

## MANIPULACIÓN DE LAS VÍAS DE REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS DE MICROARNs PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS CON MAYOR TOLERANCIA A SITUACIONES DE ESTRÉS

Gagliardi Delfina

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral UNL-CONICET. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL

**Área:** Ciencias Biológicas

**Sub-Área:** Biotecnología

**Grupo:** Y

**Palabras clave:** microARN, estrés, silenciamiento génico.

### INTRODUCCIÓN

La subsistencia de las plantas depende de la regulación rápida y precisa de la expresión génica, esto es fundamental para que su fisiología sea capaz de adaptarse a los cambios en el ambiente donde se desarrollan. Estos cambios pueden ser de tipo abiótico, como cambios de temperatura, luz, o salinidad del suelo, o también de tipo biótico, como el ataque por insectos o por patógenos bacterianos o fúngicos. El estrés abiótico provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento de la planta y a su productividad.

La regulación de la expresión génica ocurre a nivel transcripcional y post-transcripcional. En este último se incluye al silenciamiento mediado por microARNs (miARNs). En las plantas, estas moléculas de ~21 nucleótidos de largo actúan reconociendo, por complementariedad de secuencias, a ARN mensajeros (ARNm) de genes blanco, disparando su silenciamiento por degradación de éstos. En primer lugar, son transcritos por la ARN polimerasa II, y se le adiciona el capuchón y la cola de poli A. Esto genera un transcrito primario del miARN llamado pri-miARN, con una estructura de tallo bucle característica, reconocida por la ribonucleasa DICER LIKE 1 (DCL-1) que, con la ayuda de proteínas de unión a ARN bicatenario (*dsRNA-binding proteins*: DRB) como HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL) y SERRATE (SE), generan dos etapas de corte dando origen al precursor de miARN (pre-miARN) y por último la liberación del miARN y de su fragmento opuesto (miARN\*), formando una molécula de ARN doble hebra de 21 nts. El dúplex miARN/miARN\* es estabilizado por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1), la cual deposita grupos metilo en los extremos 3' de ambas hebras, previniendo la uridilación y consecuente degradación de la molécula de miARN. El miARN maduro es exportado al citoplasma de la célula y la hebra guía del dúplex de miARN es incorporada en un complejo de silenciamiento denominado RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) y la hebra de miARN\* es degradada. El componente central del complejo RISC es la proteína ARGONAUTE 1 (AGO1). Una vez ensamblado, el complejo AGO1-miARN reconoce un ARNm blanco por complementariedad de secuencias y dispara su silenciamiento.

En el laboratorio donde se realizó este trabajo se estudia de qué manera es regulada la maquinaria de biosíntesis de miARNs. Y cómo esa regulación de la maquinaria está relacionada con el desarrollo de las plantas en diferentes ambientes y ante distintas condiciones de estrés. En un trabajo publicado recientemente por miembros del Laboratorio de Biología del ARN Pequeño, se ha descrito que la desfosforilación de HYL1 por CPL1 es necesaria para la actividad de esta proteína (Manavella y col.,

2012). Un hecho interesante que se observa es que ambos estados de fosforilación de HYL1 parecen coexistir, varían en diferentes condiciones y afectan la localización de la proteína (Manavella y col., 2012) y además, el estado de fosforilación de HYL1, y por ende su actividad, podría ser regulada en condiciones de estrés.

En las respuestas al estrés participan las hormonas vegetales. Éstas son moléculas encargadas de transmitir señales de una célula a otra, de un tejido a otro e incluso de un organismo a otro. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía de la conexión entre las vías de las hormonas y la regulación de la expresión génica, incluyendo las vías de silenciamiento mediado por microARNs (miARNs). Por ejemplo, la modulación de los niveles del miR159 durante el desarrollo de las anteras por parte del ácido giberélico (Achar y col., 2004). Además, dentro de los blancos predichos para distintos miARNs, se incluyen distintos ARN mensajeros (ARNm) involucrados en respuestas hormonales tales como aquellos que codifican para factores de respuesta a auxinas, por ejemplo TIR1 (Rhoades y col., 2002; Sunkar and Zhu, 2004).

En este proyecto, planteamos una estrategia novedosa donde se pretendió estudiar qué efectos directos tienen diferentes condiciones de estrés u hormonas importantes en dichas condiciones sobre la biosíntesis de miARNs. En este sentido se proyecta utilizar la maquinaria endógena de la planta para amortiguar los efectos deletéreos que puedan tener las condiciones estresantes sobre la planta. Mediante el empleo de herramientas de ingeniería genética y biología molecular, se analizó el estado de fosforilación de HYL1 durante condiciones de estrés determinadas, lo que podría potencialmente permitirle a la planta “ignorar” condiciones de estrés pasajeras, frenando una respuesta no beneficiosa a los fines productivos.

