

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

Lic. Uciel Chorostecki

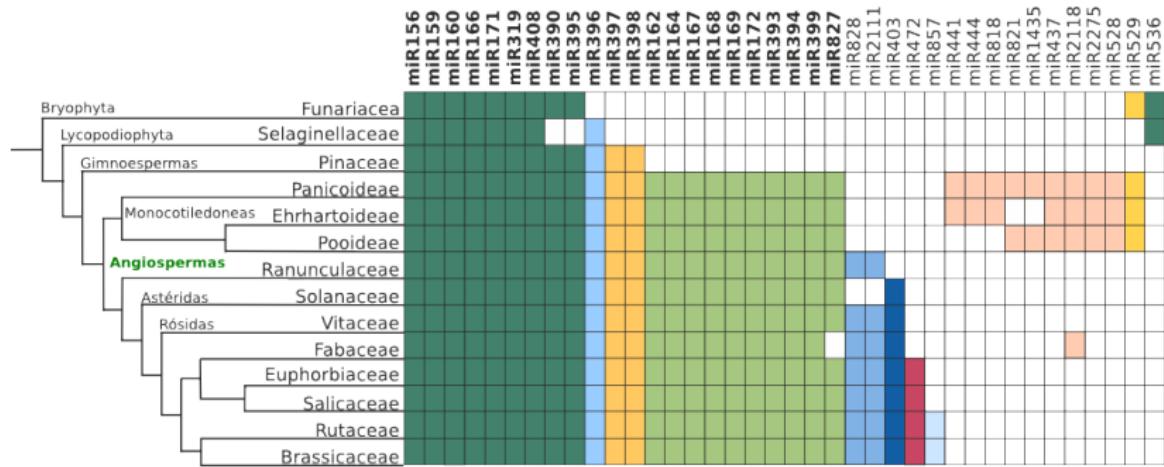
Director Dr. Javier Palatnik

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

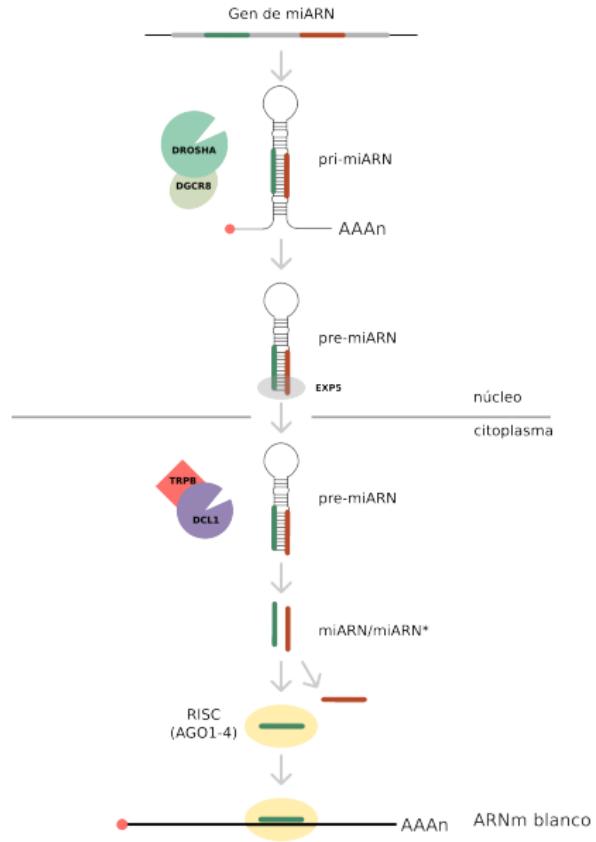
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ Controlan una gran variedad de procesos biológicos, como el desarrollo, la diferenciación y proliferación celular, y respuesta a estrés
- ▶ En *A. thaliana* 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.

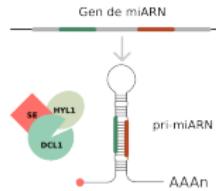
22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



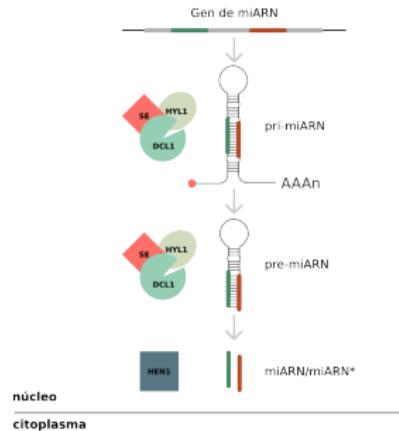
Procesamiento de miARNs en animales



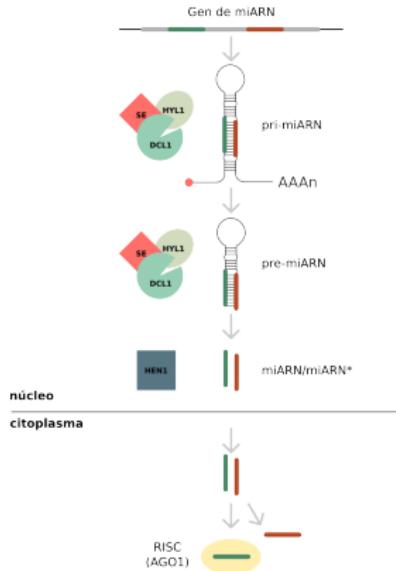
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



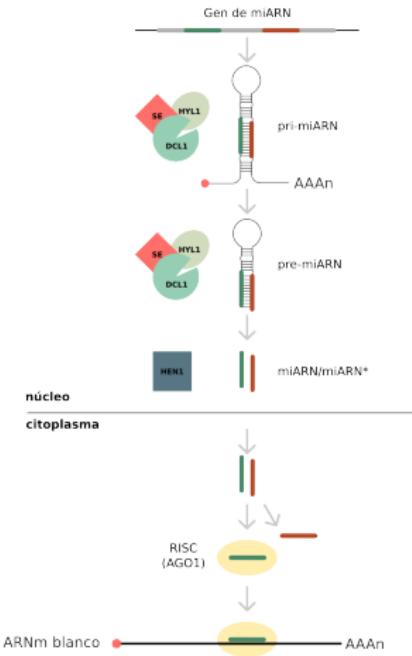
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



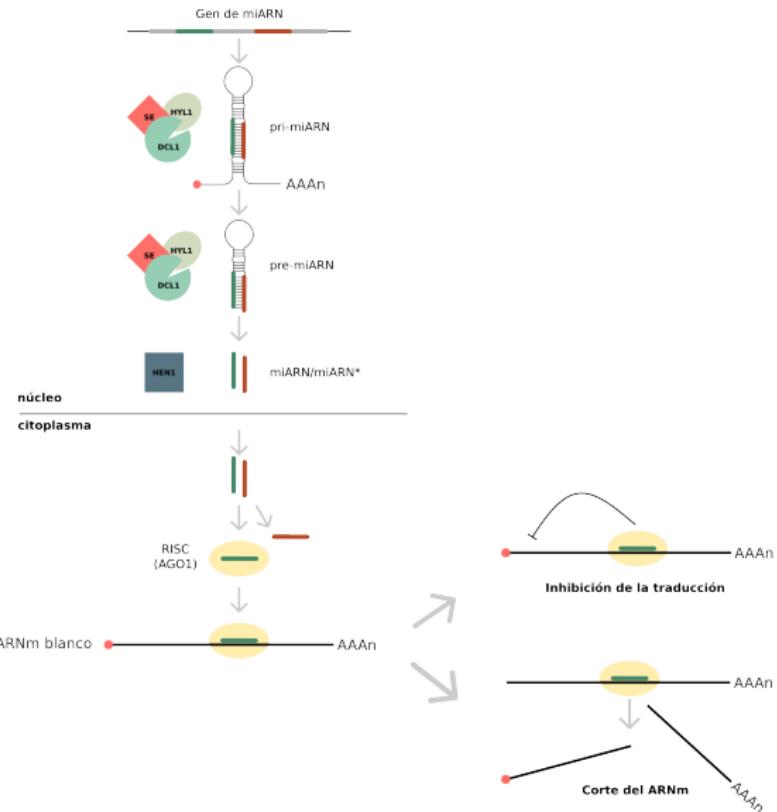
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



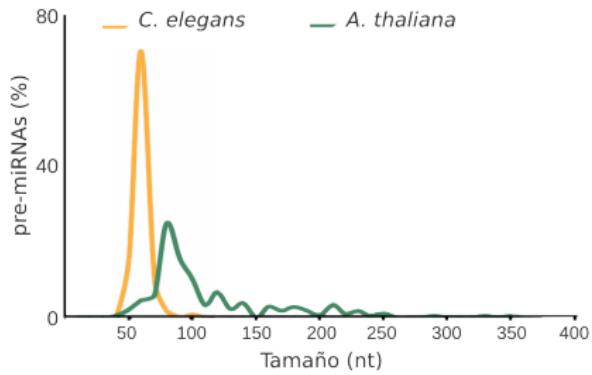
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



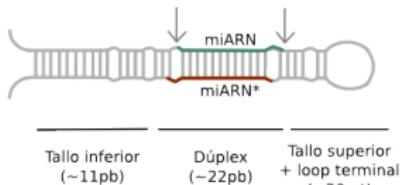
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



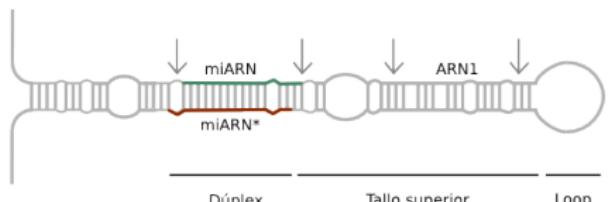
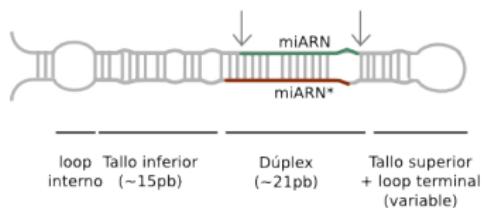
El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



Estructuras secundarias de precursores de miARNs



pre-miARNs de animales



pre-miARNs de plantas

Regulación de la expresión génica por miARNs

Seres humanos

Genes: ~25.000

Arabidopsis thaliana

Genes: ~30.000

Regulación de la expresión génica por miARNs

Seres humanos

Genes: ~25.000

miARNS: ~500-1.000

Arabidopsis thaliana

Genes: ~30.000

miARNs: ~300

Regulación de la expresión génica por miARNs

Seres humanos

Genes: ~25.000

miARNS: ~500-1.000

Genes regulados por miARNs:
~40% genes (miles)

Arabidopsis thaliana

Genes: ~30.000

miARNs: ~300

Genes regulados por miARNs:
pocos (cientos)

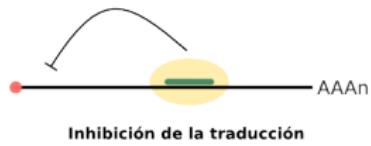
Regulación de la expresión génica por miARNs

Seres humanos

Genes: ~25.000

miARNS: ~500-1.000

Genes regulados por miARNs:
~40% genes (miles)



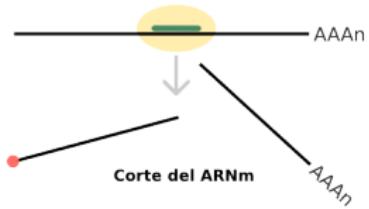
Inhibición de la traducción

Arabidopsis thaliana

Genes: ~30.000

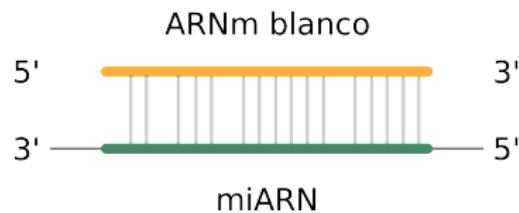
miARNs: ~300

Genes regulados por miARNs:
pocos (cientos)

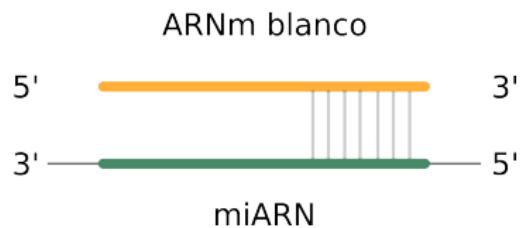


Predicción de genes blancos de miARNs

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.

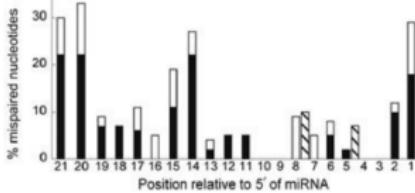
- ▶ Estrategias computacionales donde tienen en cuenta la complementariedad con sus mensajeros blanco.
- ▶ Uno de los mayores desafíos es predecir los genes regulados por estos ARN pequeños con una baja frecuencia de predicciones falsas.

