

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

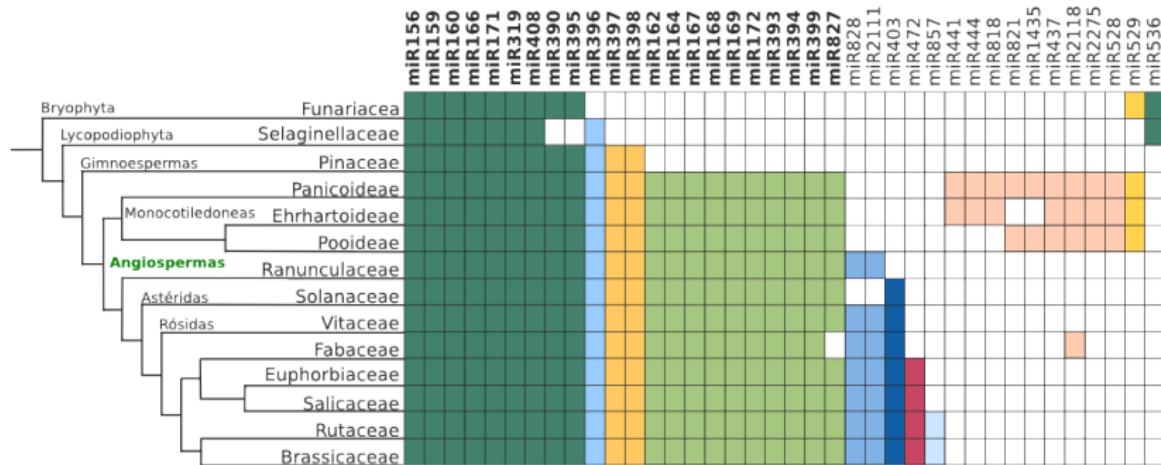
Uciel Chorostecki

Director Dr. Javier Palatnik
Instituto Biología Molecular y Celular Rosario

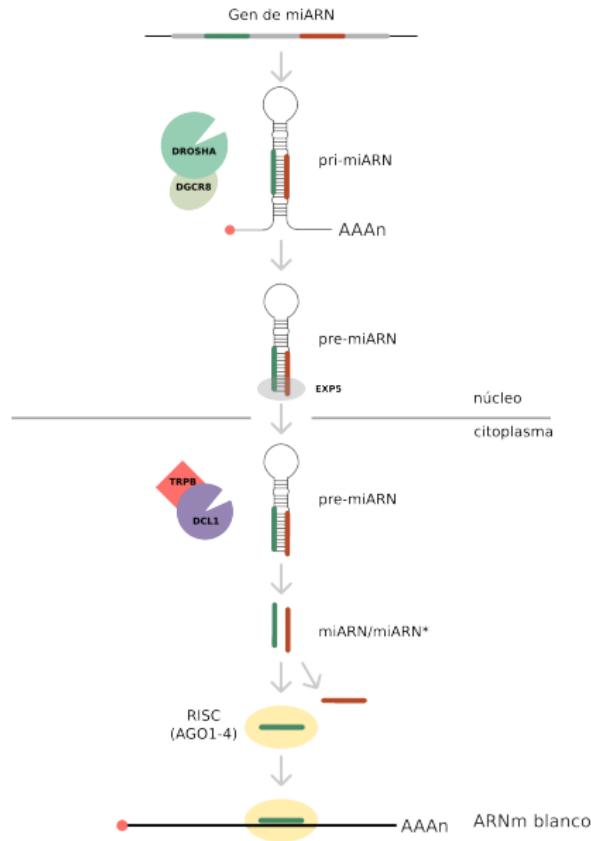
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ 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.

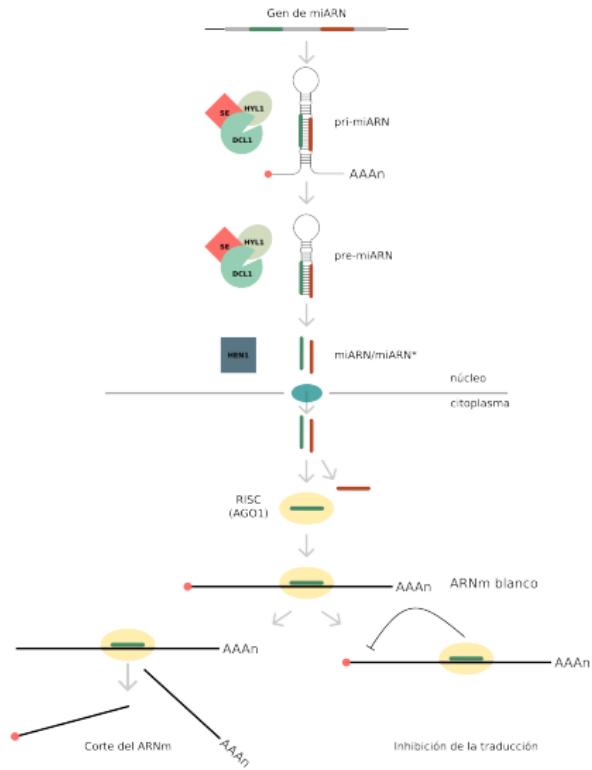
22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



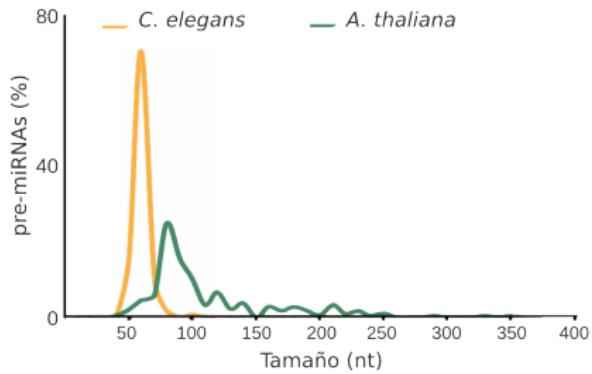
Procesamiento de miARNs en animales



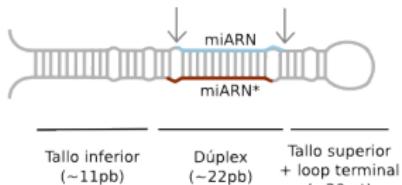
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



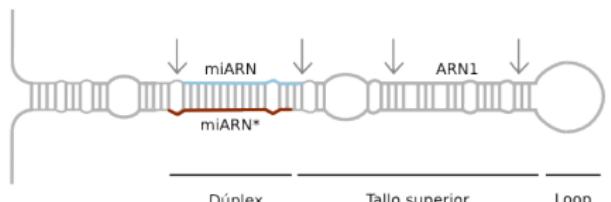
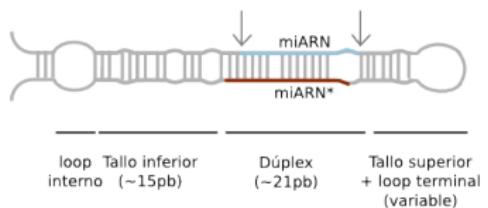
El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



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.

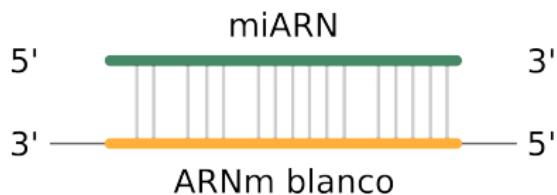
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.

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.

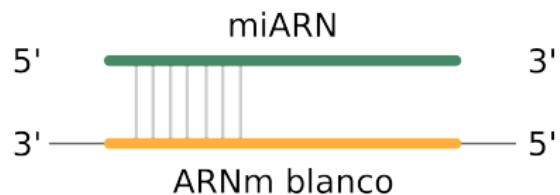
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.
- ▶ Regulación de la traducción por miARNs.
 - ▶ Inhibición de la traducción del ARNm blanco por el miARN explica la represión de la expresión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

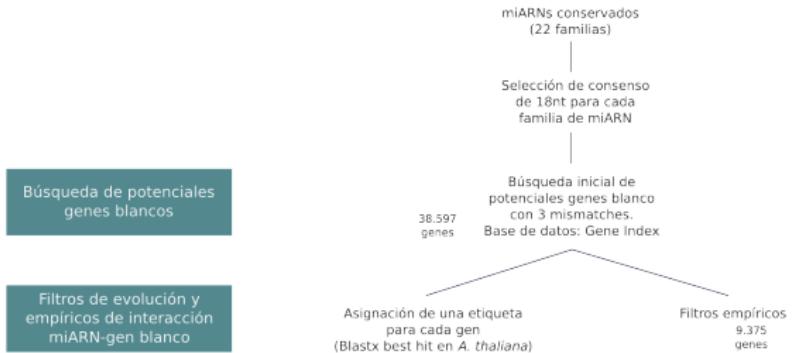
Conservación y divergencia de miARNs en distintas especies

| | 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 | |

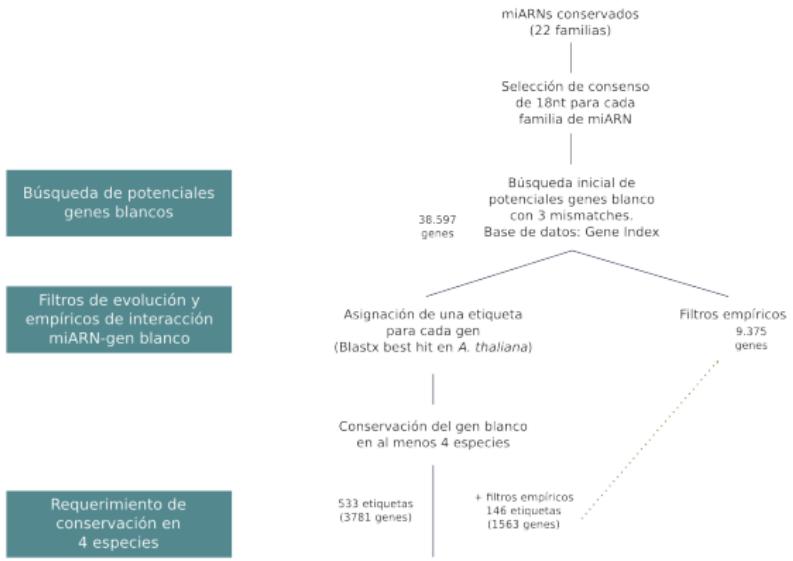
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



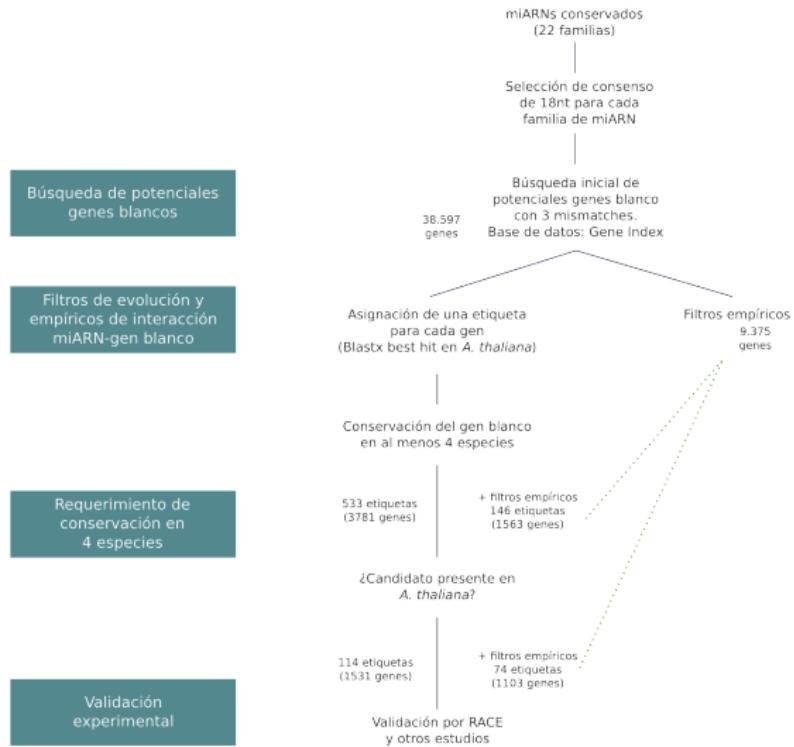
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



