

## INFLUENCIA DE R-LOOPS PRÓXIMOS AL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES MIRNA EN EL PROCESAMIENTO CO-TRANSCRIPCIONAL Y LA MOVILIDAD DE miARNs

Fernández, Josefina

*Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral*

Directora: Gonzalo, Lucía

Codirectora: Mencía, Regina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Procesamiento de pri-miARNs, R-loops anti-sentido, miARNs móviles

### INTRODUCCIÓN

Los microARNs (miARNs) son moléculas de ARNs pequeñas, de entre 20 y 22 nucleótidos de largo, que juegan un rol importante en el silenciamiento génico post-transcripcional en organismos superiores (Bologna y Voinnet, 2014). Cumplen su función al ser cargados por la proteína ARGONAUTA (AGO), formando el complejo efector RISC, por sus siglas en inglés “RNA-Induced Silencing Complex” (Fang y Qi, 2015). El complejo RISC reconoce ARNs mensajeros (ARNm) degradándolos o inhibiendo su traducción. En plantas, la característica central que hace a los miARNs fundamentales, es su preferencia evolutiva a silenciar factores de transcripción (Axtell *et al.* 2008).

Los miARNs están codificados por genes MIRNA (MIRs), los cuales son transcritos por la ARN polimerasa II (ARNPII) dando lugar a transcritos primarios denominados pri-miARNs. Los pri-miARNs son procesados por la proteína DICER-LIKE1 (DCL1) la cual, en asociación con HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE), forman el complejo de procesamiento (Achkar *et al.* 2016; Mencía *et al.* 2022). El procesamiento de los pri-miARNs, el cual finaliza con la liberación de los miARNs maduros, puede llevarse a cabo luego de la transcripción, cuando el pri-miARN se encuentra en el nucleoplasma, el cual se conoce como procesamiento post-transcripcional, o durante la transcripción, donde el pri-miARN naciente, aún asociado a ARNPII, es reconocido y procesado por el complejo procesador, este mecanismo es conocido como procesamiento co-transcripcional. A su vez, se ha demostrado la existencia de un balance entre ambos mecanismos de procesamiento, que podría depender de la etapa de desarrollo de la planta y de las condiciones de crecimiento de la misma (Gonzalo *et al.* 2022). En el mismo estudio, se demostró que el procesamiento co-transcripcional es promovido por la formación de un híbrido ADN:ARN (R-loop) cercano al sitio de inicio de la transcripción, generado por un ARN anti-sentido al gen. Llamativamente, se ha encontrado que miARNs que poseen la capacidad de moverse, ya sea célula a célula vía plasmodesmo o a través del floema a otros órganos de la planta, tienden a procesarse mayormente de forma co-transcripcional. (Gonzalo *et al.* 2022).

### OBJETIVOS

- Examinar la potencial generación de R-loops en la construcción promSUC2::amiRSUL.

Título del proyecto: “PROCESAMIENTO CO-TRANSCRIPCIONAL DE PRECURSORES DE MICRO ARNS EN ARABIDOPSIS THALIANA”

Instrumento: PICT2020-SERIEA-00757

Año de convocatoria: 2020

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Manavella, Pablo Andrés



- Generación de vectores binarios con la secuencia del ARN<sub>inc</sub> capaz de inducir la formación del R-loop in vivo.
- Producción de plantas transgénicas que porten la construcción promSUC2:amiRSUL junto con la construcción del ARN<sub>inc</sub>.
- Evaluar la movilidad del amiRSUL en las plantas generadas mediante el incremento de la clorosis y reducción de la acumulación de clorofila.

