

Biotecnología microbiana. Silenciamiento genético mediado por RNA en hongos: mecanismos y aplicaciones

VÍCTOR RODRÍGUEZ PASTOR¹

Universidad de Salamanca

victorrrp@usal.es

RESUMEN

En *Neurospora crassa* se han identificado tres fenómenos relacionados con el silenciamiento génico mediado por RNA: represión, silenciamiento mitótico por DNA no emparejado y RIP. Parecido al caso de las rutas con siRNA y miRNA en *Drosophila*, diferentes conjuntos de componentes proteicos incluyendo una polimerasa RNA dependiente de RNA, una proteína argonauta y un DICER, se usan para la represión y para el silenciamiento mitótico por DNA no emparejado.

Componentes ortólogos del silenciamiento mediado por RNA se encuentran en la mayoría de los genomas fúngicos que están en bases de datos públicas de hongos, significando que casi todos los hongos poseen maquinaria relacionada con la silenciación génica. A lo largo del trabajo se discuten las ventajas y las desventajas del silenciamiento génico con RNA como herramienta para averiguar las distintas funciones que puedan tener los genes en cuestión que se silencian.

Palabras clave: neurospora, crassa, silenciamiento-génico-mediado-por-RNA, que-lling, RIP, MSUD

¹ Víctor RODRÍGUEZ PASTOR es estudiante de 4º curso del Grado en Biotecnología de la Universidad de Salamanca

SUMMARY

Three different RNA-mediated gene silencing phenomena have been identified in *Neurospora crassa*: Quelling, Repeat-Induced Point mutation (RIP) and Meiotic Silencing by Unpaired DNA (MSUD). Similar to siRNA and miRNA paths in *Drosophila*, there are different protein complexes, which include an Argonaut protein, a RNA-polymerase-RNA-dependent and a DICER, used for the repression and the RNA-mediated silencing.

Ortholog components involved in RNA-mediated silencing have been shown to exist in most of the fungi genomes that are currently registered in public databases and, therefore, almost every fungi organism has the machinery needed for this type of silencing. Throughout this dissertation, we will discuss the pros and cons of these techniques used as a tool in order to reveal the target genes functions.

Key words: neurospora, crassa, RNA-mediated-gene-silencing, quelling, RIP, MSUD

1. INTRODUCCIÓN. EL REINO FUNGI

El reino fungi lo compone un grupo muy grande y diverso de organismos eucariotas. A fecha de 2005 lo componían 100.000 especies descritas y se creía que faltaban aproximadamente un millón más. Como grupo, fungi tienen una gran importancia tanto en la vida humana (por ejemplo, por las enfermedades que causan) como en el funcionamiento de los ecosistemas.

Los hongos son los principales descomponedores en la ecosfera y tienen papeles vitales al completar los distintos ciclos de los nutrientes. Algunos hongos realizan asociación simbiótica con plantas o algas, en las cuales los hongos obtienen carbohidratos del organismo fotosintético y, a cambio, proveen a éste con iones minerales y agua.

Se cree que más del 90% de las plantas tienen hongos en sus raíces y muchas de ellas no sobrevivirían sin ellos. Además, los organismos del reino fungi se usan directamente como comida (setas) y otros son agentes importantes para la producción de comida fermentada y para la manufacturación de enzimas y antibióticos.

Algunos hongos tienen ciclos de vida parasíticos y causan un montón de enfermedades en animales, humanos y plantas produciendo pérdidas de dinero. Así, la amenaza de las infecciones humanas producidas por hongos está ganando la atención pública debido al continuo incremento de pacientes con inmunodeficiencias, por ejemplo, causadas por el SIDA.

Los hongos son el grupo más importante de patógenos de plantas, y causan muchas pérdidas en el rendimiento de las cosechas y su valor en el mercado.

Los organismos del grupo fungi también son importantes para la ciencia básica debido a que sus estructuras celulares eucariotas, sus rutas metabólicas y su orga-

nización génica son similares a las eucariotas superiores como los humanos y las plantas. Ofrecen ventajas como modelo por la facilidad para ser manipulados tanto genética como molecularmente, combinado con unos ciclos de vida cortos y unos genomas pequeños y haploides (mucho más fáciles de estudiar).

Las investigaciones en estos hongos son totalmente punteras en diversos campos como la genética molecular, biología celular, desarrollo, reparación del DNA, ritmos circadianos, evolución y silenciamiento génico.

2. QUELLING, UN FENÓMENO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO DESCUBIERTO EN EL HONGO NEUROSPORA CRASSA

El quelling se definió originalmente como una inactivación reversible de la expresión génica mediante la transformación del organismo con secuencias homólogas repetidas. Este proceso ocurre durante la fase vegetativa del crecimiento, y como la cosupresión en plantas, afecta tanto a transgenes como a genes endógenos. El quelling requiere de una proteína argonauta y actúa generando moléculas de RNA pequeño (de unos 25 nucleótidos) que a su vez tienen como diana los mRNAs con el objetivo de silenciarlos. Recientemente se ha visto que se necesita el quelling para reprimir a los transposones, pero, al contrario que otros organismos modelos, no parece tener ningún rol en el ensamblaje de la cromatina y su mantenimiento.

Las características genéticas y bioquímicas del quelling indican que éste pertenece a la categoría de mecanismos de silenciamiento génicos mediados por RNA que incluyen el silenciamiento postrascriptcional o la cosupresión en plantas y el RNAi en animales. La co-supresión en plantas fue el primero de estos fenómenos que se observó, en 1990, intentando sobreexpresar el gen que codificaba la chalcona sintasa (responsable de la pigmentación de las flores de petunia). Con este fin, introdujeron copias extras de este gen, *chs*, pero, en vez de obtener plantas con flores completamente negras, se encontraron plantas con flores blancas.

Dos años después, se observó un fenómeno similar en *N. crassa*. Romano y Macino intentaron sobreexpresar el gen *al-1*, necesario para la biosíntesis de carotenoides, que confiere a *N. crassa* su típica pigmentación naranja. Sin embargo, al introducir copias extras del gen *al-1*, obtuvieron aproximadamente un 30% que presentaban un fenotipo blanco idéntico a uno de los mutantes de *al-1*. A este fenómeno se le llamó quelling.

Una caracterización extensiva reveló que las proteínas involucradas en estos mecanismos están evolutivamente conservadas, aunque cada uno de los sistemas tiene sus peculiaridades. Tanto el quelling, como la cosupresión y el RNAi necesitan de la actuación de RNAs pequeños de 22-25 nucleótidos, llamados RNA de

interferencia pequeños (siRNAs) que degradan directamente los mRNAs dianas, dando como resultados un silenciamiento de los genes a nivel post-transcripcional.

Mientras que la metilación del ADN suele estar relacionada con el quelling, no es necesaria para que se dé el proceso. Parece que una señal móvil como el RNA actúa en trans para causar el silenciamiento. De hecho, una serie de estudios con mutantes sin quelling han demostrado que el RNAi es necesario para que se dé el proceso. En este caso, el mutante *qde-1* no tenía la RNA polimerasa dependiente de RNA, sugiriendo que la ruta del quelling estaba relacionada con el silenciamiento de RNA.