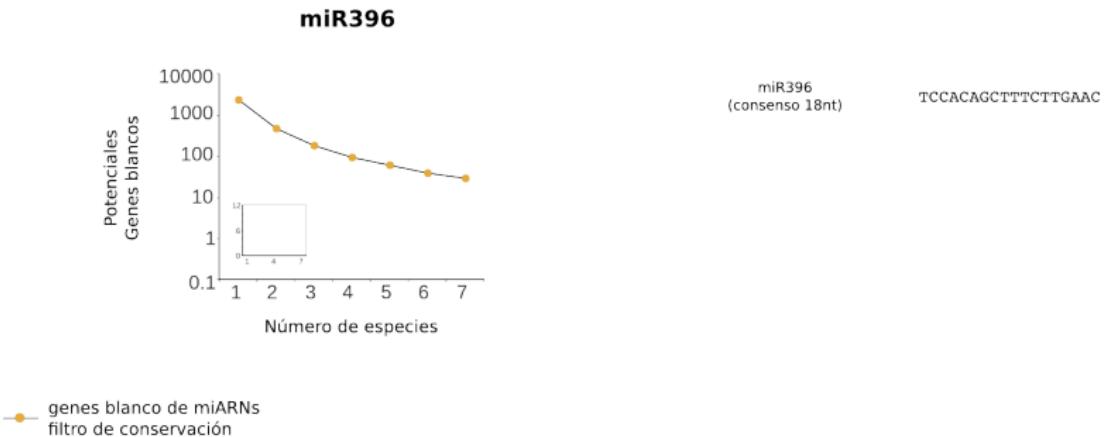
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Conservación de la interacción en distintas especie

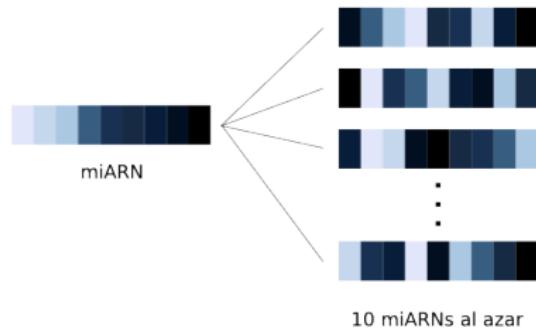


miARN consenso de 18 nt

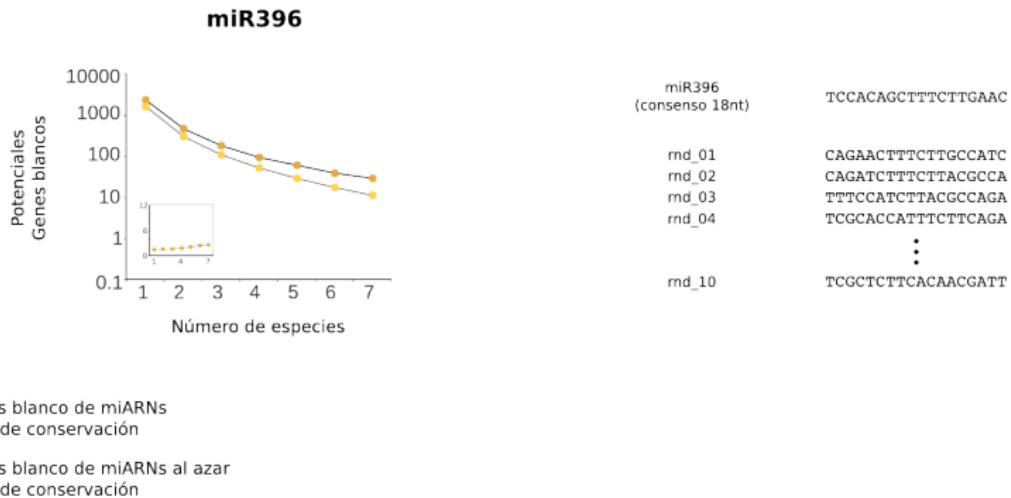


miARN

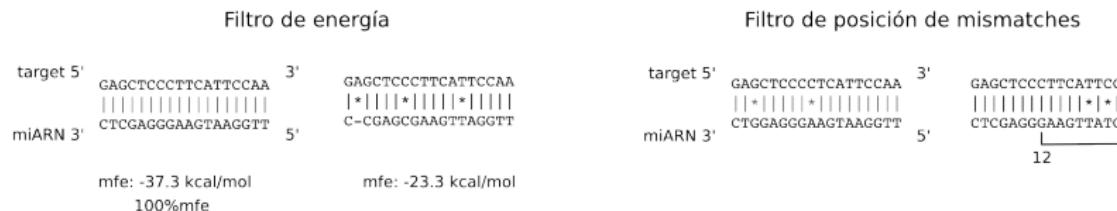
Control: miARN al azar



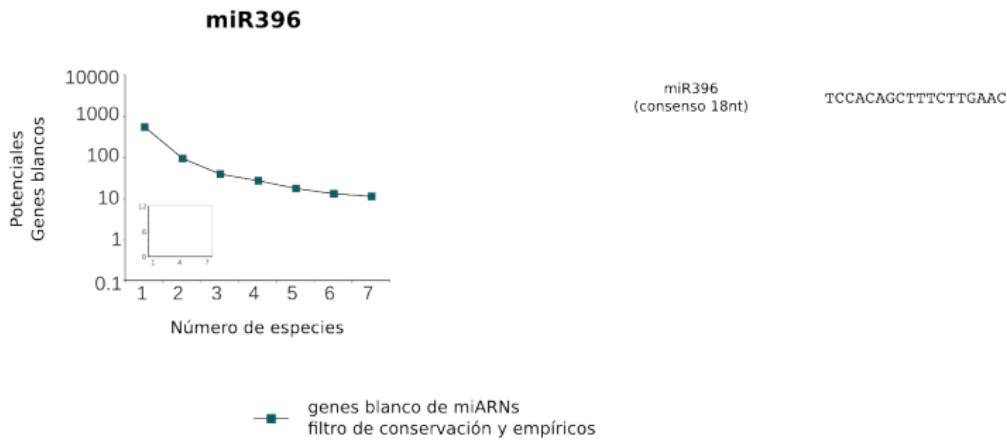
La relación señal/ruido incrementa al aumentar el número de especies



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

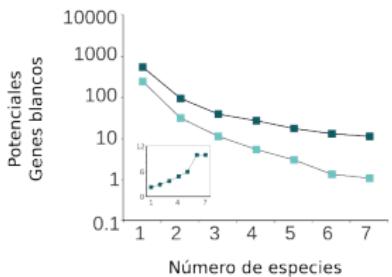


Selección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



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

miR396

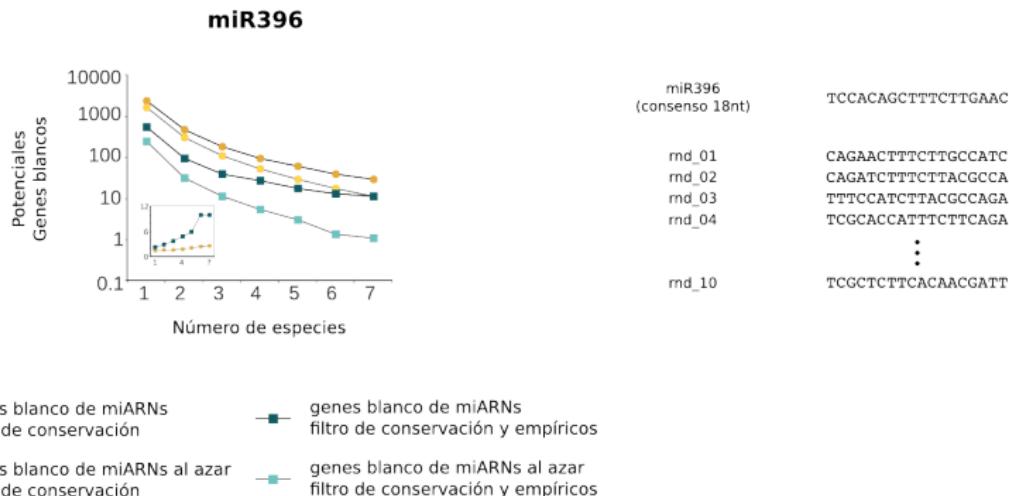


- genes blanco de miARNs
filtro de conservación y empíricos
- genes blanco de miARNs al azar
filtro de conservación y empíricos

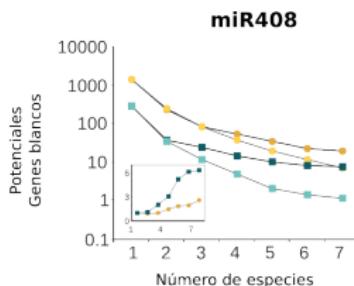
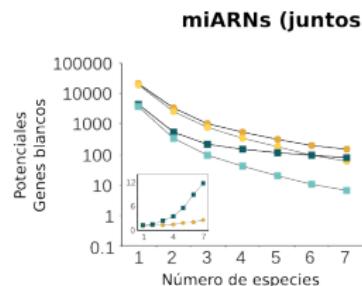
miR396
(consenso 18nt)

TCCACAGCTTCTTGAAAC
CAGAACTTCTTGCATC
CAGATCTTCTTACGCCA
TTTCCATCTTACGCCAGA
TCGGCACCATTTCTTCAGA
•
TCGCTCTTCACAACGATT

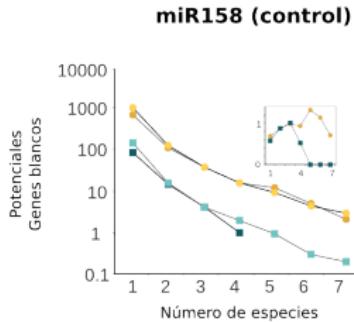
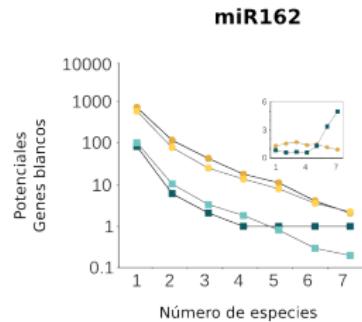
Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos



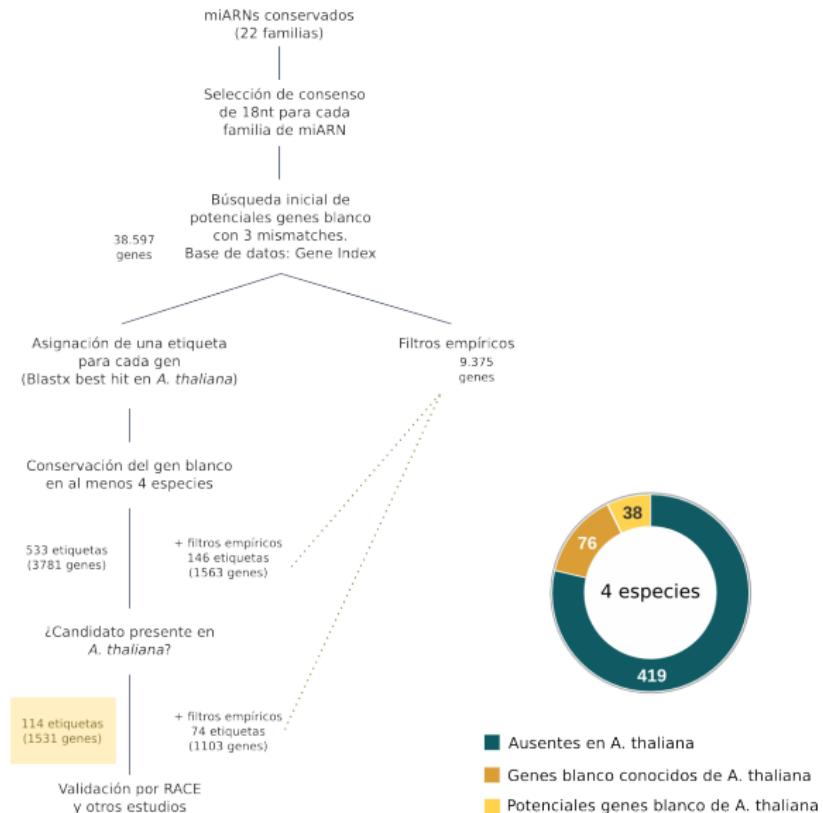
El número de genes blancos candidatos y la relación señal/ruido es variable entre los distintos miARNs



