



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Búsqueda de modificadores
del fenotipo morfológico
de un mutante *argonaute1* viable**

Verónica Aguilera Díaz
Elche, 2009

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor llevada a cabo por la Licenciada Verónica Aguilera Díaz para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

María Rosa Ponce Molet

José Luis Micol Molina

Elche, 1 de septiembre de 2009.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Aunque en los primeros modelos de regulación de la expresión génica se propuso la existencia de ARN represores (Jacob y Monod, 1961) y activadores (Britten y Davidson, 1969), se acepta generalmente en nuestros días que las moléculas reguladoras más habituales son proteínas: los factores de transcripción. Sin embargo, a lo largo de los últimos quince años se ha demostrado o predicho que existen centenares, probablemente miles, de genes eucarióticos regulados negativamente por microARN (miARN; Lee *et al.*, 1993), moléculas monocatenarias de unos 22 nt de longitud que inducen la degradación y/o la atenuación de la traducción de sus ARNm diana, con los que hibridan por complementariedad, procesos que suceden en el citoplasma, en complejos ribonucleoproteicos denominados RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*).

En el laboratorio de J.L. Micol se obtuvo una colección de varios cientos de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología foliar, 41 de los cuales fueron denominados *incurvata* (*icu*), ya que presentaban hojas recurvadas hacia el haz, a diferencia de las silvestres, que son casi totalmente planas. La clonación posicional en el laboratorio de M.R. Ponce de las mutaciones *icu3*, *icu8*, *icu9-1*, *icu9-2* e *icu15*, cuyo fenotipo era pleiotrópico, reveló que eran nuevos alelos hipomorfos o nulos de los genes *HASTY* (*HST*; Telfer y Poethig, 1998), *HYPONASTIC LEAVES1* (*HYL1*; Lu y Fedoroff, 2000), *ARGONAUTE1* (*AGO1*; Bohmert *et al.*, 1998) y *HUA ENHANCER1* (*HEN1*; Chen *et al.*, 2002), respectivamente. Los productos de estos genes son elementos clave de la ruta de los miARN (Park *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004).

Con la intención de contribuir a una mejor comprensión del papel de los miARN en la regulación de la expresión génica en las plantas, los mutantes descritos en el párrafo anterior, cuya denominación pasó a ser *hst-21*, *hyl1-12*, *ago1-51*, *ago1-52* y *hen1-13*, fueron estudiados, junto con *dcl1-9* (*dicer-like1-9*; Jacobsen *et al.*, 1999), en el laboratorio de M.R. Ponce. Hemos completado en esta Tesis sus análisis morfológicos e histológicos, concluyendo que la ruta de los miARN está implicada en la especificación de la proximodistalidad y confirmando su papel en la formación del patrón de venación de las hojas vegetativas de *Arabidopsis thaliana*.

El análisis comparativo de los transcriptomas de *hst-21*, *hyl1-12*, *ago1-52*, *hen1-13* y *dcl1-9*, realizado antes del comienzo de esta Tesis en el laboratorio de M.R. Ponce, reveló que algunos de los genes desreprimidos en estos mutantes eran dianas conocidas de los miARN. Se obtuvieron también sus combinaciones dobles mutantes, todas las cuales manifestaron un fenotipo sinérgico (Jover-Gil *et al.*, 2005). Estas observaciones

nos hicieron suponer que las mutaciones de insuficiencia de función en *HST*, *HYL1*, *AGO1*, *HEN1* o *DCL1* proporcionarían un fondo genético sensibilizado que resultaría útil para llevar a cabo una mutagénesis con el propósito de identificar nuevos genes implicados en la ruta de los miARN. Nuestra hipótesis de partida consistió en suponer que la aparición de sinergia, epistasia o supresión en una población derivada de una mutagénesis realizada sobre un mutante *hst*, *hyl1*, *ago1*, *hen1* o *dcl1* constituiría un indicio de que la segunda mutación afectaba a un gen relacionado funcionalmente con el primero y, en consecuencia, con la ruta de los miARN.

