

Hablemos del origen y acción de los otros RNAs pequeños reguladores

Cárdenas-Rojas, María Jelhen; Castellón-Hernández, León Felipe; Cordero-Hernández, Chrystian; Flores-González, Ariadne Emiret; Gutiérrez-Flores, José Hugo; Mina-Duran, Andrea; Nava-Espinoza, Karina & Serratos-Ramírez, Alejandro.

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal, Km 1.5, 90700 Santa Inés Tecuexcomac, Tlaxcala, México.



RESUMEN

Desde la segunda mitad del siglo XX, la biología molecular ha experimentado un avance continuo. Uno de los hallazgos más significativos fue la identificación de moléculas menores de 30 nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN). Estas moléculas se conocen como ARN pequeños que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, impactando en diversos procesos como el desarrollo celular, la diferenciación y/o la respuesta diversos tipos de estrés. De tal forma que, el estudio de los ARN pequeños ha mejorado nuestra comprensión de los mecanismos de regulación de la expresión génica, facilitando el avance en el diseño de diversas terapias genéticas y virales en diversos organismos, así como en innovaciones biotecnológicas.

Así con la investigación de los ARN pequeños, se ha descubierto un nuevo terreno de aplicaciones, con resultados potencialmente prometedores como en la medicina y la mejora de cultivos. Por ello, este trabajo tiene como objetivo ilustrar la naturaleza de los pequeños RNAs, su biogénesis y las funciones que desempeñan en la biología de los seres vivos.

Palabras clave: RNAs pequeños, biogénesis, miRNA

ABSTRACT

Since the second half of the 20th century, molecular biology has experienced continuous advancements. One of the most significant findings was the identification of ribonucleic acid (RNA) molecules smaller than 30 nucleotides. These molecules are called small RNAs and play an important role in the regulation of gene expression, impacting various processes such as cell development, differentiation and/or response to various types of stress. Thus, the study of small RNAs has improved our understanding of the mechanisms of regulation of gene expression, facilitating progress in the design of various genetic and viral therapies in various organisms, as well as in biotechnological innovations.

Thus, with the research of small RNAs, a new field of applications has been discovered, with potentially promising results in the field of medicine and crops improvement. Therefore, this work aims to illustrate the nature of small RNAs, their biogenesis and the functions they play in the biology of living beings.

Keywords: Small RNAs, biogenesis, miRNA

Introducción

A lo largo de la evolución, se han desarrollado diversos mecanismos para proteger la integridad del DNA, generado mecanismos de defensa a las condiciones físicas, químicas y biológicas a las que está expuesto (Carthew & Sontheimer, 2009). En este contexto los RNA pequeños (sRNA) juegan un papel crucial como reguladores clave de la expresión génica. Estas moléculas de apenas 20-24 nucleótidos de longitud que no codifican para la producción de proteínas, y, sin embargo, son herramientas que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional (Barthel, 2004), es decir, los mecanismos que controlan la expresión génica después de que el DNA ha sido transcrito a RNA mensajero, pero antes de que este mRNA sea traducido en una proteína (Schaeffe *et al.*, 2018).

En las plantas estas pequeñas secuencias funcionan principalmente mediante dos mecanismos el silenciamiento o la degradación de los genes y se pueden clasificar en microARNs (miRNAs) y RNA de interferencia (siRNAs). Los siRNAs incluyen los RNA derivados de virus (vsiRNAs), los RNA heterocromaticos (hcsiRNAs), los RNA escalonados (phasiRNAs), los RNA que actuan en trans (tasiRNAs), los RNA activados epigenéticamente (easiRNAs) y los RNA en antisentido (nat-siRNAs), cuyos aspectos claves se describen a continuación. Para la generación de los siRNAs se requieren varios componentes esenciales, incluidas las proteínas dicer-like (DCL), argonauta (AGO) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) (Tang *et al.*, 2022; Fujimoto & Iwakawa, 2023).