## METODOLOGÍA

Se realizaron recombinaciones por el método Gateway de vectores destination y pEntry, anteriormente generados en el laboratorio, para dar lugar a los vectores binarios pJF01, pJF02 y pJF03. Estos últimos, contienen la construcción 35S::IncSUC2 y le confieren a la planta resistencia al antibiótico kanamicina. Con estos vectores se transformaron células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias resultantes fueron chequeadas por PCR de colonia. Luego, a las colonias que dieron positivas a la reacción, se les realizó extracción de ADN plasmídico y se corroboró nuevamente la integridad del clon por reacciones de PCR, corte con enzimas de restricción y secuenciación. Los clones que brindaron resultados positivos para todos los chequeos fueron utilizados, en segunda instancia, para transformar *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Finalmente, mediante la técnica Floral-Dip, utilizando las células de *Agrobacterium* previamente mencionadas, se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, tanto la línea promSUC2::amiRSUL (pSUC2::amiRSUL) como Col-0. Las semillas obtenidas de estas plantas fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico kanamicina que les otorgó la construcción. A su vez, la línea pSUC2::amiRSUL también fue seleccionada por el fenotipo de clorosis en sus nervaduras. A las plantas que pasaron la selección por antibiótico, se les extrajo ADN genómico para, mediante reacciones de PCR, corroborar que posean la construcción de interés. En el genotipado de estas plantas se utilizaron como controles positivos los plásmidos utilizados en el Floral-Dip y como controles negativos ADN genómico extraído de plantas Col-0 y pSUC2::amiRSUL sin transformar. En la actualidad, nos encontramos llevando a cabo la cuantificación de la clorosis de las nervaduras y la medición de clorofila de las plantas seleccionadas, las cuales contienen las construcciones pSUC2::amiRSUL/35S::IncSUC2.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizaron plantas transgénicas de la línea pSUC2::amiRSUL, las cuales cuentan con el miARN artificial, amiRSUL, que puede reconocer el ARNm de la proteína CHLORINA 42 (CH42 o SUL), necesaria en la síntesis y acumulación de clorofila, y clivarlo para evitar su traducción. A su vez la expresión de este miARN artificial se encuentra bajo la influencia del promotor SUC2, el cual se expresa únicamente en las células acompañantes del floema. Las plantas que expresan esta construcción poseen un fenotipo de clorosis en su sistema vascular (Felippes *et al.* 2011) (Figura 1). Un estudio realizado en los últimos años, determinó que el amiRSUL posee capacidad de movimiento, pudiendo desplazarse célula a célula vía plasmodesmo (Brioude *et al.* 2021). El objetivo de este trabajo es obtener plantas pSUC2::amiRSUL capaces de expresar un ARN largo no codificante (Inc, por sus siglas en inglés) que pueda formar un R-loop cercano a la región de inicio de la transcripción. El objetivo de fomentar un R-loop en la zona mencionada es para estimular el aumento del procesamiento co-transcripcional del pri-amiRSUL y con ello favorecer el movimiento del amiRSUL maduro, y así estudiar más en profundidad la correlación existente entre procesamiento co-transcripcional y movimiento de miARNs anteriormente mencionada en la introducción (Gonzalo *et al.* 2022). Con este fin, se generaron dos vectores, denominados pJF01 y pJF03, con la construcción 35S::IncSUC2, que codifican para dos ARN<sub>inc</sub> capaces de formar los R-loop 1 y R-loop 2, respectivamente (Figura 2).

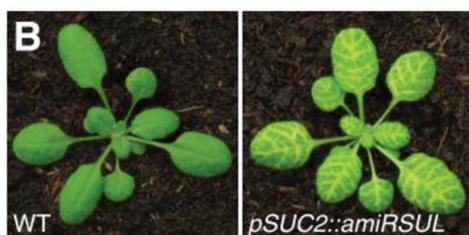


Figura 1. Fenotipo de clorosis.