Variaciones en los núcletos 1,20 y 21 dentro de cada familia de miARNs

Especie	miR ID	Secuencia maduro
Arabidopsis thaliana	ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	ath-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCU <u>U</u>
	ath-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>C</u>
Carica papaya	cpa-miR159b	CUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>C</u> -
...
Oryza sativa	osa-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>G</u>
Populus trichocarpa	osa-miR159c	A UUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>A</u>
	osa-miR159f	C UUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	ptc-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
Saccharum officinarum	sof-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>G</u>
Sorghum bicolor	sbi-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>G</u>
Vitis vinifera	vvi-miR159a	C UUGGA <u>G</u> UAAGGGAGCUC <u>C</u>
Zea mays	vvi-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	Zma-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC <u>G</u>

Mismatches en targets validados

Especie	miR ID	Secuencia maduro
Arabidopsis thaliana	ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUUA
	ath-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>C</u> UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>C</u>
	ath-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>C</u>
Carica papaya	cpa-miR159b	CU UUGGAUUGAAGGGAGCUCC- ***
Oryza sativa	osa-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>G</u>
	osa-miR159c	A UUGGAUUGAAGGGAGCU <u>C</u> UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>C</u>
	osa-miR159f	C UUGGAUUGAAGGGAGCUUA
Populus trichocarpa	ptc-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUUA
Saccharum officinarum	sof-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>G</u>
Sorghum bicolor	sbi-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>G</u>
Vitis vinifera	vvi-miR159a	C UUGGA <u>G</u> UAAGGGAGCU <u>C</u>
Zea mays	vvi-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUUA
	Zma-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCU <u>G</u>

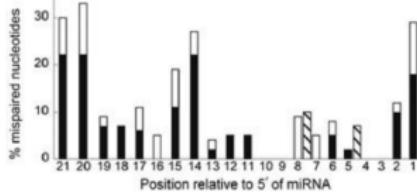


Mallory et al. EMBO J. 2004

Consenso

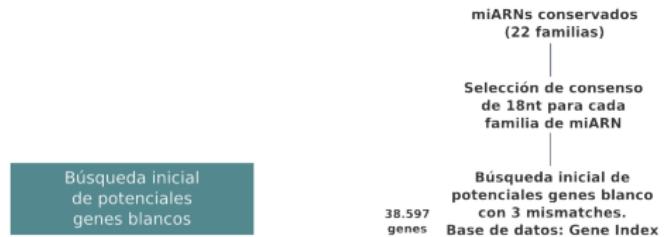
Especie	miR ID	Secuencia maduro
Arabidopsis thaliana	ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	ath-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCU U
	ath-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC C
Carica papaya	cpa-miR159b	C UUGGAUUGAAGGGAGCUC C -

	osa-miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC G
Oryza sativa	osa-miR159c	A UUGGAUUGAAGGGAGCUC A
	osa-miR159f	C UUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	ptc-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
Populus trichocarpa	sof-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC G
	sbi-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUC G
	vvi-miR159a	C UUGGAUUGAAGGGAGCUC C
Vitis vinifera	vvi-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
	Zea mays	Zma-miR159a
	consenso	miR159

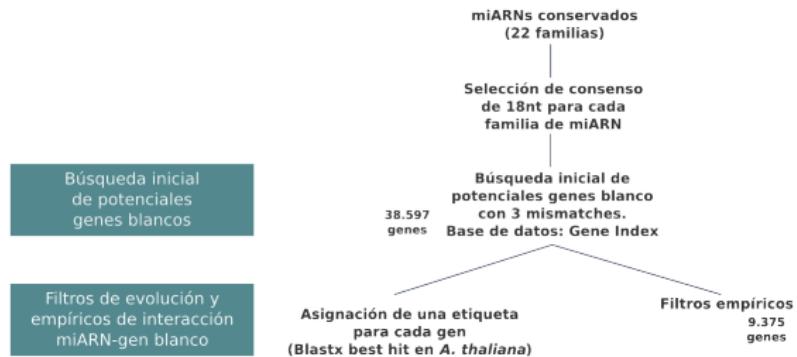


Mallory et al. EMBO J. 2004

Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



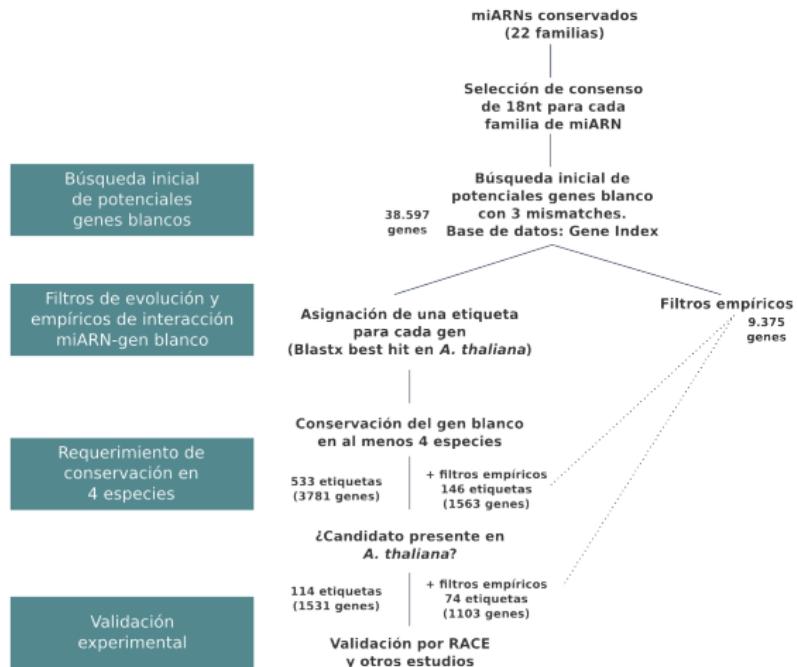
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



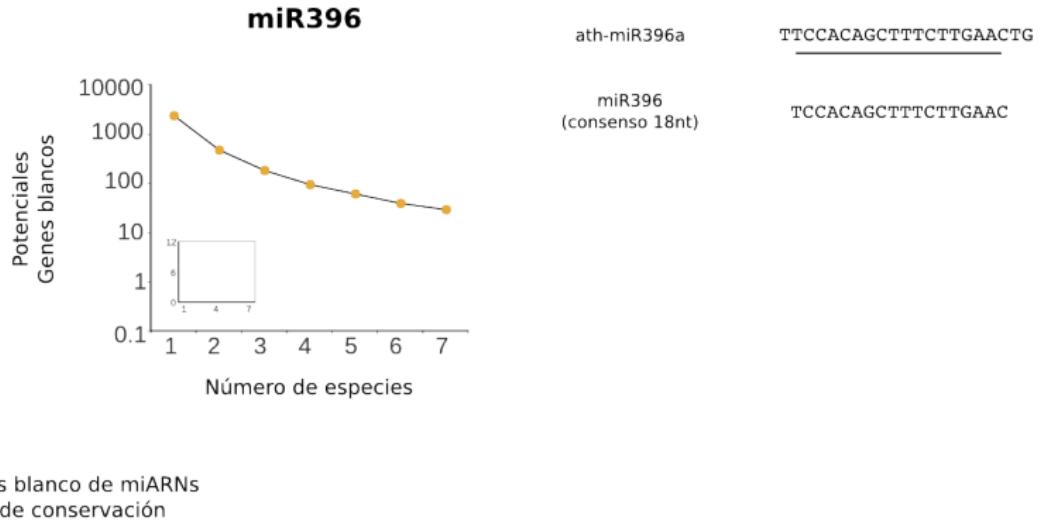
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



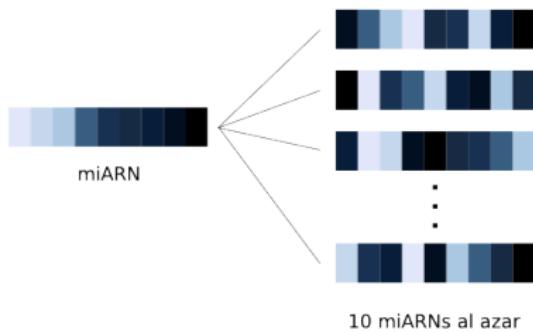
Conservación de la interacción en distintas especies



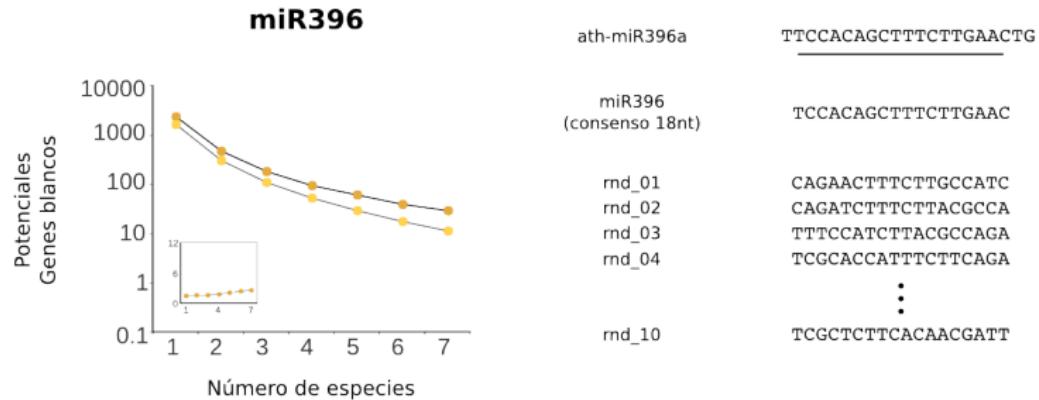
miARN consenso de 18 nt



Control: miARN al azar



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

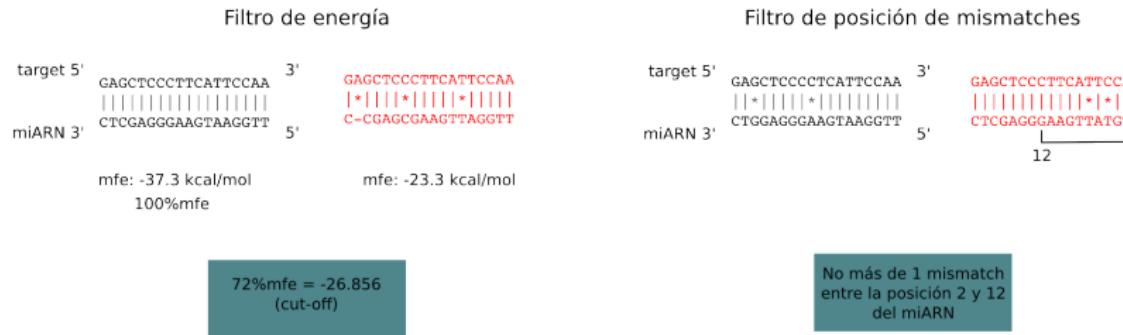


- genes blanco de miARNs
filtro de conservación
- genes blanco de miARNs al azar
filtro de conservación

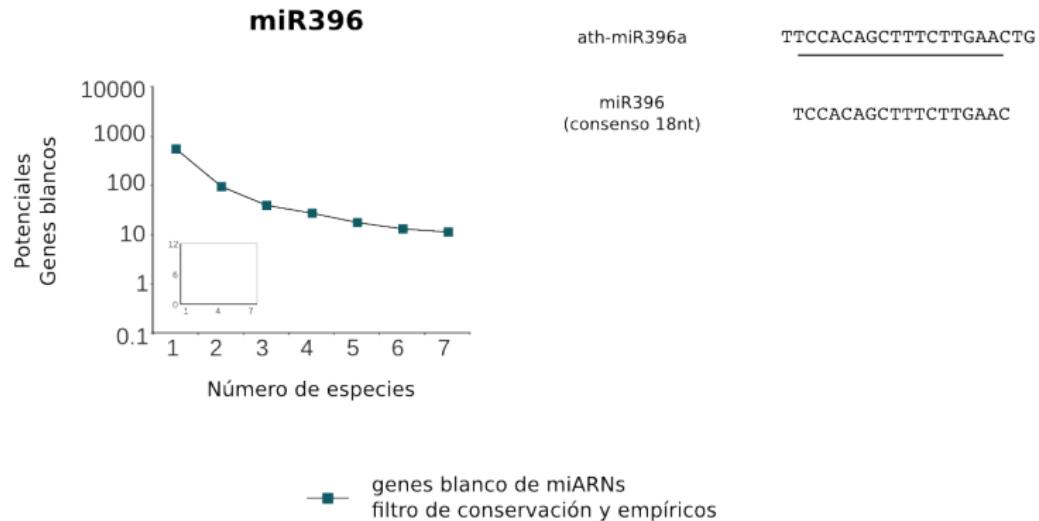
Parámetros empíricos deducidos de interacciones miARN-gen blanco validadas experimentalmente.



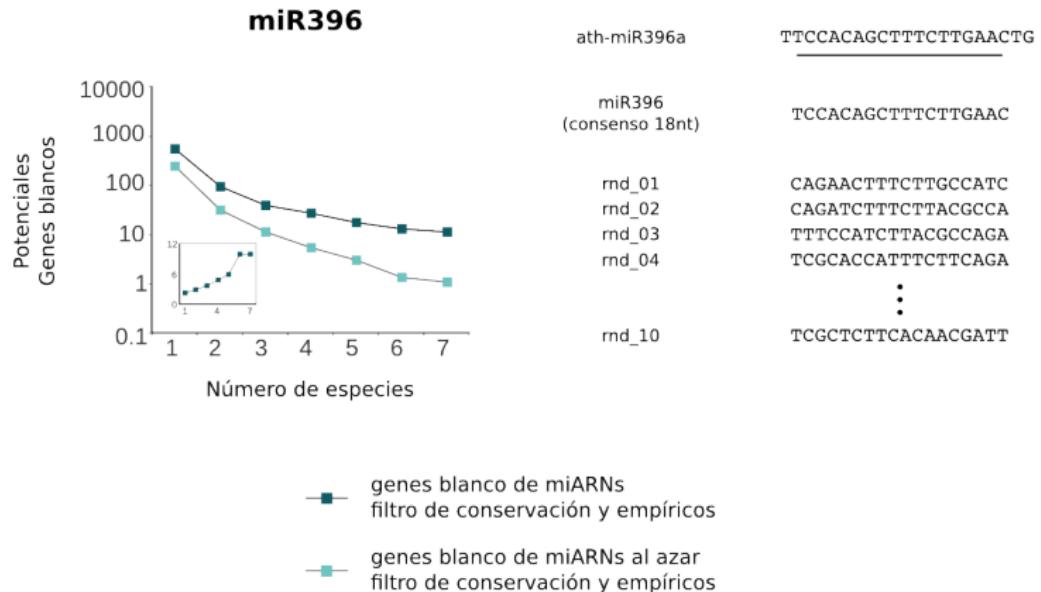
Parámetros empíricos deducidos de interacciones miARN-gen blanco validadas experimentalmente. Filtros aplicados en nuestra estrategia.