De los cuatro genes cuya implicación en la ruta de los miARN se conocía al iniciarse esta Tesis, consideramos más importante a uno de ellos: *AGO1*, de cuyo producto depende la actividad ribonucleasa del RISC. Elegimos para nuestra mutagénesis la mutación hipomorfa *ago1-52*, que elimina 55 aa del extremo carboxilo de la proteína *AGO1*, causa un fenotipo morfológico débil aunque inequívocamente distinguible del silvestre, y reduce sólo parcialmente la viabilidad y la fertilidad. Optamos por el metanosulfonato de etilo (EMS) por su gran mutagenicidad, superior a la de los mutágenos físicos o insercionales, y su capacidad de generar alelos puntuales hipomorfos, usualmente más viables que los nulos.

La mutagénesis con EMS de unas 60.000 semillas M_1 *ago1-52* resultó fructífera, ya que sometimos a escrutinio 36.810 semillas de su progenie M_2 e identificamos 4.189 presuntos dobles mutantes en los que el fenotipo de *ago1-52* se debilitaba o acentuaba, o manifestaban rasgos inesperados. 3.133 de ellos resultaron estériles o letales y mostraron un fenotipo muy severo, similar al de los dobles mutantes previamente obtenidos combinando alelos de genes de la maquinaria de los miARN. Sólo 302 de las plantas M_2 seleccionadas resultaron viables y fértiles, de las que 92 transmitieron su fenotipo a su descendencia M_3 con penetrancia completa y expresividad poco variable. El mayor número de presuntos dobles mutantes M_2 viables y fértiles se encontró en la clase en la que el fenotipo de *ago1-52* se suprimió parcialmente.

Nos hemos centrado en el estudio de las 17 líneas que mostraron mayor supresión, a cuyas mutaciones hemos denominado *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed). Hemos iniciado la clonación posicional de 5 mutaciones *mas*, completándola para 3 de ellas, ninguna de las cuales manifiesta fenotipo mutante por sí misma en presencia del alelo silvestre del gen *AGO1*. El análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares, realizado genotipando plantas F_2 de las poblaciones cartográficas obtenidas, nos permitió definir intervalos candidatos de 42 genes para la

mutación *mas1-1*, 39 para *mas2-1*, y 94 para *mas3-1* (180, 158 y 396 kb, respectivamente).

Hemos identificado dos de los genes supresores *MAS* gracias al análisis del promotor de *AGO1*, en el que hemos encontrado elementos de respuesta al choque térmico (HSR; *Heat Shock Response*) y al estrés producido por la presencia en el retículo endoplásmico (RE) de proteínas mal plegadas (UPR; *Unfolded Protein Response*; Malhotra y Kaufman, 2007). Sólo en uno de los genes del intervalo candidato a contener a *MAS1*, y en otro del de *MAS2*, hemos encontrado elementos reguladores comunes a los de *AGO1*. Su secuenciación reveló la presencia de una mutación puntual en ambos.

MAS1 codifica la proteína de procesamiento vacuolar VPE α (α VACUOLAR PROCESSING ENZYME), que pertenece a la familia de las proteasas de cisteína, también conocidas como endopeptidasas de asparaginas. Las VPE participan en las plantas en la muerte celular programada, que es llevada a cabo mediante colapso de las vacuolas (Hara-Nishimura *et al.*, 2005). Este proceso forma parte del desarrollo vegetal normal y se manifiesta durante la formación del xilema, la embriogénesis, el desarrollo de las semillas y la senescencia de los tejidos (Pennell y Lamb, 1997). El alelo *mas1-1* presenta una transición G \rightarrow A en su séptimo exón, que se traduce en un cambio de arginina a lisina en la posición 360 de la VPE α , que probablemente altera la autoinhibición de esta proteína o el procesamiento de su precursor inactivo.

