



Universidad Miguel Hernández de Elche

# **Aislamiento y caracterización de nuevas mutaciones supresoras del fenotipo de *argonaute1-52***

Rosa Micol Ponce  
Trabajo de fin de Máster  
Elche, 2011

MARIA 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 realizada por la Licenciada Rosa Micol Ponce 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, 9 de septiembre de 2011.

## I.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Al inventario de los mecanismos de regulación de la expresión génica que participan en el control del desarrollo de los eucariotas pluricelulares se incorporó hace unos 20 años el silenciamiento génico mediado por pequeñas moléculas de ARN, principalmente los microARN (miARN) y pequeños ARN interferentes (ARNpi). Los miARN reprimen la expresión de sus genes diana a nivel postranscripcional y los ARNpi tanto a nivel postranscripcional como transcripcional. Estas moléculas de ARN forman parte de complejos riboproteicos denominados RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuya actividad endonucleolítica depende fundamentalmente de una proteína de la familia ARGONAUTE (AGO).

En *Arabidopsis thaliana*, las mutaciones de insuficiencia de función en algunos de los genes responsables del silenciamiento mediado por miARN y ARNpi, como *AGO1*, causan fenotipos pleiotrópicos, en muchos casos letales, que parecen deberse a la alteración de numerosos aspectos del desarrollo de esta planta. En el laboratorio de M.R. Ponce se han identificado alelos viables de genes implicados en la ruta de los miARN, uno de los cuales es *ago1-52*, que perturba el *splicing* de uno de los intrones del gen *AGO1*. Una mutagénesis con metanosulfonato de etilo de semillas  $M_1$  del mutante *ago1-52* y el escrutinio de 36.810 de las semillas  $M_2$  obtenidas permitió el aislamiento de 17 líneas fenotípicamente silvestres, viables y moderadamente fértiles. Estas líneas, en las que el fenotipo de *ago1-52* se suprime casi totalmente, fueron denominadas *morphology of argonaute1-52 suppressed (mas)*. Las mutaciones *mas* son candidatas a ser alelos de genes funcionalmente relacionados con *AGO1*. Mediante análisis iterativo del ligamiento a marcadores moleculares se cartografiaron 6 genes *MAS* (*MAS1-MAS6*), y se identificaron 3 de ellos (*MAS1*, *MAS2* y *MAS3*).

Con el fin de encontrar nuevos supresores del fenotipo de *ago1-52*, hemos utilizado en este trabajo 20.000 semillas  $M_2$  que no se habían estudiado anteriormente. Hemos seleccionado 274 presuntos dobles mutantes que manifiestan distintos grados de supresión, 94 de los cuales resultaron ser fértiles. Para excluir revertientes, pseudorevertientes o contaminaciones accidentales, hemos secuenciado el gen *AGO1* en 48 presuntos dobles mutantes, confirmando en 44 de ellos la presencia de la mutación *ago1-52* en homocigosis.

Nos hemos concentrado en el estudio de 9 presuntos dobles mutantes *ago1-52 mas* cuyo fenotipo era muy similar al del tipo silvestre. Para reducir su lastre mutacional, los hemos retrocruzado por su parental *Ler*. También los hemos cruzado por *ago1-27* y

*ago1-25*, dos mutantes portadores de alelos viables del gen *AGO1* en fondo genético Col-0, con el objetivo de obtener las poblaciones cartográficas necesarias para la clonación posicional de los correspondientes genes *MAS*.

Hemos continuado la clonación posicional de los genes *MAS4*, *MAS5* y *MAS6*, iniciada anteriormente en el laboratorio de M.R. Ponce. Para ello, hemos secuenciado varios genes candidatos. No hemos encontrado ninguna mutación en los intervalos candidatos de *MAS4* y *MAS6*, pero hemos logrado clonar *MAS5*. En efecto, la secuenciación de la unidad de transcripción del gen AT1G80070 reveló una transición G→A en uno de sus exones, que se traduciría en un cambio de ácido glutámico por lisina, en una región muy conservada de su producto proteico. *MAS5* codifica una de las dos proteínas de la familia PRP8 de Arabidopsis, que son elementos centrales del espliceosoma en todos los eucariotas. Los alelos nulos del gen *PRP8/MAS5* de Arabidopsis, denominados *sus2* (*abnormal suspensor2*) por autores anteriores, son letales embrionarios.

Hemos genotipado las progenies F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> de varios cruzamientos *ago1-52 mas5-1* × *ago1-27*, concluyendo que el efecto supresor de *mas5-1* sobre los genotipos *ago1-52/ago1-52* y *ago1-27/ago1-52* es dominante. Sin embargo, *mas5-1* no suprime el fenotipo mutante de las plantas *ago1-27/ago1-27*. Mediante RT-PCR cuantitativa hemos comprobado que el efecto supresor de *mas5-1* sobre *ago1-52* no se debe a la normalización de su *splicing*. También hemos demostrado que los alelos *mas1-1*, *mas2-1*, *mas3-1* y *mas4-1*, en sus combinaciones dobles mutantes con *ago1-52*, tampoco corrigen el *splicing* aberrante que causa esta última, aunque sí sus efectos fenotípicos. Hemos iniciado la obtención de construcciones para la determinación del patrón de expresión espacial y temporal de *MAS5*, así como para la localización subcelular de su producto proteico.

Puede parecer sorprendente que hayamos obtenido dobles mutantes *ago1-52 mas* cuyo fenotipo morfológico se acerca notablemente al del tipo silvestre. Debe tenerse en cuenta a este respecto que la insuficiencia de la función del gen *AGO1* que padecen los mutantes hipomorfos y nulos *ago1* causa la desrepresión de los genes diana de los miARN y los ARNpi, que se manifiesta no sólo en un incremento de sus ARNm, sino también de sus productos proteicos. Es por tanto razonable suponer que el fenotipo de los mutantes *ago1* se deba al menos en parte a la acumulación de numerosas proteínas en todos sus tejidos y etapas de desarrollo.