

ANÁLISIS DE LA CONSERVACIÓN DEL ARN LARGO NO CODIFICANTE APOLO EN ESPECIES DE LA FAMILIA DE LAS BRASSICACEAS

Ibarra Virginia

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL)

Área: Ciencias biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: ARNs no codificantes, conservación, Brassicaceas.

INTRODUCCIÓN

Décadas antes del advenimiento de las revolucionarias tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, la comunidad científica ya había advertido lo que se conoce como “la paradoja del valor C”, valor que representa la cantidad de ADN que tiene una célula de un organismo, y que no muestra ninguna correlación directa con la complejidad de cada especie¹. A partir de la obtención de las secuencias de los genomas completos de organismos procariotas y eucariotas, pudimos comprobar que en los organismos superiores el porcentaje de ADN que codifica proteínas es sorprendentemente pequeño, variando, por ejemplo, desde el 50% del compacto genoma de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, hasta el 2% en cultivos de interés agronómico e incluso el ser humano^{2,3}. Durante largos años se pensó que ese abundante ADN no codificante, también llamado otrora “ADN basura” constituía un mero reservorio de potenciales mutaciones útiles para la evolución de la especie, sin cumplir un rol mayor en la vida del individuo. Sin embargo, las nuevas tecnologías de secuenciación de ARN permitieron revelar que a pesar de que una pequeña porción del genoma es traducible en proteínas, un porcentaje extraordinariamente superior es transcrito en ARNs no codificantes (ncARNs). La dilucidación del rol de estos ncARN es un nuevo desafío en la presente era de la biología molecular. Los ncARNs pueden ser procesados en pequeñas moléculas de menos de 50 nt tales como los microARNs o los ARNs de interferencia, que están involucrados en la regulación de la expresión de otros genes, tanto a nivel epigenético, como post-transcripcional⁴. Por otro lado, existen otros ncARNs que pueden cumplir una función en su forma larga, mediante la participación en complejos ribonucleoprotéicos, y han sido caracterizados en la regulación epigenética de genes, el procesamiento de transcritos, el control de la traducción, entre otros mecanismos moleculares. Algunos de ellos han sido relacionados al desarrollo de los mamíferos y la aparición de enfermedades tales como distintos tipos de cáncer. En plantas, los ARNs no codificantes estarían asociados a la respuesta adaptativa al entorno y a la señalización de fitohormonas⁵. En particular, un ARN largo no codificante (lncARN) de la especie *Arabidopsis thaliana*, llamado *APOLO*, fue caracterizado por su rol en la determinación dinámica de la conformación tridimensional de la cromatina, teniendo un impacto en la regulación de la expresión de su gen vecino, llamado *PID*⁶. La conformación tridimensional de la cromatina, también llamada topología del genoma, empieza a ser considerada como

una característica clave en la regulación de la expresión de los genes. Para tomar una dimensión de la relevancia de la organización tridimensional de la información genética en el núcleo de una célula, un autor propuso comparar un núcleo con una pelota de tenis⁷. Dado que el núcleo de una célula humana mide unas 6 micras de diámetro y contiene 2 m lineales de ADN, entonces de tener el núcleo el tamaño de una pelota de tenis, el ADN de una única célula alcanzaría para unir las ciudades de Santa Fe y Esperanza. Esto significa que el enrollamiento y empaquetamiento del ADN en cromatina y su distribución en el núcleo celular debe ser extremadamente controlada para que en cada tipo celular se exprese el subgrupo de genes apropiado, y que además esta organización cambie de manera coordinada ante un estímulo externo o interno del organismo⁸. Se destaca el interés creciente en conocer la topología del genoma, pero al mismo tiempo, se hace evidente también la necesidad de entender el rol evolutivo de estos mecanismos de regulación de la expresión génica, y cómo su dinámica puede asistir a dilucidar la diversidad existente.

METODOLOGÍA

Mediante búsqueda de tipo BLAST consultando la base de datos de www.phytozome.net, fueron identificados los loci que potencialmente codifiquen ARNs largos no codificantes de alta homología de secuencia con *APOLO*, en diferentes especies de la familia de las Brassicaceas. Las secuencias encontradas fueron alineadas usando diferentes métodos (CLUSTAL W y MUSCLE)⁹.

Se pidieron semillas de seis especies de la familia de las Brassicaceas al Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC): *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella*, *Cardamine hirsuta*, *Eutrema salsugineum* y *Arabidopsis lyrata*. Las semillas recibidas fueron cultivadas en condiciones controladas para amplificar la cantidad de semillas para futuros experimentos.

Se tomaron muestras de hojas de todas aquellas especies que germinaron. En función de los análisis bioinformáticos, actualmente estamos realizando extracciones de ARN y/o ADN con el fin de verificar las secuencias genómicas y determinar si el potencial ARN verdaderamente se expresa.

RESULTADOS

Los análisis bioinformáticos preliminares indican que existen secuencias de alta homología a *APOLO* de *Arabidopsis thaliana*, en otras especies de la familia de las Brassicaceas, incluyendo no sólo aquellas de las que contamos con material biológico, sino de otras tales como *Arabidopsis halleri* y *Capsella grandiflora*.

De las semillas recibidas del ABRC, sólo logramos hacer germinar cinco especies de las seis. Actualmente se encuentran en diferentes etapas del desarrollo. Hemos comenzado con las extracciones de ADN y ARN con protocolos clásicos de *Arabidopsis thaliana*, con resultados exitosos. Hemos podido amplificar algunas regiones para la verificación de las secuencias genómicas, y comenzaremos próximamente con los análisis de la expresión de los potenciales *APOLO* en cada especie en la que lo hayamos encontrado.

PERSPECTIVAS

Cuando hayamos cosechado las semillas de cada especie, procederemos a analizar la expresión de los potenciales ARNs largos no codificantes en los diferentes órganos, tanto en condiciones basales como en respuesta a tratamientos hormonales

y de estrés abiótico.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. **Eddy, S.R.** (2012) The C-value paradox, junk DNA and ENCODE. *Current Biology* 22, 898–899 2
2. **Birney, E. et al.** (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816 3
3. **Yamada, K. et al.** (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. *Science* 302, 842–846
4. **Achkar, N.P. et al.** (2016) miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science* 21, 1034-1044.
5. **Ariel, F. et al.** (2015) Battles and hijacks: noncoding transcription in plants. *Trends in Plant Science* 20, 362-71
6. **Ariel, F. et al.** (2014) Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell* 55, 383–396
7. **Alberts B., et al.** (2002) Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition (Garland Science, ISBN: 9780815341055).
8. **Rodríguez-Granados et al.** (2016) Put your 3D glasses on: plant chromatin is on show. *Journal of Experimental Botany* 67, 3205-21
9. **Kumar, S. et al.**, 2016. Mega7: Molecular Evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-74