

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

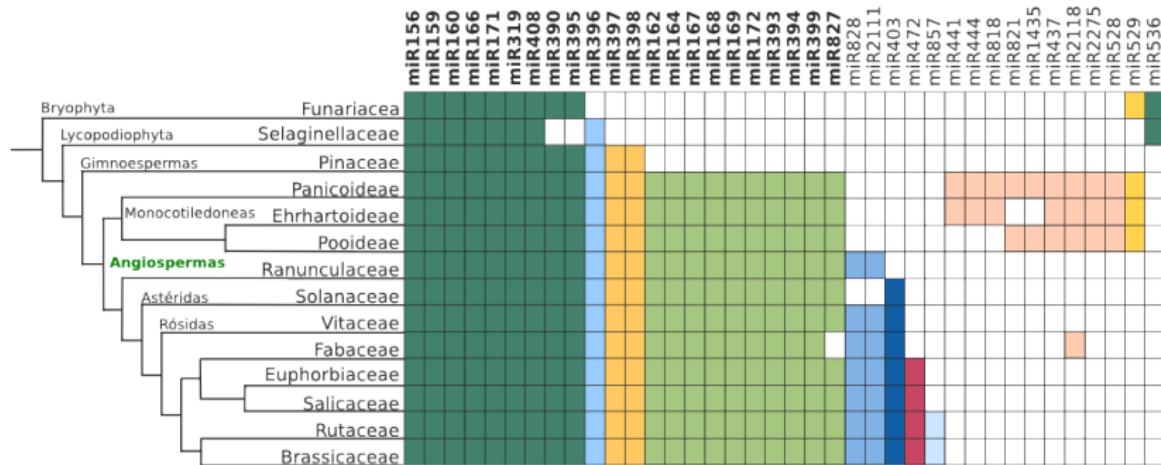
Uciel Chorostecki

Director Dr. Javier Palatnik
Instituto Biología Molecular y Celular Rosario

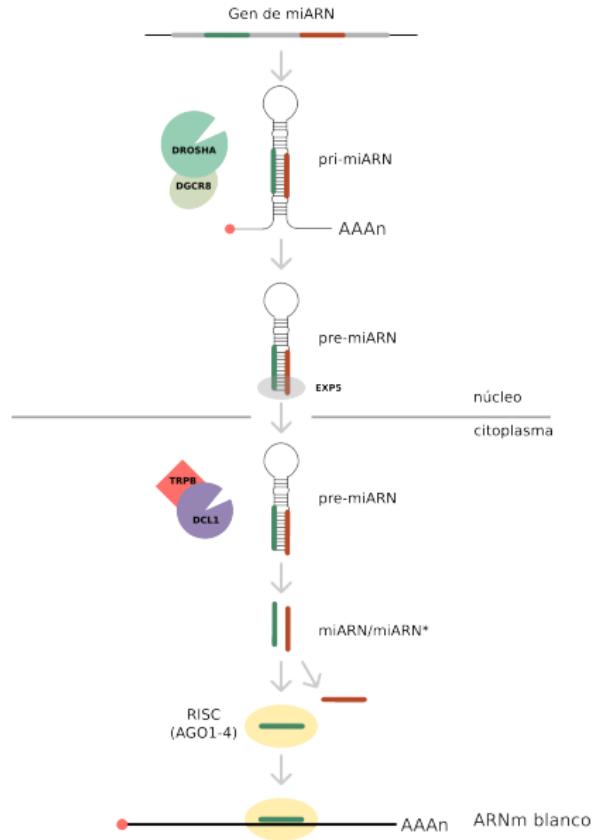
Los microARNs (miARNs) son ARN pequeños de 20-22 nt que regulan la expresión génica en animales y plantas.

- ▶ 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.

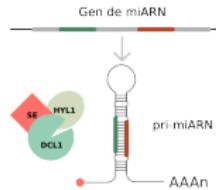
22 familias de miARNs que están altamente conservadas en las plantas



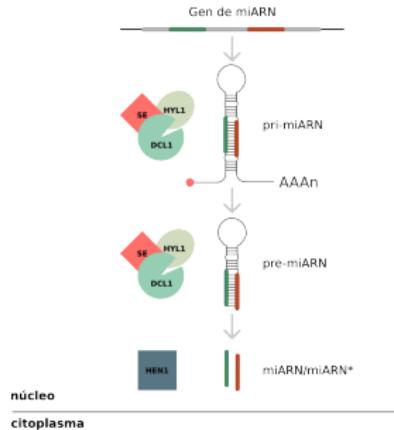
Procesamiento de miARNs en animales



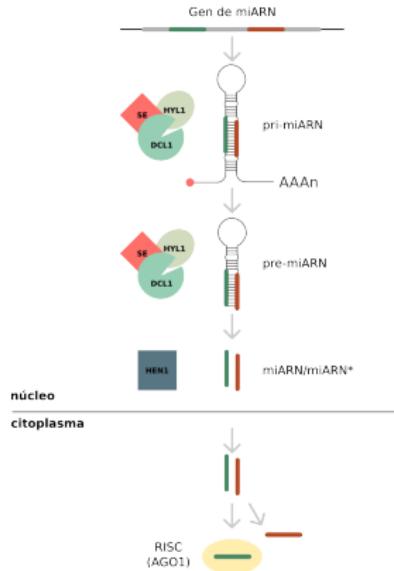
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



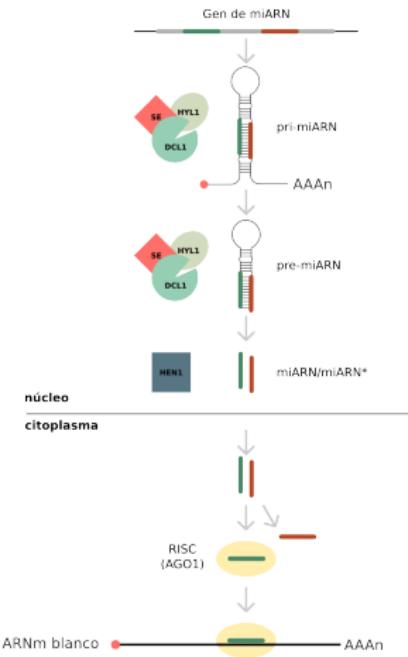
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



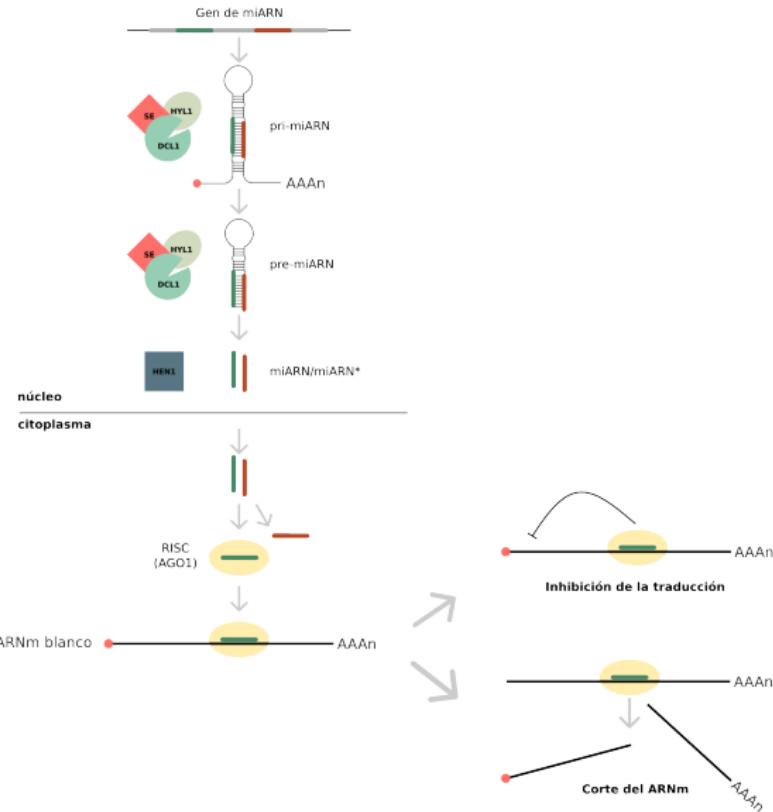
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



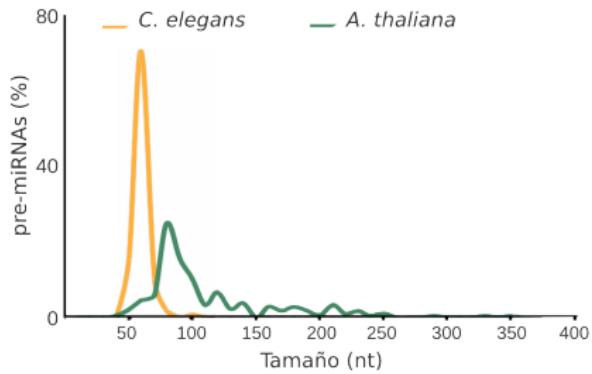
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



