

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

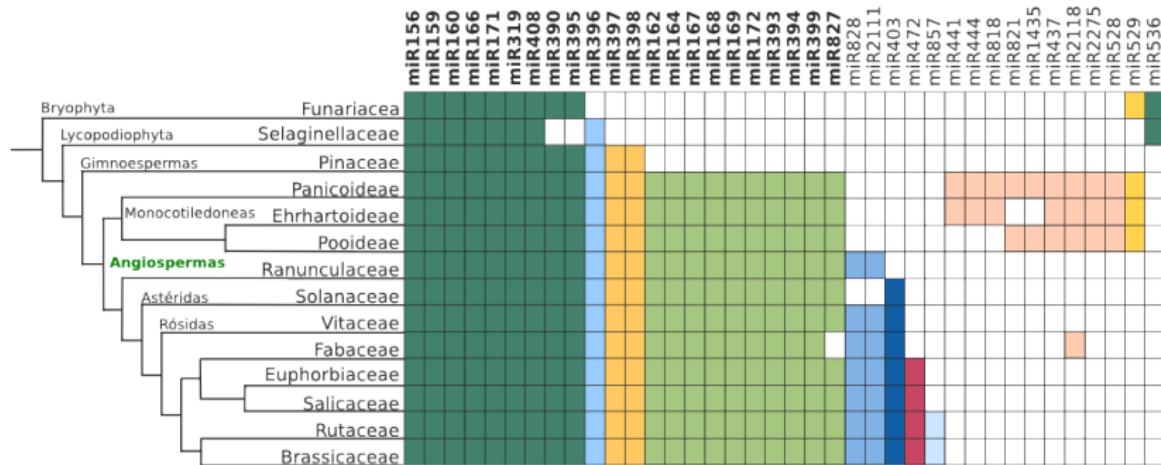
Uciel Chorostecki

Director Dr. Javier Palatnik
Instituto Biología Molecular y Celular Rosario

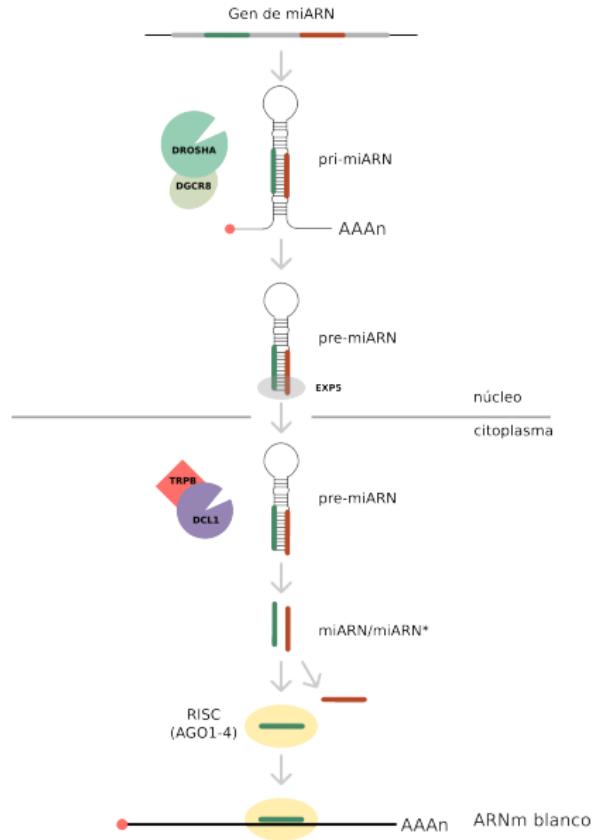
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ 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.
- ▶ Han sido identificadas unas 42 familias de miARNs en plantas, las que regulan una amplia variedad de procesos biológicos.
- ▶ Muchos de ellos han aparecido recientemente en la evolución y por lo tanto aparecen en un número pequeño de especies.

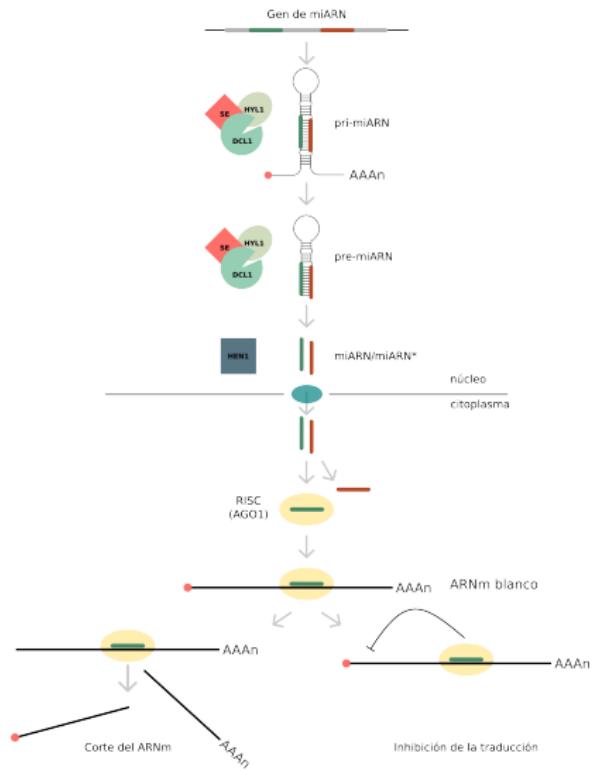
22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



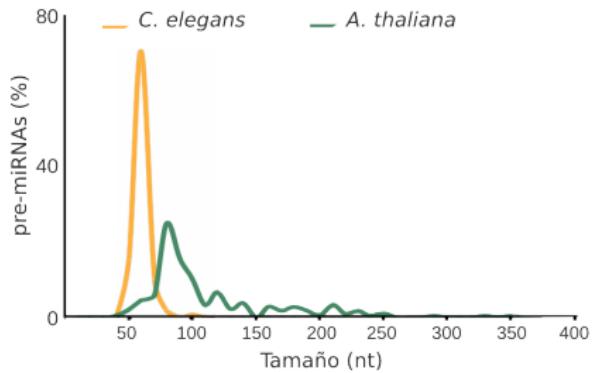
Procesamiento de miARNs en animales



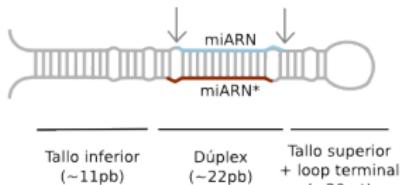
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



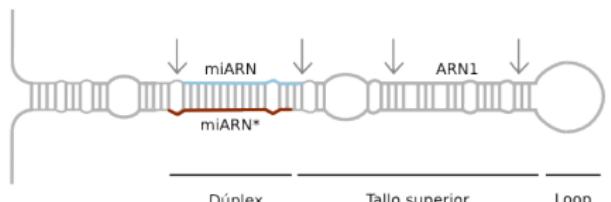
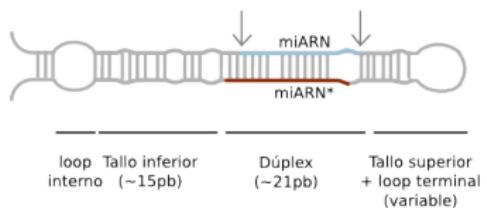
El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



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.

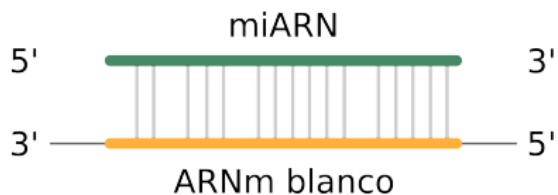
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.

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.

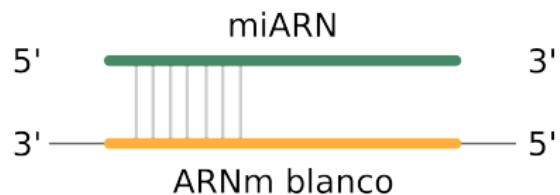
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.
- ▶ Regulación de la traducción por miARNs.
 - ▶ Inhibición de la traducción del ARNm blanco por el miARN explica la represión de la expresión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



Objetivos

1. Identificar genes regulados por miARNs en plantas.
2. Estudiar la biogénesis de los miARNs en plantas.

Objetivos

1. Identificar genes regulados por miARNs en plantas.
2. Estudiar la biogénesis de los miARNs en plantas.

- ▶ Diseñar una estrategia y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y 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 y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y 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.

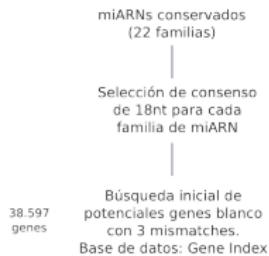
La identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas es muy importante para poder conocer el rol de los miARNs

- ▶ En general, se obtiene de diferentes 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.

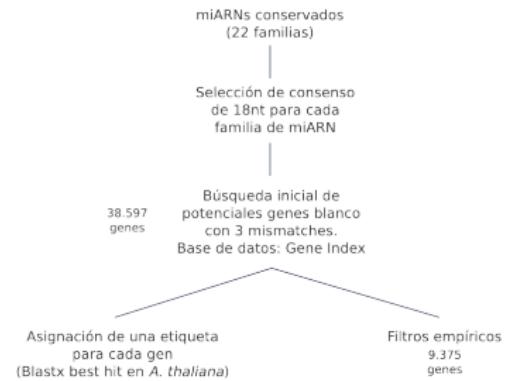
Conservación y divergencia de miARNs en distintas especies

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

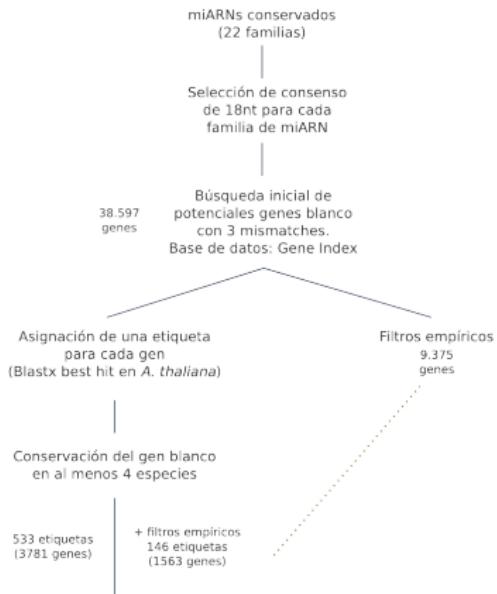
Búsqueda de potenciales genes blancos



Filtros de evolución y empíricos de interacción miARN-gen blanco



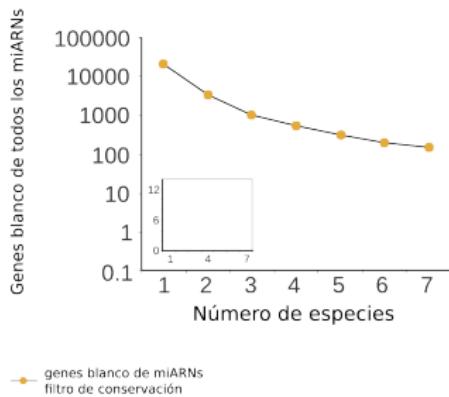
Mínimo de 4 especies requeridas



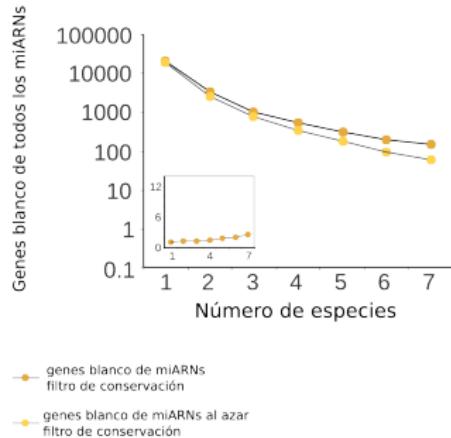
Validación experimental



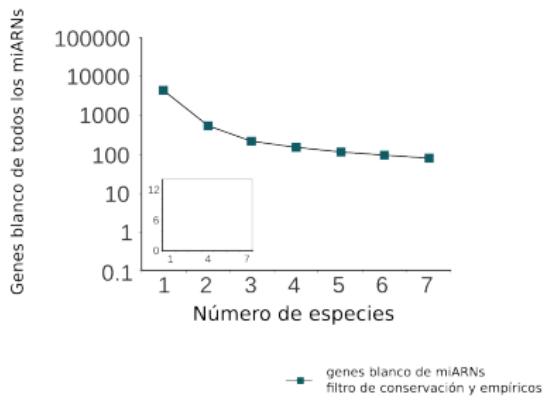
Conservación de la interacción en distintas especie



