

# Estudios sobre la regulación de la expresión génica por microARNs en plantas mediante estrategias bioinformáticas

Lic. Uciel Chorostecki

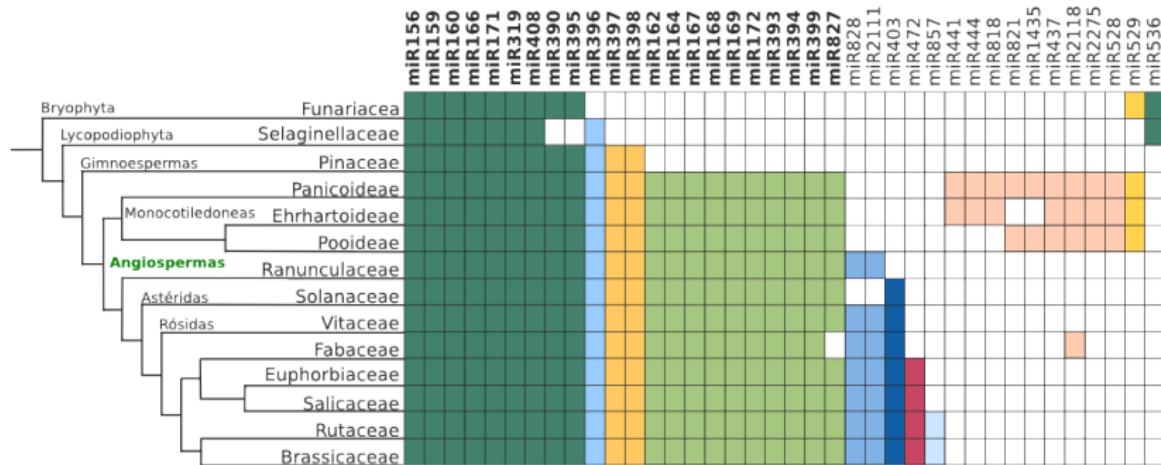
Director Dr. Javier Palatnik

Tesis de Doctorado  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

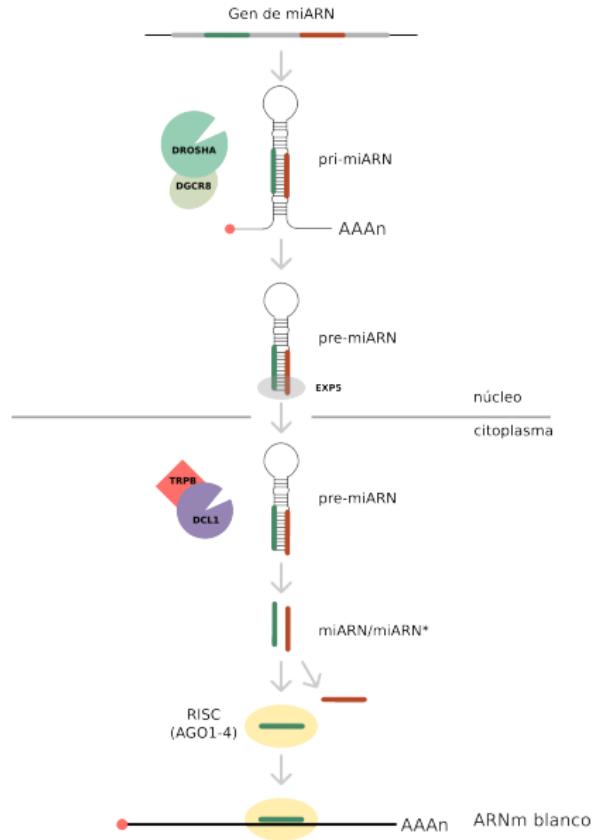
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ Controlan una gran variedad de procesos biológicos, como el desarrollo, la diferenciación y proliferación celular, y respuesta a estrés
- ▶ En *A. thaliana* se han identificado más de 300 miARNs.
- ▶ Están codificados por familias de genes de 1 a 32 miembros que dan lugar a miARNs maduros idénticos o muy similares.
- ▶ Muchos de ellas han aparecido recientemente en la evolución y por lo tanto aparecen en un número pequeño de especies.

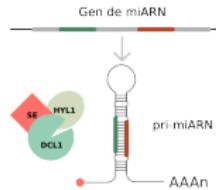
## 22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



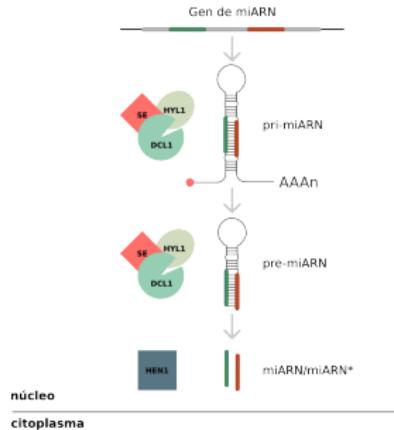
# Procesamiento de miARNs en animales



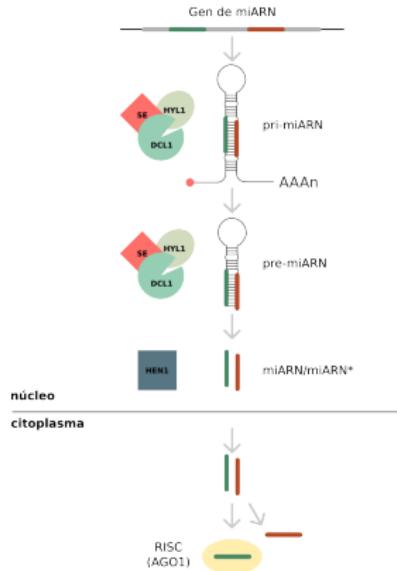
# Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



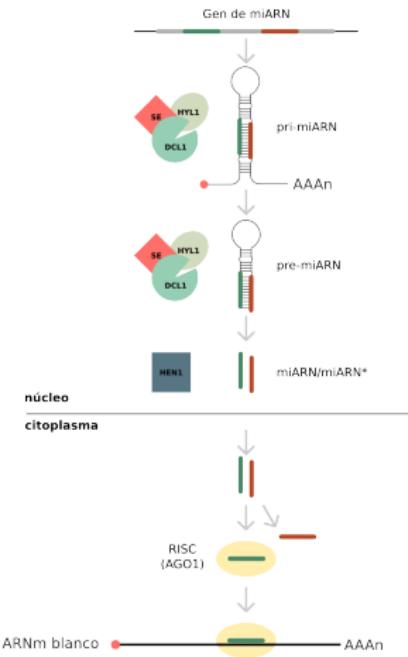
# Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



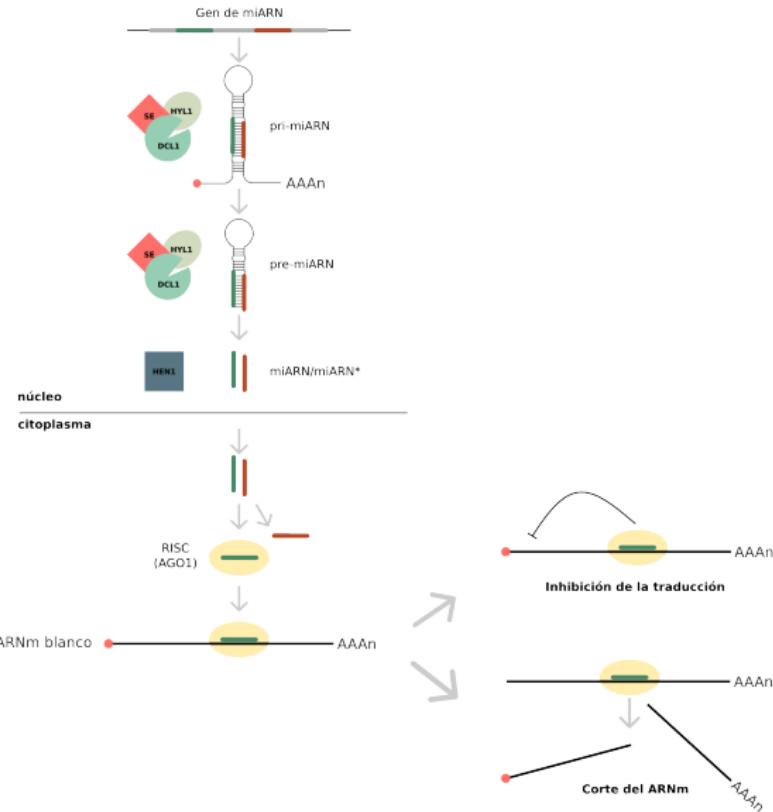
# Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



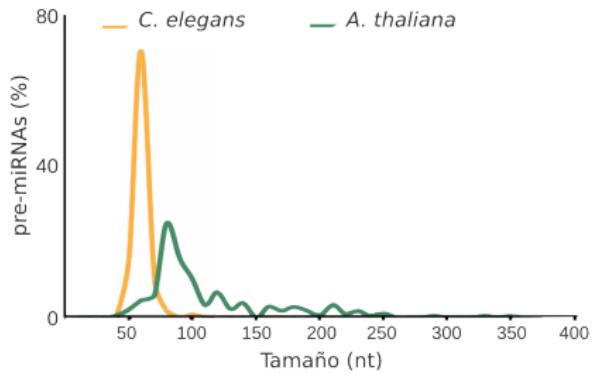
# Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



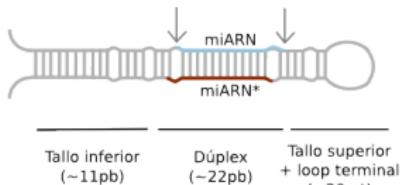
# Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



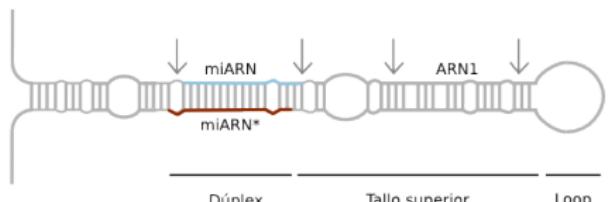
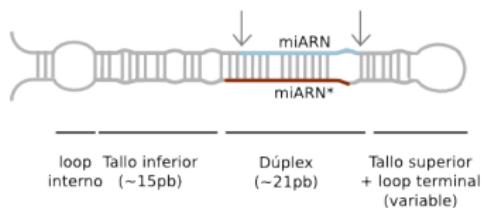
# El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



# Estructuras secundarias de precursores de miARNs



**pre-miARNs de animales**



**pre-miARNs de plantas**

En animales existe un gran número de genes blancos mediado por miARNs y un ARNm puede estar regulado por varios miARNs, en cambio los miARNs en plantas regulan un número limitado de genes blanco.

En animales existe un gran número de genes blancos mediado por miARNs y un ARNm puede estar regulado por varios miARNs, en cambio los miARNs en plantas regulan un número limitado de genes blanco.

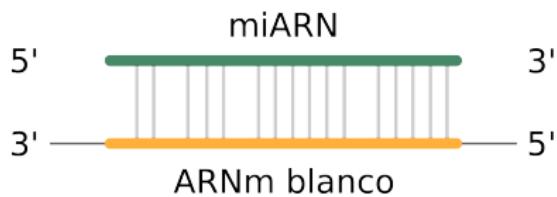
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
  - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
  - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.

En animales existe un gran número de genes blancos mediado por miARNs y un ARNm puede estar regulado por varios miARNs, en cambio los miARNs en plantas regulan un número limitado de genes blanco.

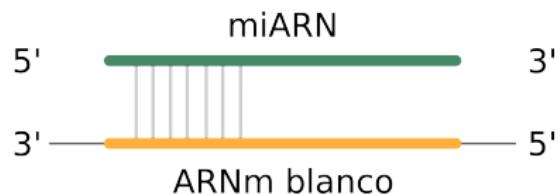
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
  - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
  - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.
- ▶ Regulación de la traducción por miARNs.
  - ▶ Inhibición de la traducción del ARNm blanco por el miARN explica la represión de la expresión de los blancos de miARNs en animales.
  - ▶ Otras veces los miARNs de animales disminuyen la vida media de los transcriptos a los que se unen.

# Predicción de genes blancos de miARNs

## Plantas



## Animales



Diseñar estrategias computacionales para:

- ▶ identificar redes regulatorias de miARNs en plantas.
- ▶ comprender la biogénesis de los miARNs en plantas.

Diseñar estrategias computacionales para:

- ▶ identificar redes regulatorias de miARNs en plantas.
- ▶ comprender la biogénesis de los miARNs en plantas.

## Objetivos específicos

- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

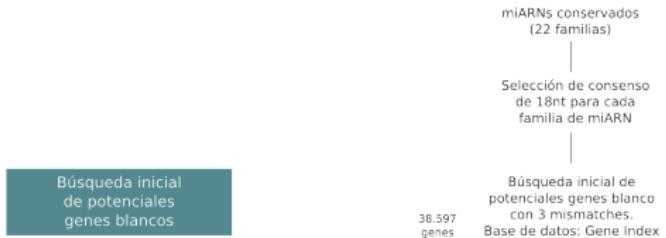
- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

- ▶ Estrategias computacionales donde tienen en cuenta la complementariedad con sus mensajeros blanco.
- ▶ Uno de los mayores desafíos es predecir los genes regulados por estos ARN pequeños con una baja frecuencia de predicciones falsas.