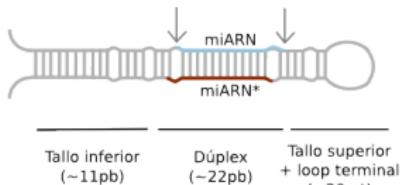
Biogénesis y actividad de miARNs en plantas



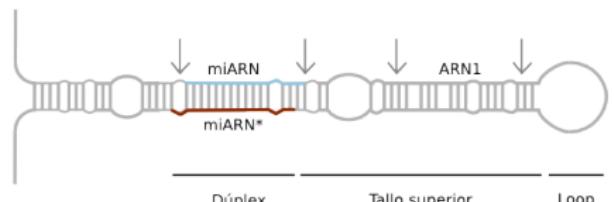
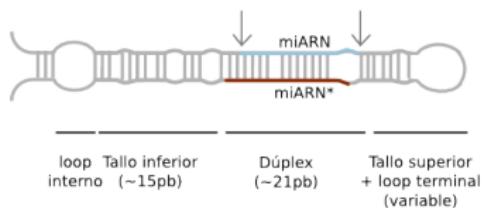
El tamaño de los precursores es muy variado en plantas



Estructuras secundarias de precursores de miARNs



pre-miARNs de animales



pre-miARNs de plantas

En animales existe un gran número de genes 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.

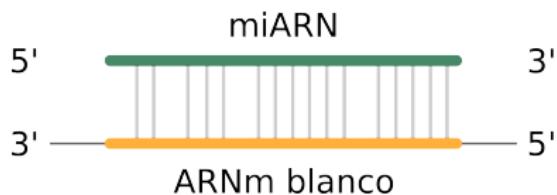
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.

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.

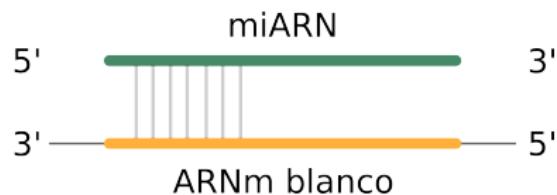
- ▶ Regulación por corte del ARN blanco.
 - ▶ Es el mecanismo más común en plantas.
 - ▶ El corte ocurre entre las posiciones 10 y 11 desde el extremo 5' del miARN.
- ▶ Regulación de la traducción por miARNs.
 - ▶ Inhibición de la traducción del ARNm blanco por el miARN explica la represión de la expresión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

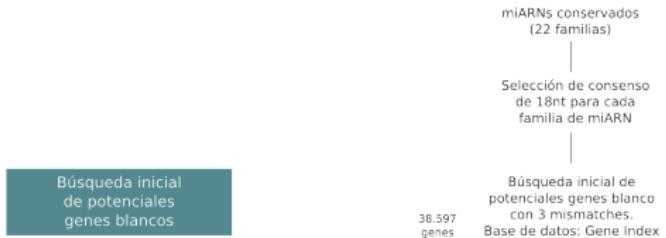
- ▶ Diseñar una estrategia para la identificación de genes blancos regulados por miARNs.
- ▶ Caracterizar precursores de miARNs en distintas especies que tengan mecanismos de procesamiento distintos.
- ▶ Caracterizar la relación entre la evolución de los precursores de miARNs en plantas y los mecanismos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

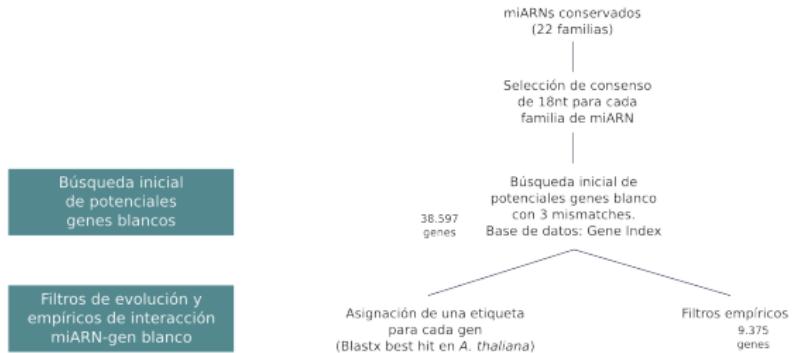
Conservación y divergencia de miARNs en distintas especies

	BAD	AVG	GODDE	miR319		BAD	AVG	GODDE	miR160
ath	mir319a	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC	U			ath	mir160a	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	
vvi	mir319k	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160a	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319l	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160b	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319m	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160c	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319n	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160d	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319o	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160e	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319p	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pic	mir160f	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319q	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160a	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319r	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160b	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319s	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160c	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319t	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160d	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319u	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160e	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319v	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				pco	mir160f	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319w	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160a	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319x	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160b	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319y	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160c	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319z	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160d	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319aa	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160e	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ab	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160f	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ac	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				stu	mir160g	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ad	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160a	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ae	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160b	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319af	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160c	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ag	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160d	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ah	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160e	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319ai	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160f	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
vvi	mir319aj	UUGGACUGUAAGGGAGCUCCC				vvi	mir160g	UGCCUGCUCCCCUUAUGCCA	
cons		*****	*****			cons		*****	

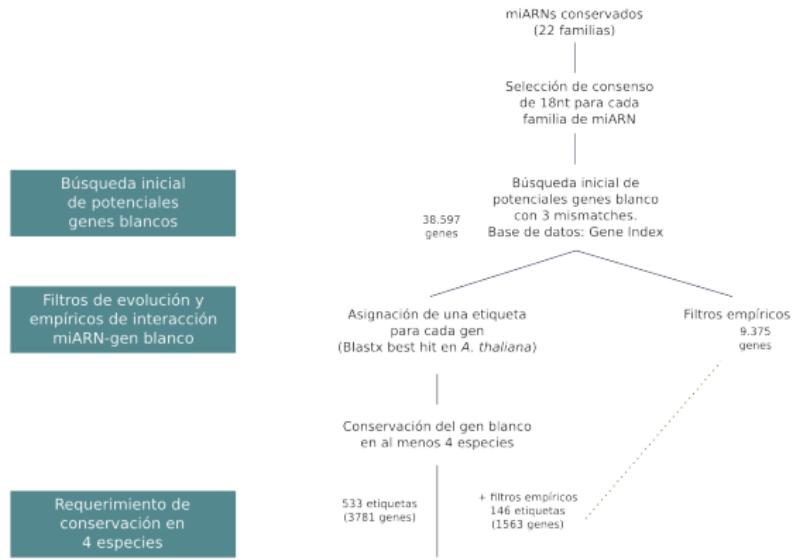
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



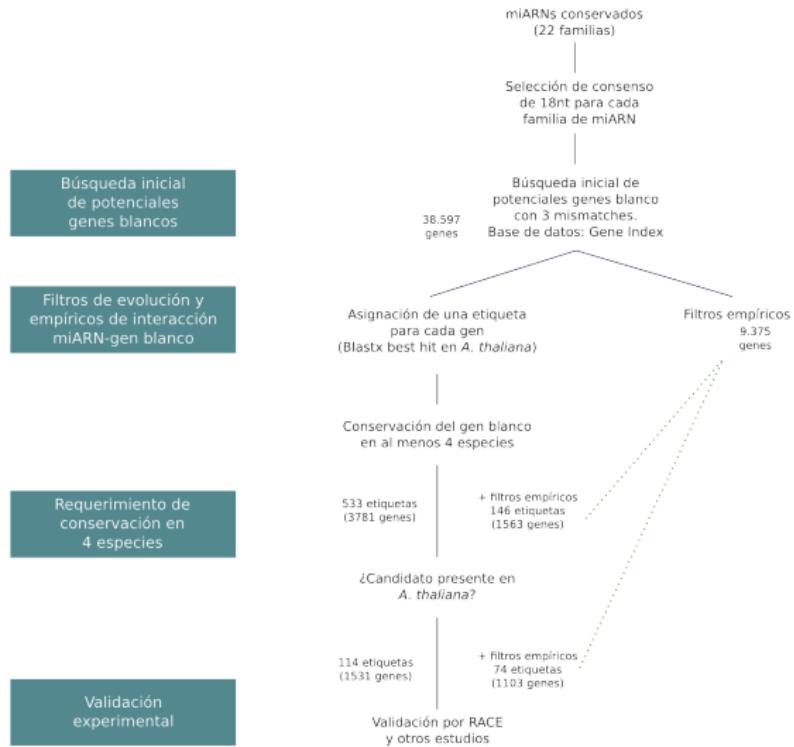
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