- 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

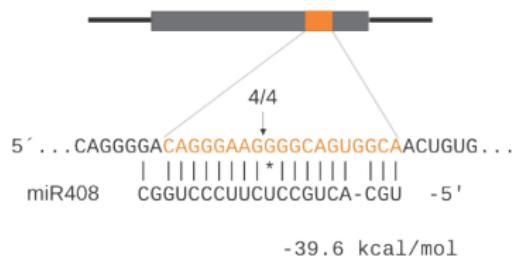


Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva



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

PAA2 (At5g21930)



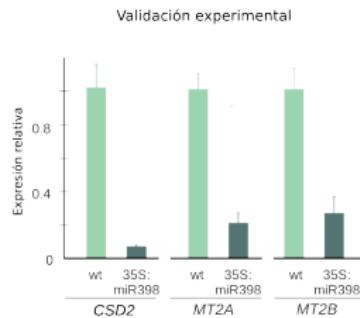
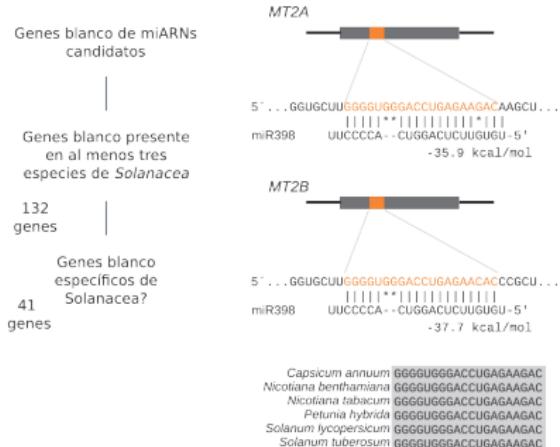
| | |
|------------------------------|----------------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | CAGGGAAAGGGGCAGUGGCA |
| <i>Capsicum annuum</i> | CAGCGAAGAACAGUUGCA |
| <i>Glycine max</i> | CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA |
| <i>Gossypium raimondii</i> | CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA |
| <i>Haseolus vulgaris</i> | UAGGGAAAGAGGCAGUUGCA |
| <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?

miR398 → CSD2 Todas las Angioespermas

miR398 → ? Específico de Solanacea

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 | 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 |
| AT1G60230 | 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 [•] |
|----------------------------|-------------------------|--|---------|
| Aquica_013_00504.1 | Aquilegia coerulea | TTGGCGGACCTGGGAACAT * * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -31.7 |
| 471402 | Arabidopsis lyrata | TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -32.1 |
| AT1G12520.1 | Arabidopsis thaliana | TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -32.1 |
| Brad5g18900.3 | Brachypodium distachyon | TTGGTGAACCTGGGAACGC ** * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -33.5 |
| Bra026968 | Brassica rapa | TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -32.5 |
| Carubv10011818m | Capsella rubella | TGGGAGACCTGGGAACAC * * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -32.1 |
| evm.model.superconig_29.47 | Carica papaya | TAGGTGAACCTGGAGACAT ** * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -34.2 |
| Ciclev10021134m | Citrus clementina | TTGGTGAACCTGGGAACAC ** * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -33.9 |
| orange1.1g020436m | Citrus sinensis | TTGGTGAACCTGGGAACAg ** * * * * CCCACTGGACTCTTGTC | -32.7 |

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

Conclusiones I

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

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

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

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

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

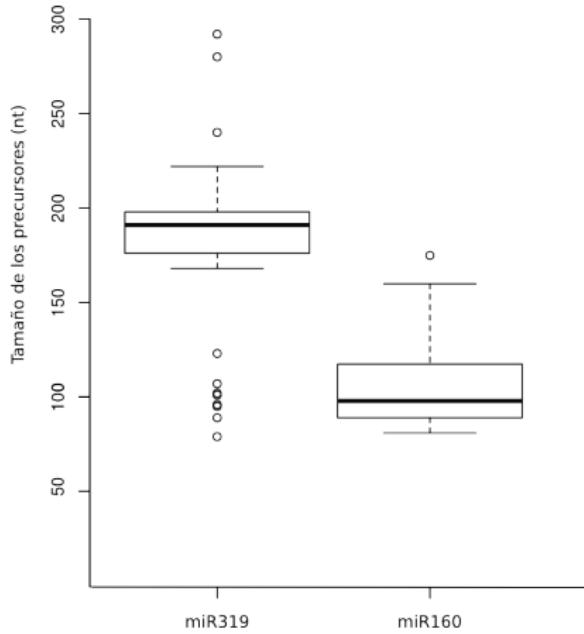
Objetivos específicos

- ▶ 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.

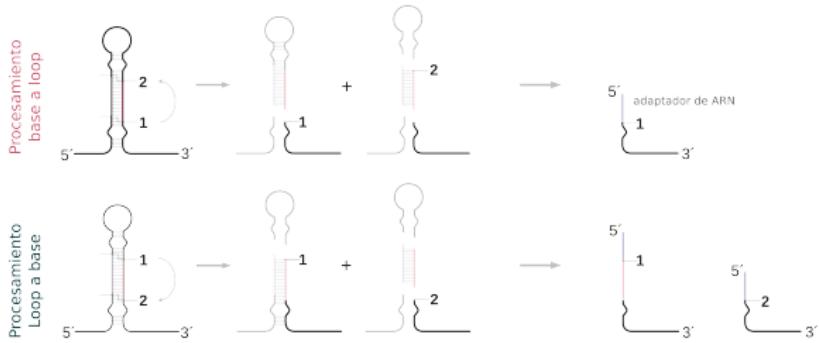
Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



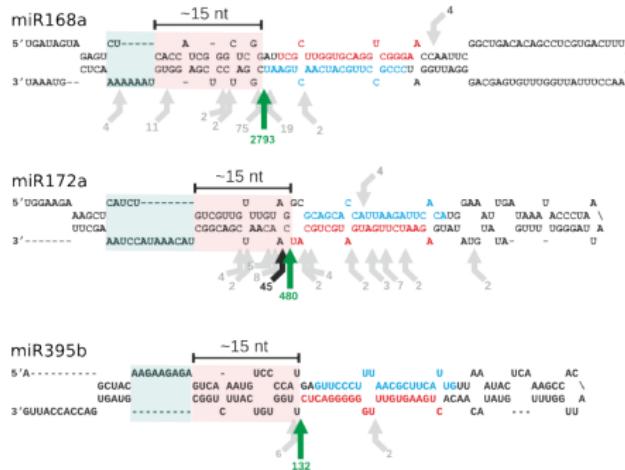
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



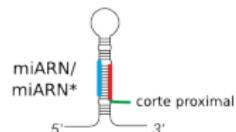
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



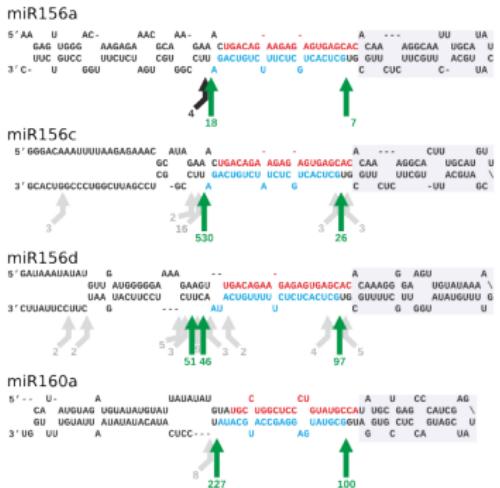
Los precursores que se procesan desde la base tienen un sólo pico de señal en las bibliotecas de SPARE



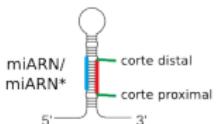
Detección solamente
del corte proximal



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

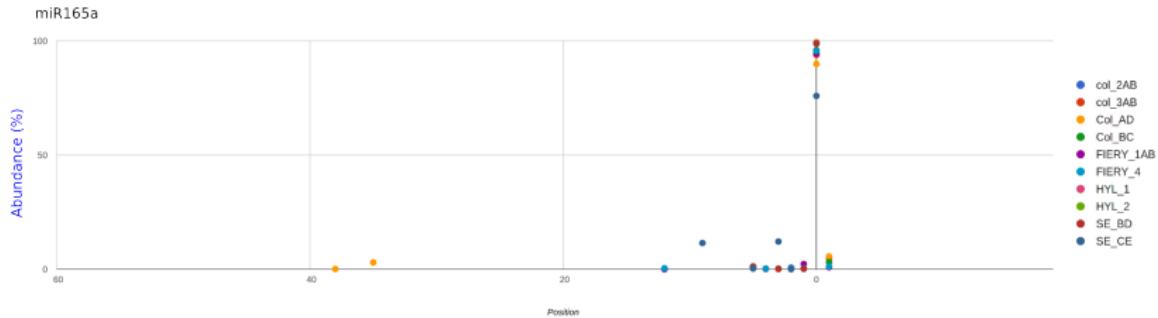


Detección de ambos cortes, proximal y distal



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

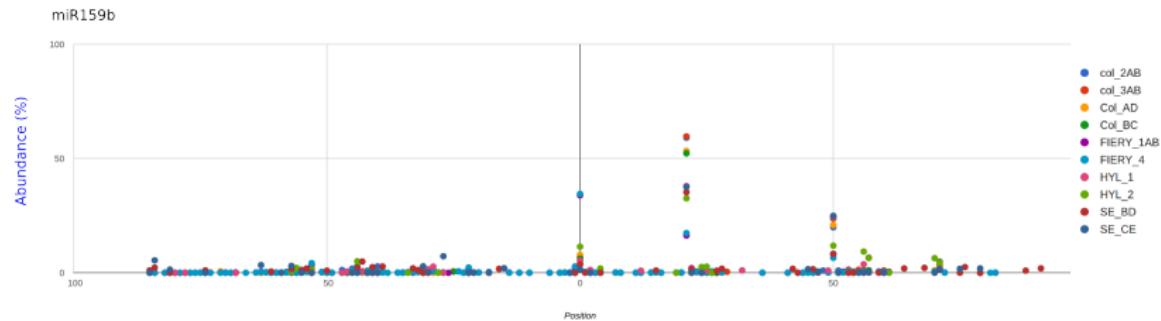
Visualización de precursores procesados desde la base



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



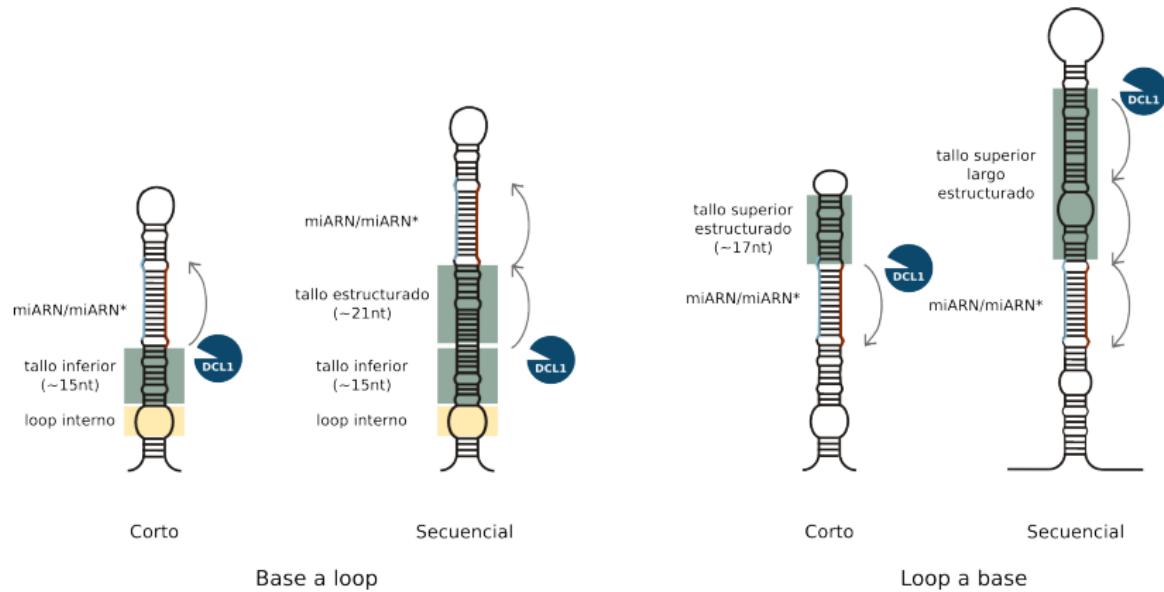
Visualización de precursores procesados desde el loop



