

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

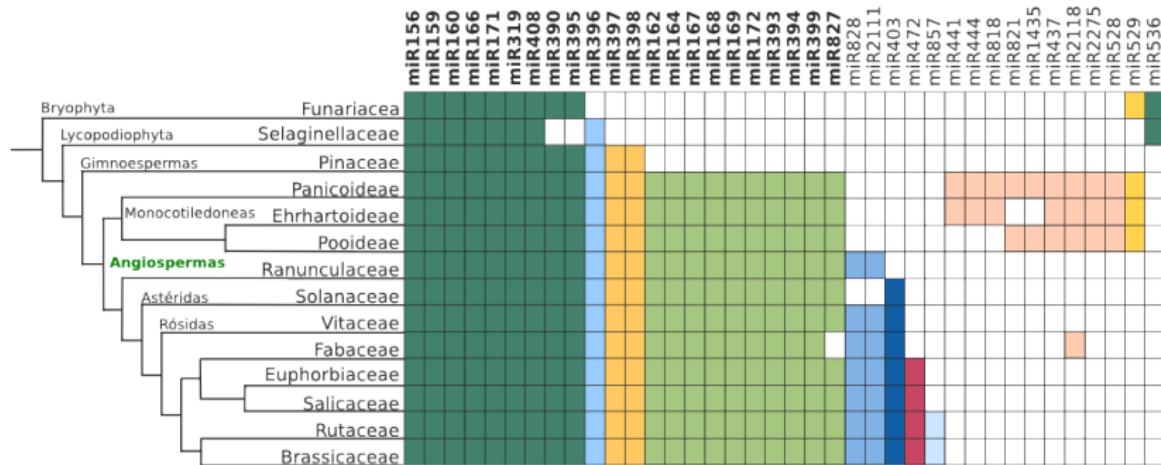
Uciel Chorostecki

Director Dr. Javier Palatnik
Instituto Biología Molecular y Celular Rosario

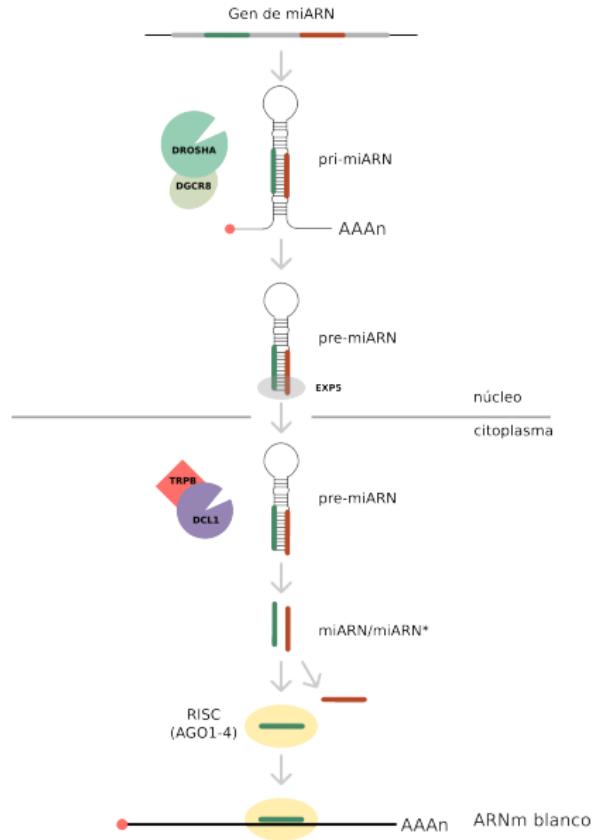
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ 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.

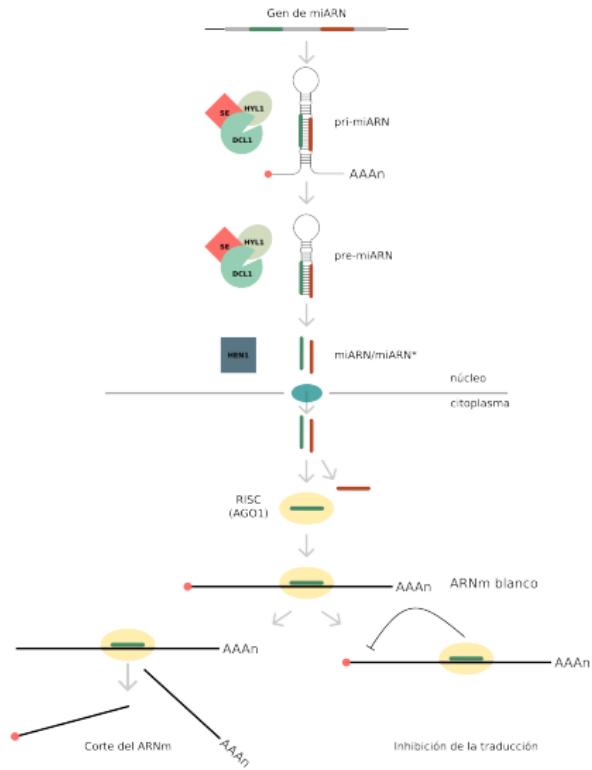
22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



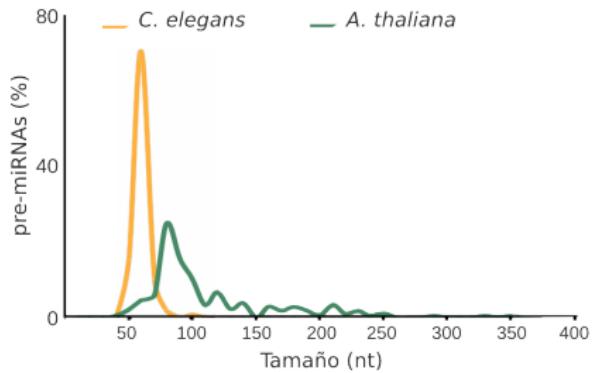
Procesamiento de miARNs en animales



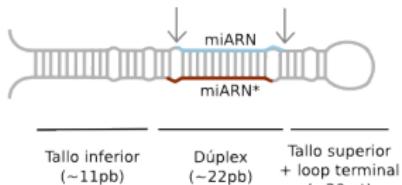
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



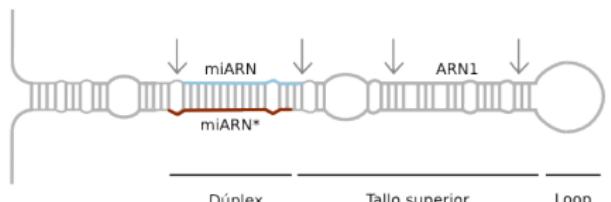
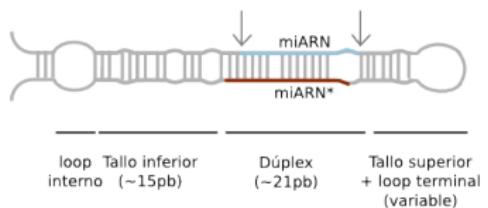
El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



Estructuras secundarias de precursores de miARNs



pre-miARNs de animales



pre-miARNs de plantas

En animales existe un gran número de genes blanco 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 blanco 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.

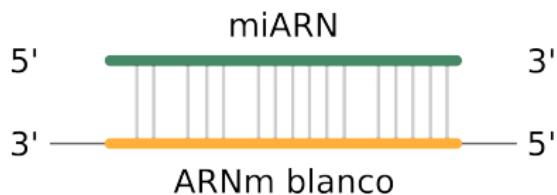
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.

En animales existe un gran número de genes blanco 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.

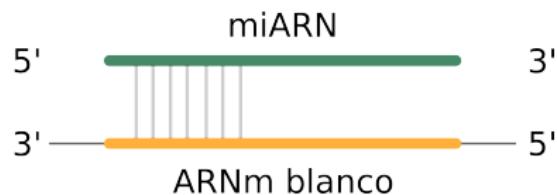
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.
- ▶ Regulación de la traducción por miARNs.
 - ▶ Inhibición de la traducción del ARNm blanco por el miARN explica la represión de la expresión 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 blanco 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.

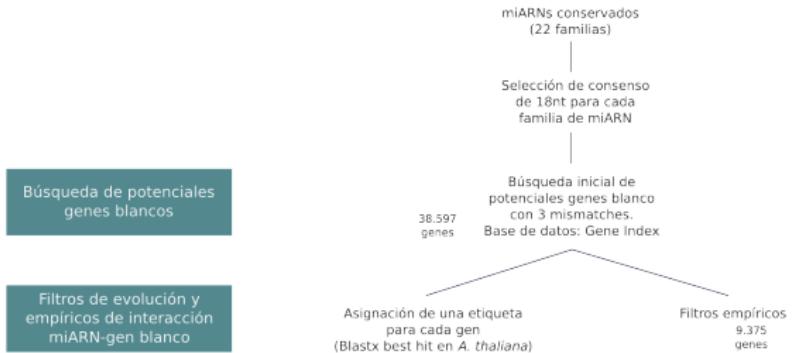
Conservación y divergencia de miARNs en distintas especies

	BAD	AVG	GODDE	miR319		BAD	AVG	GODDE	miR160
ath	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			ath	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ath	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			ath	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ath	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCUU				ath	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
hdi	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			bdi	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
cpa	mir319	AUUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				bdi	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
cpa	mir319	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				bdi	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				bdi	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				bdi	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319e	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				cpa	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319g	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			cpa	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319h	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			cpa	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319j	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			cpa	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319k	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			cpa	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319l	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			cpa	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319m	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			csl	mir160	GCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
gma	mir319p	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			gma	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
mdm	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			gma	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
mdm	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			gma	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
mtr	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				gma	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
mtr	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				gma	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
mtr	mir319d	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				gma	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
osa	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mdm	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
osa	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mdm	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ppc	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mdm	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ppc	mir319e	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mdm	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mdm	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319d	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319e	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319f	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319g	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
ptc	mir319h	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				mtr	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
sly	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
sly	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
sly	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
stu	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
stu	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				osa	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319f	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319g	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319h	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319i	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
vvi	mir319j	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				ppe	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
zma	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
zma	mir319c	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
zma	mir319b	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
zma	mir319d	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
cons		*****				pic	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
cons		*****				pic	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
cons		*****				pic	mir160g	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						ptc	mir160g	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						sly	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						sly	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						stu	mir160g	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160a	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160b	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160c	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160d	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160e	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160f	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	
						vvi	mir160g	UGCCUGCUCCCCUGUAUGCCA	

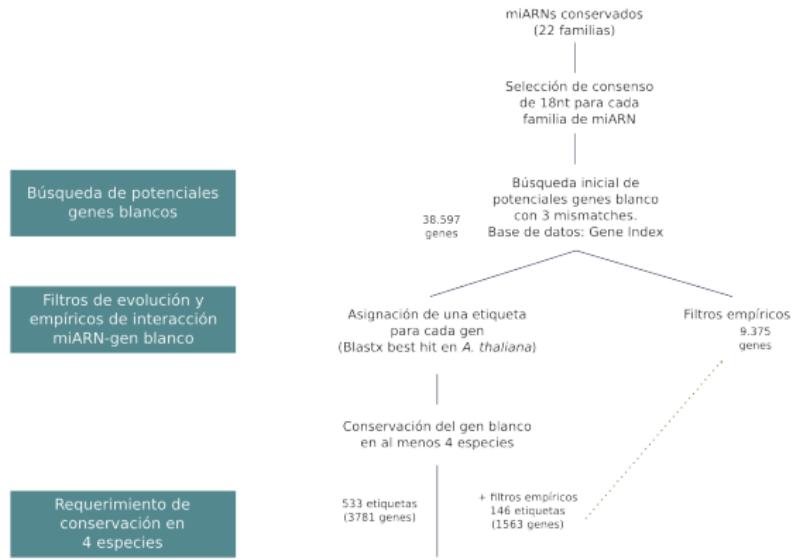
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