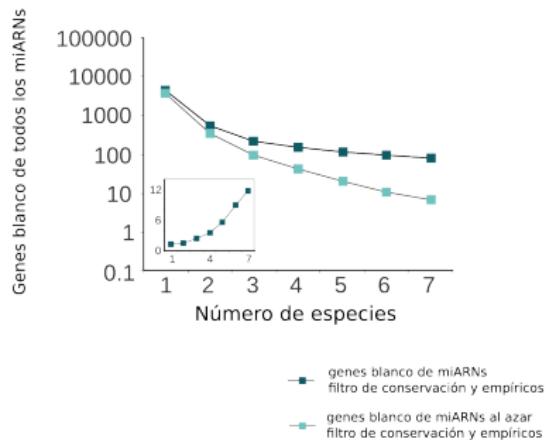
La relación señal/ruido incrementa al aumentar el número de especies



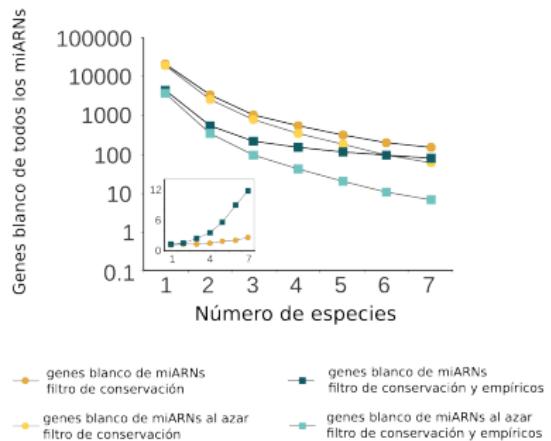
Selección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



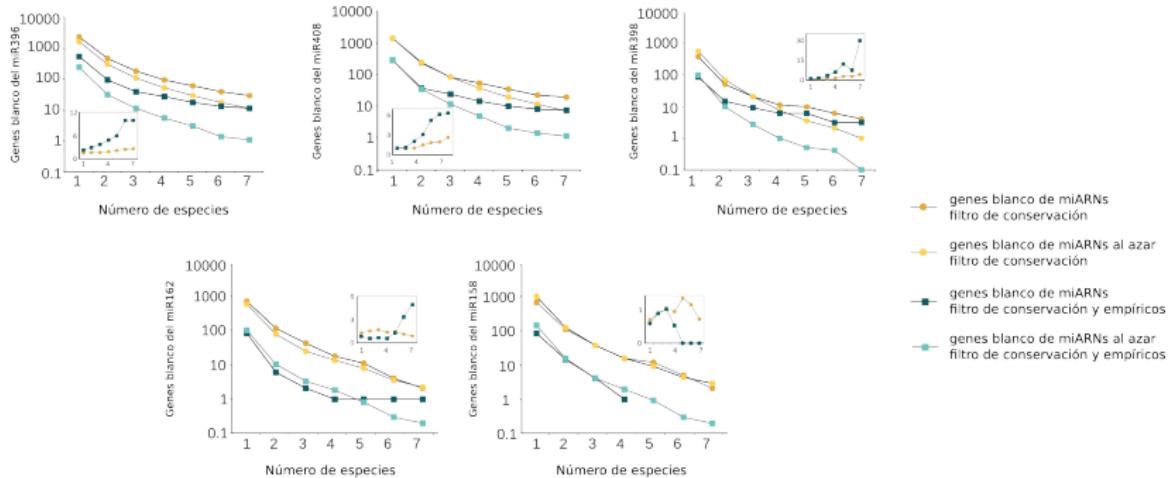
Al aplicar filtros empíricos y de conservación la relación señal/ruido aumenta



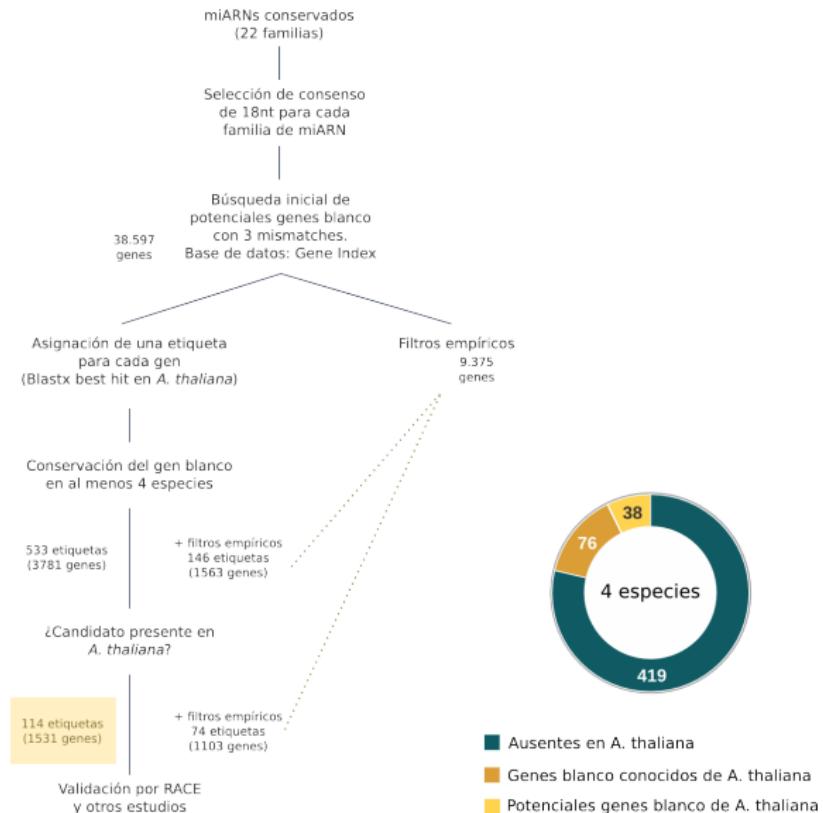
Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos



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

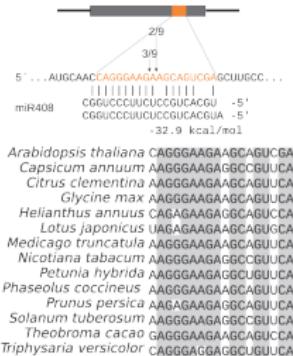


Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva

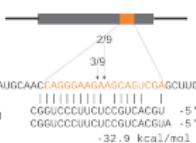


Validación experimental

PAC1 (At3g22110)

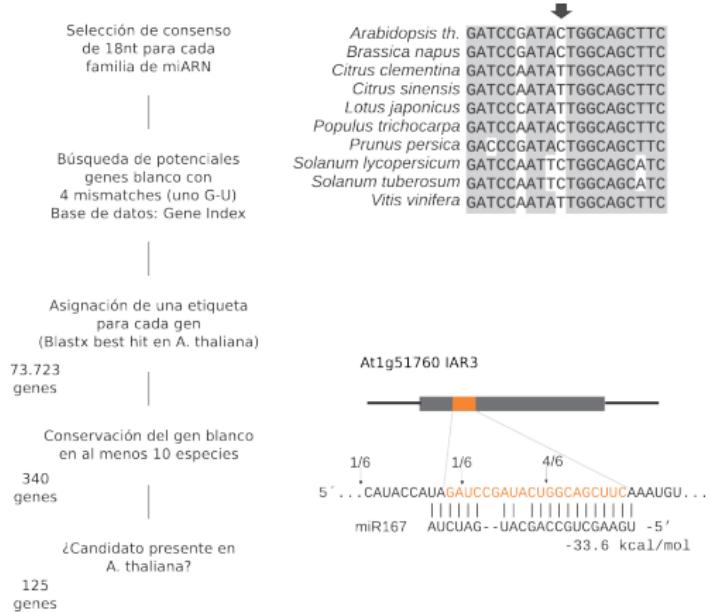


Nuevos genes blancos validados en *A. thaliana*

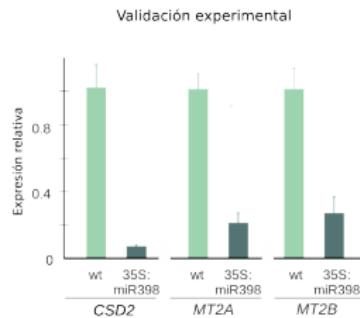
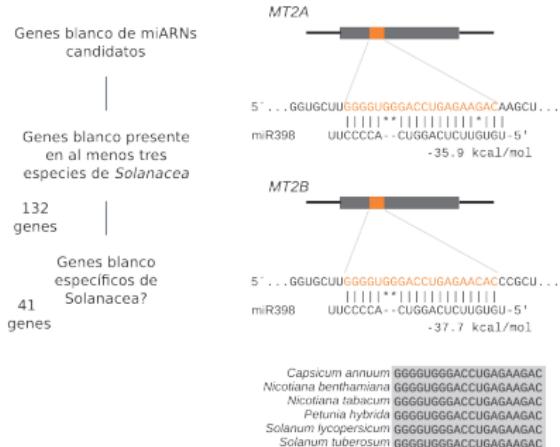
PAC1 (At3g22110)	miARN	Consenso	Targets conocidos Validados por nosotros
	mir156	GACAGAAAGAGGTGAGCA	fatores de transcripción SPI
	mir159	TGGATTTGAAGGGAGCTC	fatores de transcripción MYB, NOZZLE (NZL)
	mir160	GCTTGGCTCCCTGTATGC	fatores de transcripción ARF
	mir162	CGATAAACCTCTGCAATCC	DCL1
	mir164	GGAGAACGAGGCCACCTG	fatores de transcripción NAC
	mir166	CGGACCAAGGCTCAATTG	fatores de transcripción HDZip
	mir167	GAAGCTGGCACAGATCATC	fatores de transcripción ARF, IAA-ALANINE RESISTANT 3 (IAR3)
	mir168	CCTCTTGTCAGGTGCGG	AGO1
	mir169	AGCCAAGGATGACTTGGC	fatores de transcripción CCAAT-HAP2
	mir171	TGAGGCCGTGCCAAATAC	fatores de transcripción GRAS
	mir172	GAATCTTGTATGATGCTSC	fatores de transcripción AP2
	mir319	TGGACTGAAGGGAGCTCC	fatores de transcripción TCP
	mir390	AGCTCAGGAGGGATAGCG	TAS RNA
	mir393	CCAAAGGGATGCCAATG	TIR1 proteins, F-BOX proteins
	mir394	TGGCATTCCTGTCCACCTC	proteinas F-BOX
	mir395	TGAAGTGTGTTGGGGAAAC	ATP-sulfurilasas, transportadores de sulfato
	mir396	TCCACAGCTTCTTGAAAC	fatores de transcripción GRF, MMG4.7, FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU)
	mir397	CATTGAGTCAGGGTGTG	Laccases
	mir398	GTGTTTCAGGTACCCC	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	TAGATGACCATCAGCAAA	SPX proteins

Nuevos genes blancos con interacciones G-U

ESTO NO LO VOY A PONER



Identificación de genes blancos específicos de Solanaceae



ComTAR, una herramienta para predecir potenciales genes blancos regulados por miARNs en plantas basada en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco. Permite realizar la búsqueda de:

ComTAR, una herramienta para predecir potenciales genes blancos regulados por miARNs en plantas basada en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco. 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

ComTAR, una herramienta para predecir potenciales genes blancos regulados por miARNs en plantas basada en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco. 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.

