

Búsqueda de nuevos genes implicados en la ruta de los microARN en *Arabidopsis thaliana*

Trabajo realizado por la Licenciada Verónica Aguilera Díaz, en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar a la Suficiencia investigadora.

Elche, 22 de septiembre de 2006.

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 realizada por la Licenciada Verónica Aguilera Díaz para optar a la Suficiencia investigadora. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la División de Genética del Departamento de Biología Aplicada y el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

María Rosa Ponce Molet

José Luis Micol Molina

Elche, 22 de septiembre de 2006.

V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se asume generalmente que el control del desarrollo de los organismos pluricelulares es ejercido fundamentalmente por la actuación jerárquica de diferentes factores de transcripción, que es causa y efecto de la transducción de señales entre células vecinas y resulta modulada por los procesos epigenéticos (Davidson 1990; 1993). Un mecanismo adicional, descubierto en 1993, parece ser también de capital importancia en el control del desarrollo: la regulación de la expresión génica mediada por microARN (miARN). Los genes regulados negativamente por miARN son muchos y están implicados en numerosos procesos biológicos.

En el laboratorio de M.R. Ponce estamos intentando identificar en *Arabidopsis thaliana* nuevos genes que codifiquen miARN, elementos de la maquinaria que los produce y procesa, o sus dianas, que participen en el control del desarrollo vegetal. Con este fin, estamos siguiendo en paralelo un abordaje mutacional y otro transcriptómico.

Las mutaciones *ago1-52*, *hen1-13*, *hyl1-12*, *hst-21* (aisladas en el laboratorio de J.L. Micol) y *dcl1-9* (en el de S.E. Jacobsen) son alelos hipomorfos o nulos de los genes *AGO1*, *HEN1*, *HYL1*, *HST* y *DCL1*, cuyos productos proteicos son elementos clave de la ruta de los microARN. Sus combinaciones dobles manifiestan fenotipos sinérgicos y muy severos, lo que demuestra su relación funcional. Nuestra caracterización de estos dobles mutantes sugiere que la ruta de los miARN está implicada en la especificación de la proximodistalidad y en la formación del patrón de venación de las hojas vegetativas. La sinergia fenotípica de las combinaciones dobles de estas mutaciones sugiere además su utilidad para la búsqueda de modificadores de los fenotipos de cada una de ellas. Estas mutaciones modificadoras afectarían a genes relacionados con la ruta de los miARN, algunos de los cuales podrían no haber sido estudiados con anterioridad.

Hemos iniciado una búsqueda de modificadores del fenotipo asociado a la mutación *ago1-52*, un alelo hipomorfo, recesivo, viable y relativamente fértil del gen *AGO1*. Hemos sometido a escrutinio 3891 individuos M_2 , descendientes de plantas M_1 *ago1-52/ago1-52* mutagenizadas con metanosulfonato de etilo, identificando 370 presuntos dobles mutantes, en algunos de los cuales el fenotipo asociado a *ago1-52* se acentúa o se debilita, mientras que otros manifiestan rasgos inesperados. De los 120 presuntos dobles mutantes M_3 que resultaron viables y fértiles, hemos seleccionado 32, cuyo fenotipo se manifiesta con penetrancia completa y expresividad poco variable. Los hemos retrocruzado por su ancestro silvestre Landsberg *erecta*, para establecer su modo de herencia, estudiar su fenotipo en ausencia de la mutación *ago1-52*, y someterlos a

análisis de complementación y de ligamiento. Nuestro objetivo a corto plazo es elegir sólo un mutante, el que nos parezca más abordable e interesante, para clonar posicionalmente y caracterizar estructural y funcionalmente el gen afectado por la mutación causante de su fenotipo.

Hemos sometido a análisis de micromatrices el ARN de los mutantes *ago1-52*, *hen1-13*, *hyl1-12*, *hst-21* y *dcl1-9*, en los que el silenciamiento de los genes diana de los miARN debe estar dificultado. Esperábamos encontrar en todos o la mayoría de ellos la desrepresión de genes diana de los miARN. Nuestro análisis global de la expresión génica en estos mutantes indica la implicación de los miARN en la regulación de la senescencia, la respuesta a las auxinas y el etileno, la remodelación de la cromatina y el control de la ubiquitinación. Entre los genes sobreexpresados en nuestras micromatrices hemos encontrado el 30% de las dianas de miARN predichas o validadas por otros autores, así como 251 que no habían sido previamente identificadas.