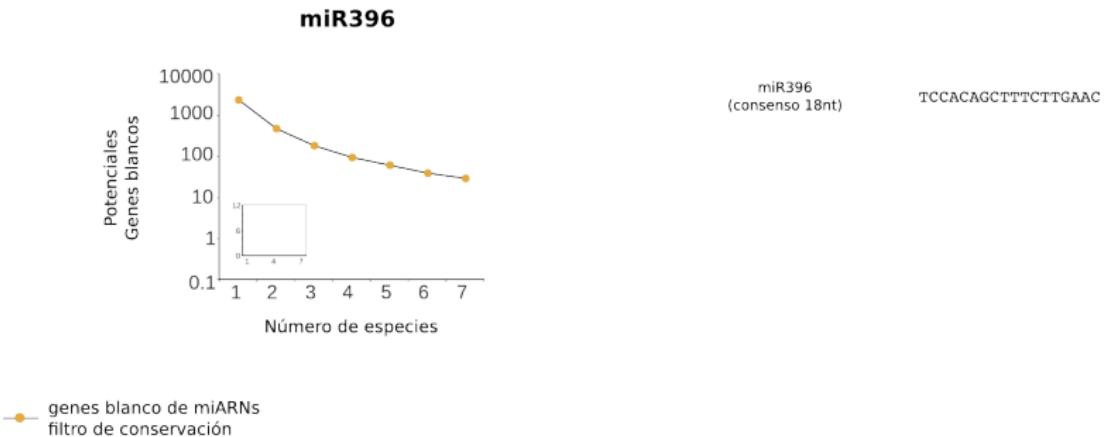
Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Esquema de la estrategia para la identificación de nuevos genes blancos



Conservación de la interacción en distintas especie

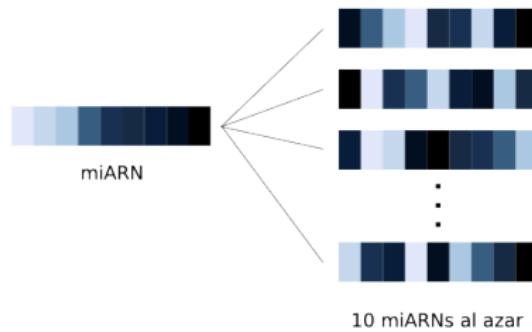


miARN consenso de 18 nt

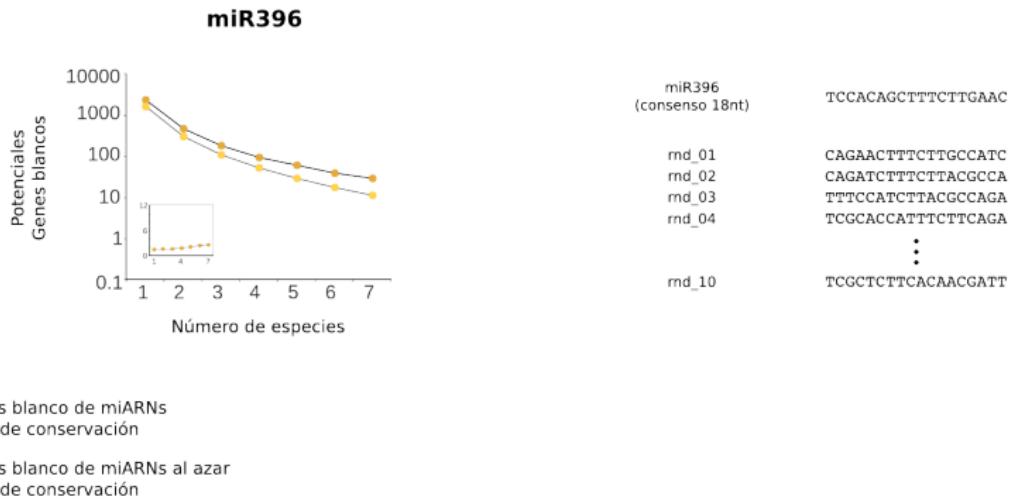


miARN

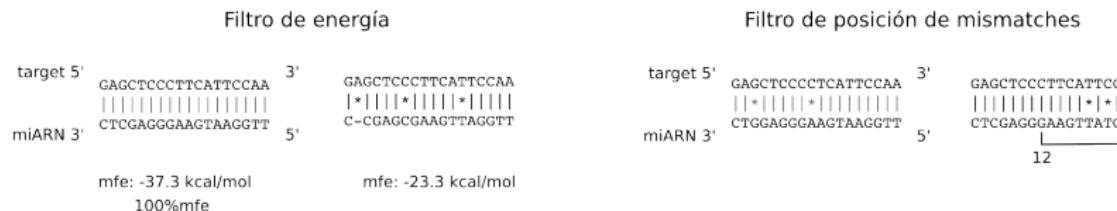
Control: miARN al azar



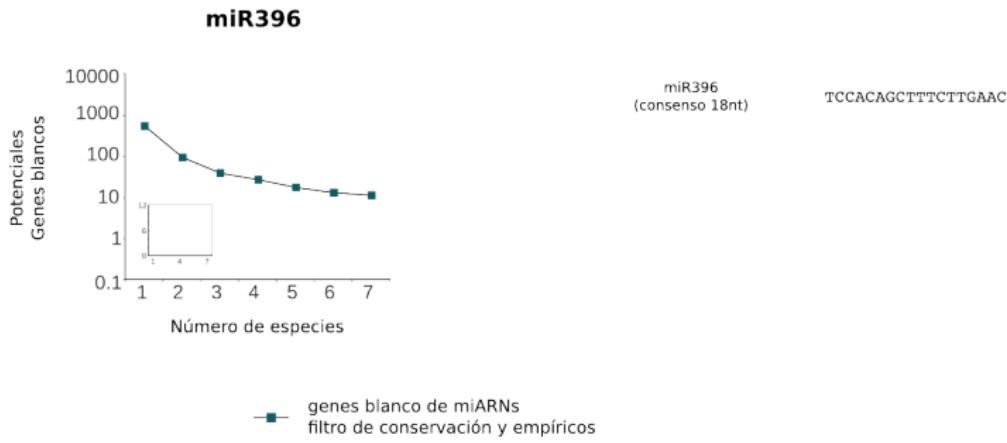
La relación señal/ruido incrementa al aumentar el número de especies



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

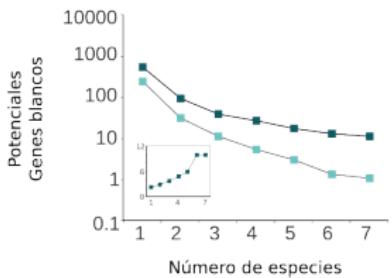


Selección de candidatos teniendo en cuenta los filtros empíricos



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

miR396

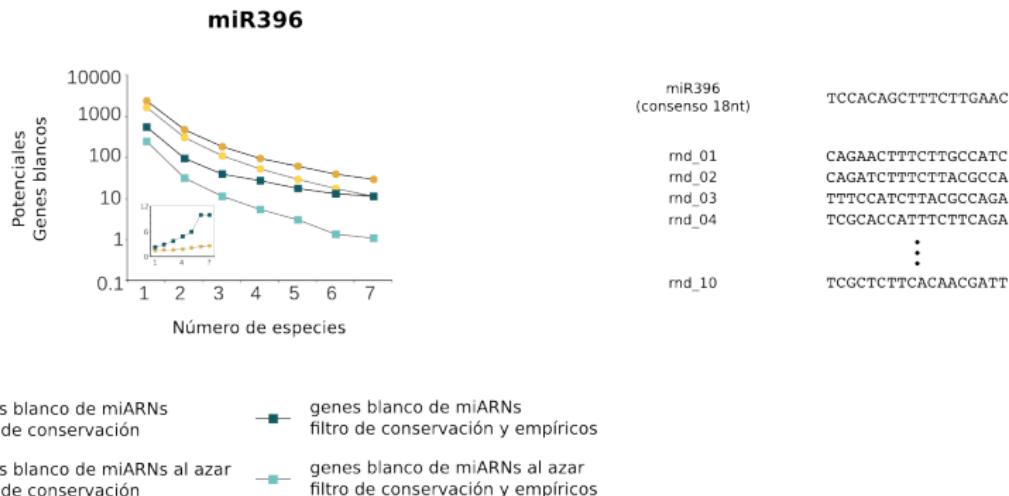


- genes blanco de miARNs
filtro de conservación y empíricos
- genes blanco de miARNs al azar
filtro de conservación y empíricos

