

ESTRATEGIAS VÍRICAS CONTRA EL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS

por MIRIAM MOYA BARRIENTOS, MARÍA RIVERO CARRANZA Y CRISTINA VIÚDEZ PAREJA

GRADO EN BIOQUÍMICA, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

RESUMEN: Los virus de plantas han desarrollado estrategias de evasión del silenciamiento genético, la principal vía de defensa ante patógenos intracelulares. Existen dos fenómenos de silenciamiento de RNA en plantas, el silenciamiento génico transcripcional y el silenciamiento génico postranscripcional, que se lleva a cabo gracias a proteínas Dicer y RNAs de pequeño tamaño. Para hacer frente a estas defensas, los virus de plantas presentan diversas estrategias, entre las que destacan las proteínas supresoras del silenciamiento.

ABSTRACT: *Plant viruses have developed strategies to evade genetic silencing, which is the main defense of plants against intracellular pathogens. There are two types of RNA silencing in plants: transcriptional silencing and postranscriptional silencing, which involves Dicer proteins and small RNAs. In order to fight these defenses, plant viruses encode suppressor proteins.*

Introducción

Las plantas son organismos sésiles que presentan mecanismos sofisticados de inmunidad innata capaces de desencadenar defensas exitosas ante patógenos invasores potenciales. Sin embargo, existen agentes infecciosos capaces de evadir el reconocimiento y/o suprimir el mecanismo de defensa del huésped^[1].

Por su parte, los virus son patógenos intracelulares obligados absolutamente dependientes de la maquinaria celular del huésped para multiplicarse y propagarse^[2]. Estos han desarrollado diferentes estrategias con el fin de evadir el sistema inmune de las plantas, entre otros organismos, mediante la codificación de proteínas específicas contra el silenciamiento genético del hospedador^[3].

Silenciamiento de RNA en plantas

El silenciamiento de RNA o *RNA interference* (RNAi) es uno de los mecanismos de defensa que presentan las plantas. Se trata de un fenómeno conservado evolutivamente en el que, mediante un mecanismo específico de secuencia, se controla la defensa

frente a ácidos nucleicos invasivos como transposones, transgenes y virus^[4].

Se conocen dos fenómenos de silenciamiento en las plantas: el silenciamiento génico transcripcional (TGS) y silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), que utiliza pequeños RNA reguladores (*small RNAs*, sRNAs) dirigidos específicamente a los ácidos nucleicos invasores^[5].

1. Silenciamiento génico transcripcional (TGS). Este proceso comienza con la acción de la RNA polimerasa IV dando lugar a RNA de cadena simple (ssRNA), los cuales pasan a RNA de doble cadena (dsRNA) por la acción de la RNA polimerasa dependiente de RNA 2 (RDR2). Por su parte, DCL3 (proteína similar a Dicer 3 o *Dicer-Like 3*) se encarga de generar los RNAs pequeños interferentes (siRNA) de 24 nucleótidos gracias a su dominio RNAasa tipo III. Estos siRNAs se asocian a la proteína Argonau-ta 4 (AGO4) dando lugar finalmente al complejo transcripcional de silenciamiento inducido por RNA (RITS), que actúa como una hebra guía para la formación de heterocromatina y la metilación^[5,6].

