



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

REGULACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DEL GENOMA POR ELEMENTOS REPETIDOS INVERTIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS RESPUESTAS FRENTE A ESTRÉS SALINO EN PLANTAS

Gieco Grimaldi, Milagros

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET-UNL

Director: Manavella, Pablo Andrés

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, repeticiones invertidas (IRs), *P5CS1*

INTRODUCCIÓN

Las repeticiones invertidas (IR) se encuentran en la mayoría de los transposones de clase II o en elementos derivados de transposones, creados cuando un fragmento de ADN se inserta dos veces, y con orientaciones opuestas, en posiciones muy próximas del genoma. La transcripción de estas secuencias repetidas genera ARN con una región bicatenaria casi perfecta, que puede ser reconocido por DCL3 y producir ARN pequeños que pueden controlar la formación de bucles de cromatina de corto alcance y, por ende, la expresión génica en cis. En nuestro grupo, identificamos más de 750 regiones con IRs capaces de producir ARN pequeños ubicadas en una ventana de 3.000 pb aguas arriba o abajo de genes anotados en *Arabidopsis thaliana*. Además, muchas de estas regiones contienen al menos una región adicional de mapeo de ARN pequeño en su proximidad, convirtiéndolas en buenas candidatas para formar bucles reguladores en la cromatina. Dentro de estos genes se encuentra *DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1(P5CS1)*. Este gen codifica para una enzima limitante en la vía de biosíntesis de prolina, un aminoácido que cumple diversas funciones en el desarrollo normal de plantas y además posee un rol fundamental en mecanismos de respuesta a estrés salino debido a su capacidad de actuar como agente osmoprotector (Lehmann et al. 2010). Así, frente al sensado de estrés por parte de la planta, se dispara la expresión de *P5CS1* y la consecuente síntesis y acumulación de prolina para afrontar la situación (Jun et al, 2016 y Funck et al, 2020).

La salinidad es el mayor estrés abiótico que perjudica la productividad y calidad de las cosechas (Ingram & Yambao, 1988). Las cantidades excesivas de sal en el suelo afectan de manera adversa el crecimiento y desarrollo de las plantas. Procesos biológicos como la germinación de la semilla y su vigor, crecimiento vegetativo, floración y desarrollo del fruto son afectados por las altas concentraciones de sales (Ren *et al.*, 2005). Aproximadamente el 20% del área cultivada a nivel mundial y cerca de la mitad de las tierras irrigadas son afectadas por este factor (Hasegawa *et al.*, 2000).

Lo expuesto anteriormente vuelve a *P5CS1* un candidato interesante para el estudio de la regulación de su expresión y por ello, nos proponemos analizar la regulación de la expresión génica de *P5CS1* asociada a la presencia del elemento IR y su impacto en la topología del genoma.

TÍTULO DEL PROYECTO: Modulación de la topología del genoma por ARNs pequeños derivados de repeticiones invertidas
INSTRUMENTO: PICT2018-03585
AÑO DE CONVOCATORIA: 2018
ORGANISMO FINANCIADOR: ANPCYT
DIRECTOR: MANAVELLA, PABLO ANDRES



OBJETIVOS

Estudiar el rol de elementos derivados de transposones en la regulación de la expresión génica de la enzima de síntesis de prolina P5CS1, mediante la modulación de la topología del genoma mediada por siRNA en *Arabidopsis thaliana* y su consecuente impacto en la respuesta a estrés salino.

METODOLOGÍA

Para comenzar con el estudio, se identificaron y aislaron variedades naturales de *Arabidopsis thaliana* que contienen o no el elemento IR. Esto se realizó mediante el análisis de los genomas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con oligonucleótidos específicos diseñados para ello. Luego, se procedió a estudiar el impacto de la presencia o ausencia del elemento IR sobre la expresión de *P5CS1* y en parámetros relacionados a la función de P5CS1 en contexto de estrés salino. Para ello, plántulas de doce días fueron sometidas a tratamientos con 200mM de NaCl durante tres tiempos diferentes, para luego analizar los niveles de transcritos de *P5CS1* mediante RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Por otro lado, se diseñó una estrategia basada en la tecnología de CRISPR con el fin de obtener líneas de plantas que contengan deleciones parciales del IR. Para esto se utilizó un vector, previamente construido en el laboratorio, el cual contiene la Caspasa 9 y dos ARN guías, que dirigen específicamente el corte de la hebra de ADN eliminando los fragmentos deseados. Para esta actividad, se transformaron con dicho vector bacterias competentes de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación, las cuales fueron utilizadas para transformar ecotipos naturales de *Arabidopsis* que contienen el elemento IR, mediante inmersión floral. Una vez obtenidas las primeras filiales de transformantes (T1), se seleccionaron las plantas positivas para la inserción, mediante la detección de fluorescencia roja evidenciada por microscopía. Posteriormente, se extrajo ADN de cada una de estas plantas para identificar la presencia de alelos mutantes mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos.

También, se evaluó el impacto causado por la presencia o ausencia del elemento IR en la topología del genoma del loci de *P5CS1* mediante la técnica de “captura de conformación cromosómica” (3C) en variedades naturales de *Arabidopsis*. Esta técnica permite el estudio de interacciones específicas que se producen entre dos regiones de interés en el genoma. Luego, la intensidad de dichas interacciones puede ser determinada de forma cuantitativa mediante RT-qPCR, utilizando primers específicos que hibridan con las regiones en estudio. Para este ensayo, las plantas fueron previamente sometidas al mismo tratamiento del ensayo en el que se evaluó la expresión de P5CS1.