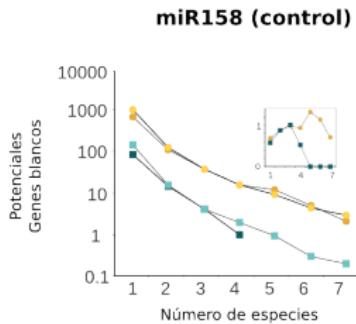
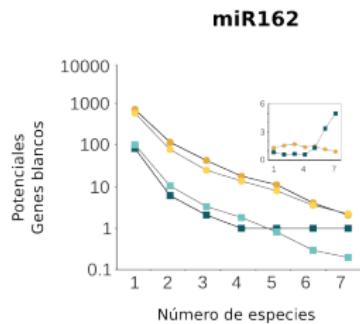
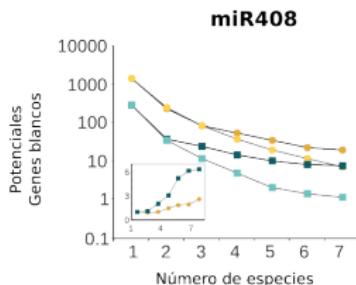
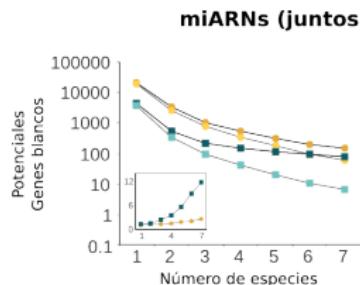
miR396
(consenso 18nt)

TCCACAGCTTCTTGAAAC
CAGAACTTCTTGCATC
CAGATCTTCTTACGCCA
TTTCCATCTTACGCCAGA
TCGGCACCATTTCTTCAGA
•
TCGCTCTTCACAACGATT

Efecto sinérgico al combinar filtro de conservación evolutiva y empíricos

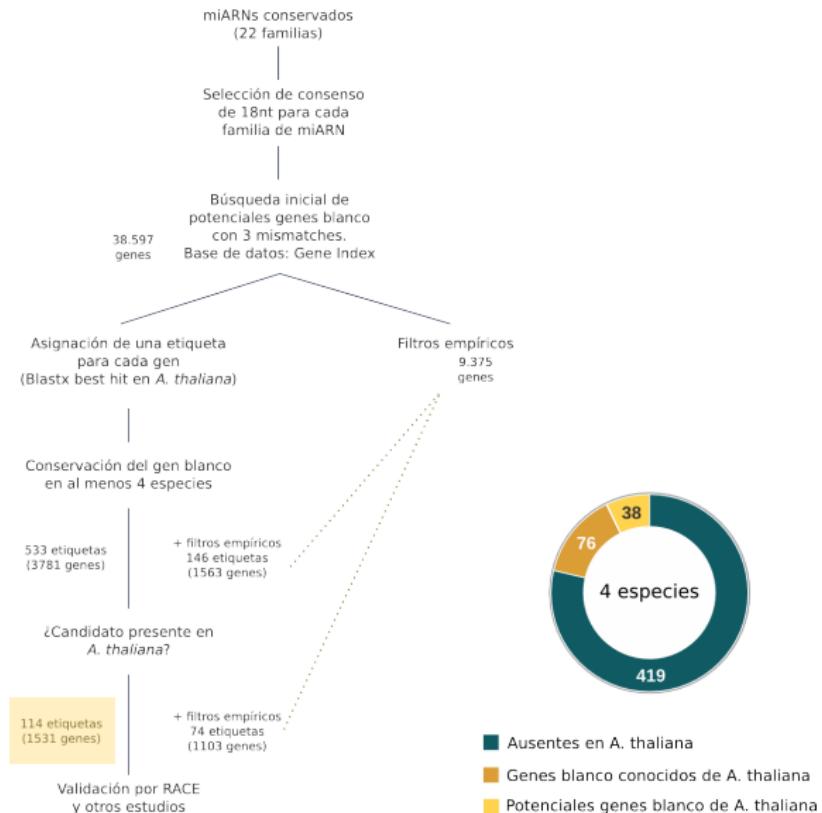


El número de genes blancos candidatos y la relación señal/ruido es variable entre los distintos miARNs



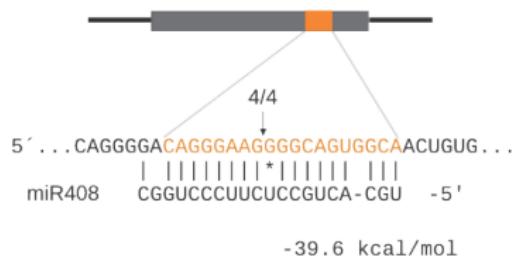
- genes blanco de miARNs filtro de conservación
- genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación
- genes blanco de miARNs filtro de conservación y empíricos
- ▲— genes blanco de miARNs al azar filtro de conservación y empíricos

Potenciales genes blancos utilizando solo conservación evolutiva



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

PAA2 (At5g21930)



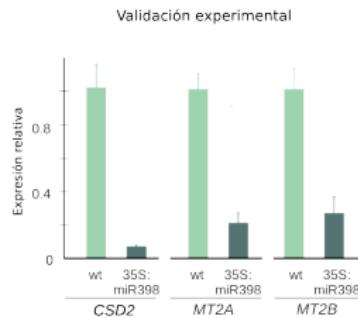
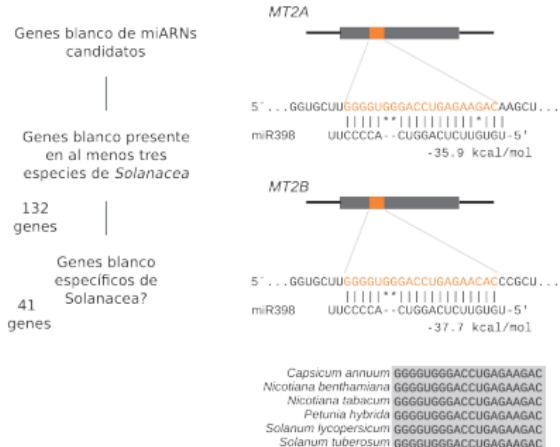
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAGGGAAAGGGGCAGUGGCA
<i>Capsicum annuum</i>	CAGCGAAGAACGUUGCA
<i>Glycine max</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Gossypium raimondii</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Haseolus vulgaris</i>	UAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Ipomoea nil</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA
<i>Lactuca sativa</i>	CAGGGAAAGAGGCAGUUGCA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

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

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	TTGACCCGTGCCAAATATC	fatores de transcripción GRAS
mir172	GAATCTTGATGATCTCG	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.

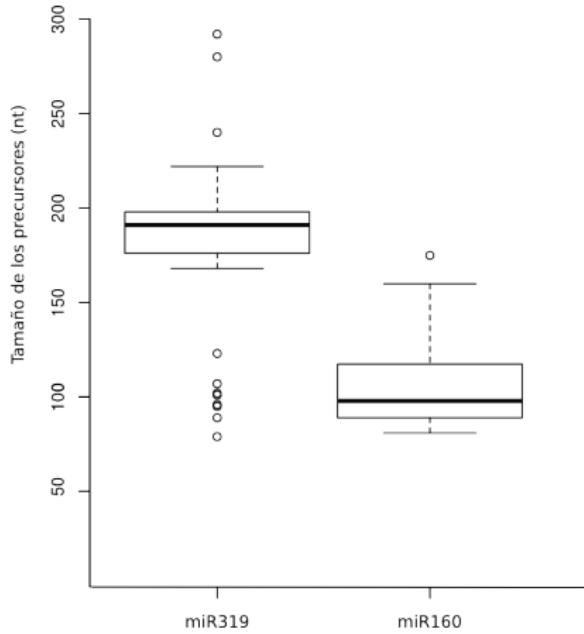
Objetivos específicos

- ▶ 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.

