

EL ROL DE LOS RNAs PEQUEÑOS (sRNA) EN HONGOS

Soley Berenice Nava Galicia^{1*} y Martha Bibbins Martínez¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México, C.P. 90700. snava@ipn.mx

RESUMEN

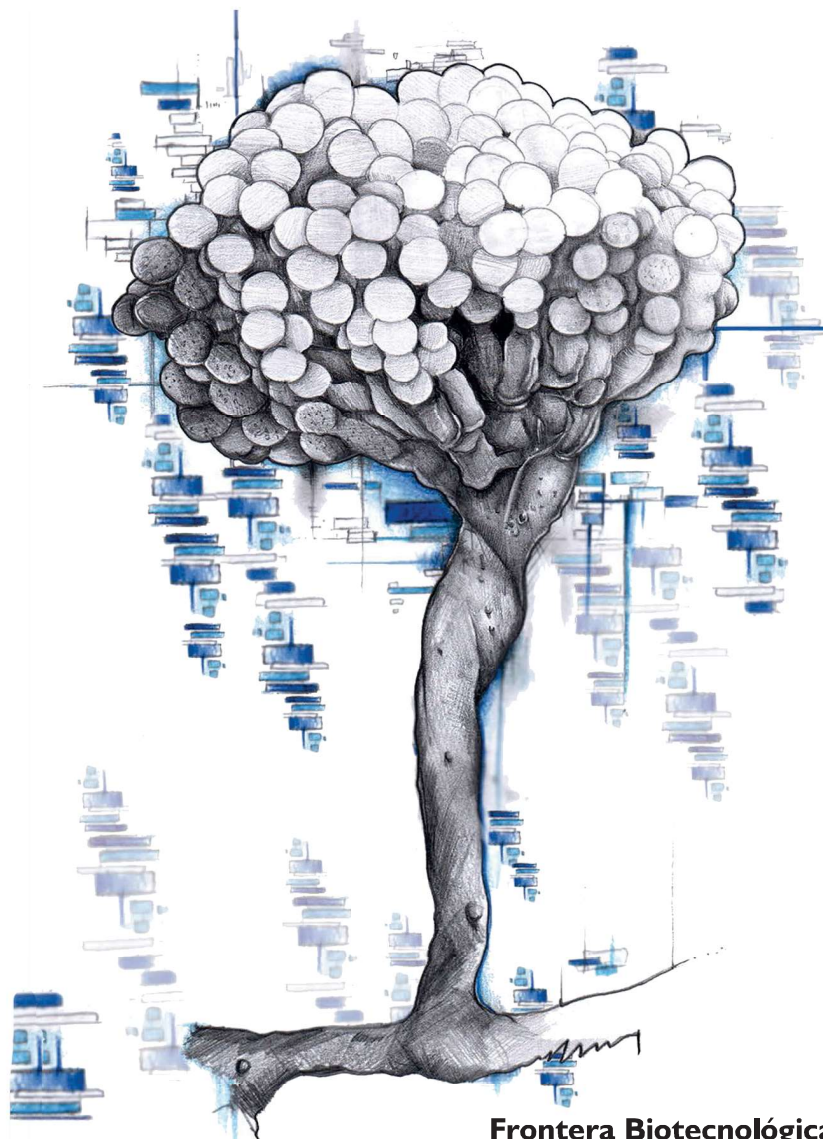
Los pequeños RNA (sRNA) son secuencias reguladoras cortas no codificantes de RNA que regulan negativamente la expresión génica. Se han descubierto sRNA en la mayoría de los organismos eucariotas, y se pueden dividir en tres clases principales de reguladores: RNA que interactúan con PIWI (piwiRNA), RNA cortos de interferencia (siRNA) y microRNA (miRNA). Los miRNAs fúngicos comparten muchas similitudes con los miRNAs de animales y plantas. Estos se procesan a partir de precursores de RNA de tallo asa y la mayoría requiere una enzima tipo Dicer para su biogénesis. Comprender la regulación génica mediada por sRNA es un requisito importante para desarrollar estrategias efectivas para manipular genéticamente hongos de importancia industrial.

