenos, por la infección de virus, o bien por medio de la introducción exógena.

Como se dijo previamente, el silenciamiento génico se produce principalmente a nivel transcripcional y post transcripcional. Sin embargo, se han descubierto otras vías por las cuales se puede inducir el silenciamiento génico. Una de ellas corresponde al silenciamiento génico post transduccional, en la cual se reprime la traducción de los ARNm. El otro mecanismo, descubierto hasta el momento en protistas, involucra la eliminación de regiones de ADN.

También las vías de silenciamiento génico se pueden clasificar según el tipo de ARN pequeño involucrado. Las vías pueden estar mediadas por microARNs, ARN pequeños de interferencia endógenos (siARNs) o ARN pequeños derivados de virus (viARNs).

## Mecanismo molecular

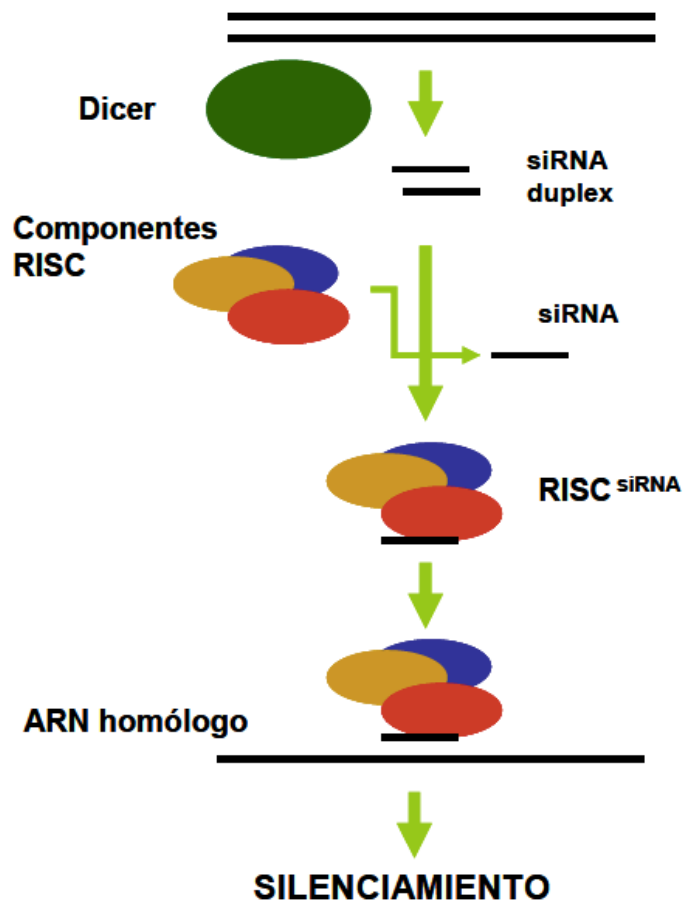
Las bases moleculares del silenciamiento génico se pudieron dilucidar a partir de la identificación de muchos de los genes involucrados en este mecanismo.

### Silenciamiento génico post transcripcional

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, como se mencionó anteriormente, con la presencia de un ARNdc. Éste es reconocido y digerido por la enzima Dicer, que posee dominios de ARNasa tipo III (enzimas que degradan moléculas de ARN), para formar moléculas de ARN pequeñas de 21-24 nucleótidos de longitud. A estos ARNs se los denominó ARN pequeños de interferencia (siARN); y son moléculas cortas de doble cadena que funcionan como determinantes específicos en el silenciamiento génico mediado por ARN.

En la etapa efectora, el siARN 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). RISC es un complejo ribonucleoproteico con actividad endonucleasa dependiente de homología de secuencia que se encarga de la degradación del ARN "target". La actividad helicasa de RISC separa las dos hebras del siARN, 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 siARNs. El núcleo o "core" de RISC está formado por proteínas pertenecientes a la familia argonauta (AGO). Estas proteínas son partícipes fundamentales en los mecanismos de ARN de interferencia en diversos organismos. Existen varias AGOs en plantas, pero la más estudiada fue la AGO1. Esta proteína se encuentra fuertemente implicada en el silenciamiento mediado por transgenes y por virus.



**Figura 2:** Esquema de los principales pasos de la vía del silenciamiento génico post transcripcional.

En plantas existe además una etapa de amplificación que ocurre mediante la producción de copias del ARNdc que originó el silenciamiento, generando más moléculas de siARNs; o directamente mediante la replicación de los siARNs. 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 siARNs como participantes en este proceso.

#### Silenciamiento génico transcripcional

El TGS ocurre en el núcleo de la célula. Mediante este mecanismo se inhibe la síntesis del ARNm, es decir, no ocurre la transcripción. En este caso, los genes están silenciados por modificaciones a nivel del ADN, que implican su metilación (adición de un grupo metilo -CH<sub>3</sub> a una molécula), remodelamiento o modificaciones de las proteínas histonas. Se propone que dichos cambios, posiblemente, alteran la formación de la heterocromatina, es decir, zonas de ADN de alta densidad que impiden el acceso de la “maquinaria transcripcional” y que por ende los genes no se expresan.