El quelling acaba dando lugar a una inactivación específica de genes que son homólogos a secuencias de ADN introducidas por transformación (transgenes). La inactivación ocurre a nivel post-transcripcional, de hecho, la cantidad de transcritos que no han sufrido el proceso de splicing no se altera, mientras que la cantidad de los mRNA maduros sufren un decrecimiento dramático detectable por northern blot. El sistema experimental propuesto por Macino se aprovechó del fenotipo no-naranja típico asociado con mutantes de genes de *al-1*. Así, *N. crassa* se transformó usando un plásmido que contenía la secuencia entera del gen *al-1*.

Mediante una simple inspección visual, se vio que alrededor del 30% de los transformantes no eran naranjas sino blancos o de color amarillo pálido, indicando que había habido algún tipo de silenciamiento del gen *al-1*.

Este sistema, que solo necesita un análisis simple y cualitativo de un fenotipo fácilmente detectable, se ha utilizado de forma extensiva para caracterizar y detectar los fenómenos de quelling en otros estudios. La transformación de *N. crassa* con diferentes construcciones ha revelado que la mínima longitud de la región homóloga a introducir para que se dé el quelling es de 132 pares de nucleótidos.

Diferentes secuencias introducidas y que inducen quelling tienen eficiencias un poco diferentes, pero parecidas (calculadas como el porcentaje de colonias que presentan un fenotipo no-naranja). Además, la introducción de regiones genómicas que no se transcriben (es decir, secuencias promotoras) no son suficientes para inducir el quelling.

Lo que es más, los investigadores pronto se dieron cuenta de que el quelling era un fenómeno reversible, ya que cepas con un fenotipo blanco, ocasionalmente daban lugar a colonias naranjas. La frecuencia de reversión variaba bastante entre las distintas cepas que habían sido silenciadas mediante el mecanismo del quelling.

El aislamiento de una cepa estable que hubiera sufrido el quelling permitió una aproximación mediante la mutación por ultravioleta y la subsiguiente caracterización de las cepas que habían perdido la habilidad de silenciar la expresión del reportador de *al-1*, identificadas por su color naranja.

Los análisis mutacionales llevaron al aislamiento de tres clases de cepas defectivas en quelling, llamadas *qde-1*, *qde-2* y *qde-3*. *Qde-1* codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), *qde-3* codifica una helicasa y *qde-2* una proteína perteneciente a la familia de las proteínas argonautas.

Además, se requieren otras dos proteínas para que se dé el proceso del quelling correctamente: *DLC-1* y *DLC-2* que no fueron detectadas en el análisis mutacional porque son redundantes en la ruta del quelling. Sin embargo, mediante una aproximación de genética inversa, se demostró su rol en el quelling de *N. crassa*. Recientemente, Maiti identificó un componente nuevo para el quelling, codificado por el gen *qip*.

2.1. MECANISMO PARA QUE SE DÉ EL QUELLING

La identificación de genes involucrados en el quelling se continuó con la caracterización bioquímica de sus correspondientes proteínas en *N. crassa* y sus homólogos en otros organismos modelos.

Se vio que *qde-1* compartía homología con *sgs-2* y *ego-1*, que son necesarios para el mecanismo de RNAi en plantas y en *Caenorhabditis elegans*, respectivamente. Su actividad bioquímica se ha descrito en detalle, confirmando su actividad como RdRP. *QDE-2* pertenece a la familia de proteínas probablemente mejor caracterizada y estudiada involucrada en RNAi, la familia de las proteínas argonautas. A partir de evidencias genéticas que relacionaban proteínas de esta familia con RNAi en fungi, nematodos y plantas, se vio que un complejo proteico es responsable del RNAi y que este contiene un miembro de la familia de las proteínas argonautas.

Esas proteínas argonautas son catalizadores que proveen actividad *slicer* al RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). Una enzima DICER fue por primera vez identificada en *Drosophila melanogaster* y después se vio que es necesaria para el RNAi en todos los organismos. Estas proteínas pertenecen a la familia de las RNasa III y cortan cadenas de RNA de doble cadena en fragmentos de unos 21 nucleótidos, que contienen normalmente extremos romos. Además, el DICER está involucrado también en la maduración de miRNA en animales y plantas.

El modelo actual para el mecanismo del quelling se basa en que la transcripción de los transgenes genera un RNA que *N. crassa* detecta y el mRNA se usa como sustrato por la proteína *QDE-1*, produciendo una molécula de RNA de doble cadena. Dicha molécula es sustrato para la degradación por las dos enzimas del tipo DICER, que la cortan en siRNAs de unos 25 nucleótidos de largo. Estas últimas moléculas se incorporan después a los RISC de dos en dos; una de las hebras

de siRNA se retiene por el RISC y la otra sufre la actividad *slicer* de QDE-2 y es removida después por la exonucleasa QIP.

El siRNA que se mantiene asociado al RISC es usado como una guía molecular para detectar moléculas homólogas de RNA por complementariedad de bases. Después de la identificación, las moléculas de RNA complementario a los siRNAs se degradan, mayoritariamente por la enzima QDE-2.

2.2. EL MODELO ESTÁ SOPORTADO POR MUCHAS EVIDENCIAS EXPERIMENTALES, SIN EMBARGO, ALGUNOS ASPECTOS TODAVÍA NO ESTÁN CLAROS

Un paso que todavía no se entiende demasiado bien es cómo el RNA transgénico es capaz de disparar el quelling. Se ha sugerido que algún tipo de propiedad intrínseca del transcrito transgénico pudiera ser identificada por RNA aberrante, dando lugar a la activación del silenciamiento en plantas. Algunas evidencias experimentales en plantas han señalado que los mRNAs sin CAP podrían ser las moléculas que disparan el silenciamiento.

Sin embargo, otros informes recientes señalan a mRNAs que no tienen un splicing correcto y/o que no se han terminado de transcribir bien. Otros modelos podrían ser sugeridos, sin requerir la transcripción de un RNA aberrante, por ejemplo, QDE-1 podría engancharse a los transcritos transgénicos directamente durante la transcripción en el núcleo.

Esto podría ser el resultado de propiedades intrínsecas de los propios locus transgénicos, más que de aberraciones de los mRNA transgénicos al transcribirse. Un candidato con posibilidades de producir este enganchamiento de QDE-1 al locus transgénico naciente podría ser QDE-3.

De hecho, el rol de *qde-3* en el quelling todavía es desconocido. Así, es probable que *qde-3* actúe en *upstream* respecto a la formación del intermediario dsRNA que comentamos antes. Se ha comprobado que la introducción de una construcción repetida invertida en *N. crassa*, que se transcribe produciendo un dsRNA que es homólogo al gen *al-1*, puede inducir el silenciamiento de *al-1* endógeno, dando a entender que no se necesita solo *qde-1* sino también la expresión de *qde-3*.

La actividad predicha para una RecQ DNA helicasa sugiere que QDE-3 podría tener un rol en la resolución de estructuras complejas de DNA que son producidas a partir de los locus transgénicos a partir de la integración en tándem, y así, se permite la correcta transcripción del propio transgén, quizás mediante QDE-1 uniéndose al transcrito naciente como se dijo antes.