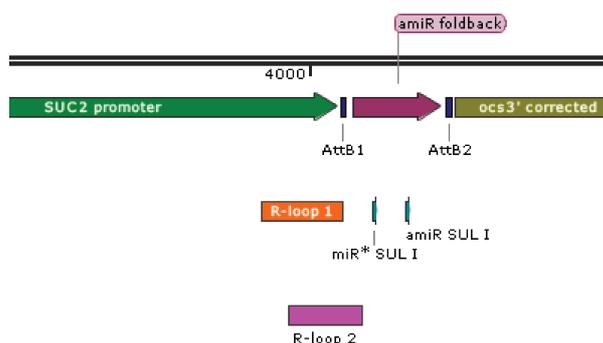
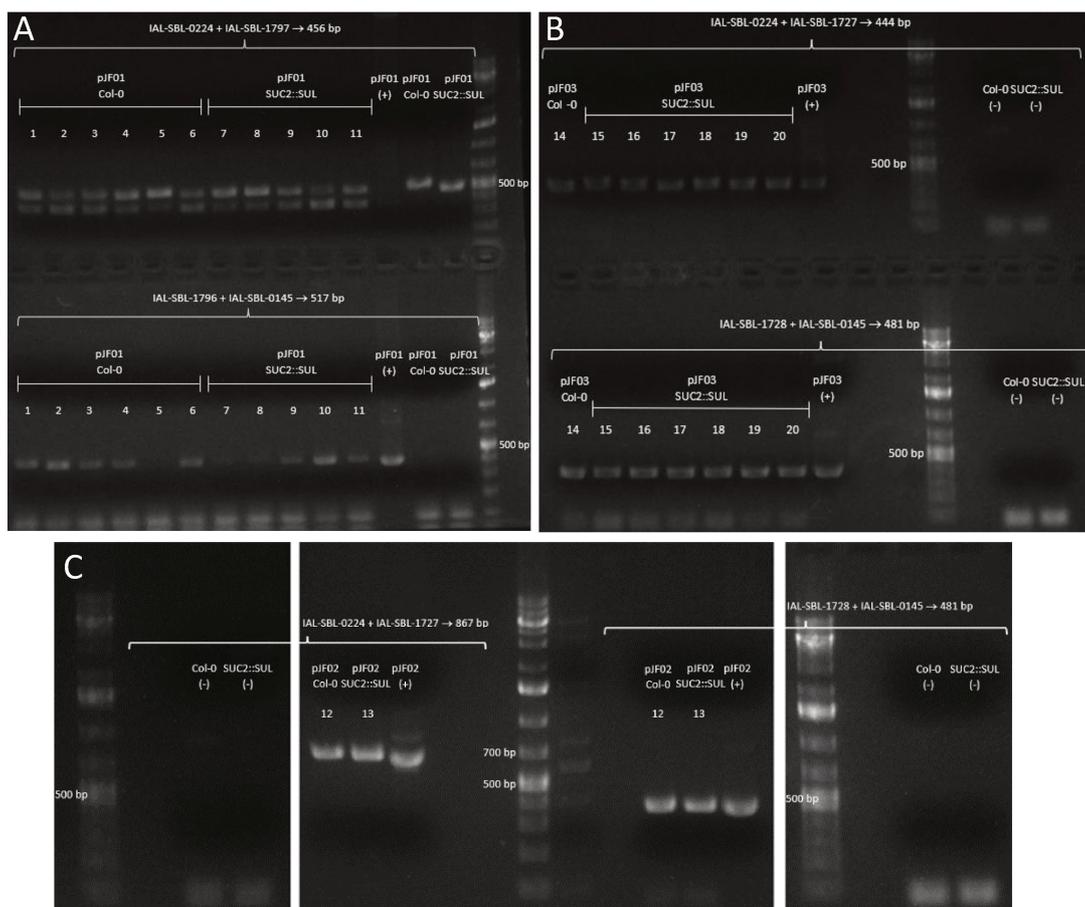


Figura 2. Formación de R-loops.

Se pudieron obtener con éxito las construcciones esperadas. Llamativamente, también se detectó un clon que posee una inserción de más de 400 pares de bases (bp). Esta inserción genera un ARNinc que tendrá el doble del largo previsto, por lo que podría generar problemas a la hora de formar el R-loop. Igualmente, se decidió sumar este clon al estudio de los dos anteriores, el cual se denominó pJF02.