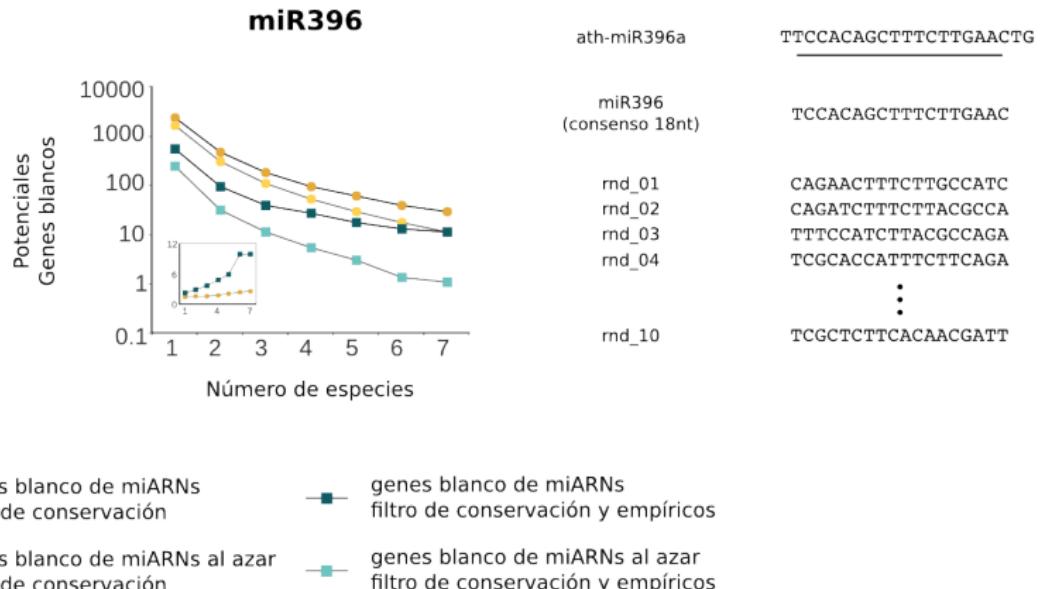
Slección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



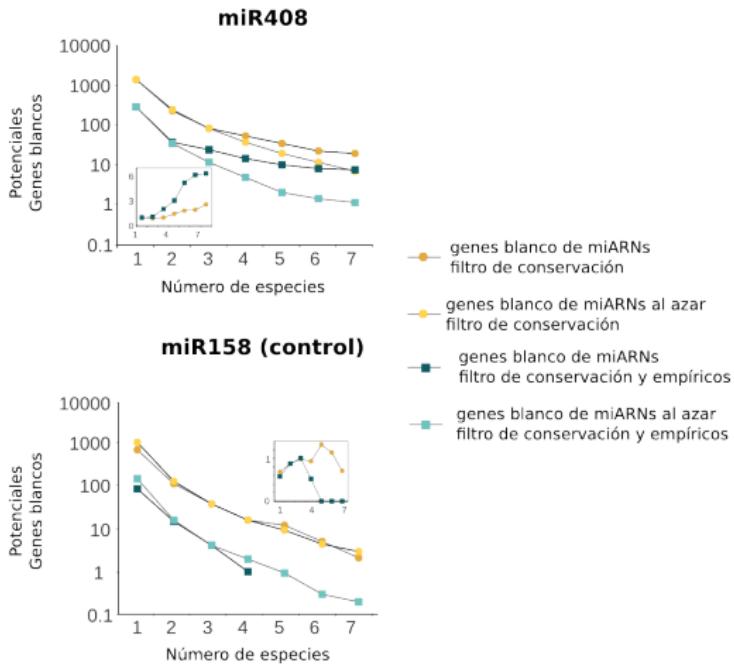
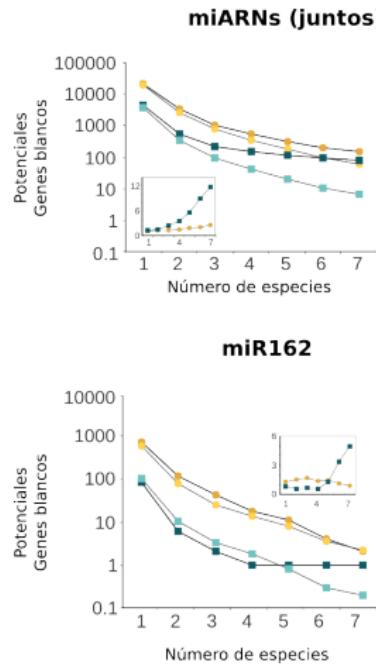
Al aplicar filtros empíricos y de conservación la relación señal/ruido aumenta



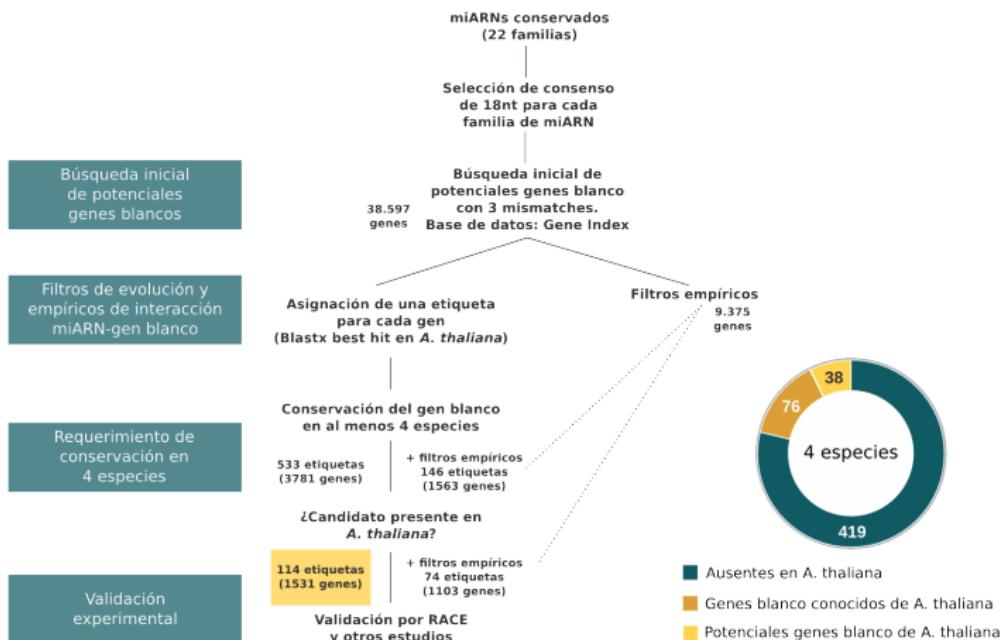
Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos



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

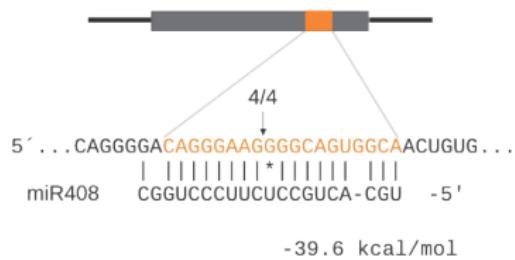


Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva



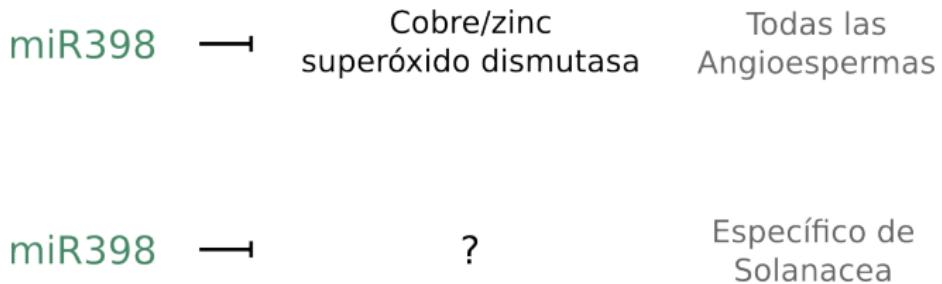
Se validaron 6 nuevos genes blancos en *A. thaliana*

PAA2 (At5g21930)



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

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



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

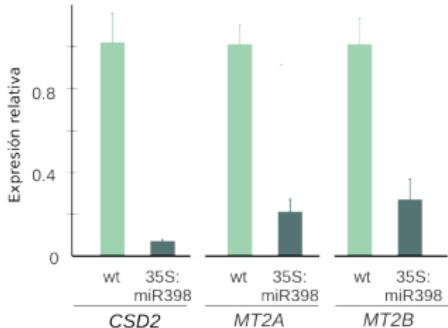
MT2A



MT2B



Validación experimental



Capsicum annuum GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC
Nicotiana benthamiana GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC
Nicotiana tabacum GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC
Petunia hybrida GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC
Solanum lycopersicum GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC
Solanum tuberosum GGGGUUUUACCUGAGAAAGAC

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

Find potential
miRNA targets

Find potential
miRNA target
families

Is this gene a
potential
miRNA target?

Targets

miRNA: miR398_GTTGTCAGGTACCCCC

MFE cutoff: -29.232 kcal/mol

MM Filter: Yes

Species: All

Go Back

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

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

Sequence ID	Species	5'-target-3' Alignment 3'-miRNA-5' [?]	MFE [?]
Aqua_013_00504.1	Aquilegia coerulea	TGGGCGACCTGGGAACAT * * * * CCCCACTGGACTCTTG	-31.7
471402	Arabidopsis lyrata	TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * CCCCACTGGACTCTTG	-32.1
AT1G12520.1	Arabidopsis thaliana	TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * CCCCACTGGACTCTTG	-32.1
Bradi5g18900.3	Brachypodium distachyon	TTGGTGACCTGGGAACGC ** * * * CCCCACTGGACTCTTG	-33.5
Bra026968	Brassica rapa	TGGGCGACCTGGGAACAC * * * * CCCCACTGGACTCTTG	-32.5
Carubv10011816m	Capsella rubella	TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * CCCCACTGGACTCTTG	-32.1
evm.model.supercontig_29.47	Carica papaya	TAGGTGACCTGAGAACAT ** * * CCCCACTGGACTCTTG	-34.2
Ciclev10021134m	Citrus clementina	TTGGTGACCTGGGAACAC ** * * * CCCCACTGGACTCTTG	-33.9
orange1.1g020436m	Citrus sinensis	TTGGTGACCTGGGAACAg ** * * * CCCCACTGGACTCTTG	-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	CGATAAACCTCTGATCC	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	CGCTTGGTCCAGGTGGGG	AGO1
mir169	AGCCAAGAGTAGCTTGCC	fatores de transcripción CCAAT-HAP2
mir171	TTGACCCGTGCCAATATC	fatores de transcripción GRAS
mir172	GAATCTTGATGATCTGC	fatores de transcripción AP2
mir319	TGGACTGAAGGGAGCTCC	fatores de transcripción TCP
mir390	AGCTCAGGAGGGATAGCG	TAS RNA
mir393	CCAANGGGATCGCATTTGA	TIR1 proteins, F-BOX proteins
mir394	TGGCATTCTGTCCACCTC	proteínas F-BOX
mir395	TGAAGTGTGTTGGGGGAC	ATP-sulfurilasas, transportadores de sulfato
mir396	TCCACACGTTCTTGAC	fatores de transcripción GRF, MMG4.7, FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU)
mir397	CATTGACTGCAGCTTGA	Laccases
mir398	GTGTTTCAGGTCAACCCC	Cu/Zn SODs, Cyt C oxidase protein subunit, Chaperona de cobre (CCS)
mir399	GCCAAGGGAGATTGGCCC	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina
mir408	TGCACTGCCCTTCCCCG	Blue copper proteins, Laccases, P-TYPE ATPase (PAA2), PAC1
mir827	TAGATGACCATCAGCAAA	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 para predecir potenciales genes blancos regulados por miARNs en plantas.

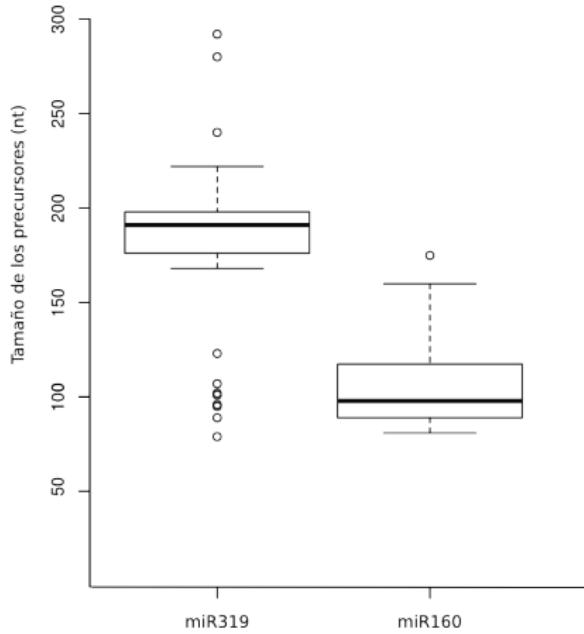
Objetivos específicos

- ▶ 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.

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.