- ▶ 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.

- ▶ 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.

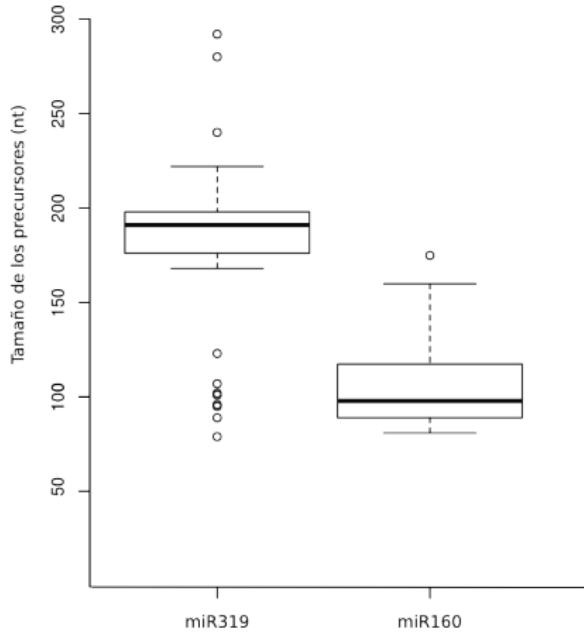
- ▶ Diseñamos una estrategia para identificar genes blancos regulados por miARNs en plantas, basado en la conservación evolutiva del par miARN-gen blanco.
- ▶ Identificamos nuevos genes blancos en *A. thaliana* y se validaron experimentalmente varios de ellos.
- ▶ Esta estrategia puede ser utilizada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

- ▶ Diseñar una estrategia y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y 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 y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y 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.

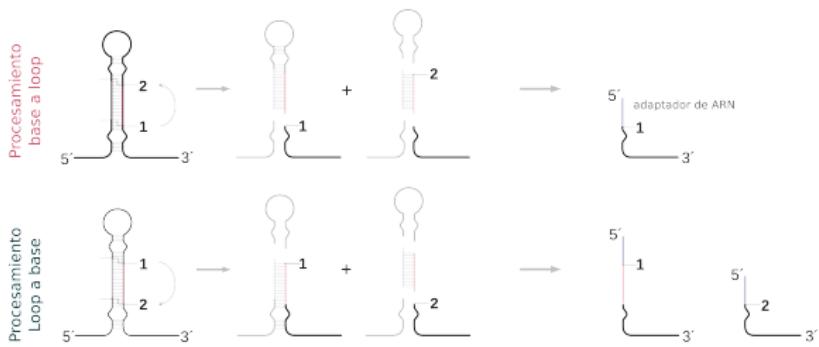
Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



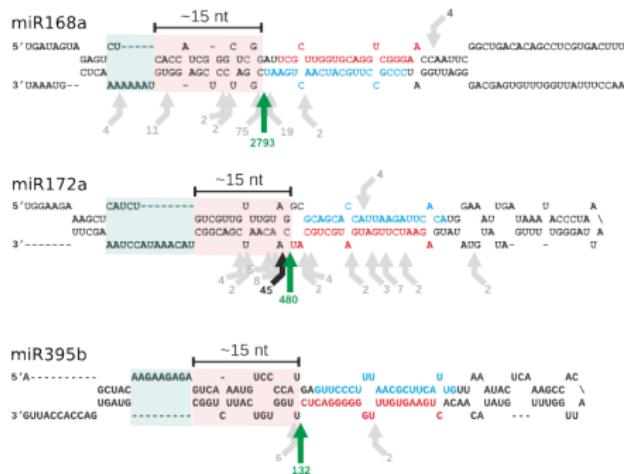
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



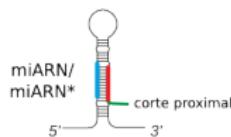
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



Visualización de precursores que se procesan desde la base

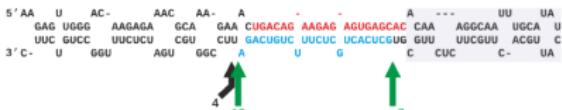


Detección solamente
del corte proximal



Visualización de precursores que se procesan desde el loop

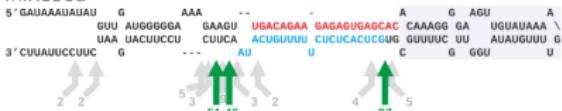
miR156a



miR156c



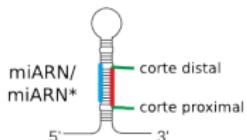
miR156d



miR160a

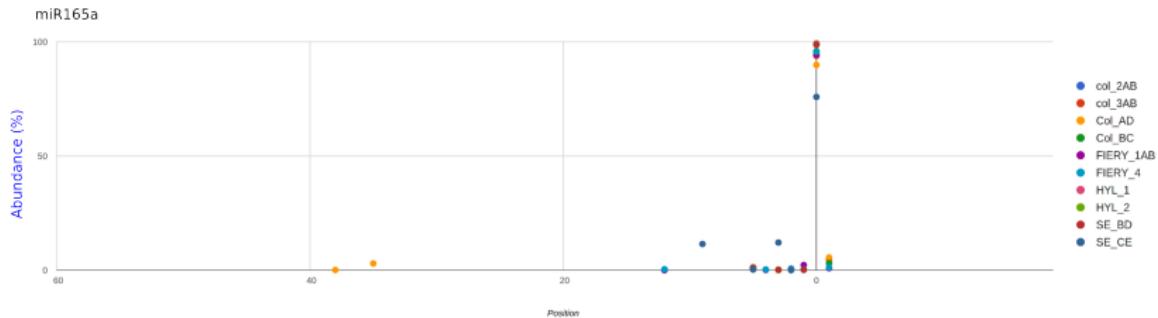


Detección de ambos cortes,
proximal y distal



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

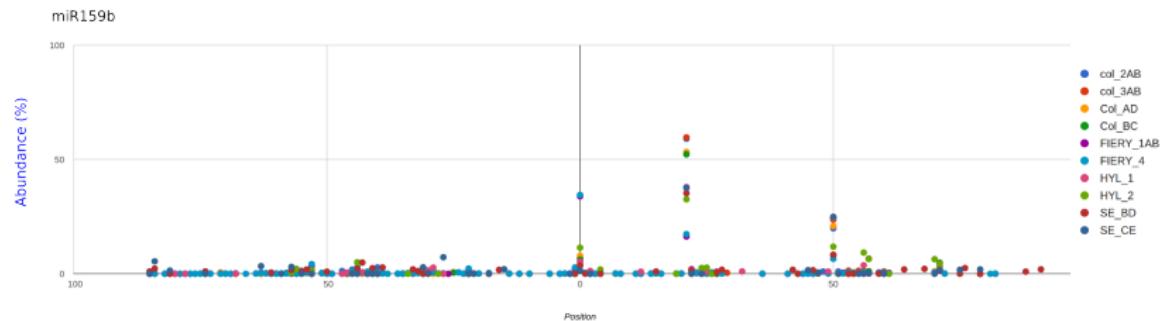
Precursors procesados desde la base



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

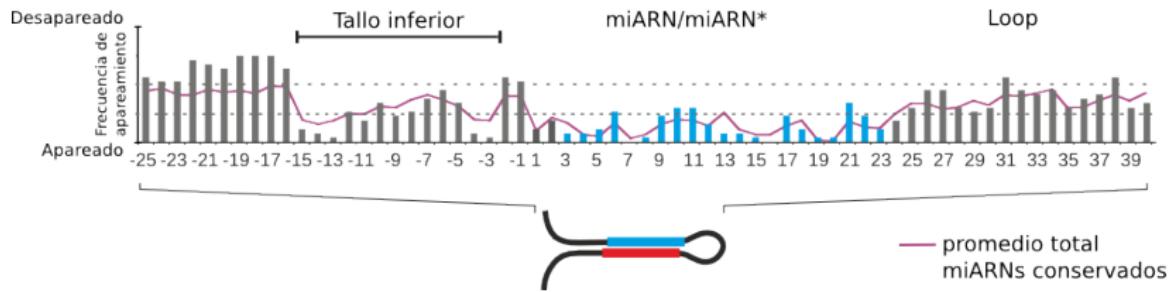


Precursors procesados desde el loop

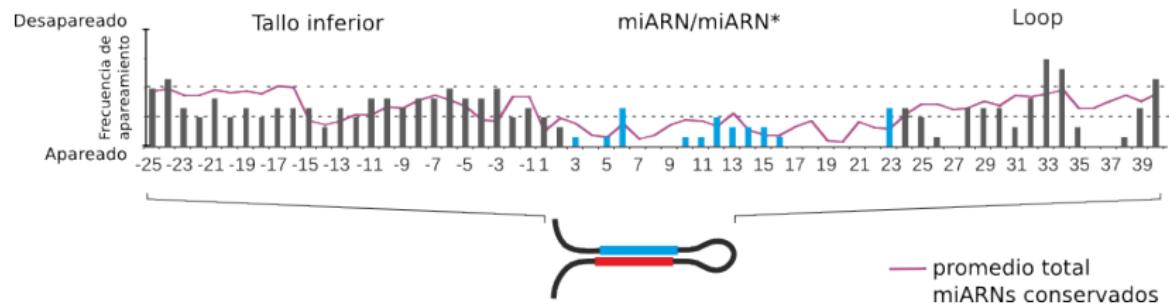


Position	col_2AB	col_3AB	Col_AD	Col_BC	FIERY_1AB	FIERY_4	HYL_1	HYL_2	SE_BD	SE_CE
21	10252	19917	5562	10992	6776	20171	2514	1477	1685	2752
50	3450	7908	2174	5164	3392	7627	1629	538	398	1824
0	1209	1319	822	1300	14091	40065	353	518	172	101
71	451	1070	233	1028	538	1713	302	201	70	125
53	9	461	1	64	250	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

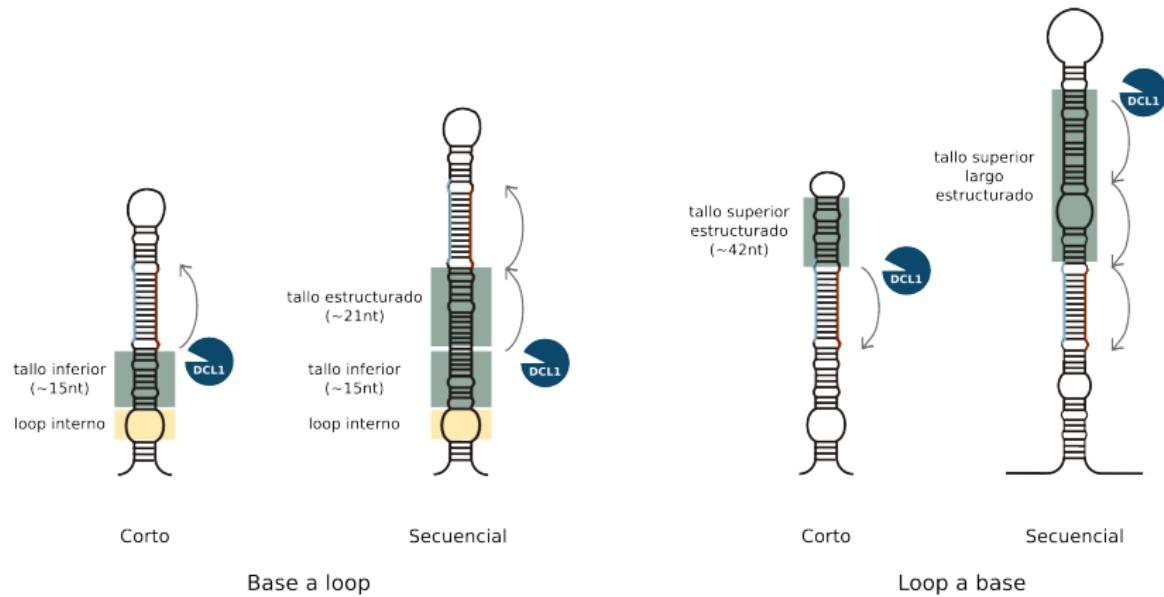
Tallo inferior de 15 nt en precursores procesados desde la base



