Programa de Doctorado en Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández de Elche

Regulación del reciclaje del ribosoma citoplásmico por el gen *ABCE2* de Arabidopsis

Carla Navarro Quiles

Director de la tesis
José Luis Micol Molina

Elche, 2021

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor desarrollada por la Graduada Carla Navarro Quiles para optar al grado de Doctora. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la UMH, según los términos y condiciones definidos en el Plan de Investigación de la doctoranda, y cumpliendo los objetivos inicialmente previstos de forma satisfactoria y lo establecido en el Código de Buenas Prácticas de la UMH.

José Luis Micol Molina

Elche, 25 de junio de 2021

II.- RESUMEN

La mayoría de los genes que codifican proteínas implicadas en la traducción en *Arabidopsis thaliana* (en adelante, Arabidopsis) tienen parálogos cercanos. Sus alelos nulos son viables y causan un fenotipo morfológico débil pero distinguible del silvestre: generan hojas apuntadas e indentadas, con un patrón de venación aberrante, rasgo que se ha atribuido tradicionalmente a la perturbación de la homeostasis de la auxina.

Las secuencias de las proteínas ATP-Binding Cassette E (ABCE) están conservadas entre las arqueas y los eucariotas. Se ha demostrado en la arquea *Saccharolobus solfataricus*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la especie humana que las ABCE son esenciales para el reciclaje de los ribosomas citoplásmicos. En estas tres especies distintas y distantes, una proteína ABCE separa las dos subunidades del ribosoma tras la terminación de la traducción, y acompaña a la subunidad 30S/40S hasta la iniciación de un nuevo ciclo de síntesis de proteínas. No se ha obtenido evidencia experimental alguna de la implicación de una ABCE en la traducción en el reino vegetal.

En casi todos los genomas estudiados el gen *ABCE* es de copia única y solo los de algunos insectos, peces y plantas, como Arabidopsis, contienen dos, usualmente denominados *ABCE1* y *ABCE2*. En esta Tesis hemos estudiado el mutante *apiculata7-1* (*api7-1*) de Arabidopsis, que fue aislado en el laboratorio de J.L. Micol y es portador de un alelo puntual, hipomorfo, recesivo y viable del gen *ABCE2*. El fenotipo morfológico de *api7-1* es similar al causado por los alelos nulos viables de genes que codifican componentes de la maquinaria de la traducción. También hemos estudiado *api7-2*, un alelo insercional y letal recesivo de *ABCE2*.

Hemos caracterizado los fenotipos morfológico, histológico y molecular de *api7-1*, prestando especial atención al patrón de venación de sus órganos planos, concluyendo que está muy alterado en las hojas del primer nudo de la roseta, pero no tanto en los cotiledones, las hojas del tercer nudo y las caulinares, y que es silvestre en los sépalos y los pétalos. Dado que la biosíntesis, el transporte polar y la señalización de la auxina contribuyen a la formación del patrón de venación foliar, hemos obtenido plantas *api7-1* $PIN1_{pro}$*:PIN1:GFP*, portadoras de una fusión traduccional de los genes que codifican el exportador de la auxina PIN-FORMED 1 (PIN1) y la proteína fluorescente verde (GFP), y *api7-1* $DR5_{pro}$*:3XVENUS:N7*, portadoras de un transgén testigo de la señalización de la auxina. El estudio mediante microscopía confocal de las raíces de estas plantas transgénicas indicó que el transporte de la auxina está disminuido, y su percepción, incrementada. Hemos realizado un análisis global del transcriptoma de *api7-1*, concluyendo que los genes que codifican las enzimas de la ruta

principal de la biosíntesis de la auxina están desreprimidos. Nuestros resultados sugieren que una de las causas de las aberraciones de la venación foliar de *api7-1* es el exceso de auxina.

La ABCE2 de Arabidopsis contiene dos grupos hierro-azufre (FeS). Hemos constatado que los genes de respuesta a los déficits de hierro y azufre están desreprimidos en *api7-1*, posiblemente para compensar la insuficiencia de función de la ABCE2 mutante. El aumento de la concentración intracelular de hierro podría conllevar el de las especies reactivas de oxígeno, tal como sugiere la desrepresión de genes de respuesta a estrés oxidativo, que también se constata en nuestro análisis transcriptómico de *api7-1*.

Hemos obtenido un transgén $ABCE2_{pro}$*:ABCE2:YFP*, que restablece el fenotipo silvestre en el mutante *api7-1*. Hemos demostrado, en un ensayo de coinmunoprecipitación, que la proteína de fusión ABCE2:YFP interacciona con varios componentes de la maquinaria de la traducción. Uno de ellos es EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3J (eIF3j), cuyo papel como proteína accesoria de las ABCE durante el reciclaje de los ribosomas se ha demostrado en células de *Saccharomyces cerevisiae* y humanas. Esta observación sugiere que la ABCE2 de Arabidopsis —y por extensión, sus ortólogas vegetales— participa en el reciclaje del ribosoma citoplásmico.

Las regiones no traducidas 5′ (5′ UTR, de 5′ untranslated region) y 3′ UTR de los ARNm eucarióticos contienen secuencias que regulan postranscripcionalmente la expresión génica. La insuficiencia de la función de la ABCE1 de *Saccharomyces cerevisiae* y células humanas dificulta la disociación de los ribosomas, y propicia que se internen en la 3′ UTR, desplazando a su paso a los factores reguladores unidos a esta última, prolongando o acortando la vida media del ARNm. El mutante *api7-1* es un buen candidato para establecer si este fenómeno también ocurre en las plantas; de ser así, se obtendría por esta vía una confirmación adicional de que la ABCE2 de Arabidopsis participa en el reciclaje del ribosoma.

Hemos constatado que varias brasicáceas presentan dos genes *ABCE*. Nuestro análisis filogenético indica que la duplicación del correspondiente gen ancestral se produjo en las rósidas antes de la diversificación de las brasicáceas y sugiere que los genes *ABCE1* de las brasicáceas están sujetos a una menor presión selectiva que sus parálogos *ABCE2*. El transgén $ABCE2_{pro}$*:ABCE1* —pero no el $ABCE1_{pro}$*:ABCE2*— restablece parciamente el fenotipo silvestre en las plantas *api7-1*. *ABCE1* se expresa muy poco en Arabidopsis, siendo el órgano en que se detecta su mayor nivel la flor, cuya morfología es aparentemente silvestre en el mutante *api7-1*. Estas observaciones sugieren que las proteínas codificadas por los genes *ABCE1* y *ABCE2*, pero no sus promotores, son funcionalmente redundantes. *ABCE2* parece conservar su función ancestral, mientras que *ABCE1* está en vías de subfuncionalización o pseudogenización.