



## **CARACTERIZACIÓN DE REPETICIONES INVERTIDAS DE ORIGEN TRANSPOSÓNICO REGULADORAS DE LA TOPOLOGÍA DEL GENOMA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**Houriet, Candela**

*Instituto de Agrobiotecnología del Litoral*

*Director: Agustín Lucas Arce*

*Co-Directora: Regina Mencía*

*Área: Ciencias Biológicas*

Palabras claves: ABI4, elementos transposónicos, cromatina

### **INTRODUCCIÓN**

La expresión génica se encuentra regulada en todos los niveles del proceso, desde la síntesis del ARNm hasta la producción de proteínas. Un importante punto de control está asociado a la conformación tridimensional de la cromatina. La cromatina es la asociación entre el ADN y proteínas histonas que le permiten, a pesar de su longitud, entrar dentro del núcleo. Una estructura interesante que adopta la cromatina son los loops o bucles, ya que tienen la particularidad de permitir la interacción de elementos que en la secuencia lineal se encuentran distantes (Huang et al., 2020; Gagliardi and Manavella, 2020).

Tanto el ADN como las histonas pueden ser marcados epigenéticamente regulando el grado de compactación de la cromatina además de otros procesos. Algunas de las marcas epigenéticas involucran metilaciones las cuales son centrales en el control de los elementos transponibles (TEs). Los genomas de las plantas son particularmente ricos en TEs que tienen la capacidad de “saltar” e insertarse en nuevos sitios de la hebra de ADN. Los TEs son generalmente activados como consecuencia de la exposición al estrés y otros estímulos ambientales (Dubin et al., 2018). Para proteger la integridad del genoma, las células vegetales mantienen los TEs silenciados mediante la vía de metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM, Matzke et al., 2015). Esta metilación lleva a la condensación de los nucleosomas, compactación de la cromatina y el consecuente silenciamiento de la región. El 20% del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* contiene TEs y otros elementos repetitivos y, sorprendentemente, muchos de ellos se encuentran cercanos a genes codificantes (Ahmed et al., 2011). Muchos tipos de TEs contienen repeticiones invertidas (IRs), que les proveen la capacidad de producir siRNAs de 24 nts a partir de un ARN con estructura de hairpin, en una manera dependiente de la ARN polimerasa II y, de esa forma, inducir la metilación del ADN (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016). Sorprendentemente, se han encontrado IRs cercanos a genes que actúan regulando su expresión, ya sea positiva o negativamente y en algunos casos involucrando la formación de loops de cromatina (Arce et al., 2023; Gagliardi et al., 2019).

En un trabajo anterior (Arce et al., 2023) se identificaron IRs dentro del genoma de *Arabidopsis* cercanos a genes que codifican proteínas y se analizaron los siRNAs (sRNAseq), la expresión génica (RNA-Seq), la metilación del ADN (BS-Seq) y el cambio de conformación de la cromatina (Capture-C). En el presente trabajo y con el fin de profundizar en el rol regulador

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

de los IRs, se utilizó la información previamente obtenida para seleccionar genes que podrían estar siendo regulados por los IRs y se realizaron diversos ensayos para analizar su comportamiento.

## OBJETIVOS

Caracterizar repeticiones invertidas de origen transposónico capaces de regular la expresión génica mediante la regulación de la estructura tridimensional de la cromatina, utilizando diferentes metodologías experimentales y bioinformáticas.

## METODOLOGÍA

Se utilizó el lenguaje de programación R, dentro del entorno Rstudio, para realizar un análisis y filtrado de datos sobre los IRs y los genes cercanos. Se consideró la variación de la expresión génica, de los niveles de sRNAs, de la metilación del ADN y de conformación tridimensional de la cromatina en los loci. Este análisis se hizo comparando la variedad de referencia, Col-0, con mutantes de la vía de RdDM, otras variedades de *Arabidopsis thaliana*, y diversas características de genes ubicados cercanos a los IRs. En base a toda esta información, se seleccionaron genes de interés para luego analizar su comportamiento experimentalmente. Para el análisis y visualización de los datos también se utilizaron programas como: Integrative Genomics Viewer (IGV), Integrated Genome Browser (IGB) y SnapGene.