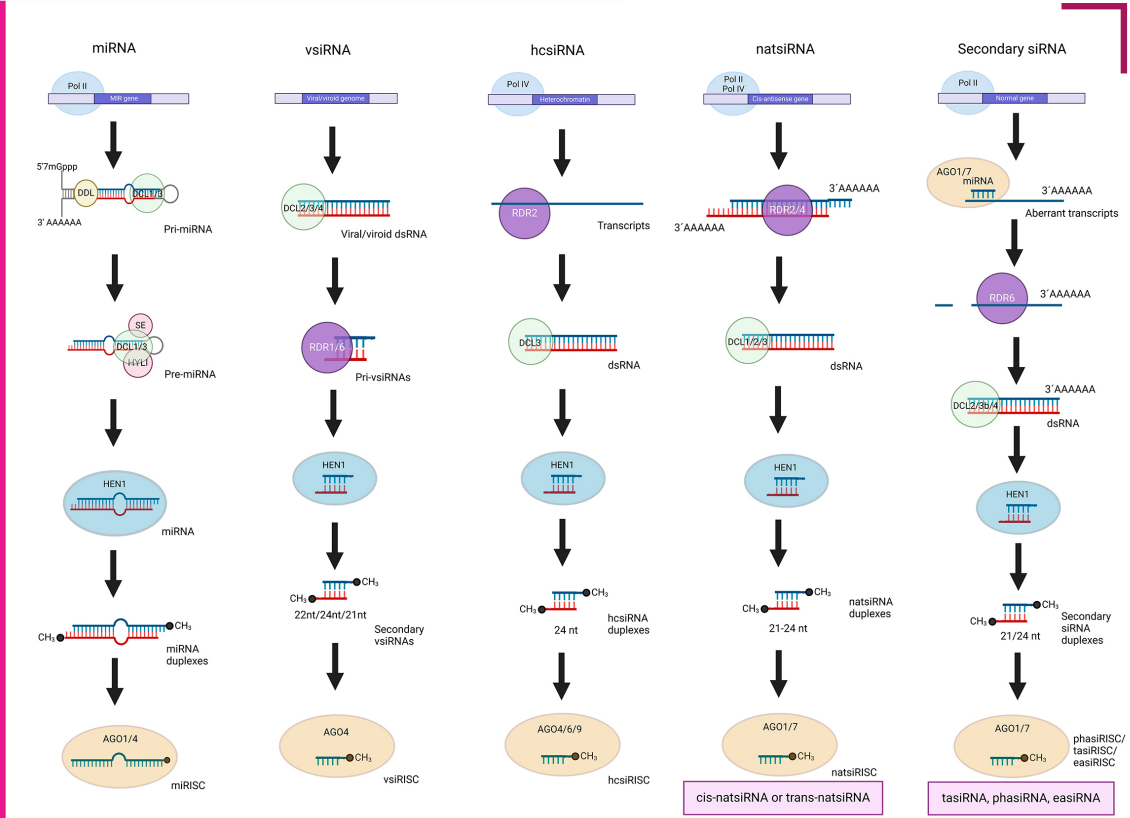


Figura 1. Representación de la biogénesis de diferentes sRNAs en plantas. Modificado de Tang *et al.* (2022).

2

Pequeños RNA derivados de virus (vsiRNAs): Defensores del Reino Vegetal

Las plantas cuentan con mecanismos de defensa contra RNAs anómalos o exógenos (Soosaar, Burch-Smith, & Dinesh-Kumar, 2005; Szittyta *et al.*, 2010). Dentro de este sistema de defensa se encuentran los pequeños RNAs derivados de virus (vsiRNAs), los cuales son elementos responsables de mediar la inmunidad antiviral a través del silenciamiento de RNAs exógenos (Zhang *et al.*, 2015; Aguiar, Olmo, & Marques, 2016). Los vsiRNAs se generan al reconocer RNA viral de doble cadena (dsRNA), o RNA de cadena sencilla (Figura 1b; Tang *et al.*, 2022). Estos RNAs pequeños se procesan mediante las DCL en fragmentos de 21-24 nucleótidos y se incorporan en complejos de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) que están formados por argonautas (AGOs), quienes degradan el RNA objetivo a través del silenciamiento postranscripcional, o dirigiendo la metilación de DNA mediante el silenciamiento transcripcional (Ameres *et al.*, 2007). Además, hay una segunda ronda de formación de vsiRNAs durante la replicación del RNA viral (Zhang *et al.*, 2015).

