

## EL ARN LARGO NO CODIFICANTE APOLO REGULA GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN ARABIDOPSIS

Mammarella María

*Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL)*

**Área:** Ciencias biológicas

**Sub-Área:** Biotecnología

**Grupo:** X

**Palabras clave:** ARNs no codificantes, estrés salino, *Arabidopsis thaliana*.

### INTRODUCCIÓN

Las plantas se encuentran constantemente expuestas a cambios de su entorno y deben adaptarse a una inmensa variedad de estreses bióticos y abióticos. Debido a su naturaleza sésil, han desarrollado sofisticados mecanismos de respuesta y adaptación a situaciones extremas y amenazas para su supervivencia, activando y reprimiendo genes que regulan su desarrollo. A lo largo de años de rigurosa investigación se ha demostrado que las condiciones de estrés abiótico, como por ejemplo la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, la radiación UV y el estrés oxidativo, afectan distintos procesos celulares, induciendo determinados programas de expresión génica con el fin de activar mecanismos de supervivencia (Chinnusamy y col., 2008; Hirayama y Shinozaki, 2010).

En las últimas décadas se vio que sólo una pequeña fracción del genoma de las plantas (y de los eucariotas en general) codifica proteínas, aunque la mayor parte de éste se transcribe a ARN. Esta gran porción de ARNs "no codificantes" ha resultado jugar un rol preponderante en la regulación de la expresión de genes y de la plasticidad del genoma ante señales internas del organismo, así como del ambiente. Además, diferentes estudios han indicado que estas señales pueden regular la expresión de genes en respuesta a estrés, modulada por mecanismos epigenéticos regular la acumulación de los ARNm a nivel post transcripcional (Chinnusamy y Zhu, 2009). Los cambios epigenéticos mayoritariamente afectan la estructura de la cromatina, es decir, al complejo de ADN asociado a proteínas y ARN en el núcleo celular. La modulación de la compactación de la cromatina afecta directamente la disponibilidad de una región del genoma para la transcripción, y depende de numerosos factores, como son las variantes de histonas, sus modificaciones post traduccionales y la metilación del ADN. Todos estos procesos están catalizados por complejos remodeladores de la cromatina, variantes de histonas y mecanismos que involucran ARNs largos no codificantes (ARNlnc) y pequeños ARNs (Chapman y Carrington, 2007; Henderson y Jacobsen, 2007; Kouzarides, 2007; Kasschau y col., 2007; Pfluger y Wagner, 2007; Law y Jacobsen, 2010; Ariel y col., 2015). Además, se sabe que los ARNs no codificantes están involucrados en la deposición de marcas epigenéticas determinantes para la expresión de los genes, así como también en la modulación dinámica de la conformación tridimensional de la cromatina, lo que se conoce como topología del genoma. Es por eso que el estudio del comportamiento de

los ARNs no codificantes en la respuesta de las plantas al estrés medioambiental constituye la base para el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas al mejoramiento y selección de cultivos altamente competitivos.

Se ha visto que el ARN largo no codificante *APOLO* es transcrito por las ARN polimerasas II y V en respuesta a auxina, una hormona que controla numerosos aspectos del desarrollo de las plantas. Esta transcripción dual regula la formación de un loop de cromatina que comprende el promotor de su gen vecino *PID*, un regulador clave del transporte polar de auxinas. Alterando la expresión de *APOLO* se afecta la formación del loop, modelando el patrón de expresión de *PID*. Análisis de blancos de *Apolo* revelaron una regulación directa en trans de varios genes de respuesta a estrés (particularmente modulados por salinidad, sequía, estrés osmótico).

Este proyecto consiste en estudiar el rol del ARN largo no codificante *APOLO* en la adaptación de las plantas sometidas a estrés por salinidad.

## METODOLOGÍA

Previamente al comienzo de este proyecto de tesina, se realizó un aislamiento de cromatina por purificación de ARN (ChIRP) para la identificación de genes de respuesta a estrés que son blancos de *APOLO*. Además, se realizó una secuenciación de ARN (RNAseq) de plantas que sobre expresan *APOLO* para determinar aquellos genes que se encuentran desregulados.

Para realizar el fenotipado molecular se llevaron a cabo tratamientos de 6 horas en condiciones control y con sal (cloruro de sodio, 150mM) utilizando plantas salvajes, sobre expresantes de *APOLO* (35S:*APOLO*) y plantas donde *APOLO* está reprimido (RNAi *APOLO*). Se tomaron muestras de plántulas y de raíz y con ellas se realizaron extracciones de ARN, retrotranscripción y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se midieron los niveles de expresión de los distintos genes seleccionados.