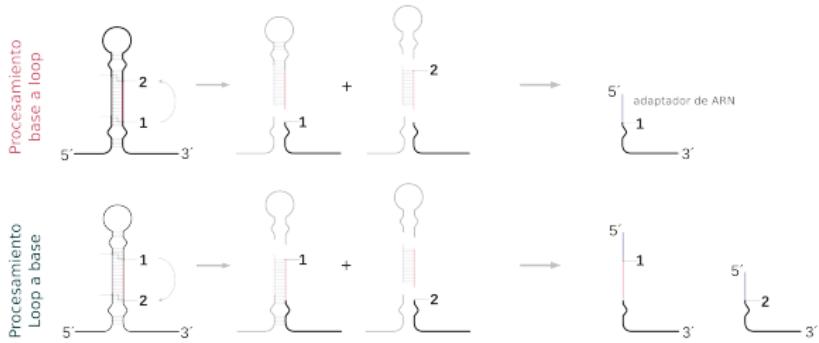
Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



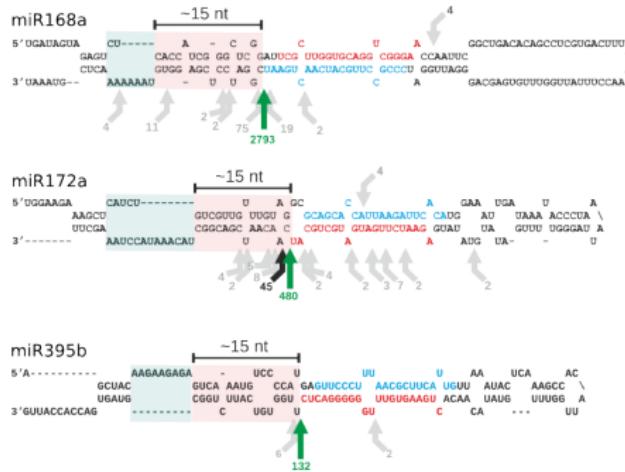
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



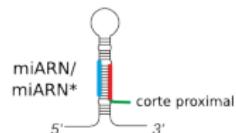
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



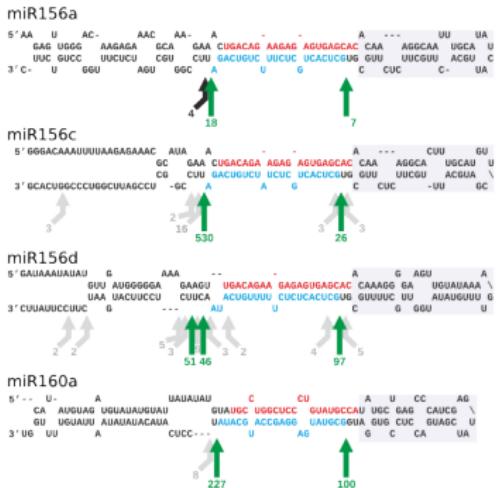
Los precursores que se procesan desde la base tienen un sólo pico de señal en las bibliotecas de SPARE



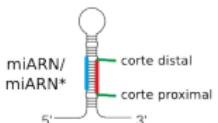
Detección solamente
del corte proximal



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



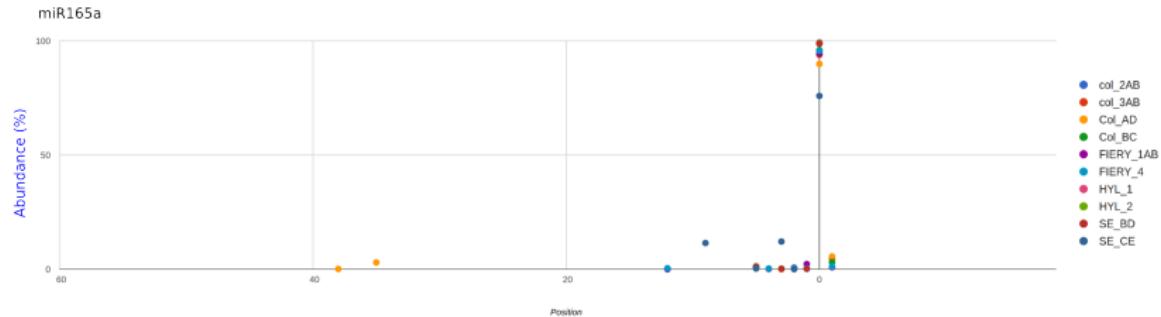
Detección de ambos cortes,
proximal y distal



Bibliotecas de SPARE

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

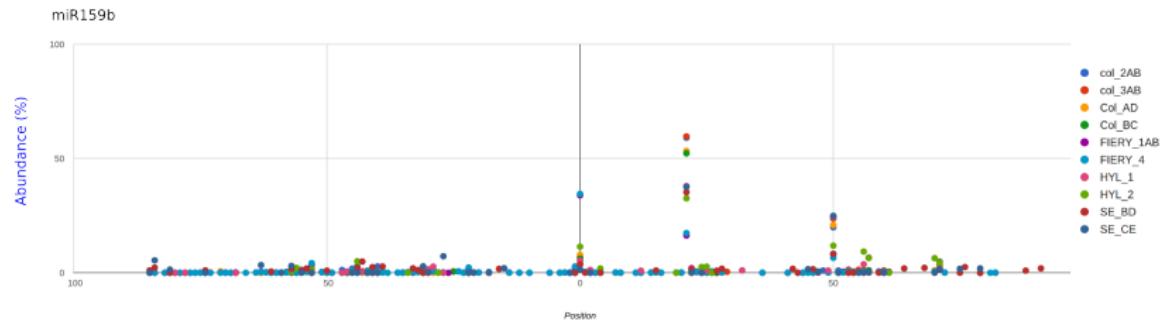
Visualización de precursores procesados desde la base



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



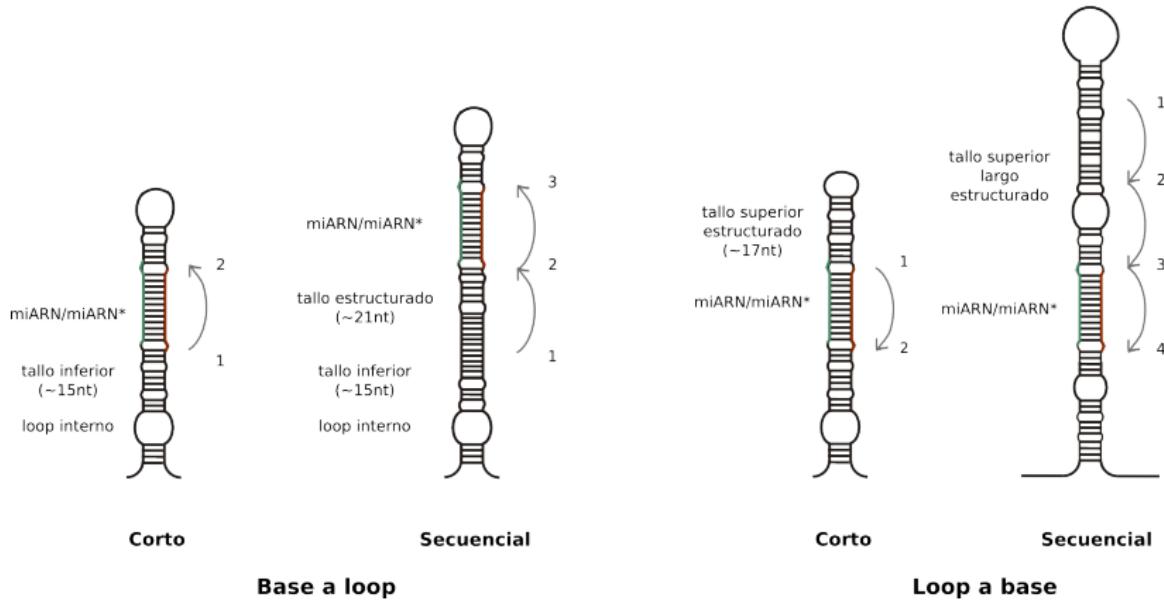
Visualización de precursores procesados desde el loop



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

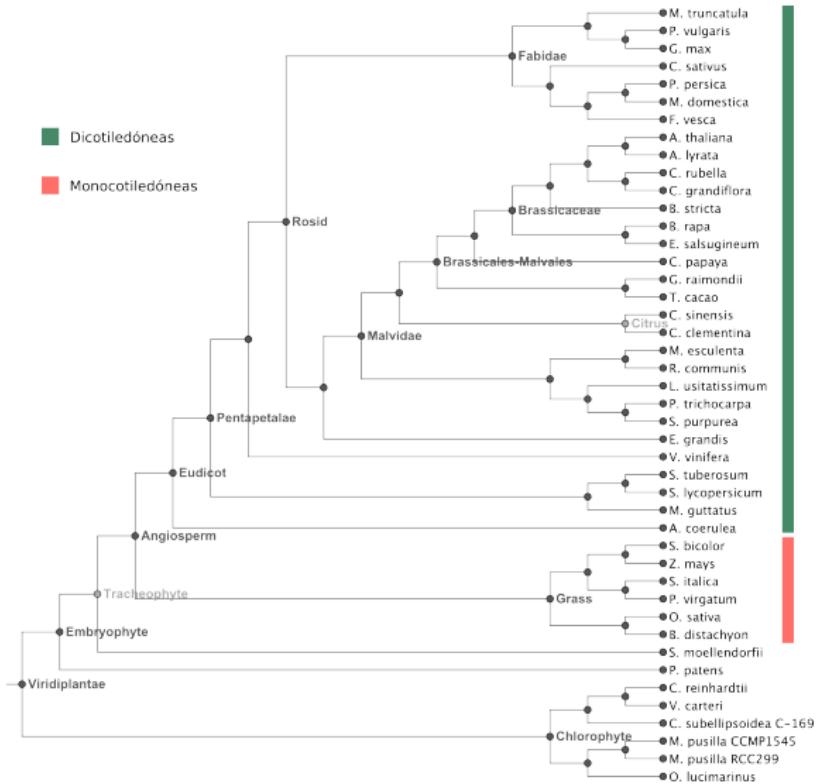


Objetivos específicos

- ▶ 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 GUAGUCUGCCUGCUCGUUAUGCCAUUAUGCUGAGCCCCAUCGAGUAUCGAUGACCUCCGUGGAUGGCGLAUGAGGGAGCCAUCGCAUAU >ath-MIR160b GUUCGUGCCUGGCCUCGUUAUGCCACAAGAAAACAUCGAUUUAGUUUCAAAAUUCGAUCACUAGUGGCGUACAGAGGUAGUCAAGCAUGAC >ath-MIR160c GUUAUGCCUGGCCUCUCGUUAUGCCACGAGUGGAUACCGAUUUUGGUUUAAAUCGGCUCGCCGUUAAGGGAGUCAAGCAUGAC
Arroz	>osa-MIR160a GUGUGCCUGCCUGCUCGUUAUGCCACACAUGUAGACCAACCCAUUGGUGUCUGGUUGCCUACUGGGGGCGUGCAAGGACCAAGCAUGC >osa-MIR160b AAAGGUUUGGUUUGGUAGUCGGCUGAGGGUGCUGGCCUCGUUAUGCCACUCAUGUAAGCCAAUCCAUUGGUGGUUUGGUAGCUGUGGGGGCGUGCAAGGAGCCAAGCAUGCGUAGAUCUCUUUCUGCCUU >osa-MIR160c GGAAUGUGCCUGGCCUCGUUAUGCCACACUCAUGAGCAACAAUCUCUGCGAGAGGUUGCCUAUGAUGGAUGGGCGUCAGGGCAAGCAUAUCC >osa-MIR160d GGAAUGUGCCUGGCCUCGUUAUGCCACACUCAUGAGCAACAAUCUCUGCGAGAGGUUGCCUAUGAUGGAUGGGCGUCAGGGCAAGCAUAGACC >osa-MIR160e GUAGGGGAUAUGCCUGGCCUCGUUAUGCCGUCGCAUGGCGUCAACCCAAUGAACUCAUCGUAUCUUGUUGGGCGUCGUACGGGUGCGAGGUAGCAUUGCCCUU >osa-MIR160f GGAUUAACCGCUGGCCUCGUUAUGCCACCGAGAACGGUUCGGCUCGUUGGGGUUGGCAUUGAGGGAGUCAUGCAGGGGUUUGCUC
Tomate	>sly-MIR160a CAAGUCGUGUAACGUAUAUGCCUGGCCUCGUUAUGCCAUUUGCAAAGCUCACCGUAUAUUAUCAUGGGGUUUGUUGUAUGGGCGUAUGAGGAGCCAAGCAUAUUCGAUAUCGUGUAUAUGAUGUUG

Conservación de la secuencia primaria del miR172a en distintas especies

	BAD	AVG	GDD0	U	C	S	C
Alvareza	AG	UABAU	UCC	GGG	G	US	
Motomestica	BR	AUAG	UAB	AG	RD	US	
Urtica	BR	UAC	UAC	UAC	UAC	UAC	
Silicopera							
BrapaPsc	AG	CBAC	UCC	GGG	G	US	
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Cypradiflo	AG	UARAU	UAC	UAC	CC	US	
Polytmus	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Lutistatia							
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Gmax	CA	DAU	AG	RD	US		
Vvinifera	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Spurpurea	AG	DAABA	AG	RD	US		
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Casztulus	AG	GGG	UCC	GGG	G	US	
Acervularia	A	GGG	UCC	GGG	G	US	
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Mutipatula	AG	DAU	AG	AC	AC	US	
Urticaria	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Capapaya	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Athelia	AG	UABAU	UCC	GGG	G	US	
Tecocao	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Chacarac	AG	DAU	AG	US	AC	US	
Praulinopsis	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
Draimondia	AG	GGG	UCC	GGG	G	US	
Stoberosum	BR	GGG	UCC	GGG	G	US	
cons							

ANSWER

cons

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

ANSWER

consists of a series of colored squares representing different categories or states.