Región terminal estructurada en precursores procesados desde el loop



Conclusiones II

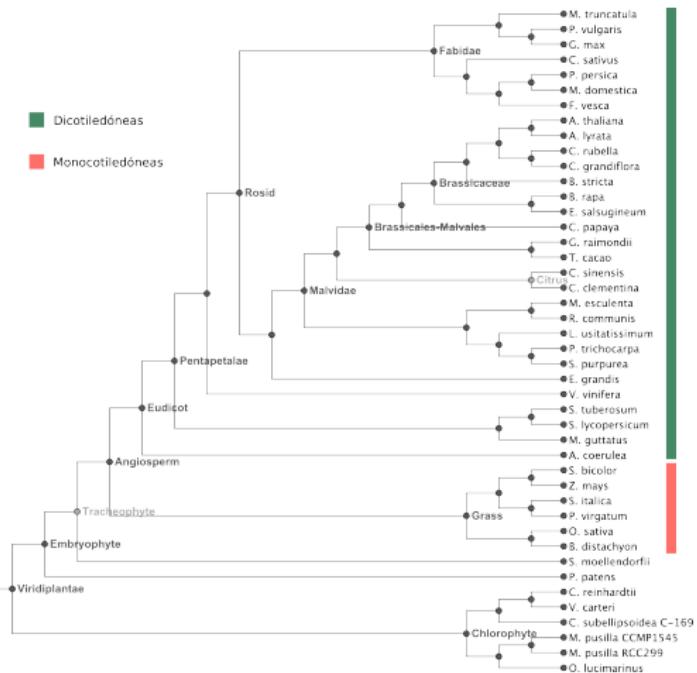


- ▶ Diseñar una estrategia y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y caracterizar precursores de miARNs en distintas especies 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 y una herramienta web para la identificación de genes blancos regulados por miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollar herramientas para el análisis de los intermediarios de procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Identificar y 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.

ARMAR UNA INTRO CON ESTO!!! Comenzamos nuestro análisis con una definición arbitraria de los precursores de plantas incluyendo 150 nt fuera del par miARN/miARN*. Para cada miembro de cada familia de *A. thaliana* no es trivial asignarle un ortólogo en otra especie teniendo en cuenta la anotación de miRBase. Por esto, realizamos una búsqueda de ortólogos para cada miembro de cada familia de *A. thaliana* utilizando como criterio la técnica de Blast recíproco.

Especies utilizadas de Phytozome (30 dicotiledóneas y 6 monocotiledóneas)



Conservación de la secuencia primaria del miR172a en distintas especies

ANSWER

[CODE](#)



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

ANSWER



© 2005 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Addison Wesley



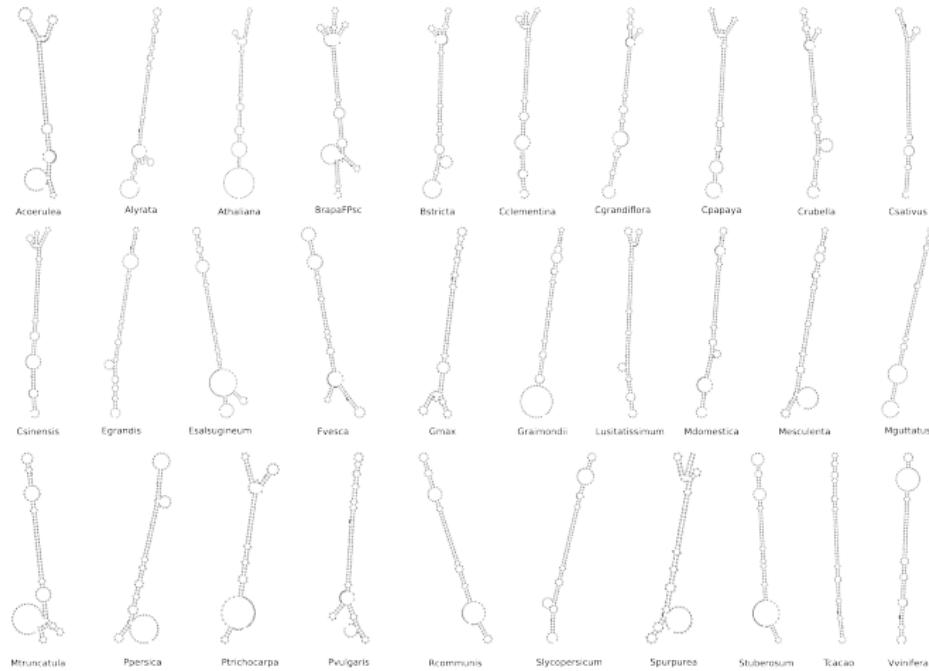
Cola de conservación hacia la izquierda del miARN y hacia la derecha del miARN*

					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	GC	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Uridil	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	
Cigrandil	AC	UUAUU	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	AC	UCAAC	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Cisineins	AC	UCAAC	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Lutalinat	AC	UCAAC	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	AC	UCAAC	UCC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	AA	GU	GA	GU	GGAU	GU	AGGA	A	AA	AA	
Geax	CA	UUAUU	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	UUAUU	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	UUAUU	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Spurpurase	CA	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	CA	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Catstivus	CA	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
R	REAUCAUC	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	A	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Mesocleista	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Pugnatus	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Hippocampus	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Capapaya	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Urokinase	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Crucellula	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Tocaco	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Chacarac	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Pulgariol	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Graminalis	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Graminalis	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	
Strobosom	GU	GUAAAAC	UAC	GAC	GU	UC	A	ACAUUCCUUAUUCGUUCAUCACAUAA	CACAUUCCU	GU	GG	EC	GGC	GGGG	GU	AGGA	A	AA	AA	