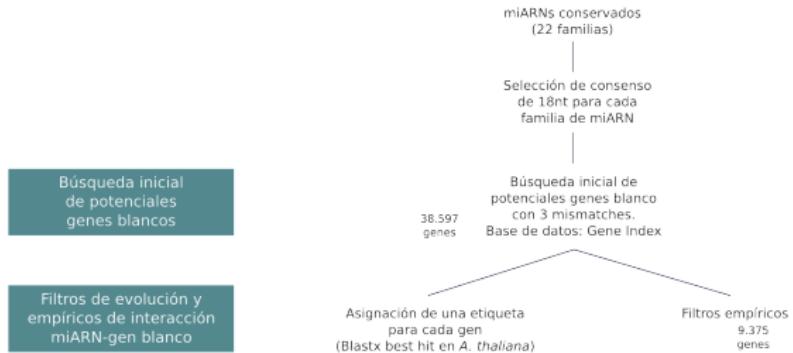
## Conservación y divergencia de miARNs en distintas especies

	BAD	AVG	GOOD	miR319		BAD	AVG	GOOD	miR160
ath	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		ath	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ath	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		ath	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ath	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCUU	U		ath	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ath	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		bdi	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
cpa	mir319	AJUUGGCACUAAGGGAGCUCU			bdi	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
cs1	mir319	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCU			bdi	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			bdi	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			bdi	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319g	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			cpa	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319h	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		cpa	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319j	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		cpa	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319k	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		cpa	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319l	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		cpa	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319m	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		csi	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319n	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		gma	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
gma	mir319q	JUUGGCACUAAGGGAGCUCUC			gma	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mdm	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		gma	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mdm	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		gma	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mdm	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		gma	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mdm	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC	U		gma	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mtr	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mtr	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mtr	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
osa	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
mir319b		JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ppc	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mdm	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319e	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319f	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319g	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			mtr	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319h	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
ptc	mir319i	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
sly	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
sly	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
sly	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
sly	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			osa	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160b	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319f	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319g	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160e	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
vvi	mir319h	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			vvi	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
zma	mir319a	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			zma	m1R160a	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
zma	mir319c	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			zma	m1R160c	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
zma	mir319b	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			zma	m1R160d	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
zma	mir319d	JUUGGCACUAAGGGAGCUCCC			zma	m1R160f	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		
cons		*****			zma	m1R160g	UGCUCGGCUCCCUGUAGUAGCC		

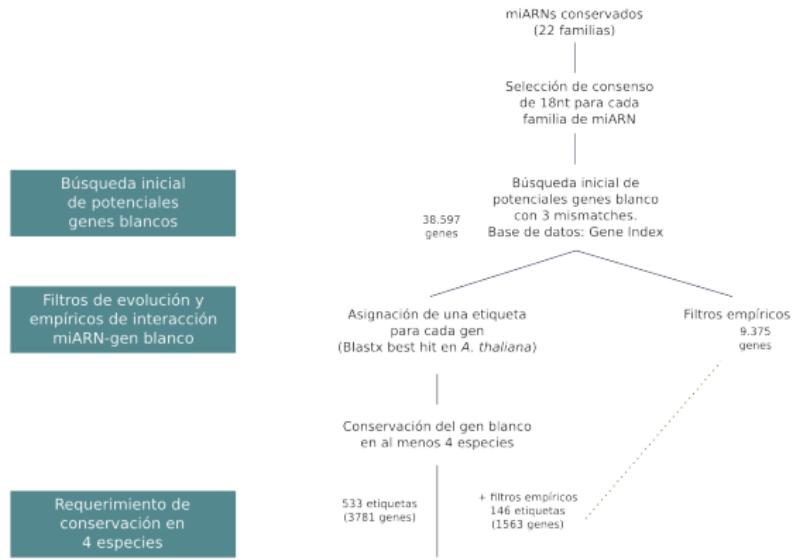
# Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



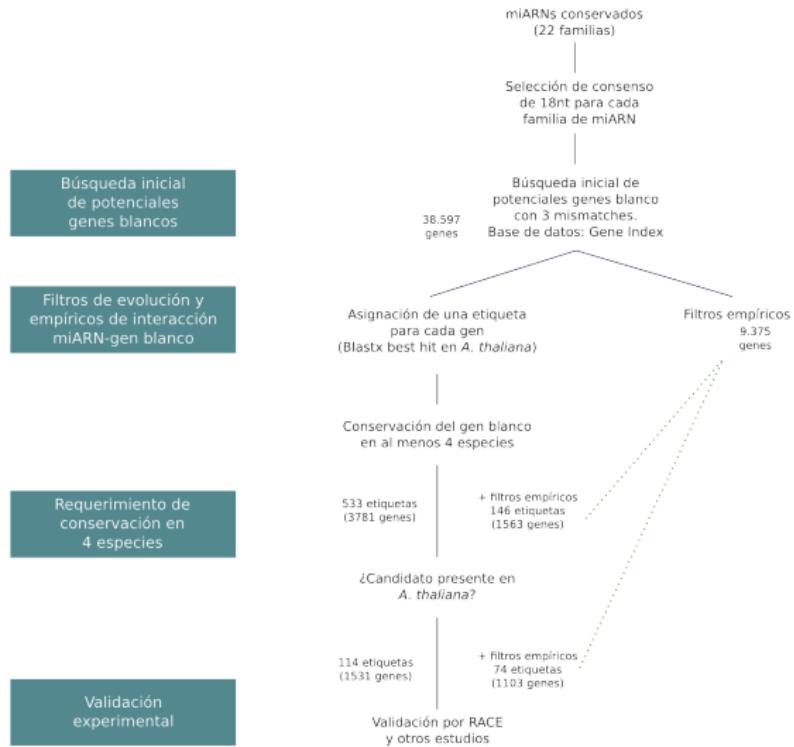
# Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



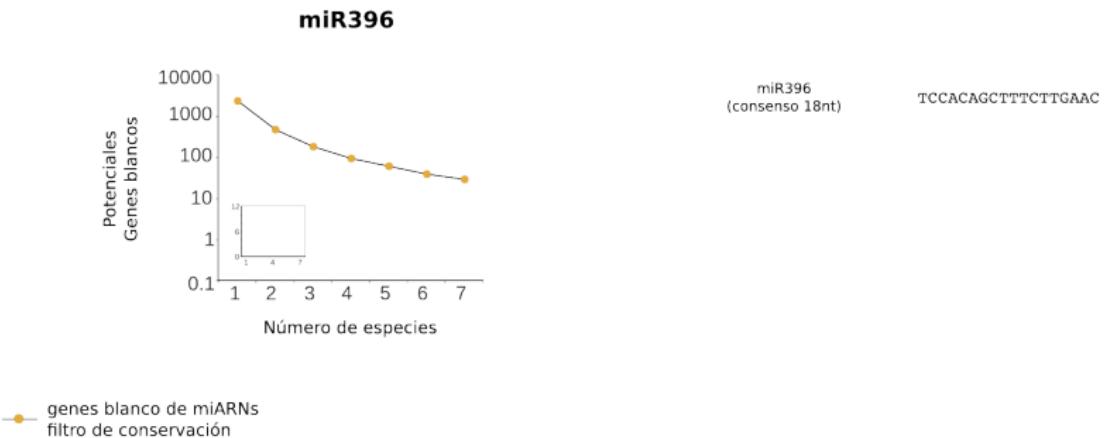
# Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



# Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



# Conservación de la interacción en distintas especies

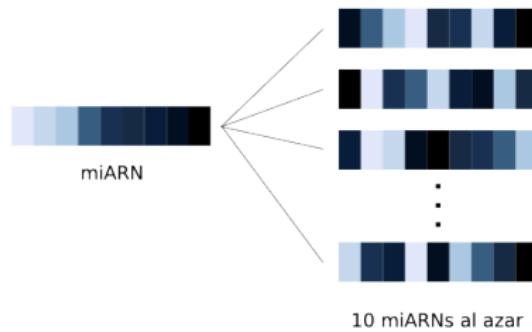


# miARN consenso de 18 nt

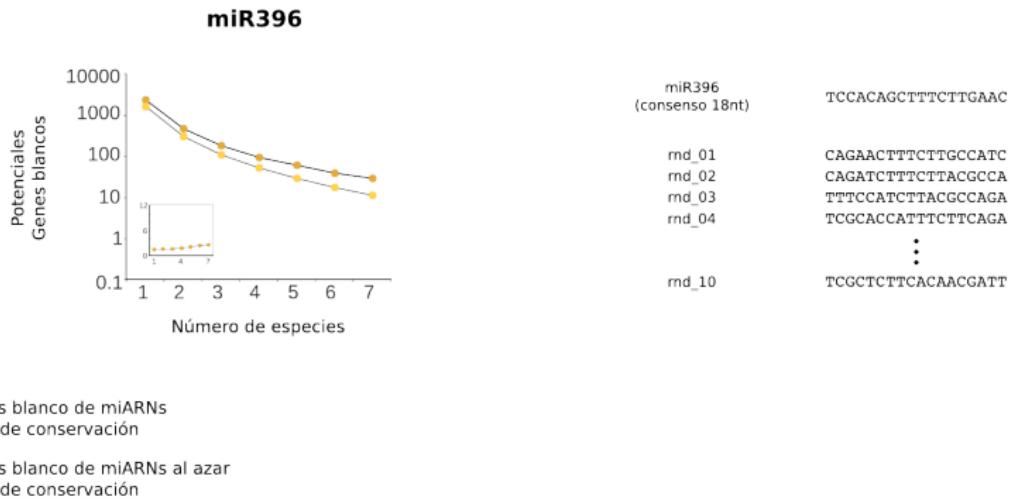


miARN

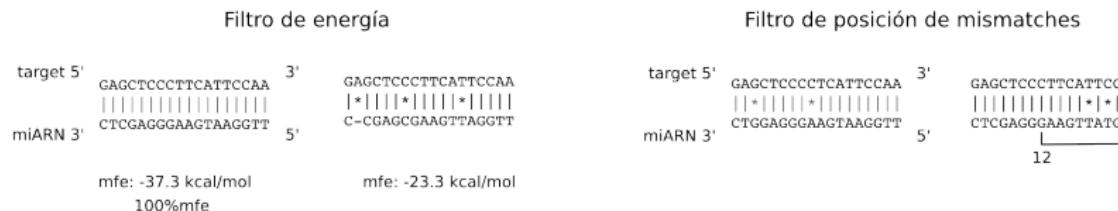
## Control: miARN al azar



# La relación señal/ruido incrementa al aumentar el número de especies

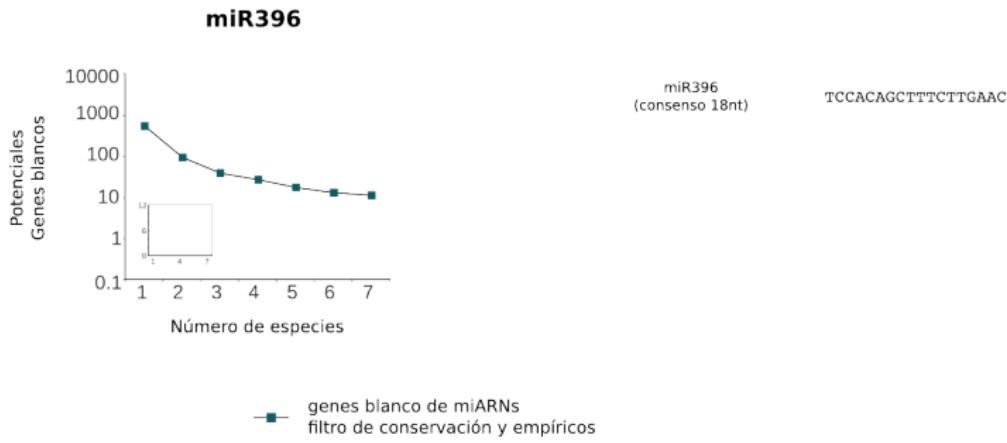


# Parámetros empíricos deducidos de interacciones miARN-gen blanco validadas experimentalmente.



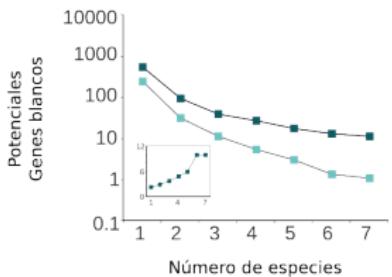


## Selección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



# Al aplicar filtros empíricos y de conservación la relación señal/ruido aumenta

## miR396



miR396  
(consenso 18nt)

TCCACAGCTTCTTGAAAC

rnd\_01

CAGAACTTCTTGCATC

rnd\_02

CAGATCTTCTTACGCCA

rnd\_03

TTTCCATCTTACGCCAGA

rnd\_04

TCGCACCATTCTTCAGA

rnd\_10

TCGCTCTTCACAACGATT

⋮

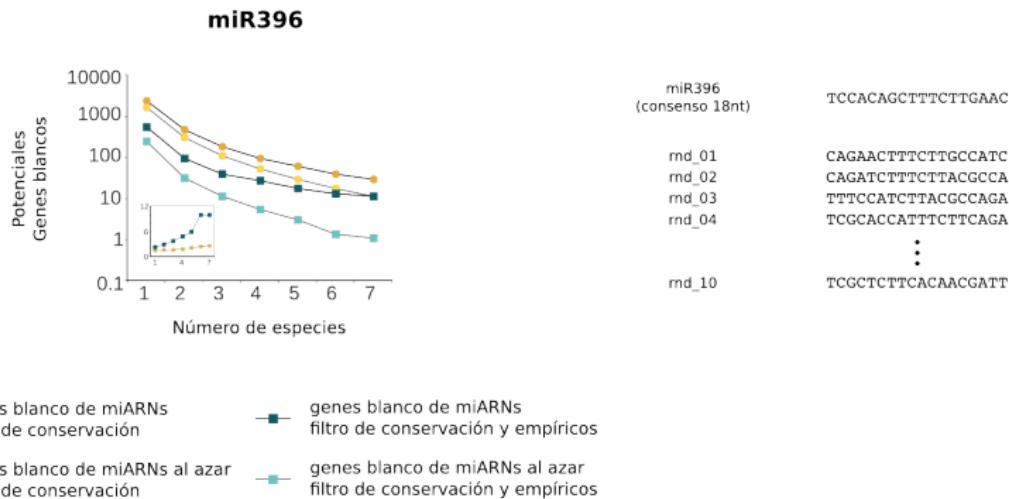
- genes blanco de miARNs filtro de conservación y empíricos
- genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación y empíricos