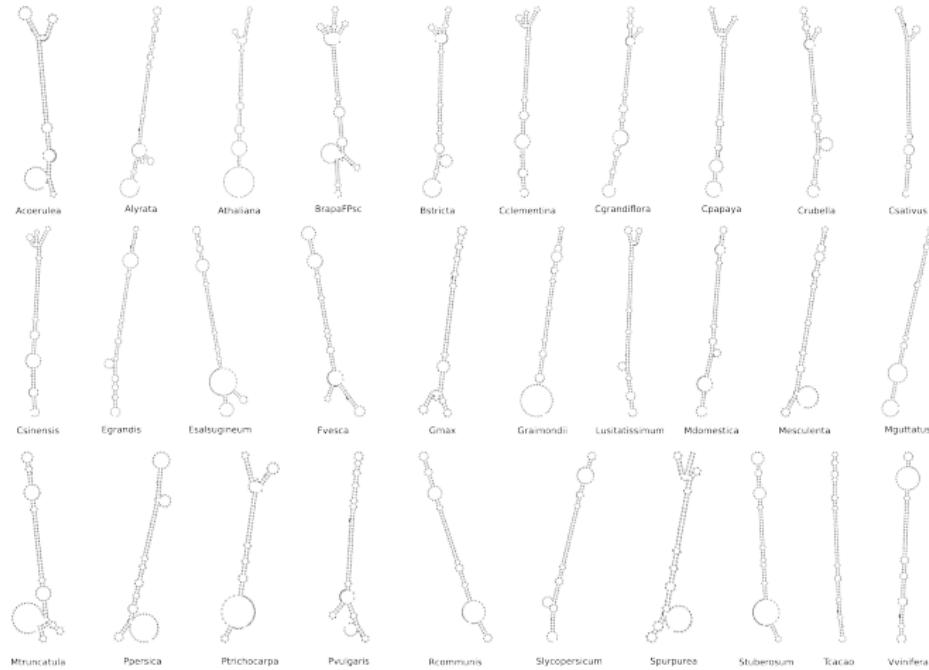
Cola de conservación hacia la izquierda del miARN* y hacia la derecha del miARN

	BAD	AVG	GODD	miARN*	U	C	G	C
Alhydrat	NC	UUAUU	UCC	GGG	U	UC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Methionin	NC	UAUGG	UAC	AGG	U	UC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Prolinecarbamyl	NC	UACGG	UAC	AGG	U	UC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Silycopersi	NC	GAACG	GAC	UCA	U	GC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Argininosuccinate	NC	UCCCG	UCC	GGG	U	GC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Ergards	NC	ACGCC	ACG	CCC	U	GC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Cyprandiflo	NC	UUAUU	UAC	AAC	C	CC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Glutathione S-Transferase	NC	AAUAA	AAA	AGA	C	CC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Cisvinens	NC	GAACG	GAAC	CAA	C	CC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Lutalitatis	NC	UACGG	UAC	GGC	CC	CC	AEGAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Geax	EA	GUU	GUU	GUU	GUU	GUU	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Arginase	EA	GUU	GUU	GUU	GUU	GUU	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Hemocyanins	EA	GUU	GUU	GUU	GUU	GUU	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Purpurea	EA	GUAAA	GUAAA	GUAAA	GUAAA	GUAAA	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Urease	EA	GUU	GUU	GUU	GUU	GUU	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Catstivus	EA	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Rhizopina	EA	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Mesocellula	EA	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Mugatutus	EA	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Arginase	EA	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	GUAGG	AACAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Capapaya	EC	GUU	GUU	GUU	GUU	GUU	GUUAGGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Crucellula	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Tocaco	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Chlorocar	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Pulgariolis	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Grammatostil	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Ageliochus	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU
Strobosom	EC	UAUUU	UAC	AAA	C	CC	ACGUUCGUUCGUUVUUVUUCGUUCGUUCAUCAUCAGAU	ACAGCUUCGU

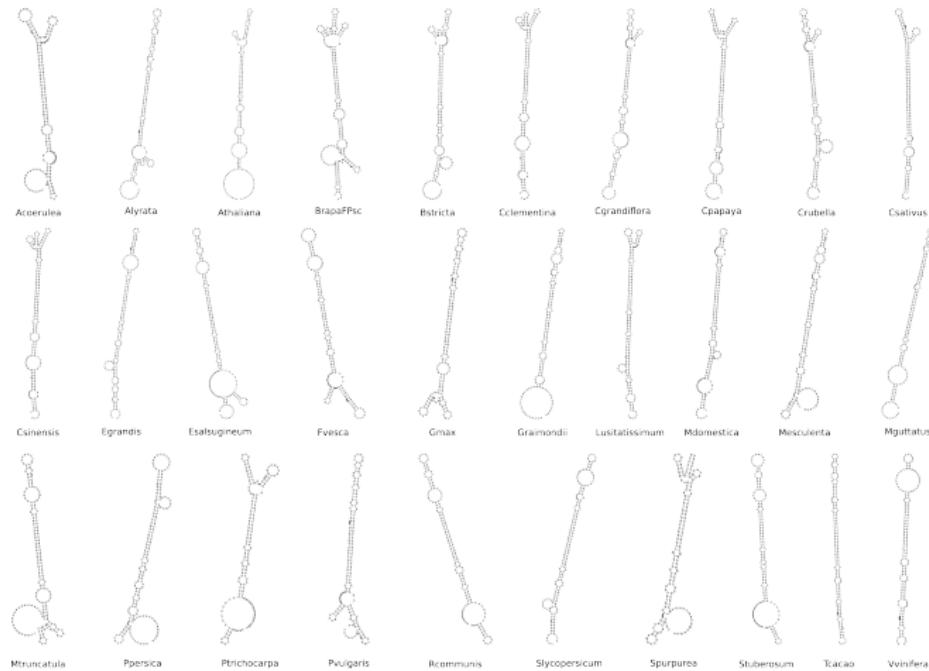
ANSWER

© 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Addison Wesley

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

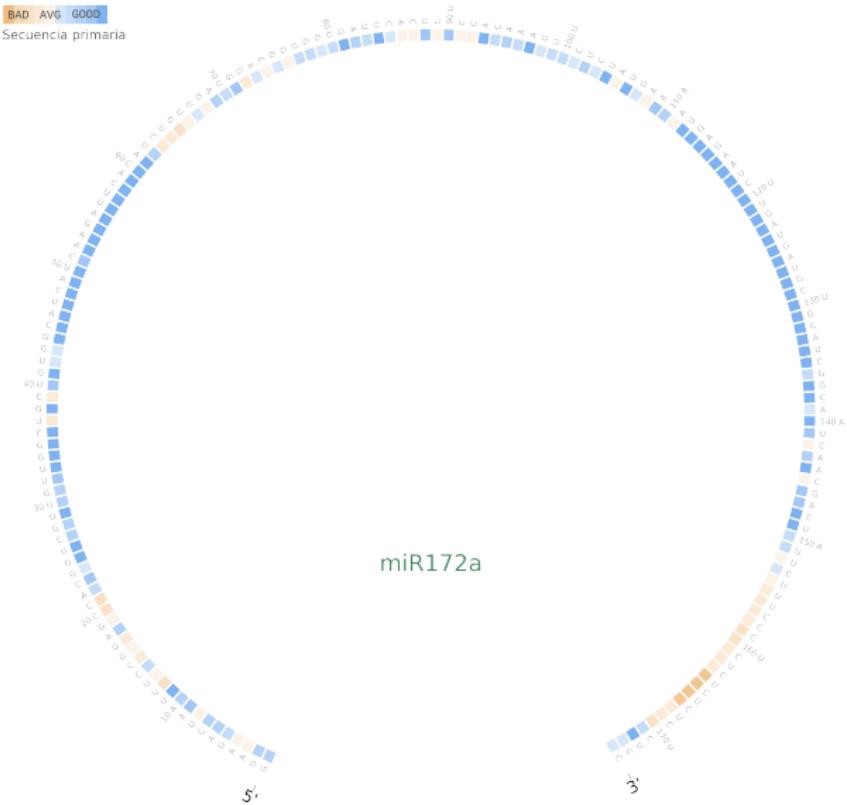


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN* (miR172a)

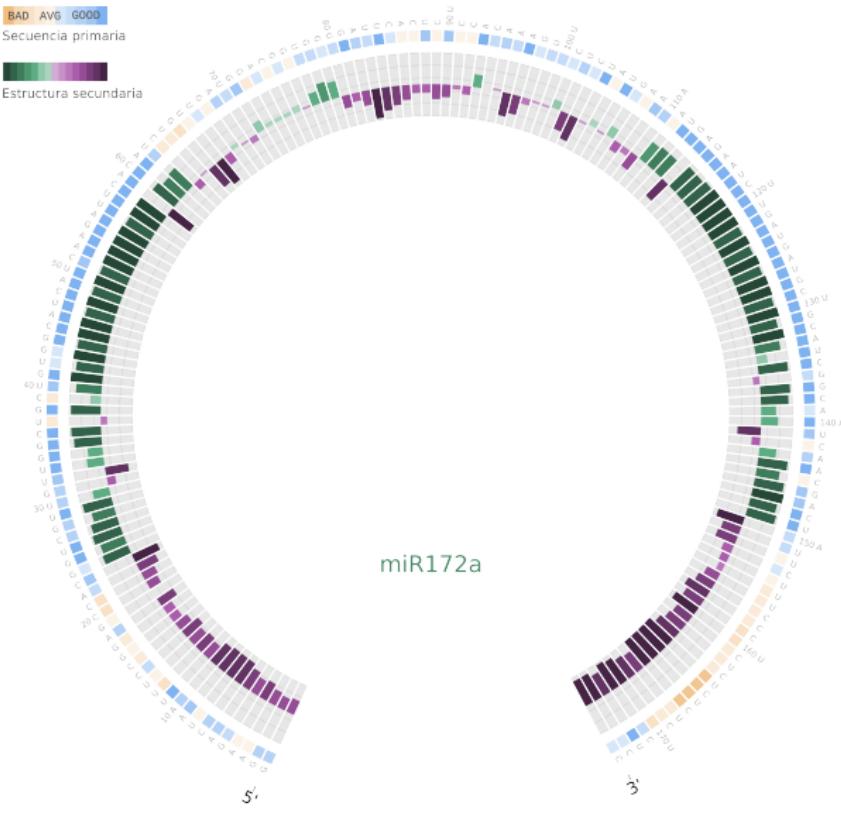


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

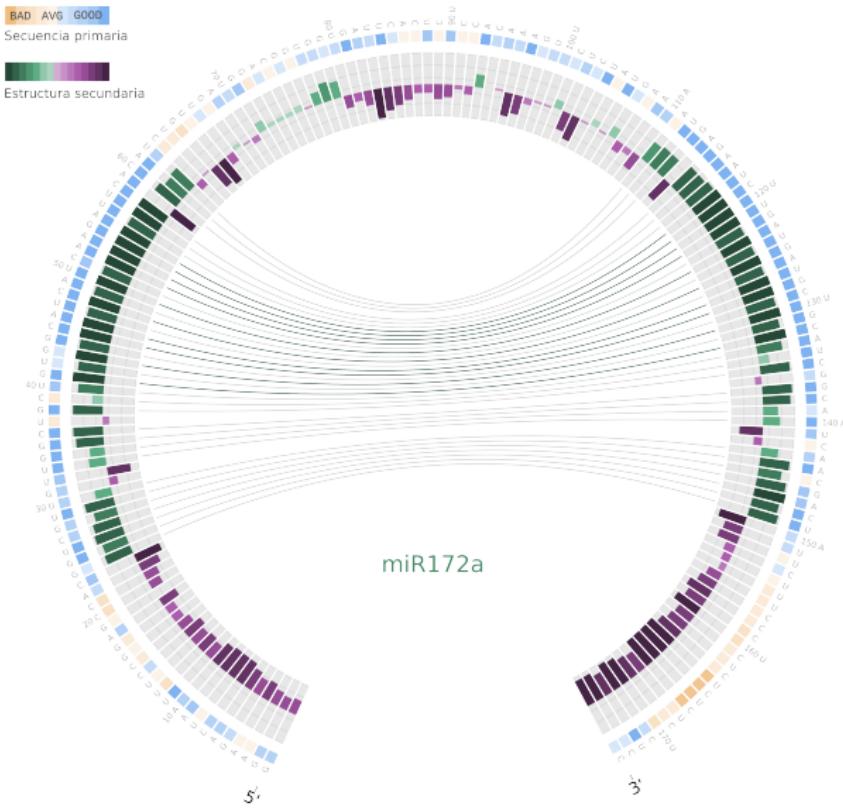
Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



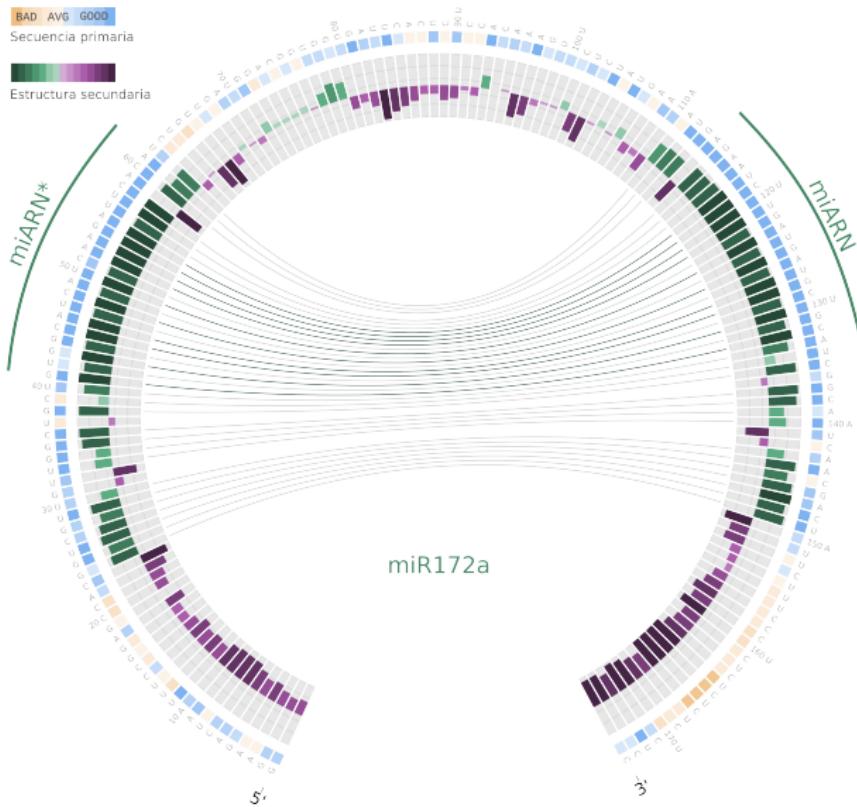
Frecuencia de bases apareadas y desapareadas