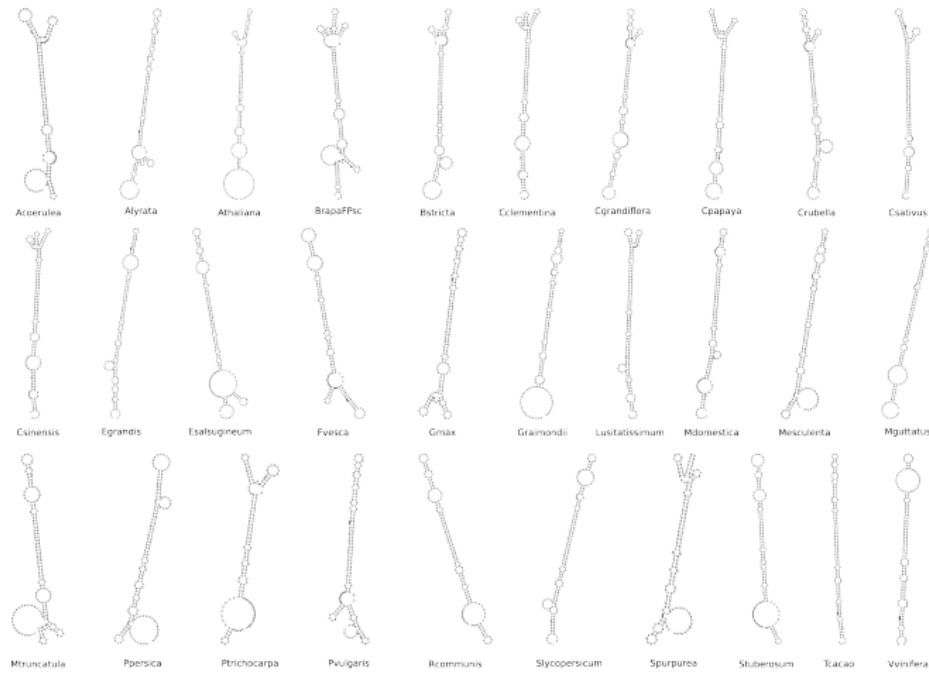
ANSWER

© 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*

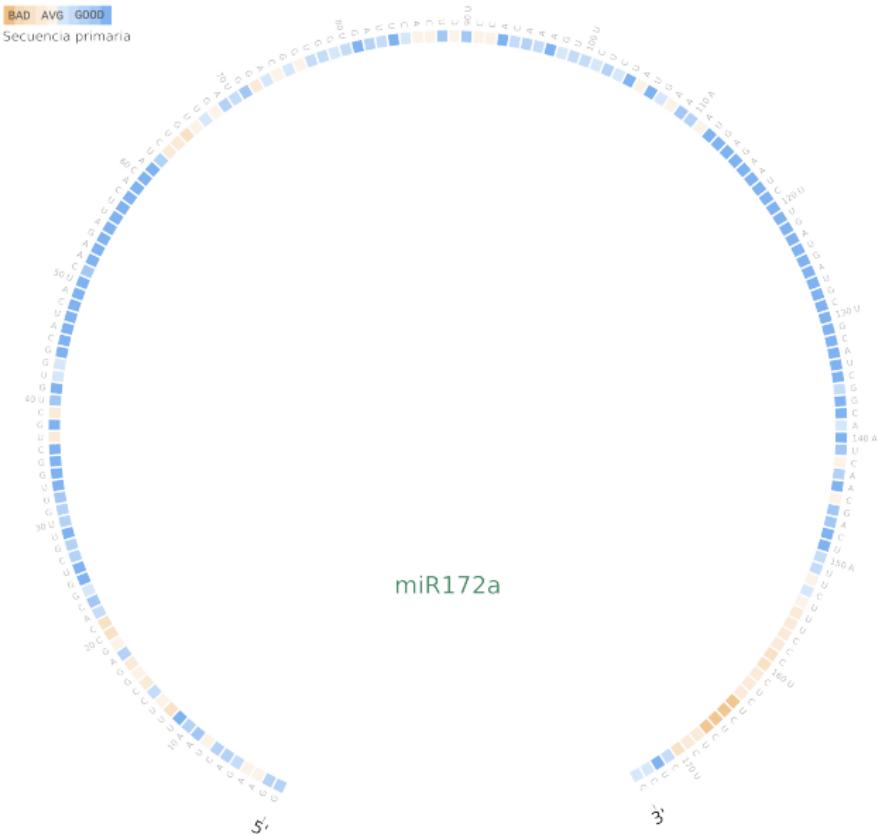


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN*

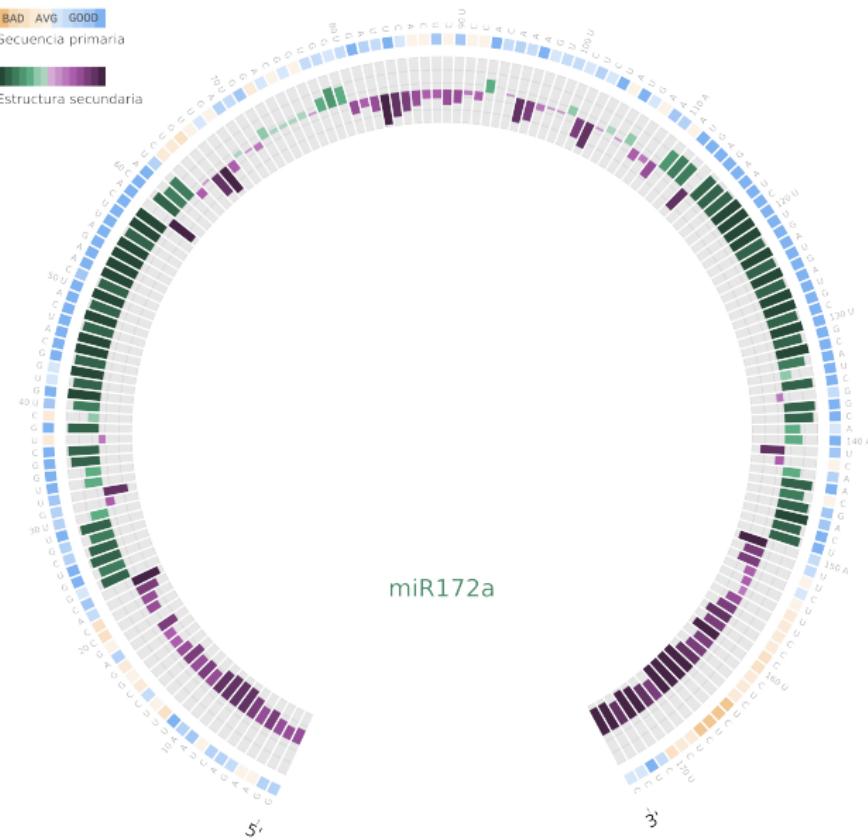


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

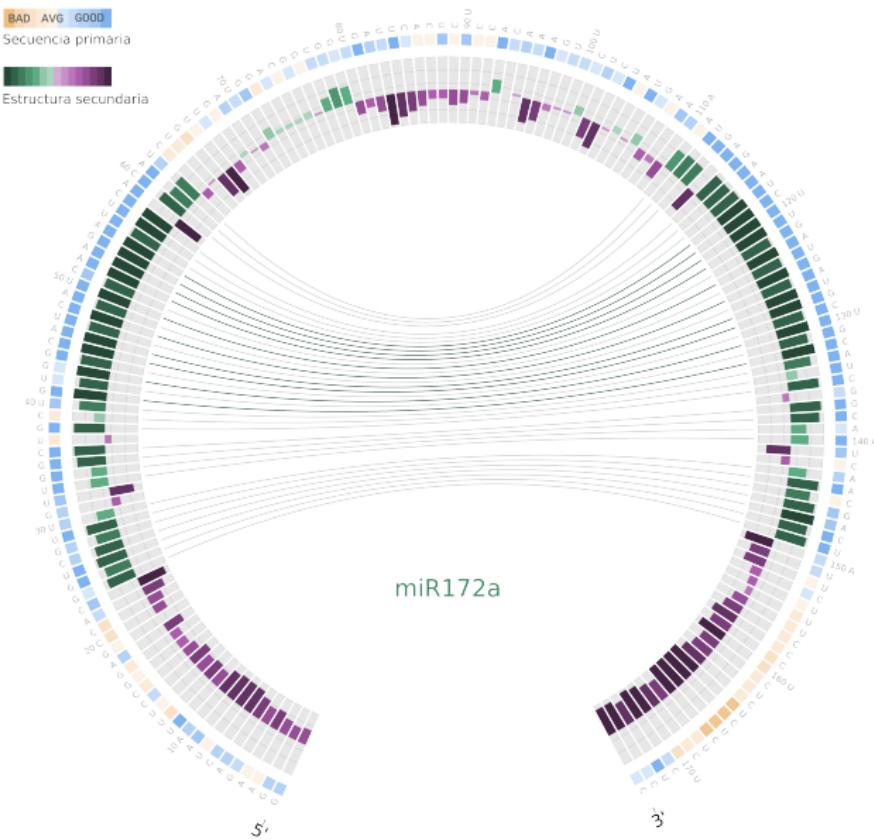
Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



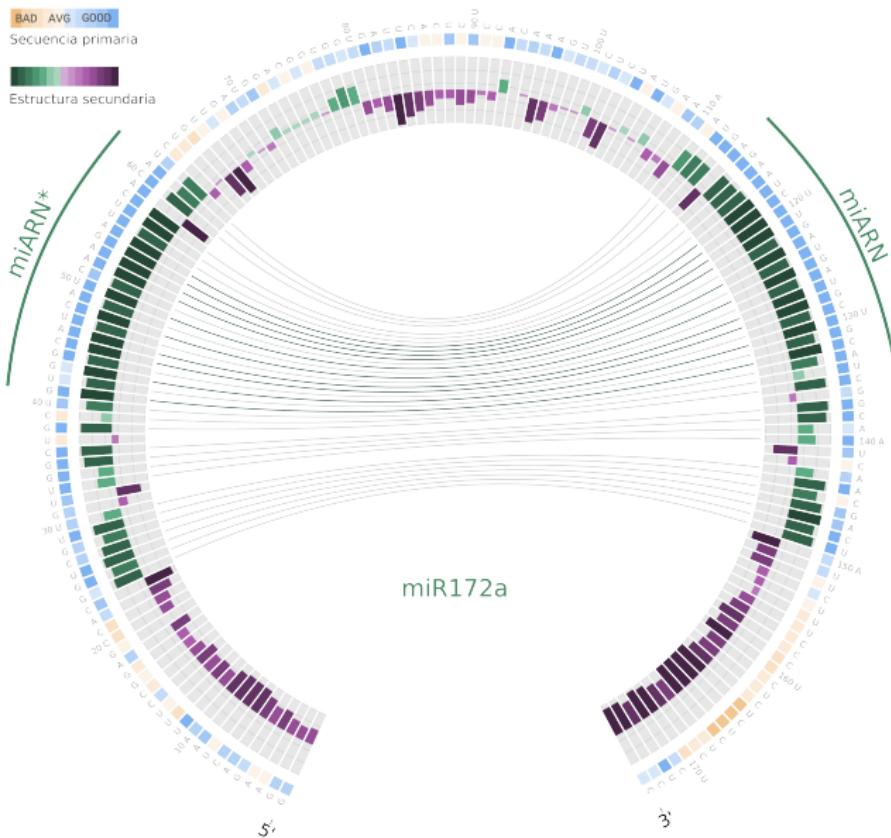
Frecuencia de bases apareadas y desapareadas



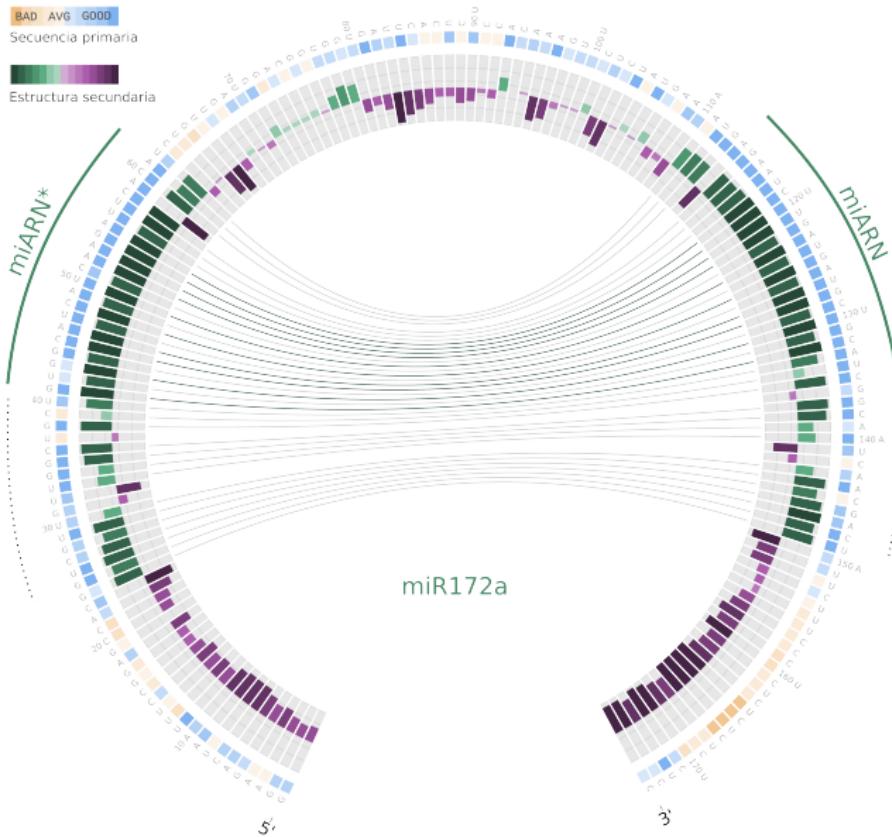
Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



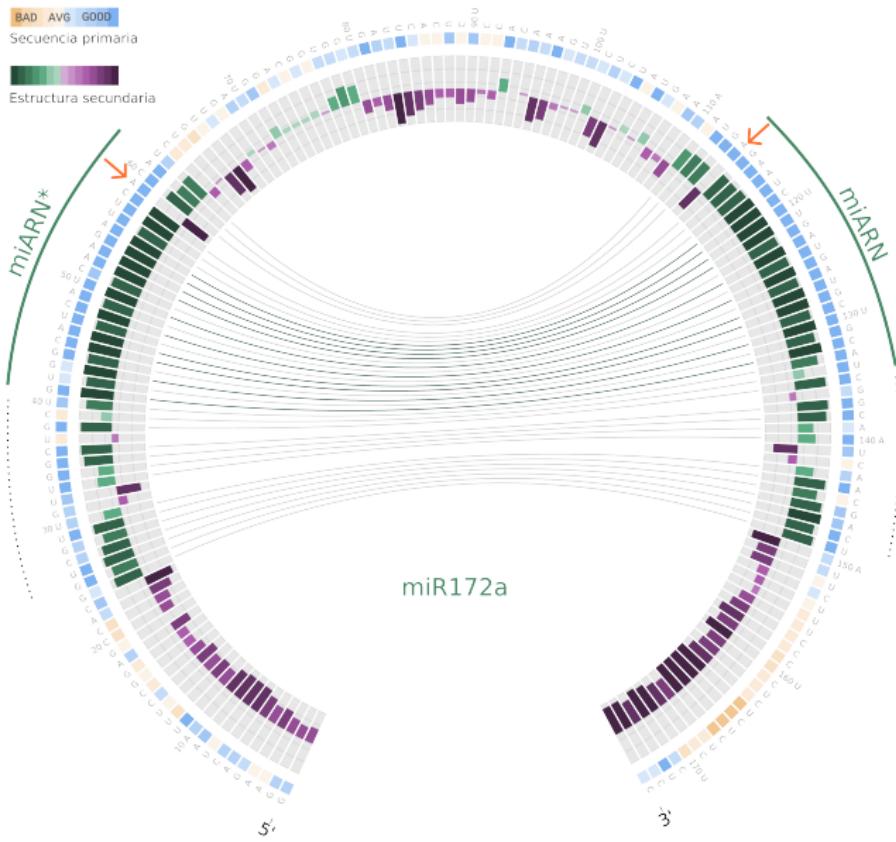
miARN y miARN* conservados en secuencia primaria y estructura