Por último, se analizó el fenómeno de “splicing alternativo” que, según bibliografía consultada (Kesari et al., 2012), se produce de forma exacerbada en el ecotipo Sha en comparación con Col-0 y es responsable de la formación del gen *P5CS1* no funcional, con una consecuente disminución de la respuesta al estrés salino. Dicho análisis se llevó a cabo mediante la cuantificación de niveles de expresión del gen en cada ecotipo por RT-qPCR, sometidos al ensayo de estrés.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los análisis por PCR realizados sobre los extractos genómicos de quince variedades naturales de *Arabidopsis* evidenció la presencia del elemento IR en nueve de estas variedades. De ellas, fueron elegidas dos con elemento IR, Columbia (Col-0, originaria de Estados Unidos, América del Norte) y Uod (Uod-1, originaria de Austria, Europa Central), y una sin elemento IR, Shahdara (Sha, originaria de Tadjikistan, Asia Central), para su posterior análisis.

Respecto al estudio del impacto de la presencia del IR en la respuesta, por parte de la planta, al estrés salino; luego de los tratamientos durante 30, 60 y 180 minutos, los resultados mostraron que los niveles de expresión de *P5CS1* eran mayores en aquellos ecotipos que presentaban el elemento IR en su genoma respecto del que no. Además, como es de esperar según la bibliografía, se observaron mayores niveles de expresión en el tratamiento salino más prolongado (180 minutos). Esto indicaría entonces, que el elemento IR ejercería una regulación positiva sobre el gen *P5CS1*.

Resulta interesante, además, observar que mayores niveles de expresión del gen, se condicen con una mayor acumulación de Prolina, aminoácido para el cual la enzima *P5CS1* resulta limitante en su biosíntesis. Esto, según un ensayo realizado donde se midió dicho parámetro fenotípico, en las plantas sometidas al tratamiento salino antes mencionado. Lo que indicaría entonces que la mayor expresión del gen implica una mayor respuesta fisiológica en estas condiciones de estrés.

En cuanto a las filiales transformantes (T1) generadas mediante CRISPR, en ninguno de los individuos obtenidos a partir de la transformación de los ecotipos Col-0 y Uod-1 fue posible detectar la presencia del alelo CRISPR, todos presentaron el alelo salvaje. Debido a esto planteamos rediseñar la estrategia con el fin de obtener alelos mutantes. El impacto causado por la presencia o ausencia del elemento IR en la topología del genoma del loci de *P5CS1*, medido mediante la técnica 3C, solo puede analizarse en plantas controles hasta el momento; la qPCR realizada sobre los genómicos de los ecotipos en estudio, obtenidos por la técnica antes mencionada, mostró la formación de dos interacciones diferentes que involucran distintas regiones del gen. A estas interacciones se las denominó "loop 1" y "loop 2" y se observaron dos situaciones: niveles de formación relativos de "loop 1" fueron mayores en Sha mientras que, niveles de formación relativos de "loop 2" fueron más altos en los ecotipos con presencia del elemento IR; Col-0 y Uod-1. Estos resultados indicarían que la presencia del IR se relaciona con la formación del loop 2, el cual podría favorecer la transcripción del gen. Asimismo, un estudio reciente (Kesari et al., 2012) describe la existencia del fenómeno de splicing alternativo, particularmente *exon-skipping*, para el gen *P5CS1*. Este fenómeno se ve exacerbado en el ecotipo Sha, lo cual pudimos corroborar en nuestros experimentos y podría estar relacionado con la menor expresión del gen en este ecotipo. Sumado a lo descrito anteriormente, y poniendo en diálogo nuestros resultados, hipotetizamos que la ausencia del IR y el consecuente aumento de formación de "loop 1" podría estar relacionado al fenómeno de splicing alternativo. La conformación tridimensional que adopta la cromatina sobre el loci podría afectar la velocidad de transcripción de la Polimerasa II favoreciendo el splicing alternativo o interferir en la actividad del complejo de spliciosoma.

En conclusión, este estudio provee otro ejemplo de cómo los elementos derivados de transposones son capaces de alterar la expresión de genes vecinos aportando finalmente a la adaptación de las especies a su entorno natural.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Funck D., L. Baumgarten L., M. Stift M., N. von Wirén N. and L. Schönemann L.. 2020. Differential Contribution of P5CS Isoforms to Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 11:565134,1–15



- Jun XF., Rui J., Lian S., Fang Q., Bo J., and Jun X.H.** 2016. Light affects salt stress-induced transcriptional memory of P5CS1 in Arabidopsis. PNAS E8335–E8343.
- Ingram K. T. and Yambao E. B.** 1988. Rice sensitivity to water deficit at different growth stages. Agris Newsletter 13(5): 16-28.
- Ren Z., Gao J., Li L., Cai X., Huang W., Chao D., Zhu M., Wang Z., Luan S., and Lin H.** 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nature Genetic. 37 (1): 1141-1146.
- Hasegawa, P. M., Bressan RA., Zhu JK., and Bohnert H.** 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51(1): 463-499.
- Kesari R., Laskyb J., Villamora J., Des Maraisb D., Chena Y., Liua T., Lina W., Juengerb T., and Versluesa P.**2012. Intron-mediated alternative splicing of Arabidopsis P5CS1 and its association with natural variation in proline and climate adaptation. PNAS. 1203433109.
- Lehmann S., Funck D., Szabados L., and Rentsch D.**. 2010. Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids, 949–62.