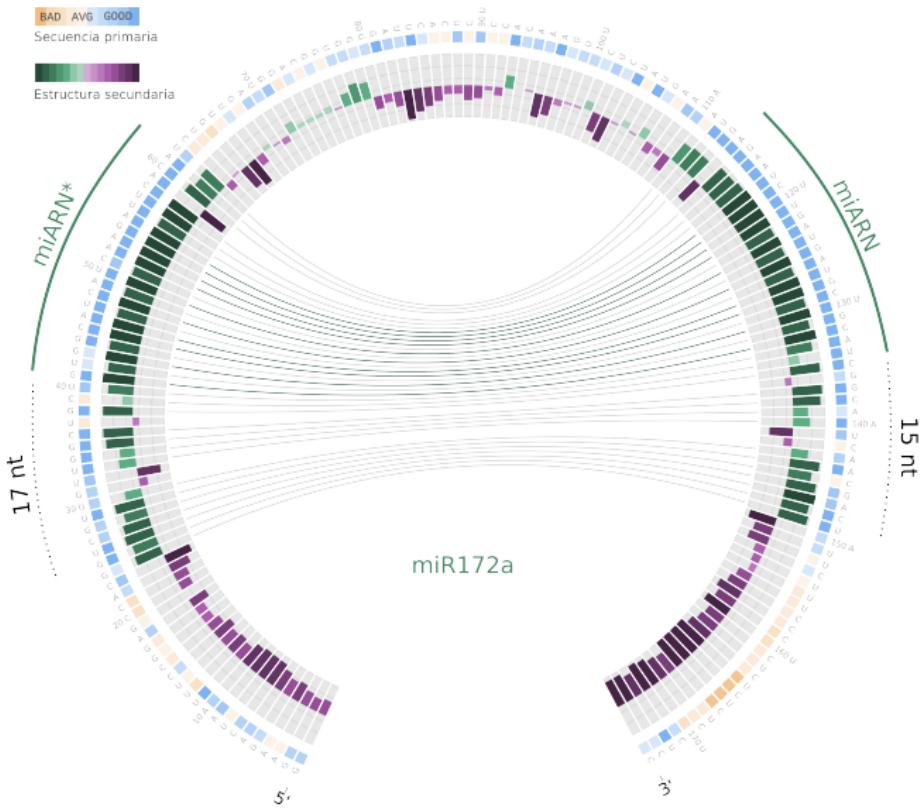
Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



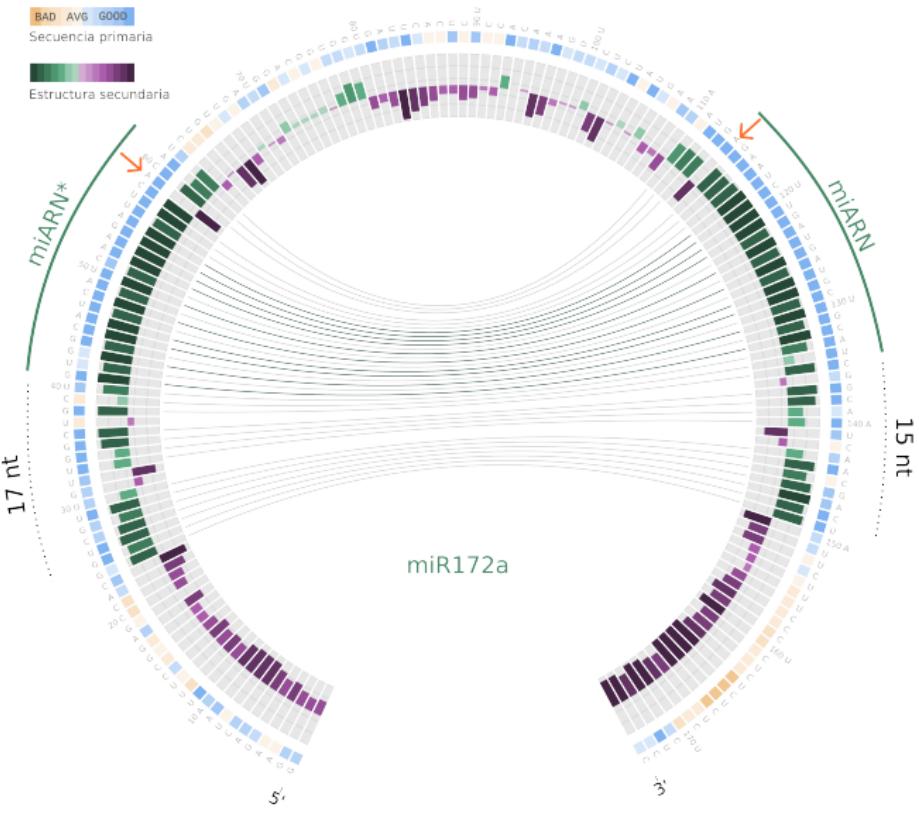
miARN y miARN* conservados en secuencia primaria y estructura



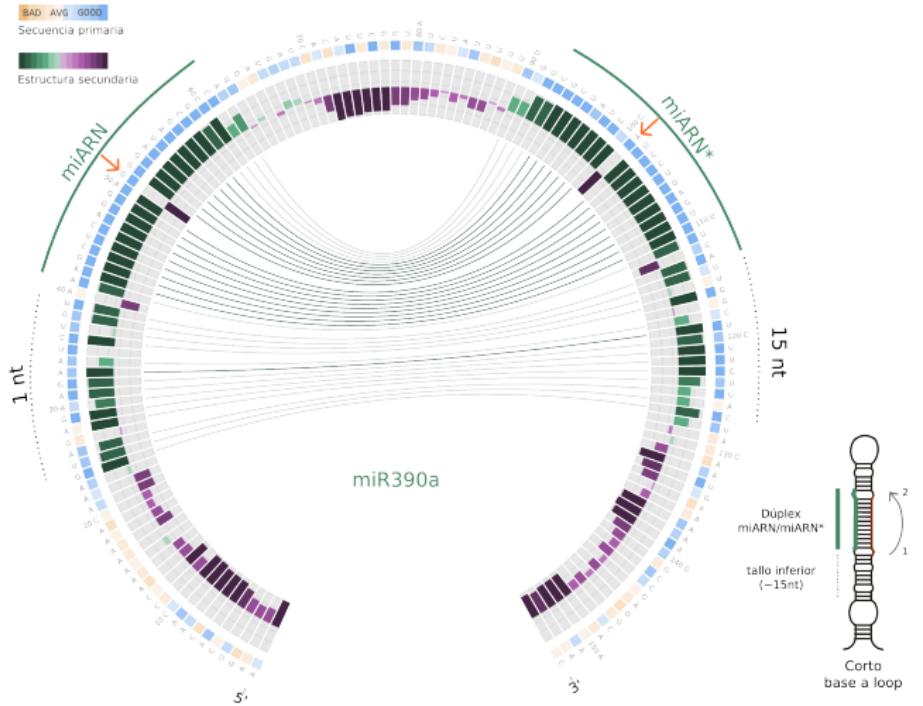
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



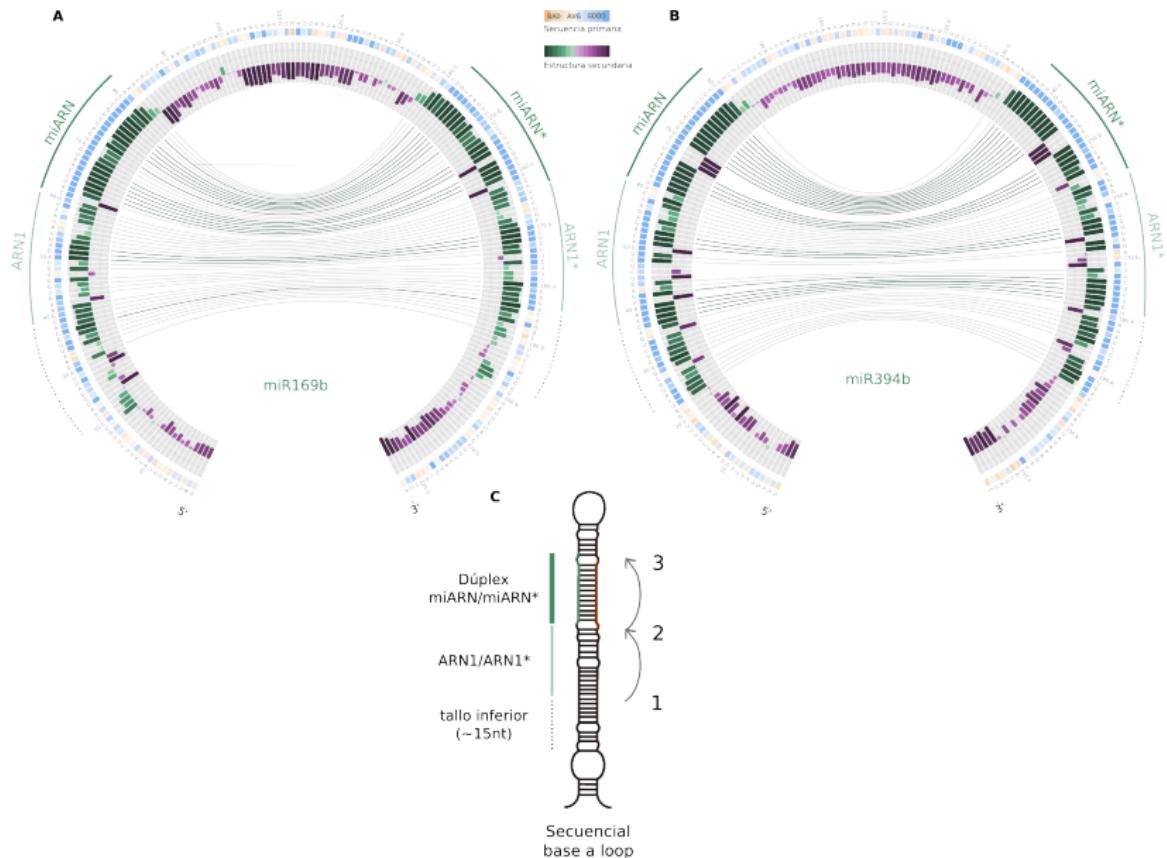
Mismatches conservados



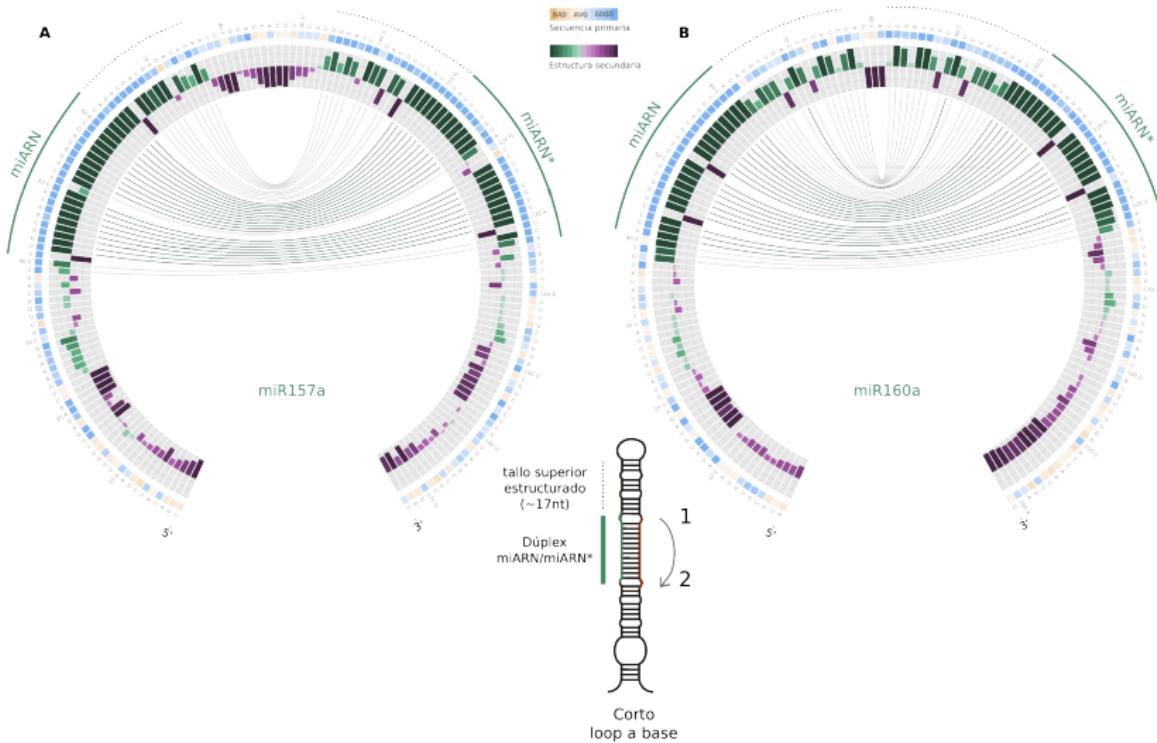
Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