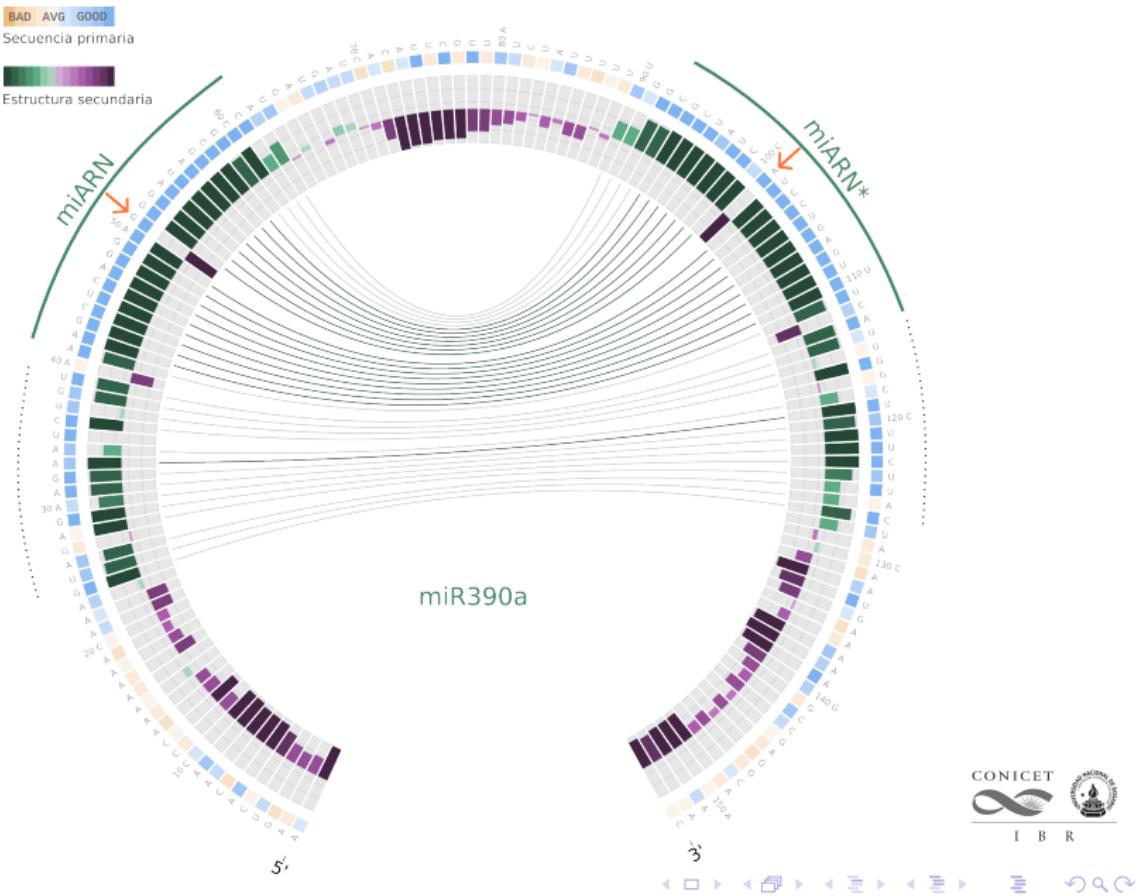
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



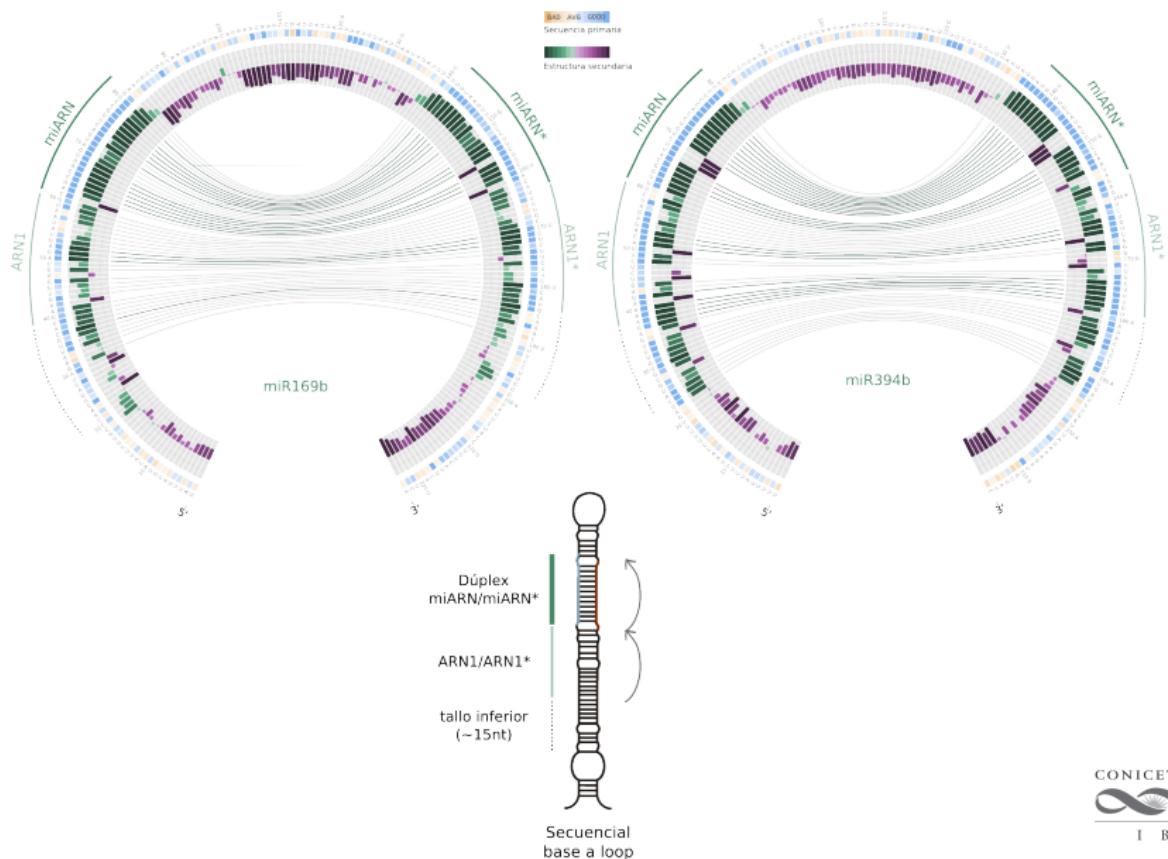
Mismatches conservados



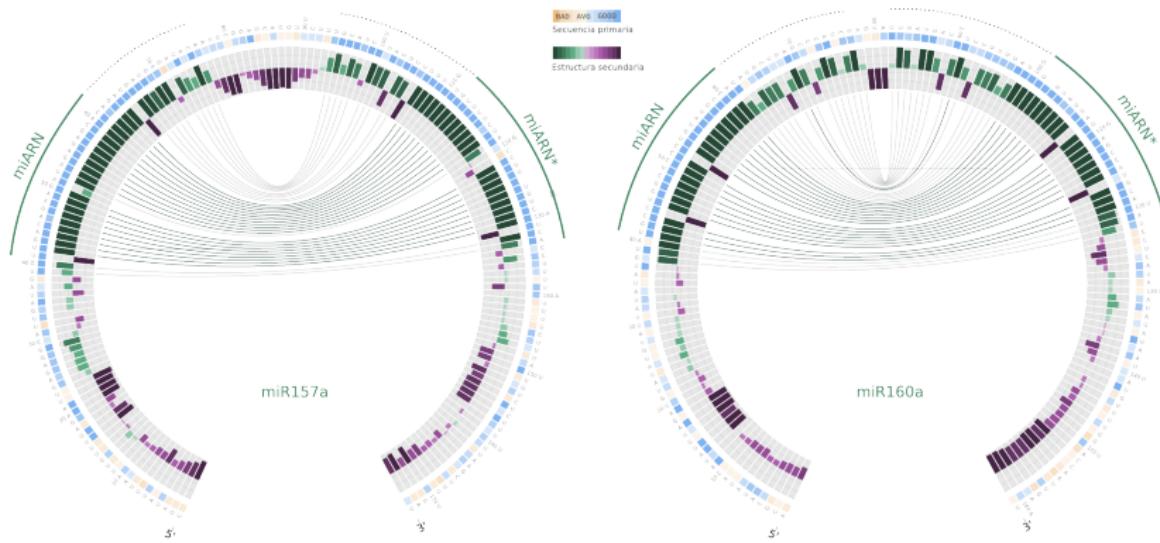
Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



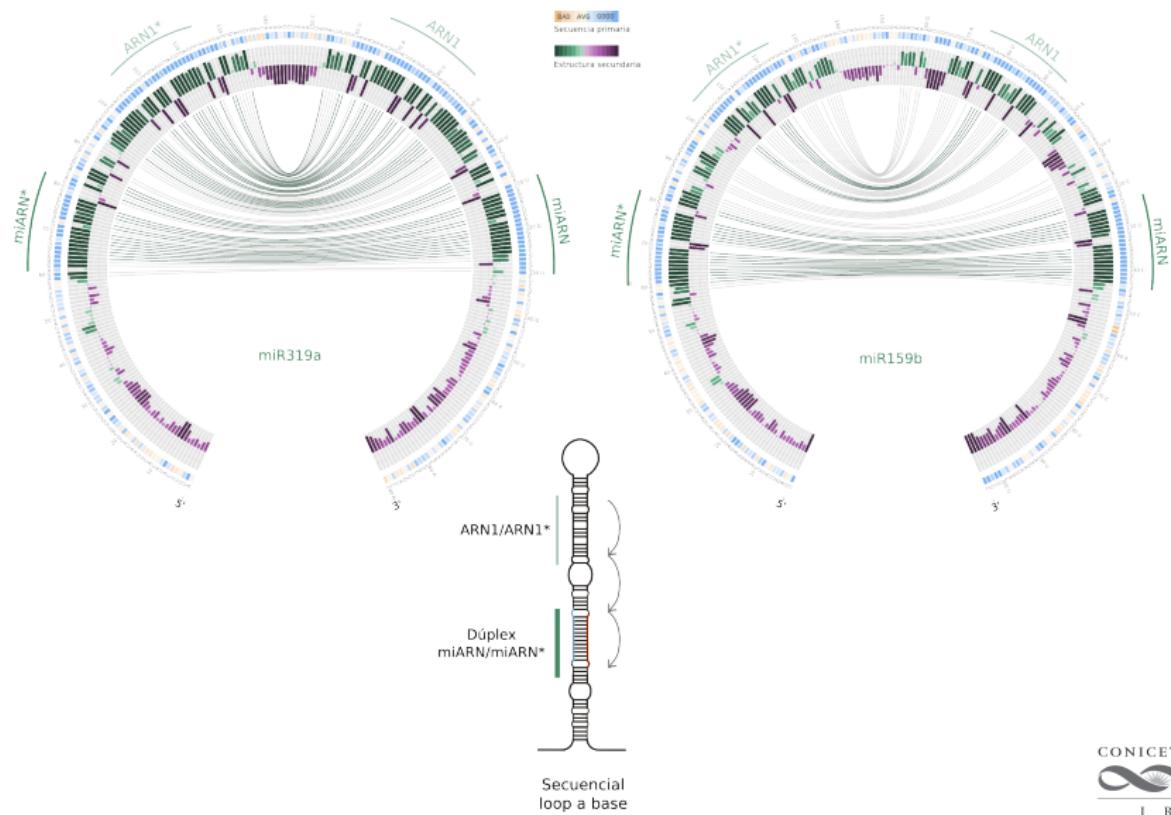
Precursos que se procesan desde la base en forma secuencial



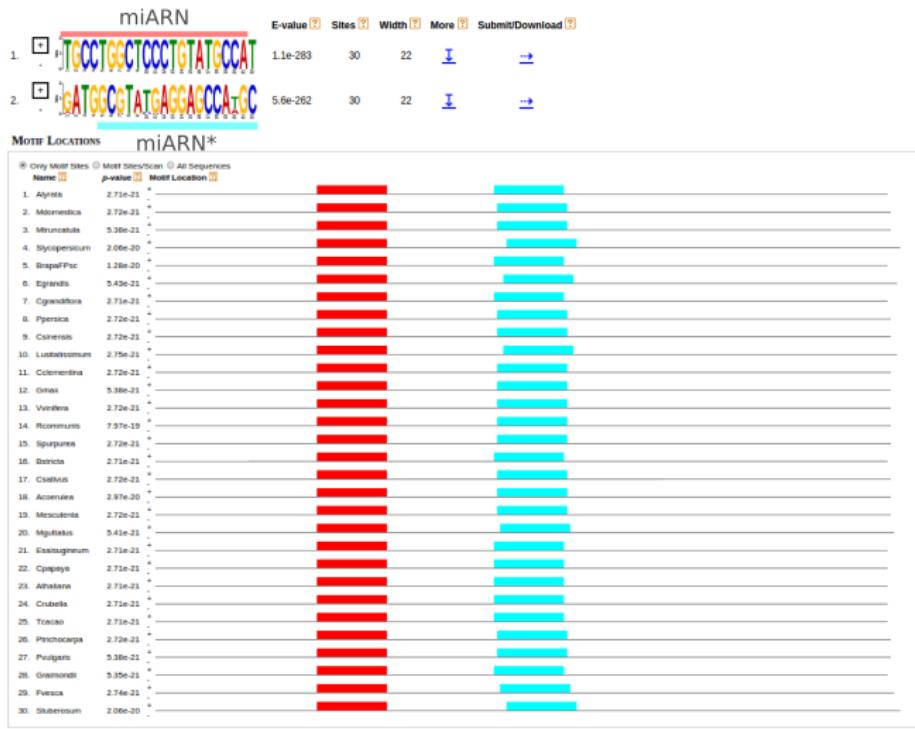
Precursors que se procesan desde el loop cortos



