

## ANÁLISIS DEL ROL DE LOS R-LOOPS EN GENES *MIRNA* DURANTE EL PROCESAMIENTO DE pri-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*  
Director: Manavella, Pablo Andrés  
Codirectora: Gonzalo, Lucía

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Procesamiento de pri-miARNs, R-loops, TurboID

### 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 en proteínas ARGONAUTAS (AGOs), formando el complejo efector RISC, por sus siglas en inglés “RNA-Induced Silencing Complex”, que induce la degradación de ARN mensajeros (ARNm) o inhiben su traducción (Fang y Qi, 2015). En plantas, los miARNs presentan una preferencia por silenciar factores de transcripción, lo que los convierte en elementos centrales en diversos procesos biológicos (Axtell y Bowman, 2008; Manavella *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2019).

La biosíntesis de miARNs comienza con la transcripción de los genes miARNs (*MIRNA*) por la ARN polimerasa II (ARNPII), lo que da lugar a transcriptos primarios denominados pri-miARNs. Éstos son reconocidos y procesados por DICER-LIKE1 (DCL1) que, en asociación con HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE), forman el complejo de procesamiento o microprocesador. El procesamiento de los pri-miARNs, puede llevarse a cabo luego de la transcripción (procesamiento post-transcripcional o canónico), o durante la transcripción misma, donde el pri-miARN naciente, aún asociado a ARNPII, es reconocido y procesado en un mecanismo denominado 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). Además, el procesamiento co-transcripcional es promovido por la formación de un híbrido ADN:ARN (R-loop) cercano al sitio de inicio de la transcripción (TSS, del inglés “*Transcription Start Site*”), generado por un ARN anti-sentido al gen. La hipótesis de este trabajo es que los R-loops son necesarios para reclutar al microprocesador a los loci *MIRNA*. Un posible mecanismo es que alguna proteína, aún desconocida, reconozca específicamente estos híbridos y promueva el reclutamiento del microprocesador a esta ubicación. Finalmente, el objetivo de este trabajo es dilucidar el mecanismo por el cual los R-loops estarían favoreciendo el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs, analizando las proteínas asociadas a éstos.

Título del proyecto: PROCESAMIENTO CO-TRANSCRIPCIONAL DE PRECURSORES DE MICRO ARNs EN *ARABIDOPSIS THALIANA*  
Instrumento: PICT  
Año de la convocatoria: 2020  
Organismo financiador: ANPCyT  
Director/a: Manavella, Pablo Andrés



## OBJETIVOS

- Obtención de plantas transgénicas que porten la construcción dCas9-TurboID-Guía a *MIR165A/160B*.
- Clonado de guías a *MIR165A/160B* dentro de los vectores que contienen la construcción dCas9-RNasaH/dRNasaH.