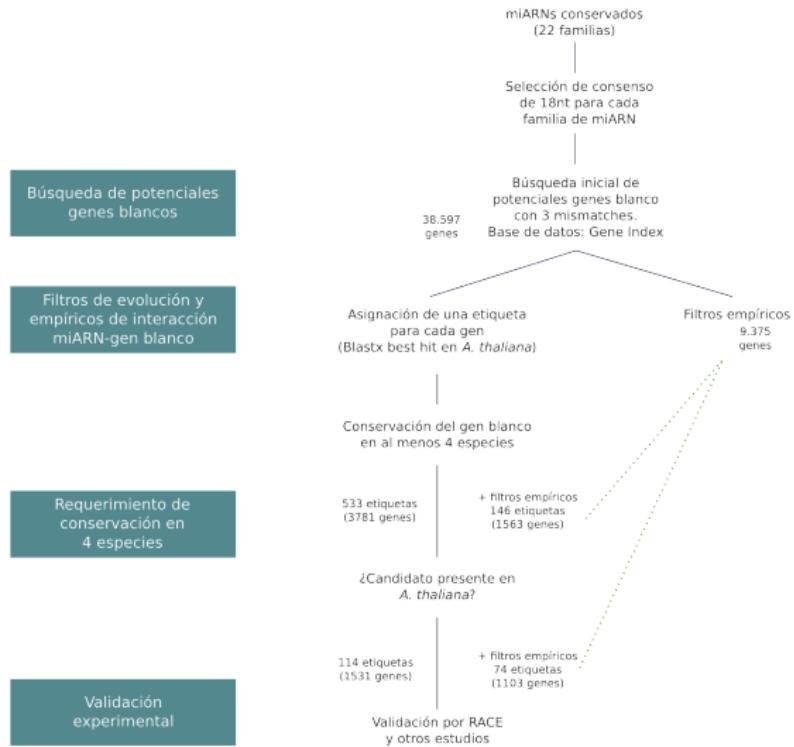
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



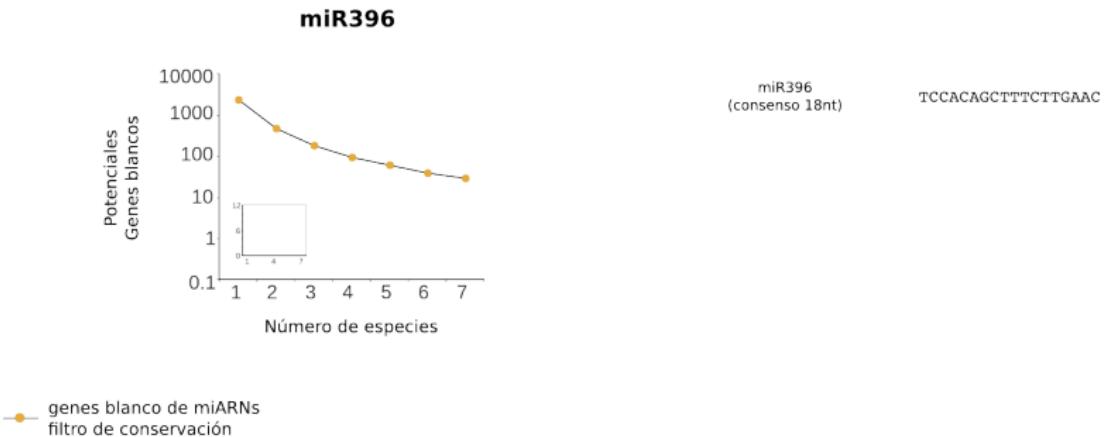
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Conservación de la interacción en distintas especie

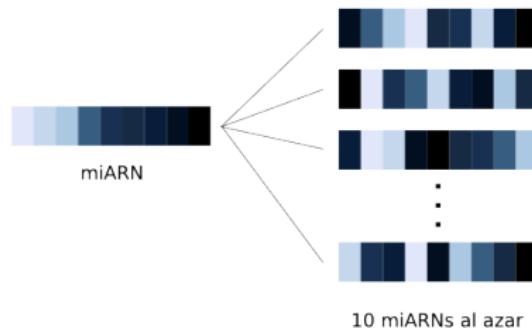


miARN consenso de 18 nt

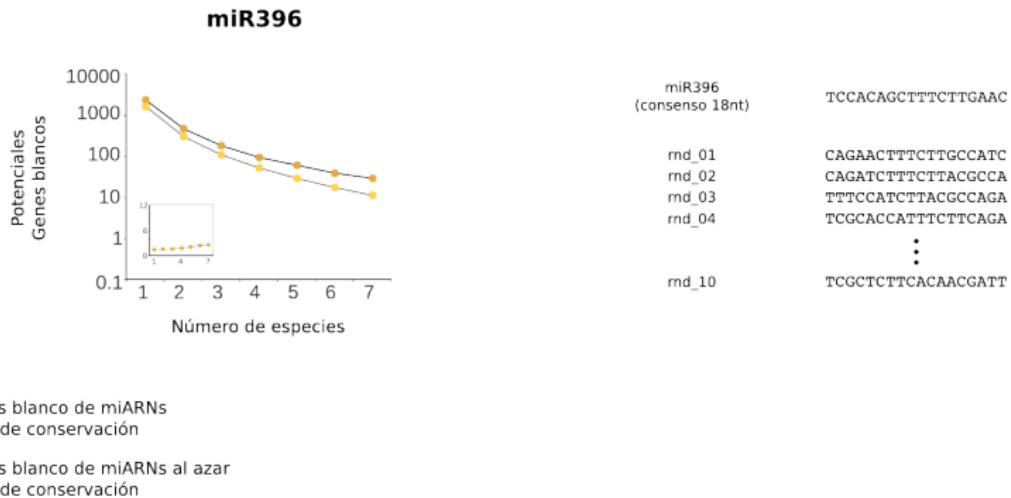


miARN

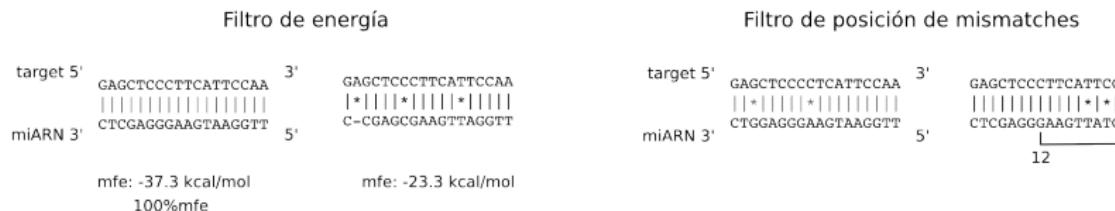
Control: miARN al azar



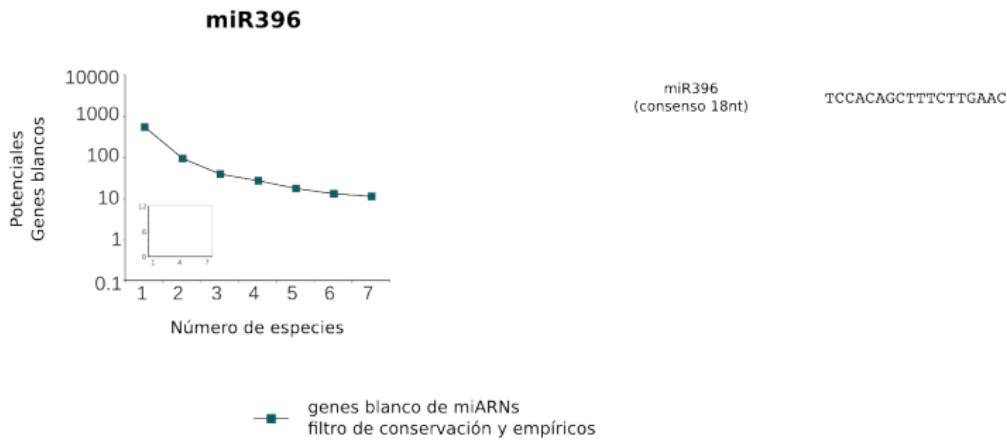
La relación señal/ruido incrementa al aumentar el número de especies



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

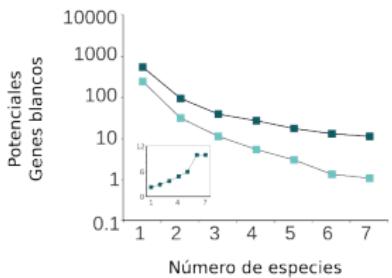


Selección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



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

miR396

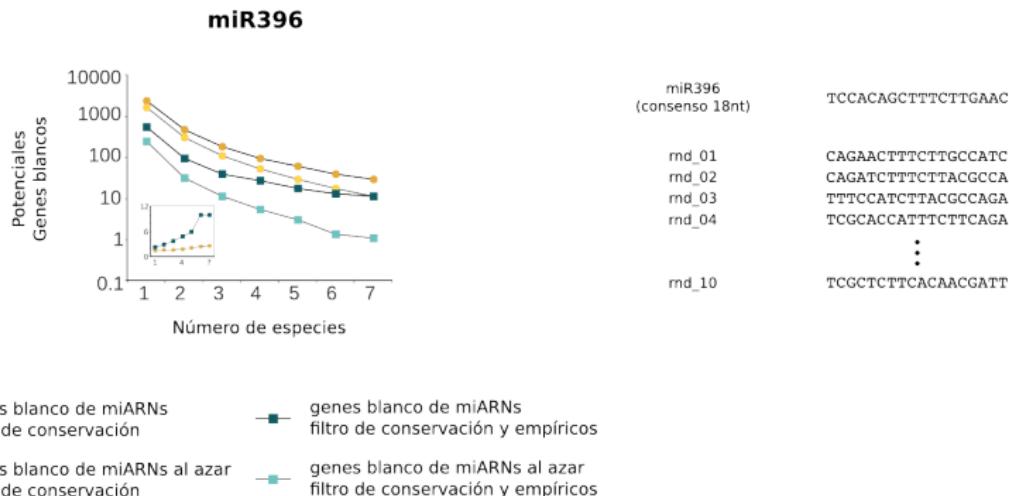


- genes blanco de miARNs filtro de conservación y empíricos
- genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación y empíricos

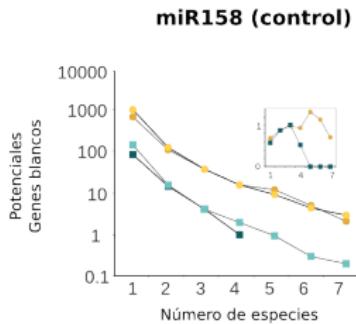
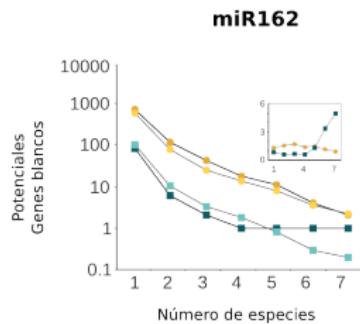
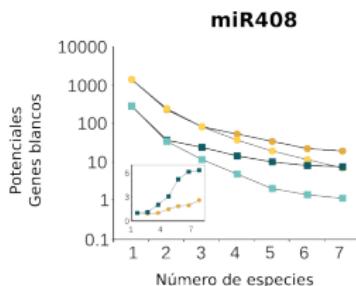
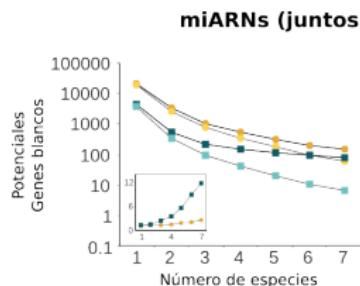
miR396
(consenso 18nt)

TCCACAGCTTCTTGAAAC
CAGAACTTCTTGCATC
CAGATCTTCTTACGCCA
TTTCCATCTTACGCCAGA
TCGGCACCATTTCTTCAGA
•
TCGCTCTTCACAACGATT

Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos

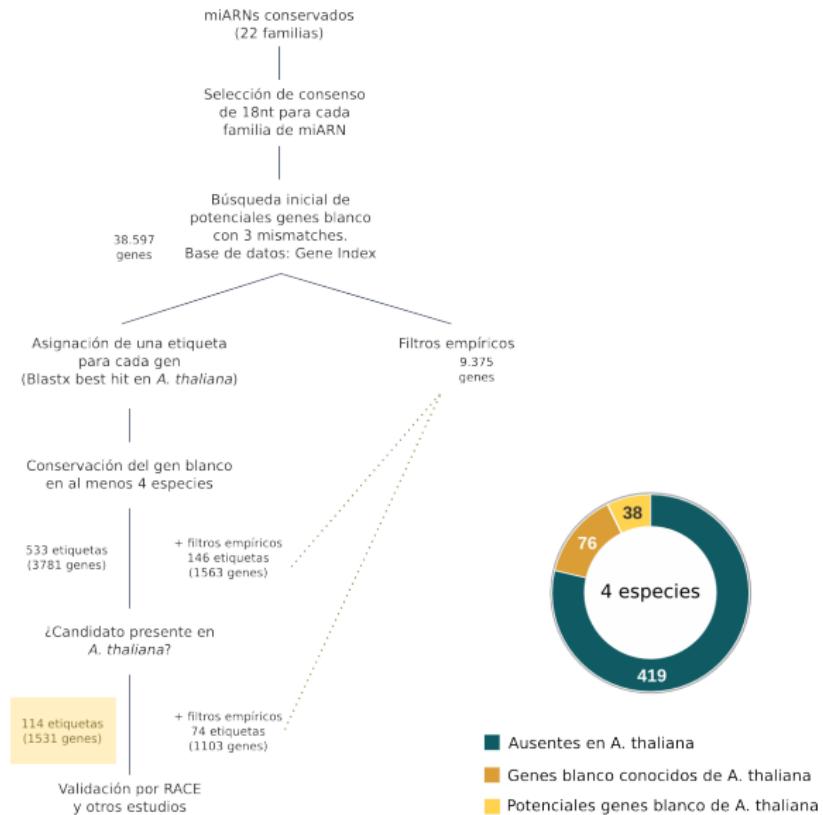


El número de genes blancos candidatos y la relación señal/ruido es variable entre los distintos miARNs