Conviene darse cuenta de que QDE-3 comparte homología con el dominio RecQ helicasa de humanos de la proteína WRN, la cual está involucrada en la reparación del DNA y está unida al síndrome de Werner. De hecho, *qde-3* parece tener un rol en la reparación del DNA, en conjunto con su homólogo, *Recq-2*.

Interesantemente, otros genes que comparten homología con el dominio RNAasa de *wrn* parecen ser necesarios para el RNAi tanto en plantas como en otros organismos. Además, un homólogo cercano de *qde-3*, *rRecQ-1*, parece estar asociado con una nueva clase de RNAs pequeños llamados piRNAs.

2.3. EFICIENCIA DEL QUELLING Y MANTENIMIENTO

El hecho de que el quelling ocurre en un porcentaje pequeño como ya comentamos anteriormente (sobre el 30% de las cepas transformadas) sugiere que la introducción de transgenes como tal no es suficiente para inducir el quelling. Análisis moleculares han revelado que el número de copias del transgén es también un factor importante (cuantas más copias se integren en el genoma, más probable es que se dé el quelling).

Esto da a entender que existe un límite que se debe alcanzar para disparar el fenómeno del quelling. Uno podría preguntarse cuál es el factor limitante en el establecimiento del quelling. La respuesta se consigue en distintos experimentos en los cuales las eficiencias de quelling se incrementaron mediante la sobreexpresión del gen *de-1*, y así, presumiblemente se incrementaron los niveles de dsRNA acumulados dentro de la célula.

Esto está de acuerdo con los resultados independientes que demostraban que la eficiencia del quelling se incrementaba bastante (hasta un 80%) cuando se inducía por una construcción de repeticiones invertidas más que por un transgén.

Cualquiera de estas aproximaciones lleva a un incremento del dsRNA dentro de la célula, sugiriendo que el factor limitante podría ser la producción de un RNA de doble cadena.

Recientemente se ha visto que las cepas que sufren el quelling tienen tendencia a revertir al fenotipo silvestre. La frecuencia de reversión varía y parece estar correlacionada con el número de copias del transgén. La metilación de Lys9 de la Histona 3 es requerida para el mantenimiento del transgén. De hecho, los knock-out del gen *dim5*, responsable de la metilación de H3K9 en *N. crassa*, resulta en el incremento de la frecuencia de reversión debida a la pérdida progresiva de las copias del gen transgénico.

2.4. EL ROL FISIOLÓGICO DEL QUELLING

El quelling probablemente ha evolucionado como un mecanismo de defensa frente a virus y transposones. En *N. crassa* el quelling coopera con el MSUD y el RIP en el mantenimiento del control de la expansión de los transposones dentro del genoma. De hecho, la eficiencia de estos tres mecanismos es consistente con el hecho de que no se puede encontrar ni un solo transposón activo en el genoma de *N. crassa*. La única excepción es el elemento Tad, que actúa en algunas de las cepas.

Sin embargo, hay restos de transposones antiguos a lo largo del genoma de *N. crassa*. Esto es principalmente porque el proceso RIP, que ocurre en la fase premeiótica, ha saturado progresivamente todos los transposones antiguos con mutaciones que los han ido inactivando. A pesar de eso, hay varias evidencias de que el quelling actúa para silenciar transposones en *N. crassa*. Por un lado, se han visto que los genes *qde-2*, *dcl-1* y *dcl-2* son necesarios para reprimir un elemento Tad en *N. crassa*, mientras que por otro lado se han encontrado siRNAs que tienen como diana transposones que ya han sufrido el RIP y, por tanto, están inactivados.

Se ha visto en distintos organismos que el RNAi está relacionado con el silenciamiento génico transcripcional guiando el ensamblaje de la heterocromatina. En *Saccharomyces pombe*, por ejemplo, una proteína argonauta y un gen DICER son necesarios para el ensamblaje de la heterocromatina a los centrómeros.

Sorprendentemente, parece que *N. crassa* difiere del resto de los organismos en este aspecto. De hecho, al contrario que en otros organismos, la incapacidad para hacer quelling no afecta a la metilación de H3k9 y, consecuentemente, tampoco varía la configuración de la cromatina de los genes que han sufrido quelling. Lo que es más, el quelling no es necesario para el mantenimiento del estado de la heterocromatina de los restos de transposones que hemos comentado que sufrieron el mecanismo RIP.

En plantas y animales, se ha visto que el mecanismo RNAi tiene un papel importante en la modulación de la expresión de genes endógenos a un nivel post-transcripcional. De hecho, una clase nueva de RNAs pequeños, llamada microRNA (miRNA) degradan directamente o inhiben la traducción de los mRNAs dianas mediante un mecanismo dependiente de RISC en plantas y animales.

Sin embargo, no se han encontrado miRNAs en fungi a pesar de haber hecho análisis exhaustivos. Finalmente, se ha propuesto que la maquinaria del quelling podría regular algunos genes endógenos. En particular, *frq* se transcribe en ambas orientaciones (sentido y antisentido), sugiriendo que se podría formar una molécula de RNA de doble cadena in vivo y podría ser un sustrato para las enzimas DCL-1 y DLC2.

A pesar de ello, un papel masivo para el quelling en la fisiología de *N. crassa* no parece probable porque ninguno de los mutantes que no tenían quelling mostraban otro tipo de defectos.

3. SILENCIAMIENTO MEIÓTICO POR DNA DESEMPAREJADO, UN FENÓMENO NUEVO RELACIONADO CON EL SILENCIAMIENTO

El silenciamiento meiótico causado por DNA desemparejado (MSUD) es un fenómeno nuevo que se descubrió en un estudio en *Neurospora crassa* sobre la transvección meiótica (interacciones entre los distintos alelos del mismo gen que pueden activarlo o no). Aunque *Neurospora crassa* es haploide durante el crecimiento vegetativo, forma una célula diploide transitoria para formar el cigoto. Este cigoto sufre meiosis, lo que incluye el emparejamiento de los cromosomas homólogos, seguido por una mitosis post-meiótica que acaba dando lugar a un asca con 8 ascosporas.