El conocimiento actual sobre los vsiRNAs se está aplicando, por ejemplo, para desarrollar plantas resistentes a virus mediante ingeniería genética (Yu *et al.*, 2016). Por ejemplo, al construir RNAs con estructuras tallo-asa en plantas se puede inducir el silenciamiento de genes virales específicos, proporcionando resistencia contra ciertas infecciones virales (García-Ruiz *et al.*, 2015). Existe evidencia que, en tabaco transgénico, la expresión de RNA derivado de proteínas de replicación de virus confiere resistencia completa contra éstos (Wu *et al.*, 2023). Por otra parte, se ha utilizado la secuenciación de vsiRNAs para reconstruir el genoma completo del aislado T318A del virus

de la tristeza de los cítricos (CTV) que infecta naranjas dulces y agrias, así como plántulas de lima mexicana (Zhang *et al.*, 2015); además, se también se ha usado la secuenciación de vsiRNAs en la reconstrucción de virus de DNA de las familias Caulimoviridae y Geminiviridae, e incluso para identificar nuevos virus, como el agente causal de la enfermedad de la enación de las venas de los cítricos (CVEV) (Zhang *et al.*, 2015).



3

RNA de interferencia heterocromático (hcsiRNA)

Además de los RNA pequeños de interferencia ya descritos, se encuentran los RNAs de interferencia heterocromáticos (hcsiRNA), los cuales están presentes en la vía de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM), que está involucrada principalmente en el silenciamiento génico transcripcional (TGS) de elementos transponibles (TE), así como otras secuencias de DNA (Zhan et al., 2023). Los hcsiRNA se originan a partir de secuencias repetitivas en el DNA y TE, se caracterizan por presentar una longitud de 24 nt. Los hcsiRNA son los que presentan mayor abundancia en plantas, particularmente en la planta modelo Arabidopsis thaliana constituyendo más del 90% del total de siRNA que se han descrito (Tang et al., 2022; Zhan et al., 2023; Genschik et al., 2024).

Los actores principales inmiscuidos en la biogénesis de los hcsiRNA son la RNA Pol IV, AGO4, RDR2, DCL3 y HEN1 (Figura 1c) (Chao et al., 2022; Tang et al., 2022). La Pol IV reconoce sitios localizados río arriba del primer nucleótido de la región transcrita y corresponden en su mayoría a pirimidinas, además, el primer nucleótido de esta región es una purina, en la mayoría de los casos. Pol IV tiene acción en diversas regiones, lo que permite conseguir de un solo locus varias transcripciones cortas, pero de manera ordenada (Zhan et al., 2023).

RDR2 y Pol IV tienen una interacción física para que pueda ser sintetizada la segunda cadena de los precursores correspondientes de hcsiRNA (Figura 1c) (Zhan et al., 2023). Los precursores de hcsiRNA resultantes serán fragmentados por DCL3, que toma de 23 o 24 nt en una sola de las hebras del RNA bicatenario. Finalmente, la metilación mediada por HEN1 forma los hcsiRNA y así puedan tomar acción en la célula (Chao et al., 2022; Tang et al., 2022; Zhan et al., 2023). Se ha logrado comprobar, por medio de mutaciones en la Pol IV, que los hcsiRNA son necesarios para la estabilidad de AGO4, AGO6 y AGO9 (Zhan et al., 2023; Genschik et al., 2024). En plantas, un ejemplo de la regulación mediante hcsiRNA, es el que ocurre en el locus Rice Pygm. El gen *PigmS* expresa proteínas que están involucradas en la resistencia al hongo *M. oryzae*, el promotor de *PigmS* contiene dos transposones que son regulados por hcsiRNA (Sanan-Mishra et al., 2021; Mierziak et al., 2024)



4

¿Qué son los natsiRNAs y cómo se forman?