Se seleccionaron y encargaron las variedades naturales de *Arabidopsis* con variaciones en la presencia de IRs y plantas mutantes por T-DNA y sobreexpresantes para el estudio de los genes. Las distintas semillas fueron cultivadas en tierra y genotipadas mediante PCR utilizando primers específicos.

Se realizaron análisis de nivel de transcripto mediante RT-qPCR. Se partió de ARN extraído de hojas de plantas adultas al cual se le realizó una retrotranscripción utilizando oligos dT y retrotranscriptasa reversa. El ADNc obtenido fue el material con el que se realizó la PCR cuantitativa (qPCR). Además, en la reacción de qPCR se utilizaron oligonucleótidos que hibridan sobre los genes a analizar, los cuales fueron diseñados utilizando el programa QuantPrime. Como Housekeeping se utilizó la actina.

Para uno de los genes seleccionados, ABI4, se realizó un ensayo de floración en el cual se monitoreó el número de hojas y la altura del tallo en diferentes tiempos en distintos genotipos crecidos en condiciones de crecimiento controladas de día largo.

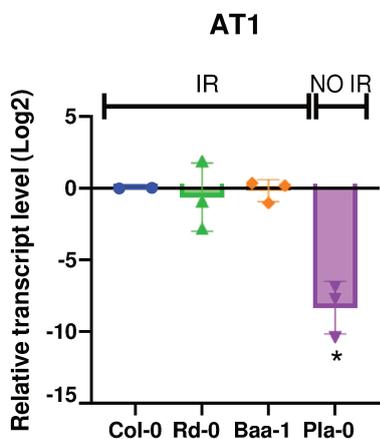
Debido al rol preponderante que tiene ABI4 en la germinación, se usó la hormona ABA, que actúa inhibiendo la germinación, para evaluar la sensibilidad de las plantas al tratamiento. Se evaluó el tiempo de germinación de las distintas variantes que se tienen para analizar el comportamiento del gen ABI4. Para ello, se sembraron semillas de cada variante previamente esterilizadas, en placas con agar MS suplementado con 0,5% de sacarosa y con distintas concentraciones de la hormona ABA. Se incubaron en oscuridad y se comenzó el ensayo al transferirlas a cámara de cultivo controlada de día largo. Cada 24 hs se realizó el conteo de semillas germinadas.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

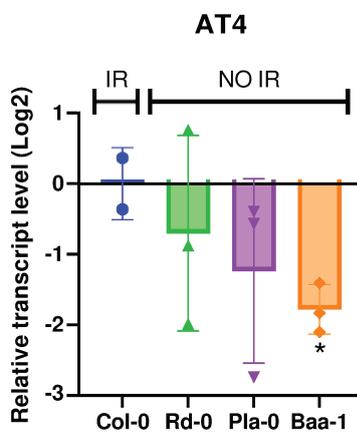
Para el filtrado y selección de genes se tuvieron en cuenta aquellos para los que se observaba mayor cambio de expresión, mayor cambio en la estructura de la cromatina y relevancia en base a la cantidad de publicaciones asociadas al gen. Finalmente, los genes seleccionados para su estudio fueron: AT1G57630 (Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein, abreviación: AT1), AT4G19520 (disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family, abreviación: AT4) y AT2G40220 (ABI4: ABA insensitive 4). Los dos primeros genes

corresponden a genes de respuesta a patógenos y el tercero es un gen de respuesta a la hormona ABA.

Para el estudio de los genes seleccionados se adquirieron las siguientes variedades naturales de Arabidopsis: Baa-1, Rd-0 y Pla-0. El IR cercano al gen AT1 falta en la variedad Pla-0 y el



**Figura 1:** Niveles relativos de transcripción del gen AT1G57630 para las distintas variantes de Arabidopsis evaluadas.