CONICET

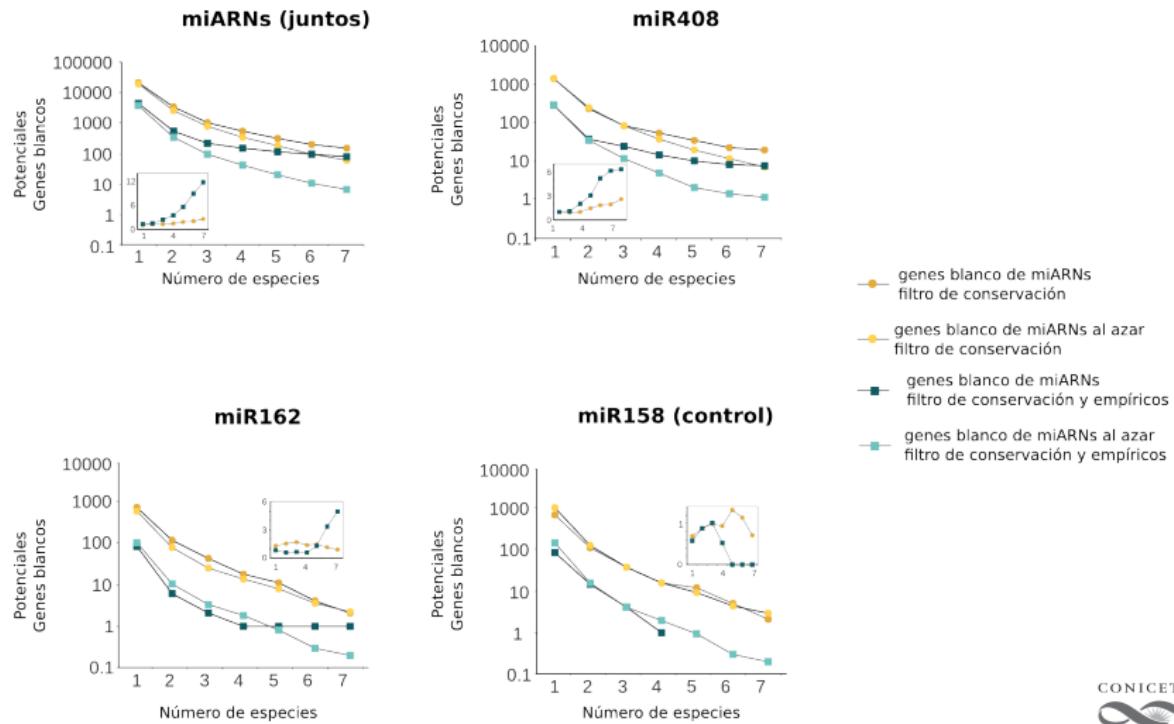


I B R

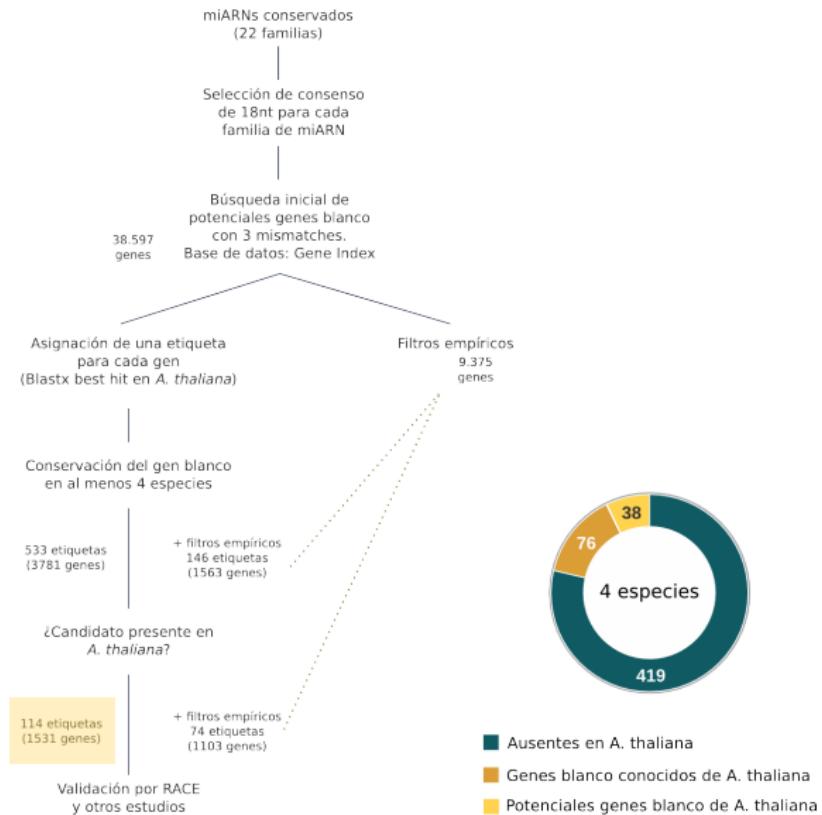
# Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos



# El número de genes blancos candidatos y la relación señal/ruido es variable entre los distintos miARNs

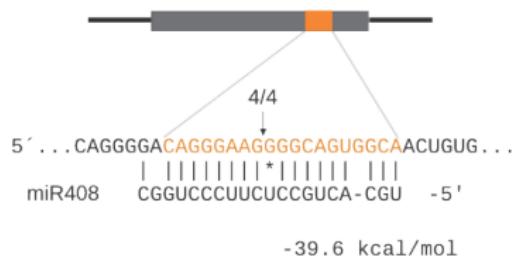


# Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva



# Se validaron 6 nuevos genes blancos en *A. thaliana*

## PAA2 (At5g21930)



<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAGGGAAAGGGGCAGUGGCA
<i>Capsicum annuum</i>	CAGCGAAGAACAGUUGCA
<i>Glycine max</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Gossypium raimondii</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Haseolus vulgaris</i>	UAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Ipomoea nil</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Lactuca sativa</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Medicago truncatula</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Saccharum officinarum</i>	UAGGGAAAGAACAGUGACA
<i>Solanum lycopersicum</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Solanum tuberosum</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Sorghum bicolor</i>	UAGGGAAAGAACAGUGACA
<i>Theobroma cacao</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA
<i>Vitis vinifera</i>	CAGGGAAAGAGGGCAGUUGCA

# ¿Pueden los miARNs en Angiospermas regular genes específicos de Solanaceae?

miR398 → CSD2      Todas las Angioespermas

miR398 → ?      Específico de Solanacea

# Identificación de genes blancos específicos de Solanaceae

Genes blanco de miARNs candidatos

Genes blanco presente en al menos tres especies de Solanaceae

132 genes

Genes blanco específicos de Solanaceae?  
41 genes

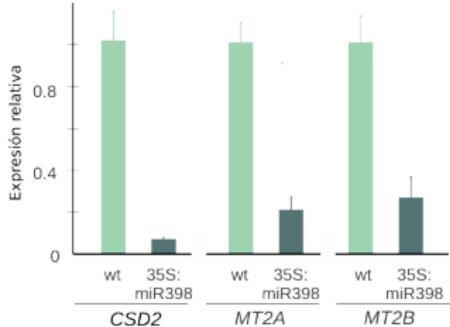
MT2A

5' ...GGUGCUU**GGGGUGGGACCUGAGAAAGAC**AAGCU...  
miR398            UUCCCCA--CUGGACUCUUGUGU-5'  
-35.9 kcal/mol

MT2B

5' ...GGUGCUU**GGGGUGGGACCUGAGAACAC**CCGCU...  
miR398            UUCCCCA--CUGGACUCUUGUGU-5'  
-37.7 kcal/mol

Validación experimental



*Capsicum annuum* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC  
*Nicotiana benthamiana* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC  
*Nicotiana tabacum* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC  
*Petunia hybrida* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC  
*Solanum lycopersicum* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC  
*Solanum tuberosum* GGGGUGGGGACCUGAGAAAGAC

# Herramienta web para la predicción de genes blancos regulados por miARNs en plantas

Desarrollamos ComTAR, que permite realizar la búsqueda de:

Desarrollamos ComTAR, que permite realizar la búsqueda de:

- ▶ potenciales genes blancos a partir de un miARN.
- ▶ familias de potenciales genes blancos de un miARN.
- ▶ un gen de interés para ver si es potencial gen blanco de algún miARN conservado
- ▶ nuevos ARNs pequeños

# Herramienta web para la predicción de genes blancos regulados por miARNs en plantas

Desarrollamos ComTAR, que permite realizar la búsqueda de:

- ▶ potenciales genes blancos a partir de un miARN.
- ▶ familias de potenciales genes blancos de un miARN.
- ▶ un gen de interés para ver si es potencial gen blanco de algún miARN conservado
- ▶ nuevos ARNs pequeños

▶ <http://rnabiology.ibr-conicet.gov.ar/comtar>

# Potenciales genes blancos del miR398



conserved plant miRNA target prediction tool

First potential miRNA targets

First potential miRNA target families

Is this gene a potential miRNA target?

[Go Back](#)

Arabidopsis Tag [?]	Count [?]	Species [?]	Target description [?]	Gene family [?]	Alignments [?]
AT1G12520	16	Show/Hide	copper chaperone for SOD1		<a href="#">View</a>
AT1G08830	9	Show/Hide	copper/zinc superoxide dismutase 1		<a href="#">View</a>
AT3G15640	4	Show/Hide	Rubredoxin-like superfamily protein		<a href="#">View</a>
AT1G80230	3	Show/Hide	Rubredoxin-like superfamily protein		<a href="#">View</a>
AT2G26975	3	Show/Hide	Ctr copper transporter family		<a href="#">View</a>
AT2G40340	3	Show/Hide	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AP2-EREBP Transcription Factor Family	<a href="#">View</a>
AT3G27200	3	Show/Hide	Cupredoxin superfamily protein	Miscellaneous Membrane Protein Families	<a href="#">View</a>
AT3G43860	3	Show/Hide	glycosyl hydrolase 9A4	Glycoside Hydrolase Gene Families	<a href="#">View</a>
AT4G00050	3	Show/Hide	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factor	<a href="#">View</a>
AT5G12220	3	Show/Hide	las1-like family protein		<a href="#">View</a>

# ComTAR permite visualizar el alineamiento, energía de hibridación en cada especie

Sequence ID	Species	5'-target-3' Alignment 3'-miRNA-5' [•]	MFE [•]
Aquica_013_00504.1	Aquilegia coerulea	TTGGCGGACCTGGGAACAT *   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-31.7
471402	Arabidopsis lyrata	TGGGAGACCTGGGAACAC *   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-32.1
AT1G12520.1	Arabidopsis thaliana	TGGGAGACCTGGGAACAC *   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-32.1
Brad5g18900.3	Brachypodium distachyon	TTGGTGAACCTGGGAACGC **   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-33.5
Bra026968	Brassica rapa	TGGGAGACCTGGGAACAC *   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-32.5
Carubv10011818m	Capsella rubella	TGGGAGACCTGGGAACAC *   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-32.1
evm.model.superconig_29.47	Carica papaya	TAGGTGAACCTGGAGACAT **   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-34.2
Ciclev10021134m	Citrus clementina	TTGGTGAACCTGGGAACAC **   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-33.9
orange1.1g020436m	Citrus sinensis	TTGGTGAACCTGGGAACAg **   *   *   *   * CCCACTGGACTCTTGTC	-32.7

- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.

# Conclusiones I

- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.
- ▶ Identificamos nuevos genes blancos en *A. thaliana* y se validaron experimentalmente varios de ellos.

miARN	Consenso	Targets conocidos   Validados por nosotros
mir156	GACAGAAAGAGAGTGAGCA	fatores de transcripción SPL
mir159	TTCGATTTGAAGGGAGCTC	fatores de transcripción MYB, NOZZLE (NZL)
mir160	GCCTGGCTCCCTGTATGC	fatores de transcripción ARF
mir162	CGATAAACCTCTGCATCC	DCL1
mir164	GGAGAGACCAAGGGCACGTC	fatores de transcripción NAC
mir166	CGGACCAAGGCCATTATCC	fatores de transcripción HDZip
mir167	GAAGCTGCCAGCAATGATC	fatores de transcripción ARF, IAA-ALANINE RESISTANT 3 (IAR3)
mir168	CGCTTGGTCCAGGTCCGGG	AGO1
mir169	AGCCAAGAGTAGCTTGCC	fatores de transcripción CCAAT-HAP2
mir171	TTGACCCGTGCCAAATATC	fatores de transcripción GRAS
mir172	GAATCTTGATGATCTCG	fatores de transcripción AP2
mir319	TGGACTGAAGGGAGCTCC	fatores de transcripción TCP
mir390	AGCTCAGGAGGGATAGCG	TAS RNA
mir393	CCAANGGGATCGCATTGA	TIR1 proteins, F-BOX proteins
mir394	TGGCATTCGTGTCACCTC	proteínas F-BOX
mir395	TGAAGTGTGGGGGAC	ATP-sulfurilasas, transportadores de sulfato
mir396	TCCACACGTTCTTGAC	fatores de transcripción GRF, MMG4.7, FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU)
mir397	CATTGACTGCAGCGTTGA	Laccases
mir398	GTGTTTCAGGTCACCCC	Cu/Zn SODs, Cyt C oxidase protein subunit, Chaperona de cobre (CCS)
mir399	GCCAAGGGAGATTGGCC	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina
mir408	TGCACTGCCCTTCCCTG	Blue copper proteins, Laccases, P-TYPE ATPase (PAA2), PAC1
mir827	TAGATGACCATCAGCAA	SPX proteins

- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.
- ▶ Identificamos nuevos genes blancos en *A. thaliana* y se validaron experimentalmente varios de ellos.
- ▶ Esta estrategia puede ser utilizada para identificar genes blancos presentes en un grupo específico de especies.

- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.
- ▶ Identificamos nuevos genes blancos en *A. thaliana* y se validaron experimentalmente varios de ellos.
- ▶ Esta estrategia puede ser utilizada para identificar genes blancos presentes en un grupo específico de especies.
- ▶ Interacciones miARN-gen blanco conservadas probablemente participen en procesos biológicos relevantes.

- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.
- ▶ Identificamos nuevos genes blancos en *A. thaliana* y se validaron experimentalmente varios de ellos.
- ▶ Esta estrategia puede ser utilizada para identificar genes blancos presentes en un grupo específico de especies.
- ▶ Interacciones miARN-gen blanco conservadas probablemente participen en procesos biológicos relevantes.
- ▶ Desarrollamos una herramienta web denominada comTAR.