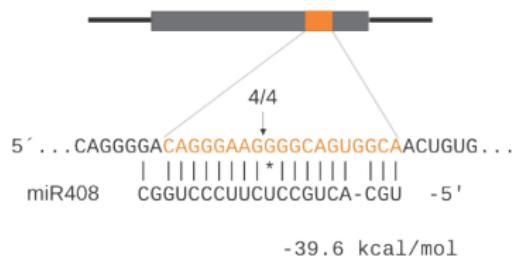
- genes blanco de miARNs filtro de conservación
- genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación
- genes blanco de miARNs filtro de conservación y empíricos
- ▲— genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación y empíricos

Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva



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

PAA2 (At5g21930)

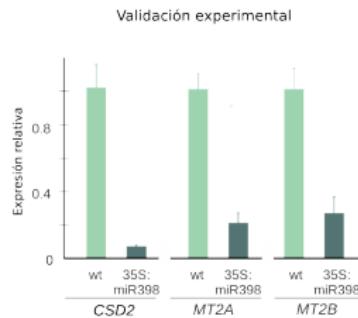
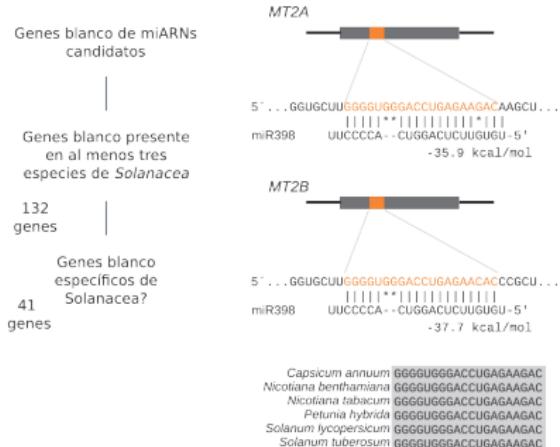


<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAGGGAAAGGGGCAGUGGCA
<i>Capsicum annuum</i>	CAGCGAAGAACGUUGCA
<i>Glycine max</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Gossypium raimondii</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Haseolus vulgaris</i>	UAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Ipomoea nil</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Lactuca sativa</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA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

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

?????????

Identificación de genes blancos específicos de Solanaceae



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



Targets					
Arabidopsis Tag [?]	Count [?]	Species [?]	Target description [?]	Gene family [?]	Alignments [?]
AT1G12520	16	ShowHide	copper chaperone for SOD1		View
AT1G08830	9	ShowHide	copper/zinc superoxide dismutase 1		View
AT3G15640	4	ShowHide	Rubredoxin-like superfamily protein		View
AT1G60230	3	ShowHide	Rubredoxin-like superfamily protein		View
AT2G26975	3	ShowHide	Ctr copper transporter family		View
AT2G40340	3	ShowHide	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	AP2-EREBP Transcription Factor Family	View
AT3G27200	3	ShowHide	Cupredoxin superfamily protein	Miscellaneous Membrane Protein Families	View
AT3G43860	3	ShowHide	glycosyl hydrolase 9A4	Glycoside Hydrolase Gene Families	View
AT4G00050	3	ShowHide	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factor	View
AT5G12220	3	ShowHide	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 [•]
Aquica_013_00504.1	Aquilegia coerulea	TGGGCAGACCTGGGAACAT * * * * * 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	TGGGCAGACCTGGGAACAC * * * * * 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	GACAGAAAGAGAGTGGAGCA	factores de transcripción SPL
mir159	TGGATTTGAAAGGGAGCTC	factores de transcripción MBY, NOZZLE (NZL)
mir160	CCCTGCTCCCCCTATATGCC	factores de transcripción ARF
mir162	CGATAAACCTTCGATCC	DCL1
mir164	GGAGAAGCAGGGCACGTG	factores de transcripción NAC
mir166	CGGACCAAGGCTTCATPTCC	factores de transcripción HDZip
mir167	GAAGCTGCCAGCATGATC	factores de transcripción ARF, IAA-ALANINE RESISTANT 3 (IAR3)
mir168	CGCTTGGTGCAGGTGGG	AGO1
mir169	AGCCAAGGATGACTTGCC	factores de transcripción CCAAT-HAP2
mir171	TGGAGCCGTGGCAATATC	factores de transcripción GRAS
mir172	GAATCTTGATGATGCTGC	factores de transcripción AP2
mir319	TGGACTGAAAGGGAGCTCC	factores de transcripción TCP
mir390	AGCTCAGGAGGGATAGCG	TAS RNA
mir393	CCAAAGGATCGCATCTGA	TIR1 proteins, F-BOX proteins
mir394	TGGCATCTGTGCCACCTC	proteínas F-BOX
mir395	TGAAGTGTGCGGGAAAC	ATP-sulfúrlasas, transportadores de sulfato
mir396	TCCACAGCTTTCTTGAAC	factores de transcripción GRF, MMG4.7, FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU)
mir397	CATTGAGTCAGCGTTGA	Laccases
mir398	GTGTTCTCAGGTACCCCC	Cu/Zn SODs, CytC oxidase protein subunit, Chaperona de cobre (CCS)
mir399	GCCAAAGGAGATTTGCC	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina
mir408	TGCACTGCTCTTCCCTG	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 para predecir potenciales genes blancos regulados por miARNs en plantas.

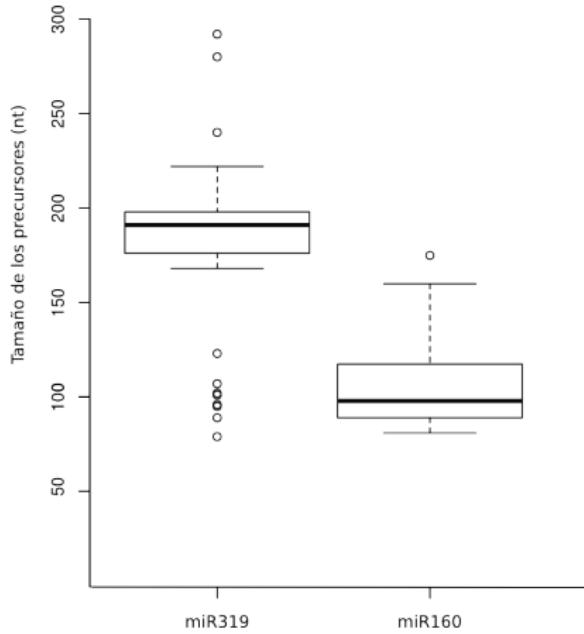
Objetivos específicos

- ▶ 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.

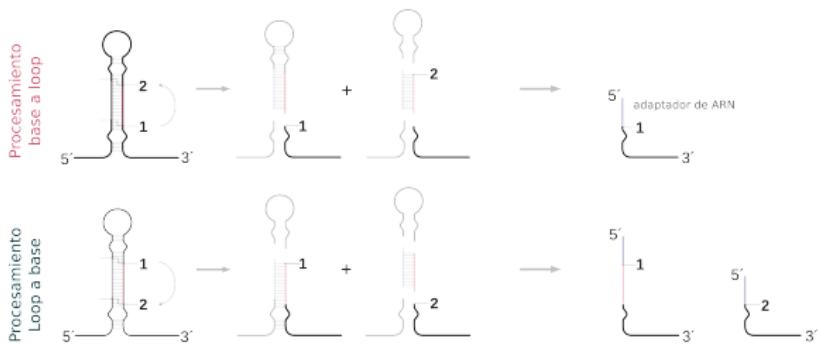
Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



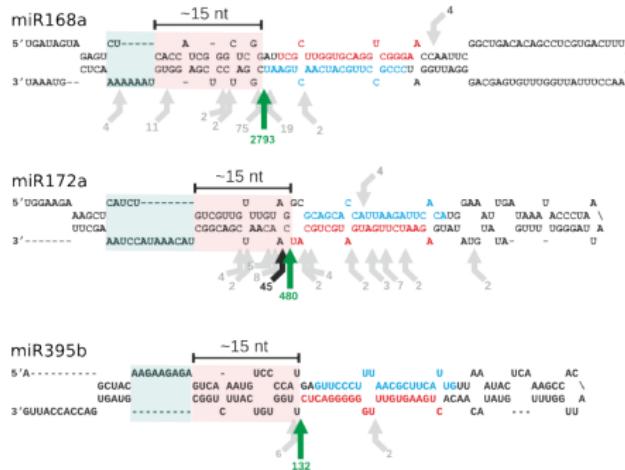
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



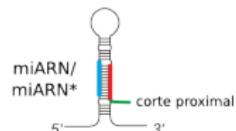
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



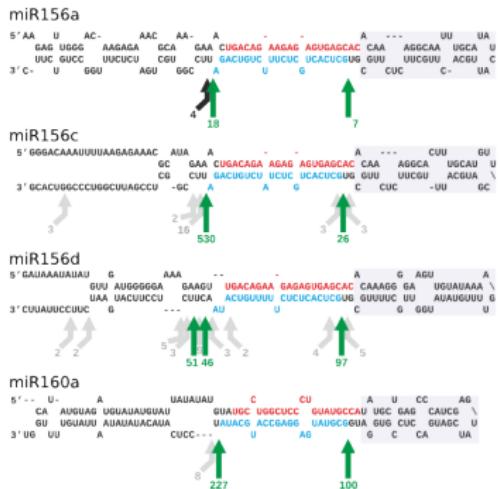
Los precursores que se procesan desde la base tienen un sólo pico de señal en las bibliotecas de SPARE



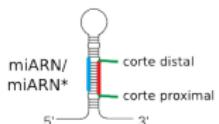
Detección solamente
del corte proximal



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



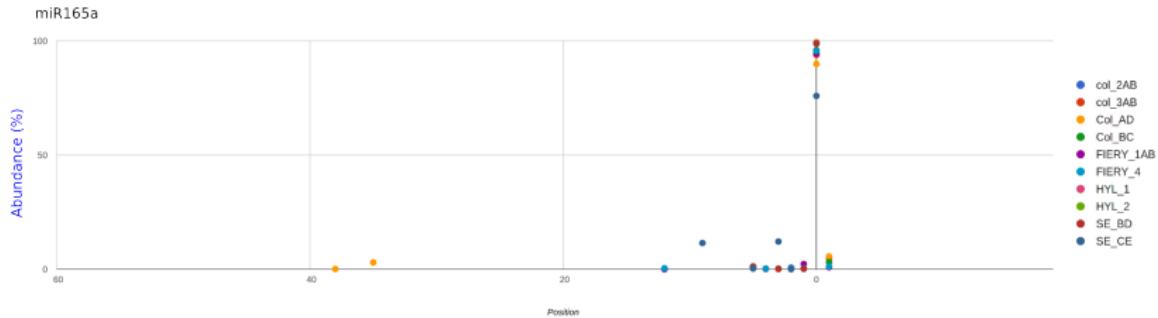
Detección de ambos cortes,
proximal y distal