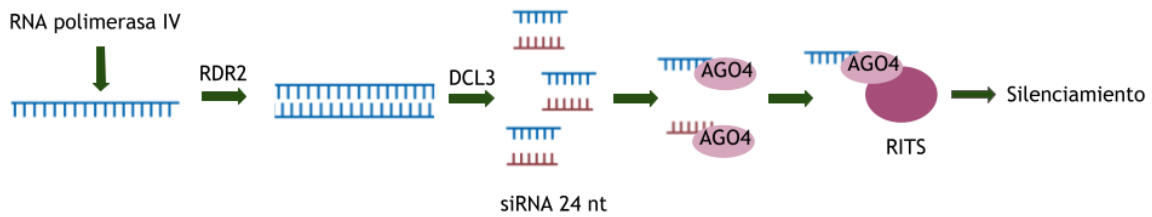


Figura 1. Mecanismo molecular del silenciamiento génico transcripcional (TGS). La RNA polimerasa IV origina el RNA de cadena sencilla que es tomado por la RNA polimerasa dependiente de RNA 2 (RDR2). Esta polimerasa sintetiza la cadena complementaria del RNA generando el RNA de doble cadena, el cual es fragmentado por la proteína similar a Dicer 3 (DCL3) en RNAs interferente de pequeño tamaño (siRNA) de 24 nucleótidos (nt). La proteína argonauta 4 (AGO4) capta estos siRNAs y se asocia al complejo transcripcional de silenciamiento inducido por RNA (RITS). De esta manera, RITS actúa como guía para el silenciamiento del genoma viral. Figura de elaboración propia.

2. Silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). El primer paso del PTGS es la síntesis de dsRNA o de un *hairpin* de RNA (hpRNA) a partir del genoma viral, ya sea por la RDR de los virus de RNA o por la RNA polimerasa II celular si es un virus de DNA. El dsRNA formado es el sustrato, en este caso, de DCL4, que genera siRNAs de 21 nt [4,5,6,7]. Los siRNAs procesados son llevados por la proteína AGO al componente efector, conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). RISC se encarga de romper la cadena de RNA mensajero (mRNA) viral por la unión complementaria del siRNA al

mRNA, generando el dúplex siRNA-mRNA [4,5,6]. De esta manera, los RNA o los transcritos de DNA viral son eliminados por PTGS [5].

3. microRNAs. La transcripción de los genes MIR de la planta por parte de la RNA polimerasa II genera transcritos dsRNA que, cuando se procesan por la DCL1, generan microRNAs (miRNAs). Los miRNAs regulan negativamente la expresión génica por apareamiento de bases a mRNAs específicos (monocatenarios), resultando en la rotura del mRNA o en la detención de la traducción del mismo [4,6,7].

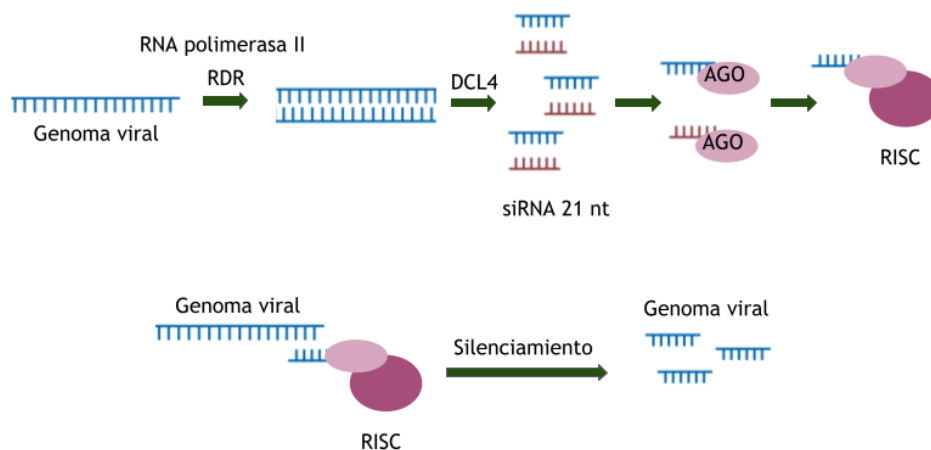


Figura 2. Mecanismo molecular del silenciamiento postranscripcional (PTGS). El genoma viral monocatenario es tomado por la RNA polimerasa II (virus de DNA) o por la RNA polimerasa dependiente de RNA de un virus RNA para formar la cadena complementaria (dsRNA). A continuación, la proteína similar a Dicer 4 (DCL4) origina RNAs interferentes de pequeño tamaño (siRNA) de 21 nucleótidos (nt). La proteína argonauta (AGO) capta estos siRNAs y se asocia al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). De esta manera, RISC reconoce al genoma viral y se encarga de fragmentarlo. Figura de elaboración propia.