Los natural antisense transcripts small interfering RNAs (natsiRNAs) se originan a partir transcritos naturales antisentido (NATs), son secuencias de RNA que son transcritas a partir de la hebra opuesta de una región específica. Éstos están implicados en la regulación de la expresión génica por cortes de la región objetivo o en remodelaciones de la estructura de la cromatina haciendo que esté disponible la secuencia de ADN (Yu et al., 2016, Zhang et al., 2023; Faghihi et al., 2009). Los NATs son pares de transcritos complementarios codificados por los genes endógenos y pueden ser transcritos que codifican proteínas, o no. Los NATs pueden categorizarse de acuerdo con la región de donde provengan; es decir, puede ser cis-NAT cuando los dos transcritos vienen de dos loci genómicos superpuestos en las hebras opuestas, o trans-NAT cuando los transcritos complementarios son generados por dos loci genómicos distantes (Yu et al., 2016).

Para que la biogénesis de los natsiRNA ocurra, se requiere de su precursor NAT, el cual requiere de la polimerasa II o IV para su transcripción, que, a su vez necesita de RDR2/4 para amplificar los RNA de doble cadena (double-stranded RNA o dsRNA) (Figura 1d). Posteriormente, se hace el corte mediante DCL1/2 para producir los natsiRNA. También requieren de la enzi-

ma HEN1 para metilar los extremos con el fin de estabilizar el transcrito (Figura 1d). Una vez que madura el natsiRNA, y esto quiere decir que ya tiene una longitud de 24-21 nucleótido, es cargado por la AGO1/7 para guiarlo al transcrito objetivo y realice su función (Tang et al., 2020; Zhang et al., 2023).

Los natsiRNAs funcionan de forma postranscripcional, al interferir con el inicio de la traducción al regular la expresión génica mediante la inhibición de la traducción de mRNA o la degradación de RNAs específicos por lo que se pueden observar efectos inhibitorios y estimulatorios. Esto sucede cuando el natsiRNAs dentro del complejo RISC es guiado a un mRNA donde se une y se induce el corte y la degradación del mRNA (Yu et al., 2016; Zhan et al., 2023; Ghildiyal, M., & Zamore, P. D., 2009).

Tabla 1: Comparación de componentes en la biogénesis de sRNAs en plantas.

	miRNA	natsiRNA	hcsiRNA	visRNA	2°siRNA
Origen	Gen MIR	Gen Cis-antisentido	Heterocromatina	Genoma viral	Gen normal
Pol	II	II/IV	IV	No	II
ETH*	Si	No	No	No	No
M/B*	-	B	M	B	M
RDR	No	2/4	2	1/6	6
DCL	1/3 PC	1/2/3	3	2/3/4	2/3b/4
HEN	1	1	1	1	1
ComC*	No	Si	Si	Si	Si
nt*	20-24	21-24	24	22/24/21	21/24
AGO	1/4	1/7	4/6/9	4	1/7

*M/B monocatenaria o bicatenaria. *ComC: complementariedad de cadena. *nt: número de nucleótidos. *ETH: estructura tipo horquilla.

5

Biogénesis de los siRNAs secundarios: phasiRNAs, tasiRNAs y easiRNAs

La generación de los siRNAs, mediada por la vía o participación de RDR6, promueve la biogénesis de phasiRNAs y tasiRNAs. Éstos regulan la transcripción endógena y exógena por PTGS y se llevan a cabo de una forma similar (Qili et al., 2013; Zheng et al., 2018). Se han reportado dos vías debido al número de sitios de unión que presenta, siendo: “de un hit” (corte en un solo sitio) o “dos hits” (dos sitios diana y es procesado como dsRNAs) (Qili et al., 2013; Tang et al., 2022).