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

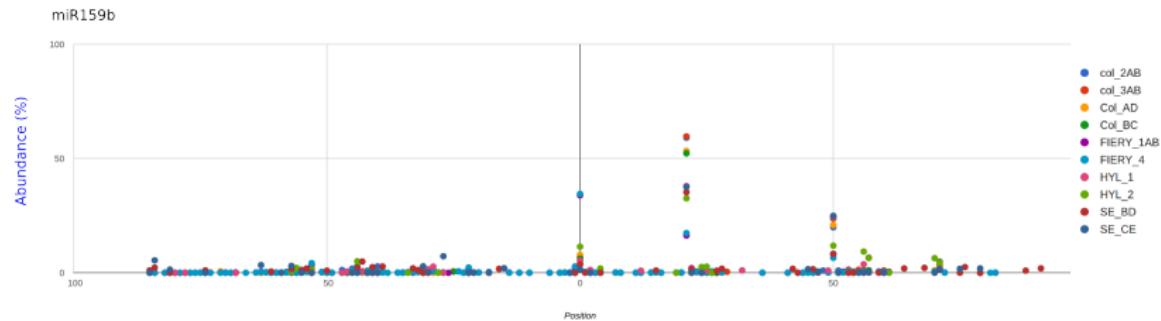
Visualización de precursores procesados desde la base



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

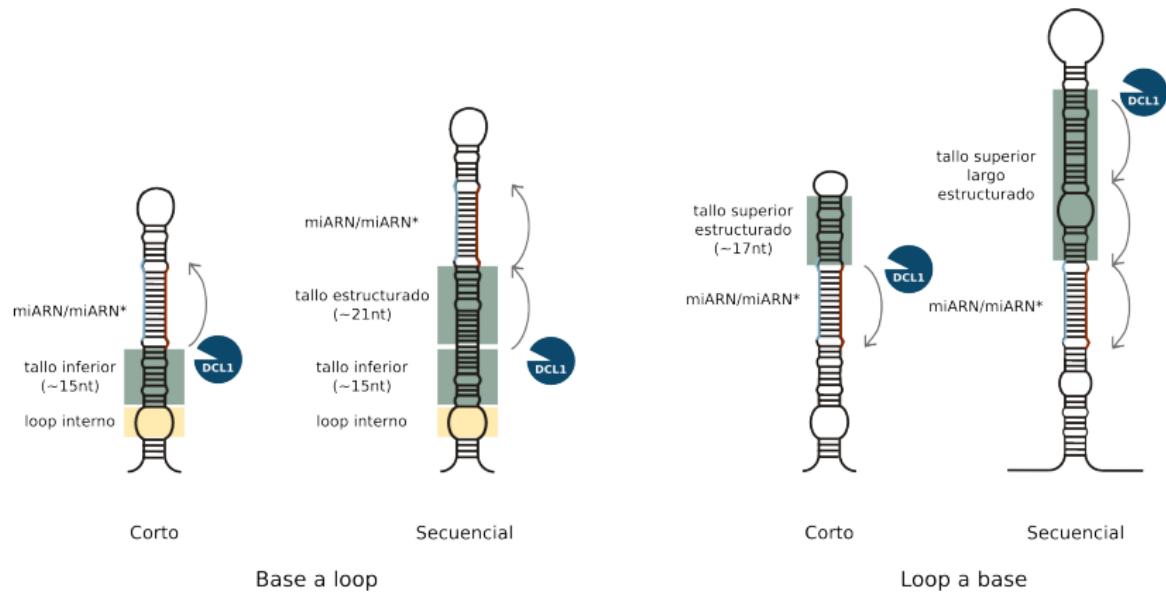


Visualización de precursores procesados desde el loop



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

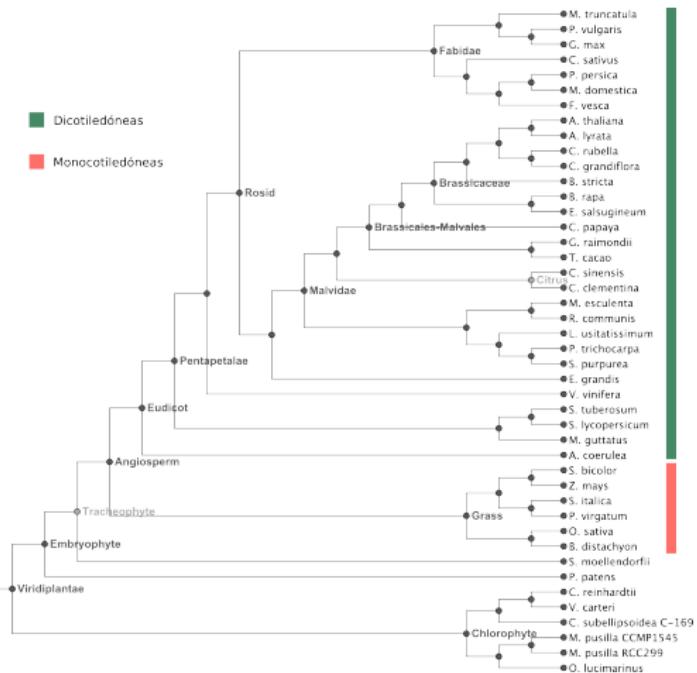


Objetivos específicos

- ▶ 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?

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. All Rights Reserved.



cons



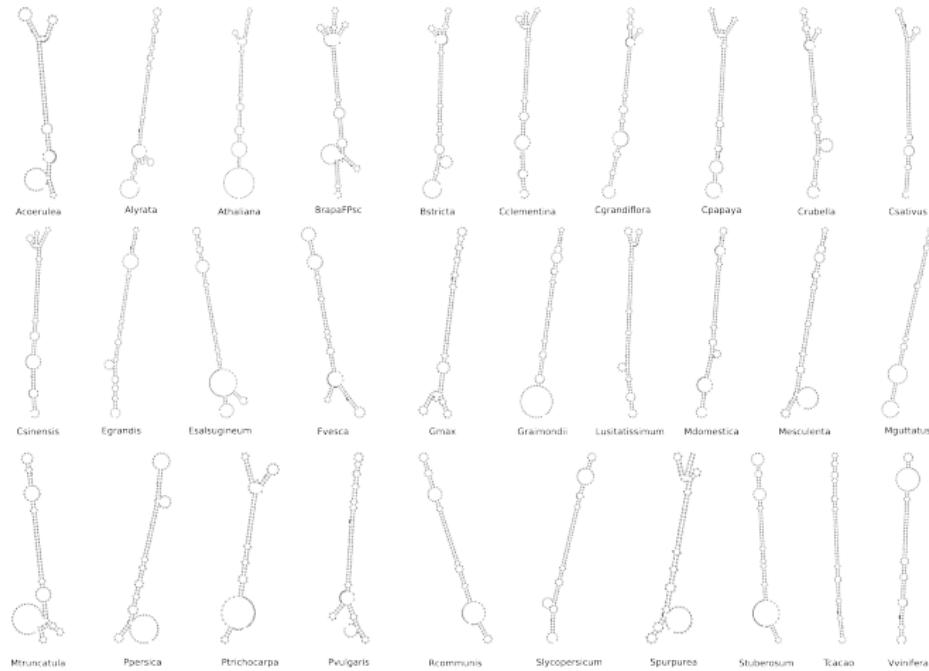
Cola de conservación hacia la izquierda del miARN y hacia la derecha del miARN*

					miARN*															
Alhydrat	AC	UUAUU	UCC	GGA	GU	UC	A	AGGGUGGCUUUNGCCAUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	US	AU	GG	CA	GGU	GG	US	A	U	U	
Methionat	AC	UAUUG	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	C	A	GC	CA	GUU	GG	S	A	U	U	
Propranolol	AC	UUAUU	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAA	CA	A	A	A	AA	
Silycopersi	AC	GAC	UCA	GU	GG	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	AC	CAUCG	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Ergardil	AC	UCAAC	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Cyprandil	AC	UUAUU	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	AC	UCAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Cisnemisin	AC	UCAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Lutamex	AC	UCAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	AC	UCAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Geax	CA	UACAU	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	UACAU	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	UACAU	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Purpurea	CA	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Catstivus	CA	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
R	REAUCAUC	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Mesocistema	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Mugitatus	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Capapaya	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Crucellula	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Tocaco	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Pulgariensis	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Gramineus	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Strobosom	GU	GUAAAAC	UAC	GU	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GU	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	