Por otro lado se realizó un fenotipado de raíces en placas, en condiciones control y con sal (75mM), de los distintos genotipos. Además se llevó a cabo un fenotipado de desarrollo de las mismas plantas en condiciones control y con sal en macetas y se midió el daño celular (mediante cuantificación de clorofila y medidas de conductividad).

Para el análisis del patrón de expresión de *APOLO* se utilizaron plantas transformadas con una construcción del promotor de *APOLO* fusionado al gen *GUS*, que codifica para la  $\beta$  glucuronidasa, como reportero. Las plantas fueron tratadas durante 6 horas en condiciones control y con sal.

## RESULTADOS

### ***APOLO* y *PID* son regulados por estrés salino**

En la información disponible en base de datos se encontró que *PID* estaría inducido por sal a las 6 horas sólo en raíces. Por otro lado, con los análisis realizados se vio que la expresión de *APOLO* se induce a las 6 horas de tratamiento con sal.

### **Identificación de genes de respuesta a estrés que son blancos de *APOLO***

De la comparación de los datos obtenidos del ChIRP y del RNAseq de plantas salvajes versus las sobreexpresantes de *APOLO*, se obtuvo una serie de genes potencialmente regulados de manera directa por *APOLO*. Con esa lista de genes se realizó un análisis de la información disponible en Araport, donde se muestra la respuesta de éstos en diferentes ensayos de estrés. De esta base de datos se obtuvo que gran parte corresponde a genes de respuesta a estrés, mayormente por salinidad.

### ***APOLO* regula transcripcionalmente a un grupo de genes de respuesta a estrés**

De la serie de genes elegidos se vio que algunos se comportan de manera diferencial en condiciones control en los distintos genotipos (35S y RNAi). Además, algunos presentan cambios en su acumulación cuando esas plantas son tratadas con sal.

### **La desregulación de *APOLO* impacta en la respuesta de la planta al estrés salino**

De manera preliminar se observó que en condiciones basales, las plantas de 7 días que sobreexpresan *APOLO* presentan la raíz principal más corta que las plantas salvajes cuando son crecidas en condiciones control. En cambio, cuando crecen en presencia de sal, sus raíces presentan una longitud mayor a las salvajes. A su vez, las plantas que tienen *APOLO* reprimido presentan, a los 14 días, mayor longitud total de raíces laterales respecto de las salvajes cuando son crecidas en presencia de sal, ocurriendo lo contrario en condiciones control.

En cuanto al fenotipo de desarrollo se vio que las plantas que tienen reprimido *APOLO* presentan mayor producción de semillas respecto de las salvajes cuando son regadas con concentraciones constantes de sal.

Además se observó que las plantas que sobre expresan *APOLO* tienen menor daño celular cuando son regadas con concentraciones crecientes de sal con respecto a las salvajes. Las plantas que lo tienen reprimido presentan el fenotipo opuesto, es decir, mayor daño celular.

### **El promotor de *APOLO* es activo en diferentes órganos de la planta y responde al tratamiento con sal**

Se observó que *APOLO* se expresa en pecíolos de plántulas de 14 días, además del inicio de raíces laterales y los estomas. También se vio que en las plántulas tratadas con sal la expresión es mayor, lo que se condice con lo obtenido por cuantificación de los niveles endógenos del ARN de *APOLO*.

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Nuestros resultados indican que *APOLO* regula de manera coordinada una serie de genes de respuesta al estrés salino, y que las plantas con niveles desregulados de *APOLO* responden de manera diferente al tratamiento con sal. Para culminar este proyecto de investigación nos proponemos identificar las marcas epigenéticas y la conformación tridimensional de la cromatina en los loci regulados por *APOLO* en trans. Realizaremos ensayos de ChIP (inmunoprecipitación de la cromatina) y 3C (captura de la conformación de la cromatina) para determinar qué modificaciones de la organización de la cromatina dependen del reconocimiento de *APOLO*.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chinnusamy V.** y col., 2008. Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses. *J Int Plant Biol* 50, 1187-95.
- Hirayama T.** y **Shinozaki K.**, 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-52.
- Chinnusamy V.** y **Zhu J.-K.**, 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Op in Plant Biol* 12, 133-9.
- Chapman E.** y **Carrington J.**, 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Gen* 8, 884-96.
- Henderson I.** y **Jacobsen S.**, 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447, 418-24.
- Kouzarides T.**, 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705
- Kasschau K.** y col., 2007. Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol* 5, 479-93.
- Pfluger J.** y **Wagner D.**, 2007. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr Op in Plant Biol* 10, 645-52.
- Law y Jacobsen**, 2010. *Nat Rev Genet* 11, 204-20. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.
- Ariel F.** y col., 2015. Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *Trends in Plant Sci* 20, 362-71.