Palabras clave: pequeños RNA, micro RNA, hongo

ABSTRACT

Small regulatory RNAs are short non-coding RNAs that negatively regulate gene expression. Small RNAs (sRNAs) have been discovered in most eukaryotic organisms, and can be divided into three major regulatory classes: piwi-interacting RNAs (piwiRNAs), short interfering RNAs (siRNAs), and microRNAs (miRNAs). Fungal miRNAs share many similarities with animal and plant miRNAs. All are processed from stem-loop RNA precursors and the majority require a Dicer-like enzyme for their biogenesis. A deeper understanding of sRNA-mediated gene regulation is an important prerequisite for developing more effective strategies to genetically manipulate this industrially important fungus.

Keywords: small RNA, micro RNA, fungi



I. INTRODUCCIÓN

Uno de los avances más sorprendentes en biología celular y molecular lo constituye la descripción de nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica por parte de pequeños RNA reguladores (sRNA).

Los sRNA tienen un tamaño de ~18-30 nucleótidos los cuales regulan negativamente la expresión génica, uniéndose a los RNA codificantes o mensajeros (mRNA) diana, dirigiendo su degradación, la inhibición de la traducción, la formación de la heterocromatina y la regulación transcripcional. Los sRNAs regulan genes vinculados a procesos tales como desarrollo, diferenciación celular, apoptosis, transducción de señales, organogénesis, proliferación celular, entre otros.

Desde el descubrimiento del primer miRNA en 1993 durante la caracterización de los genes que controlaban la coordinación del desarrollo larvario en el gusano *Caenorhabditis elegans*, se han identificado miRNAs en diversos organismos, incluidos animales, plantas, hongos y eucariotas unicelulares, como algas.

Actualmente, en función de su origen, biogénesis y mecanismo efector se distinguen 3 familias principales de pequeños RNA reguladores:

- siRNA (pequeños RNA de interferencia)
- miRNA (micro RNA)
- piRNA (RNA pequeños asociados a proteínas Piwi)

2. Los sRNA EN HONGOS

Se pensaba que los sRNAs estaban ausentes en los hongos. El silenciamiento de genes relacionados con el RNA de interferencia (iRNA) en los hongos se describió por primera vez en *Neurospora crassa* en 1992. Sin embargo, los primeros micro RNA like (miRNA) de *N crassa* fueron identificados hasta el año 2010. El mecanismo de silenciamiento génico en hongos se conoce comúnmente como Quelling y se produce a nivel postranscripcional durante la etapa vegetativa del ciclo de vida. (Dahlmann and Kück 2015; Armas-Tizapantzi and Montiel-González 2016; Catalanotto et al. 2004; Dang et al. 2011; Fulci and Macino 2007; Goldoni et al. 2004).

Los miRNAs se han reportado en diferentes hongos, como lo son: *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*, *Metarhizium anisopliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium marneffei*, entre otros.

En el basidiomiceto *Antrodia cinnamomea* el cuál se caracteriza por la producción de compuestos bioactivos, hasta el momento se tienen identificados cuatro miRNA aci-miRNA-9, aci-miRNA-10, aci-miRNA-2b, aci-miRNA-6b, que están relacionados con la síntesis de triterpenos, reconocimiento del apareamiento, proteínas sensoriales químicas ó físicas y el transporte de azúcares

respectivamente (Lin et al. 2015).

En *Pleurotus ostreatus*, un hongo branquial, cosmopolita con un alto valor nutricional, así como, con propiedades terapéuticas y con una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y ambientales, se han identificado los miRNA miR2673a, miR2673b, and miR-4968-3p conservados en el grupo de los Agaricomycotina evolutivamente. Así como, miR2673 que presenta una estructura estable que se conserva en todas las especies de plantas (Qu et al. 2016).

También se han detectado miRNA en los patógenos de plantas *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora sojae*. Estos miRNAs pueden desempeñar funciones internas o, alternativamente, afectar la maquinaria del hospedero. *S. sclerotiorum*, un hongo patógeno de plantas, es uno de los primeros ejemplos donde se ha propuesto que dos miRNAs están involucrados en el desarrollo vegetativo. Por el contrario, *B. cinerea*, un patógeno fúngico agresivo puede infectar a más de 200 especies de plantas, usando RNAs pequeños para interferir con la maquinaria de interferencia de ARN del huésped (iRNA) y silencia selectivamente los genes de inmunidad del huésped para lograr la infección (Wang, Thomas, and Jin 2017).

3 BIOGÉNESIS DE sRNAs EN HONGOS

Basado en su definición un miRNA, debe cumplir con tres criterios: primero, su precursor debe ser un RNA monocatenario que forme una estructura en horquilla. Segundo, los miRNA maduros deberían derivarse principalmente de un tallo de la horquilla. Tercero, miRNA debería ser capaz de silenciar los objetivos de mRNA endógeno, ya sea dando como resultado la degradación del mRNA o la represión de la traducción.