Precursos que se procesan desde el loop en forma secuencial



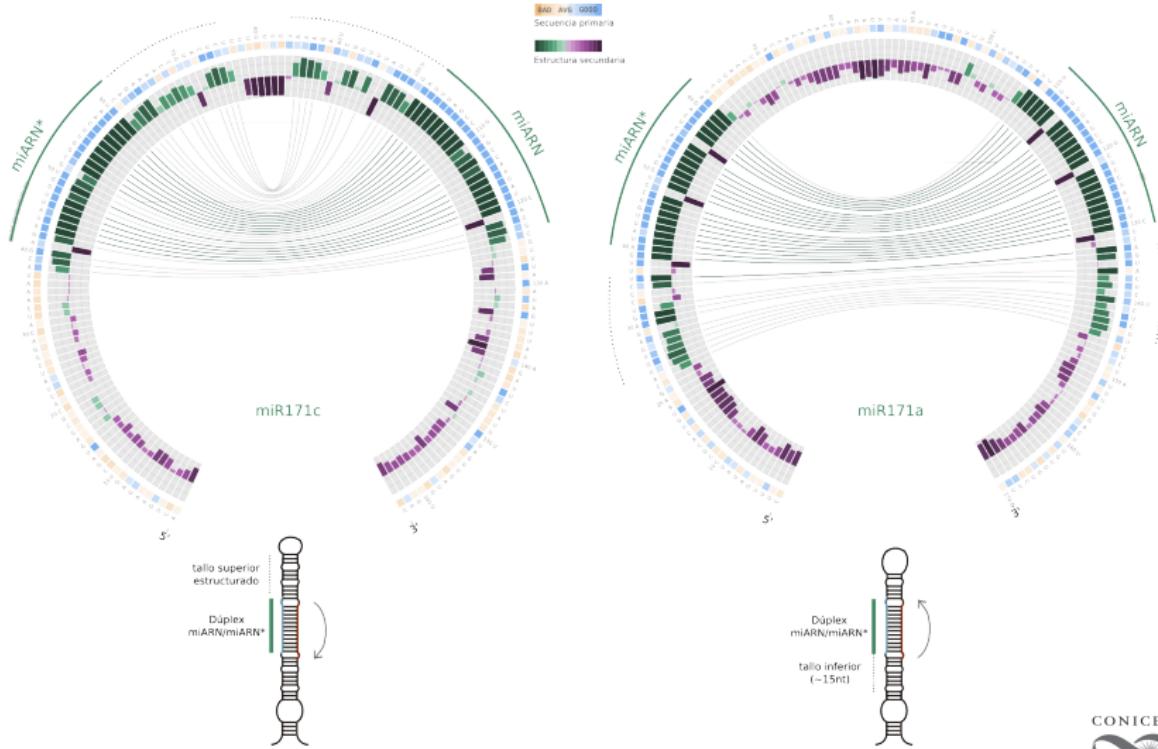
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



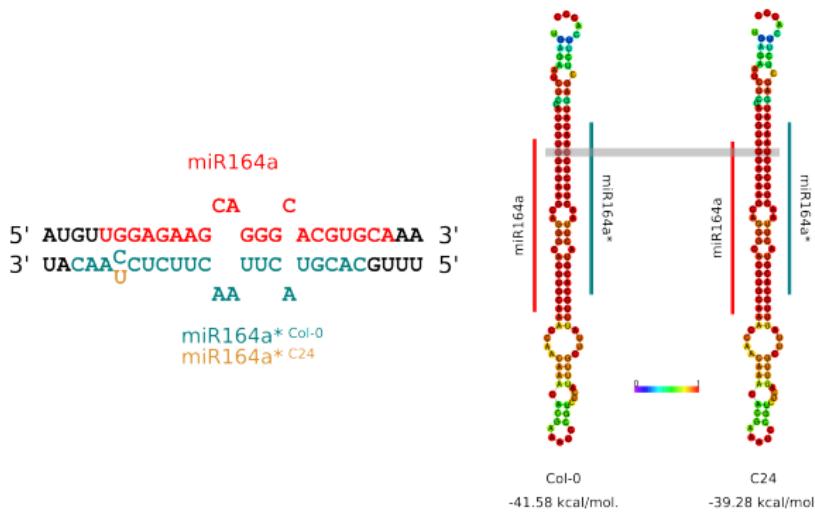
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



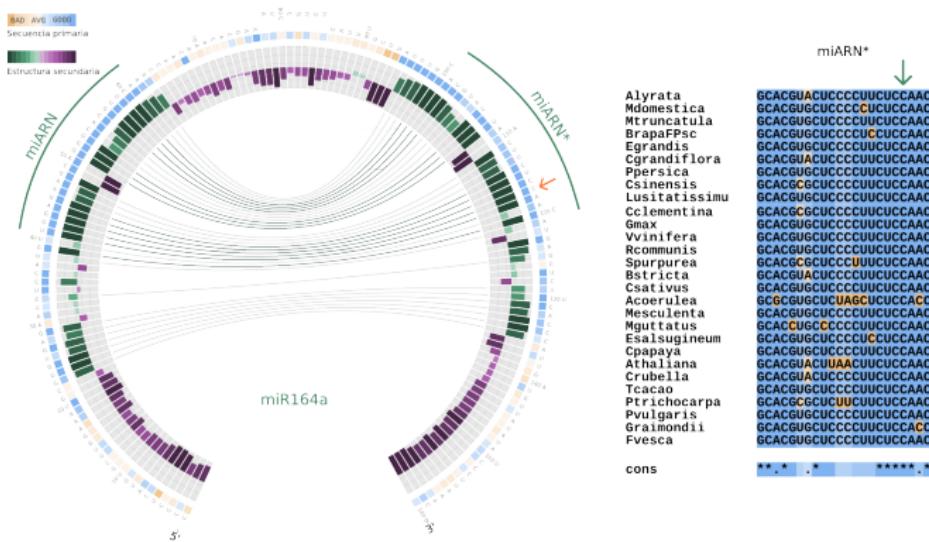
Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



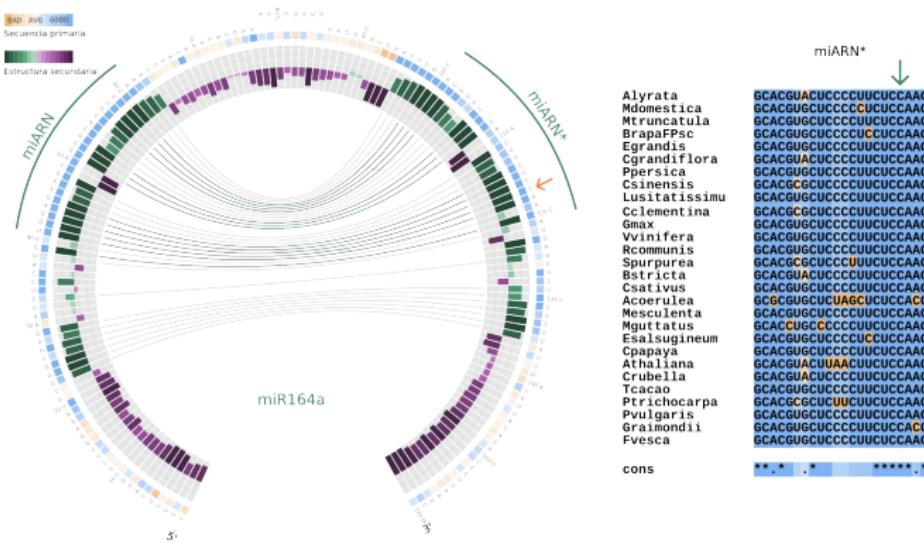
Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