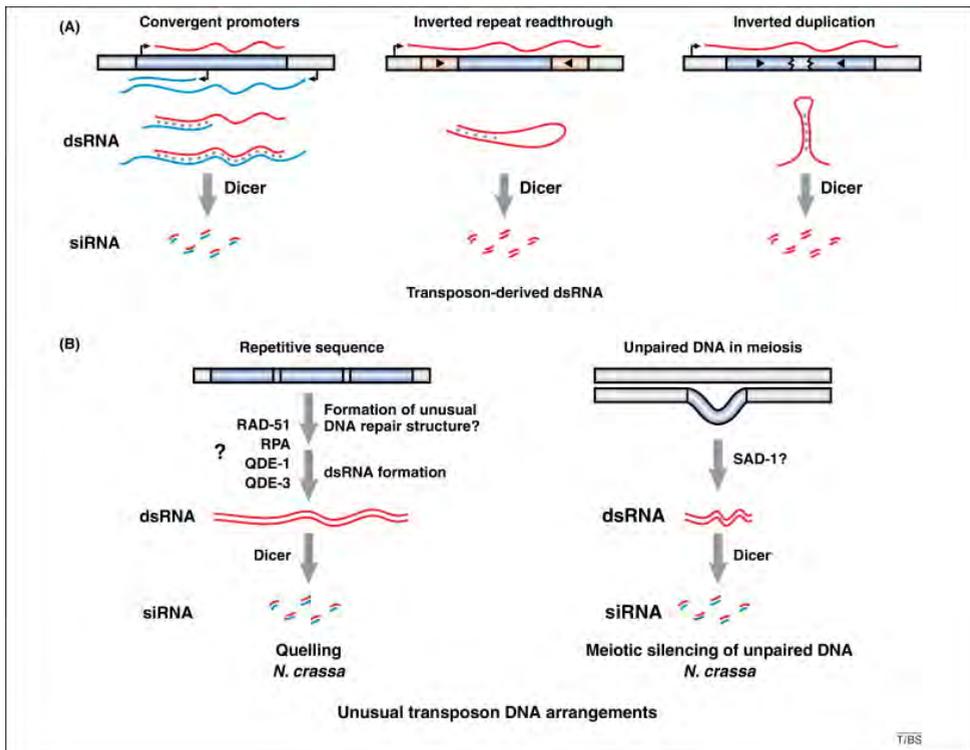


Ilustración 1. Quelling vs MSUD. (Phillip A. Dumesic et al, "Recognizing the enemy within: licensing RNA-guided genome defense")

Este MSUD bloquea la expresión de genes que existen en uno de los cromosomas parentales, pero no en el otro, y que, por tanto, da lugar a DNA desemparejado mediante la meiosis. Sorprendentemente, esto no afecta solo a genes que se encuentren en una sola copia en el genoma, sino que, si ese gen está emparejado en otros lugares del genoma, pero uno de los cromosomas tiene una copia adicional desemparejada, se dará el silenciamiento de la misma manera. Esto sugiere que debe haber alguna señal móvil que actúa en trans como en el caso anterior del quelling.

El MSUD se puede ver mediante el uso de GFP hibridado a la histona H1, por ejemplo. Cuando los dos cromosomas parentales tienen el mismo alelo de H1, esta proteína híbrida se expresa durante la meiosis y el desarrollo de la ascospora. Sin embargo, si se mezclan el wild-type y la histona H1 unida a GFP, la proteína híbrida es silenciada por MSUD.

Sin embargo, la proteína silenciada empieza a reexpresarse aproximadamente 12-34 horas después de que se forme el asca y que se delimiten las ascosporas. Así, se piensa que el MSUD actúa solo durante un período de tiempo limitado durante los primeros estadios de la maduración de las ascosporas.

Se descubrieron conexiones inesperadas entre el emparejamiento de DNAs y el silenciamiento de RNA mediante screenings genéticos de supresores de la transvección meiótica y del MSUD.

El MSUD es, por tanto, reversible y requiere una señal que actúe en trans para el silenciamiento. Lo que sorprendió a los investigadores es que los conjuntos de componentes proteicos que actúan en MSUD y en el quelling son distintos y, por tanto, hay dos rutas distintas para el silenciamiento génico en *Neurospora crassa*. Según los distintos experimentos, parece que DLC-2 es la principal proteína DICER responsable de la ruta del quelling en *Neurospora crassa*, aunque DLC-1 puede compensar la pérdida de DLC-2 sin cambios de fenotipos.

Los genomas eucarióticos se protegen de los virus y de los transposones mediante una gran variedad de defensas distintas, varias de ellas basadas en el RNA de interferencia (RNAi). En un proceso típico de silenciamiento mediado por RNA, una doble cadena de RNA se corta en pequeños RNAs de 21-25 nucleótidos por una RNasa III conocida como DICER. Un complejo proteico que contiene la proteína argonauta incorpora estas especies pequeñas de RNA y las usa para guiar el silenciamiento transcripcional o post-transcripcional.

Además del quelling, que ya hemos comentado antes, *N. crassa* tiene el MSUD que funciona específicamente durante la meiosis y silencia genes que no están emparejados entre los cromosomas homólogos. Esto ocurre porque los dos genomas parentales normalmente no van a tener los transposones localizados en el mismo sitio y, por tanto, esta técnica sirve para protegerse de ellos.

Durante la formación de las ascosporas, el MSUD busca la presencia de DNA desemparejado, y si lo encuentra, el MSUD silenciará su expresión de este y de todas las copias homólogas que haya en el genoma. Por ejemplo, si se pone una copia extra del gen de maduración de la ascospora (*asm-1*) en uno de los cromosomas, pero no en el otro, todas las copias de este gen se silenciarán durante el desarrollo sexual, dando lugar a la producción de ascosporas blancas e inviables.

El MSUD parece ser un mecanismo robusto y se han usado distintos genes marcadores para poder comprobar correctamente su efectividad al intentar introducir copias extras de distintos genes. Por ejemplo, se incluyó la actina (*act⁺*) y la beta-tubulina (*bml^R*), cuyos desemparejamientos dieron lugar al *aborto* de la mayoría de las ascosporas y a esporas redondas.

Después de que un DNA desemparejado se detecta, según el modelo del MSUD, un RNA aberrante (aRNA) se transcribe a partir de la región desemparejada. Este aRNA se transporta a la región perinuclear, donde se encuentra al menos a 6 proteínas que se conocen que están relacionadas con el mecanismo de MSUD. Entre estas se encuentra SAD-1, una RNA polimerasa que se cree que convierte el aRNA en un RNA de doble cadena. También esta SAD-3 que es una helicasa que ayuda a SAD-1 a formar esos dsRNAs. DCL-1, es una proteína DICER que rompe los dsRNA en pequeñas moléculas de interferencia (siRNAs). Por otro lado, QIP es una exonucleasa que procesa los siRNAs y los convierte en regiones de una sola hebra. A su vez, SMS-2 es una proteína argonauta que usa los siRNAs para *tarjetear* mRNAs complementarios. En último lugar, SAD-2 es la única proteína no común en los mecanismos de RNAi y sirve como proteína andamio en la región perinuclear.

Todas estas seis proteínas se localizan a la vez en la periferia nuclear, sugiriendo que son todas miembro de un complejo proteico.

Mientras que la parte del proceso del MSUD que se da fuera del núcleo se conoce bastante bien, ha sido complicado averiguar qué sucede dentro de él. Y aunque se conocen las proteínas que actúan y se sabe que todas ellas son necesarias para el desarrollo sexual a la vez que para el silenciamiento, la relación exacta entre estos dos campos es un enigma.

4. RIP

Los núcleos de líneas germinales haploides de muchos hongos filamentos (incluida *N. crassa*) tienen la capacidad de detectar secuencias de nucleótidos homólogas presentes en el mismo o en diferentes cromosomas. Una vez reconocidas, estas

secuencias pueden sufrir metilación en la citosina o sufrir una mutación de citosina a timina de forma específica a lo largo de la extensión de la homología compartida.

En *N. crassa* este fenómeno se conoce como mutación puntual inducida por repetición (RIP). Previamente, se sabía ya que RIP no requería de MEI-3, la única proteína RecA homóloga en *Neurospora*, y que este proceso podía detectar trinucleótidos homólogos intercalados cada 11 o 12 bases a lo largo de los segmentos de los cromosomas en cuestión.