En general, la vía de biogénesis de miRNA consta de tres pasos: transcripción de ADN Precursor (gen codificante del miRNA), el procesamiento de la estructura en horquilla por la enzima Dicer, y la formación del complejo de silenciamiento de RNA (RISC) que contiene el miRNA. Las células eucariotas tienen tres tipos de RNA polimerasas: Pol I, que sintetiza rRNA 18S y 28S; Pol II, responsable de la síntesis de mRNAs y la mayoría de miRNAs; y Pol III, que sintetiza 5S rRNA, tRNAs, y algunos snRNAs. A diferencia de los genes miRNA de plantas y animales que son principalmente transcritos por Pol II, la mayoría de los miRNAs son transcritos por RNA Pol III. Curiosamente, a pesar de que la inhibición de Pol II no afecta la síntesis de los miRNAs más abundantes, solo Pol II o ambos Pol II y Pol III están presentes en varios loci de producción de miRNA sugiriendo que Pol II y Pol III podrían coordinarse para regular la transcripción de algunos miRNAs en hongos (Fig. I) (Lee et al. 2010; Sesma and von der 2014).

Una diferencia importante sobre la biogénesis de los miRNA de hongos comparada con animales o plantas, es que estos organismos al menos cuentan con cuatro mecanismos diferentes de generarlos (Fig. 1), los miRNA son producidos por diferentes combinaciones entre Dicer (Pol III), QDE-2 (Argonauta), QIP (exoribonucleasa) (Lee et al. 2010).

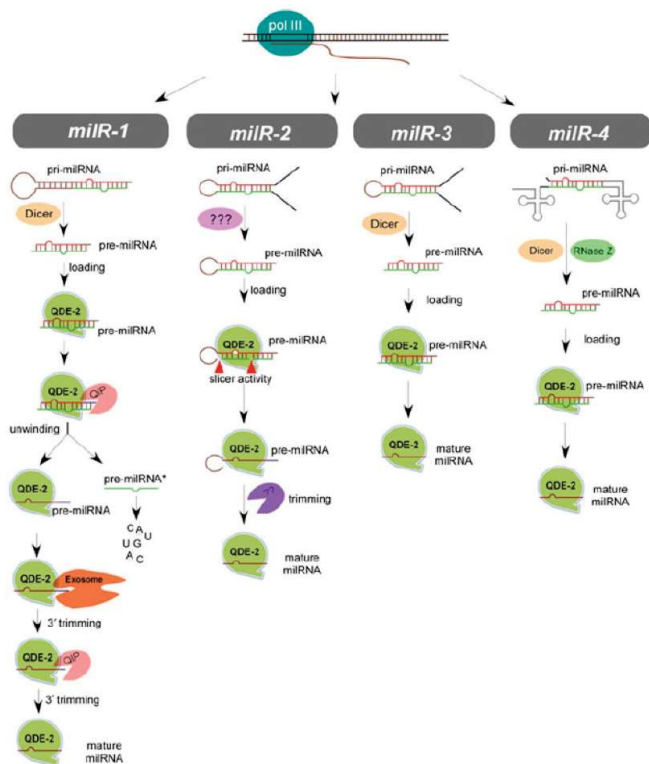


Figura. 1. Vías de biogénesis de sRNA similar a los microRNA (miRNA), en *Neurospora* (miR-1 a -4). (Sesma and von der 2014)

El miR-1 utiliza un mecanismo de recorte 3'-5' para la maduración de los miRNA y actualmente es el mecanismo mejor comprendido: La biogénesis de miR-2 es completamente independiente de Dicer. Se predice que el precursor de miR-2 (pre-miR-2) forma una estructura de horquilla, tanto el miR-2 maduro y pre-miR-2 están asociados con QDE-2, pero la maduración de la pre-miR-2 no depende de Dicer. La biogénesis miR-2 es el primer ejemplo de un mecanismo independiente de Dicer pero dependiente de la enzima Argonauta. La biogénesis de miR-3 sigue la vía canónica de miRNA: la horquilla primaria (pri-miR-3) es procesada por Dicer para producir miRNA maduro, que posteriormente se carga en la proteína Argonauta QDE-2. Finalmente, aunque el procesamiento de miR-4 es similar al de miR-3, es solo parcialmente dependiente de Dicer. El pri-miR-4 surge de un precursor de tRNA. La producción de miR-4 requiere una endonucleasa RNasa Z, en el extremo 3' del tRNA.