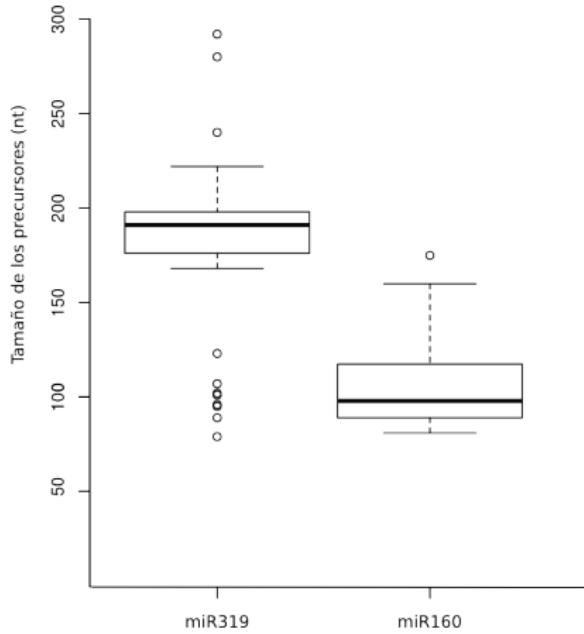
## Objetivos específicos

- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

## Objetivos específicos

- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

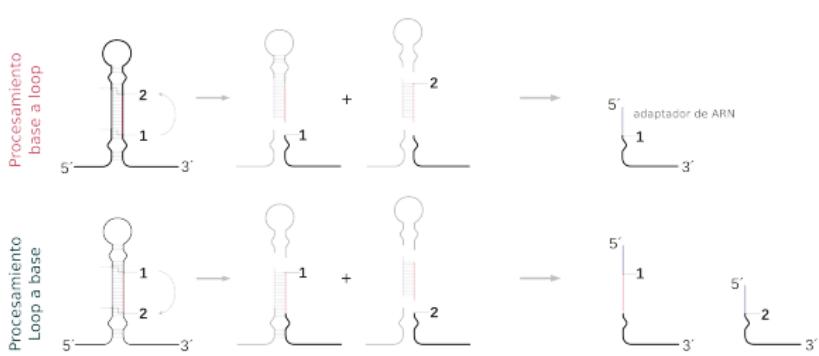
## Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



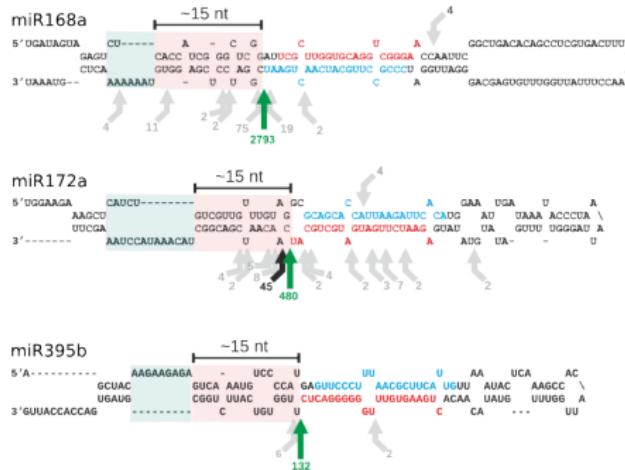
# Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



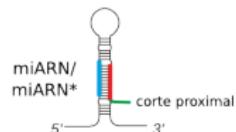
# Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



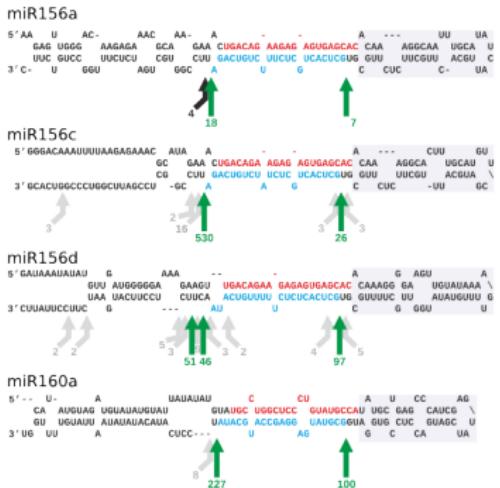
# Los precursores que se procesan desde la base tienen un sólo pico de señal en las bibliotecas de SPARE



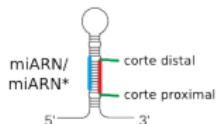
Detección solamente  
del corte proximal



# Los precursores que se procesan desde el loop tienen al menos dos picos de señal en las bibliotecas de SPARE

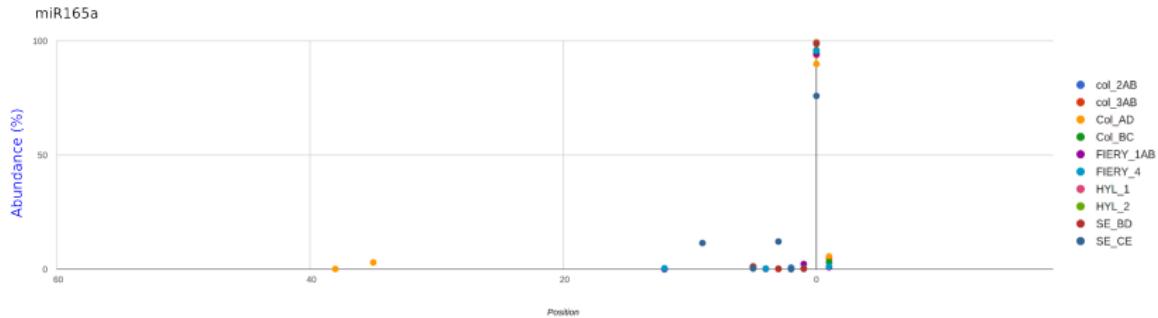


Detección de ambos cortes,  
proximal y distal



Bibliotecas	Muestras	Secuencias totales	Secuencias que mapean los precursores	Secuencias únicas que mapean los precursores
col_2AB	Col-0 réplica 1. Control de fiery y hyl1	13911694	80166	308
col_3AB	Col-0 réplica 2. Control de fiery y hyl1	16618008	126556	426
Col_AD	Col-0 réplica 1. Control de se	13758567	119368	496
Col_BC	Col-0 réplica 2. Control de se	14648459	241973	553
FIERY_1AB	fiery réplica 1	9832923	470789	1655
FIERY_4	fiery réplica 2	23529725	821562	1752
HYL_1	hyl1 réplica 1	10171629	45653	316
HYL_2	hyl1 réplica 2	8864406	35860	320
SE_BD	se réplica 1	15291993	299513	639
SE_CE	se réplica 1	25296809	510438	693

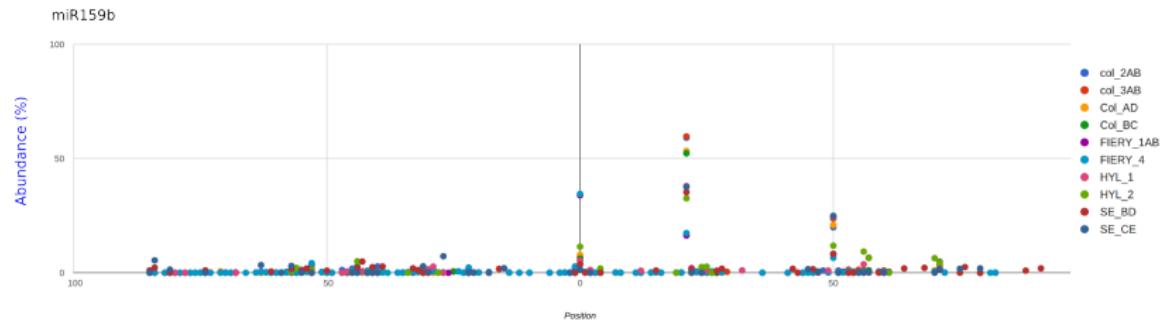
# Visualización de precursores procesados desde la base



Position	col_2AB	col_3AB	Col_AD	Col_BC	FIERY_1AB	FIERY_4	HYL_1	HYL_2	SE_BD	SE_CE
-38	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
-35	0	0	89	0	0	0	0	0	0	0
-12	1	0	0	0	10	147	0	0	0	0
-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	270
-5	29	67	40	26	116	326	2	1	5	9
-4	0	0	0	0	15	111	0	0	0	0
-3	0	0	1	0	0	0	0	1	1	285
-2	0	0	0	0	77	189	0	0	0	1
-1	0	0	0	13	247	141	0	0	1	0
0	2902	4574	2700	3993	10065	29877	317	314	546	1781
1	0	231	169	129	97	387	0	0	0	0

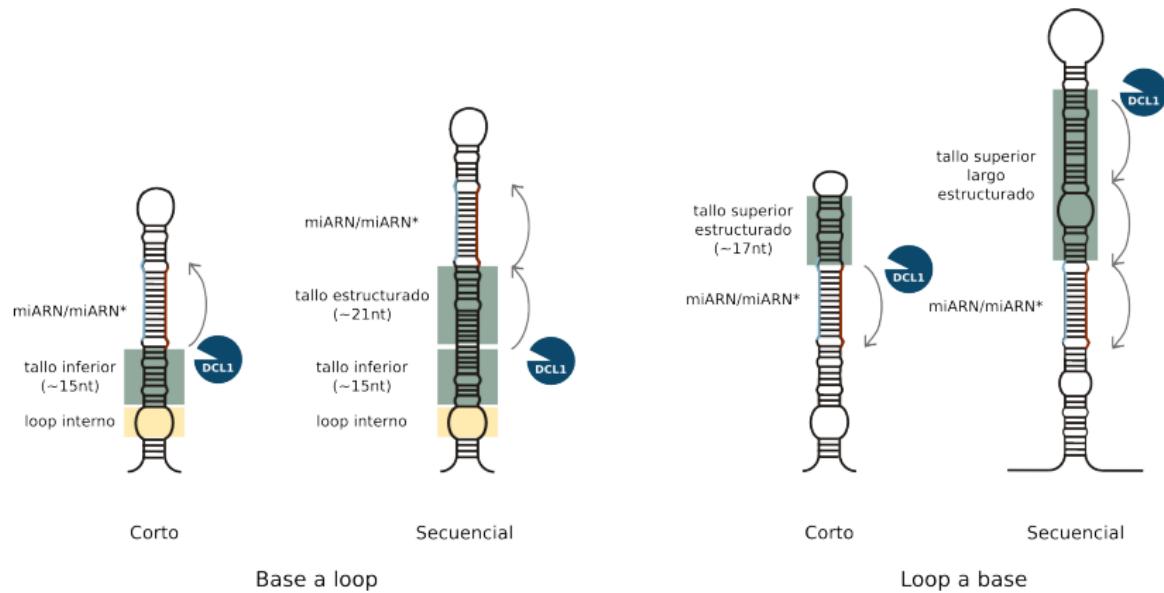


# Visualización de precursores procesados desde el loop



Position	col_2AB	col_3AB	Col_AD	Col_BC	FIERY_1AB	FIERY_4	HYL_1	HYL_2	SE_BD	SE_CE
21	10252	19917	5562	10992	6776	20171	2514	1477	1685	2752
50	3450	7908	2174	5164	3392	7627	1629	538	398	1824
0	1209	1319	822	1300	14091	40065	353	518	172	101
71	451	1070	233	1028	538	1713	302	201	70	125
53	9	461	1	64	250	822	0	0	1	0
55	92	450	16	157	365	639	52	24	17	1
57	32	379	66	218	115	227	442	294	6	23

## Conclusiones II

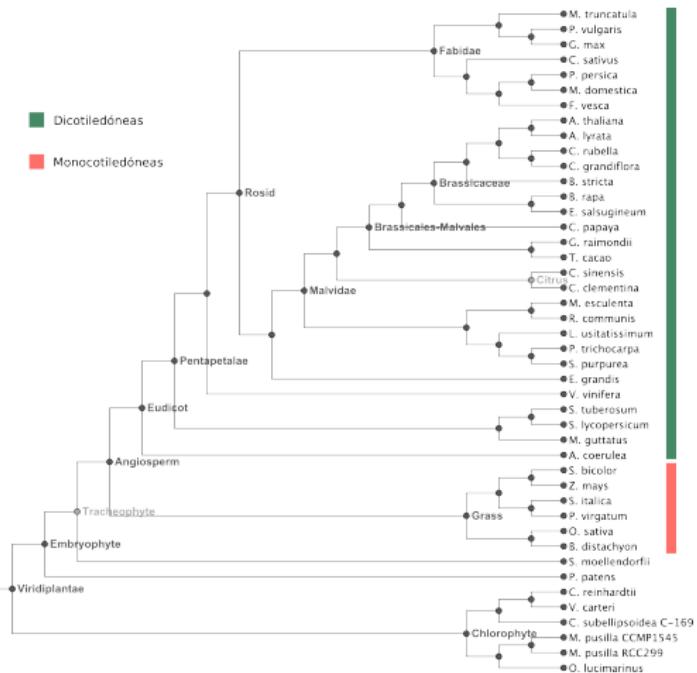


## Objetivos específicos

- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos de procesamiento determinados previamente.

# Especies utilizadas de Phytozome (30 dicotiledóneas y 6 monocotiledóneas)



Anotación arbitraria en miRBASE (Base de datos de secuencias y anotación de miARNs).

- ▶ Longitud de precursores.
- ▶ Definición de ortólogos

# ¿Cuál es el ortólogo en otras especies?

Arabidopsis	>ath-MIR160a GUAGUCUGCUCCGUUAUCCGUAAUAGCAGGCCAACGAGUAUUCGAUGACCUCCGGUGGAUGGGCGUAUGAGGAGCCAUGCAGCAAU >ath-MIR160b GUUCGUUGCCUGGUCCCUAUAUGCCACAAGAAAACAUCAUCGUUUAGUUUCAAAAUUCGAUCACUAGUGGCGUACAGAGGUAGUCAAGCAUGAC >ath-MIR160c GUUAUGCCUGGUCCCUAUAUCCACAGAGUGGUACCGAUUUUUGGUUUAUAAUCGGCUCGCCGUUAAGGGAGUCAAGCAUGAC
Arroz	>osa-MIR160a GUGUGCCUGGCUCGUUAUGCCACACAUGUAGACCAACCCAUUGGUUCUGGUUGCCUACUGGGGGCGUGCAAGGACCAAGCAUGC >osa-MIR160b AAGGUUUGGUUUGGUAGUCGGCUUGAGGGUGCUGGCCUCCGUUAUGCCACUCAUGUAGCCAAUCCAUUGGUUGGUUGGUUGGCGUGCAAGGAGCCAAGCAUGCG >osa-MIR160c GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUAUGCCACACUCAUGAGCAACAAUCUCUGCGAGAGGUUGCCUAUGAUUGGUUGGCGUGCACGGAGCCAAGCAUAUCC >osa-MIR160d GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUAUCCACUUCGGUAGCCAAACAUCAUCAGUAGAAACAAUCUGCUUCUCCGGCAAGAUCAUGCAUJUGUUGGUAGUUCUACUGGGGAUGGGCGUGGAGGAGCCAAGCAUGACC >osa-MIR160e GUAGGGGAUAUGCCUGGUCCGUUAUCCGCGUCGCAUGGUUGCCAAUAGAACUCAUCGUACUUCGUUGUUGGGCGUGCGUACGGGUGGCGAGCAUUGCCCUU >osa-MIR160f GGAUUAACCGCUGGUCCUGGUCCGUUAUCCGUACAGAGAAGCGUGCCGUUGGGCGUGCUUCUCCGUUGGUAGGGAGUCAUGCAGGGGUJUGGUUC
Tomate	>Slv-MIR160a CAAGUCGUGUAACGUUAUAGCCUGGUCCGUUAUCCGUAAUAGCAGGUACCGGUAAUUAUUCGAUAGGGGUUUGGUUAUUGGGGUUAUAGGAGCCAAGCAUAUUCGAUUAUCGUUAUAGAUUGUUG

## Conservación de la secuencia primaria del miR172a en distintas especies

ANSWER

[CODE](#)

El miR172a maduro y el miR172a\* están conservados en las distintas especies

Copyright © 2010 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.