**Figura 2:** Niveles relativos de transcripción del gen AT4G19520 para las distintas variantes de Arabidopsis evaluadas.

IR cercano al gen AT4 falta en todas las variedades (excepto en Col-0). Para el gen de ABI4 se obtuvieron plantas de Arabidopsis mutantes por T-DNA en el IR cercano y sobreexpresantes de este IR, estas últimas se llamaron Rm01 13, Rm01 15 y Rm01 16. Además, se adquirió una

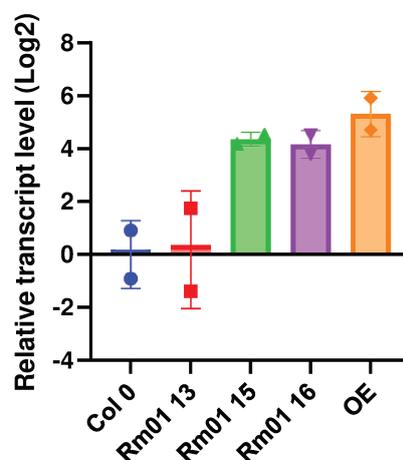
versión sobreexpresante de ABI4 (OE: over expressed). Todas las plantas que se utilizaron fueron genotipadas exitosamente.

El análisis de nivel de transcripción permitió observar que la presencia de los respectivos IRs en las cercanías de los genes AT1G57630 y AT4G19520 parecen provocar una disminución en la transcripción de dichos genes, regulándolos negativamente (Fig. 1 y 2).

Para el caso de ABI4, las plantas sobreexpresantes del IR cercano al gen mostraron un comportamiento similar a la planta sobreexpresante del gen, por lo que, en este caso, el gen podría estar siendo regulado positivamente (Fig. 3).

En los análisis de fenotipo y germinación se observaron diferencias en el crecimiento de las distintas variantes, lo que inicialmente indica que podría haber una regulación causada por la expresión constitutiva del IR cercano.

Nuestros resultados apuntan a la existencia de una regulación transcripcional de los genes en estudio causada por la presencia de los IRs. Es de nuestro interés seguir profundizando el análisis del mecanismo por el cual podrían estar actuando.



**Figura 3:** Niveles relativos de transcripción del gen de ABI4 para las distintas mutantes evaluadas.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Huang, Y., Rodriguez-Granados, N. Y., Latrasse, D., Raynaud, C., Benhamed, M., & Ramirez- Prado, J. S. 2020. The matrix revolutions: towards the decoding of the plant chromatin three-dimensional reality. *Journal of Experimental Botany*, 71(17), 5129-5147.

**Gagliardi, D., & Manavella, P. A.** 2020. Short-range regulatory chromatin loops in plants. *New Phytologist*, 228(2), 466-471.

**Dubin, M.J., Mittelsten Scheid, O., and Becker, C.** 2018. Transposons: a blessing curse. *Curr Opin Plant Biol* 42, 23-29. 10.1016/j.pbi.2018.01.003.

**Matzke, M.A., Kanno, T., and Matzke, A.J.** 2015. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants

**Ahmed, I., Sarazin, A., Bowler, C., Colot, V., & Quesneville, H.** 2011. Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research*, 39(16), 6919-6931.

**Cuerda-Gil, D., & Slotkin, R. K.** 2016. Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nature plants*, 2(11), 1-8.

**Gagliardi, D., Cambiagno, D.A., Arce, A.L., Tomassi, A.H., Giacomelli, J.I., Ariel, F.D., and Manavella, P.A.** 2019. Dynamic regulation of chromatin topology and transcription by inverted repeat-derived small RNAs in sunflower. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 17578-17583. 10.1073/pnas.1903131116.

**Arce, A. L., Mencia, R., Cambiagno, D. A., Lang, P. L., Liu, C., Burbano, H. A., ... & Manavella, P. A.** 2023. Polymorphic inverted repeats near coding genes impact chromatin topology and phenotypic traits in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Reports*, 42(1).