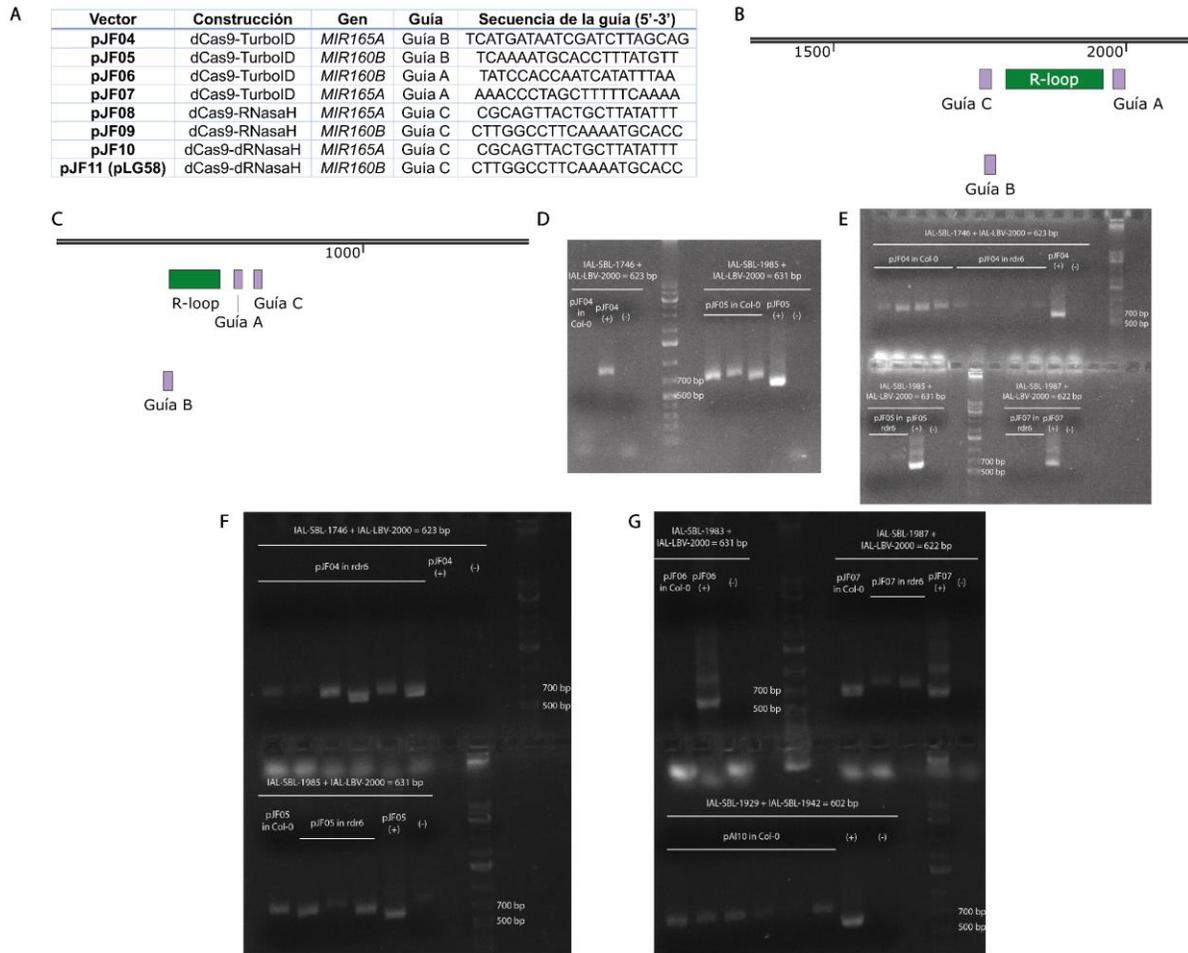
## METODOLOGÍA

Se utilizaron los vectores pJF04, pJF05, pJF06 y pJF07, generados por la empresa VectorBuilder. Éstos contienen la construcción dCas9-TurboID y una guía de ARN (ARNg). Para confirmar que los vectores sintetizados sean los esperados y no contengan mutaciones, se secuenció el plásmido completo con tecnología *Nanopore* por la empresa Eurofins. Con estos vectores se transformó *Escherichia coli DH5α* mediante electroporación para asegurar su almacenamiento. A su vez, se transformaron *Agrobacterium tumefaciens GV3101* con los mismos vectores para, finalmente, mediante la técnica Floral-Dip, transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las transformaciones se realizaron en el ecotipo Col-0 y en la línea mutante *rdr6*. RDR6 es una ARN polimerasa dependiente de ARN que juega un rol central en el silenciamiento génico. Se eligió trabajar con esta mutante para evitar los posibles procesos de silenciamiento desencadenados por la introducción de múltiples transgenes. Las semillas obtenidas de estas plantas fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico kanamicina que le otorga la construcción incorporada. Las plantas seleccionadas en el paso anterior fueron genotipadas, para lo cual se les extrajo ADN genómico y, mediante reacciones de PCR, se corroboró que contengan la construcción de interés. Durante el genotipado de estas plantas se utilizó como control positivo el plásmido correspondiente y como control negativo agua. En el momento de la realización de este informe, nos encontramos realizando los clonados de los ARNg para *MIR165A/160B* en vectores que contienen las construcciones dCas9-RNasaH/dRNasaH mediante corte con la enzima de restricción tipo III BsaI y ligación con ADN ligasa.