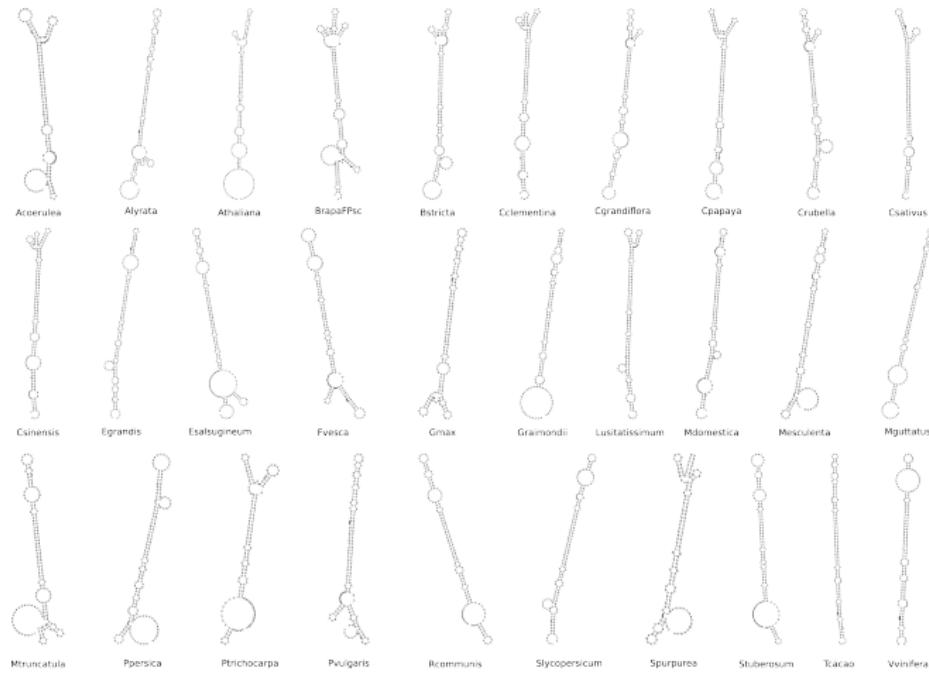
ANSWER

© 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*

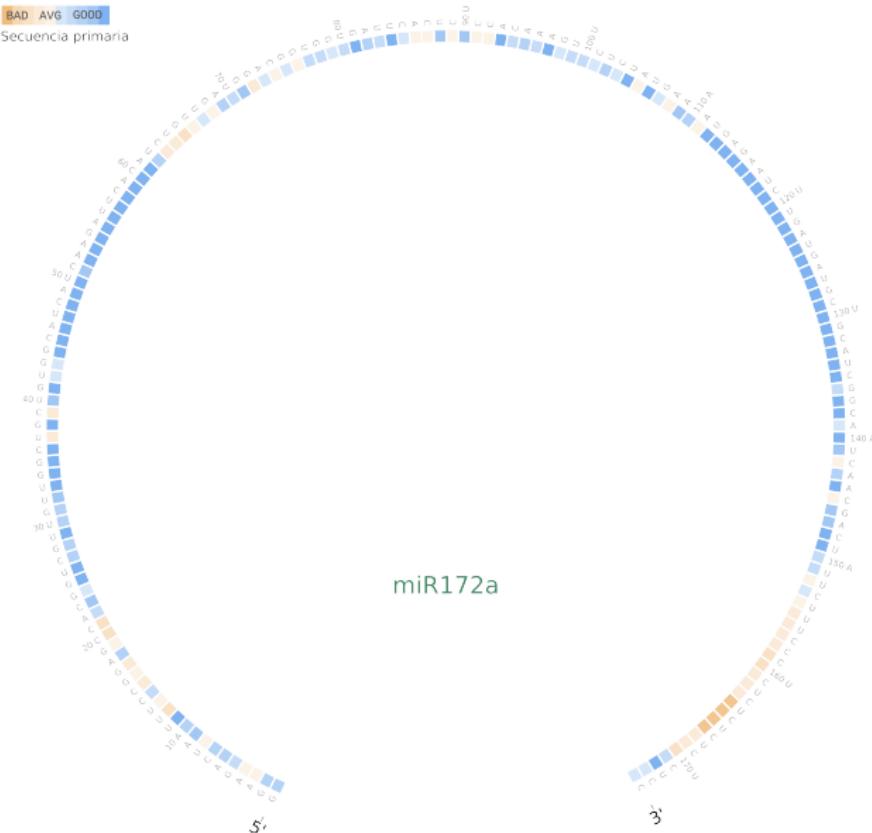


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN*

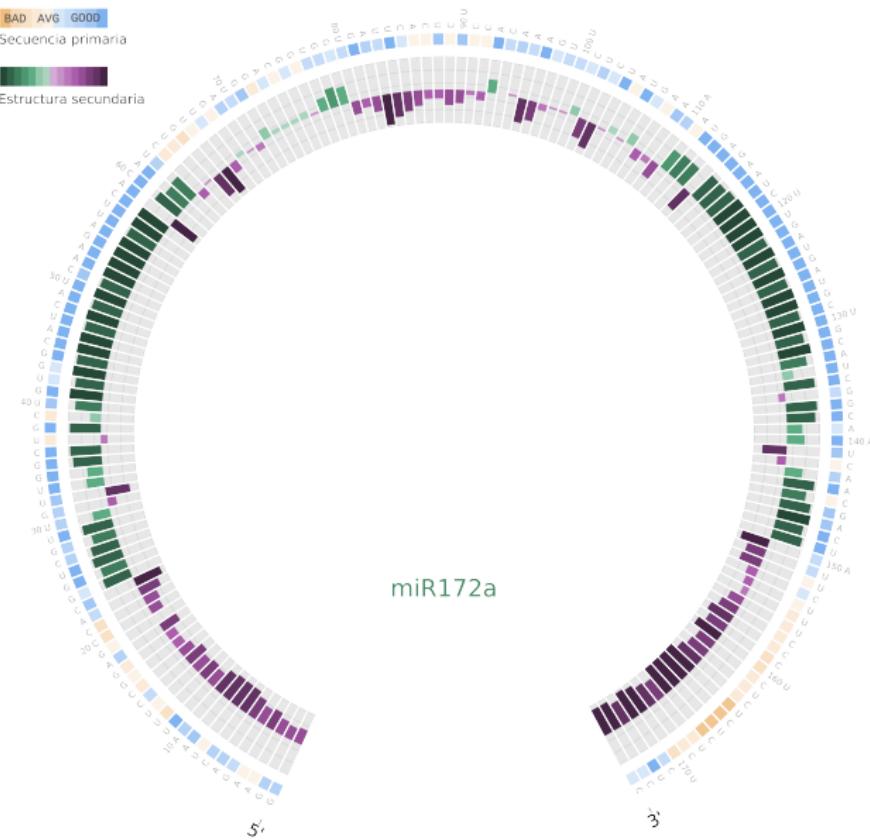


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

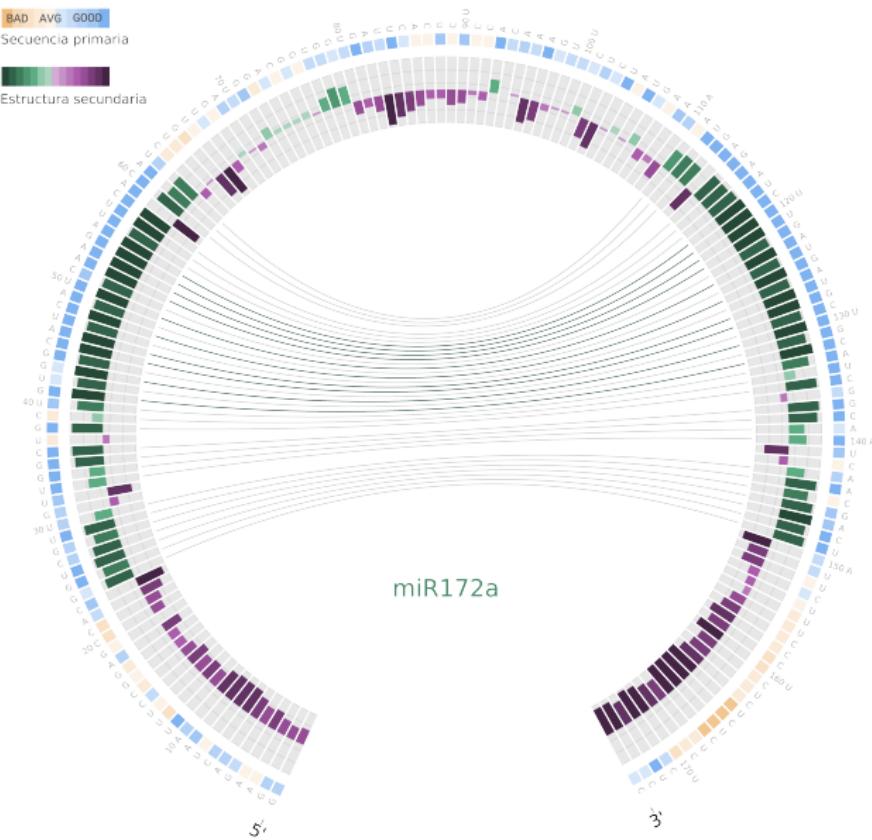
Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



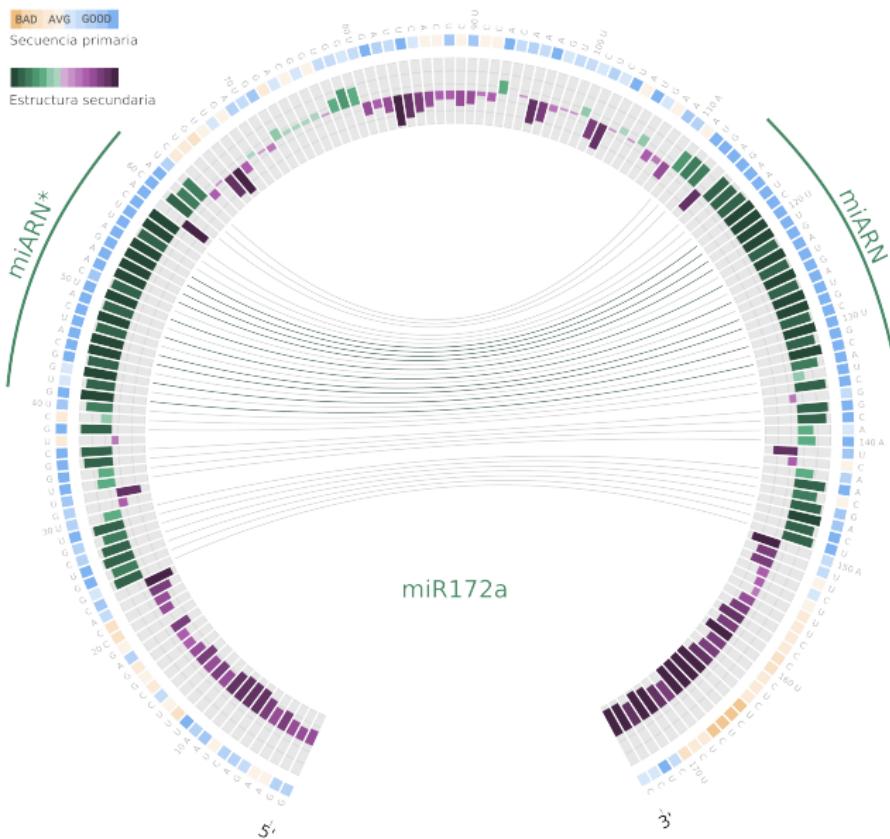
Frecuencia de bases apareadas y despareadas



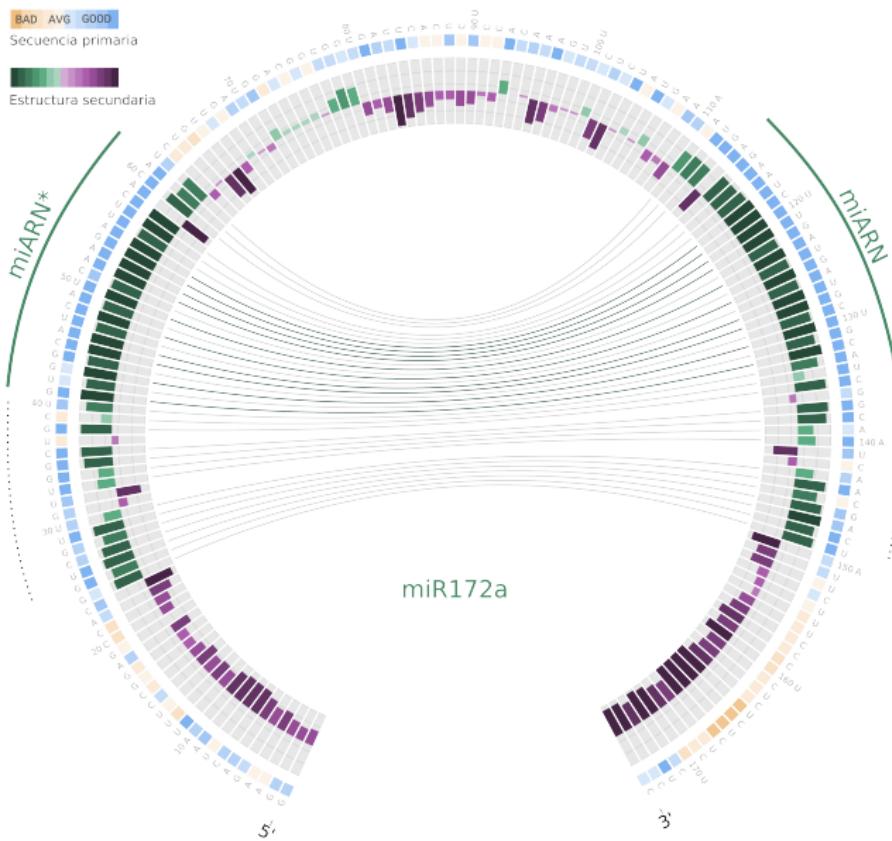
Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



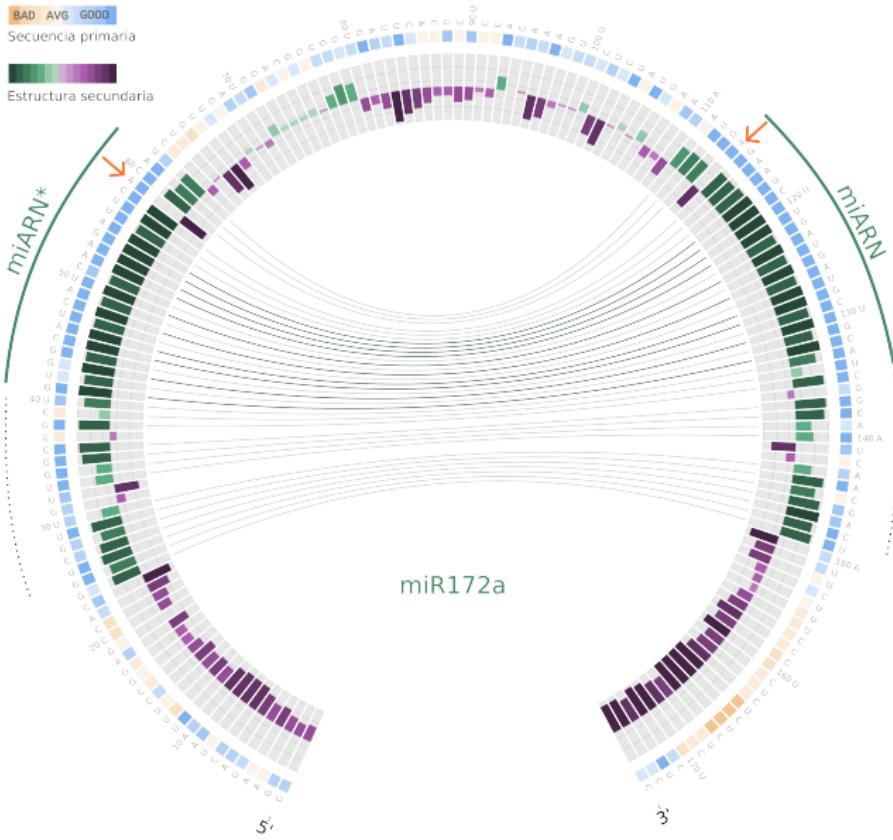
miARN y miARN* conservados en secuencia primaria y estructura



