



Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Análisis de la contribución
de los genes *MAS2*, *SMO4* y *RRP7*
al metabolismo del ARN ribosómico
en *Arabidopsis thaliana***

Rosa Micol Ponce

Elche, 2017

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

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por la Licenciada Rosa Micol Ponce para optar al grado de Doctora. 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, 7 de junio de 2017.

II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se considera metabolismo del ARN a cualquier evento en el ciclo de vida de estas moléculas, como su síntesis, plegamiento, procesamiento, modificación y degradación. Una de las facetas más antiguas y complejas del metabolismo del ARN es la biogénesis del ribosoma citoplásmico eucariótico, también llamado ribosoma 80S, en la que intervienen los productos de más de 350 genes, que sintetizan, modifican, ensamblan y transportan unas 80 proteínas ribosómicas (PR) y cuatro ARN ribosómicos (ARNr).

Otro aspecto del metabolismo del ARN es el silenciamiento postranscripcional mediado por microARN (miARN), en el que la proteína ARGONAUTE1 (AGO1) juega un papel central en Arabidopsis. Los alelos de insuficiencia de función del gen *AGO1* causan un fenotipo pleiotrópico —letal en los casos más severos— que parece deberse a la alteración de numerosos aspectos del desarrollo. En el laboratorio de M.R. Ponce se han identificado alelos hipomorfos y viables de *AGO1* y de otros genes de la maquinaria de los miARN, inducidos mediante metanosulfonato de etilo (EMS), uno de los cuales es *ago1-52*, portador de una mutación puntual que perturba el *splicing* de su transcrito primario.

ago1-52 fue mutagenizado con EMS en una tesis anterior a esta, con el objetivo de aislar dobles mutantes con fenotipos sinérgicos, que permitiesen identificar genes relacionados funcionalmente con *AGO1*. El escrutinio de 56.810 semillas M₂ nos ha permitido aislar, entre otras, 23 líneas viables en las que el fenotipo morfológico de *ago1-52* se suprime casi totalmente. Hemos denominado *morphology of argonaute1-52 suppressed (mas)* a las segundas mutaciones de las que son portadoras estas líneas, todas las cuales, salvo una, son supresores extragénicos. Hemos considerado a las mutaciones *mas* candidatas a ser alelos de genes funcionalmente relacionados con *AGO1*.

Mediante análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares se identificaron transiciones G→A —las mutaciones que con más frecuencia causa el EMS— en los genes AT4G02720 y AT1G80070, a los que hemos denominado *MAS2* y *MAS5*, respectivamente. *MAS2* es un gen esencial de copia única que codifica una proteína homóloga de las NKAP (NF-kappa B Activating Proteins) de los metazoos. Hemos demostrado que *MAS2* participa en el control de la transcripción del ADNr 45S y el procesamiento de su transcrito primario, cuyos productos finales son los ARNr 25S, 18S y 5.8S. *MAS5* es un gen esencial que codifica la proteína PRP8 (PRE-MRNA-PROCESSING SPLICING FACTOR 8) de Arabidopsis. PRP8 es el elemento central del espliceosoma en todos los eucariotas en los que se ha estudiado. La caracterización de *MAS5* se completará más adelante.

Hemos realizado una búsqueda de interactores de MAS2 basada en el ensayo del doble híbrido de la levadura. Varios de los interactores identificados son ortólogos de proteínas cuya implicación en el control del *splicing* y en la biogénesis del ribosoma se ha demostrado en otros eucariotas. En esta tesis se han analizado dos de los genes que codifican interactores de MAS2: AT2G40430 y AT5G38720. El ortólogo de AT2G40430 en la levadura codifica la Nucleolar protein 53 (Nop53), que participa en la maduración del pre-ARNr 5.8S y en la biogénesis y exportación del núcleo al citoplasma de la subunidad mayor del ribosoma 80S. AT5G38720 es ortólogo del gen que codifica la Ribosomal RNA-processing protein 7 (Rrp7) de la levadura, que participa en la maduración del ARNr 18S. Durante el desarrollo de esta Tesis, otros autores han denominado *SMALL ORGAN 4* (*SMO4*) a AT2G40430; hemos llamado *RRP7* a AT5G38720. La insuficiencia de función de *SMO4* causa un fenotipo similar al de las mutaciones en algunos genes que codifican PR: sus hojas son ligeramente dentadas y apuntadas. Los alelos mutantes de *RRP7* alteran la filotaxia y la venación de los órganos laterales, retrasan la floración, reducen la fertilidad y causan hipersensibilidad al ácido abscísico durante el establecimiento de la plántula.

Hemos demostrado que *SMO4* es una proteína nucleolar y nucleoplásmica y que *RRP7* es nucleolar y perinucleolar. En los mutantes *smo4* y *rrp7* se acumulan intermediarios del procesamiento del pre-ARNr 45S, que indican que *SMO4* participa en la maduración de los ARNr 5.8S y 18S, y *RRP7* en la del ARNr 18S. Los niveles de las variantes *VAR* del pre-ARNr 45S están alterados en los mutantes *rrp7* y *smo4*, lo que evidencia la participación de *RRP7* y *SMO4* en el control, directo o indirecto, de la transcripción del ADNr 45S. Hemos demostrado que *rrp7-1* es epistático sobre *smo4-3*, y que ambos interactúan con *mas2-1* y con alelos hipomorfos o nulos de genes que participan en el procesamiento del pre-ARNr 45S y en la regulación epigenética de la transcripción del ADNr 45S.

En conclusión, en esta tesis se han identificado supresores extragénicos de un alelo hipomorfo y viable del gen *AGO1* y se ha iniciado la caracterización de uno de ellos, *MAS5*, que muy probablemente juega un importante papel en el *splicing*, tal como hacen sus ortólogos en otros eucariotas. También se ha contribuido a la caracterización de otro, *MAS2*, que regula la transcripción del ADNr 45S y participa en la maduración del pre-ARNr 45S. Se ha confirmado que *SMO4* y *RRP7* codifican interactores de MAS2 y se ha demostrado a niveles genético, citológico y molecular que estos dos genes están implicados en la biogénesis del ribosoma citoplásmico de *Arabidopsis* y presentan actividades evolutivamente conservadas a la vez que divergentes. Nuestros resultados sugieren que *SMO4* y *RRP7* también participan en otras rutas del metabolismo del ARN.