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



Conclusiones II

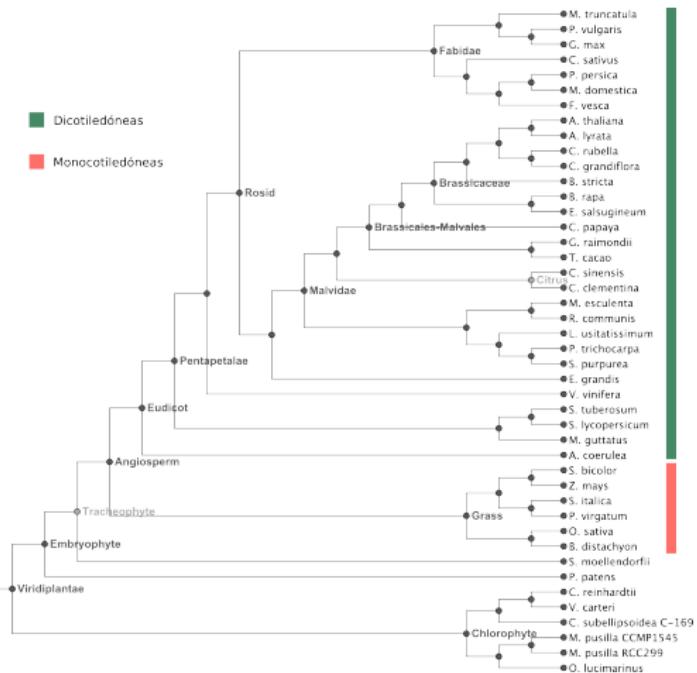


Objetivos específicos

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

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

Especies utilizadas de Phytozome (30 dicotiledóneas y 6 monocotiledóneas)



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

- ▶ Longitud de precursores.
- ▶ Definición de ortólogos

¿Cuál es el ortólogo en otras especies?

| | |
|-------------|--|
| Arabidopsis | >ath-MIR160a GUAGUCUGCUCCGUUAUCCGUAAUAGCAGGCCAACGAGUAUUCGAUGACCUCCGGUGGAUGGGCGUAUGAGGAGCCAUGCAGCAAU >ath-MIR160b GUUCGUUGCCUGGUCCCUAUAUGCCACAAGAAAACAUCAUCGUUUAGUUUCAAAAUUCGAUCACUAGUGGCGUACAGAGGUAGUCAAGCAUGAC >ath-MIR160c GUUAUGCCUGGUCCCUAUAUCCACAGAGUGGUACCGAUUUUUGGUUUAUAAUCGGCUCGCCGUUAAGGGAGUCAAGCAUGAC |
| Arroz | >osa-MIR160a GUGUGCCUGGCUCGUUAUGCCACACAUGUAGACCAACCCAUUGGUUCUGGUUGCCUACUGGGGGCGUGCAAGGACCAAGCAUGC >osa-MIR160b AAGGUUUGGUUUGGUAGUCGGCUUGAGGGUGCUGGCCUCCGUUAUGCCACUCAUGUAGCCAAUCCAUUGGUUGGUUGGUUGGCGUGCAAGGAGCCAAGCAUGCG >osa-MIR160c GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUGCCACAUCAUCAGAGCAACAAUCUCUGCGAGAGGUUGCCUAUGAUUGGUUGGCGUGCACGGAGCCAAGCAUAUCC >osa-MIR160d GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUAUCCACUUCGGUAGCCAAACAUCAUCAGUAGAAACAAUCUGCUUCUCCGGCAAGAUCAUGCAUJUGUUGGUAGUUCUACUGGGGAUGGGCGUGGAGGAGCCAAGCAUGACC >osa-MIR160e GUAGGGGAUAGCCUGGUCCGUUAUCCCGCUCGCAUGGUUGCCAAACAUCAUCGUACUUCGUUGUUGGCCUUCGUACGGGUGCGAGGUAGCAUUGCCCUU >osa-MIR160f GGAUUAACCGCUGGUCCUGGUCCGUUAUCCCAUCGGAGAACGGUUCGGCUGUUGGGCGCUGCUUCUCCGUUGGUAGGGAGUCAUGAGGGGUJUGCUC |
| Tomate | >Slv-MIR160a CAAGUCGUGUAACGUUAUAGCCUGGUCCGUUAUCCGUAAUAGCAGUACCGGUAAUUAUUCGAUAGGGGUUUGGUUAUUGGGGUUAUAGGAGCCAAGCAUAUUCGAUUAUCGUUAUAGAUUGUUG |

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.