### OBJETIVOS

Nos propusimos identificar condiciones de estrés que induzcan la activación o represión mediada por fosforilación de la proteína de biosíntesis de miARNs “HYL1”. Usando ese conocimiento, planteamos obtener y analizar plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresen, temporalmente bajo condiciones de estrés, la versión hiperactivada de HYL1 mitigando así los efectos de la reducción en la producción de miARNs en estas condiciones.

### METODOLOGÍA

**1-Evaluación de la expresión de HYL1 en plantas tratadas con distintas hormonas o sometidas a distintos tipos de estrés:** Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Columbia (Col-0), sembradas en placas Petri que contenían medio MS 0,5X (Murashige y Skoog, 1962) y 0,6% (p/v) agar. Para los distintos tratamientos, se emplearon plantas de 10 días, las cuales fueron dispuestas en medio MS líquido. **Tratamientos:** Oscuridad (24 hs); frío (4°C-12 hs) /Calor (37°C-12 hs); hormonas (Ácido abscísico, Metil Jasmonato, Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, Ácido salicílico, Ácido indolacético, Ácido giberélico, 6-bencilaminopurina); estrés osmótico con Polietilenglicol (PEG) 4X; cicloheximida (inhibidor de la traducción); controles (sin tratamiento). Luego de haber realizado los distintos tratamientos, se recogieron muestras, rápidamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido, almacenadas a - 80° C hasta su procesamiento. **Extracción de proteínas:** Se procesó tejido congelado se adicionó buffer de extracción de proteínas. Se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante y se determinó la concentración proteica. **Separación proteica y Western blot. Preparación del gel:** Se prepara, en primer lugar, el gel de separación. Se cubre el gel con isopropanol y se espera hasta que el mismo esté completamente polimerizado. Posteriormente se prepara el gel de apilamiento y se dispone hasta que el gel esté completamente polimerizado. **Preparación de muestras:** Se emplean 20-40 µg de proteína total. Luego se agregan Buffer Laemmli 5X y se calientan las muestras durante 5 minutos a 95°C. Se lleva a temperatura ambiente y se siembra. **SDS-PAGE:** Se siembran las muestras en el gel. Además, se siembran marcador de peso molecular. La corrida

electroforética se realiza en buffer de corrida durante 30 minutos a 80 V, 60 mA y luego a 120 V, 120 mA hasta la caída del marcador del frente de corrida.

**Transferencia de proteínas a la membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF):**

Se equilibran los geles en buffer de transferencia 1X y se activa la membrana de PVDF con metanol. La transferencia se realiza con un sistema de tanque húmedo a 60 V, 180 mA, durante 2 horas. Posteriormente, se bloquea el espacio libre de la membrana con solución de bloqueo toda la noche. A continuación, se sumerge la membrana en buffer de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario policlonal de conejo específico para HYL1 (Agrisera) durante dos horas y en agitación. Se realizan tres lavados de la membrana en TBS-TWEEN. Luego se sumerge la membrana en solución de bloqueo conteniendo el anticuerpo secundario fusionado a Peroxidasa de Rábano Picante (Agrisera) durante una hora en agitación. Por último se realiza la inmunodetección en un equipo para tal fin (C-digit marca LI-COR), utilizando Luminol Enhancer Solution y Peroxide Solution (Amersham™ ECL™ Prime Western Blot/Western blotting Detection Reagent) como sustratos luminiscentes.

**2-Análisis del efecto de la luz y temperatura sobre la expresión y abundancia de HYL1:**

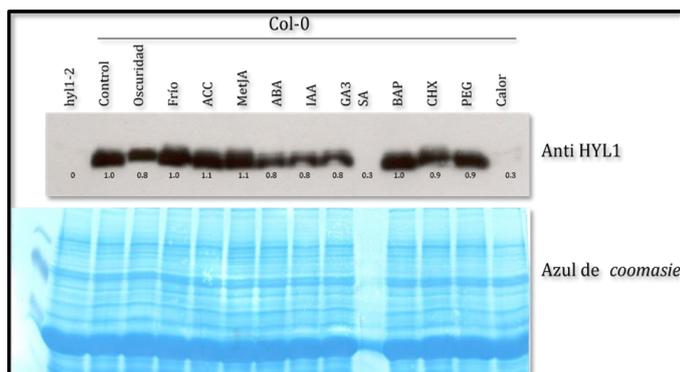
Se realizó una cinética, tomando muestras de plantas ecotipo col-0 a distintos tiempos. Se evaluaron los niveles de proteína HYL1 en estas muestras, para lo cual fue realizado un *Western blot*, como se describió anteriormente. Para cuantificar los niveles de transcripto de la proteína HYL1, se empleó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). ARN total fue purificado a partir de plántulas de 10 días empleando el reactivo de TRIZOL® y se procedió con la reacción de retrotranscripción. Brevemente, a 1 µg de ARN total se agregó oligo (dT) y enzima transcriptasa reversa II M-MLV (Promega). Los niveles de ARNm fueron cuantificados por qPCR utilizando al gen de actina como normalizador.