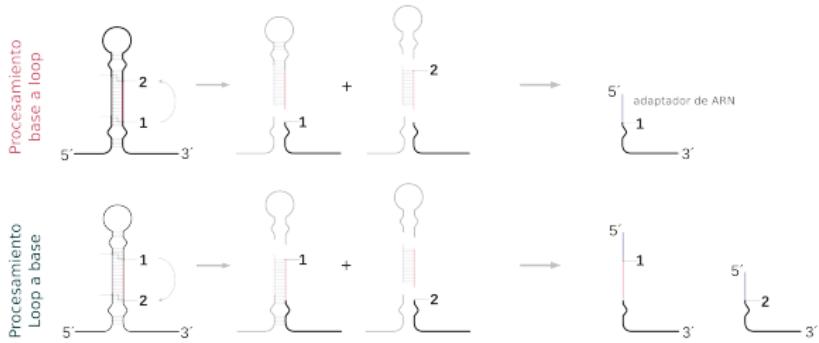
Precursos en plantas son muy variables en tamaño y forma



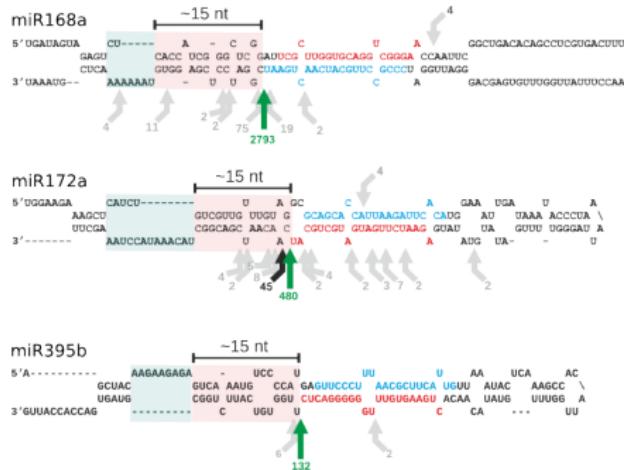
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



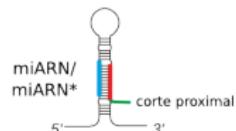
Bibliotecas SPARE para estudios genómicos de biogénesis de miARNs en plantas



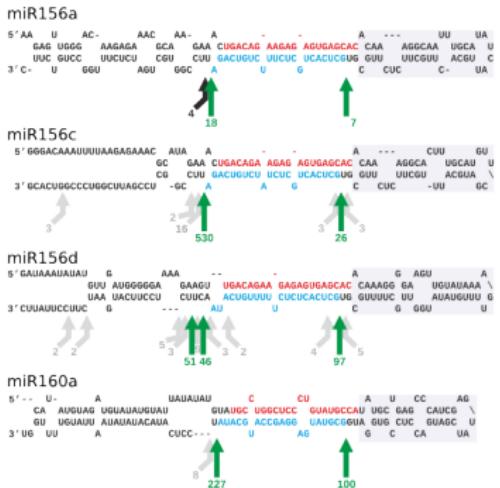
Los precursores que se procesan desde la base tienen un sólo pico de señal en las bibliotecas de SPARE



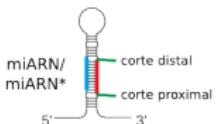
Detección solamente
del corte proximal



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



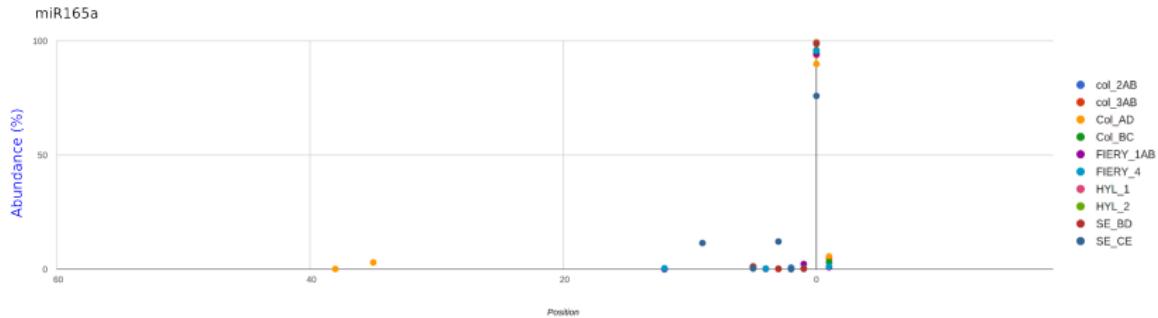
Detección de ambos cortes,
proximal y distal



Bibliotecas de SPARE

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

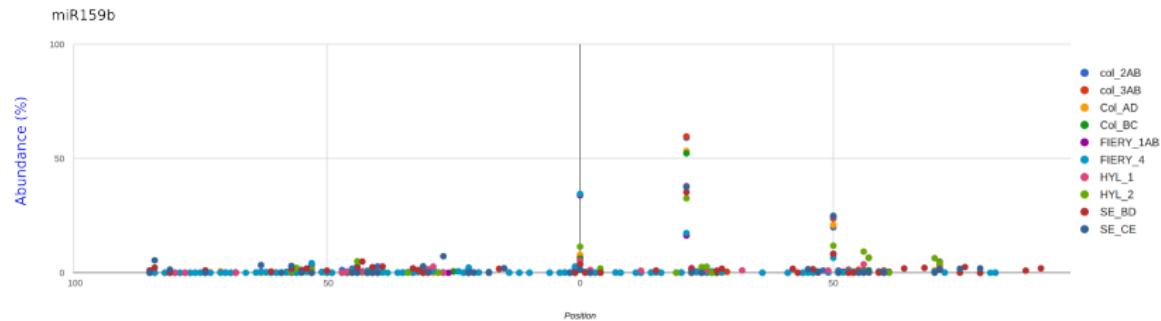
Visualización de precursores procesados desde la base



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



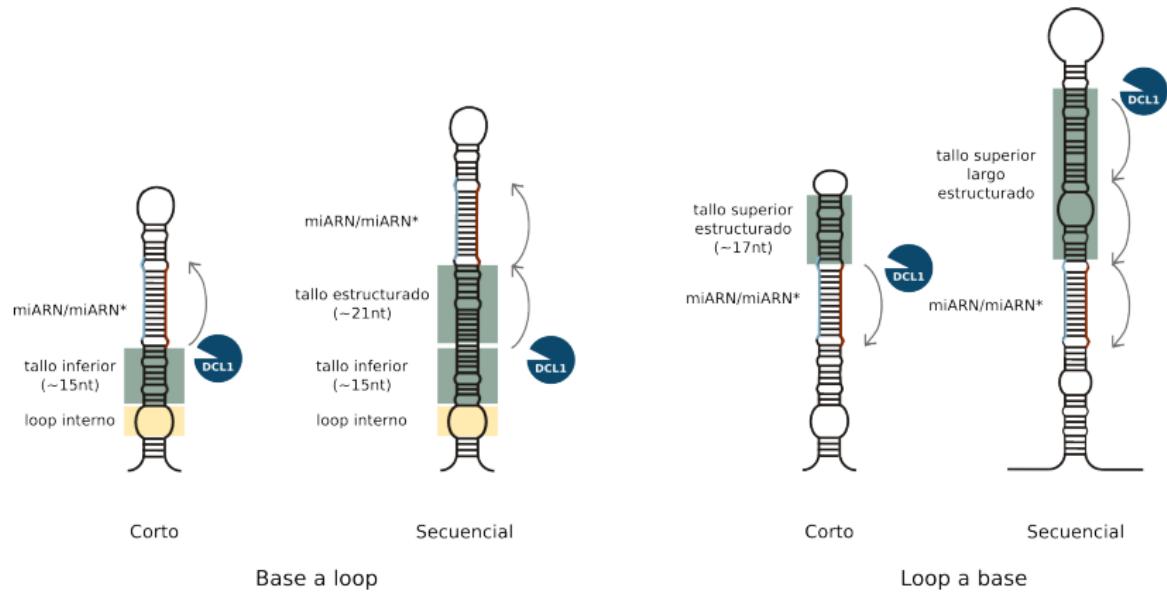
Visualización de precursores procesados desde el loop



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



Conclusiones II

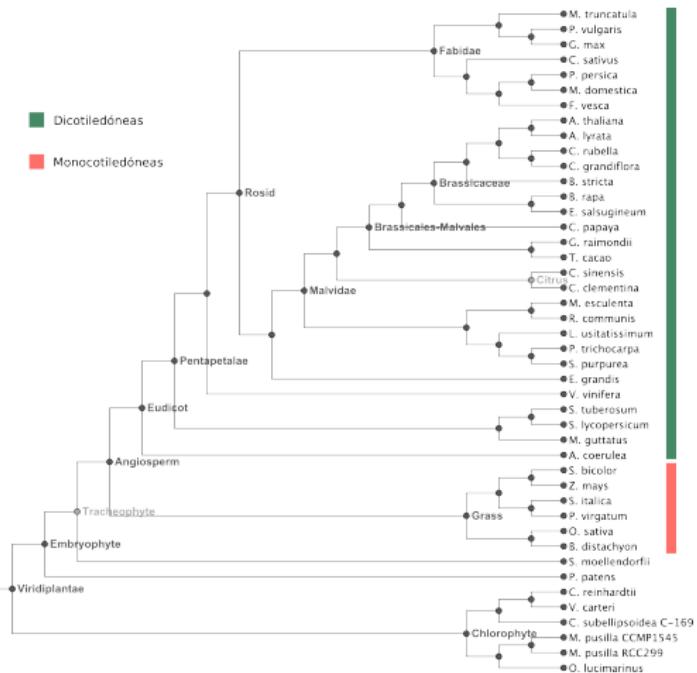


Objetivos específicos

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

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

Especies utilizadas de Phytozome (30 dicotiledóneas y 6 monocotiledóneas)



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

- ▶ Longitud de precursores.
- ▶ Definición de ortólogos

¿Cuál es el ortólogo en otras especies?

