



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Análisis de las interacciones
genéticas del gen *SMO4*, que codifica
un factor de la biogénesis del ribosoma
en *Arabidopsis***

Sara Fontcuberta Cervera

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Unidad de Genética

Instituto de Bioingeniería

Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería

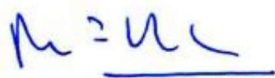
Curso académico 2017/2018

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

ROSA MICOL PONCE, Investigadora posdoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Graduada Sara Fontcuberta Cervera como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y Bioingeniería. Las investigaciones que se reflejan en esta memoria han sido desarrolladas íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



María Rosa Ponce Molet



Rosa Micol Ponce

Elche, 28 de junio de 2018.

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El gen *Nucleolar protein p53 (Nop53)* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica un factor de la biogénesis del ribosoma necesario para la maduración del ARN ribosómico (ARNr) 5.8S; su ortólogo en *Arabidopsis* es *SMALL ORGAN 4 (SMO4; AT2G40430)*. En el laboratorio de María Rosa Ponce se han obtenido evidencias moleculares de la relación funcional de *SMO4* con *MAS2*, *MTR4*, *NUC1* y *NUC2*, que también codifican factores de la biogénesis del ribosoma. En este Trabajo de Fin de Máster hemos analizado las interacciones genéticas entre alelos de insuficiencia de función de estos genes, obteniendo dobles mutantes y estudiando sus fenotipos morfológico y fisiológico. Se tomaron fotografías de las rosetas y micrografías de la capa subepidérmica del mesófilo en empalizada y de la venación foliar, que se transformaron en diagramas para su análisis morfométrico. Se extrajeron y cuantificaron clorofilas y antocianinas, y se visualizó la autofluorescencia de los cloroplastos. Los rasgos fenotípicos que hemos analizado en los dobles mutantes revelan la existencia de sinergia o epistasia en la mayoría de los casos y de aparente aditividad solo en algunos. Considerados en conjunto, nuestros resultados corroboran que los genes estudiados están relacionados funcionalmente.

Palabras clave: *SMO4*, *MAS2*, ARNr, morfometría, *Arabidopsis*.

In yeast, the *Nucleolar protein 53 (Nop53)* gene encodes a ribosome biogenesis factor required for 5.8S ribosomal RNA (rRNA) maturation; its *Arabidopsis* ortholog is *SMALL ORGAN 4 (SMO4; AT2G40430)*. The laboratory of María Rosa Ponce has obtained molecular evidence of the functional relationship of *SMO4* with *MAS2*, *MTR4*, *NUC1* and *NUC2*, genes that also encode ribosome biogenesis factors. In this End of Master Assignment, we analyzed the genetic interactions among loss-of-function alleles of these genes: we obtained double mutants and studied their morphological and physiological phenotypes. Pictures were taken from rosettes, the subepidermal layer of palisade mesophyll, and leaf venation, which were transformed into diagrams for its morphometric analysis. We extracted and quantified chlorophylls and anthocyanins, and visualized chloroplast autofluorescence. The phenotypic traits that we analyzed in double mutants revealed the existence of synergy or epistasis in most cases, and of apparent additivity in some others. Taken together, our results corroborate that the genes under study are functionally related.

Keywords: *SMO4*, *MAS2*, rRNA, morphometry, *Arabidopsis*.

VI.- CONCLUSIONES

El ribosoma es la maquinaria de traducción de los ARNm y presenta un alto grado de conservación evolutiva, permitiendo la síntesis de proteínas heterólogas en las células de todos los seres vivos. Los alelos nulos de algunos de los genes que codifican proteínas ribosómicas y otros factores de la biogénesis del ribosoma de los eucariotas pluricelulares, como las plantas, son letales embrionarios, aunque la mayoría son viables y muchos causan un crecimiento ralentizado, reducción de la estatura, la fertilidad, y la proliferación celular en las hojas, que son apuntadas y dentadas, y manifiestan alteraciones en su patrón de venación. Uno de estos mutantes es *smo4-3*, portador de una inserción de ADN-T que interrumpe el gen *SMO4* (Zhang *et al.*, 2015) de *Arabidopsis*, que es ortólogo del *Nop53* de *Saccharomyces cerevisiae* y del *GLTSCR2 (PICT1)* humano. En el laboratorio de M.R. Ponce se ha analizado la función de *SMO4*, usando *smo4-3* y otros alelos nulos de este gen. Se concluyó que la proteína *SMO4* está implicada en la regulación de la transcripción de los genes del ADNr 45S y en la maduración del ARNr 5.8S (Micol Ponce, 2017; Micol-Ponce *et al.*, 2018).