**3- Obtención de plantas que expresan versiones activas e inactivas de HYL1:**

Se utilizaron plásmidos binarios conteniendo “fosfo-mimics” de HYL1 (disponibles en el laboratorio). Estas construcciones mutantes de HYL1 tienen sus serinas fosforilables remplazadas por alaninas o ácido aspártico. Debido a la similitud estructural y físico-química entre una serina y una alanina, y dado que esta última no puede ser fosforilada, este tipo de mutante emula a la versión no-fosforilada de HYL1. Por otro lado, la carga presente en el ácido aspártico imita a una serina fosforilada. Al transformar plantas con estas construcciones se busca generar por un lado una mutante que presenta constitutivamente las características de HYL1 en su estado fosforilado (fosfo-mimic Asp) y por otro lado una mutante que tendría a HYL1 siempre desfosforilado (fosfo-mimic Ala). Los vectores en cuestión, fueron empleados para la transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*, mediante el método de inmersión floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, descrito por Clough y Bent (1998). Esperamos obtener en los próximos meses plantas estables homocigotas en estas construcciones.

## RESULTADOS

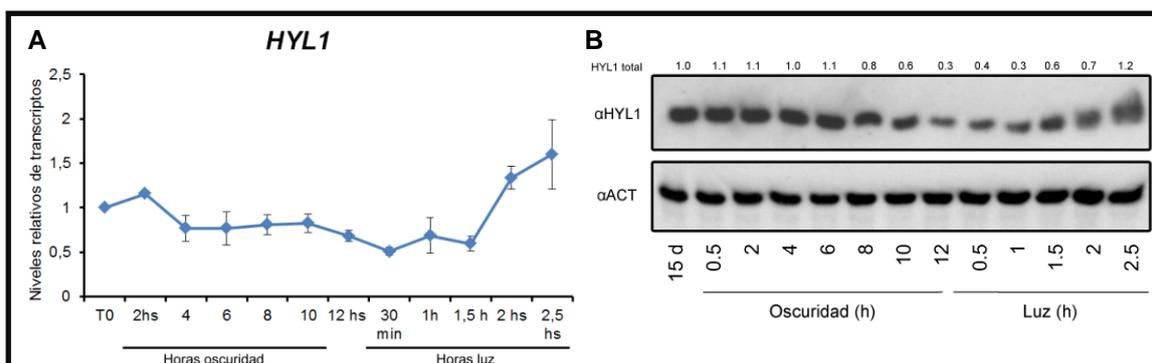
1-



**Figura 1:** *Western blot* correspondiente a las muestras obtenidas luego de aplicar los tratamientos descriptos.

De acuerdo a lo obtenido en la **Figura 1**, puede concluirse que en el tratamiento con calor, como se observa en el panel inferior (Azul de *coomasie*), la extracción de proteínas totales fue eficiente, sin embargo, la expresión de HYL1 es muy baja o prácticamente indetectable bajo estas condiciones. Respecto de los tratamientos restantes, ABA, IAA, GA3 y oscuridad provocan una disminución en los niveles de HYL1 en comparación con el control utilizado para el ensayo. Por último, en lo referido a los demás tratamientos, puede destacarse que en aquellas plántulas que fueron sometidas a tratamiento con frío, ACC y MetJA, la expresión de HYL1 es mayor respecto del control. Esto convirtió a los factores nombrados, en objetos de estudio para el equipo de trabajo que desarrolló el proyecto de investigación.

2-



**Figura 2A.** RT-qPCR de muestras de plantas Col-0 tomadas a distintos tiempos. **Figura 2B.** Western blot de muestras de plantas Col-0 tomadas a distintos tiempos.

De acuerdo a los resultados obtenidos que se observan en la **Figura 2A**, se observa que durante la noche (horas de oscuridad) y las primeras horas del día no hay cambios significativos en los niveles de expresión transcripcional de *HYL1*. Recién a las 2 – 2,5 horas de luz hay un pequeño incremento transcripcional.

En cuanto a la **Figura 2B**, se observa un claro decaimiento de la proteína HYL1 a medida que transcurre la noche. Mientras que, a las 1,5 hs puede observarse un aumento en la cantidad de proteína en cuestión.

Podemos concluir diciendo que existe una *regulación post-transcripcional de HYL1*, mediada por oscuridad. El mecanismo por el cual ocurre esta regulación, se desconoce hasta el momento, por lo tanto se encuentra actualmente en estudio.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. and Harberd, N.P.**, 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 131, 3357–3365.

**Clough Steven J. y Bent Andrew F.**, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16(6), 735–743.

**Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., y Weigel, D.**, 2012. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* 151, 859-870.

**Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. y Bartel, D.P.**, 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110, 513–520.

**Sunkar, R. y Zhu, J.K.**, 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2001–2019.

**Olivier Voinnet.**, 2009. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* 136, 669–687.

**Toshio Murashige y Folke Skoog**, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.