Arabidopsis	>ath-MIR160a GUAGUCUGCUCCGUUAUCCGUAAUAGCAGGCCAACGAGUAUUCGAUGACCUCCGGUGGAUGGGCGUAUGAGGAGCCAUGCAGCAAU >ath-MIR160b GUUCGUUGCCUGGUCCCUAUAUGCCACAAGAAAACAUCAUCGUUUAGUUUCAAAAUUCGAUCACUAGUGGCGUACAGAGGUAGUCAAGCAUGAC >ath-MIR160c GUUAUGCCUGGUCCCUAUAUGCCAGAGGUAAUCCGAUUUUGGUUUAUAAUCGGCUCGCCGUUAAGGGAGUCAAGCAUGAC
Arroz	>osa-MIR160a GUGUGCCUGGCUCGUUAUGCCACACAUGUAGACCAACCCAUUGGUUCUGGUUGCCUACUGGGGGCGUGCAAGGAGCCAAGCAUGCG >osa-MIR160b AAGGUUUGGUUUGGUAGUCGGCUUGAGGGUGCUGGCCUCCGUUAUGCCACUCAUGUAGCCAAUCCAUUGGUUGGUUJUGGAUGCGUGGGGGCGUGCAAGGAGCCAAGCAUGCG >osa-MIR160c GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUGCCACAUCAUAGAGCAACAAUCUCUGCGAGAGGUUGCCUAUGAUGGUUGGCGUGCACGGAGCCAAGCAUAUCC >osa-MIR160d GGAAUUGUGCCUGGUCCGUUAUCCACUUCGGUAGCCAAACAUCAUCAGUAGAAACAAUCUGCUUCUCCGGCGAGAUCAUGCAUJUGGUUGGUAGUUCUACUGGGGAUGGGCGUGGGAGGAGCCAAGCAUGGCC >osa-MIR160e GUAGGGGAUAUGCCUGGUCCGUUAUCCGUCAUGGGCUCGCAUGGUUGCCAAUAGAACUCAUCGUACUUCGUUGUUGGGCGUGCGUACGGGUGGCGAGCAUUGGCCUU >osa-MIR160f GGAUUAACCGCUGGUCCUGGUCCGUUAUCCGUACGGUAGCGUCCGUUGGGCGUGCUUCUCCGUUGGUAGGGAGUCAUGCAGGGGUJUGGUUC
Tomate	>Slv-MIR160a CAAGUCGUGUAACGUAAUAGCCUGGUCCGUUAUCCGUAAUAGGUAGGUAAUAAUAGGUAGGGGUUUGGUAGGGAGCCAAGCAUAUUCGAUUAUCGUUAUAGGUUG

Conservación de la secuencia primaria del miR172a en distintas especies

	BAD	AVG	GDD0	U	C	S	C
Alvareza	AG	UABAU	UCC	GGG	G	US	
Motomestica	BR	AUAG	UAB	AG	RD	US	
Urtica	BR	UAB	AG	RD	US	GRD	
Silicoperis							
Bryopippsc	AG	CBAC	GGG	AA	AA	U	
Urticaria	BR	GGG	AA	AA	AA	U	
Cypradiflo	AG	UABAU	UAC	AA	CC	CC	
Urticaria	BR	UABAU	UAC	AA	CC	CC	
Ptilimensis							
Lutistatia							
Urticaria	BR	GGG	AA	AA	AA	AA	
Gmax	CA	DAU	AG	AA	AA	U	
Vvinifera							
Urticaria	BR	GGG	AA	AA	AA	AA	
Spurpurea	AG	DAABA	AG	AA	AA	U	
Urticaria	BR	DAABA	AG	AA	AA	U	
Cstavtus	AG	DAABA	AG	AA	AA	U	
Acervaria	A	ACACUCA	GGG	AA	AA	U	
Urticaria	BR	GGG	AA	AA	AA	U	
Mgutatus	AG	DAU	AG	AA	AA	U	
Urticaria	BR	DAU	AG	AA	AA	U	
Capapay	AG	UUDU	GGG	AA	AA	U	
Athelia	AG	UABAU	GGG	AA	AA	U	
Tecocao	AG	UABAU	GGG	AA	AA	U	
Chacarac	AG	UABAU	GGG	AA	AA	U	
Pvalmaris							
Draimondii							
Agave	AG	UCC	GGG	AA	AA	U	
Stuberosem							
cons							

ANSWER

[CODE](#)

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

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.