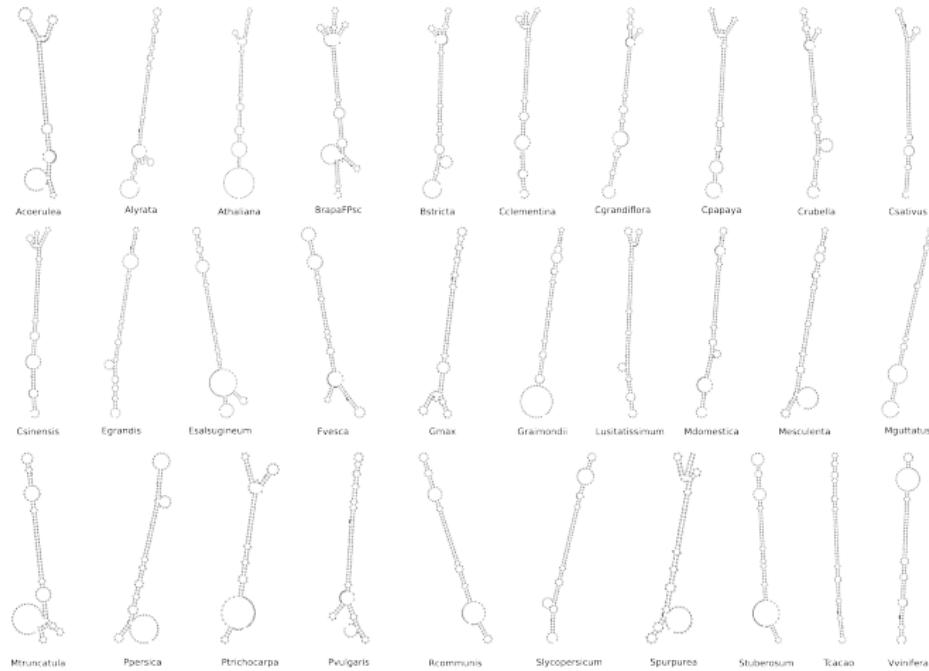
cons

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

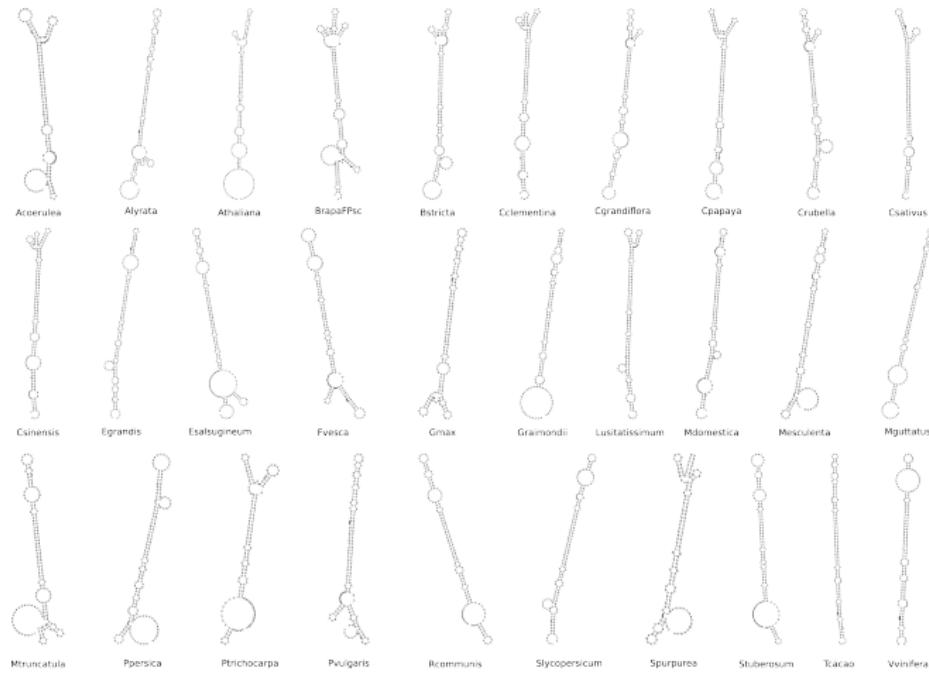
ANSWER

© 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*

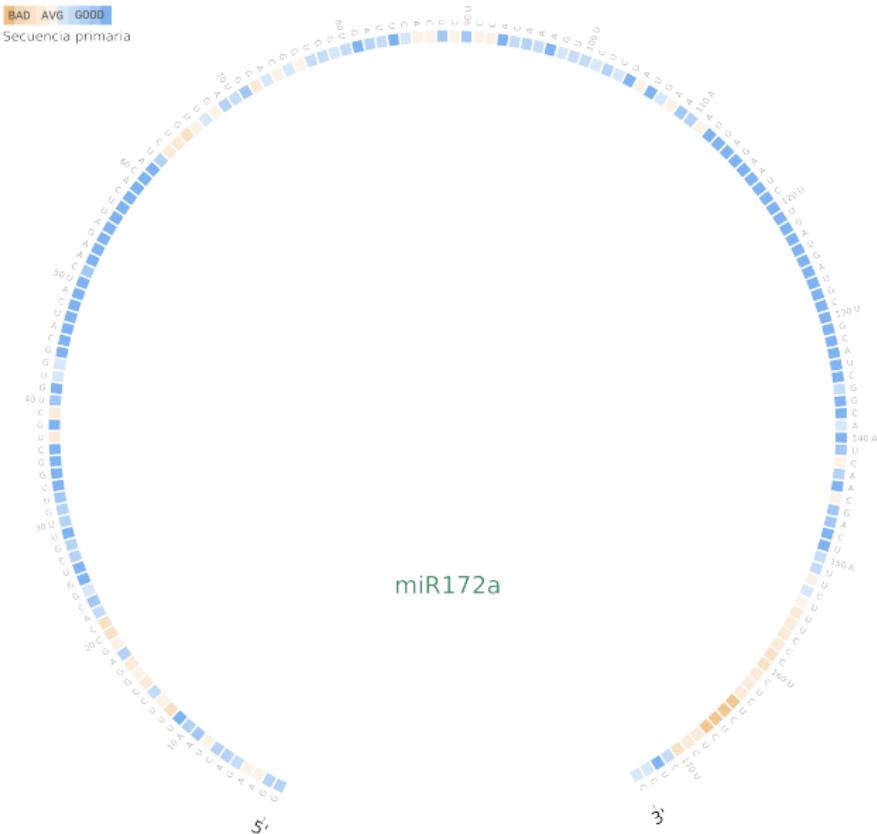


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN*

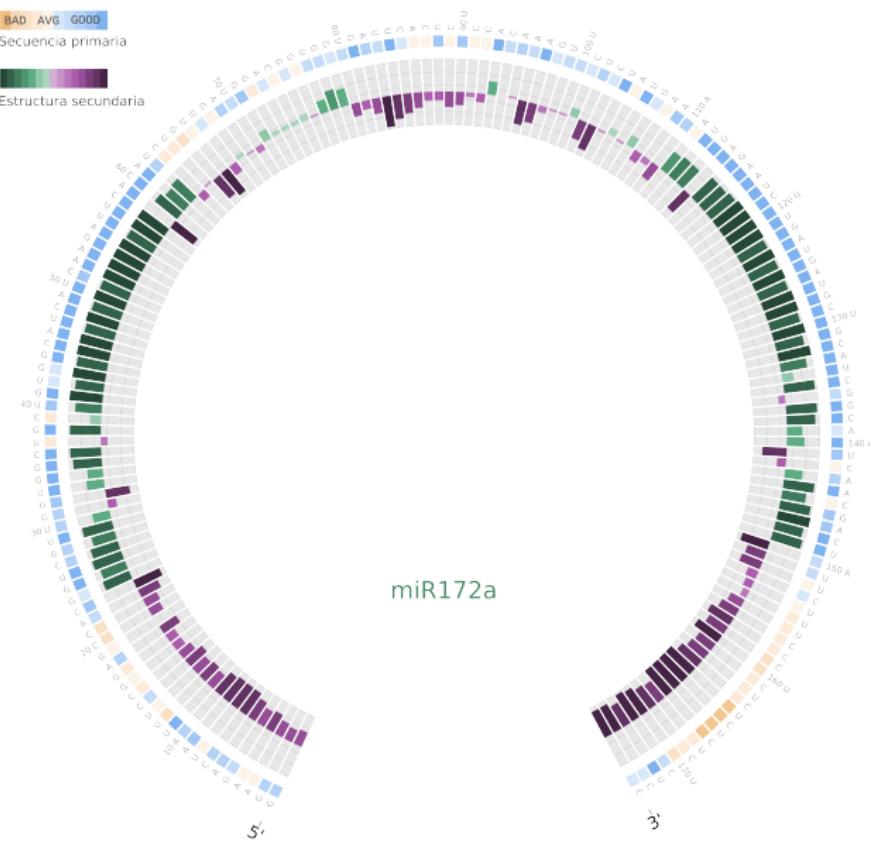


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

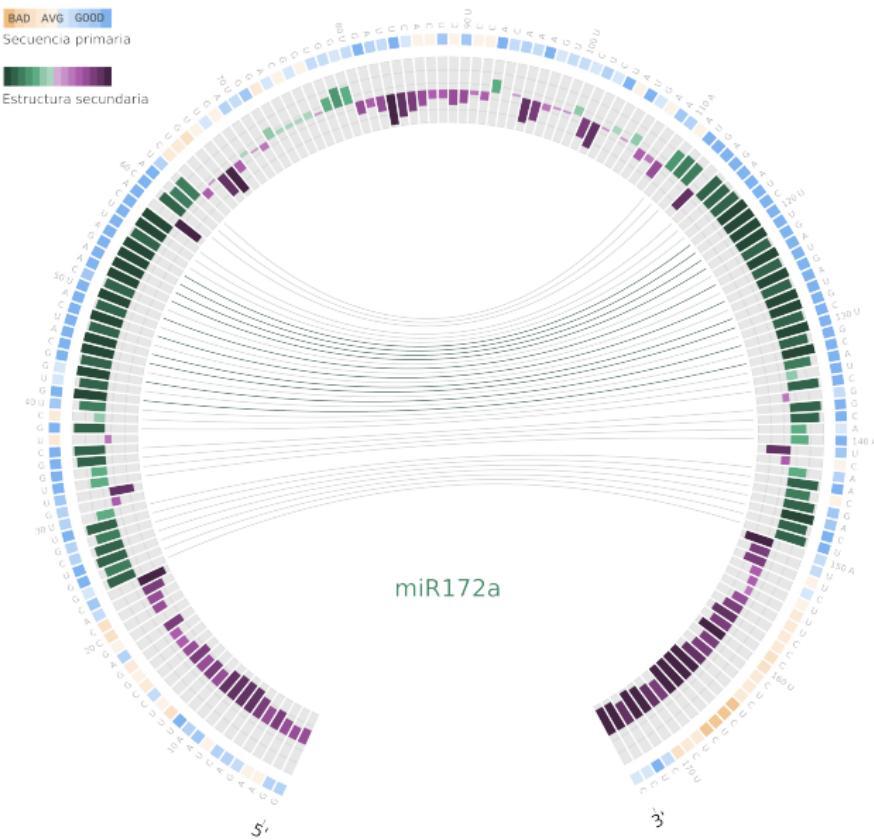
Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



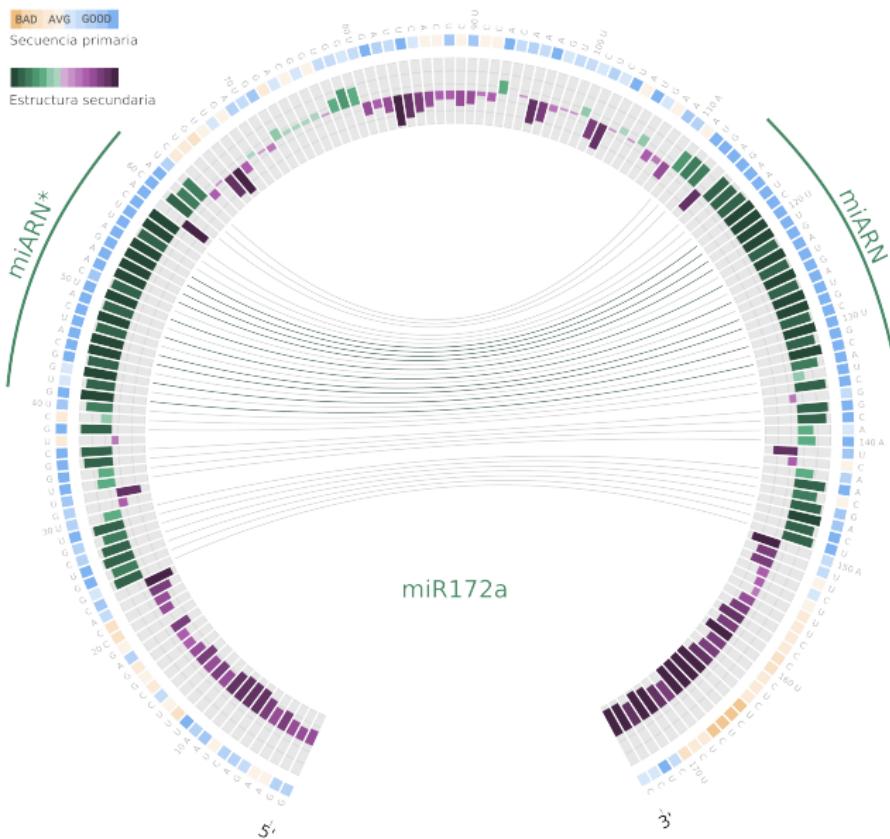
Frecuencia de bases apareadas y despareadas



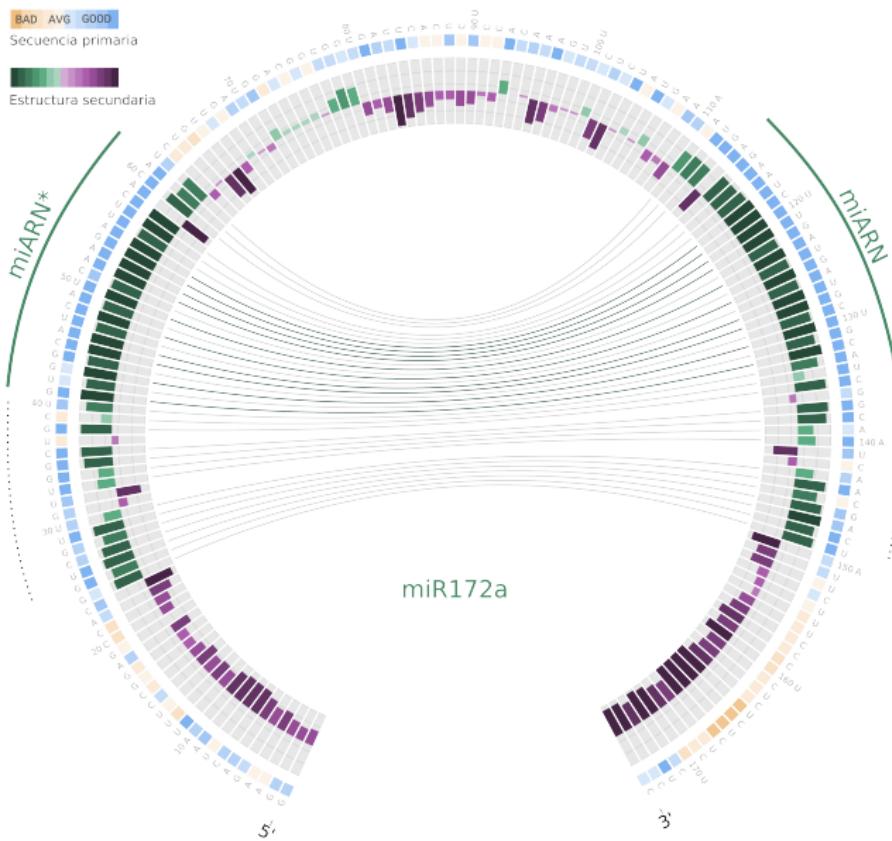
Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



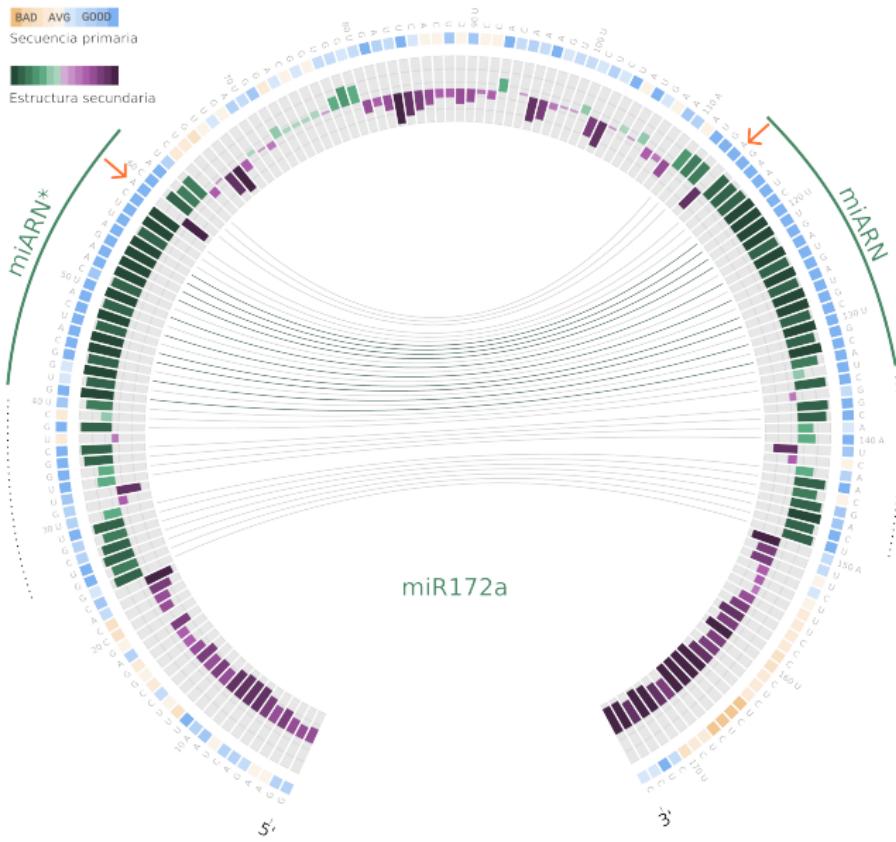
miARN y miARN* conservados en secuencia primaria y estructura