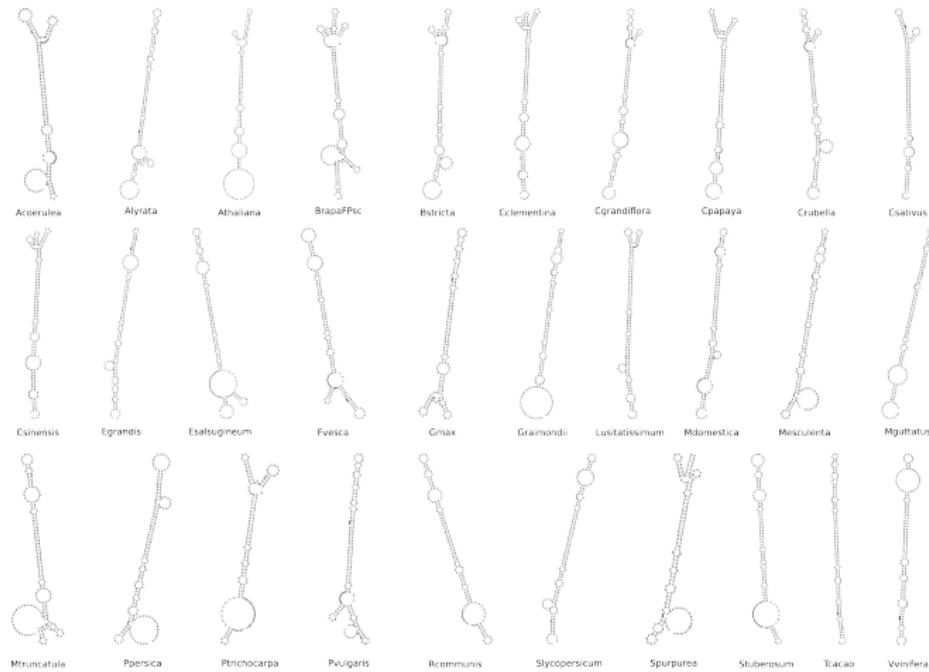
cons

Cola de conservación hacia la izquierda del miARN\* y hacia la derecha del miARN

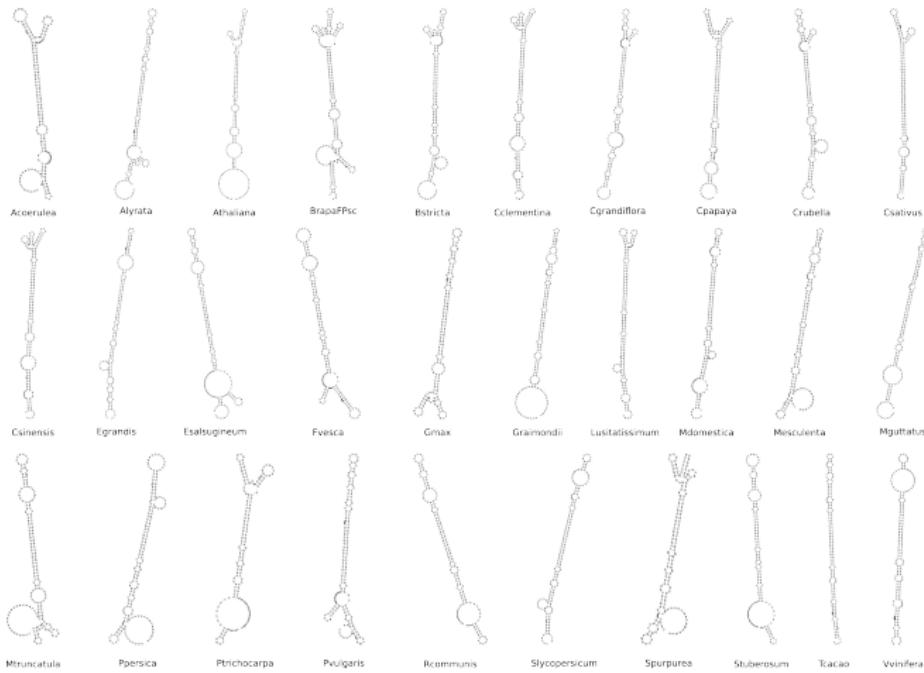
Copyright © 2010 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings. All Rights Reserved.

cons

## Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN\* (miR172a)

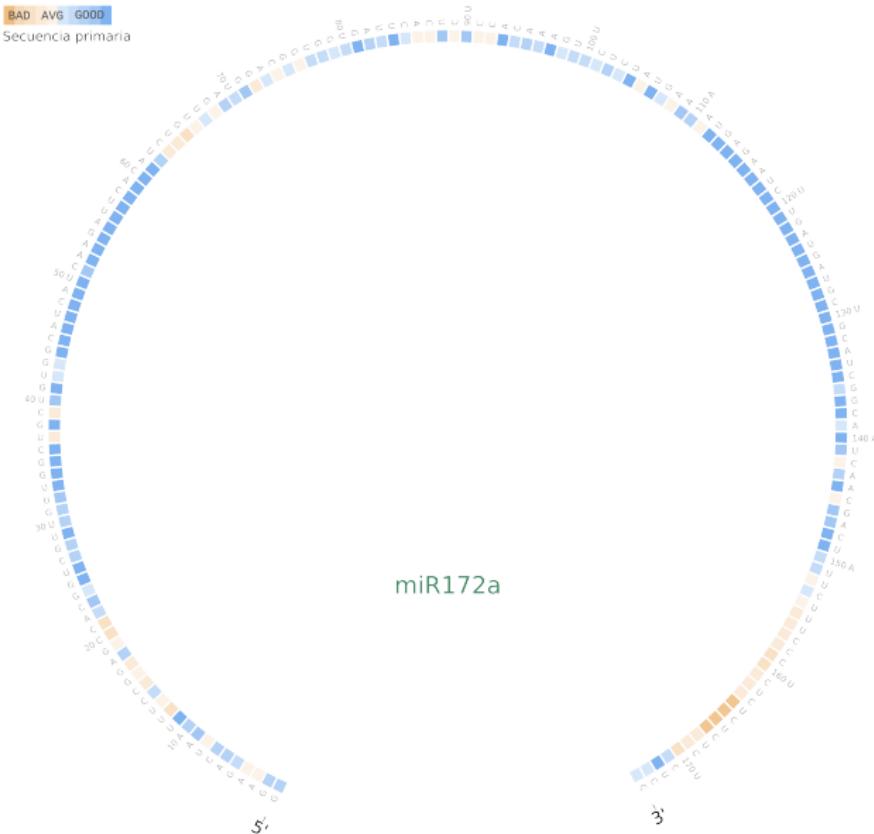


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN\* (miR172a)

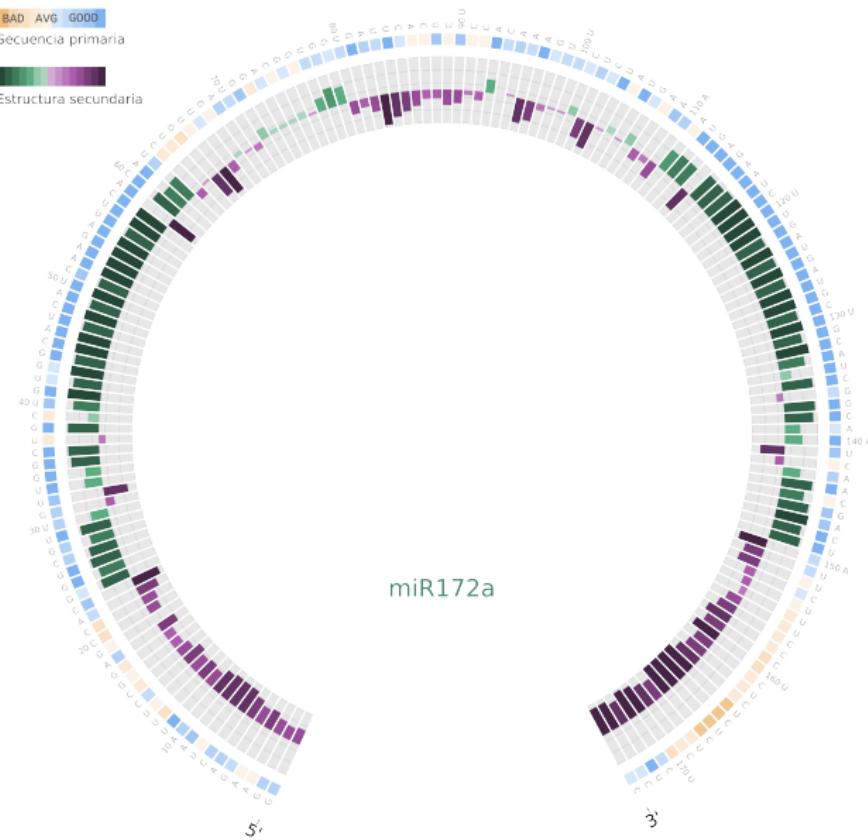


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

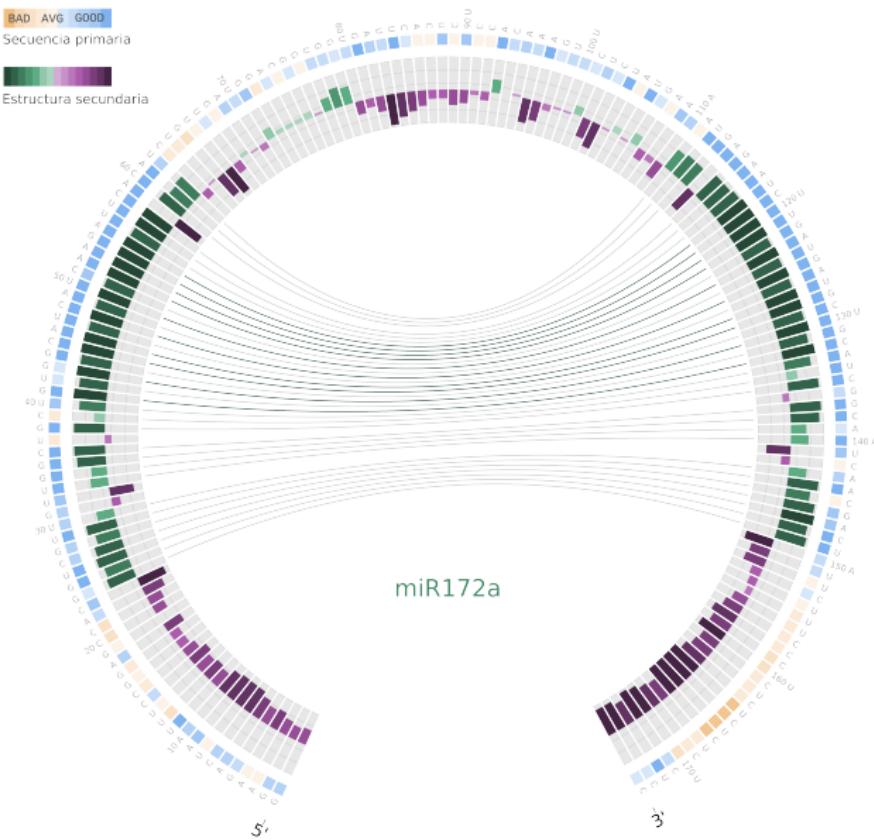
# Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



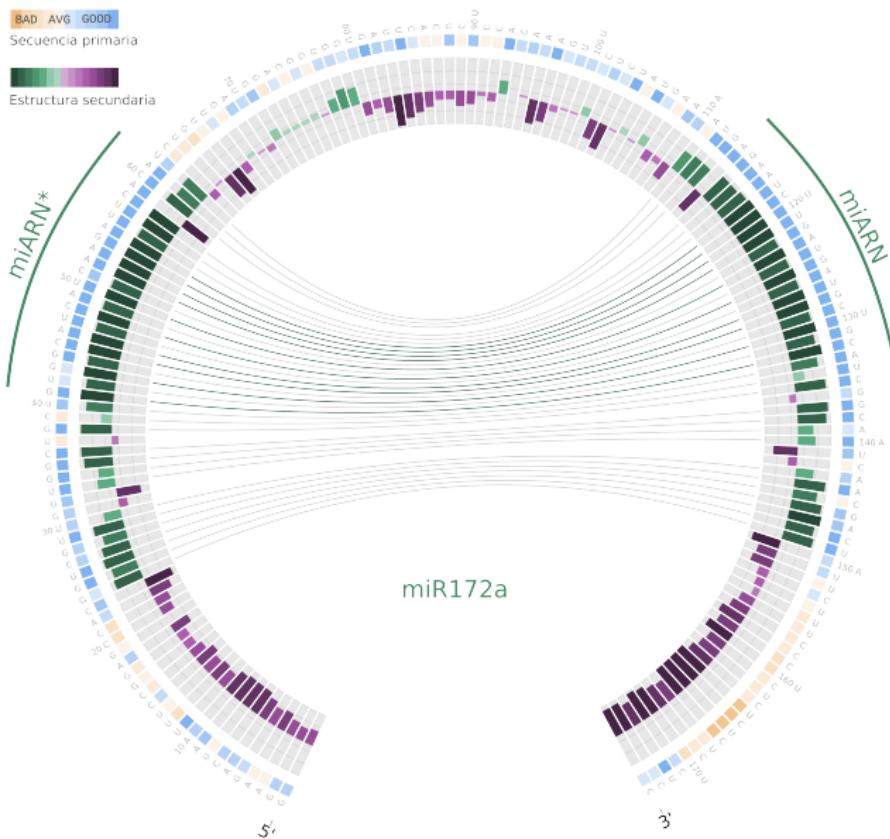
# Frecuencia de bases apareadas y desapareadas



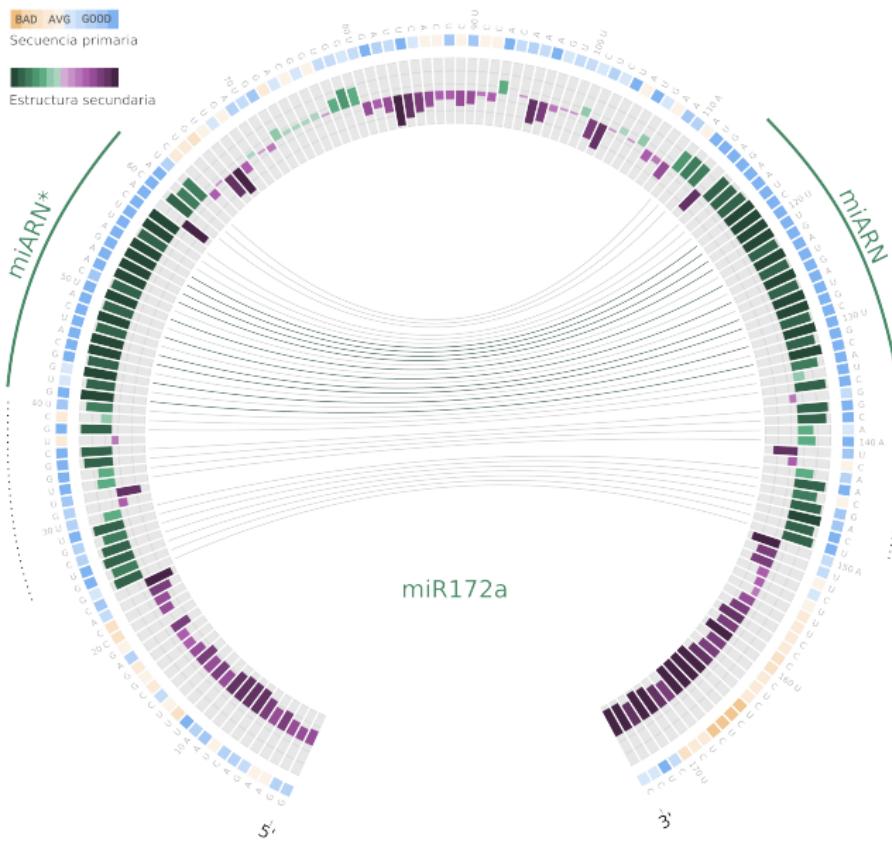
## Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