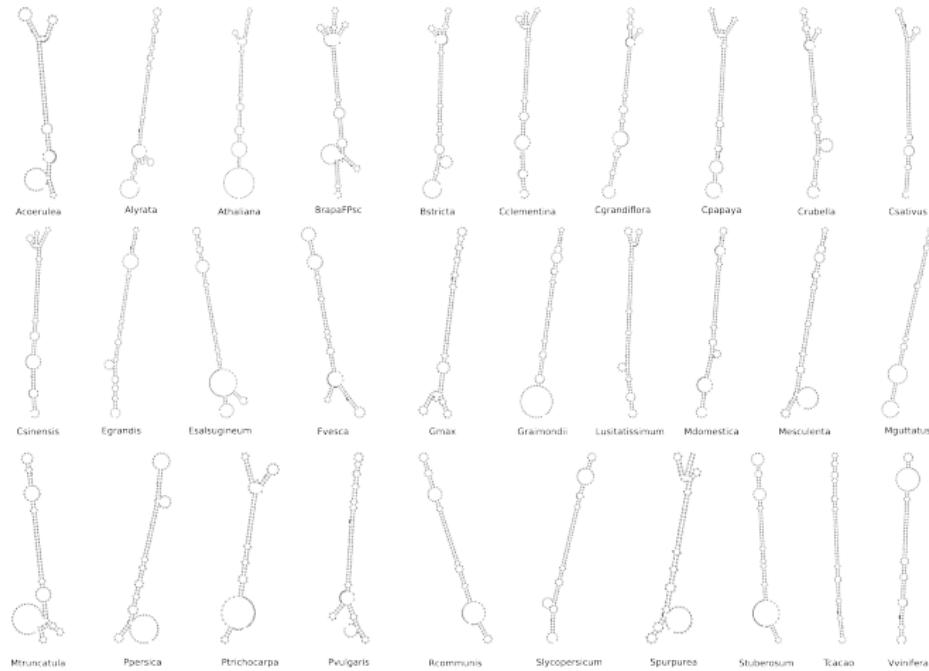
cons

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

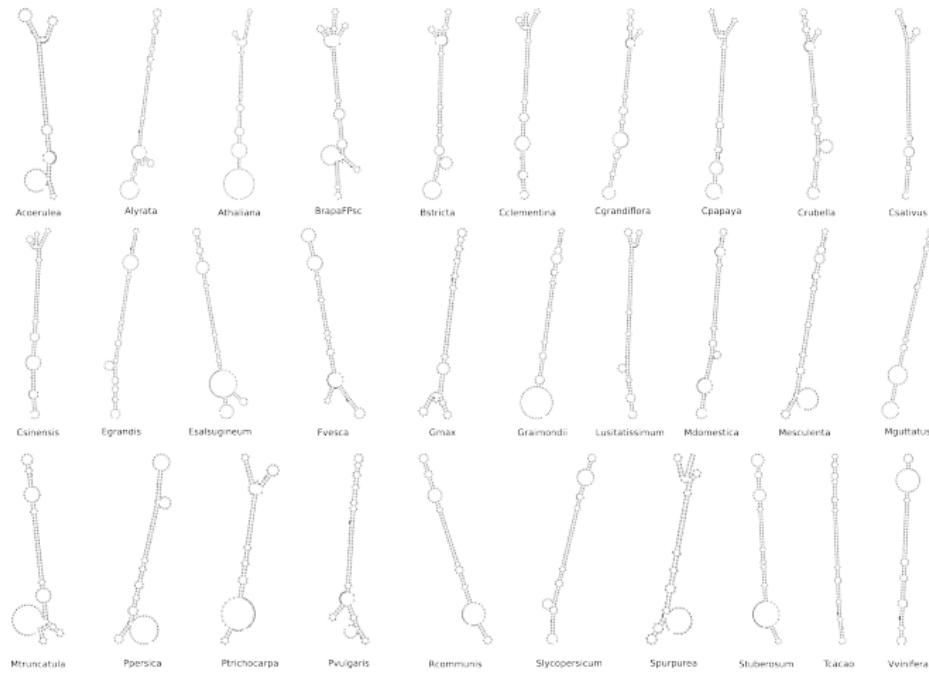
ANSWER

© 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*

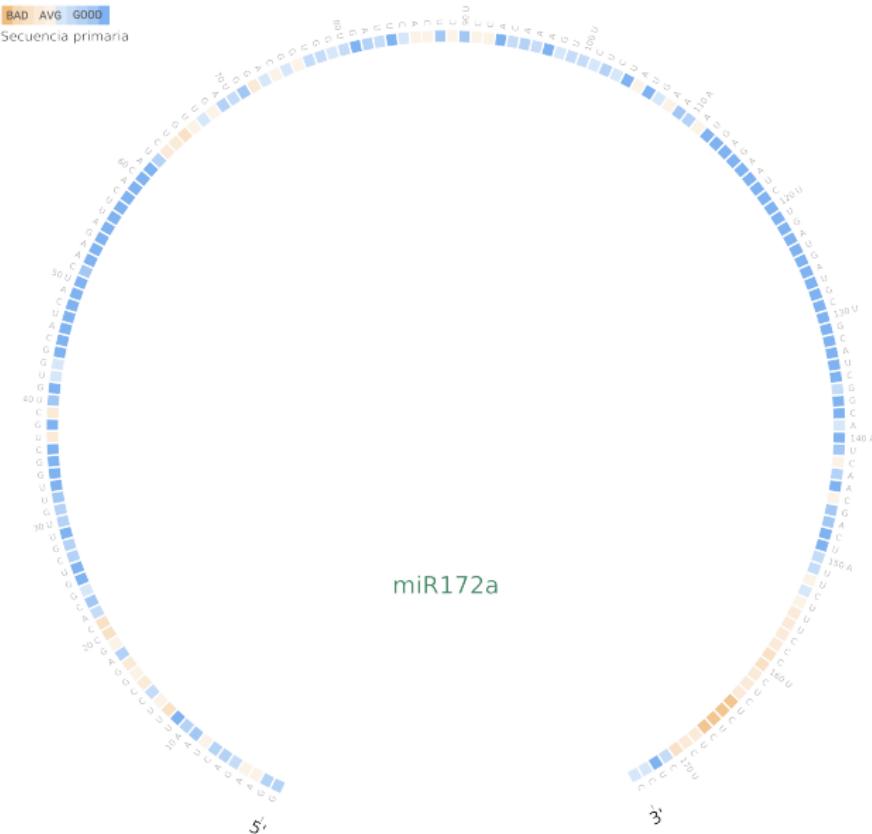


Existe un patrón estructural que comparten los precursores, en la región inmediata por debajo del dúplex miARN/miARN*

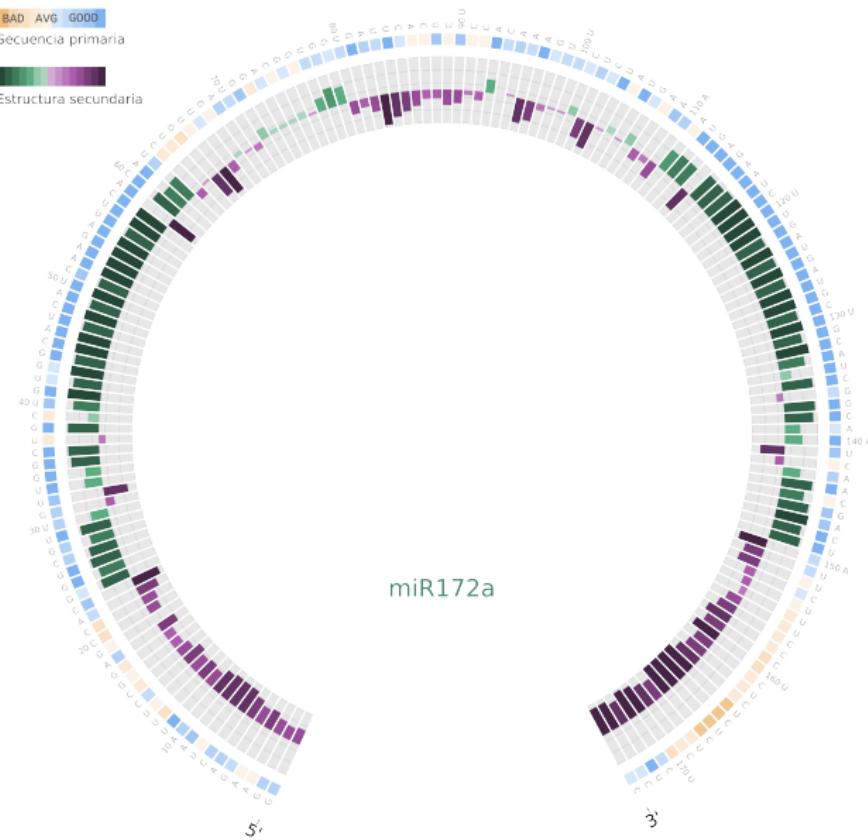


No es trivial deducir información concreta a partir de estas figuras.

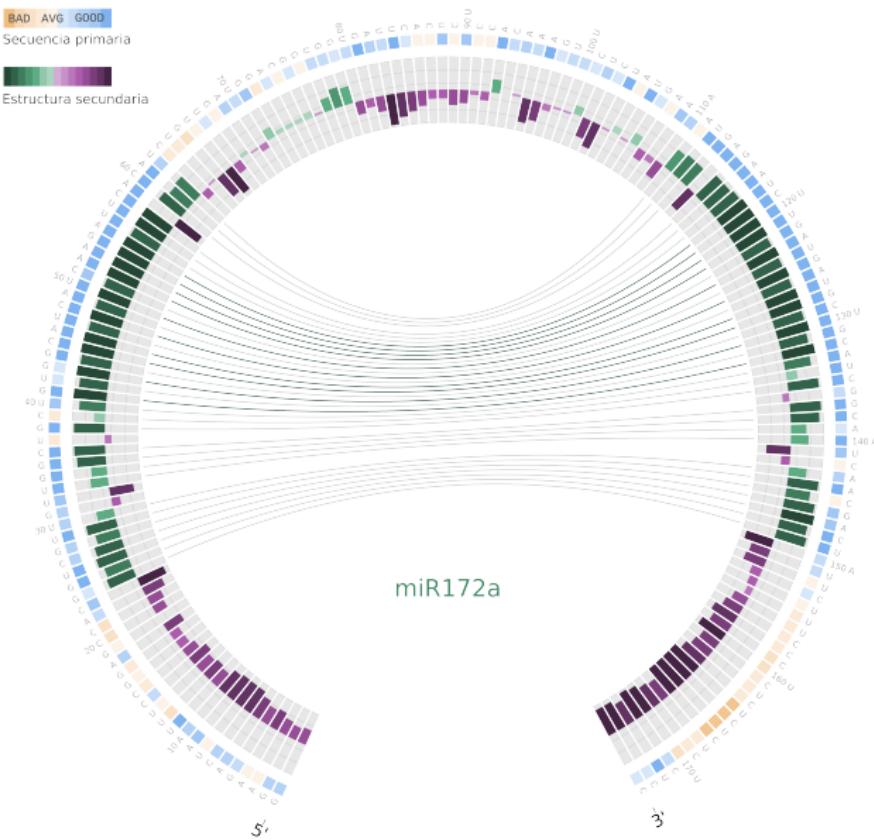
Conservación del consenso en base al alineamiento de secuencia primaria