Este patrón estaba de acuerdo con un mecanismo de reconocimiento de homología que involucraba interacciones directas entre moléculas de ADN de doble cadena alineadas, en las cuales se establecían contactos específicos entre dsDNA y dsDNA usando no más de un triplete cada vez.

En el estudio de Eugene y Nancy, se estudió más extensivamente los requerimientos de las secuencias de DNA para que se dé el proceso de RIP. En sus trabajos más antiguos, las homologías intercaladas a lo largo de las cadenas de ADN eran siempre encontradas en el contexto de regiones muy grandes unidas con una homología perfecta. Pero, usando un nuevo sistema de repetición que carecía de estas interacciones fuertes, han demostrado que con un 36% de homología en el global de la secuencia, se puede detectar eficientemente por el mecanismo RIP.

Lo que es más, en este nuevo sistema, en el que la cantidad de homología está cerca de ese límite requerido para que se dé el RIP, la composición nucleotídica de las moléculas de DNA se ha identificado como un factor importante. Sus resultados señalan específicamente el triplete GAC en dirección 5'-3' como una unidad particularmente eficiente para el reconocimiento de homología.

Finalmente, presentaron evidencia experimental de que el proceso de detección de la homología puede ser desacoplado de la mutación en *downstream*. En su conjunto, sus resultados suponen un avance en la noción de que la información de la secuencia se puede comparar directamente entre dos moléculas de DNA de doble cadena durante el RIP y, potencialmente, en otros procesos en los que el apareamiento de moléculas de DNA homólogas es necesario.

4.1. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE EUGENE Y NANCY

Ellos previamente habían explorado el reconocimiento de homologías intercaladas usando construcciones repetitivas que incluían regiones de unos doscientos pares de bases en una secuencia y doscientos veinte en la otra con una homología perfecta. En este contexto, los patrones de homologías intercaladas eran efectivos e implicaban que la información de la secuencia era detectada en unidades de 3 pares

de bases intercaladas cada 11 o 12 pares de bases, a lo largo de la totalidad de la longitud.

Por tanto, habían interpretado estos resultados como una evidencia de que las dos moléculas de doble cadena de DNA se alineaban mediante contactos directos y así se comparaban las homologías dentro de la célula.

Por otro lado, durante los siguientes estudios extendieron esas nociones básicas en diversos aspectos. En primer lugar, se vio que las homologías intercaladas podían ser reconocidas eficientemente por el mecanismo de RIP sin la necesidad de que hubiera a los lados homologías perfectas.

En segundo lugar, se vio que regiones cortas con una homología perfecta pueden incrementar el RIP drásticamente en las regiones adyacentes que tienen la homología intercalada, donde una actividad fuerte de las regiones con homología parcial lleva a un mayor efecto de la región completamente homóloga y viceversa. Estos resultados señalan que tienen un rol sinérgico a lo largo de las secuencias homólogas que se encuentran en el mismo segmento de ADN y apoya la idea de que el mecanismo por reconocimiento de homología de RIP integra información de las secuencias a lo largo de varios cientos de bases.

En tercer lugar, exploraron por primera vez, el posible papel de la secuencia de ADN principal en el reconocimiento de homología por el mecanismo RIP. Para ello, compararon patrones de mutación disparados por diferentes homologías intercaladas de una misma longitud y con la misma periodicidad, pero con diferentes composiciones de pares de bases en las unidades homólogas.

Encontraron que la composición de los pares de bases en las unidades homólogas puede jugar un papel fundamental en el RIP e identificaron que el triplete 5'-GAC-3' es particularmente favorable para el reconocimiento de la homología. Los resultados posteriores apoyan la idea de que la homología está siendo detectada en grupos de pares de bases, específicamente, en tripletes.

Sin embargo, se dieron cuenta de que secuencias con homologías intercaladas que no tenían tripletes GAC también podían dar lugar al RIP sin que dichos tripletes fueran esenciales. Lo que es más, secuencias con homologías intercaladas con los mismos tripletes promovían de manera diferente el RIP implicando que hay otros factores importantes en esto, por ejemplo, la composición de la secuencia en las zonas no homólogas.

Finalmente, se demostró que las mismas citosinas en una determinada secuencia de referencia se mutan con una eficiencia similar, independientemente de cuál de los pares de bases particulares que en esa secuencia estén involucradas en las interacciones por homología. Este descubrimiento implica que los procedimientos de RIP se pueden separar en dos pasos:

- Primero se identifica la homología global
- En segundo lugar, se modifican las secuencias que tienen esta homología.

En su conjunto, descubrimientos antiguos y nuevos han dejado claro que hay muchas características de las secuencias que contribuye al reconocimiento de la homología por RIP. Sus estudios anteriores identificaron homologías de tripletes con periodicidades de unos 11-12 pares de bases como importantes características para que se dé el RIP. Mientras que, por otro lado, los estudios nuevos sugieren otro importante factor, la secuencia concreta de DNA en general y los tripletes GAC en particular.

Es importante apreciar que estas dos características se descubrieron en estudios distintos, por las diferentes configuraciones de repeticiones que se usaron en ellos. En los trabajos antiguos habían examinado variaciones en los patrones básicos de homología intercalada dentro de regiones de doscientos pares de bases que estaban al lado de regiones de doscientos veinte pares de bases con homología perfecta, que, por sí sola, disparaba sustancialmente el RIP.

Así, las efectividades de los diferentes patrones de homología se evaluaron en una situación en la que el nivel basal de homología dado por esos doscientos veinte pares de bases estaban ya por encima del umbral crítico requerido para que se dé el mecanismo del RIP.

Los estudios más nuevos, en contraste, examinaron situaciones en los que el nivel basal de homología estaba próximo o por debajo al umbral crítico del RIP.

Todavía solo hay evidencia indirecta de que para que se dé el RIP se necesita un reconocimiento directo de homología entre dos cadenas de DNA de doble cadena. En principio, el reconocimiento de la homología puede involucrar dsRNA con dsDNA o, incluso, algún otro tipo de interacciones específicas sin tener que ser dos ácidos nucleicos de doble cadena.

Sin embargo, el RIP puede reconocer unidades de cuatro pares de bases metidas en una secuencia que no sea homóloga en absoluto, estando esos cuatro pares de bases significativamente por debajo del límite de longitud de 6-7 nucleótidos requeridos para que se ensamblen cadenas sencillas de ácidos nucleicos en el contexto de las proteínas argonautas, dando razones para que las proteínas argonautas no sean consideradas que funcionan para la detección de la homología del RIP.

Todo este conjunto de observaciones deja nuevas bases que justifican la consideración de los modelos existentes de emparejamientos específicos de secuencias entre moléculas de DNA intactas. Hay dos modelos comúnmente aceptados que necesitan del principio de autocomplementaridad de Watson y Crick entre los pares de bases, por el cual, pares de bases idénticos pueden formar, tanto en el surco menor

como en el surco mayor, tétradas planas. La posibilidad de dichas interacciones se confirmó experimentalmente por NMR.

5. RUTAS DE SILENCIAMIENTO GENÉTICO MEDIADO POR RNA EN FUNGI Y EUCARIOTAS SUPERIORES

En eucariotas superiores, se conocen dos rutas de silenciamiento por RNA relacionadas pero distintas. Se las conoce como ruta dirigida por siRNA y ruta dirigida por microRNA debido a estas pequeñas moléculas de RNA implicadas.