Estrategias víricas para escapar del silenciamiento

Al mismo tiempo que las plantas han ido estableciendo barreras y defensas para protegerse de las infecciones, los virus han desarrollado estrategias para contrarrestarlas y contraatacar. La mayor parte de

los virus de plantas presenta genes que codifican proteínas supresoras del silenciamiento de RNA (VSRS, *viral suppressors of RNA silencing*). Además, algunos RNAs virales presentan estructuras secundarias protectoras, que impiden su degradación por el sistema de silenciamiento, o se encuentran en compartimentos que no están accesibles para la maquinaria de silenciamiento de la planta^[7].

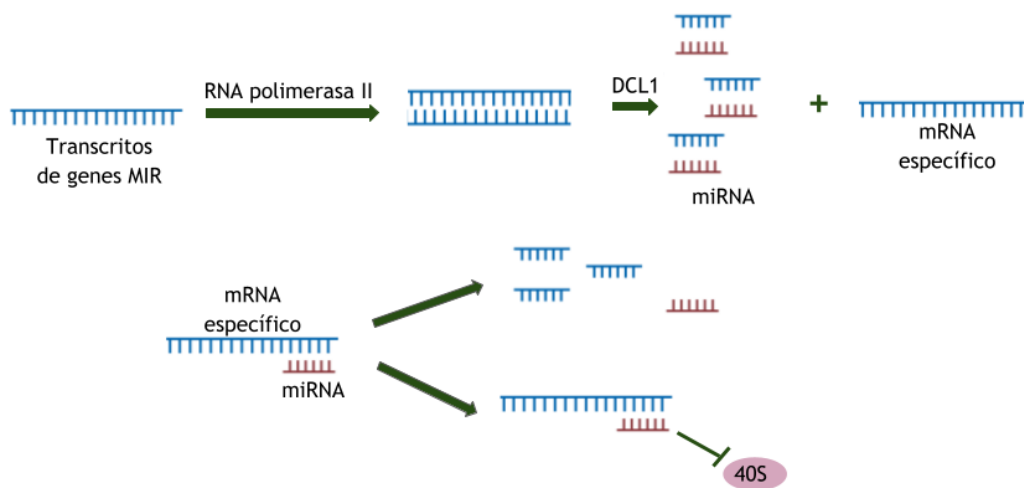


Figura 3. Mecanismo molecular de silenciamiento mediante miRNAs. Los transcritos de los genes MIR son tomados por la RNA polimerasa II para generar el RNA de doble cadena (dsRNA). Estos dsRNAs son fragmentados por la proteína similar a Dicer 1 (DCL1) generando microRNA (miRNA). El miRNA reconoce mensajeros de RNA (mRNA) específicos, lo que da pie a la degradación del mismo o a la detección de su traducción al no permitir la unión de la subunidad pequeña ribosomal (40S). Figura de elaboración propia.

Las proteínas supresoras del silenciamiento presentan una gran diversidad, pero pueden clasificarse en cuatro grupos atendiendo al paso del silenciamiento con el que interfieren^[8]:

- Supresores que se unen a dsRNA impidiendo su procesamiento por DCL.
- Supresores que degradan o secuestran siRNAs antes de que se unan a su diana.
- Supresores que actúan sobre AGO y RISC.
- Supresores que bloquean la propagación sistémica de las señales de silenciamiento.

Además, muchas de estas proteínas supresoras actúan en varios niveles del silenciamiento, interfiriendo con varios pasos del proceso.