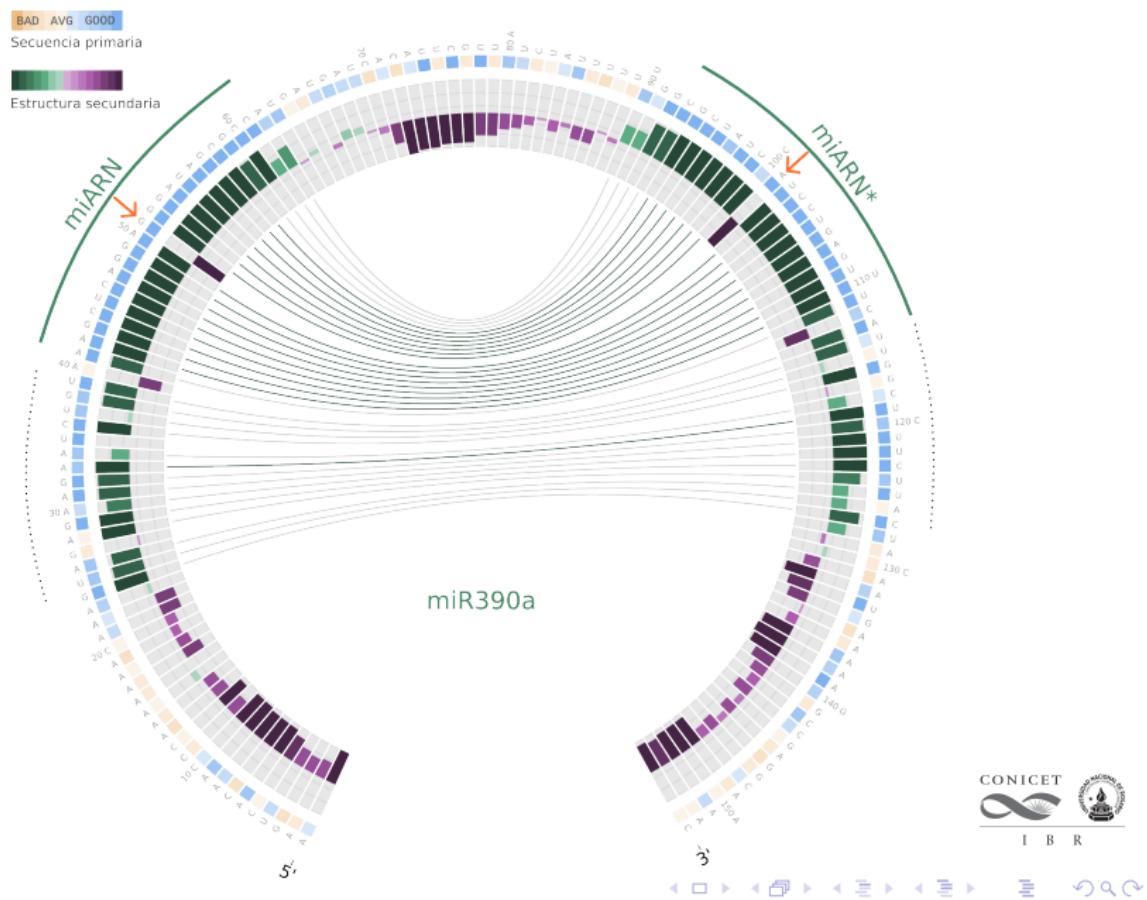
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



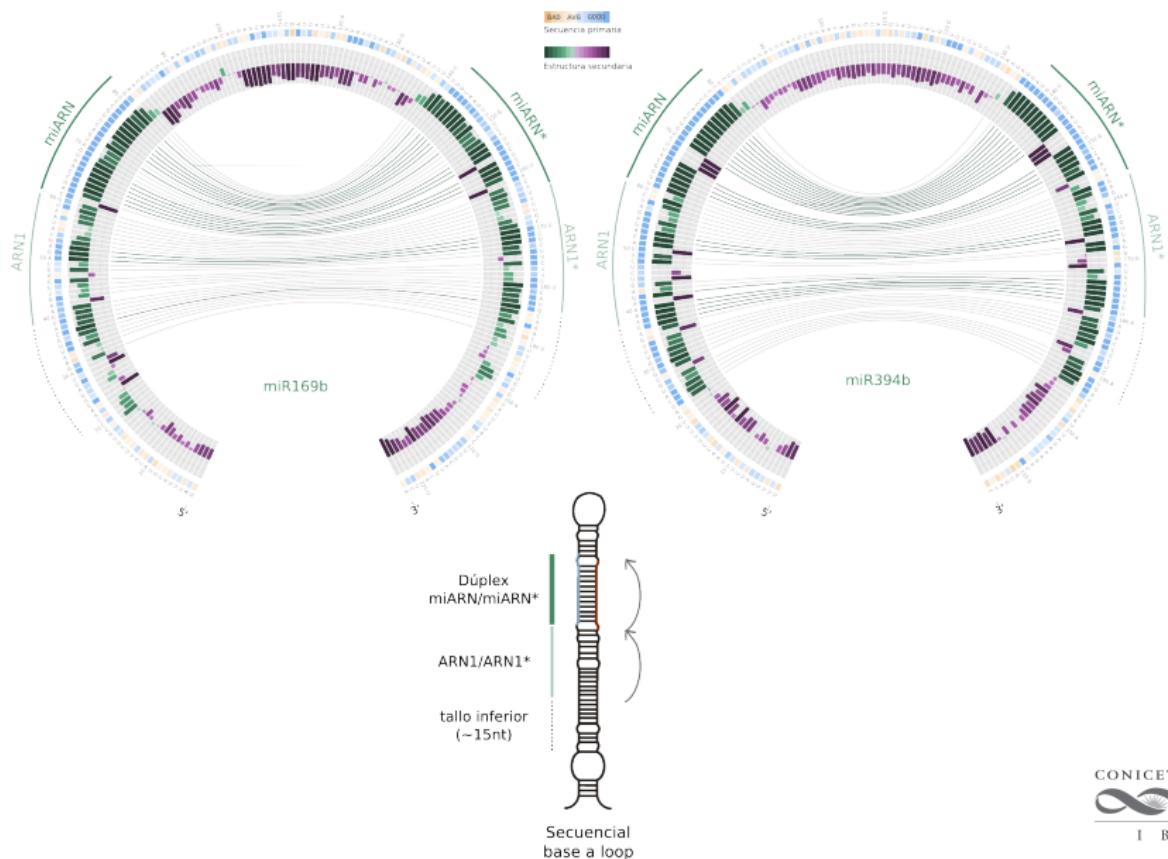
Mismatches conservados



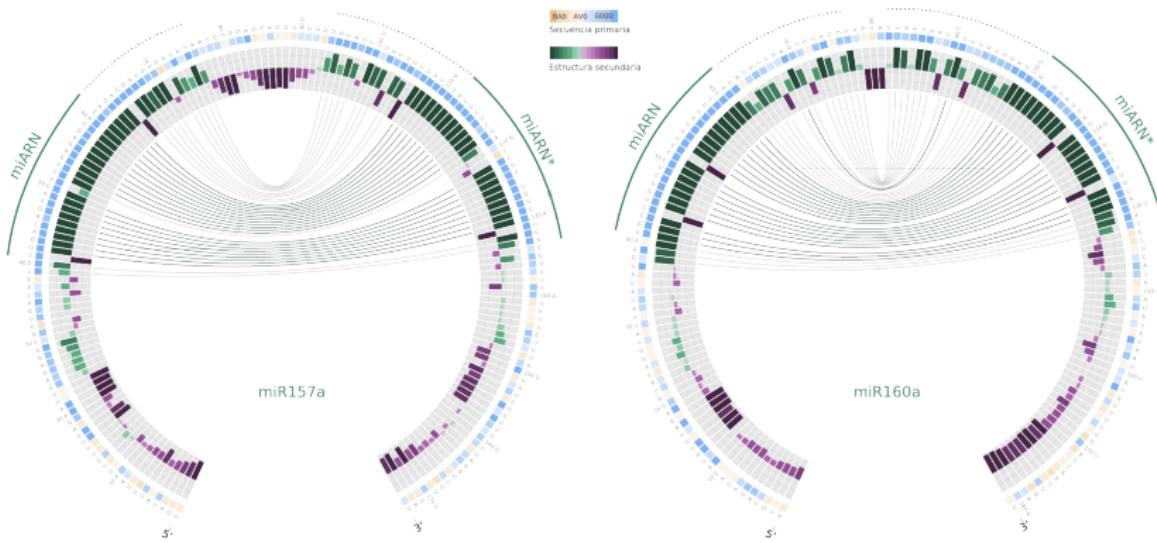
Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



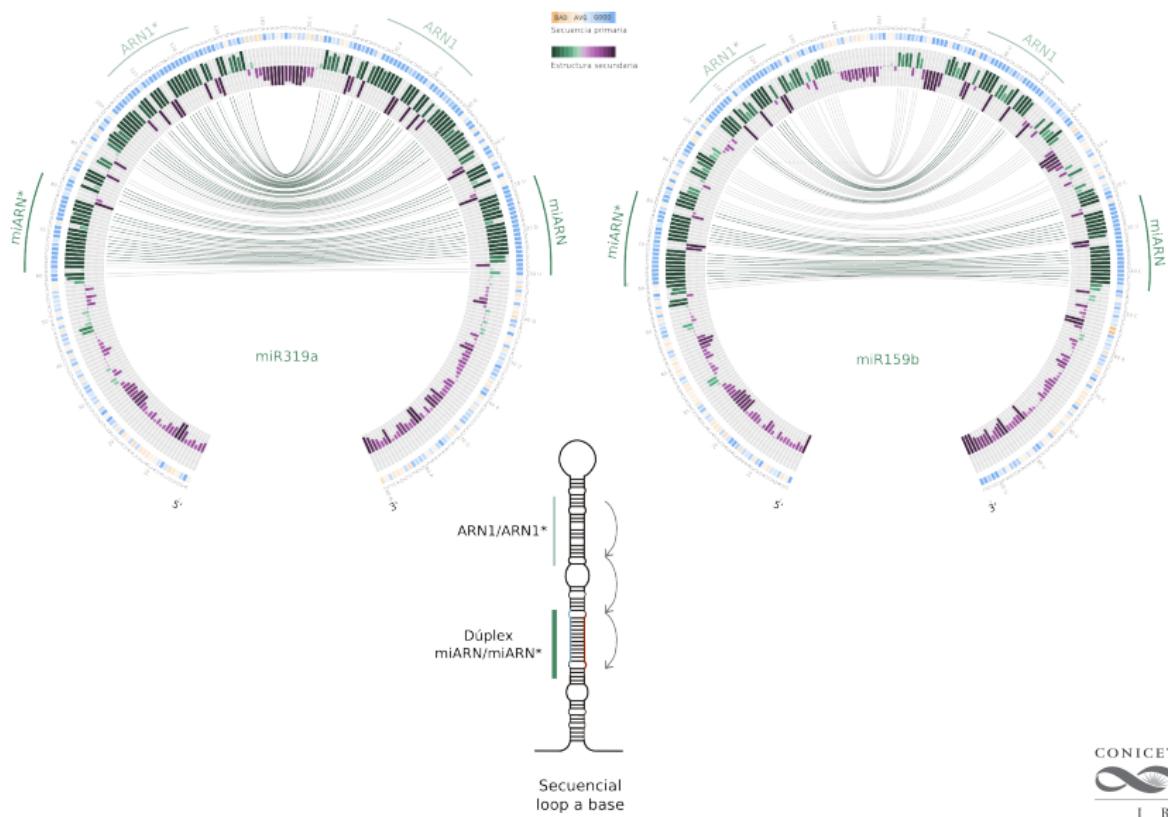
Precursos que se procesan desde la base en forma secuencial



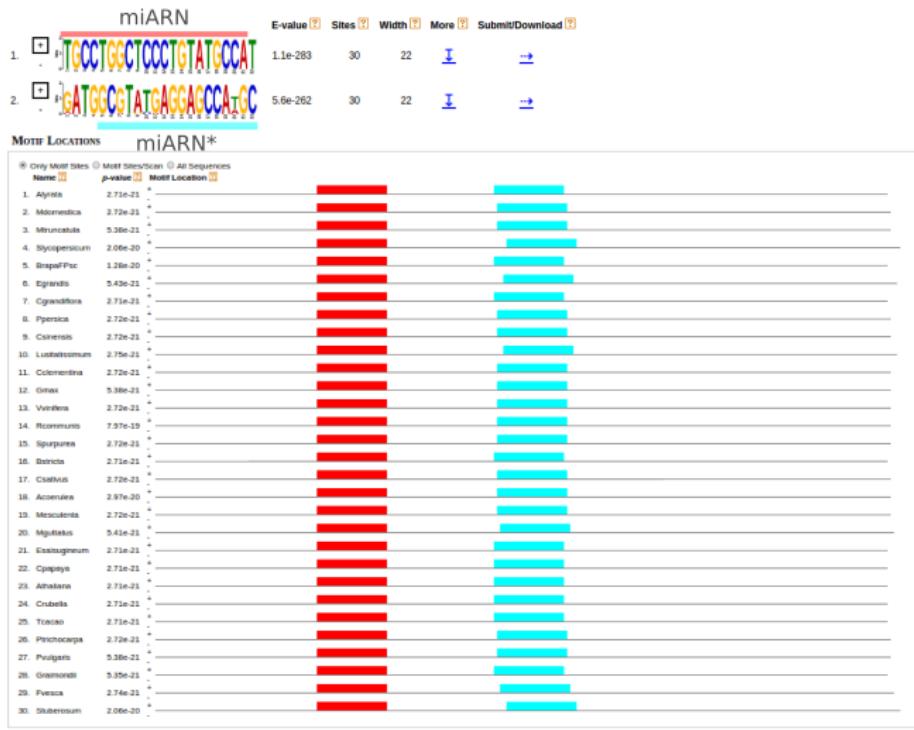
Precursors que se procesan desde el loop cortos



