



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Caracterización genética y molecular
de los mutantes *transcurvata*
de *Arabidopsis thaliana***

Almudena Ferrández Ayela
Elche, 2012

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

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática 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 realizada por la Licenciada Almudena Ferrández Ayela 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.

José Luis Micol Molina

María Rosa Ponce Molet

Elche, 8 de octubre de 2012.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las hojas del tipo silvestre Landsberg *erecta* de *Arabidopsis* son casi totalmente planas. Las de los mutantes *transcurvata* (*tcu*), que fueron aislados en el laboratorio de J.L. Micol tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo, se recurvan hacia el envés oblicuamente a la vena primaria, un rasgo fenotípico que les hace candidatos a estar alterados en algún gen implicado en la especificación y/o el mantenimiento de la simetría bilateral de las hojas, motivo por el que han sido estudiados en esta Tesis.

En el mutante *tcu1-1* se reduce el tamaño del limbo y el número de las células del mesófilo en empalizada de las hojas vegetativas, y se incrementa la longitud del hipocotilo y los peciolo y de las células de ambos. Manifiesta floración temprana e hipersensibilidad a la auxina sintética 2,4-D y al paclobutrazol, un inhibidor de la síntesis de giberelinas. Hemos establecido mediante clonación posicional que el gen *TCU1* es At4g37130, confirmando su identidad mediante la obtención de 4 alelos insercionales de dominio público, cuyos fenotipos fueron similares al de *tcu1-1*, y los correspondientes ensayos de complementación. *TCU1* codifica una nucleoporina presuntamente ortóloga de la Nup58 de los vertebrados y la levadura. El alelo *tcu1-1* es portador de una transición C→T que introduce un codón de terminación prematura que impide la traducción de 452 de los 513 aa de TCU1 (NUP58), lo que sugiere su naturaleza nula. La viabilidad de *tcu1-1* indica que el gen *TCU1* no es esencial, a pesar de ser de copia única.

Hemos construido transgenes *TCU1_{pro}:TCU1*, *2×35S_{pro}:TCU1* y *TCU1_{pro}:TCU1:GFP*, cuya transferencia a plantas *tcu1-1* restableció completamente el fenotipo silvestre. Ni la expresión constitutiva de *TCU1* ni la de *tcu1-1* causaron efecto fenotípico alguno en las plantas silvestres. Los transgenes *TCU1_{pro}:GUS* y *TCU1_{pro}:TCU1:GFP* nos han permitido establecer que el gen *TCU1* se expresa en todos los órganos estudiados y que la proteína TCU1 se localiza en la envoltura nuclear, tal como cabría esperar de una nucleoporina. TCU1 parece contribuir menos que otras nucleoporinas a la exportación del ARNm del núcleo al citoplasma, ya que los alelos *tcu1* más extremos alteran solo levemente la distribución subcelular del ARN poliadenilado.

Empleando el método del doble híbrido de levadura, hemos realizado un escrutinio de genotecas de ADNc y varios ensayos dirigidos, que han revelado interacciones físicas entre TCU1 y varias nucleoporinas, importinas y exportinas, entre otras proteínas. Estos resultados son coherentes con los que hemos obtenido del análisis

de los fenotipos de los dobles mutantes en los que hemos combinado *tcu1-1* y *tcu1-2* con otras mutaciones de insuficiencia de función.

Considerados en conjunto, nuestros resultados indican que TCU1 forma parte del complejo del nucleoporo de *Arabidopsis*, en el que interacciona con nucleoporinas de los subcomplejos Nup107-160 (NUP96 y NUP160) y Nup62 (NUP54 y NUP62). Probablemente forma parte de este último, como sus presuntas ortólogas de la levadura y los vertebrados. TCU1 parece necesaria para la percepción de la luz, dado que los mutantes *tcu1* manifiestan constitutivamente el síndrome de huida de la sombra, que se suprime cuando se incrementa la intensidad de la luz a la que son cultivados. TCU1 también parece relacionada con la ubiquitinación: interacciona con ASK1 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE1) y ASK2, dos componentes de los complejos SCF (LIGASA DE UBIQUITINA SKP1-CULINA/CDC53-E-BOX); y se comporta como un regulador negativo de la ubiquitinación, tal como se deduce de los niveles de proteínas ubiquitinadas en los mutantes *tcu1*, que son superiores a los silvestres. Además, hemos demostrado que NUP54 y NUP62 interaccionan entre sí y con ASK2.

También hemos comenzado el estudio de la estirpe que inicialmente llamamos *tcu2-1*, que ha resultado ser portadora de dos mutaciones en genes ligados, separados por unos 30 cM: *tcu2-1* en *TCU2* y *zll-2* (*zwille-2*) en *AGO10* (*ARGONAUTE10*). El gen *AGO10* codifica un componente bien estudiado de la maquinaria de los microARN. Hemos denominado *zll-2* al alelo de *AGO10* que hemos identificado por ser idéntico al previamente descrito de igual denominación. Hemos clonado posicionalmente el gen *TCU2*, que codifica la subunidad no catalítica de NatB, una acetilasa N-terminal de proteínas.

El análisis de *tcu2-2*, un alelo insercional de dominio público de *TCU2*, y de *pnh-2*, un alelo de *AGO10* de fenotipo muy similar a *zll-2*, nos ha permitido concluir que el fenotipo del doble mutante *tcu2-1 zll-2* es aditivo respecto a algunos rasgos, como la fusión de las primeras hojas de *zll-2* y la floración temprana de *tcu2-1*, pero sinérgico respecto a otros, como la escasa fertilidad y la curvatura foliar. Estos rasgos superaditivos sugieren que existe una relación funcional entre los genes *AGO10* y *TCU2*.

Hemos construido transgenes *TCU2_{pro}:TCU2:GFP* y *TCU2_{pro}:GUS*, que nos han permitido demostrar que TCU2 es una proteína citoplásmica y que *TCU2* se expresa en todos los tejidos estudiados, respectivamente. La caracterización de los alelos del gen *TCU2* que hemos obtenido resultará útil para la comprensión del papel de la acetilación N-terminal de proteínas a nivel celular y del organismo en su conjunto, un proceso acerca del que se sabe muy poco tanto en los animales como en las plantas.