Tanto los siRNAs como los miRNAs interfieren con la expresión génica a través de la degradación del mRNA diana o a través de la supresión de la traducción del mensajero (a efectos prácticos, no se sintetizan proteínas de ninguna de las maneras). Los siRNAs actúan como guías para los complejos siRISC inducidos por ellos para degradar mRNAs perfectamente complementarios.

Los miRNAs se procesan a partir de horquillas imperfectas en sus precursores que se transcriben desde genes que no codifican para proteínas tanto en genomas de plantas como animales. Una vez el miRNA madura, se causa la represión traduccional del mRNA que tiene una complementariedad no completa con el miRNA. Hay que tener en cuenta que en los casos en los que la complementariedad es total, los mRNAs son directamente marcados para la degradación. La mayoría de los miRNAs que se conocen hasta el momento están involucrados en el crecimiento y el desarrollo.

Parece que algunos de los mecanismos de supervisión de los DNA desemparejados están muy conservados en un amplio rango de organismos eucariotas. Así, es fácil especular que la maquinaria de silenciamiento mediado por RNA podría tener algún papel en la vigilancia del DNA desemparejado ya que esta maquinaria también está involucrada en el silenciamiento transcripcional de la metilación de histonas mediada por siRNA en muchos organismos como las levaduras de fisión, *Drosophila* y *Arabidopsis*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto no indica necesariamente que la metilación del DNA y la modificación de la cromatina tomen parte en el MSUD o en el quelling de Neurospora.

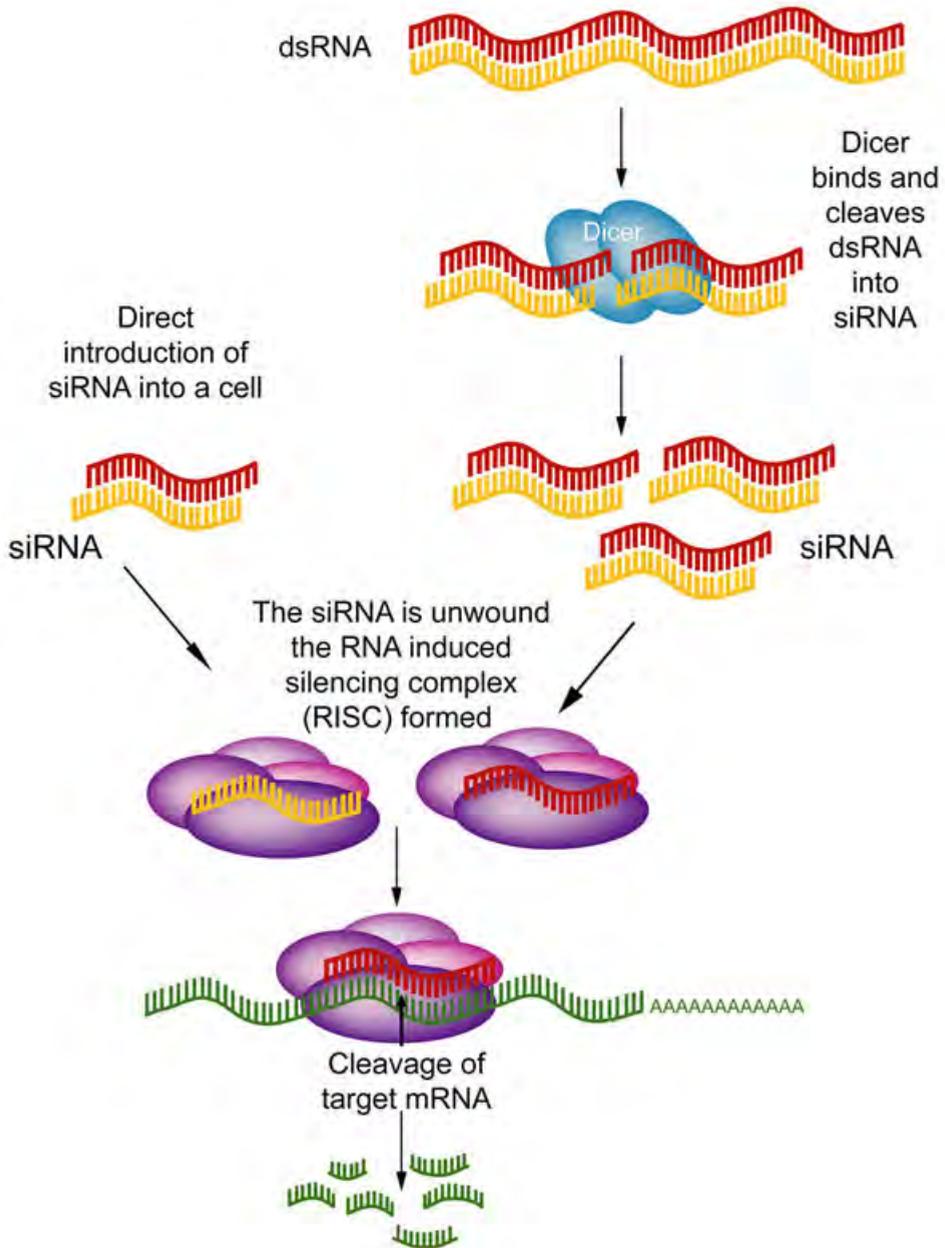


Ilustración 2. Silenciamiento en eucariotas superiores (http://zimdarsgen564s14.weebly.com/uploads/2/6/0/7/26071264/6070654_orig.jpg)

6. SILENCIAMIENTO POR RNA EN OTROS ORGANISMOS DEL REINO FUNGI APARTE DE NEUROSPORA

Hasta hace poco, prácticamente no se habían descrito casos de fenómenos de silenciamiento génico post-transcripcional en organismos distintos a Neurospora. Solo algunos casos parecidos a la co-supresión en *Cladosporium fulvum* y silenciamiento genético en *Phytophthora infestans*, los cuales pertenecen al género *Oomycota* y, por tanto, no son reconocidos como verdaderos miembros del reino fungi, sino que están en la barrera sin saber bien qué son.