Los phasiRNAs (siRNAs en fase) son generados de transcritos endógenos con más de un sitio de unión a un miRNA, que pueden ser mRNA codificantes o RNA largos no codificantes (lncRNA) (Liu et al., 2020). Para que eso ocurra, inicialmente se da el reconocimiento del RNA diana por el miRNA, lo cual da como resultado la escisión del extremo 5', seguido del reclutamiento de RDR6 y los supresores de silenciamiento génico 3 (SGS3) y SDE5. Este complejo es el responsable de la síntesis del dsRNAs y su posterior corte por enzimas RNasa III DCL para generar los phasiRNAs (Chen et al., 2018). Los siRNAs de acción trans (tasiRNAs o TAS), aunque tienen diferentes sitios diana o que actúan en sitios trans, y son generados por precursores de RNAs llamados transcritos TAS. Los TAS son reconocidos por RISC (complejo entre miRNA y AGO), lo que le permite reclutar a RDR6, junto con SGS3, y producir la hebra complementaria, la cual es procesada por DCL4 y generando los tasiRNAs de 21 nt (Fujimoto e Iwakawa, 2023; Vazquez et al., 2010).

Los easiRNAs, otro tipo de sRNAs, se caracterizan por regular secciones del DNA llamadas transposones. La presencia de los easiRNAs protege a las plantas de los problemas generados por los transposones, ya que los easiRNAs protegen el genoma silenciando la actividad de los elementos transponibles (Creasey et al., 2014). Esta protección la efectúan favoreciendo la metilación del DNA en las secuencias donde se encuentran los transposones. La producción o acumulación de easiRNAs puede ser inducida por condiciones de estrés, como infecciones por patógenos o estrés ambiental. Algunos estudios sugieren que los easiRNAs no sólo están involucrados en la defensa genómica, sino que también pueden tener funciones en el desarrollo y la diferenciación celular, sugiriendo un papel más amplio de lo que se pensaba inicialmente (Borges y Martienssen, 2015; Zhang y Qian, 2023).

6

Conclusión

A más de 20 años del descubrimiento del primer RNA pequeño, se ha logrado obtener información de diferentes tipos de RNAs pequeños, como microARNs y RNA de interferencia. Estos han sido de gran importancia y relevancia para la investigación por su función en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional con lo cual contribuyen a la estabilidad genómica, protegiendo a las plantas de elementos transponibles y patógenos. Conocer la biogénesis de

estos RNA permite tener un mejor entendimiento sobre su funcionamiento en la adaptación de las plantas a factores ambientales. Los avances han sido significativos, por lo que, en los siguientes años, tal vez sea posible identificar nuevos tipos de RNAs pequeños y conocer más a detalle su importante función. Y estos avances puedan ser usados en mejora genética en especial en la tolerancia de los cultivos a las condiciones ambientales adversas.

7

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de la Doctora Flor de Fátima Rosas Cárdenas del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, CIBA - IPN Unidad Tlaxcala.



REFERENCIAS

Aguiar, E. R. G. R., Olmo, R. P., & Marques, J. T. (2016). Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host-pathogen interactions. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 7, Issue 6, pp. 824-837). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1361>

Ameres, S., Martinez, J., & Schroeder, R. (2007). Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. *Cell*, 130, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.037>

Bartel, D. P. (2004). Review MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function ulation of hematopoietic lineage differentiation in mam-mals (Chen et al., 2004), and control of leaf and flower development in plants (Aukerman and Sakai, 2003. In *Cell* (Vol. 116).

Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 727-741). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. In *Cell* (Vol. 136, Issue 4, pp. 642-655). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>

Chao, H., Hu, Y., Zhao, L., Xin, S., Ni, Q., Zhang, P., & Chen, M. (2022). Biogenesis, Functions, Interactions, and Resources of Non-Coding RNAs in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 3695, 23(7), 3695. <https://doi.org/10.3390/IJMS23073695>

Chen, C., Zeng, Z., Liu, Z., & Xia, R. (2018). Small RNAs, emerging regulators critical for the development of horticultural traits. *Horticulture Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41438-018-0072-8>

Clavel, M., Péllissier, T., Montavon, T., Tschopp, M. A., Pouch-Péllissier, M. N., Descombin, J., Jean, V., Dunoyer, P., Bousquet-Antonelli, C., & Deragon, J. M. (2016). Evolutionary history of double-stranded RNA binding proteins in plants: identification of new cofactors involved in easiRNA biogenesis. *Plant Molecular Biology*, 91(1-2), 131-147. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0448-9>