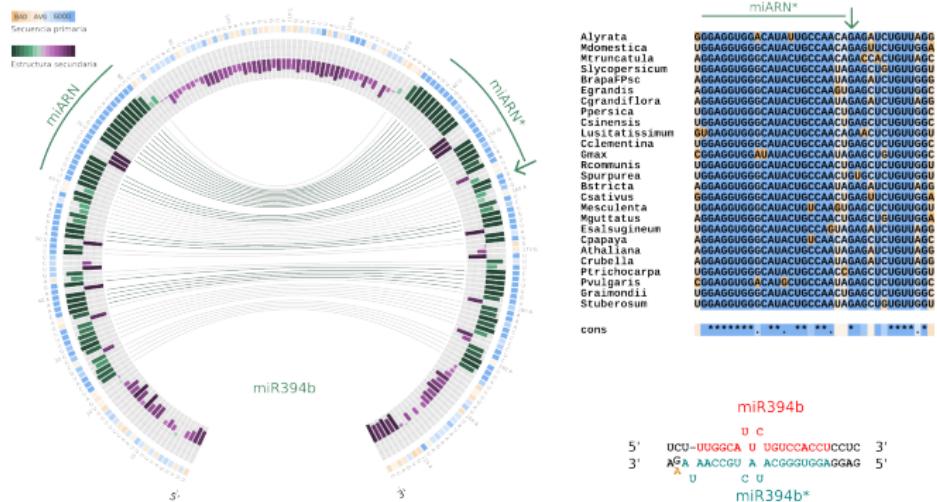


Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

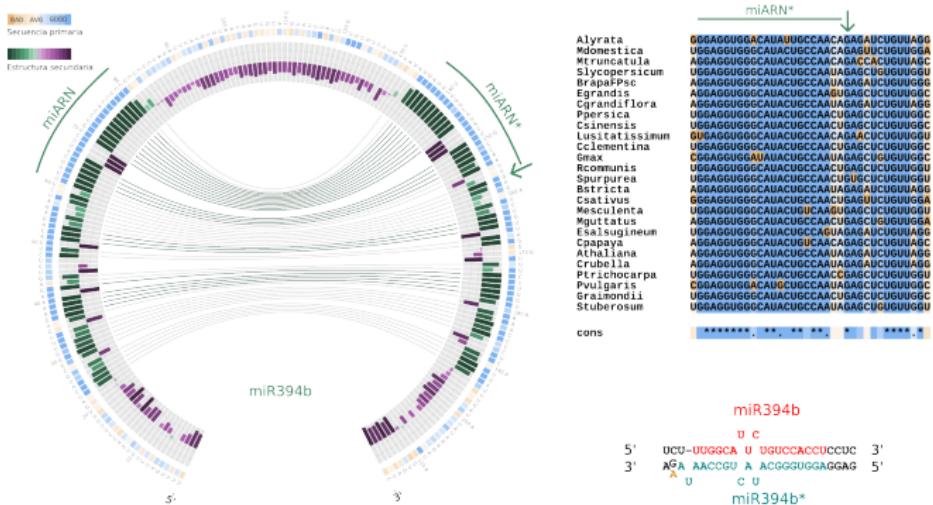


La posición *2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

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

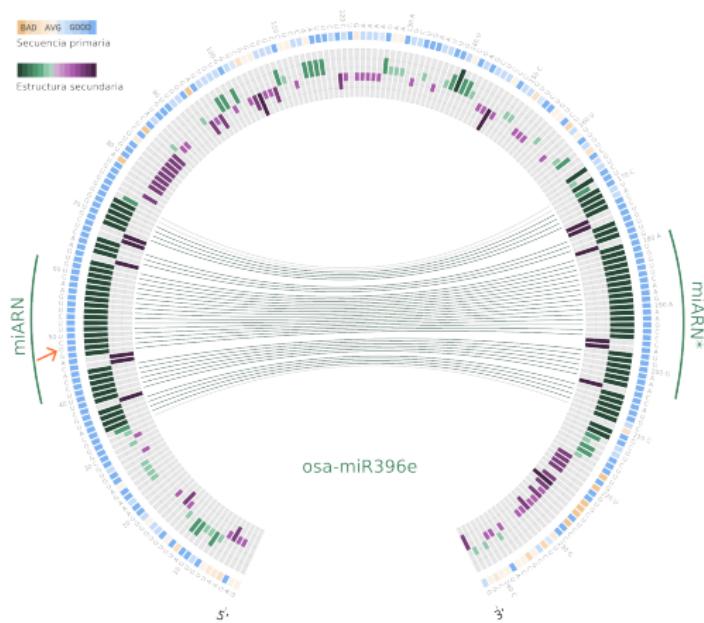


Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

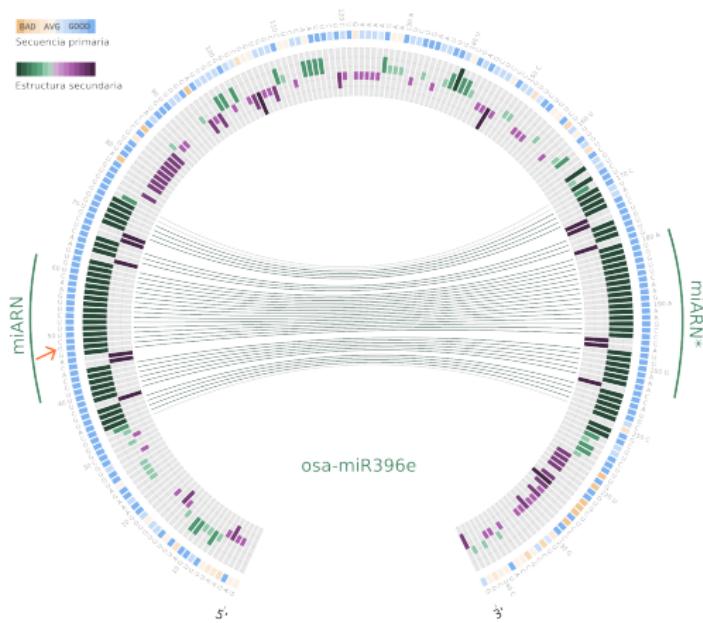


Mutaciones simples en el precursor puede afectar el reconocimiento de DICER.

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?

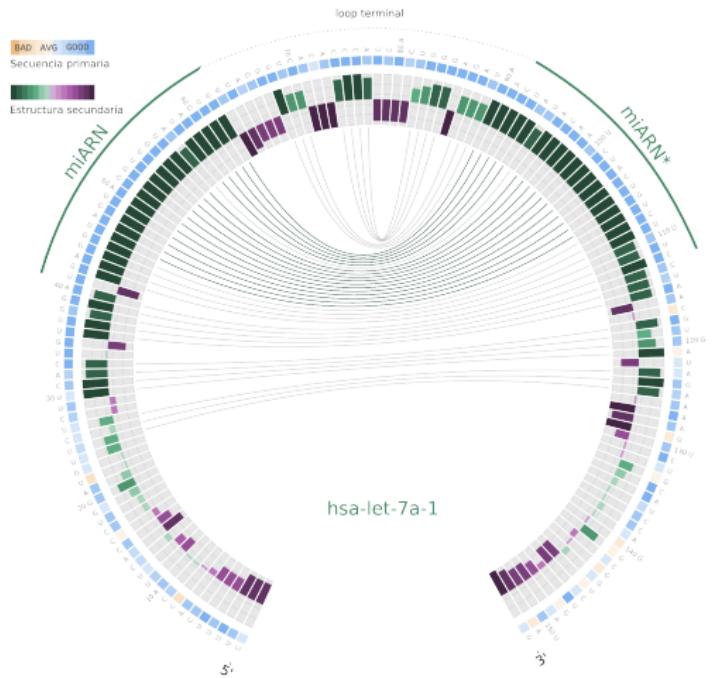
Animales

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

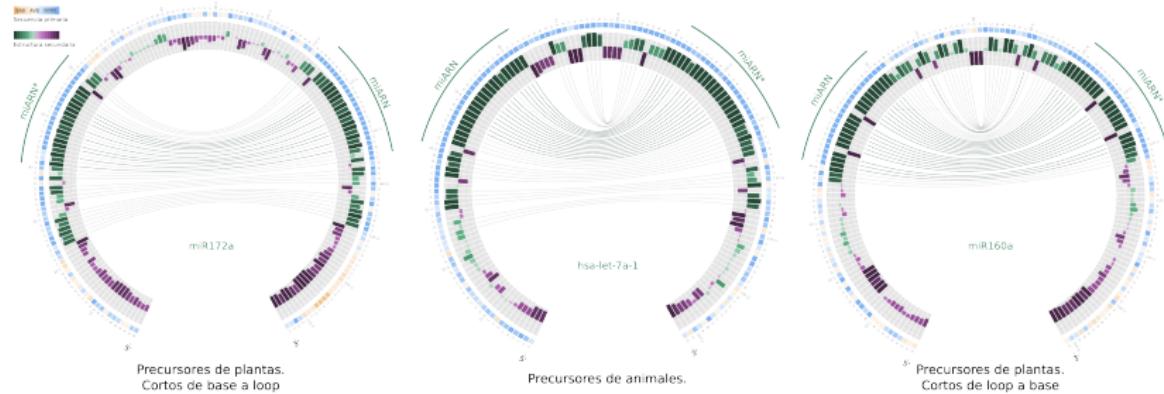
La riboproteína HnRNP A1 se une al loop terminal del precursor de let-7-a e inhibe su procesamiento por Drosha.

hsa-let-7-a. El loop terminal está conservado en algunos precursores de animales.

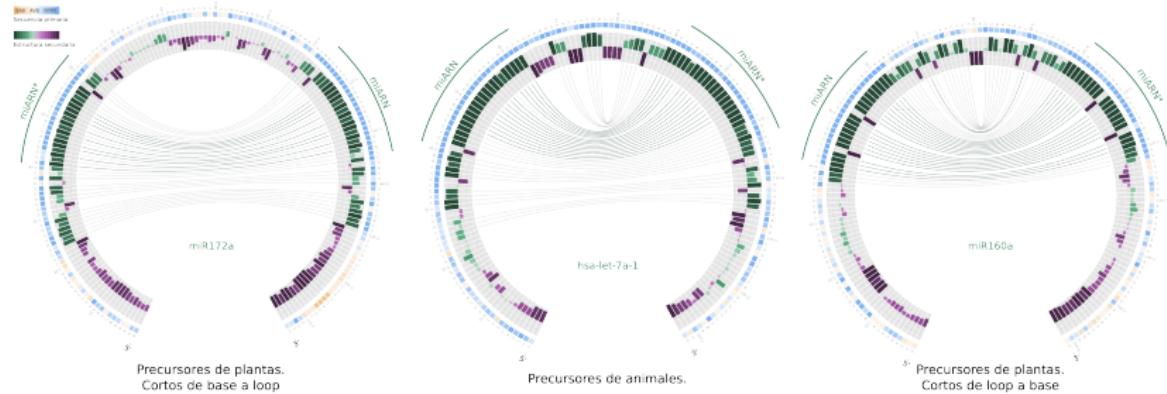
La riboproteína HnRNP A1 se une al loop terminal del precursor de let-7-a e inhibe su procesamiento por Drosha.



Circos animales vs plantas



Circos animales vs plantas



Estructuralmente los precursores en animales comparten patrones similares a los precursores de plantas cortos de loop a base y también a los cortos de la base al loop

- ▶ 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

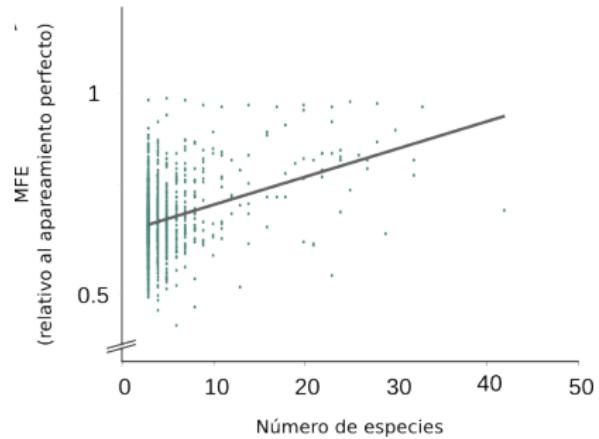
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

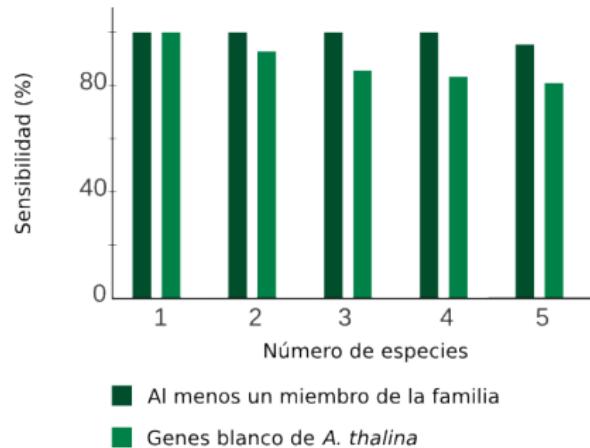
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollo de una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica

- ▶ 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.

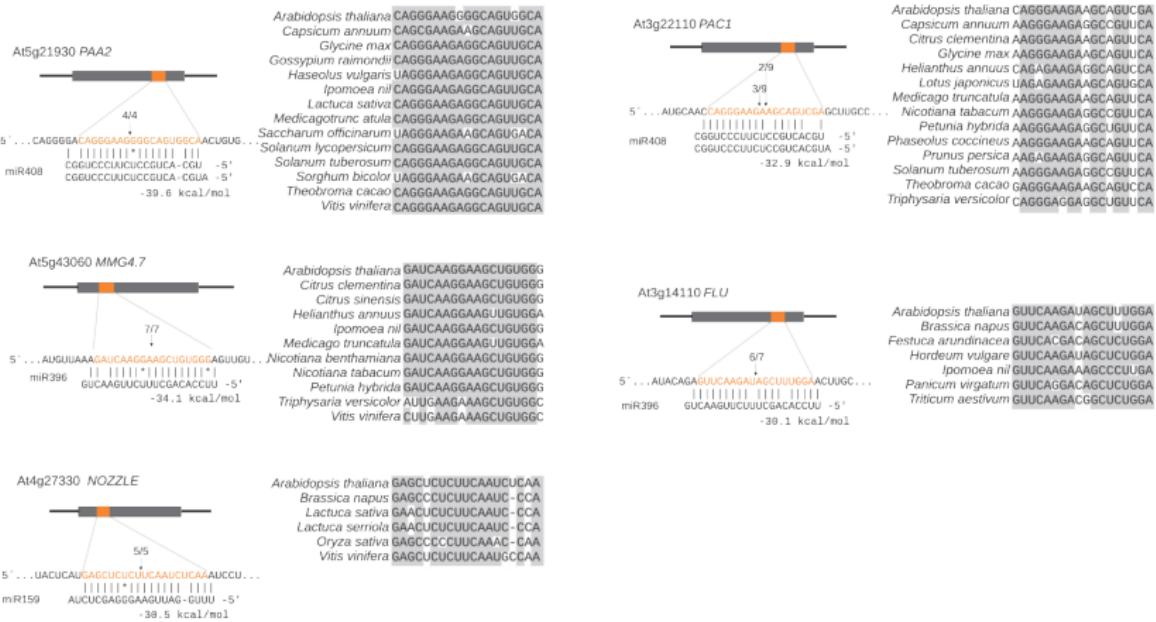
- ▶ Aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Desarrollo de la herramienta comTAR
- ▶ Determinantes mecánisticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollo de una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica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