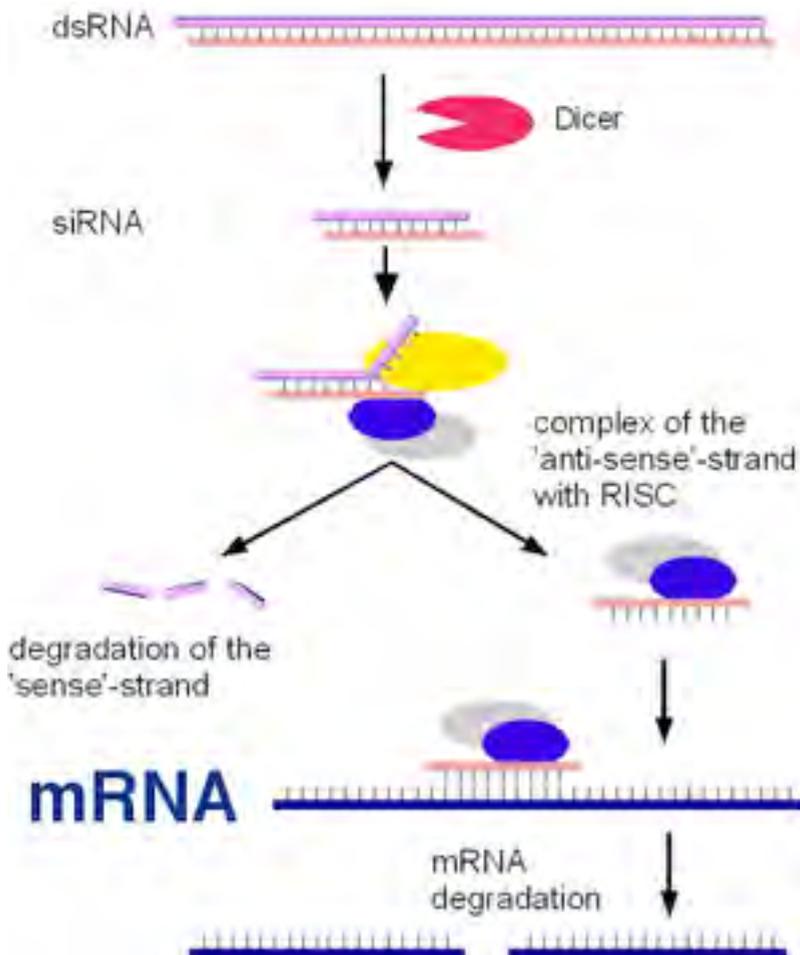


Ilustración 3. Por medio del DICER y del RISC se impide que el mRNA se traduzca a proteína (http://davisgen564s14.weebly.com/uploads/2/6/0/1/26017342/2822164_orig.jpeg?213)

Sin embargo, una vez se descubrieron los fenómenos mediados por RNAi, se ha intentado aprovechar esta tecnología para controlar la expresión génica en diversas especies fúngicas. Así, plásmidos que expresan RNA de doble cadena y otros sistemas relacionados se han usado para suprimir la expresión de genes en *Ascomycota* y *Zygomycota*, por ejemplo.

Los estudios han demostrado que los mecanismos fundamentales de silenciamiento génico mediado por RNA están muy conservados en la mayoría de las especies del reino fungi, con algunas excepciones.

C. albicans y *C. tropicalis* aparentemente no tienen ni DICER ni proteínas RdRP en sus genomas. Proteínas que son necesarias para realizar el silenciamiento génico tal y como lo conocemos. A su vez, organismos muy conocidos como *S. cerevisiae* tampoco tienen toda la maquinaria completa.

Por esto, puede ser que se haya perdido parte de la maquinaria de silenciamiento mediado por RNA en una parte de las especies fúngicas a lo largo de la evolución. Otra evidencia que soporta esta teoría es que se han identificado en el genoma restos que podrían haber sido anteriormente parte de la maquinaria de silenciamiento.

7. USO DEL SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNA PARA DESCUBRIR FUNCIONES DE GENES EN HONGOS FILAMENTOSOS

Debido al tipo de genoma que tienen la mayoría de los miembros del reino fungi, pequeño y compacto, por la fecha en la que se publicó este artículo (2005) había bastantes especies cuyos genomas habían sido ya secuenciados. Algunos de ellos muy famosos como *N. crassa*, *S. pombe*, *A. oryzae*, *S. cerevisiae*... y también algunos patógenos de plantas como *M. oryzae* y de animales como *C. albicans*.

Para aprovechar toda esta información genética y poder desentrañar cómo funcionan los genes en los hongos, se ha usado el silenciamiento mediado por RNA como una de las técnicas más potentes, debida a su gran especificidad con pocos efectos off-target.

Como se ha visto que el silenciamiento mediado por RNA existe en muchos organismos del reino fungi distintos, se puede contrastar incluso entre distintos organismos silenciando los mismos genes y así evitando que en un organismo en concreto se confunda la verdadera función de un gen que silenciamos al equivocarlo con un posible efecto off-target. Al comprobarlo en varios organismos, las posibilidades de equivocación se reducen mucho.

Hasta el momento, el silenciamiento mediado por RNA en fungi se ha inducido sobre todo mediante plásmidos que expresan RNAs en formas de horquillas, a veces con secuencias intrónicas que ayudan a la formación de la estructura.

Para que los vectores construidos sean efectivos para la clonación basada en PCR, se desarrolló el vector pSilent-1 para hongos ascomicetos, que tiene un gen de resistencia a higromicina y una unidad transcripcional para la expresión de RNA en forma de horquilla y con un sitio múltiple de clonación y un espaciador con una secuencia intrón.

En las primeras pruebas que hicieron con algunos genes como *mpg1*, los genes diana fueron silenciados hasta cierto punto en un 70-90% de los organismos transformados. Y, además, entre un 10 y un 15 por ciento de los transformantes silenciados mostraron un fenotipo nulo.

Este vector fue también efectivo para la silenciamiento de la proteína GFP en *C. lagenarium*. Por tanto, el vector pSilent-1 puede servir como una herramienta eficiente para la genética inversa en un amplio rango de hongos ascomicetos, al menos para el análisis de genes a una pequeña y media escala.

8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL SILENCIAMIENTO MEDIADO POR RNA FRENTE A LA ESTRATEGIA DE CREACIÓN DE MUTANTES KNOCK-OUT

Comparado con las estrategias convencionales de creación de knock-outs, el silenciamiento por RNA tiene varias ventajas potenciales. La mayor de ellas es el poder afectar a la expresión del gen mediante el silenciamiento de uno de los intermediarios de la ruta de señalización sin tener que prestar atención a la eficiencia a la hora de quitar el gen del organismo diana.

La eficiencia de la recombinación homóloga varía considerablemente entre las distintas especies de hongos. Hay modelos como *M. oryzae* en los que se consigue con un gran porcentaje de acierto mientras que en muchos de los hongos no es tan sencillo.

La mayoría de los hongos se componen de una hifa multinuclear o multicelular y algunos de ellos tienen dos o más núcleos diferentes en el mismo citoplasma, siendo diferentes genéticamente entre ellos. Estas características hacen a los hongos por lo general difíciles a la hora de formar organismos knock-out.

Ya que el silenciamiento génico mediado por RNA es independiente del locus y se media por una señal que actúa en trans y es móvil en el citoplasma, esta técnica puede aplicarse a organismos en los que la eficiencia de formación de knock-outs

es baja o incluso a especies fúngicas como los zygomycetos los cuáles tienen una hifa tubular conteniendo varios núcleos dentro de la misma célula.

En segundo lugar, el silenciamiento mediado por RNA permite la flexibilidad en experimentos de inactivación génica debido a que induce la supresión génica en una secuencia completamente específica, pero no específica de locus. Por ejemplo, experimentalmente se han conseguido silenciamientos simultáneos de genes homólogos e incluso heterólogos mediante el *targeting* de una secuencia conservada en una familia génica o construyendo una secuencia quimérica derivada de distintos genes.