Creasey, K. M., Zhai, J., Borges, F., Van Ex, F., Regulski, M., Meyers, B. C., & Martienssen, R. A. (2014). MiRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. *Nature*, 508(7496), 411-415. <https://doi.org/10.1038/nature13069>

Fei, Q., Xia, R., & Meyers, B. C. (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *The Plant Cell*, 25(7), 2400-2415. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.114652>

Fujimoto, Y., & Iwakawa, H. O. (2023). Mechanisms that regulate the production of secondary siRNAs in plants. *Journal of Biochemistry*, 174(6), 491-499. <https://doi.org/10.1093/JB/MVAD071>

Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J. S., Fahlgren, N., Gilbert, K. B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M. T., McGinn, M. G., Lowery, N., Martinez Baladejo, M. T., & Carrington, J. C. (2015). Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 11(3), 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755>

Genschik, P., Schiaffini, M., & Lechner, E. (2024). Proteolytic control of the RNA silencing machinery. *The Plant Cell*, 00. <https://doi.org/10.1093/PLCELL/KOAE075>

Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews. Genetics*, 10(2), 94-108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>

Liu, Y., Teng, C., Xia, R., & Meyers, B. C. (2020). PhasiRNAs in Plants: Their Biogenesis, Genic Sources, and Roles in Stress Responses, Development, and Reproduction. *The Plant Cell*, 32(10), 3059-3080. <https://doi.org/10.1105/TPC.20.00335>

Mierziak, J., & Wojtasik, W. (2024). Epigenetic weapons of plants against fungal pathogens. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/S12870-024-04829-9>

Roles, R., Zhan, F. J., & Meyers, B. C. (2023). *Annual Review of Plant Biology*. 18. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070122>

Schaeffe, B., Sun, W., Li, Y. S., Fang, L., & Chen, W. (2018). The evolution of posttranscriptional regulation. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 9, Issue 5). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1485>

Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 10, pp. 789-798). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1239>

Szitty, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme Pilcher, R., Moulton, V., Burgyan J, Dalmay T. Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 1;6(4):e1000838. doi: 10.1371/journal.ppat.1000838. PMID: 20368973; PMCID: PMC2848561

Tang, Y., Yan, X., Gu, C., & Yuan, X. (2022). Biogenesis, Trafficking, and Function of Small RNAs in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.825477>

Vazquez, F., Legrand, S., & Windels, D. (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends in Plant Science*, 15(6), 337-345. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.001>

Wight, M., & Werner, A. (2013). The functions of natural antisense transcripts. *Essays in Biochemistry*, 54(1), 91-101. <https://doi.org/10.1042/BSE0540091>

Wu, R., Wu, G., Huang, Y., Zhang, H., Tang, J., Li, M., & Qing, L. (2023). vsiRNA18 derived from tobacco curly shoot virus can regulate virus infection in Nicotiana benthamiana. *Molecular Plant Pathology*, 24, 466 - 473. <https://doi.org/10.1111/mpp.13310>

Yu, D., Meng, Y., Zuo, Z., Xue, J., & Wang, H. (2016). NATpipe: An integrative pipeline for systematical discovery of natural antisense transcripts (NATs) and phase-distributed nat-siRNAs from de novo assembled transcriptomes. *Scientific Reports*, 6(January), 8-13. <https://doi.org/10.1038/srep21666>

Zhan, J., & Meyers, B. C. (2023). Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 74(Volume 74, 2023), 21-51. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-070122-035226/CITE>

Zhang C., Wu Z., Li Y. & Wu J. (2015) Biogenesis, Function, and Applications of Virus-Derived Small RNAs in Plants. *Front Microbiol*. 9;6:1237. doi: 10.3389/fmicb.2015.01237. PMID: 26617580; PMCID: PMC4637412.

Zhao, B. S., Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 31-42). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>

Zheng, Y., Guo, J., Wai, C. M., Ming, R., & Sunkar, R. (2018). *MicroRNAs, tasiRNAs, phasiRNAs, and Their Potential Functions in Pineapple*. 167-182. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00614-3_12

