



Miguel Hernández
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Análisis genético y molecular
del gen *MAS2* de
*Arabidopsis thaliana***

Ana Belén Sánchez García
Trabajo de fin de Máster
Elche, 2010

MARIA ROSA PONCE MOLET, Profesora Titular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACE CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Ana Belén Sánchez García como trabajo final del Máster en Bioingeniería. Las investigaciones reflejadas en esta memoria 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, 13 de septiembre de 2010.

I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hasta hace poco más de una década se pensaba que el desarrollo de los organismos pluricelulares estaba controlado fundamentalmente por la acción jerárquica de diferentes factores de transcripción. Sin embargo, en 1993 se descubrió un mecanismo adicional de regulación de la expresión génica mediado por microARN (miARN), 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. Estos procesos de silenciamiento génico postranscripcional suceden en el citoplasma, en complejos ribonucleoproteicos denominados RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*; (Hammond *et al.*, 2000). Con el paso del tiempo, este mecanismo ha ido cobrando importancia y en la actualidad se ha demostrado o predicho que existen centenares, probablemente miles, de genes eucarióticos regulados negativamente por miARN (Lee *et al.*, 1993). Aunque se han descrito numerosos miARN en *Arabidopsis thaliana*, se asume que su catálogo dista de estar completo y que las funciones de casi todos ellos están por demostrar.

En el laboratorio de M.R. Ponce estamos intentando contribuir a la comprensión de la regulación de la expresión génica mediada por miARN, mediante un abordaje genético y molecular cuyo objetivo es la identificación de nuevos elementos de la ruta de los miARN en el sistema modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*. Durante los últimos 5 años, nuestro grupo se ha centrado en la identificación a gran escala de mutaciones modificadoras del fenotipo morfológico de la estirpe *ago1-52*, portadora de un alelo hipomorfo y viable del gen *ARGONAUTE1 (AGO1)*, uno de los elementos clave de la ruta de los miARN, ya que en la proteína AGO1 reside la actividad ribonucleolítica del RISC (Vaucheret *et al.*, 2004). Nos hemos centrado en el estudio de 17 líneas supresoras identificadas en el escrutinio que hemos realizado (Aguilera Díaz, 2009). Hemos denominado *MORPHOLOGY OF argonaute1-52 SUPPRESSED (MAS)* a los genes cuyas mutaciones suprimen en mayor o menor medida el fenotipo morfológico de *ago1-52*. Hemos logrado clonar posicionalmente tres genes *MAS*, ninguno de los cuales había sido descrito por autores anteriores.

Antes de iniciar la caracterización genética y molecular de los genes supresores, las líneas dobles mutantes *ago1-52 mas* se retrocruzaron por *Ler* para eliminar el lastre mutacional asociado inevitablemente a la mutagénesis con EMS. Una de mis tareas fundamentales ha consistido en el aislamiento de los mutantes simples *mas* y los dobles mutantes *ago1-52 mas* en las poblaciones F₂ resultantes de dos rondas de

retrocruzamientos. Aunque he conseguido identificar los mutantes simples *mas1-1* y *mas2-1*, y el doble mutante *ago1-52 mas2-1*, me he centrado en el análisis genético y molecular del gen *MAS2*. Los mutantes *mas2-1* y *ago1-52 mas2-1* carecen de fenotipo morfológico visible, por lo que su aislamiento ha supuesto el genotipado de 70 individuos F_2 de fenotipo silvestre, mediante la secuenciación de la región del gen *AGO1* donde se encuentra la mutación *ago1-52*, y el análisis de un polimorfismo de tipo CAPS para la discriminación entre los alelos *MAS2* y *mas2-1*.

He realizado un análisis comparativo de algunos rasgos morfológicos de los mutantes *ago1-52*, *mas2-1* y *ago1-52 mas2-1* y de la estirpe silvestre *Ler*, para intentar determinar el grado de supresión de la mutación *mas2-1* sobre el fenotipo *Ago1-52* en los individuos *ago1-52 mas2-1*. Hemos determinado los niveles de ploidía de las hojas 1 y 2 de plantas de 21 días mediante citometría de flujo, y evidenciado que en los mutantes *ago1-52* las poblaciones celulares correspondientes a ciclos de endoreduplicación (8C-64C) se encuentran muy disminuidas con respecto a *Ler* y a *mas2-1*, y que en los dobles mutantes *ago1-52 mas2-1* los niveles se normalizan. Estos resultados nos permiten concluir que *mas2-1* es capaz de suprimir no sólo el fenotipo morfológico externo de *ago1-52*, sino también los defectos en el ciclo celular o el retraso en su crecimiento, dependiendo de qué proceso se encuentre alterado, ya que no lo hemos establecido.

He completado la caracterización morfológica de un mutante insercional de ADN-T que interrumpe el único exón del gen *MAS2* y que habíamos identificado previamente en nuestro grupo, en una colección de dominio público, y al que denominamos *mas2-2*. Mediante el análisis de 167 embriones procedentes de 4 individuos portadores de la inserción en hemicigosis, he confirmado las observaciones previas realizadas en mi laboratorio en referencia al papel esencial de *MAS2*, ya que la mutación *mas2-2* es letal embrionaria.

He cruzado individuos *mas2-1/mas2-1* por *MAS2/mas2-2*, que se encuentra en el fondo genético Col-0, e identificado los individuos heterocigóticos *mas2-1/mas2-2*, tras genotipar 20 individuos de la generación F_1 . Hemos observado que el limbo de las hojas vegetativas de los individuos *mas2-1/mas2-2* es más redondeado que el de los mutantes *mas2-1/mas2-1*, Col-0 y *Ler*, y el tamaño de la roseta es menor.

He analizado plantas T_1 portadoras de un miARN artificial (amiARN) obtenido en mi laboratorio, para el silenciamiento postranscripcional del gen *MAS2*. El fenotipo de diferentes individuos T_1 sugiere que *MAS2* es un gen que impide la muerte celular en *Arabidopsis* e inhibe la senescencia.

He continuado el trabajo iniciado por otros investigadores de mi laboratorio para la obtención de construcciones para la sobreexpresión del alelo silvestre *MAS2* y de *mas2-1* en *Arabidopsis*. Aunque todavía está por confirmar a nivel molecular, he podido constatar que la sobreexpresión del alelo *MAS2* en plantas *ago1-52* suprime su fenotipo mutante, así como el del mutante *hen1-13*, cuyo producto silvestre HEN1 es una metilasa de ARN implicada en la estabilización de los miARN y otros pequeños ARN interferentes (Chen *et al.*, 2002).

He analizado plantas T₁ en las que el promotor de *MAS2* dirige la expresión del gen testigo de la β -glucuronidasa, para visualizar el patrón de expresión espacial y temporal de *MAS2* mediante tinción GUS. He constatado que se expresa en las raíces y hojas de *Arabidopsis*, en regiones con alta tasa de proliferación.

He contribuído a la obtención de una construcción para la localización subcelular de la proteína MAS, que he transferido a *Arabidopsis*. He podido determinar mediante el análisis de plantas T₁ portadoras de una fusión del gen *MAS2* y la proteína verde fluorescente (GFP), que la proteína MAS2 es nuclear.