Se utilizaron los tres plásmidos para transformar plantas de Arabidopsis, tanto la línea pSUC2::amiRSUL como Col-0. Para verificar que las plantas obtenidas contengan la nueva construcción, se realizó el genotipado de las líneas resultantes, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3. Todas las plantas genotipadas evidencian la incorporación de la construcción de interés a su genoma y, por lo tanto, serían potencialmente capaces de producir los respectivos ARNinc. En lo que respecta a las plantas pJF01 (Figura 3A), se observaron dos bandas, correspondientes a dos productos de PCR. Se determinó que la banda correspondiente a la construcción es la que posee un tamaño aproximado a 400bp (banda inferior), dado a que en el control positivo se observa una banda tenue del mismo tamaño, el cual era el esperado. A su vez, el producto de aproximadamente 500 bp, se puede observar en los controles negativos, por lo que este producto sería inespecífico. Es de interés destacar que los oligonucleótidos utilizados en pJF02 (Figura 3B) y pJF03 (Figura 3C) son los mismos, ya que estas construcciones solo difieren en la inserción manifestada en el pJF02. Esto último, explica que el producto del primer juego de oligonucleótidos posee el doble de tamaño en pJF02. Se seleccionaron plantas pSUC2::amiRSUL que además de dar positivo en el genotipado, presentaron el fenotipo de clorosis. Éstas fueron: líneas 8, 9 y 11 (contienen pJF01) y líneas de la 15 a la 20 (contienen pJF03). La línea 13 (con pJF02), aunque fue positiva en el genotipado, no presentó el fenotipo de clorosis, por lo que no se continuará con su análisis. Actualmente estamos analizando estas líneas para comprobar si se produjo una alteración en el patrón de clorosis, lo que estaría indicando una mayor movilidad del amiRSUL. Lo estamos abordando por dos técnicas diferentes: cuantificación de los niveles de clorofila y determinación de la expansión de la clorosis por análisis de imágenes con un programa informático. Los datos obtenidos de las líneas pSUC2::amiRSUL/ARNinc se compararán con los obtenidos de las plantas de la línea pSUC2::amiRSUL.



**Figura 3.** Genotipado de líneas transformadas con: pJF01, plantas 1-11 (A); pJF02, plantas 12-13 (B) y pJF03, plantas 14-20 (C)

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Achkar, N. P., Cambiagno D. A. & Manavella, P. A.** 2016. "MiRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway." *Trends in Plant Science* 21(12): 1034–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>.
- Axtell, M. J. & Bowman, J. L.** 2008. "Evolution of Plant MicroRNAs and Their Targets." *Trends in Plant Science* 13(7): 343–49.
- Bologna, N. G. & Voinnet, O.** 2014. "The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis." *Annual Review of Plant Biology* 65 (February): 473–503.
- Brioudes, F. et al.** 2021. "HASTY, the Arabidopsis EXPORTIN5 Ortholog, Regulates Cell-to-cell and Vascular MicroRNA Movement." *The EMBO Journal*: 1–22.
- Fang, X. & Yijun, Q.** 2015. "Rnai in Plants: An Argonaute-Centered View." *Plant Cell* 28(2): 272–85.
- Felippes, F. F., Ott, F & Weigel, D.** 2011. "Comparative Analysis of Non-Autonomous Effects of TasiRNAs and MiRNAs in Arabidopsis Thaliana." *Nucleic Acids Research* 39(7): 2880–89. <https://academic.oup.com/nar/article/39/7/2880/1145558>.
- Gonzalo, L. et al.** 2022. "R-Loops at MicroRNA Encoding Loci Promote Co-Transcriptional Processing of Pri-MiRNAs in Plants." *Nature Plants* 8(4): 402–18.
- Mencia, R. et al.** (2022). "Keeping up with the miRNAs: current paradigms of the biogenesis pathway." *Journal of Experimental Botany* 74.7 (2023): 2213-2227.