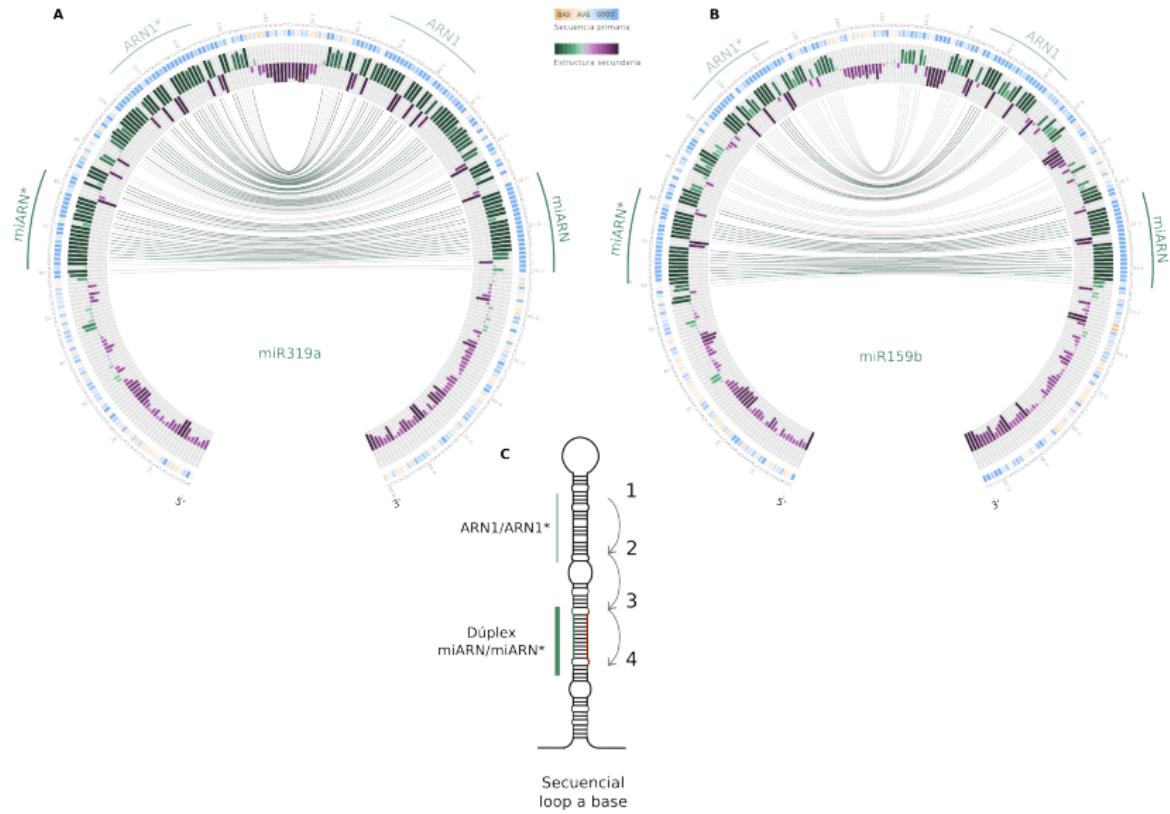
Precursos que se procesan desde la base en forma secuencial



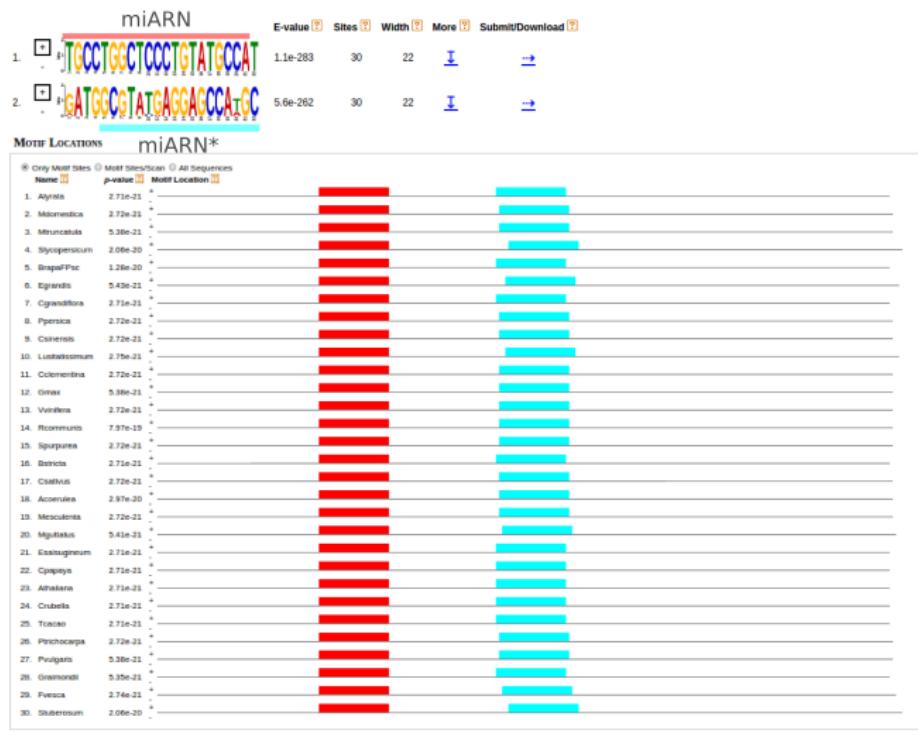
Precursors que se procesan desde el loop cortos



Precursors que se procesan desde el loop en forma secuencial



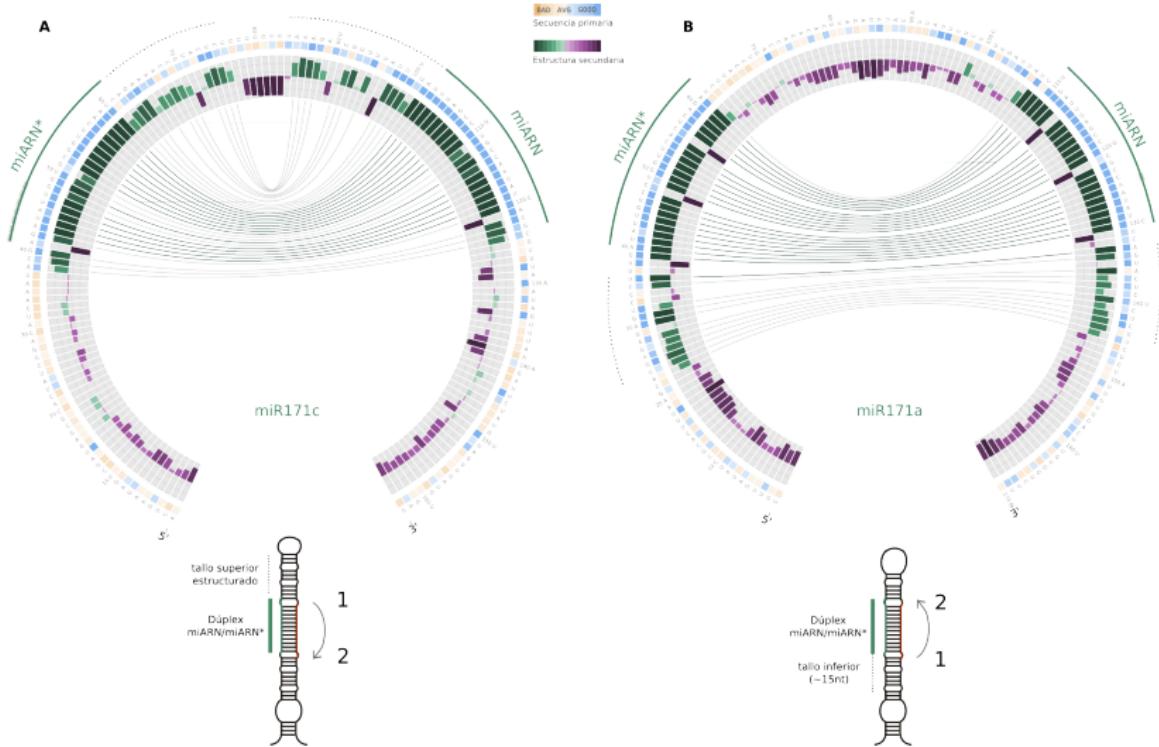
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



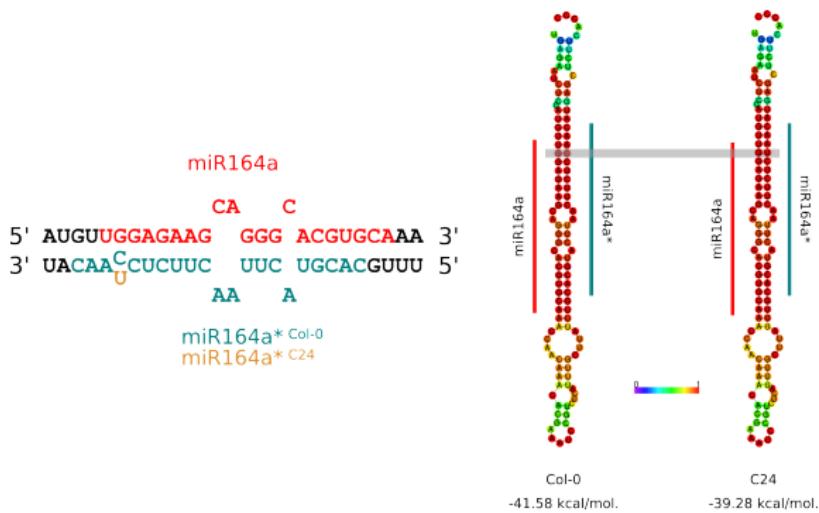
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



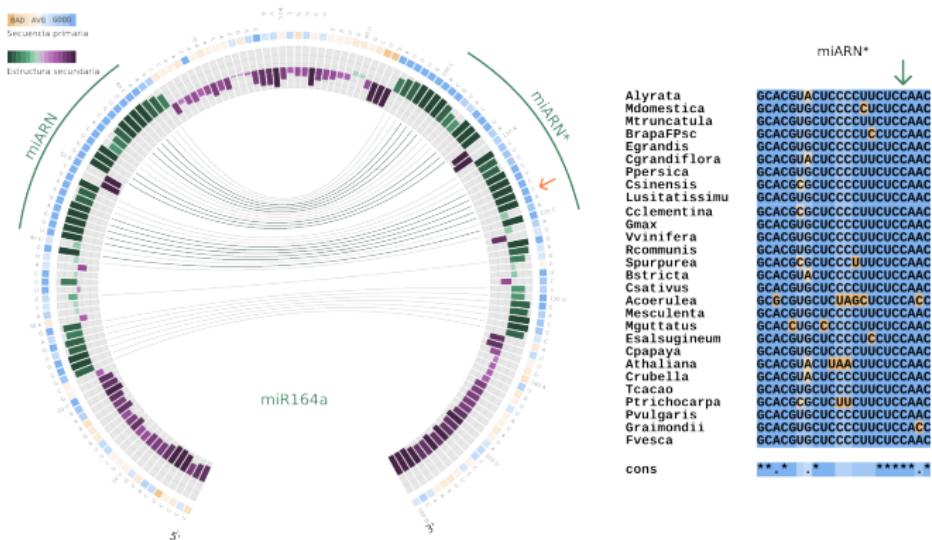
Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



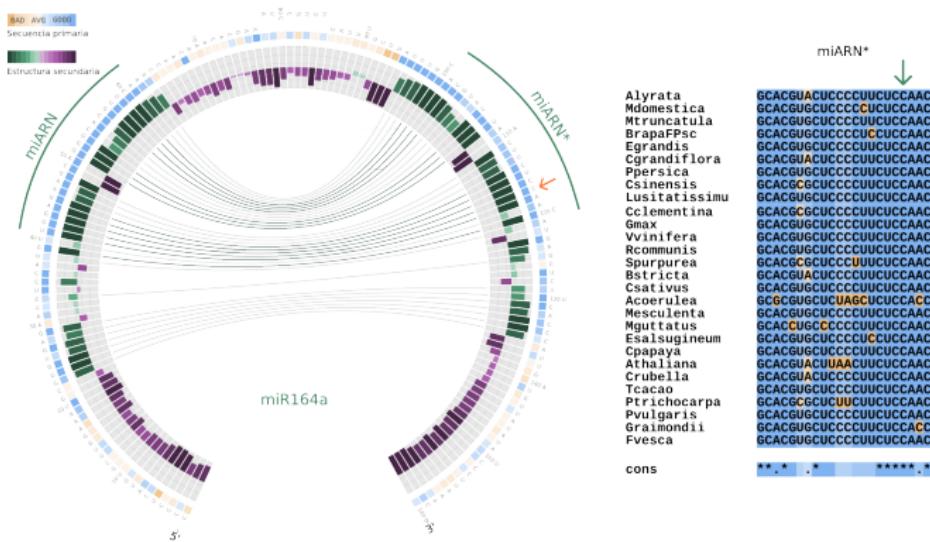
Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