El silenciamiento mediado por RNA con un promotor inducible o el silenciamiento transitorio por siRNA permite el estudio de la expresión génica en un determinado momento del desarrollo o cómo afecta un determinado gen a las distintas partes del organismo. Este tipo de estudios no se pueden llevar a cabo mediante estrategias de delección génica porque éstas eliminan el gen diana permanentemente. Además, se ha demostrado que el silenciamiento mediado por RNA puede usarse selectivamente para degradar distintas isoformas del mRNA según el proceso de *splicing* que hayan tenido en cultivos de células de *Drosophila*. Así, algunas isoformas con una determinada estructura se silenciarán, mientras otras no.

Así, el silenciamiento mediado por RNA ofrece varias opciones para eliminar la expresión de un gen requiriendo un esfuerzo menor. Finalmente, el silenciamiento mediado por RNA puede ser usado para análisis de letalidad en genes ya que induce que la expresión de los genes sea mínima pero no la destruye del todo, es decir, las células pueden seguir viviendo en muchas ocasiones si se trata de genes letales, pero se podrá ver la disminución de la función concreta.

La función de genes esenciales sigue siendo desconocida en varios aspectos de los procesos biológicos ya que los intentos genéticos clásicos como el screening de mutantes no valen en estos casos debido a la letalidad. El silenciamiento imperfecto con la reducción de los niveles de expresión podría conseguir vislumbrar funciones desconocidas e inesperadas de estos genes que son vitales para la supervivencia de la célula.

La mayor desventaja del silenciamiento génico mediado por RNA es que una mutación reversible o incompleta a veces conlleva resultados difíciles de interpretar. Con cierta frecuencia, se ve que hay diferencias fenotípicas entre organismos en los cuales se ha bajado la expresión considerablemente y aquellos en los que se ha eliminado ésta por completo.

Por ejemplo, en el caso del gen *mpg1* que mencionamos anteriormente en *M. oryzae*, si se silencia totalmente el gen, es decir, si se hace un mutante Knock-out, se pierde toda la patogenicidad, mientras que, si se reduce mucho la expresión

génica mediante el silenciamiento mediado por RNA metido en un vector, la patogenicidad se mantiene, si bien en mucha menor medida que el wild-type.

Por tanto, se debería prestar atención a estas discrepancias fenotípicas que encontramos al intentar interpretar los datos obtenidos de experimentos de silenciamiento génico mediado por RNA.

En segundo lugar, se sabe que una fracción de los genes y ciertos tipos celulares como las neuronas y los espermatozoides son resistentes al silenciamiento mediado por RNA por razones hasta ahora desconocidas.

Aunque en el reino fungi, no se conoce ningún gen o tipo celular que sea resistente al silenciamiento génico mediado por RNA, podría ser el caso de ciertos tipos celulares o genes que no se hayan estudiado hasta el momento.

En tercer lugar, aunque el silenciamiento mediado por RNA funciona de una manera específica para secuencias, distintos estudios han sugerido que esta especificidad no es absoluta, ya que se ha visto que hay RNAi capaces de silenciar a varios genes conservados. Esto causa cambios inesperados en los patrones de expresión génica, llamados efectos off-target.

Estudios recientes en microarrays han dado a entender que los siRNAs pueden provocar efectos off-target cuando hay un emparejamiento parcial de al menos 14 pares de bases entre estos siRNAs y los genes off-target. Últimamente, los estudios sobre el silenciamiento mediado por RNA en organismos del reino fungi están sintiendo la necesidad de técnicas genéticas nuevas.

Especialmente, no hay ningún sistema de alto rendimiento para los ensayos de silenciamiento génico en fungi que se haya estandarizado. Mientras que esto no pasa en eucariotas superiores, como el caso del vector VIGS. La estandarización de un método es esencial para una investigación productiva.

9. CONCLUSIONES

En el reino fungi, las estrategias knock-out que se han usado convencionalmente por recombinación homóloga se usan mucho más que las de silenciamiento génico mediado por RNA. Esta estrategia se ha usado satisfactoriamente en el análisis a nivel de genoma para el descubrimiento de las funciones de los genes en *S. cerevisiae*.

Como ya se ha mencionado antes, el silenciamiento mediado por RNA y las estrategias knock-out tienen ventajas diferentes; así, si los genes se estudian de las dos maneras se podrán conseguir mayores facilidades para explorar las funciones

desconocidas de los genes y resolver las posibles incongruencias que se puedan generar.

Como se demostró con el descubrimiento del quelling y del MSUD en *Neurospora*, estas características únicas de los fungi pueden servir como un excelente modelo para estudios detallados sobre la maquinaria molecular para el silenciamiento génico mediado por RNA.

Además, estudios recientes han ayudado a entender la conexión existente entre la maquinaria de silenciamiento mediada por RNA en el citoplasma y la modificación de la cromatina en el núcleo.

A pesar del rápido progreso en el entendimiento de los mecanismos moleculares que afectan a este silenciamiento, surgen preguntas interesantes sobre cómo se originan las distintas rutas de silenciamiento y cuál es la señal que detecta el complejo RdRP.

En su estudio, Hammond TM consigue caracterizar dos proteínas MSUD que fueron caracterizadas mediante un método de screening de genética inversa bastante reciente. Este método requiere la transferencia de la espora asexual en suspensión (perteneciendo a cepas knock-out) y probarlo con varios testers de MSUD. Así, se detectaron *sad-4* y *sad-5*, viendo que se perdía la función de MSUD y que, por tanto, deberían estar relacionadas las proteínas en este proceso. Aun así, hay que tener en cuenta que *N. crassa* tiene otros dos mecanismos de silenciamiento, aunque le falte el MSUD (quelling y RIP).

Las proteínas SAD4 y SAD5 parecen ser específicas de hongos y no tienen motivos conocidos. Lo más interesante del análisis filogenético de este autor es que SAD-4 se encuentra en un mayor rango de organismos que SAD-5, pudiendo tener este primero alguna función secundaria en otros procesos celulares. Esto se corresponde con sus experimentos de knock-out de *sad-4* en los que se veía que, aunque *sad-4* no era totalmente necesario para la esporulación, su delección daba lugar al *aborto* de las ascoporas.

De todas formas, algunos hongos tienen SAD-5 pero no SAD-4. Puede ser que SAD-4 y SAD-5 tengan papeles que sean específicos de la especie en la que se encuentren.

10. BIBLIOGRAFÍA

- FULCI VI, MACINO, G. "Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*." *Curr Opin Microbiol.* 2007 Apr;10(2):199-203
- NAKAYASHIKI, H. "RNA silencing in fungi: mechanisms and applications". *FEBS Letters* 579, 5950-5957 (2005).
- LOGAN, M. Decker *et al.* "The Nuclear Cap-Binding Complex Mediates Meiotic Silencing by Unpaired DNA" *GENES, GENOMES, GENETICS* Early online February 7, 2017
- HAMMOND, T. M. *et al.* "Novel proteins required for meiotic silencing by unpaired DNA and siRNA generation in *Neurospora crassa*." *Genetics.* 2013 May;194(1):91-100.
- Eugene GLADYSHEV, Nancy KLECKNER. "Recombination-Independent Recognition of DNA Homology for Repeat-Induced Point Mutation (RIP) Is Modulated by the Underlying Nucleotide Sequence". *PLoS Genet.* 2016 May; 12(5).