Precursors que se procesan desde el loop en forma secuencial



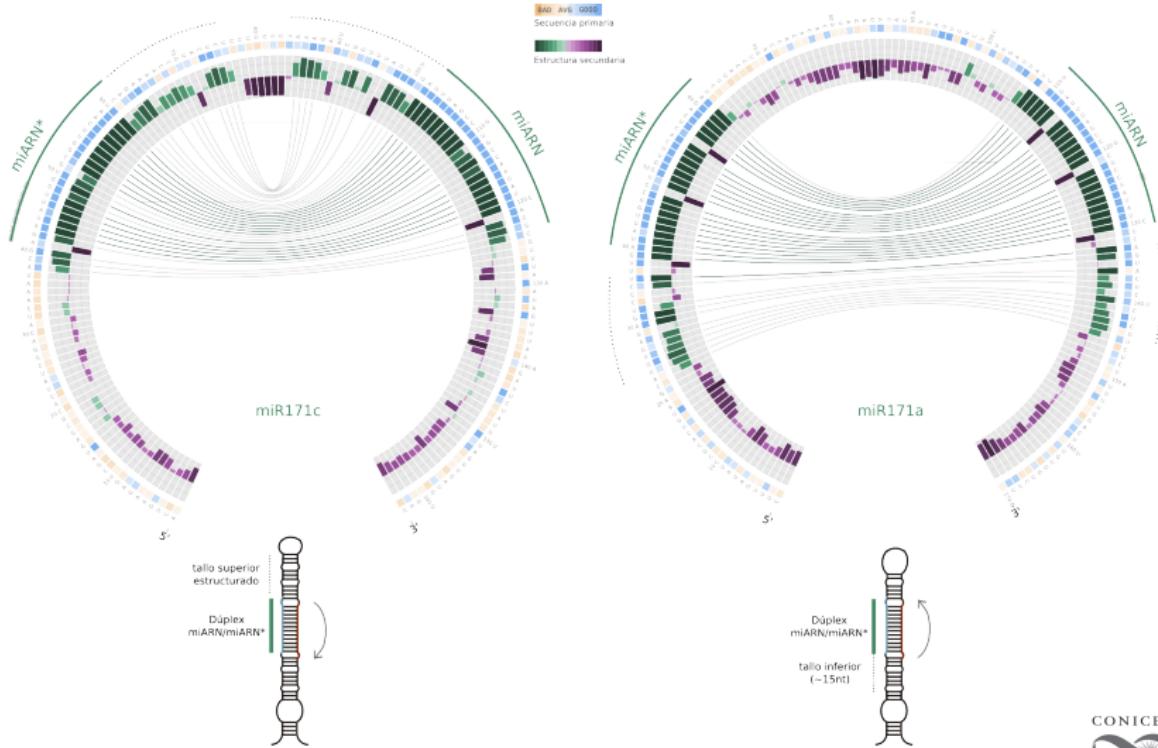
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



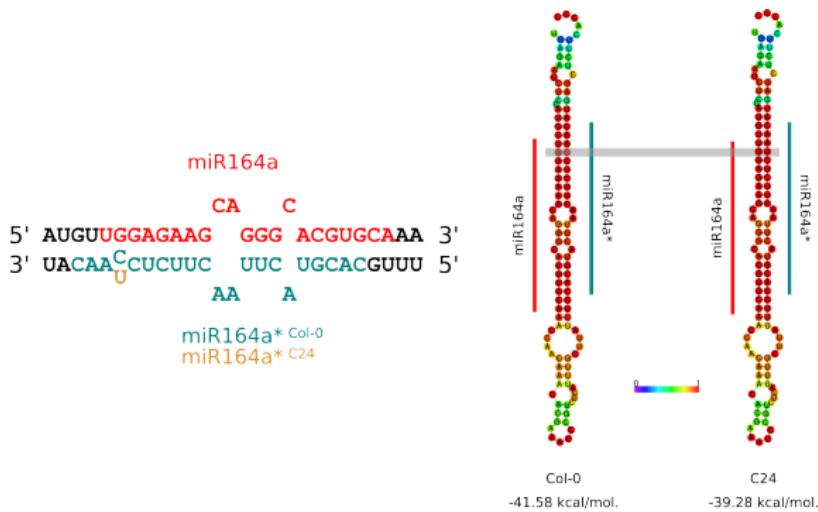
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



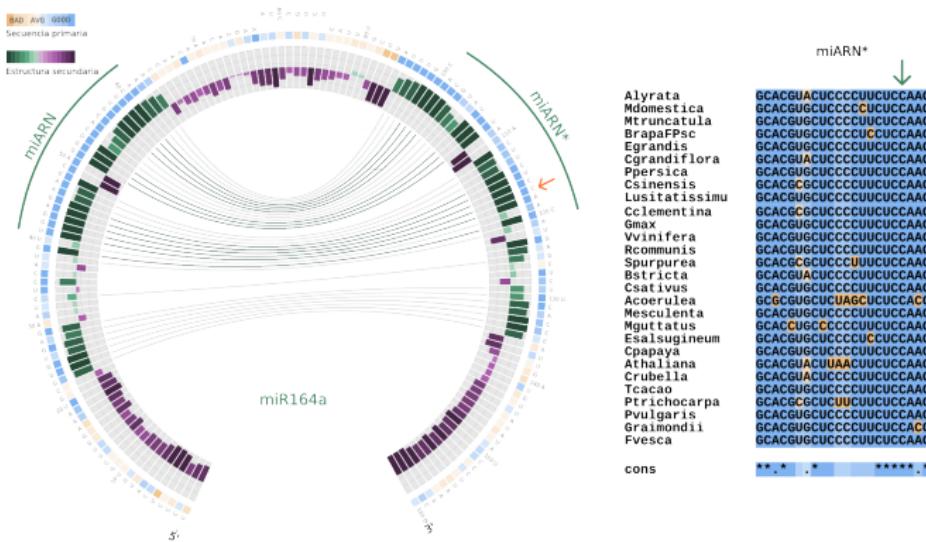
Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



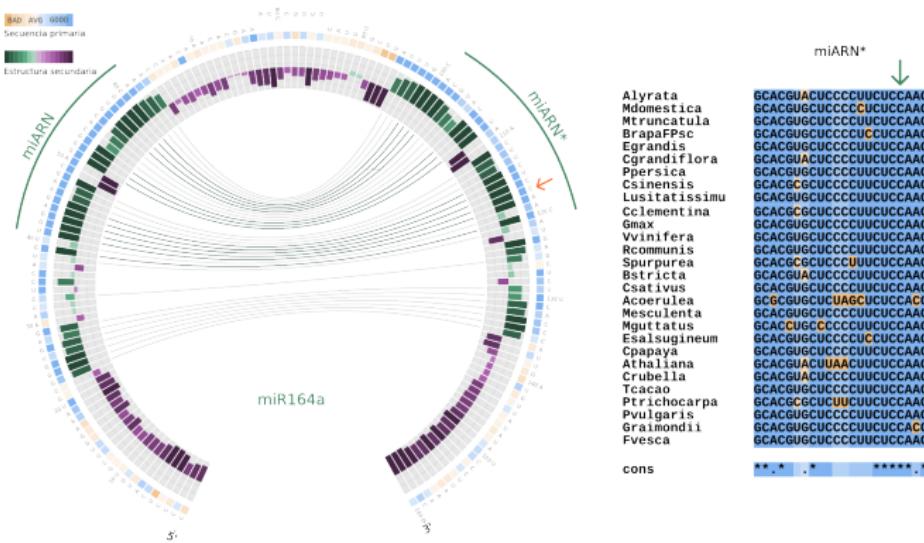
Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

