



Universidad Miguel Hernández de Elche

Análisis funcional de *RRP8* y desarrollo de un método basado en la PCR digital para el análisis del número de copias del ADNr 45S

Juan Felipe Gallego Serna

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Curso académico 2022-2023

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

ROSA MICOL PONCE, Investigadora postdoctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Juan Felipe Gallego Serna como Trabajo de Fin del Máster en Biotecnología y 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



Rosa Micol Ponce

Elche, 1 de septiembre de 2023.

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La biogénesis del ribosoma es un proceso esencial y complejo que tiene lugar de manera altamente regulada en todas las células de cualquier organismo vivo. Ribosomal RNA Processing 8 (Rrp8p) es una metiltransferasa de ARN ribosómico en la levadura y en humanos. Con este Trabajo de Fin de Máster hemos contribuido a la caracterización de *RRP8* en *Arabidopsis*. Hemos predicho *in silico* la función y localización suborganular de *RRP8*, hemos confirmado el alelismo de *rrp8-1* y *rrp8-2*, dos alelos insercionales que interrumpen el gen *RRP8*, hemos contribuido a la caracterización de líneas transgénicas para la sobreexpresión de *RRP8* y el rescate de sus alelos mutantes y hemos iniciado la construcción de un transgén para establecer la localización subcelular de la proteína *RRP8*. Hemos obtenido dobles mutantes entre los mutantes *rrp8* y otros mutantes de pérdida de función en genes involucrados en la biogénesis del ribosoma. Hemos analizado también la expresión del ADNr 45S en los mutantes *rrp8* y en otros mutantes afectados en genes implicados en la biogénesis del ribosoma. Por otro lado, hemos desarrollado un método basado en la PCR digital (dPCR) para estimar el número de copias del ADNr 45S presente en estirpes silvestres y mutantes, utilizando los mutantes *fas1* como control, ya que contiene menos copias de este gen que sus ancestros silvestres.

Palabras clave: *Arabidopsis*, ribosoma, ADNr 45S, PCR digital, dPCR, *RRP8*.

Ribosome biogenesis is an essential and complex process that occurs in a highly regulated manner in all cells of any living organism. Ribosomal RNA Processing 8 (Rrp8p) is a ribosomal RNA methyltransferase in yeast and humans. With this Master's thesis we have contributed to the characterization of *RRP8* in *Arabidopsis*. We have predicted in silico the function and suborganular localization of *RRP8*, confirmed the allelism of *rrp8-1* and *rrp8-2*, two insertional alleles that disrupt the *RRP8* gene, contributed to the characterization of transgenic lines for *RRP8* overexpression and the rescue of its mutant alleles, and initiated the construction of a subcellular localization transgene of the *RRP8* protein. We have obtained double mutants between *rrp8* mutants and other loss-of-function mutants in genes involved in ribosome biogenesis. We have also analyzed 45S rDNA expression in *rrp8* mutants and other mutants affected in genes involved in ribosome biogenesis. On the other hand, we have developed a method based on digital PCR (dPCR) to estimate the copy number of 45S rDNA present in several wild-type accessions and in mutant strains, using the *fas1* mutants as control, since they have a reduction in the number of copies of this gene respect to their wild-type backgrounds.

Keywords: *Arabidopsis*, ribosome, 45S rDNA, digital PCR, dPCR, *RRP8*.