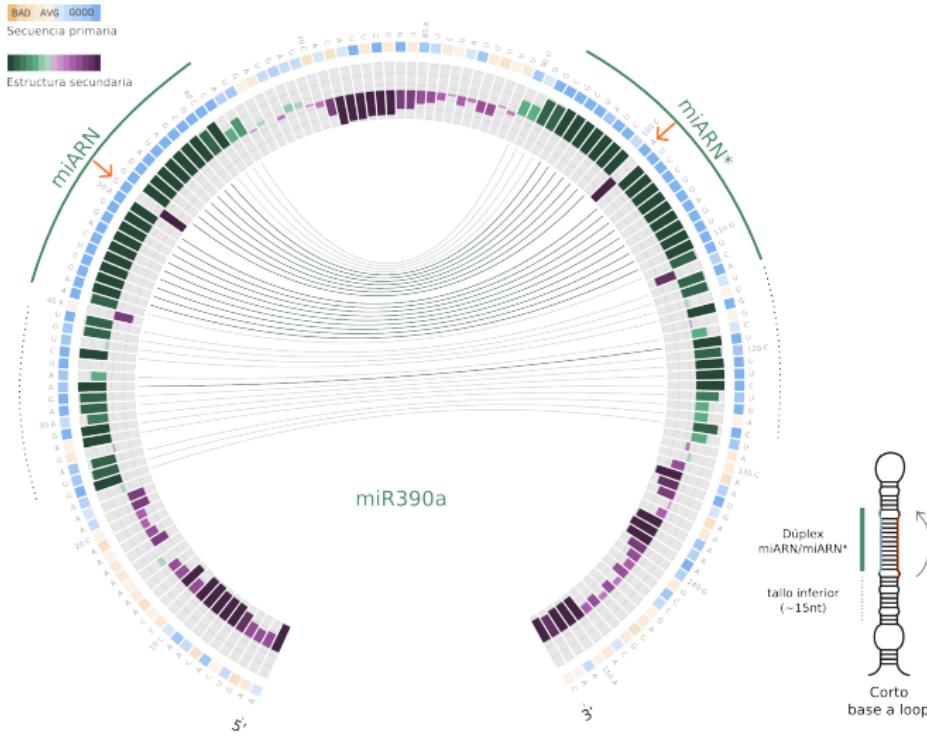
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



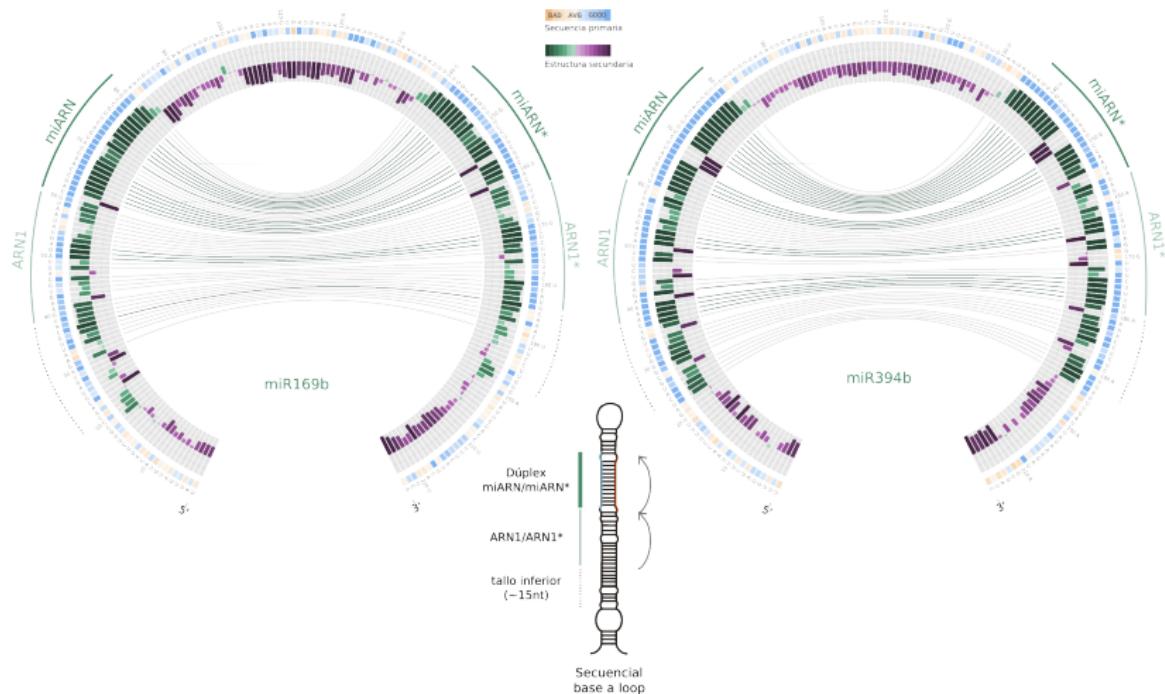
Mismatches conservados



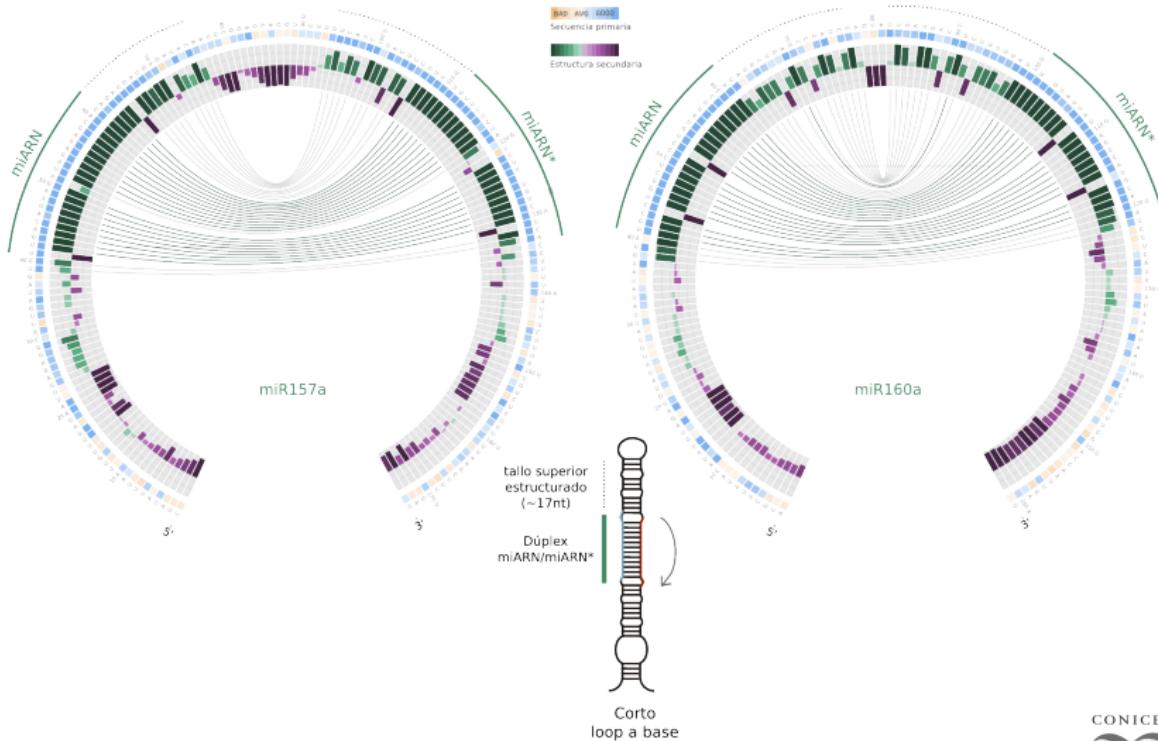
Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



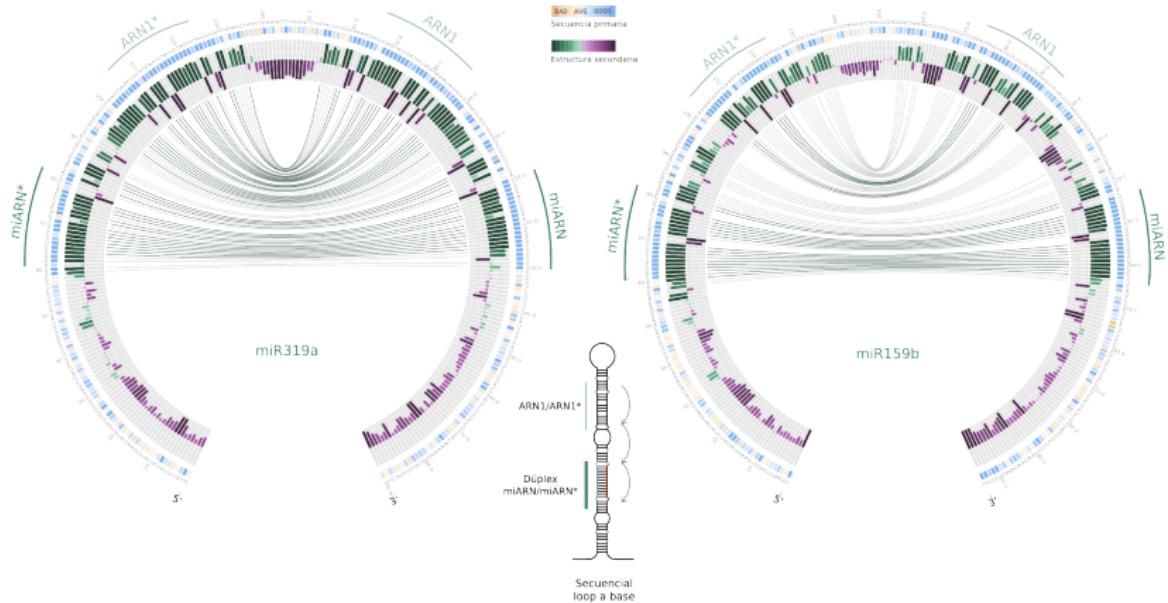
Precursors que se procesan desde la base en forma secuencial



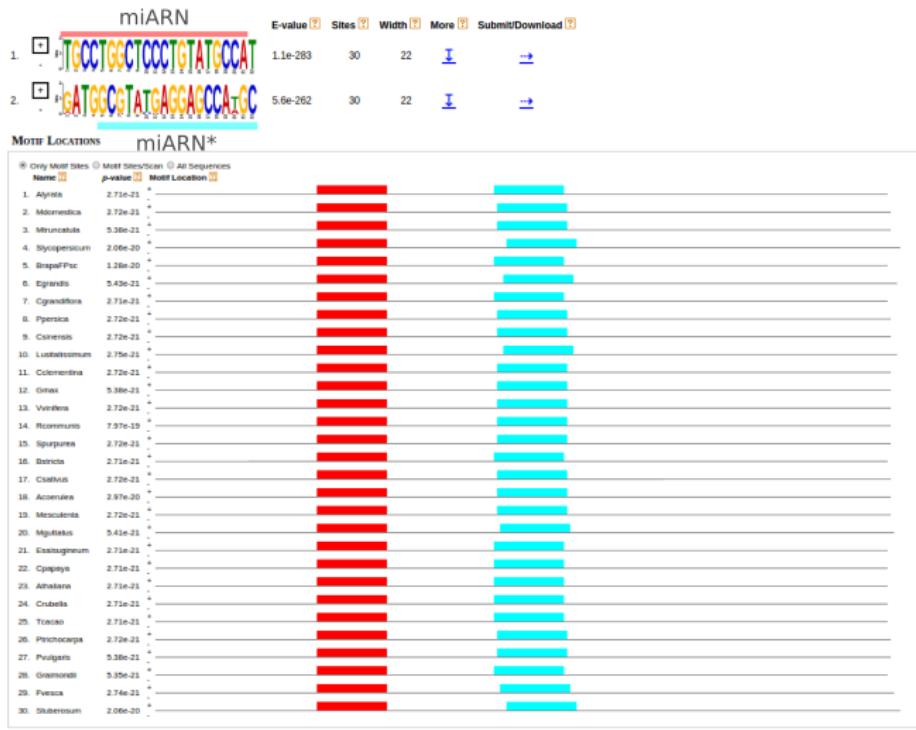
Precursors que se procesan desde el loop cortos