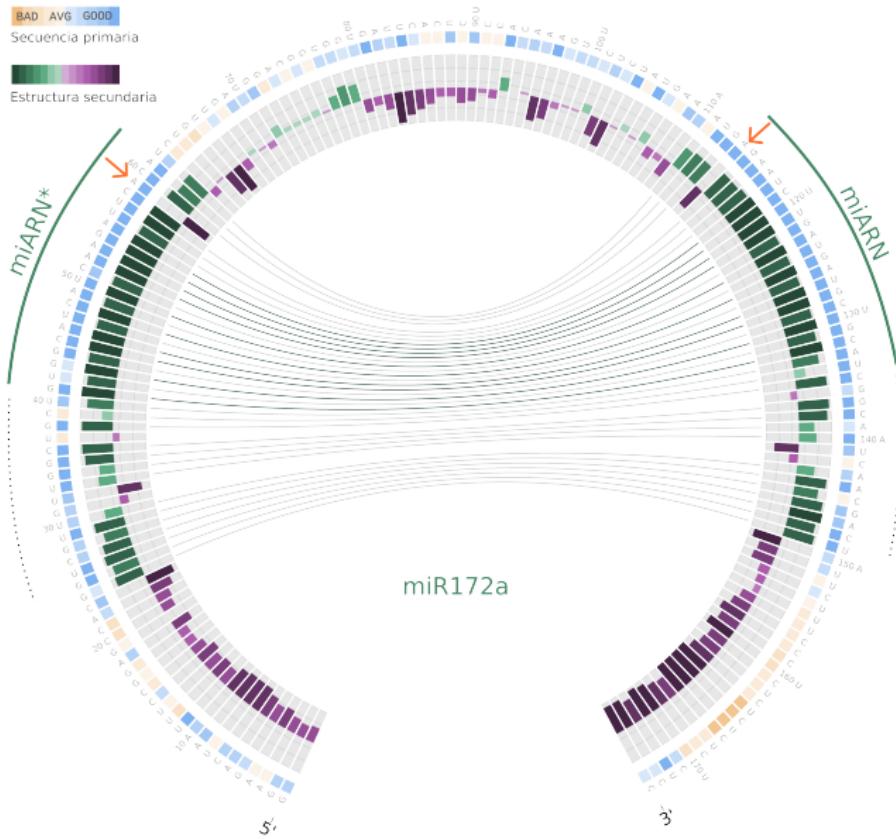
## miARN y miARN\* conservados en secuencia primaria y estructura



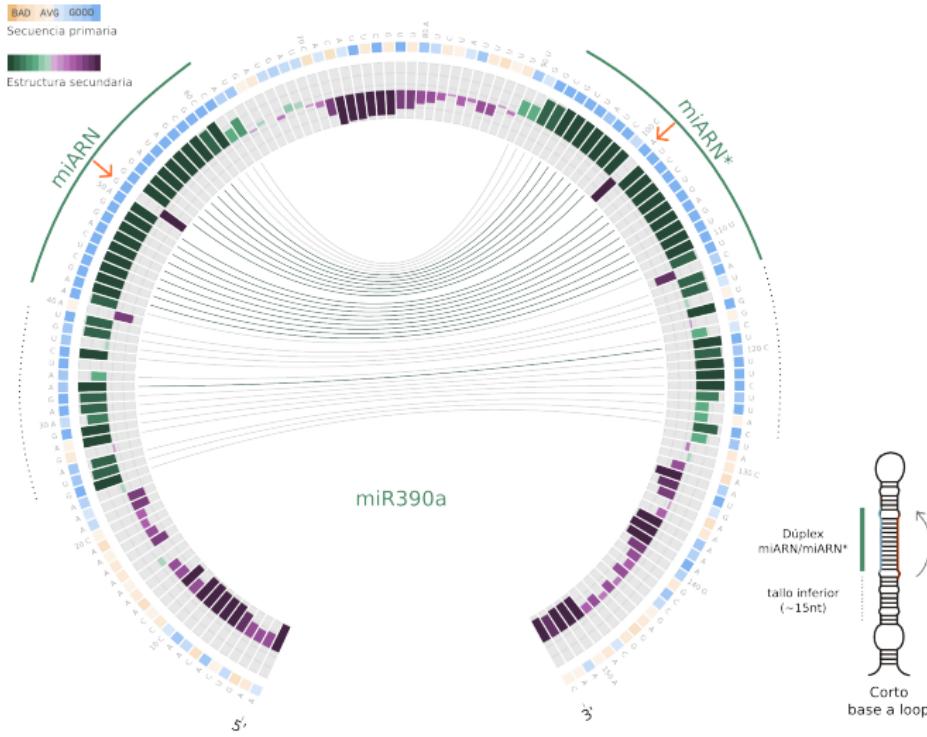
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



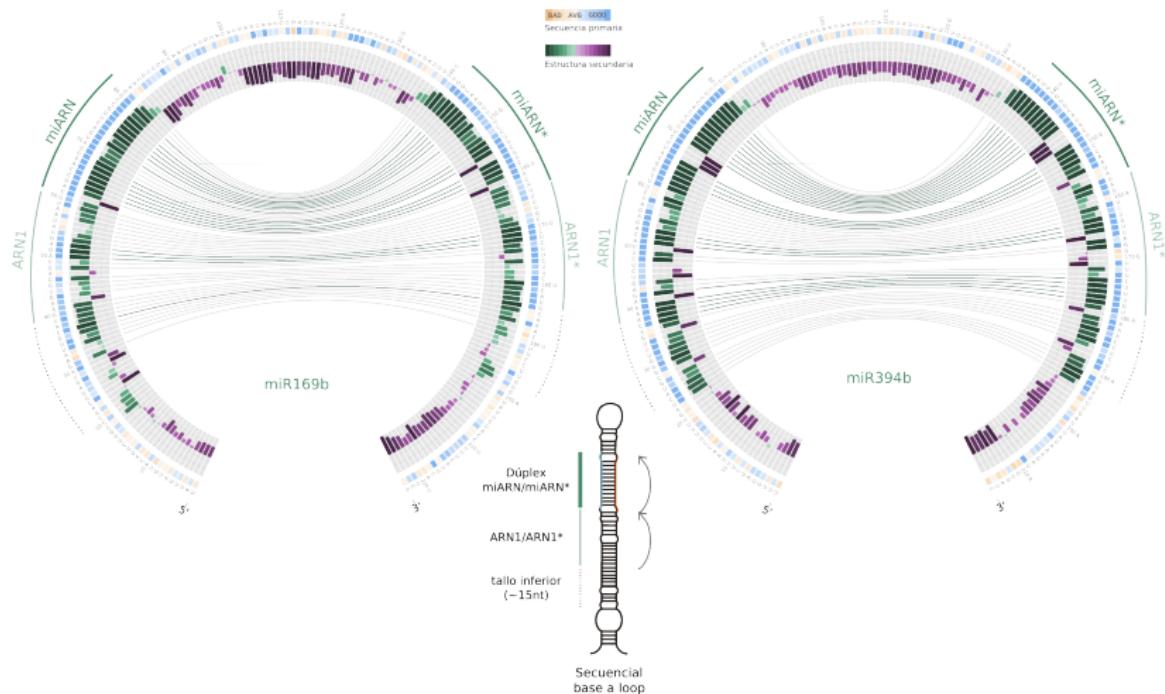
# Mismatches conservados



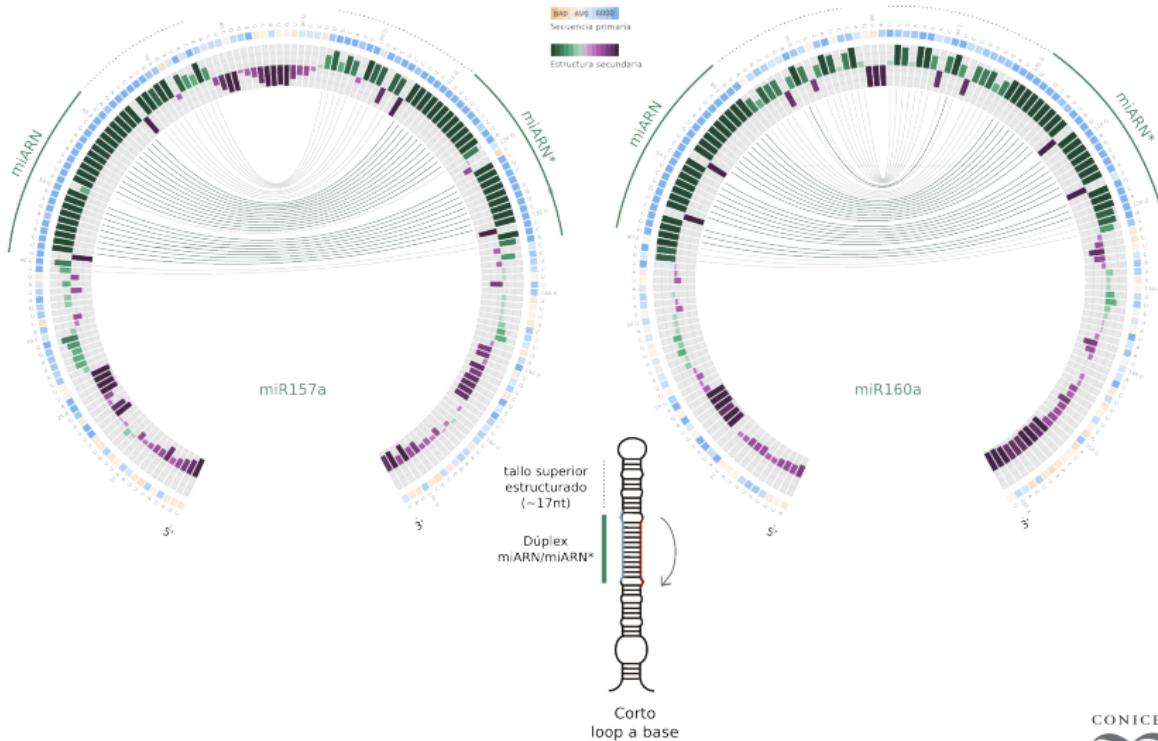
# Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



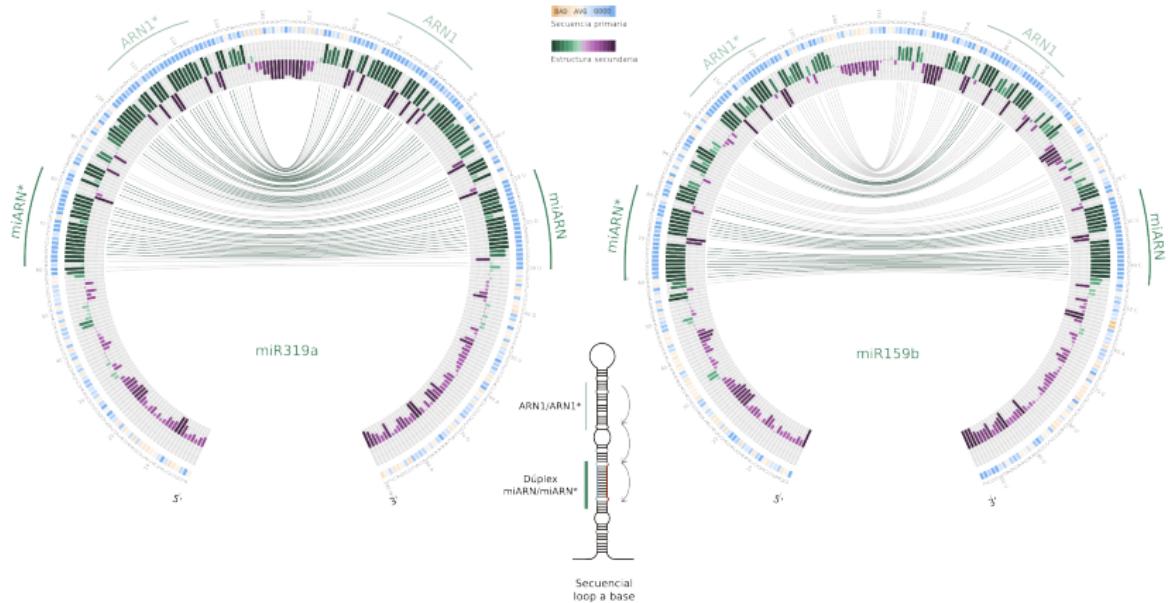
# Precursors que se procesan desde la base en forma secuencial



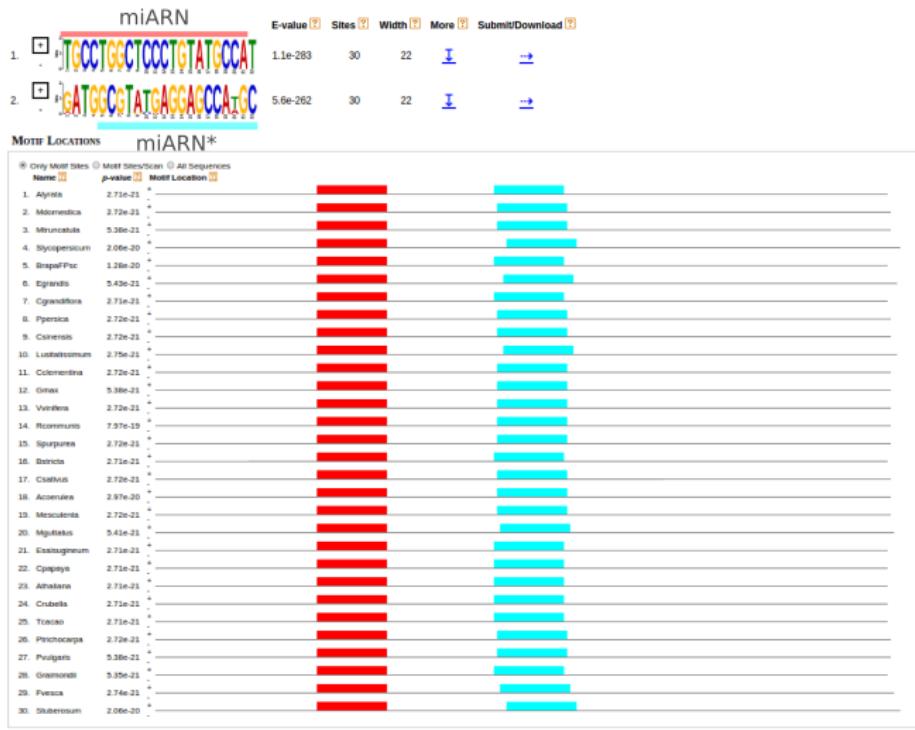
# Precursors que se procesan desde el loop cortos