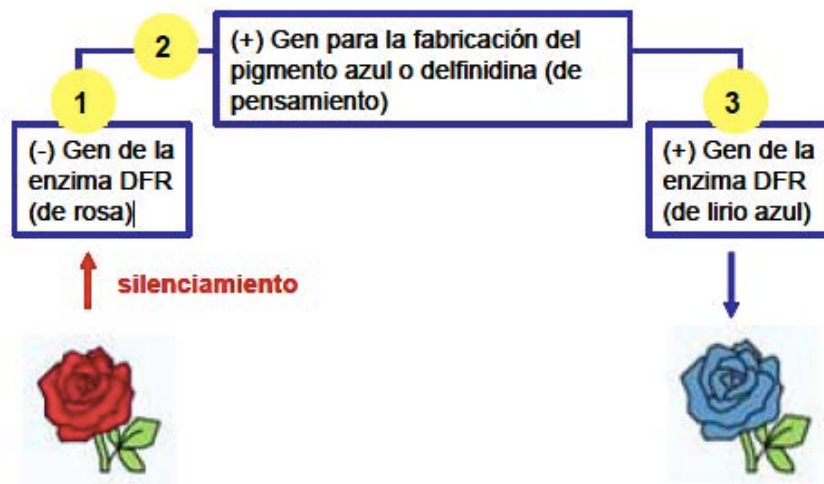
## Aplicaciones biotecnológicas

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 la planta de pensamiento para la producción del pigmento azul (o delphinidina).
3. Restituyeron la actividad de la enzima DFR por introducción del gen de la DFR del lirio azul.

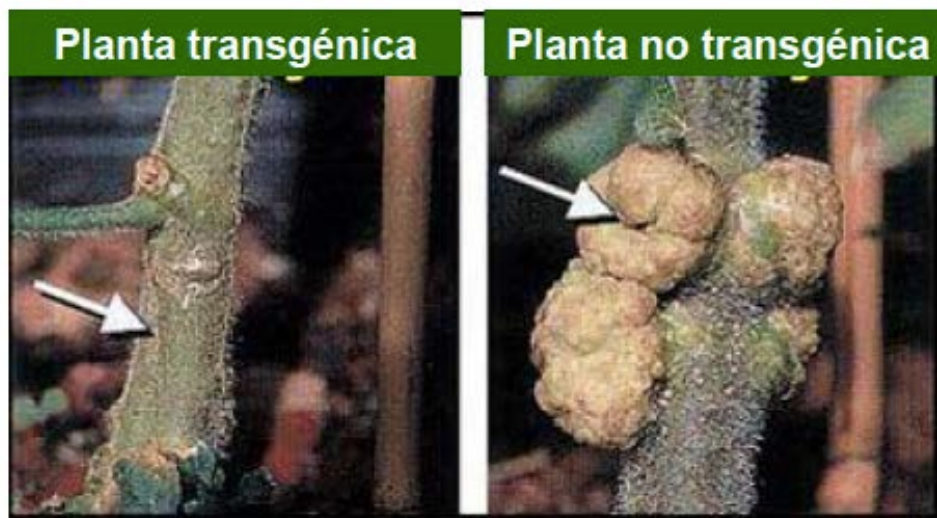


**Figura 3:** Etapas en el desarrollo para obtener una rosa azul.

### 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).

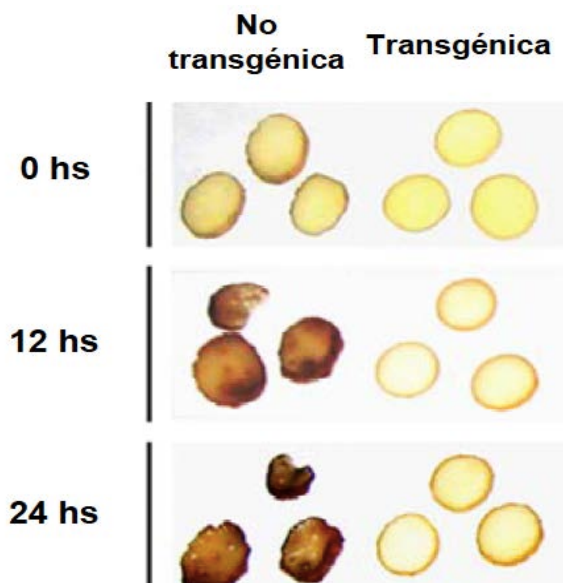


**Figura 4:** Obtención de plantas de tomate resistentes a la agalla de la corona. Tomado de Matthew et al, PNAS, 2001 vol. 98 (23) 13437–13442.

#### 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.

### Planta de café descafeinada

El café descafeinado corresponde al 10% del total de café comercializado alrededor del mundo.

Investigadores japoneses desarrollaron una planta de café (*Coffea* sp.) transgénica que expresa un ARN doble cadena correspondiente a la secuencia del gen CaMXMT1. Dicho gen codifica una enzima que se encuentra involucrada en la vía de biosíntesis de la cafeína. En las plantas que se transformaron con dicho ARNdc se indujo el silenciamiento del gen CaMXMT1 provocando una disminución en los niveles de cafeína entre un 30 y 50% respecto a los controles. Estos resultados demostraron que esta tecnología puede ser utilizada para el desarrollo de plantas de café comerciales descafeinadas.

### **Bibliografía y sitios recomendados**

1. Cuaderno N° 15 Por Qué Biotecnología.
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.
9. Developmental genome rearrangements in ciliates: a natural genomic subtraction mediated by non-coding transcripts. S. Duhaucourt, G. Lepere, E. Meyer. Trends Genet., 2009, 344–350.
10. Gene silencing in plants: A diversity of pathways. Angel Emilio Martínez de Alba, Emilie Elvira-Matlot, Hervé Vaucheret. Biochimica et Biophysica Acta 1829, 2013, 1300–1308.
11. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for efficient biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. Ogita, S. et al. Plant Mol. Biol., 2004, 54, 931–941