En este TFM hemos contribuido a la caracterización funcional de *SMO4*, analizando las interacciones genéticas de *smo4-3* con *mas2-1*, *mtr4-2*, *parl1-2* y *nuc2-2*, que son alelos de insuficiencia de función de genes implicados en el control de la transcripción del ADNr 45S (*mas2-1*, *parl1-2* y *nuc2-2*) o en la maduración del ARNr 5.8S (*mtr4-2*). Hemos intentado obtener evidencias de las interacciones genéticas entre *SMO4* y *MAS2*, a fin de validar las interacciones físicas entre las proteínas *SMO4* y *MAS2* detectadas previamente en ensayos del doble híbrido de levadura. También hemos estudiado las eventuales interacciones genéticas entre *SMO4* con *MTR4*, ya que la proteína *Mtr4* de *Saccharomyces cerevisiae* interacciona con *Nop53*, ortóloga de *SMO4*, durante la maduración del ARNr 5.8S.

Hemos obtenido dobles mutantes y cuantificado varios parámetros morfológicos de las hojas y rosetas, de las células en la capa subepidérmica del mesófilo en empalizada y de la venación foliar. También hemos determinado su contenido en clorofilas y antocianinas. En nuestro estudio de la morfología, histología y fisiología de dobles mutantes hemos encontrado sinergia fenotípica entre *smo4-3* y *mas2-1* en el tamaño y la forma de la roseta y de la segunda hoja, así como en el tamaño y el número de las células del mesófilo en empalizada. Deducimos de estos resultados que en los dobles mutantes *smo4-3 mas2-1* se incrementa más la expansión celular respecto al tipo silvestre que en a sus mutantes simples parentales, mientras que la proliferación celular, disminuye en el

doble mutantes resoecto a los tipos silvestres, cosa que no ocurre en los mutantes simples. Estos resultados sugieren que MAS2 promueve la proliferación y/o inhibe la expansión, tal como se ha propuesto para SMO4 (Zhang *et al.*, 2015). En cuanto al patrón de venación, hemos observado epistasia de *mas2-1* sobre *smo4-3*, tal como cabría esperar, ya que MAS2 actúa antes que SMO4 en el procesamiento del pre-ARNr 45S.

Hemos cuantificado los niveles de clorofilas a y b en el doble mutante *smo4-3 mas2-1*, que es visiblemente más pálido que los silvestres Col-0 y Ler. Sorprendentemente, hemos concluido que los niveles de clorofilas son más altos en el doble mutante que en los silvestres, lo que no concuerda con la observación de una mayor palidez en las plantas *smo4-3 mas2-1*.

Hemos encontrado epistasia de *mtr4-2* sobre *smo4-3* en prácticamente todos los parámetros analizados: en el tamaño y morfología de la roseta y de la segunda hoja, y en el patrón vascular. Estos resultados apoyan la hipótesis de que SMO4 y MTR4 estén funcionalmente relacionadas, cooperando en las mismas etapas del procesamiento del pre-ARNr 5.8S. Hemos iniciado los preparativos para determinar mediante ensayos de Northern las alteraciones del procesamiento del pre-ARNr 45S que se dan en el doble mutante *smo4-3 mtr4-2*, que compararemos con los que manifiesten los mutantes simples parentales. Por otro lado, hemos observado sinergia fenotípica en el doble mutante *smo4-3 mtr4-2* en cuanto al número de células del mesófilo en empalizada. Este resultado sugiere que MTR4 promueve la proliferación celular. También hemos encontrado sinergia fenotípica en *smo4-3 par11-2* en algunos de los parámetros estudiados, concretamente, en el tamaño y forma de la roseta y en el patrón de venación.

También hemos cuantificado los niveles de antocianinas en *smo4-3 mtr4-2* y *smo4-3 par11-2*, cuyos peciolos y tallos eran más oscuros que los de las plantas silvestres, sugiriendo la acumulación de estos pigmentos. Efectivamente, las plantas *smo4-3 mtr4-2* y *smo4-3 par11-2* acumulan más antocianinas que las plantas silvestres, tal como ocurre en *mtr4-2* y *par11-2*, pero no en *smo4-3*.

Nuestros resultados no son concluyentes en cuanto a la relación funcional entre SMO4 y NUC2, ya que solamente hemos encontrado sinergia fenotípica en el doble mutante *smo4-3 nuc2-2* en el número de células del mesófilo en empalizada, que es menor en el doble mutante, y epistasia de *smo4-3* sobre *nuc2-2* en las alteraciones del patrón vascular. En el resto de parámetros analizados hemos observado simple aditividad.

Estos resultados de interacciones genéticas confirman la relación funcional de SMO4 con MAS2, MTR4 y NUC1 y sugieren que la proteína SMO4 participa en el control de la transcripción del ADNr 45S y en la maduración del ARNr 5.8S.