# Precursors que se procesan desde el loop en forma secuencial



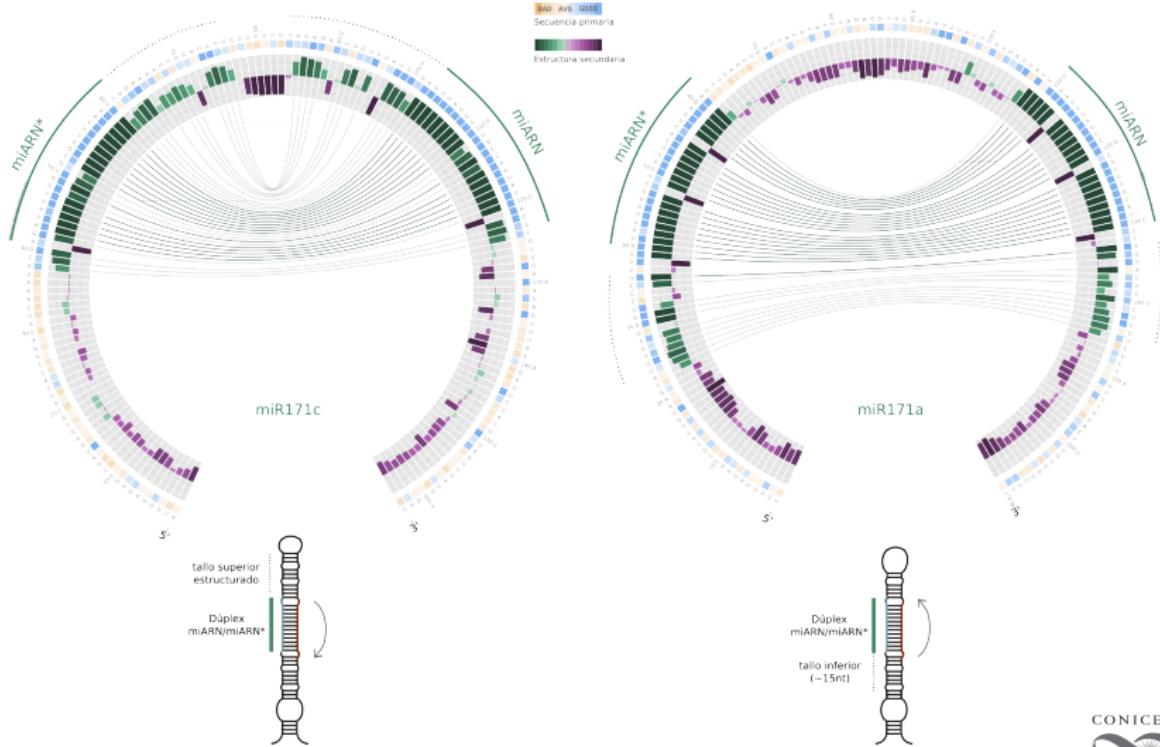
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



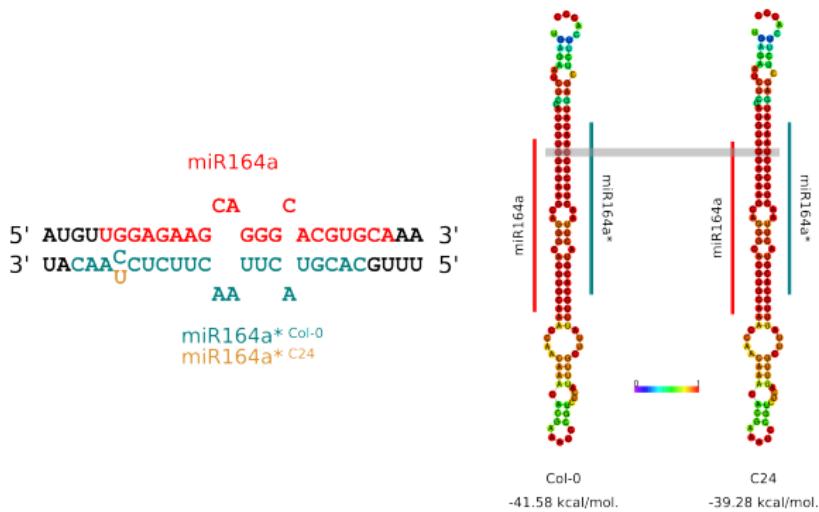
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



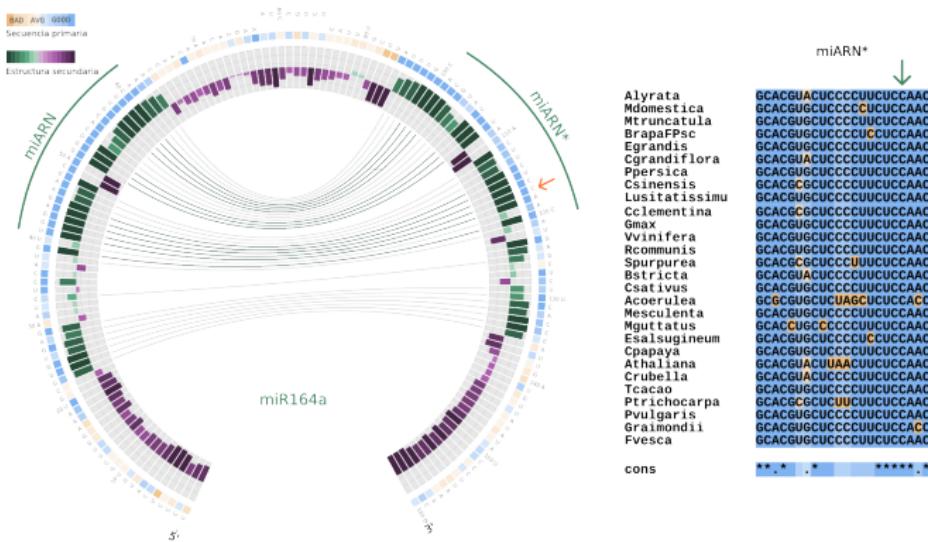
# Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



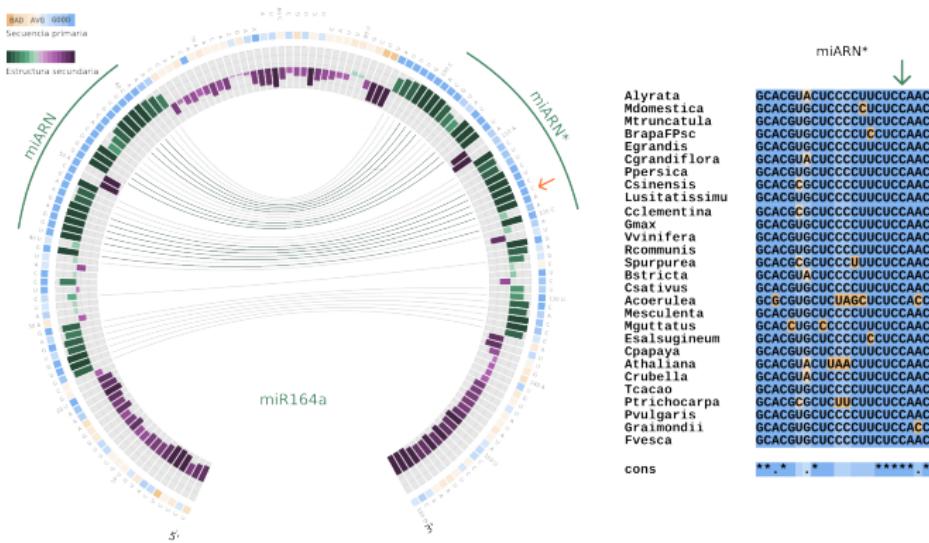
# Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



# Posición \*2 del miR164a\* está conservada en dicotiledóneas

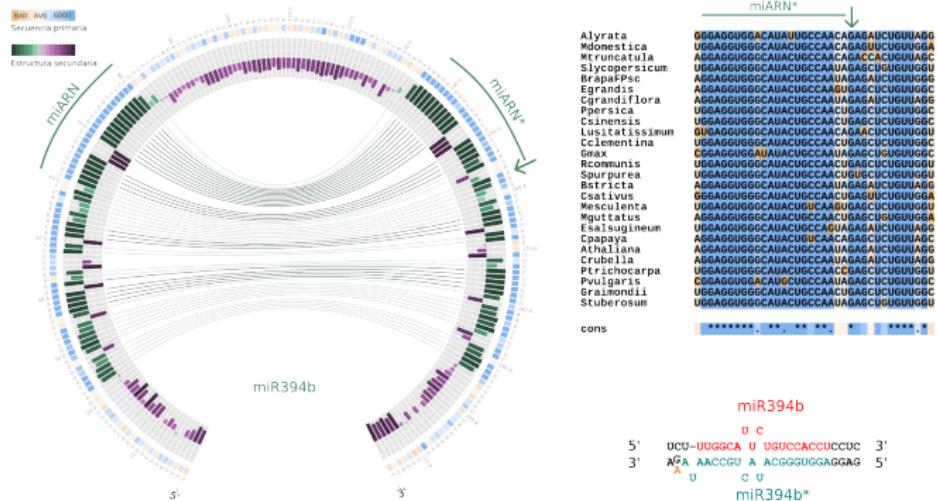


# Posición \*2 del miR164a\* está conservada en dicotiledóneas

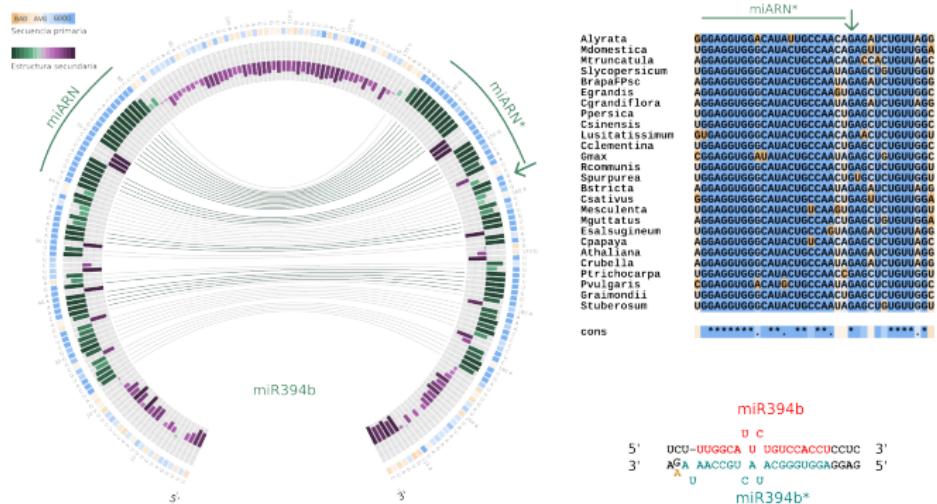


La posición \*2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

# Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

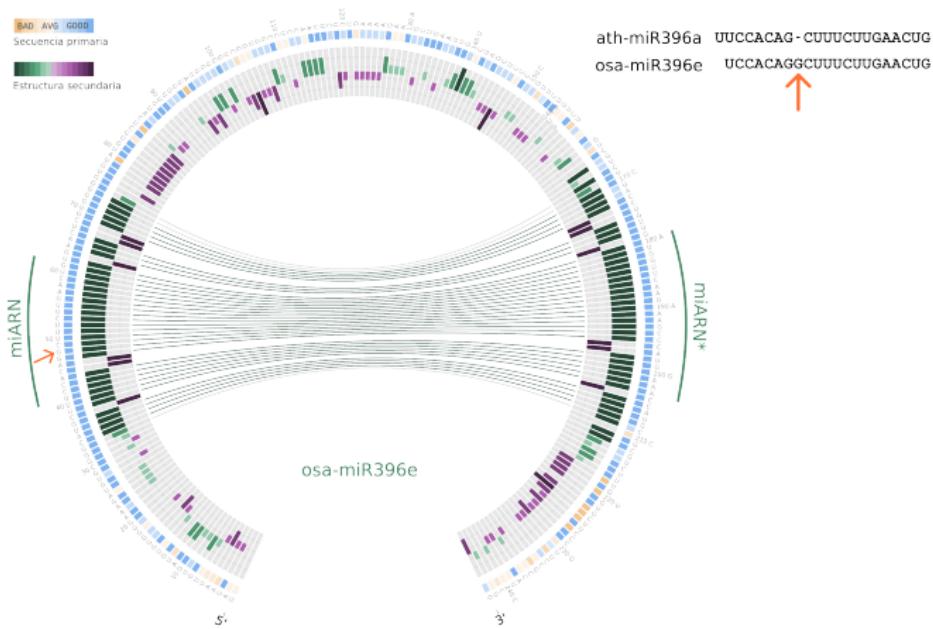


# Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

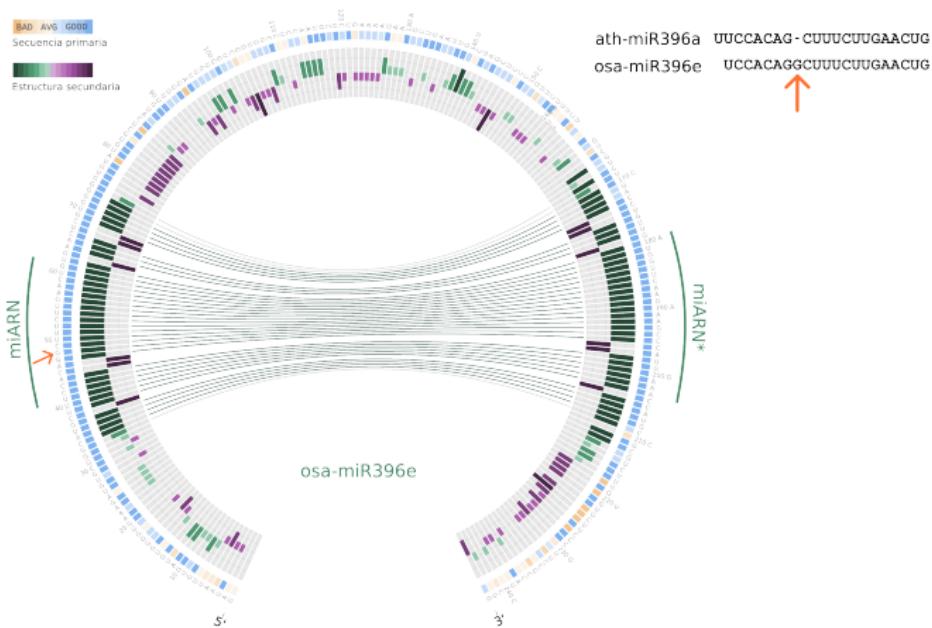


Mutaciones simples en el precursor (fuera del dúplex) puede afectar el reconocimiento de DICER.

# Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



# Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



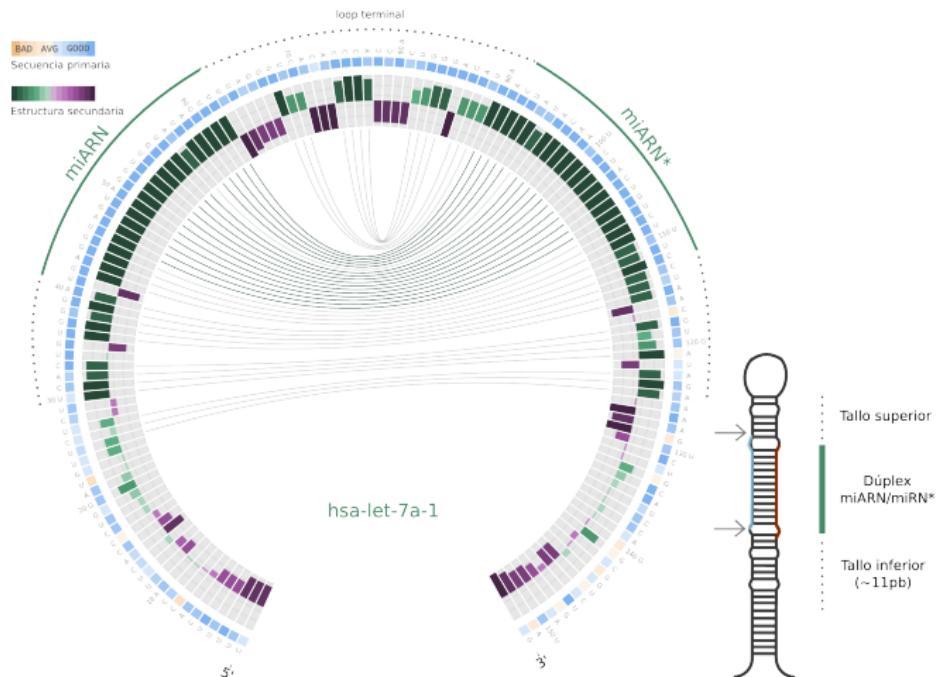
El nucleótido extra, que le da identidad a la variante de monocotiledóneas, está conservado.

# ¿Qué sucede con los precursores de miARNs conservados en animales?

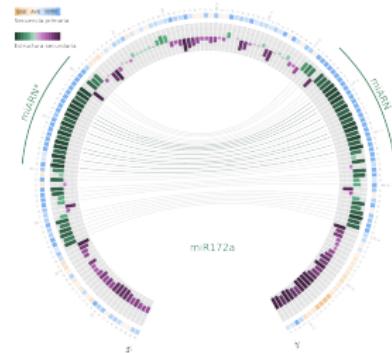
## Animales

Bos taurus  
Canis familiaris  
Equus caballus  
Gallus gallus  
Gorilla gorilla  
Homo sapiens  
Macaca mulatta  
Monodelphis domestica  
Mus musculus  
Ornithorhynchus anatinus  
Petromyzon marinus  
Sus scrofa  
Xenopus tropicalis

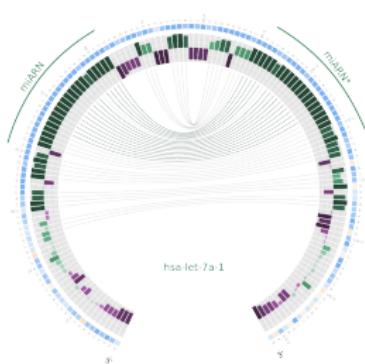
El loop terminal está conservado en la mayoría de los precursores de animales estudiados.



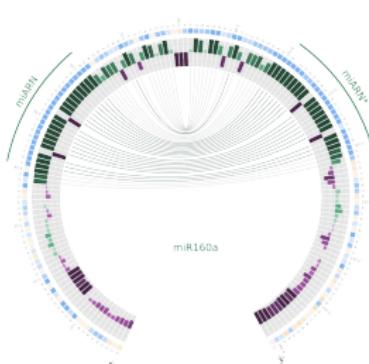
# Circos animales vs plantas



Precursors de plantas.  
Cortos de base a loop



Precursors de animales.



Precursors de plantas.  
Cortos de loop a base

- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.

- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una implementación gráfica para visualizar de manera simple los precursores de miARNs en distintas especies de plantas.



- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una implementación gráfica para visualizar de manera simple los precursores de miARNs en distintas especies de plantas.
  - ▶ Lo utilizamos para caracterizar la evolución de precursores de miARNs en plantas con distintos mecanismos de procesamiento.

- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una implementación gráfica para visualizar de manera simple los precursores de miARNs en distintas especies de plantas.
  - ▶ Lo utilizamos para caracterizar la evolución de precursores de miARNs en plantas con distintos mecanismos de procesamiento.
  - ▶ Estudiamos precursores con mutaciones que afectan al procesamiento de miARNs en plantas. Esta información podría ser utilizada para ayudar en el diseño de miARNs artificiales en distintas especies y aumentar su eficiencia.



- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una implementación gráfica para visualizar de manera simple los precursores de miARNs en distintas especies de plantas.
  - ▶ Lo utilizamos para caracterizar la evolución de precursores de miARNs en plantas con distintos mecanismos de procesamiento.
  - ▶ Estudiamos precursores con mutaciones que afectan al procesamiento de miARNs en plantas. Esta información podría ser utilizada para ayudar en el diseño de miARNs artificiales en distintas especies y aumentar su eficiencia.
  - ▶ Pudimos utilizar este mismo enfoque para estudiar precursores de miARNs en animales.

- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.

- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

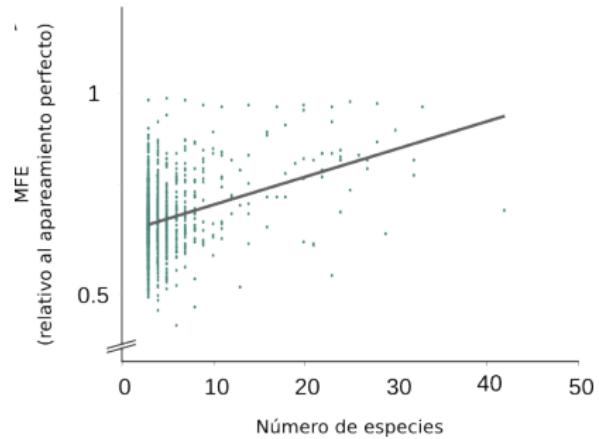
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.

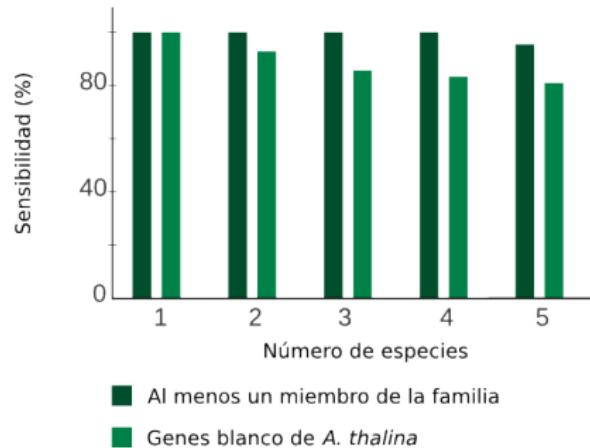
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.
- ▶ Analizamos las estructuras de los precursores y su evolución.

- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.
- ▶ Analizamos las estructuras de los precursores y su evolución.
- ▶ Realizamos una forma de representación Visualización de información compleja por adaptación de una herramienta Circos.

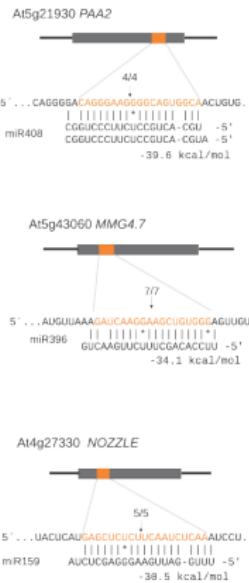
# Muchas gracias.







# Nuevos genes blancos validados en *A. thaliana*



**Arabidopsis thaliana** CAGGGAAAGGGCAGUGCA  
**Capiscum annuum** CAGCGGAAGGAAGCAGUUGCA  
**Glycine max** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Gossypium raimondii** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Haseoulus vulgaris** UAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Ipomoea nil** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Lactuca sativa** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Medicago truncatula** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Saccharum officinarum** UAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Solanum lycopersicum** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Solanum tuberosum** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Sorghum bicolor** UAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Theobroma cacao** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Vitis vinifera** CAGGGAAAGGGCAGUUGCA

**At3g22110 PAC1**

5' ... AUCCAA~~CAGGGAAACCCACCCACCC~~GCUGGCC...  
miR408 CGGUCCUUCUCCUGACCU -5'  
-32.9 kcal/mol

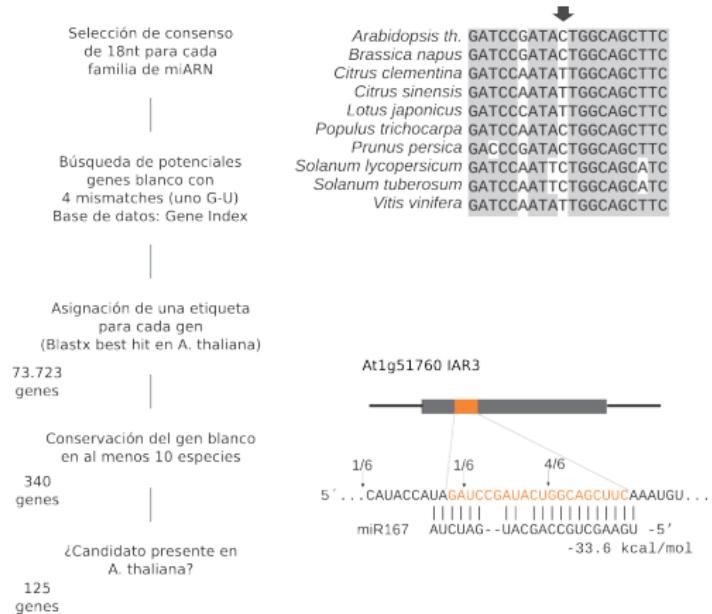
**Arabidopsis thaliana** CAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Capiscum annuum** AAGGGAAAGGGCAGUUGCA  
**Citrus clementina** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Glycine max** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Helianthus annuus** CAGAAAAGAGCAGUUGCA  
**Lotus japonicus** UAGGAAGAGAAGCAGUUGCA  
**Medicago truncatula** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Nicotiana tabacum** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Phaseolus coccineus** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Prunus persica** AAGGAAGAGGGCAGUUGCA  
**Solanum tuberosum** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Theobroma cacao** AAGGGAAAGAGCAGUUGCA  
**Triphysaria versicolor** CAGGGAGGAGGCGUGUUC

**At3g14110 FLU**

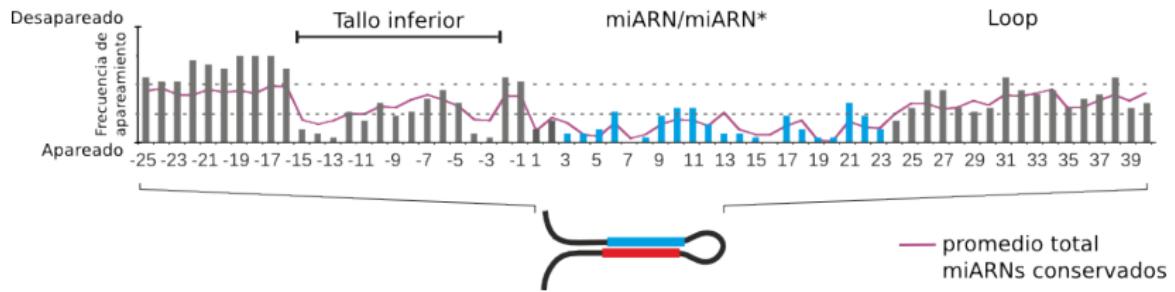
5' ... AUACAGA~~GUUCAGAUACGUUUGGACUUGC~~...  
miR396 GUCAAGUUCUUUCGACCCU -5'  
-39.1 kcal/mol

**Arabidopsis thaliana** GUUCAAGAUACGUUUGGA  
**Brassica napus** GUUCAAGACAGCUUUGGA  
**Festuca arundinacea** GUUCAAGACAGCUUUGGA  
**Hordeum vulgare** GUUCAAGAUAGCUCUUGGA  
**Ipomoea nil** GUUCAAGAAAGCCUUGA  
**Panicum virgatum** GUUCAGGACAGCUCUUGGA  
**Triticum aestivum** GUUCAAGACGCGCUUGGA

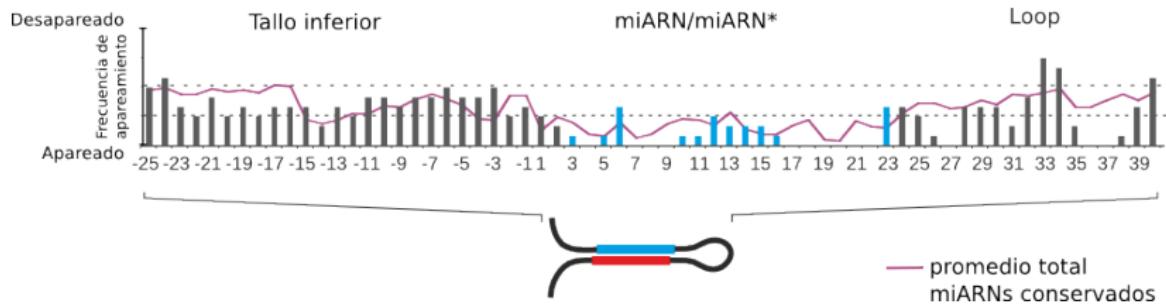
# Nuevos genes blancos con interacciones G-U



Tallo inferior de 15 nt en precursores procesados desde la base



# Región terminal estructurada en precursores procesados desde el loop



— promedio total  
miARNs conservados