MAS2 es un gen sin parálogos que codifica una proteína de función desconocida, que presenta un 47, 44, y 39% de identidad con las NKAP [NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) Activating Proteins] de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Brachydanio rerio*, respectivamente. Su alelo *mas2-1* es portador de una transición G \rightarrow A, que causa una sustitución de alanina por treonina en el dominio conservado DUF926, de función desconocida. Algunos componentes de las rutas de señalización que activan a NF- κ B promueven la transcripción de genes que codifican sensores transmembrana del estrés del RE o que participan en la apoptosis (Malhotra y Kaufman, 2007). Por analogía, proponemos la implicación de *MAS2* en las respuestas al estrés del RE.

La identificación de *MAS3* ha sido posible gracias a la relación de su ortólogo humano con el de *MAS2*. Tras analizar los promotores de los genes candidatos a ser *MAS3*, no encontramos ningún elemento regulador común a los previamente identificados en *AGO1* u otros genes de la maquinaria de los miARN. Buscamos a continuación los homólogos de los genes candidatos, y averiguamos que el ortólogo humano de uno de ellos es *ZNF216*, cuyo producto es un inhibidor de la activación del NF- κ B (Huang *et al.*, 2004). El alelo *mas3-1* presenta una transición C \rightarrow T en su región 5' no traducida, que no

modifica la secuencia de su producto proteico pero podría incrementar o reducir su transcripción. El producto de *MAS3* es la proteína SAP7 (STRESS ASSOCIATED PROTEIN7; Vij y Tyagi, 2006), que contiene dos dominios de dedos de zinc conservados, A20 y AN1. Las proteínas con estos dominios están implicadas en las respuestas de las plantas a diversos estreses abióticos como las bajas temperaturas, la deshidratación y el estrés salino, aunque se desconoce su mecanismo molecular de acción (Vij y Tyagi, 2008).

Se acepta generalmente que el fenotipo pleiotrópico de los mutantes *ago1* se debe a la alteración de muchos procesos biológicos, aquéllos en los que participan los numerosos genes que están regulados directa o indirectamente por los miARN. En consecuencia, puede parecer sorprendente que hayamos obtenido dobles mutantes *ago1-52 mas* cuyo fenotipo morfológico se acerca notablemente al del tipo silvestre. Debe tenerse en cuenta a este respecto que la insuficiencia de la función del gen *AGO1* que padecen los mutantes hipomorfos y nulos *ago1* causa la desrepresión de los genes diana de los miARN, que se manifiesta no sólo en un incremento de sus ARNm, sino también de sus productos proteicos. Aunque se cree que son unas 500 las dianas de los miARN en *Arabidopsis thaliana*, lo que correspondería a un 2% de sus genes (Wang *et al.*, 2004), este valor podría haberse subestimado, ya que en la especie humana asciende a la insólita cantidad del 30% (Xie *et al.*, 2005). Es por tanto razonable suponer que el fenotipo de los mutantes *ago1* se deba al menos en parte a la acumulación de proteínas en todos sus tejidos y etapas de desarrollo.

La naturaleza molecular de los genes *MAS* sugiere que su función silvestre es contribuir a reducir el estrés que el exceso de proteínas causa al RE. La presencia de elementos de UPR y HSR en los promotores de *AGO1*, *MAS1* y *MAS2* apoya esta hipótesis e indica además que están corregulados. De ser cierta esta propuesta, las mutaciones *mas* serían de ganancia de función y reducirían el exceso de proteínas que en nuestra opinión padece *ago1-52*. Por el contrario, si las funciones de los genes *MAS* fueran antagónicas de la de *AGO1*, las mutaciones *mas* deberían ser hipomorfos o nulos. En ambos casos las mutaciones *mas* suprimirían el fenotipo de *ago1-52*. Se deriva de lo propuesto en este párrafo y el anterior que no sólo los genes *MAS*, sino también *AGO1*, y por tanto la ruta de los miARN, están implicados en las respuestas al estrés del RE y pudieran estarlo en la muerte celular programada.