



Programa de Doctorado en Bioingeniería
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Análisis de la contribución de los genes
PRP8, *RPS24A* y *RPS24B* al metabolismo
del ARN en *Arabidopsis thaliana***

Adrián Cabezas Fuster

Directora de la tesis
María Rosa Ponce Molet

Elche, 2023

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática 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 el graduado Adrián Cabezas Fuster para optar al grado de Doctor. 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 del doctorando, y cumpliendo los objetivos inicialmente previstos de forma satisfactoria y lo establecido en el Código de Buenas Prácticas de la UMH.

María Rosa Ponce Molet

Elche, 1 de junio de 2023

II.- RESUMEN

Casi todos los ARN eucarióticos maduran, sufriendo diferentes tipos de cortes exo y endonucleolíticos, la eliminación de algunos de sus segmentos y la sustitución y/o modificación química de determinados ribonucleótidos. Esto es así tanto para los que codifican proteínas (ARN mensajeros [ARNm]) como para los que no las codifican (ARN ribosómicos [ARNr] y otros). Se denomina metabolismo del ARN al conjunto de estos procesos, que se inicia con la síntesis de un transcrito primario y termina con la degradación del ARN maduro, usualmente posterior al cumplimiento de su función.

Se denomina pre-ARNm al producto primario de la transcripción de los genes eucarióticos que codifican proteínas, que sufre un complejo proceso de maduración antes de convertirse en un ARNm apto para su exportación desde el núcleo al citoplasma y su traducción por el ribosoma. El *splicing* de los pre-ARNm es uno de sus mecanismos de maduración mejor conocidos, en el que suceden dos transesterificaciones sucesivas que conllevan la eliminación de un intrón y la ligación de los exones adyacentes. El *splicing* es realizado por el espliceosoma, una maquinaria ribonucleoproteica compleja, dinámica y muy precisa, que reconoce secuencias conservadas en los extremos de los intrones y exones de los pre-ARNm: los sitios donante (5' splicing site; 5'SS) y aceptor (3'SS) del *splicing*. La eliminación de los intrones durante el *splicing* no siempre es idéntica para todas las moléculas de un mismo pre-ARNm, obteniéndose así diferentes variantes de ARNm maduro, que suelen ser específicas de tejido. Este fenómeno se denomina *splicing* alternativo y es una de las fuentes principales de la diversificación del proteoma de las plantas, y en particular, de los animales.

La proteína ARGONAUTE1 (AGO1) de *Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) es el componente más importante de los RNA-induced silencing complexes (RISC), que juegan un papel central en la regulación postranscripcional de la expresión génica mediada por los microARN (miARN). El alelo *ago1-52* del gen *AGO1* es hipomorfo, viable y portador de una mutación puntual en su vigésimo intrón, que genera un 3'SS nuevo, que el espliceosoma usa más frecuentemente que el genuino, que está inalterado. Como resultado, el alelo *ago1-52* produce dos ARNm, uno silvestre y muy minoritario, y otro mutante; este último incluye 10 nucleótidos del vigésimo intrón, que desfasan su pauta de lectura. La traducción de este ARNm aberrante rinde una proteína AGO1-52 mutante, que además es mucho más abundante que la proteína AGO1 silvestre en el mutante *ago1-52*.

Los componentes del espliceosoma están muy conservados en todos los eucariotas. Uno de ellos es PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 8 (PRP8), una de las proteínas centrales del espliceosoma, que reconoce los 5'SS y 3'SS de los intrones de los pre-ARNm.

En todas las especies en las que se han estudiado, los alelos nulos de *PRP8* son letales, y los hipomorfos causan alteraciones globales del *splicing*, que a su vez perturban el desarrollo. Hemos caracterizado en esta Tesis seis nuevos alelos mutantes del gen *PRP8* de Arabidopsis, que fueron aislados en una búsqueda de supresores extragénicos del fenotipo morfológico de *ago1-52*. Hemos llamado a estos alelos *morphology of argonaute1-52 suppressed 5-1 (mas5-1)* a *mas5-6*. Cuatro de los alelos *mas5* del gen *PRP8* de Arabidopsis causan sustituciones de uno de los aminoácidos de una región de PRP8 que forma una cavidad próxima al sitio activo de esta proteína.

