



Universidad Miguel Hernández de Elche

**El gen *MAS2* de *Arabidopsis*  
es esencial, codifica una proteína ortóloga de las  
NKAP animales y participa en el silenciamiento del  
ADN ribosómico 45S**

Ana Belén Sánchez García  
Elche, 2016

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Ana Belén Sánchez García para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

María Rosa Ponce Molet

Elche, 24 de junio de 2016.

## II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Una parte importante de la regulación de la expresión de muchos genes eucarióticos es postranscripcional. Participan en este proceso en *Arabidopsis* los complejos del silenciamiento génico inducido por ARN (RISC), cuyo componente principal es la proteína AGO1 (ARGONAUTE1). La insuficiencia de función del gen *AGO1* perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad. Para comprender mejor la actividad y las interacciones de *AGO1*, se realizó en el laboratorio de María Rosa Ponce una búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de su alelo *ago1-52*, que es hipomorfo, viable y fértil. Se aislaron así 23 mutantes inducidos por metanosulfonato de etilo, de fenotipo similar al silvestre, y se denominó *MAS* (*MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED*) a sus genes supresores. La clonación posicional de uno de ellos, *MAS2*, reveló que codifica una proteína homóloga de las NKAP (*NF-kappa B Activating Protein*) de los metazoos.

*MAS2* es un gen de copia única y esencial: sus alelos insercionales *mas2-2* y *mas2-3* son recesivos y letales embrionarios. Hemos identificado 9 alelos portadores de mutaciones puntuales supresoras, 8 de las cuales (*mas2-1* y de *mas2-4* a *mas2-10*) se agrupan en la región que codifica el dominio conservado SynMuv, que caracteriza a las NKAP.

*mas2-1* suprime el fenotipo de *ago1-51* y *ago1-52*, cuyo *splicing* está alterado, pero no el de *ago1-25* y *ago1-27*, que causan sustituciones de aminoácidos. Tanto la sobreexpresión constitutiva del alelo silvestre *MAS2* como la del mutante *mas2-1* carecen de efecto fenotípico en la estirpe silvestre; la sobreexpresión de *mas2-1*, pero no la de *MAS2*, suprime el fenotipo de *ago1-52*. Estos resultados sugieren que *mas2-1* es un alelo antimorfo del gen *MAS2*.

El mutante *ago1-52* produce dos variantes del ARN mensajero (ARNm) de *AGO1*, una mutante y mayoritaria y otra silvestre y casi indetectable. La proporción relativa de la variante de ARNm silvestre se incrementa en casi todos los dobles mutantes *ago1-52 mas2* estudiados. Estos resultados indican que los alelos *mas2* portadores de mutaciones puntuales son supresores informacionales y que la proteína *MAS2* participa en el procesamiento del ARN en general o el de *AGO1* en particular.

Hemos construido un microARN artificial que reprime parcialmente a *MAS2* (*amiR-MAS2*) y causa floración temprana, deforma las hojas y las flores y reduce la fertilidad. La proporción relativa de la proteína *AGO1* silvestre es mucho mayor en los dobles mutantes *ago1-52 mas2* que en el mutante simple *ago1-52*. En las plantas *ago1-52 amiR-MAS2*,

por el contrario, los niveles de la proteína AGO1 silvestre se reducen. Nuestros resultados sugieren que MAS2 participa en algún mecanismo de control de la calidad de los ARNm, favoreciendo la traducción de la variante silvestre o dificultando la de la mutante.

Hemos obtenido una fusión transcripcional *MAS2<sub>pro</sub>:GUS*, con la que hemos visualizado la expresión de *MAS2* en todos los tejidos estudiados, que alcanza valores máximos en células en división activa, como las de los ápices de la raíz y de las hojas vegetativas. También hemos obtenido los transgenes *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* y *MAS<sub>pro</sub>:MAS2:GFP*, que nos han permitido establecer que MAS2 es una proteína nuclear en células en división muy activa, y perinucleolar en las restantes. Hemos demostrado mediante hibridación *in situ* fluorescente que MAS2 se acumula en el ADN ribosómico (ADNr) 45S de los organizadores nucleolares.

El gen *NUC-L1* de *Arabidopsis* codifica la NUCLEOLINA1, que participa en el control epigenético de la expresión del ADNr 45S. Tanto *mas2-1* como *amiR-MAS2* interaccionan genéticamente con un alelo nulo de *NUC-L1*. Hemos comprobado que los promotores del ADNr 45S están hipometilados en las plantas *amiR-MAS2*, una observación que indica que MAS2 regula negativamente al ADNr 45S.

Hemos realizado una búsqueda de interactores basada en el ensayo del doble híbrido de la levadura, identificando proteínas presuntamente implicadas en el control del *splicing*, en la biogénesis del ribosoma y en la reparación de roturas dobles en el ADN. Estos interactores de MAS2 son similares a los descritos para la NKAP humana.

Las proteínas SR deben su nombre a su dominio RS, que es rico en serina (S) y arginina (R); su participación en el *splicing* está sobradamente demostrada en diferentes especies de hongos, animales y plantas. La NKAP humana presenta una región aminoterminal a la que se ha considerado un dominio RS no canónico y se ha encontrado asociada a diferentes complejos del spliceosoma. Nuestros resultados indican que MAS2, la ortóloga en *Arabidopsis* de la NKAP humana, es una proteína multifuncional que participa en el control del *splicing*, en la traducción del ARNm y en la regulación transcripcional y el procesamiento de los genes del ADNr 45S. La letalidad embrionaria asociada a la insuficiencia de función de MAS2, su localización subcelular, la naturaleza de sus interactores y los procesos en los que participa revelan una conservación no solo estructural sino también funcional respecto a la NKAP humana.