



MECANISMOS DE CARGA, SELECCIÓN Y RETENCIÓN DE HEBRAS DE MICRO ARNS EN PLANTAS

Ariel Hernán Tomassi

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Pablo Andrés Manavella; co-directora: Dra. Delfina Adela Ré

Lugar de realización: Laboratorio de Biología del ARN. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL - CONICET).

Fecha de la defensa: 16 de marzo de 2020

ahtomassi@gmail.com

Resumen

En plantas, los ARN pequeños (sARN) controlan múltiples aspectos de la fisiología de estos organismos, desde la defensa contra virus hasta la estabilidad y topología de los genomas. En particular, los micro ARNs (miARNs), una de las clases más abundantes de sARN endógenos, regulan numerosos procesos durante el desarrollo y la adaptación de las plantas al ambiente. Para cumplir sus funciones, los sARNs se asocian a proteínas ARGONAUTA (AGO). En el caso de los miARNs, AGO1 es el principal efector de la vía, cargando dúplex de miARN maduros y reteniendo sólo una de las hebras, la cual usa como guía para reconocer y silenciar genes blanco. Recientemente, se descubrió que la carga de miARNs en AGO1 ocurre, al menos en parte, en el núcleo de la célula permitiendo exportar hacia el citoplasma los miARNs ya asociados al complejo efector RISC. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo preciso de carga de miARNs en AGO1 dentro del núcleo, y cómo esta proteína elige cuál hebra del dúplex de miARN retener y cuál descartar. En esta Tesis buscamos comprender estos dos aspectos de la biología de la proteína AGO1, en el contexto de la regulación génica mediada por miARNs.

En una primera etapa de este trabajo, y a fin de generar las herramientas necesarias para responder a las preguntas planteadas, desarrollamos un protocolo de detección de miARNs no radiactivo que permitiera la cuantificación, de manera sensible, de ambas hebras de un miARN. Además, el protocolo permite la re-hibridación de las membranas, práctica común en protocolos de detección radioactiva pero inexistente en técnicas no-radioactivas. Mediante el uso de esta herramienta que nos permitió observar cambios en los niveles de miARNs de plantas mutantes identificadas en nuestro laboratorio y disponibles para su estudio, logramos identificar a CARP9, una proteína intrínsecamente desordenada de localización nuclear, como un factor que promueve la carga de miARNs en AGO1 en el núcleo. Mutaciones en el gen que codifica CARP9 llevan a una alteración en la acumulación de miARNs y en el silenciamiento génico, y causan defectos morfológicos notables. Curiosamente, encontramos que

CARP9 es capaz de interactuar con HYL1, pero no con otras proteínas de la maquinaria de biogénesis de miARNs. De la misma manera, CARP9 interactúa con miARNs maduros, pero no con sus precursores, posicionando a esta proteína en un paso posterior al procesamiento de los pri-miARNs. También encontramos que CARP9 es capaz de interactuar con AGO1 promoviendo su carga con miARNs. Las plantas deficientes en CARP9 presentan niveles reducidos de miARNs cargados en AGO1, retención parcial de miARNs en el núcleo, y niveles proteicos reducidos de AGO1. En conjunto, nuestros resultados sugieren que CARP9 modula la comunicación HYL1-AGO1 actuando como una proteína de anclaje para permitir la carga adecuada de los miARNs en el complejo efector RISC. A su vez, estos resultados permiten posicionar a HYL1 como el potencial “dador” de miARNs a AGO1 durante su proceso de carga nuclear.

Por último, en esta Tesis diseñamos un sistema reportero de doble gatillo que permite discernir qué hebra se carga en AGO1, a fin de estudiar los mecanismos que rigen el proceso de retención de la hebra guía en el complejo efector AGO1-miARN. El sistema reportero consta de un miARN artificial diseñado para que su hebra guía (amiR:BASTA) silencie al gen de resistencia al herbicida BASTA, mientras que su hebra pasajera (amiR:BASTA*) silencia una versión modificada de la proteína bioluminiscente Firefly Luciferasa (F-Luc). El sistema reportero fue introducido en plantas de *Arabidopsis thaliana* y se evaluó su funcionamiento midiendo los niveles de amiR:BASTA, amiR:BASTA*, bioluminiscencia basal, fenotipo y resistencia a distintas concentraciones del herbicida. De la misma manera, se estableció la concentración de trabajo del herbicida. Una vez identificada una línea de plantas homocigotas para el sistema reportero con características óptimas, las mismas se sometieron a mutagénesis al azar y posterior identificación de mutantes de interés. Los genomas completos de estas mutantes fueron secuenciados, y se determinó bioinformáticamente los potenciales genes vinculados a los fenotipos observados. De esta manera, se generó una colección de mutantes, cuyos análisis preliminares de algunas de ellas se describen en esta Tesis, que nos permitirá estudiar los procesos que dictan la selección de la hebra guía de miARNs por AGO1.

Como resultado de este trabajo de Tesis, hemos logrado generar un avance significativo en la comprensión de la biología de la proteína AGO1 en las vías de silenciamiento génico mediado por miARNs. En especial, esta Tesis aporta nuevas evidencias que permiten comprender mejor cómo es el proceso nuclear de carga de miARNs en AGO1 al haber identificado la proteína, CARP9, que actúa en la interfase entre la maquinaria de procesamiento de miARNs y el complejo efector RISC. Además, logramos identificar potenciales mutantes con alteración en la selección de hebras de miARNs por AGO1, lo que permitirá comprender los mecanismos por los cuales este proceso tiene lugar en la célula vegetal.

Abstract

MECHANISMS OF LOADING, SELECTION AND RETENTION OF THE MICRO RNAS STRANDS IN PLANTS

MicroRNAs (miRNAs) regulate numerous processes during plant development. ARGONAUTA 1 (AGO1), the main effector of the pathway, loads miRNA duplexes and uses them as a guide to recognize and silence target genes. In order to study the mechanisms of loading and strand selection of miRNAs into AGO1 we took two approaches. We identified CARP9, an intrinsically disordered nuclear protein, as a factor that promotes nuclear loading of miRNAs in AGO1. Mutations in CARP9 lead to an alteration in miRNA levels and gene silencing, causing notable morphological defects. CARP9 interacts with HYL1, and is associated with mature miRNAs, but not with its precursors. Furthermore, CARP9 interacts in the nucleus with AGO1. Plants deficient in CARP9 displayed reduced levels of AGO1-loaded miRNAs, partial retention of miRNAs in the nucleus, and reduced protein levels of AGO1. These results suggest that CARP9 modulates HYL1-AGO1 crosstalk in the nucleus, acting as a scaffold and promoting the loading of miRNAs in the RISC complex. On the other hand, we performed a forward genetic screening searching for proteins potentially participating in miRNA-duplex strand selection by AGO1. For this, we designed and used a reporter system that allows us to discern which strand is loaded into AGO1. Performing random mutagenesis and whole genome sequencing of mutant plants of interest, we identified and preliminarily analyzed some candidate genes linked to these processes.