Hemos establecido que la causa de la supresión del fenotipo morfológico del mutante *ago1-52* en los dobles mutantes *mas5 ago1-52* es la restauración parcial del uso por el espliceosoma del 3'SS genuino del vigésimo intrón del gen *AGO1*, que a su vez conlleva una mayor producción del ARNm de *AGO1* y la proteína AGO1 silvestres. Del análisis de las bases moleculares de la supresión del fenotipo de *ago1-52* y otros mutantes también afectados en el *splicing* de genes concretos hemos concluido que nuestros alelos *mas5* incrementan la fidelidad del *splicing*, favoreciendo el uso de los 5'SS y 3'SS genuinos tras la aparición por mutación de otros nuevos. En consecuencia, en los mutantes *mas5* no se altera globalmente el *splicing*, por lo que crecen como el tipo silvestre o aún mejor. Dado que actualmente es fácil inducir mutaciones mediante CRISPR/Cas, la obtención en líneas celulares de alelos del gen *PRP8* humano equivalentes a los *mas5* de Arabidopsis podría ser de gran utilidad para el estudio y la eventual terapia de enfermedades causadas por defectos en el *splicing* de genes concretos, ya que podrían suprimir sus efectos deletéreos sin perturbar globalmente el *splicing*.

El ribosoma citoplásmico 80S (en adelante, el ribosoma) es la maquinaria ribonucleoproteica que traduce a proteínas los ARNm de los genes nucleares. Está constituido por dos subunidades, que contienen cuatro ARNr y decenas de proteínas ribosómicas. La biogénesis del ribosoma es muy compleja y en ella participan tres ARN polimerasas y cientos de proteínas, conocidas colectivamente como factores de la biogénesis del ribosoma, que regulan de forma coordinada la transcripción de los genes del ADN ribosómico (ADNr), la maduración de los ARNr y el ensamblaje del ribosoma. En esta Tesis hemos caracterizado la función de RIBOSOMAL PROTEIN S24A (RPS24A) y RPS24B, una de las cuales está siempre presente, como componente estructural, en la subunidad menor del ribosoma de Arabidopsis. Los genes parálogos *RPS24A* y *RPS24B* son casi idénticos. El gen *RPS24* humano y el *Rps24* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son de copia única y codifican una proteína con un papel dual, ya que no solo es un componente estructural del ribosoma sino también un factor de su biogénesis, que actúa en la maduración del ARNr 18S.

Hemos caracterizado funcionalmente los genes parálogos *RPS24A* y *RPS24B* de *Arabidopsis* mediante abordajes genéticos y moleculares. Hemos obtenido alelos mutantes de ambos genes, probablemente nullos, y comprobado que su fenotipo morfológico es similar al de los alelos mutantes de genes implicados en la maquinaria de la traducción. Hemos concluido, tras intentar obtener dobles mutantes *rps24a rps24b*, que *Arabidopsis* necesita al menos dos copias silvestres de alguno de sus dos genes *RPS24* para su viabilidad, y tres para su desarrollo normal. Estos resultados indican que *RPS24A* y *RPS24B* presentan haploinsuficiencia combinada; *RPS24*, su ortólogo humano, es de copia única y haploinsuficiente.

Nuestro estudio de los mutantes *rps24a* y *rps24b* ha revelado defectos en la maduración de sus ARNr: en estas estirpes se acumulan precursores del ARNr 18S y está incrementada la transcripción del ADNr 45S, que codifica los tres ARNr mayores (25S, 18S y 5,8S). Estos resultados sugieren funciones extrarribosómicas de *RPS24A* y *RPS24B*, en el procesamiento del pre-ARNr 45S y en la represión de la transcripción del ADNr 45S. Hemos observado fenotipos morfológicos y moleculares sinérgicos en las combinaciones dobles de *rps24b* con alelos mutantes de genes que codifican otros factores de la biogénesis del ribosoma. Hemos demostrado que *RPS24A* y *RPS24B* no solo juegan un papel estructural en el ribosoma, sino que actúan también como factores de la biogénesis del ribosoma, tal como hacen sus ortólogos humano y de la levadura.