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizará la proteína TurboID como un marcador de proximidad. TurboID es una biotina ligasa que es capaz de biotinilar inespecíficamente proteínas cercanas, generando enlaces anhidro biotina-5'-AMP con residuos nucleofílicos como la lisina (Branon *et al.*, 2018). Para lograr nuestros objetivos, utilizamos TurboID fusionada a una versión mutagenizada de la proteína Cas9, la cual es capaz de cargar el ARNg, y posicionarse en la región correspondiente, pero no posee actividad catalítica. Esta versión toma el nombre de dCas9. Los ARNg, los cuales guían el posicionamiento de la dCas9, fueron diseñados hacia los loci *MIR160B* y *MIR165A*, seleccionados por la particularidad de que sus pri-miARNs son procesados mayormente de forma co-transcripcional y poseen un R-loop en su TSS. Los vectores utilizados para transformar plantas de *Arabidopsis* que poseen la construcción dCas9-TurboID y las diferentes guías, se detallan y representan gráficamente en la Figura 1 (1A-C). Para verificar que las plantas obtenidas mediante transformación estable por Floral-Dip contengan la construcción, luego de seleccionadas por resistencia al antibiótico, se realizó extracción de ADN genómico, seguido de PCR, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 1 (1D-G). Se pudo detectar la incorporación al genoma de la construcción de interés en las plantas transformadas con pJF04, pJF05 y pJF07 y, por lo tanto, serían potencialmente capaces de expresar la fusión dCas9-TurboID y las ARNg

correspondientes. Aún continúa bajo trabajo la obtención de plantas que contengan la construcción otorgada por el vector pJF06.