1. Supresores que se unen a dsRNA. Estos supresores se unen a la molécula de dsRNA con el fin de protegerla de la actividad de DCL, con lo que se evitaría la generación de siRNA y se detendría el silenciamiento en la etapa más inicial^[3]. Algunos supresores de este tipo presentan especificidad por el

tamaño, es decir, se unen de forma selectiva según el número de nucleótidos del dsRNA. Esta especificidad permite interferir con la respuesta antiviral sin dañar excesivamente a la planta al no interferir con dsRNA largos y endógenos^[9]. Asimismo, también existen supresores que se unen al dsRNA independientemente de su tamaño, como es el caso de las proteínas P14 de aureusvirus y CP del virus del arrugado del nabo (TCV; familia *Tombusviridae*, género *Betacarmovirus*).

Por otra parte, los supresores presentan distintos requerimientos estructurales para unirse al dsRNA, es decir, sólo se unen al dsRNA cuando este presenta una determinada estructura^[10]. Como ejemplo de este tipo de supresores está la proteína P14 de aureusvirus, que forma complejos con siRNAs de doble cadena de 21 a 26 nucleótidos y con dsRNA de mayor tamaño. Esta proteína puede unirse a ambas moléculas y suprimir el silenciamiento inducido por *hairpins*, previniendo así la acumulación de siRNAs^[9].

2. Supresores que degradan o secuestran siRNAs. El segundo grupo de supresores está constituido por proteínas que impiden que el siRNA se una

a su diana complementaria. En este grupo se conoce bien el mecanismo de acción de la proteína P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV; familia *Tombusviridae*, género *Tombusvirus*). En este caso, un homodímero de P19 forma una estructura alrededor del siRNA, de modo que no puede ser incorporado a un RISC activo^[7]. La unión al siRNA ocurre independientemente de su secuencia^[10]; sin embargo, esta proteína muestra especificidad por los siRNAs de 21 nucleótidos^[3].

3. Supresores que actúan sobre AGO y RISC.

Los mecanismos a través de los cuales los supresores actúan sobre AGO consisten en la inhibición de la proteína o la activación de su degradación. La principal consecuencia de este mecanismo es que se inhibe la función del complejo RISC y no se puede continuar con el silenciamiento.

En este grupo de supresores se encuentra la proteína P38 de la cápside del TCV^[13]. Durante una infección por TCV la proteína de la cápside P38 reprime el silenciamiento actuando como un homodímero que se une específicamente a AGO1, la cual carga preferencialmente los siRNAs de 22 nucleótidos generados por la infección de estos virus. P38 mimetiza proteínas del huésped necesarias para el ensamblaje y funcionamiento de RISC. La proteína de la cápside se acumula durante la multiplicación viral, de manera que secuestra AGO1 y previene que interactúe con las moléculas de siRNA y miRNA, evitando su ensamblaje y en consecuencia su carga al complejo^[13]. Por otra parte, se ha observado que la inactivación de AGO1 mediada por el supresor P38 tiene un impacto en la disponibilidad de proteínas Dicers.

Otros supresores, como la proteína F-box (P0) de los polerovirus, median la degradación de la proteína AGO. Esta acción es indirecta puesto que P0 interactúa con proteínas implicadas en la degradación de AGO1. Como consecuencia de la acción del supresor se produce la degradación de la proteína a través de autofagia^[15].

4. Supresores que bloquean la propagación sistémica. La supresión de la actividad de las proteínas RDR supone una diana perfecta para muchos VSRs, ya que de ella depende la amplificación de la señal a otros tejidos. Por tanto, sin esta actividad se facilitarían la diseminación y replicación viral en otras zonas de la planta^[16]. Sin embargo, existen otros mecanismos que también permiten bloquear la propagación del silenciamiento, de ahí la variedad de supresores.