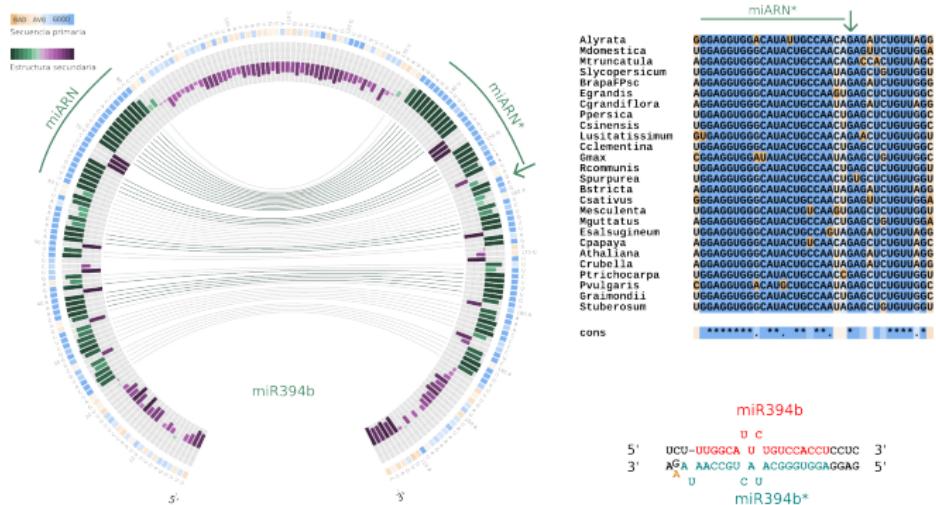


Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

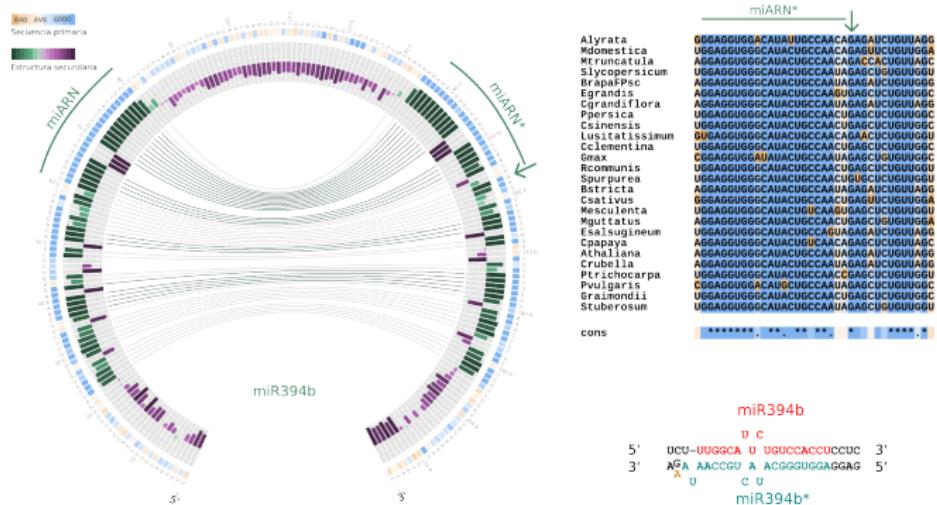


La posición *2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

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



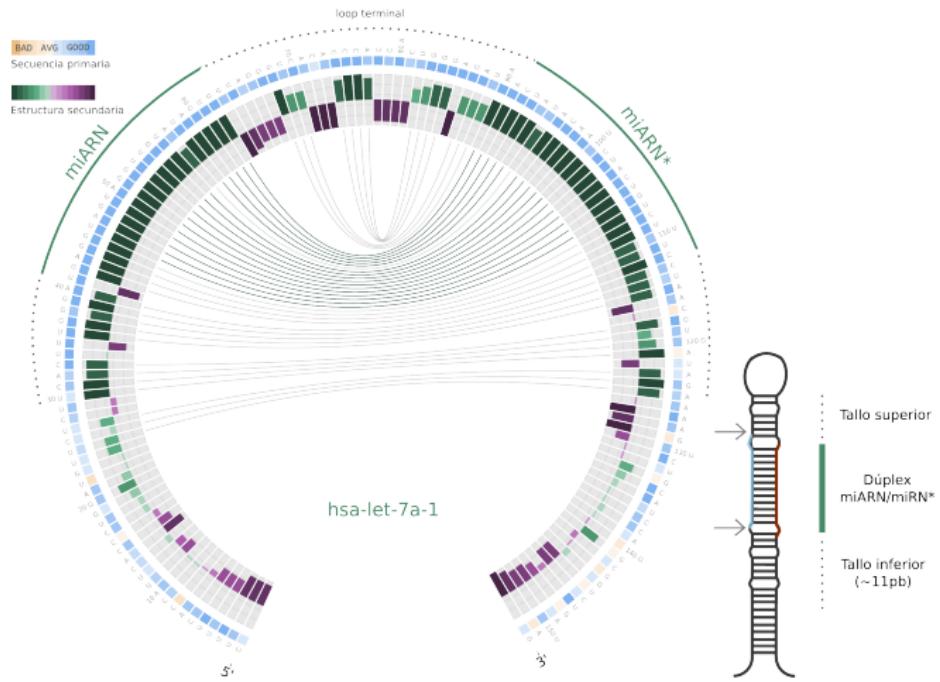
Mutaciones simples en el precursor (fuera del dúplex) puede afectar el reconocimiento de DICER.

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

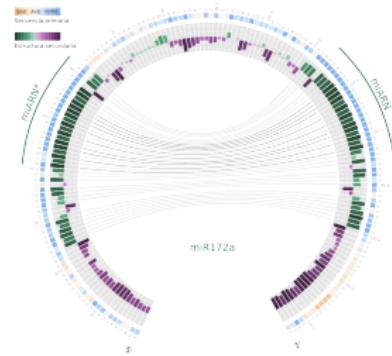
Animales

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

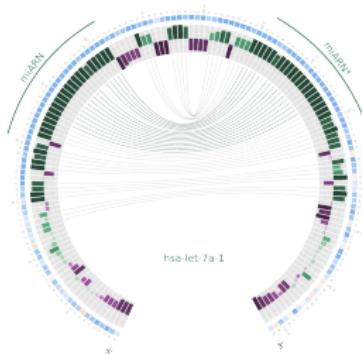
El loop terminal está conservado en la mayoría de los precursores de animales estudiados.



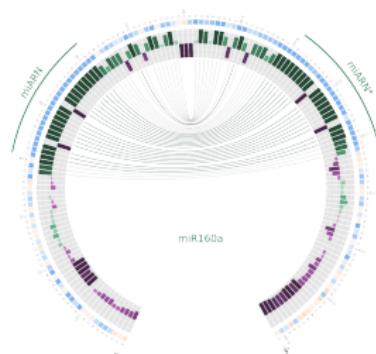
Circos animales vs plantas



Precursors de plantas.
Cortos de base a loop



Precursors de animales.



Precursors de plantas.
Cortos de loop a base

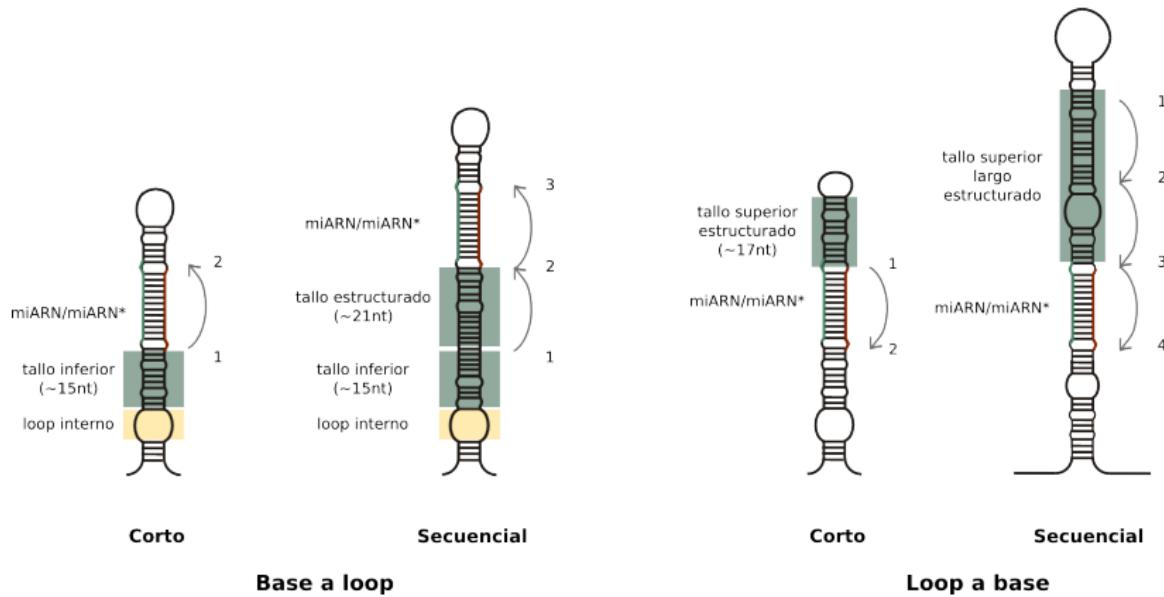
- ▶ Presentamos un enfoque bioinformático para el estudio de la evolución y biogénesis de miARNs en plantas.

- ▶ 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.
 - ▶ Pudimos utilizar este mismo enfoque para estudiar precursores de miARNs en animales.

Conclusiones III



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

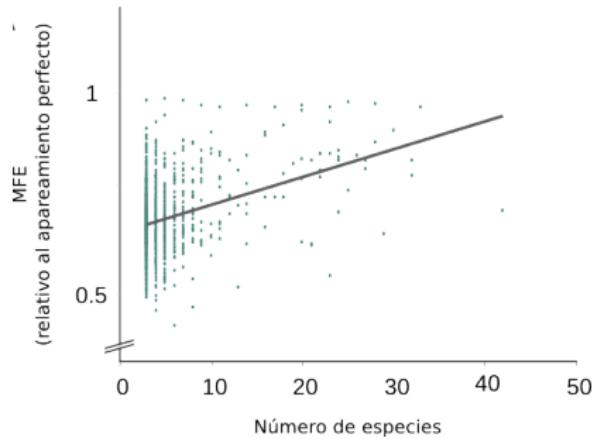
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

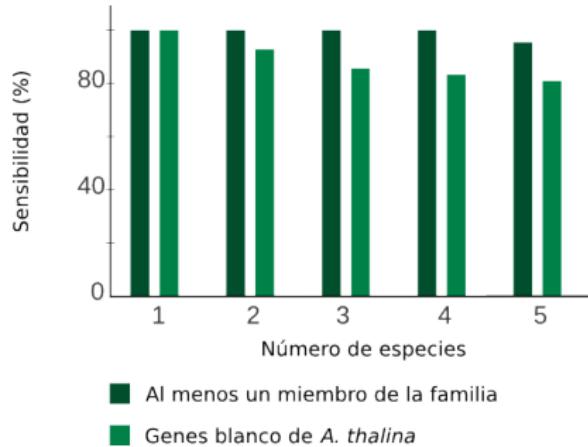
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.

- ▶ 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.

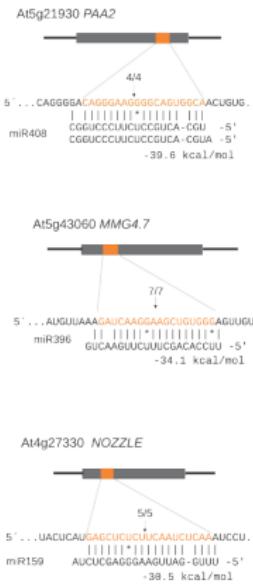
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.
- ▶ Analizamos 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 CAGGGGAAGGGCAGUGCA
Capsicum annuum CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Glycine max CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Gossypium raimondii CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Haseoulus vulgaris UAGGGAAAGGGCAGUGCA
Ipomoea nil CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Lactuca sativa CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Medicago truncatula CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Saccharum officinarum UAGGGAAAGGGCAGUGCA
Solanum lycopersicum CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Solanum tuberosum CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Sorghum bicolor UAGGGAAAGGGCAGUGCA
Theobroma cacao CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Vitis vinifera CAGGGAAAGGGCAGUGCA

At3g22110 PAC1

5' ... AUCCAA~~CAGGGAAACCCACCCACUCA~~GCUGGCC...
miR408 CGGUCCUCUUCUGCGUACCU -5'
-32.9 kcal/mol

2/9

3/9

At3g14110 FLU

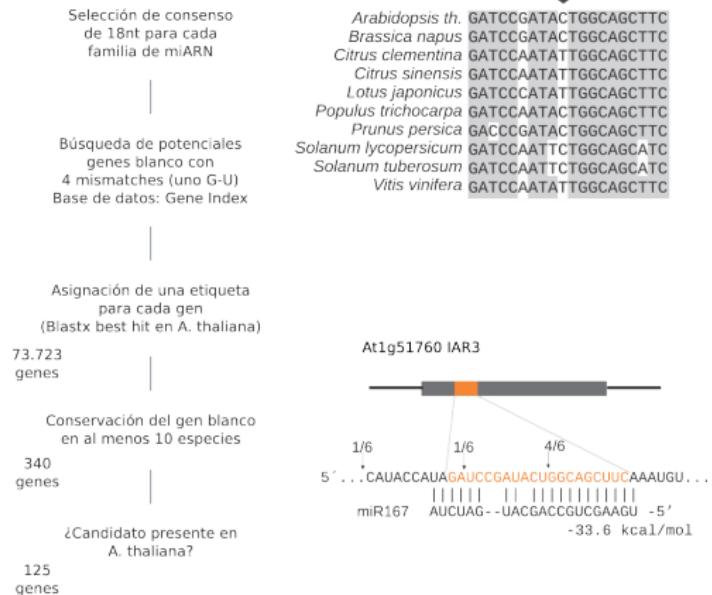
5' ... AUACAGA~~GUUCAAGAUACGUUUGGACUUGC~~...
miR396 GUCAAGUUCUUUCGACACCUU -5'
-39.1 kcal/mol

6/7

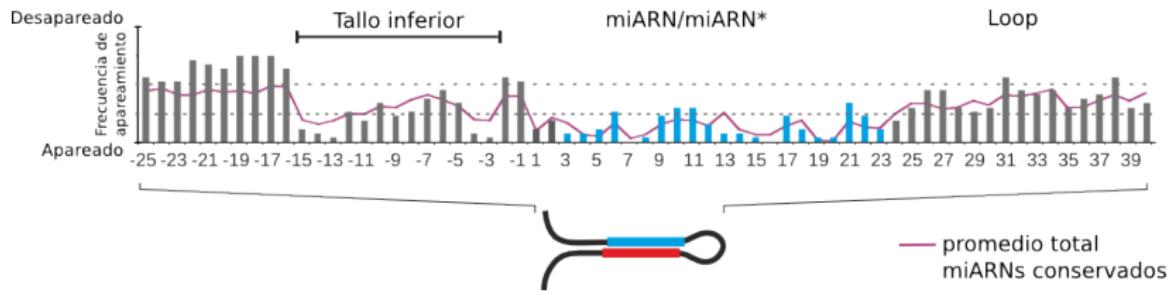
Arabidopsis thaliana CAGGGAAAGGGCAGUGCA
Capiscum annuum AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Citrus clementina AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Glycine max AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Helianthus annuus CAGAAAAGGGCAGUGCA
Lotus japonicus UAGGAAGAAAGGGCAGUGCA
Medicago truncatula AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Nicotiana tabacum AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Petunia hybrida AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Phaseolus coccineus AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Prunus persica AAGGAAGAGGGCAGUGCA
Solanum tuberosum AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Theobroma cacao AAGGGAAAGGGCAGUGCA
Triphysaria versicolor CAGGGAGGAGGGCAGUGCA

Arabidopsis thaliana GUUCAAGAUACGUUUGGA
Brassica napus GUUCAAGACAGCUUUGGA
Festuca arundinacea GUUCAAGACAGCUUUGGA
Hordeum vulgare GUUCAAGAUAGCGUCUUGGA
Ipomoea nil GUUCAAGAAAGCCUUGA
Panicum virgatum GUUCAGGACAGCGUCUUGGA
Triticum aestivum GUUCAAGACGCGUCUUGGA

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