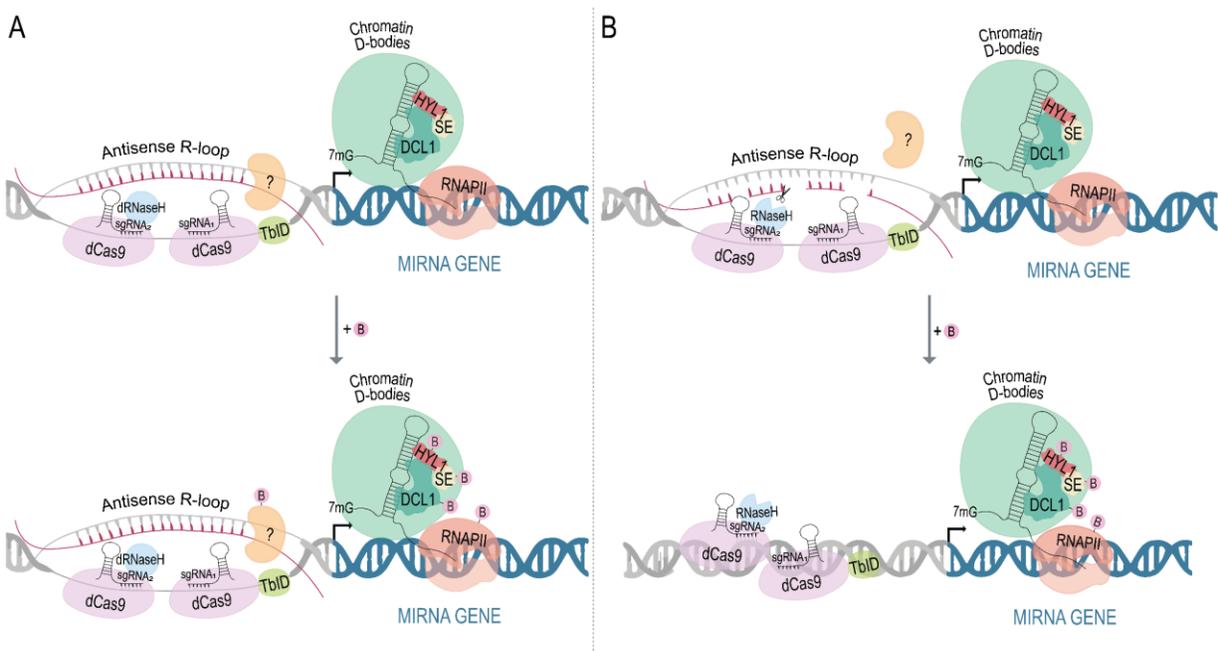


**Figura 1. (A)** Descripción de los vectores utilizados en el trabajo. **(B-C)** Posiciones donde hibridan las ARNg diseñadas sobre los locus *MIR160B* y *MIR165A*, respectivamente. **(D-G)** Genotipados de plantas Col-0 y *rdr6* transformadas con los vectores pJF04, pJF05, pJF06 y pJF07.

Además, se está trabajando para obtener vectores con las construcciones dCas9-RNasaH y dCas9-dRNasaH con las guías correspondientes (Figura 1A-C). RNasaH es una endonucleasa que posee la capacidad de clivar específicamente ARNs unidos a ADN. Por el contrario, la versión dRNasaH posee una mutación la cual no le permite este accionar y en este trabajo se utilizará para contrastar los resultados obtenidos con su versión activa. Una vez obtenidos estos vectores, transformaremos plantas Col-0 y *rdr6*.

El objetivo final es obtener mediante cruzamiento, plantas que contengan ambas construcciones: dCas9-TurboID y dCas9-RNasaH o dCas9-TurboID y dCas9-dRNasaH con diferentes ARNg para hibridar en distintas posiciones de los genes *MIRNA*. Como se muestra en la Figura 2A y 2B, el resultado esperado de estos cruzamientos, es el posicionamiento en el mismo locus de (1) dCas9-TurboID y dCas9-dRNasaH o (2) dCas9-TurboID y dCas9-RNasaH.

La primera combinación nos permitirá, en la estancia final, analizar todas las proteínas que se recluten en las cercanías del R-loop, durante la transcripción y procesamiento del pri-miARN. La segunda combinación, la cual posee la versión activa de la RNasaH, cumplirá su función, eliminando el R-loop y, si nuestra hipótesis es correcta, evitará la unión de ciertas proteínas que reconocen este híbrido ARN-ADN, disminuyendo la eficiencia del procesamiento co-transcripcional de los pri-miARNs. Al comparar los resultados de espectrometría de masas de ambas combinaciones, seremos capaces de detectar proteínas específicas que reconocen el R-loop en la primera combinación, pero no así en la segunda. Esta detección diferencial nos indicará un accionar específico de ciertas proteínas en el reconocimiento de R-loops y el procesamiento co-transcripcional, debiendo profundizar el estudio en cada una de ellas.



**Figura 2. (A-B)** Esquema representativo del funcionamiento del sistema dCas9-TurboID/dCas9-dRNasaH (A) y dCas9-TurboID/dCas9-RNasaH (B) que se utilizará en este trabajo para determinar proteínas asociadas específicamente a R-loops que favorezcan el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- 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.
- Branon, T. C. et al.** 2018. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature biotechnology*, 36(9), 880-887.
- Fang, X. & Yijun, Q.** 2015. Rnai in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell* 28(2): 272–85.
- 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.
- Manavella, P. A., Yang, S. W., & Palatnik, J.** 2019. Keep calm and carry on: miRNA biogenesis under stress. *The Plant Journal*, 99(5), 832-843.
- Song, X., Li, Y., Cao, X., & Qi, Y.** (2019). MicroRNAs and their regulatory roles in plant–environment interactions. *Annual review of plant biology*, 70(1), 489-525.