La proteína P15 del virus del macizo del cacahuate (PCV; familia *Virgaviridae*, género *Pecluvirus*) une

siRNAs y los lleva a los peroxisomas, donde son degradados, impidiendo que se propaguen por la célula^[17]. Otro de los supresores que actúan a este nivel es la proteína V2 del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV; familia *Geminiviridae*, género *Begomovirus*). Se plantea que interactúa con la proteína SGS3, que es cofactor de RDR6, compitiendo por la unión de dsRNA^[12].

5. Supresores que actúan a más de un nivel.

La proteína HC-Pro de potyvirus es una proteína que ejerce múltiples funciones, entre las cuales se encuentra su acción como supresor, interfiriendo a diferentes niveles del silenciamiento. Existen diferencias en la actividad y en la conformación activa de esta proteína en los diferentes potyvirus, pudiendo formar dímeros o multímeros^[18].

En el caso del virus del grabado del tabaco (TEV), esta proteína se une al siRNA y lo secuestra, impidiendo así su ensamblaje en el complejo RISC. Se ha observado que tiene especificidad por siRNAs de 21 nucleótidos^[3]. También puede interferir con dos enzimas clave del ciclo de la metionina, de modo que inhiben la metilación de los siRNA virales^[18,19].

Conclusión

El silenciamiento génico de RNA supone una sofisticada defensa contra patógenos intracelulares. Aun así, el desarrollo de numerosas estrategias víricas frente a diferentes niveles de esta ruta compromete su efectividad. Los supresores víricos del silenciamiento presentan gran diversidad de estructura y de mecanismos de acción, de manera que hay supresores que actúan en diferentes puntos de la ruta de silenciamiento, pero también hay supresores que interrumpen varios puntos. El objetivo final de estos es interferir con las defensas de la planta para lograr una infección exitosa.

Referencias

- [1] Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A. y Fontes, E. P. (2017). Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in microbiology*, 7, 2139.
- [2] Boualem, A., Dogimont, C. y Bendahmane, A. (2016). The battle for survival between viruses and their host plants. *Current opinion in virology*, 17, 32-38.
- [3] Li, F. y Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 503-531.
- [4] Zvereva, A. S. y Pooggin, M. M. (2012). Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses*, 4 (11), 2578-2597.

- [5] Muthamilarasan, M. y Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of biosciences*, 38(2), 433-449.
- [6] Wang, M. B. y Metzloff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current opinion in plant biology*, 8(2), 216-222.
- [7] Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356-363.
- [8] Prasad, A., Sharma, N., Muthamilarasan, M., Rana, S. y Prasad, M. (2019). Recent advances in small RNA mediated plant-virus interactions. *Critical reviews in biotechnology*, 39(4), 587-601.
- [9] Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L. y Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of virology*, 80(12), 5747-5756.
- [10] Danielson, D. C. y Pezacki, J. P. (2013). Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS letters*, 587(8), 1198-1205.
- [11] Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J. y Silhavy, D. (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of virology*, 79(11), 7217-7226.
- [12] Burgyán, J. y Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in plant science*, 16(5), 265-272.
- [13] Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T. y Voinnet, O. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & development*, 24(9), 904-915.
- [14] Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E. y Baulcombe, D. C. (2007). The P1 protein of the P1/P2 virus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current biology: CB*, 17(18), 1609-1614.
- [15] Pumplin, N. y Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745-760.
- [16] Csorba, T., Kontra, L. y Burgyán, J. (2015). Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479-480, 85-103.
- [17] Daròs J. A. (2017). Viral suppressors: Combatting RNA silencing. *Nature plants*, 3, 17098.
- [18] Bao, W., Yan, T., Deng, X. y Wuriyangan, H. (2020). Synthesis of Full-Length cDNA Infectious Clones of Soybean Mosaic Virus and Functional Identification of a Key Amino Acid in the Silencing Suppressor Hc-Pro. *Viruses*, 12(8), 886.
- [19] Ivanov, K. I., Eskelin, K., Bašić, M., De, S., Löhmus, A., Varjosalo, M. y Mäkinen, K. (2016). Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 85(1), 30-45.
-
-