La diversidad de las rutas de biogénesis de miRNA en hongos ofrece ideas importantes sobre las vías de biogénesis de sRNA eucariótico.

Poco después del descubrimiento del mecanismo de biogénesis del miR-2, se demostró que el miR-451 de ratón es producido por un mecanismo independiente de Dicer pero dependiente de Argonauta, muy similar al de miR-2. Del mismo modo, la demostración bioquímica de la vía de biogénesis miR-1 e identificación de exosoma y QIP en el proceso de maduración de miRNA ofrece importantes conocimientos sobre cómo pueden ser pequeños RNA madurado mediante el uso de un mecanismo de recorte de 3'-5'. Se ha propuesto que la maduración de piRNA requiere un recorte de 3'-5' del precursor de piRNA unido a proteínas PIWI (Yang et al. 2013; Lee et al. 2010; Liu et al. 2010).

4 MECANISMO DE ACCIÓN DE sRNA EN HONGOS

Los microRNA pueden dirigir al complejo RISC (Complejo de Silenciamiento inducido por ARN) para regular negativamente la expresión génica, mediante cualquiera de los dos mecanismos postranscripcionales mencionados a continuación: escisión del mRNA ó represión traduccional. De acuerdo con el modelo prevaleciente, la elección de mecanismos postranscripcionales no está determinada por si el RNA de silenciamiento pequeño se originó como siRNA o miRNA, sino que está determinado por la identidad del gen blanco: una vez incorporado a un RISC citoplásmico, el miRNA especificará la escisión si el mRNA tiene una complementariedad suficiente con el miRNA, o reprimirá la traducción productiva si el mRNA no tiene suficiente complementariedad para ser escindido.

En animales y hongos, el emparejamiento de los miRNA en los genes diana es impreciso lo que conduce a una inhibición traduccional, en cambio en las plantas, la complementariedad es casi perfecta entre los miRNA y sus genes dianas lo que conduce a la escisión del RNA mensajero (Fig.2).

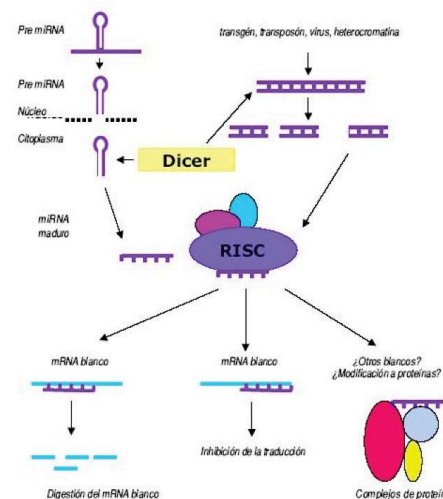


Figura. 1. Procesamiento y funcionamiento simplificado de siRNAs y miRNA (Vázquez-Ortiz, Piña-Sánchez, and Salcedo 2006)

5 PERSPECTIVA

Los hongos producen diversos tipos de RNA pequeños, el descubrimiento de estos representa una pieza central para la comprensión de la regulación de la expresión génica y las funciones llevadas a cabo en un rango más amplio de organismos eucarióticos, así como para el desarrollo de investigaciones en varios campos de estudio a nivel biológico, médico y biotecnológico. La aplicación de nuevas tecnologías a partir de sRNA de hongos, permitirá potenciar la función de genes de interés, así como, la capacidad potencial de modificar las vías bioquímicas para aumentar la producción de importantes metabolitos comerciales, identificar nuevos objetivos antifúngicos y/o desarrollar plantas de cultivo inducidas por el huésped con resistencia a patógenos fúngicos, demostrando la importancia de los sRNA en la biotecnología fúngica.

6 REFERENCIAS

Armas-Tzapantzi, Anahí, and Alba Mónica Montiel-González. 2016. "RNAi Silencing: A Tool for Functional Genomics Research on Fungi." *Fungal Biology Reviews* 30 (3): 91–100. doi:10.1016/j.fbr.2016.05.003.

Catalanotto, Caterina, Massimiliano Pallotta, Paul Refalo, Matthew S Sachs, Laurence Vayssie, Giuseppe Macino, and Carlo Cogoni. 2004. "Redundancy of the Two Dicer Genes in Transgene-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Neurospora Crassa* Redundancy of the Two Dicer Genes in Transgene-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Neurospora Crassa* †." *Molecular and Cellular Biology* 24(6) (6): 2536–45. doi:10.1128/MCB.24.6.2536.