Precursors que se procesan desde el loop en forma secuencial



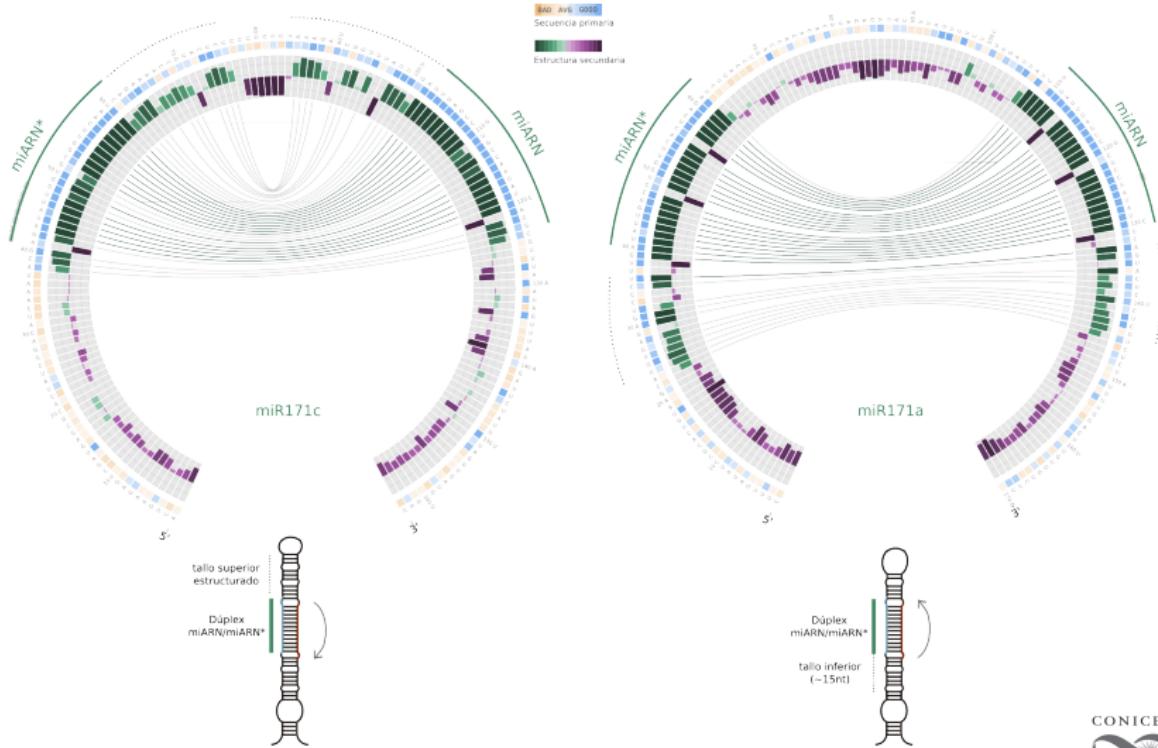
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



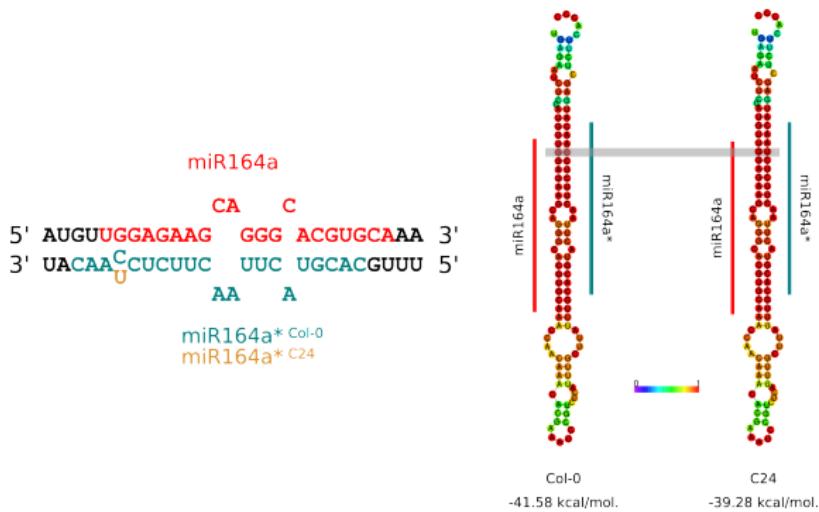
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



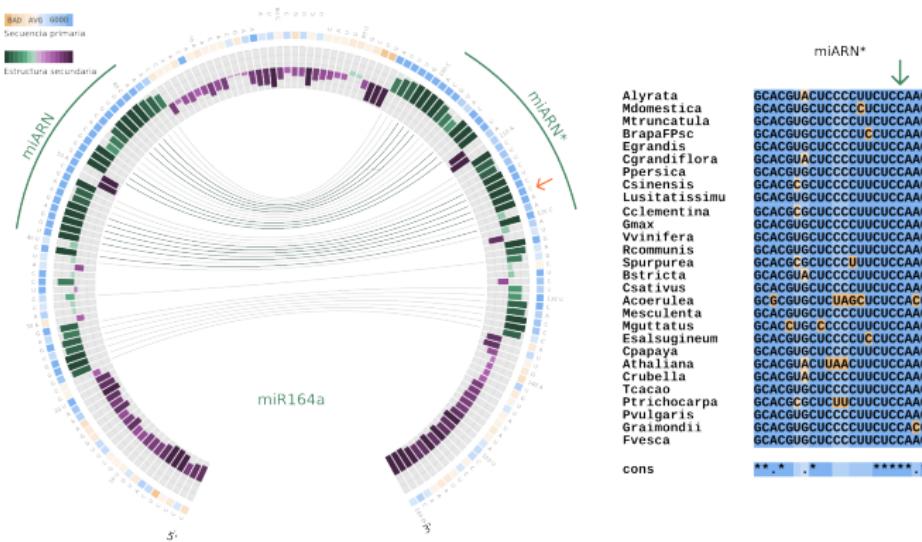
Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



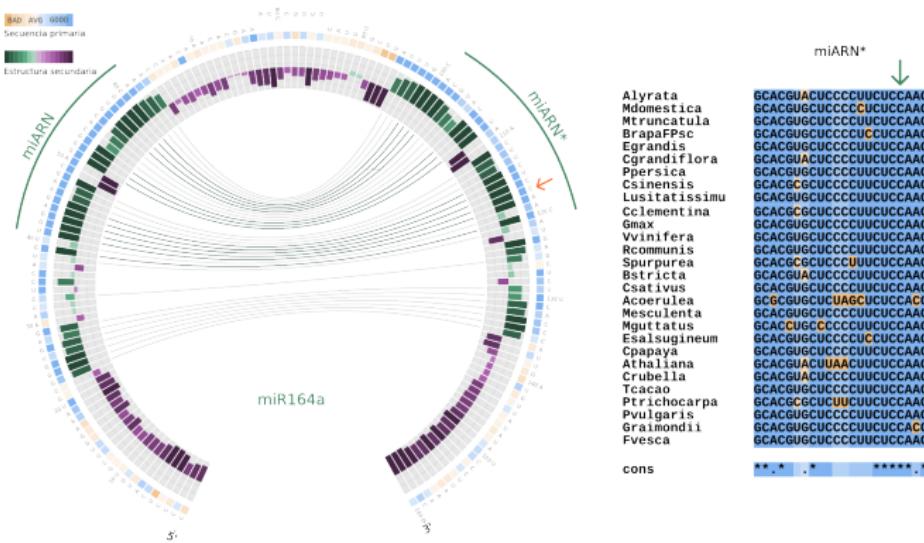
Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

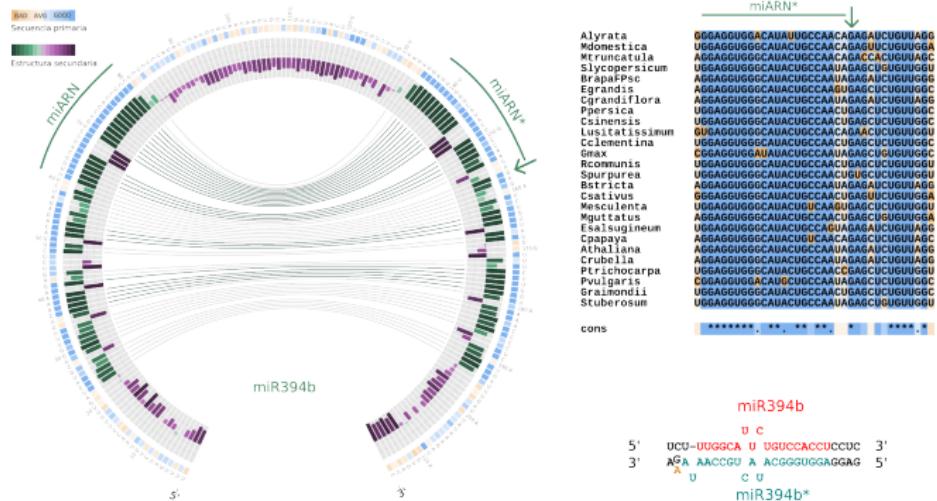


Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

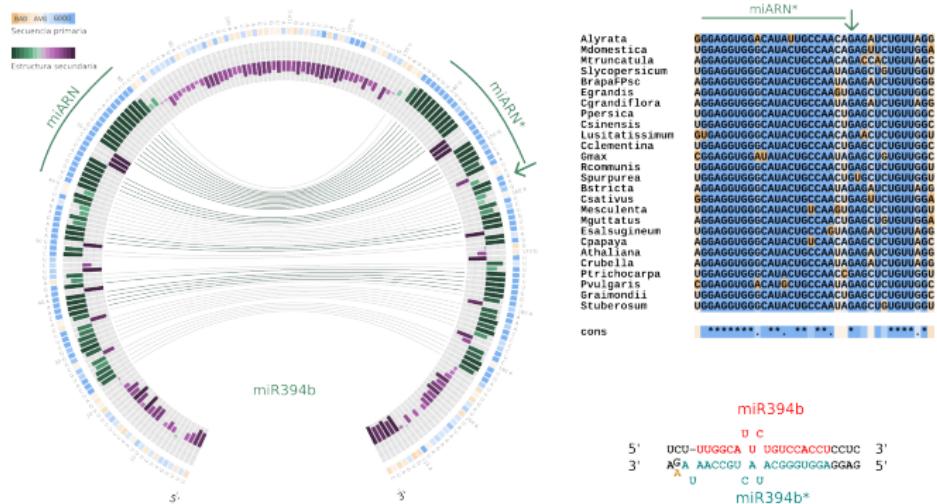


La posición *2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

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

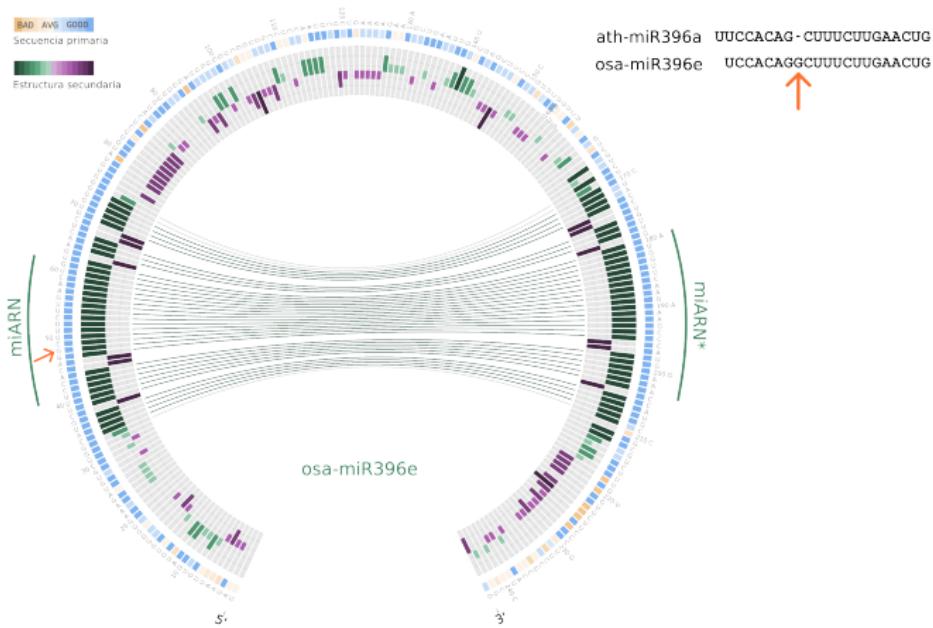


Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

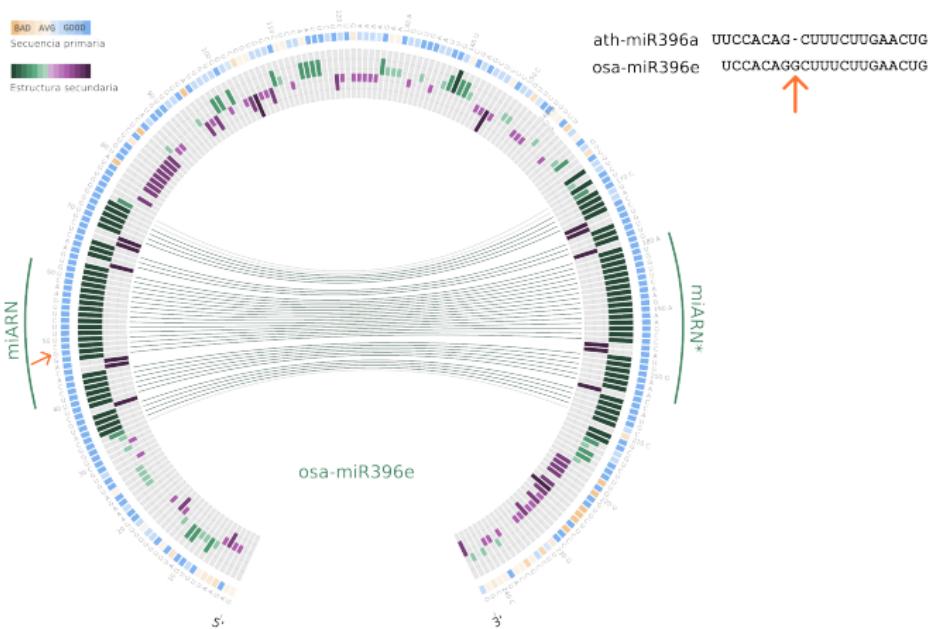


Mutaciones simples en el precursor puede afectar el reconocimiento de DICER.

Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



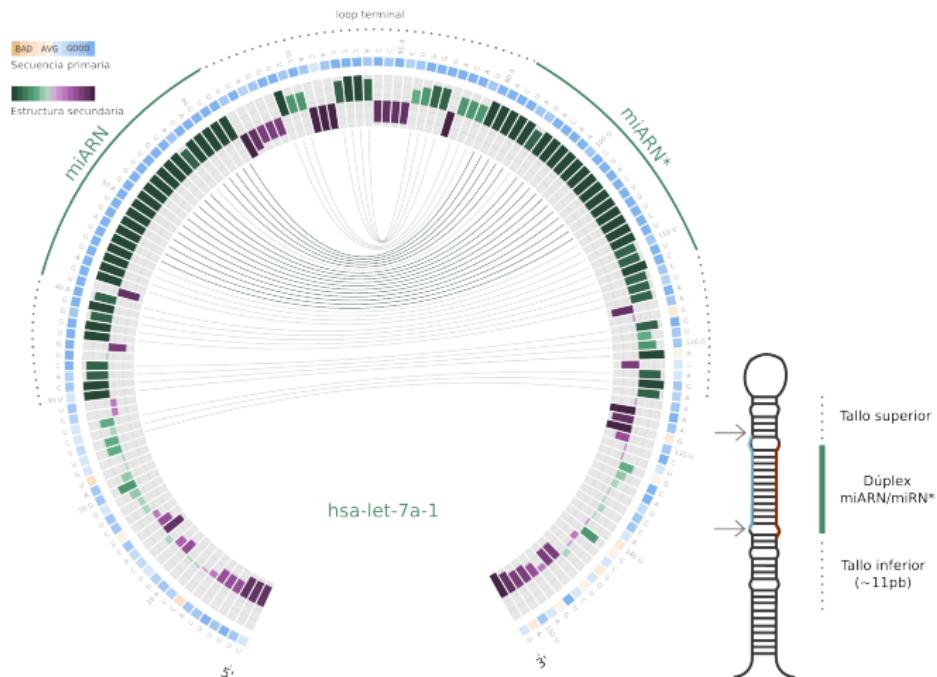
El nucleótido extra, que le da identidad a la variante de monocotiledóneas, está conservado.

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

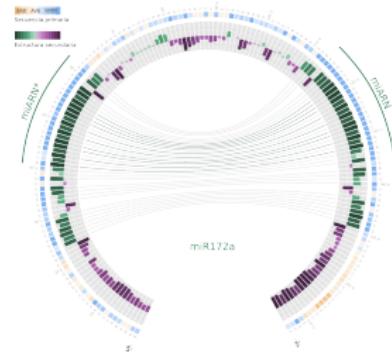
Animales

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

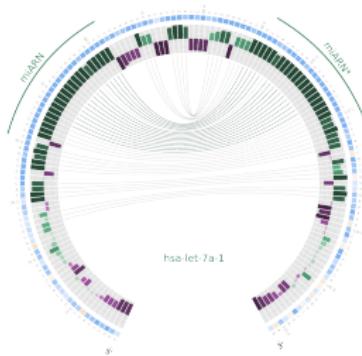
El loop terminal está conservado en la mayoría de los precursores de animales estudiados.



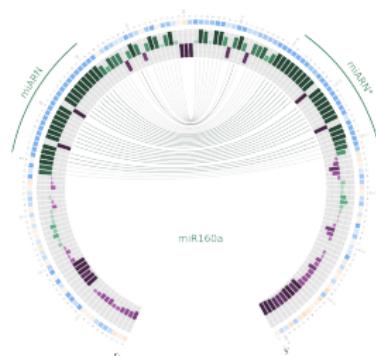
Circos animales vs plantas



Precursors de plantas.
Cortos de base a loop



Precursors de animales.



Precursors de plantas.
Cortos de loop a base

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

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

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

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

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

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

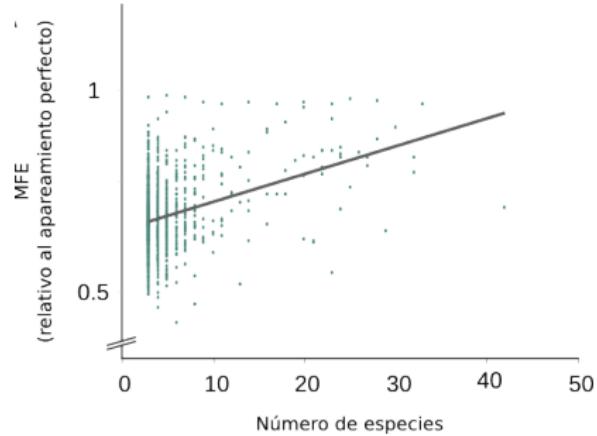
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

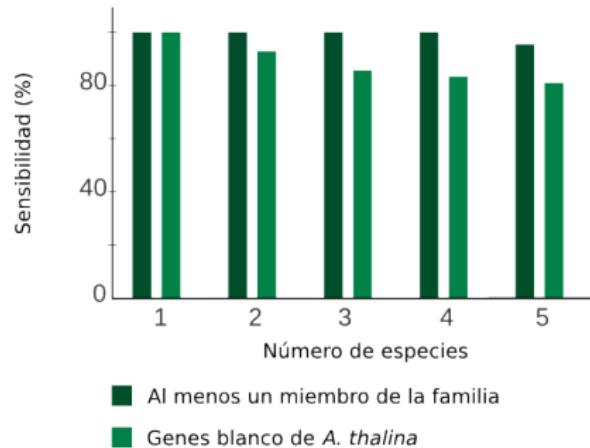
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.

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

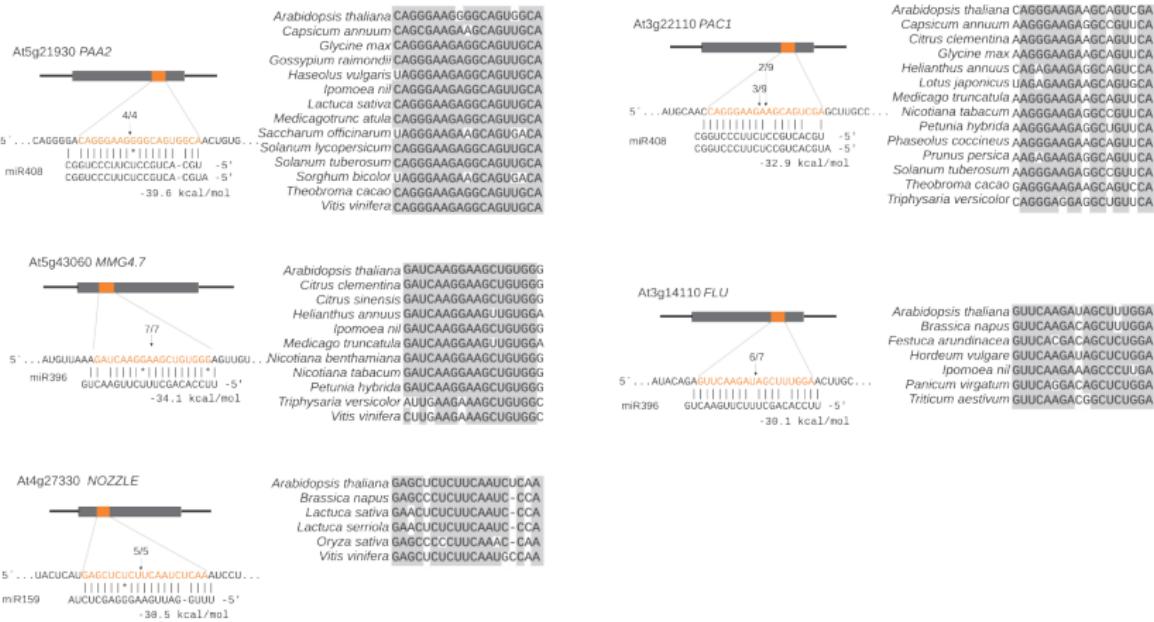
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.
- ▶ Analizamos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

Muchas gracias.

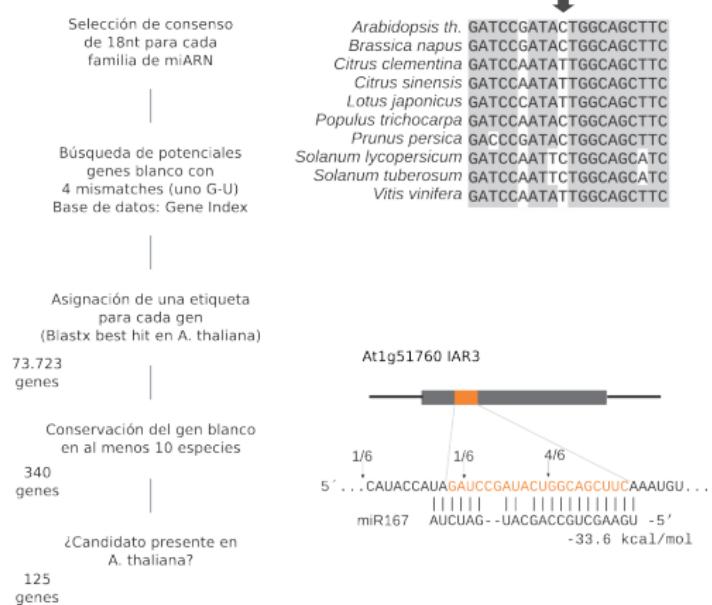




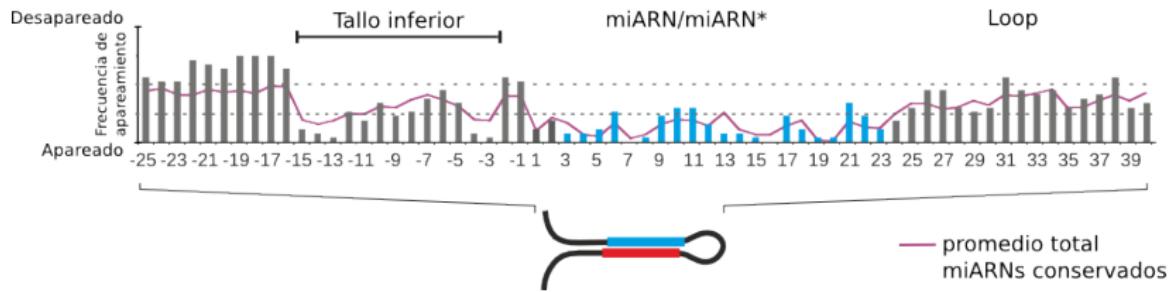
Nuevos genes blancos validados en *A. thaliana*



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