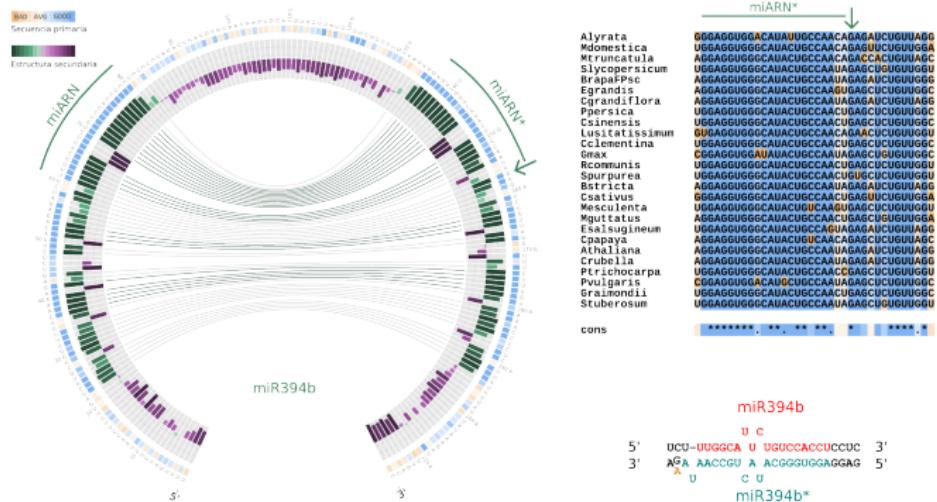


Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

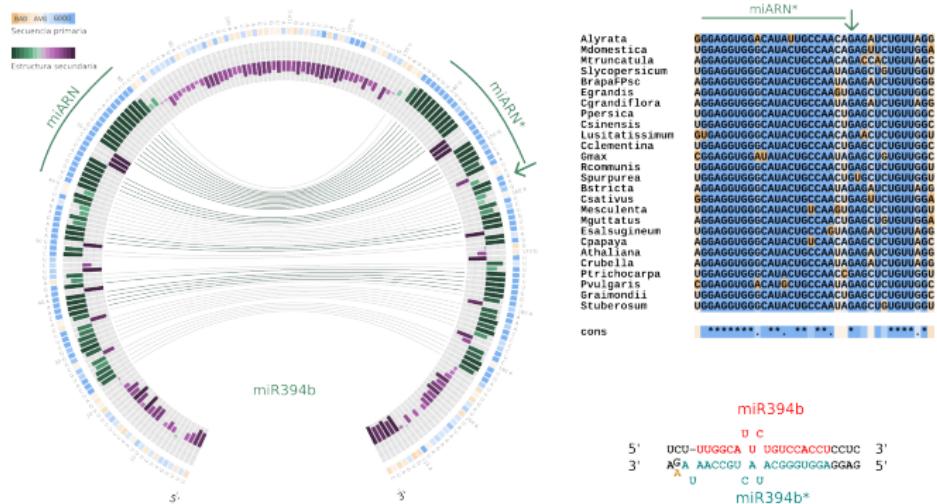


La posición *2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

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

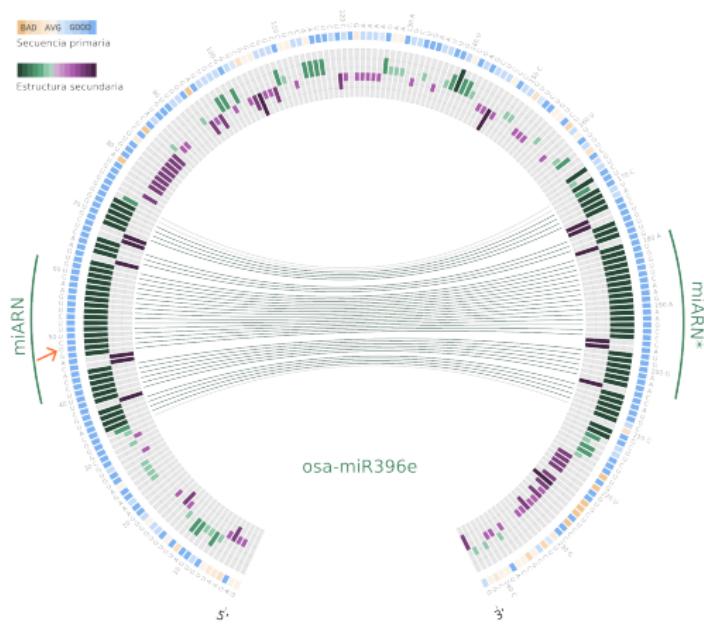


Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

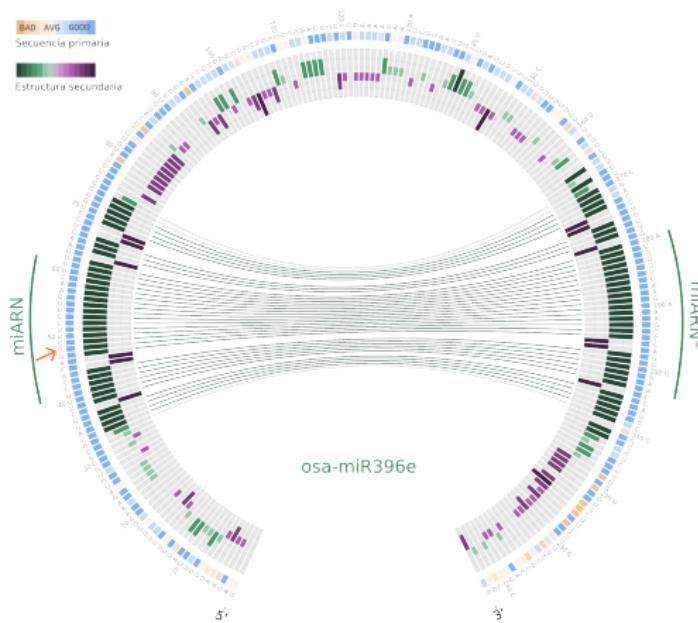


Mutaciones simples en el precursor puede afectar el reconocimiento de DICER.

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.

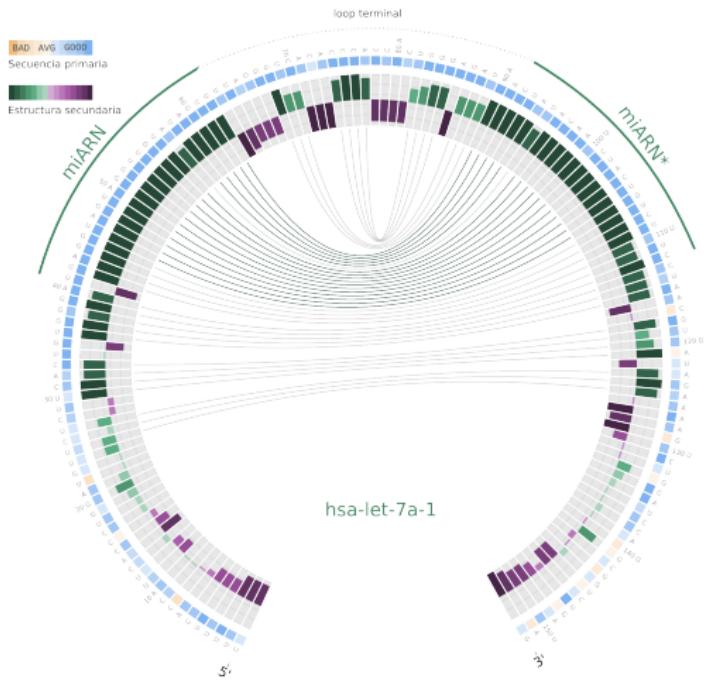
¿Qué sucede con los precursores de miARNs conservados en animales?

Animales

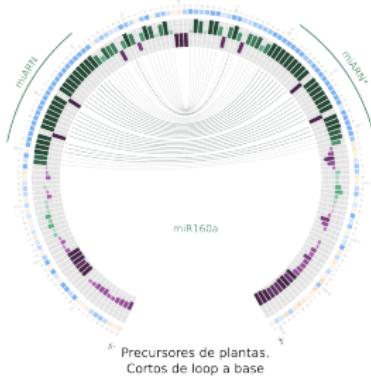
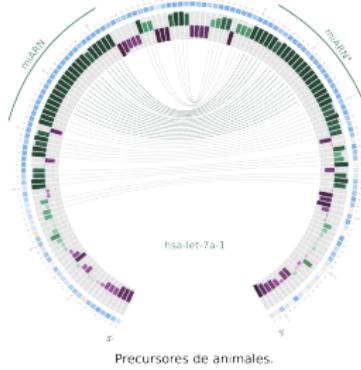
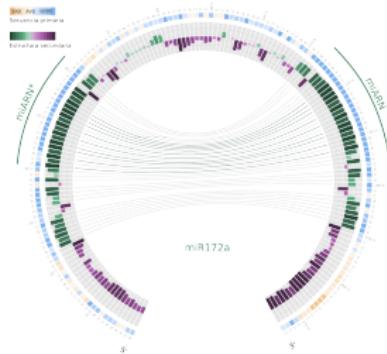
Bos taurus
Canis familiaris
Equus caballus
Gallus gallus
Gorilla gorilla
Homo sapiens
Macaca mulatta
Monodelphis domestica
Mus musculus
Ornithorhynchus anatinus
Petromyzon marinus
Sus scrofa
Xenopus tropicalis

hsa-let-7-a.

hsa-let-7-a. El loop terminal está conservado en la mayoría de los precursores de animales estudiados.



Circos animales vs plantas



- ▶ 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.

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

- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR

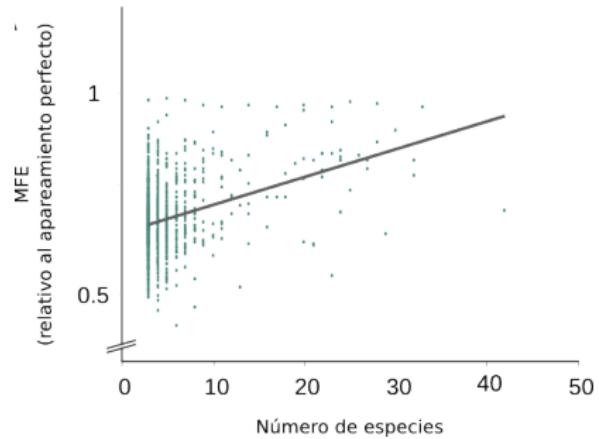
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

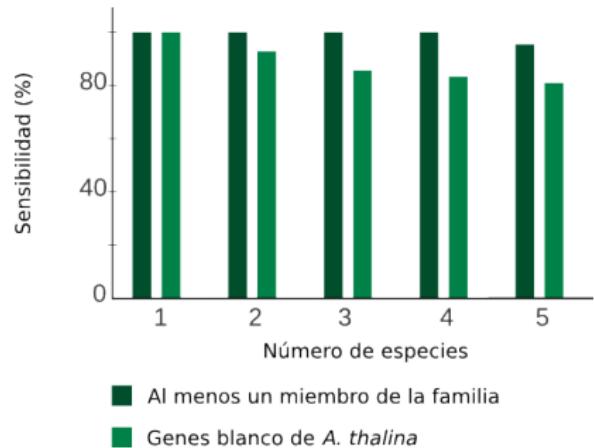
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollo de una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica

- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecánisticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollo de una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica
- ▶ Análisis de las estructuras de los precursores y su evolución.

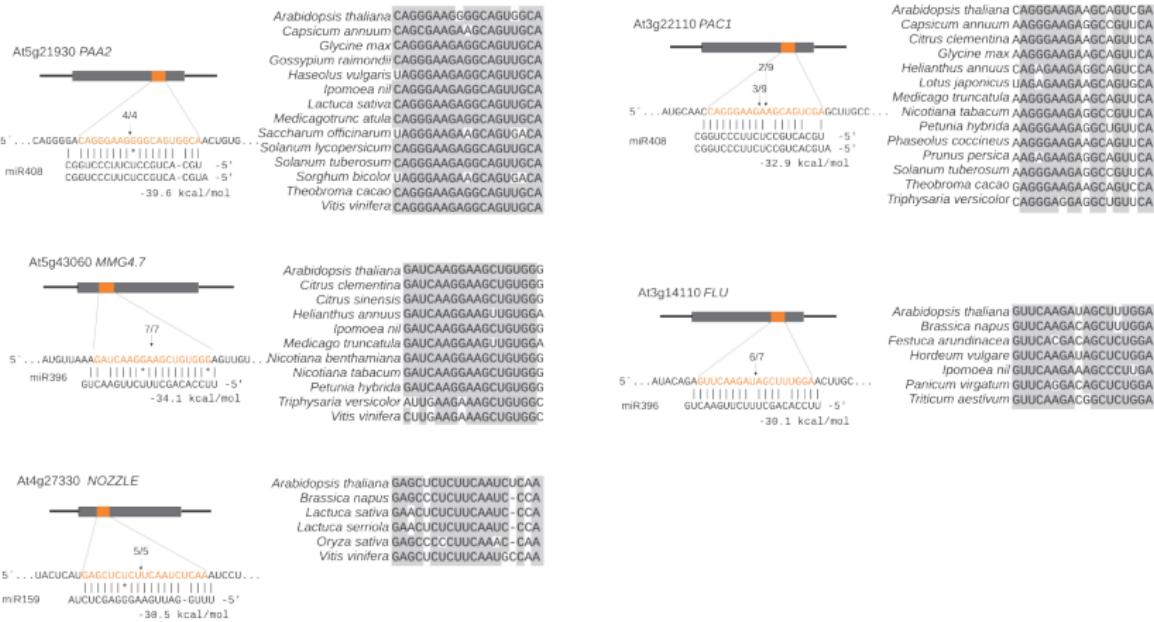
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecánisticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollo de una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica
- ▶ Análisis de las estructuras de los precursores y su evolución.
- ▶ Visualización de información compleja por adaptación de una herramienta Circos.

Muchas gracias.

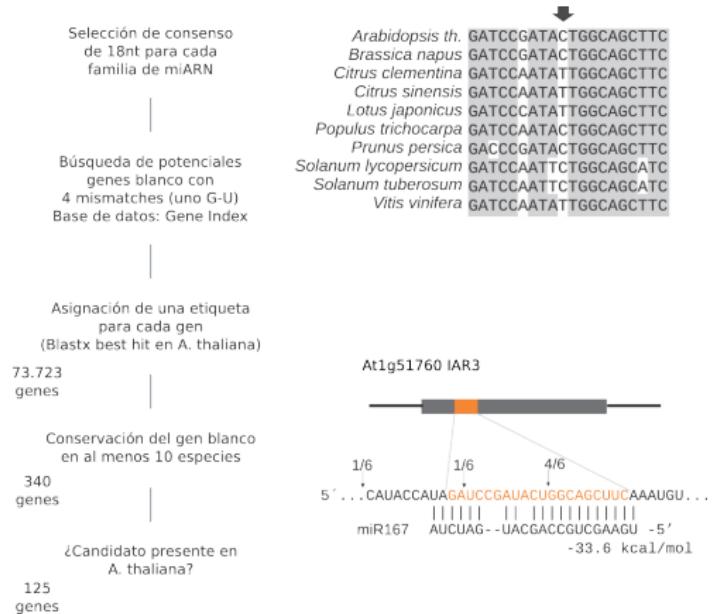




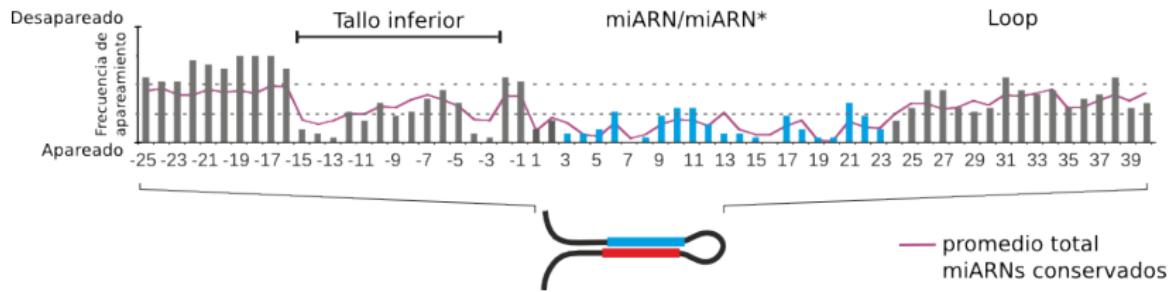
Nuevos genes blancos validados en *A. thaliana*



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