Dahlmann, Tim A., and Ulrich Kück. 2015. "Dicer-Dependent Biogenesis of Small RNAs and Evidence for MicroRNA-like RNAs in the Penicillin Producing Fungus *Penicillium Chrysogenum*." *PLoS ONE* 10 (5): 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0125989.

Dang, Yunkun, Qiuying Yang, Zhihong Xue, and Yi Liu. 2011. "RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications." *Eukaryotic Cell* 10 (9): 1148–55. doi:10.1128/EC.05109-11.

Fulci, Valerio, and Giuseppe Macino. 2007. "Quelling: Post-Transcriptional Gene Silencing Guided by Small RNAs in *Neurospora Crassa*." *Current Opinion in Microbiology* 10 (2): 199–203. doi:10.1016/j.mib.2007.03.016.

Goldoni, Marina, Gianluca Azzalin, Giuseppe Macino, and Carlo Cogoni. 2004. "Efficient Gene Silencing by Expression of Double Stranded RNA in *Neurospora Crassa*." *Fungal*

Genetics and Biology 41 (11): 1016–24. doi:10.1016/j.fgb.2004.08.002.

Halliwell, Barry. 2007. "Oxidative Stress and Cancer: Have We Moved Forward?" *The Biochemical Journal* 401 (1): 1–11. doi:10.1042/BJ20061131.

Lee, Heng Chi, Liande Li, Weifeng Gu, Zhihong Xue, Susan K. Crosthwaite, Alexander Pertsemliadis, Zachary A. Lewis, et al. 2010. "Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi." *Molecular Cell* 38 (6). Elsevier Ltd: 803–14. doi:10.1016/j.molcel.2010.04.005.

Lin, Yan Liang, Li Ting Ma, Yi Ru Lee, Shih Shun Lin, Sheng Yang Wang, Tun Tschu Chang, Jei Fu Shaw, Wen Hsiung Li, and Fang Hua Chu. 2015. "MicroRNA-like Small RNAs Prediction in the Development of *Antrodia Cinnamomea*." *PLoS ONE* 10 (4). doi:10.1371/journal.pone.0123245.

Liu, Yi, Heng Chi Lee, Antti P. Aalto, Qiuying Yang, Shwu Shin Chang, Guocun Huang, Daniel Fisher, Joonseok Cha, Minna M. Poranen, and Dennis H. Bamford. 2010. "The DNA/RNA-Dependent RNA Polymerase QDE-1 Generates Aberrant RNA and DsRNA for RNAi in a Process Requiring Replication Protein a and a DNA Helicase." *PLoS Biology* 8 (10). doi:10.1371/journal.pbio.1000496.

Qu, Jibin, Mengran Zhao, Tom Hsiang, Xiaoxing Feng, Jinxia Zhang, and Chenyang Huang. 2016. "Identification and Characterization of Small Noncoding RNAs in Genome Sequences of the Edible Fungus *Pleurotus Ostreatus*" 2016: 25–28. doi:10.1155/2016/2503023.

Sesma, Ane, and Haar von der. 2014. "Small RNA-Mediated Gene Silencing in *Neurospora*." In *Fungal RNA Biology*, edited by Ane Sesma and Haar von der, 396. Springer.

Vázquez-Ortiz, Guelaguetza, Patricia Piña-Sánchez, and Mauricio Salcedo. 2006. "Grandes Alcances de Los RNAs Pequeños RNA de Interferencia y MicroRNA." *Revista de Investigacion Clinica* 58 (4): 335–49.

Wang, Ming, Nicholas Thomas, and Hailing Jin. 2017. "Cross-Kingdom RNA Trafficking and Environmental RNAi for Powerful Innovative Pre- and Post-Harvest Plant Protection." *Current Opinion in Plant Biology* 38. Elsevier Ltd: 133–41. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003.

Yang, Qiuying, Liande Li, Zhihong Xue, Qiaohong Ye, Lin Zhang, Shaojie Li, and Yi Liu. 2013. "Transcription of the Major *Neurospora Crassa* MicroRNA-Like Small RNAs Relies on RNA Polymerase III." *PLoS Genetics* 9 (1): 1–12. doi:10.1371/journal.pgen.1003227.