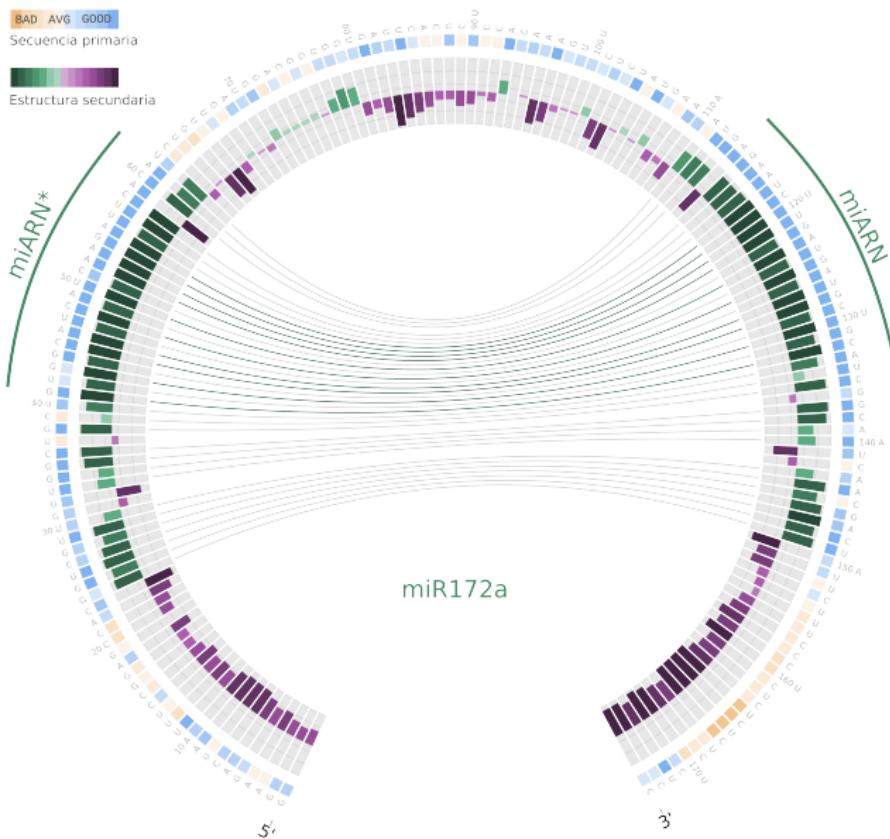
Frecuencia de bases apareadas y desapareadas



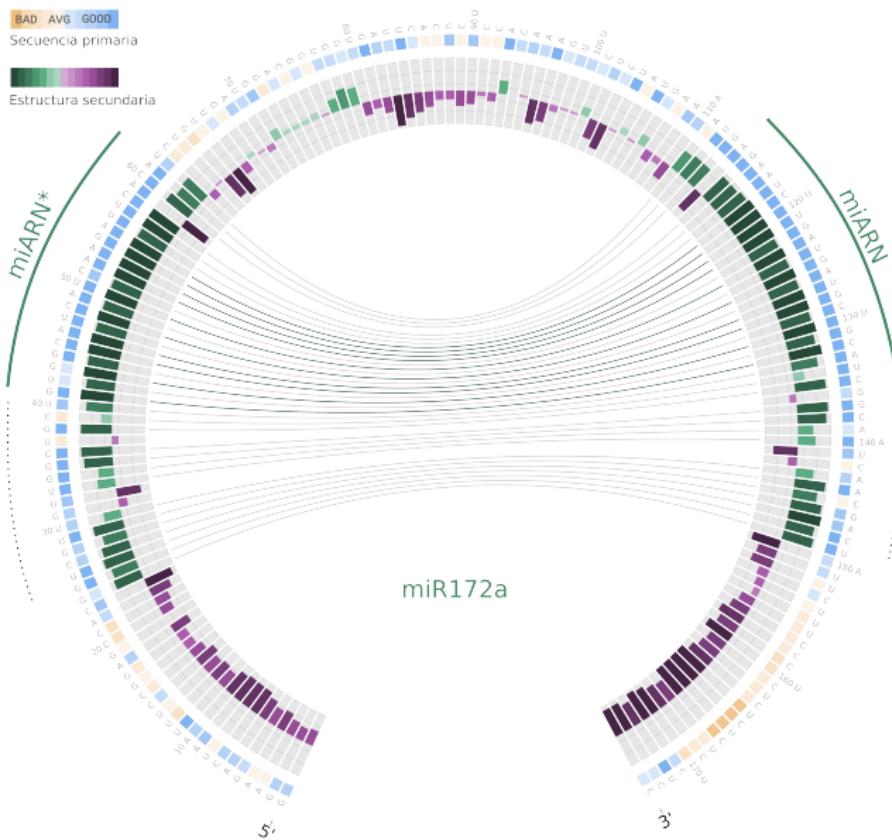
Interacción entre pares de bases considerando estructura secundaria



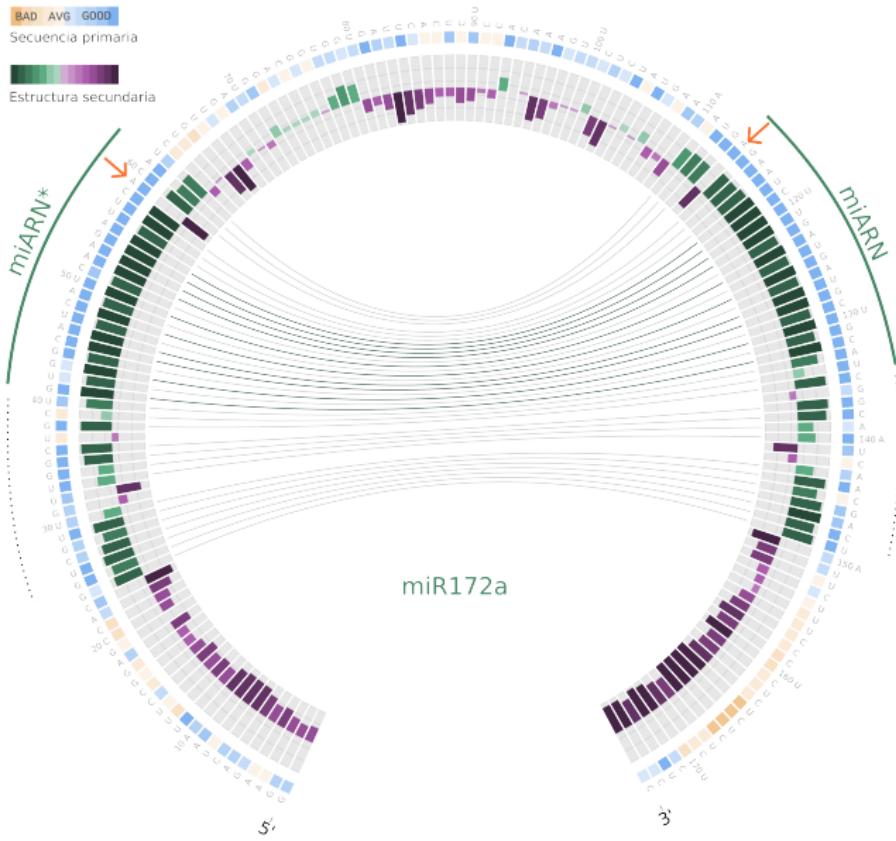
miARN y miARN* conservados en secuencia primaria y estructura



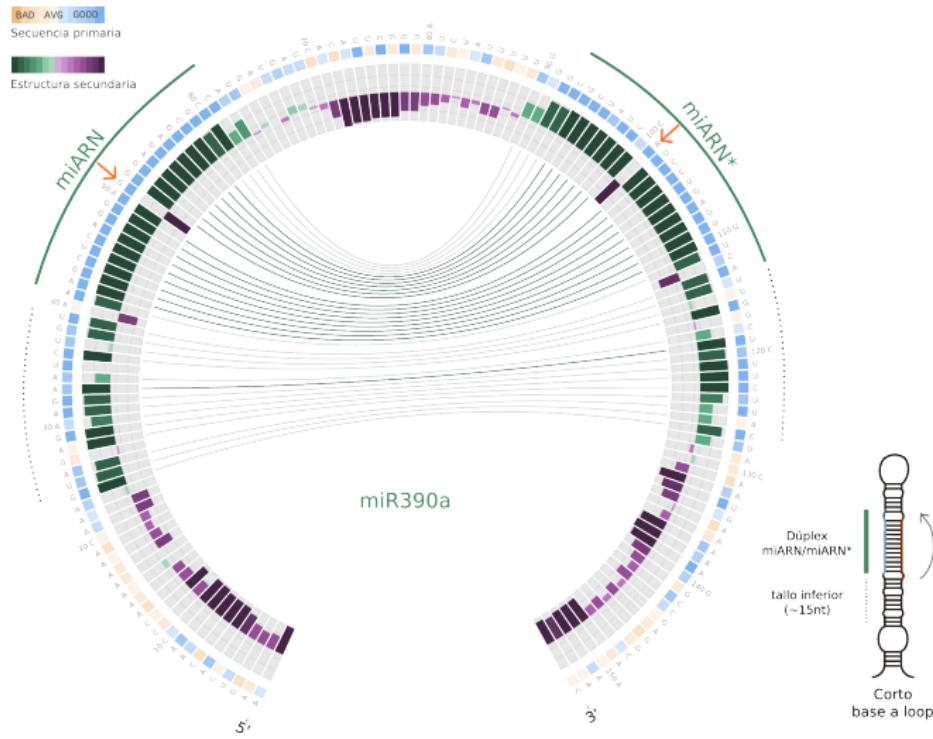
Región conservada por debajo del dúplex que coincide con el tallo inferior



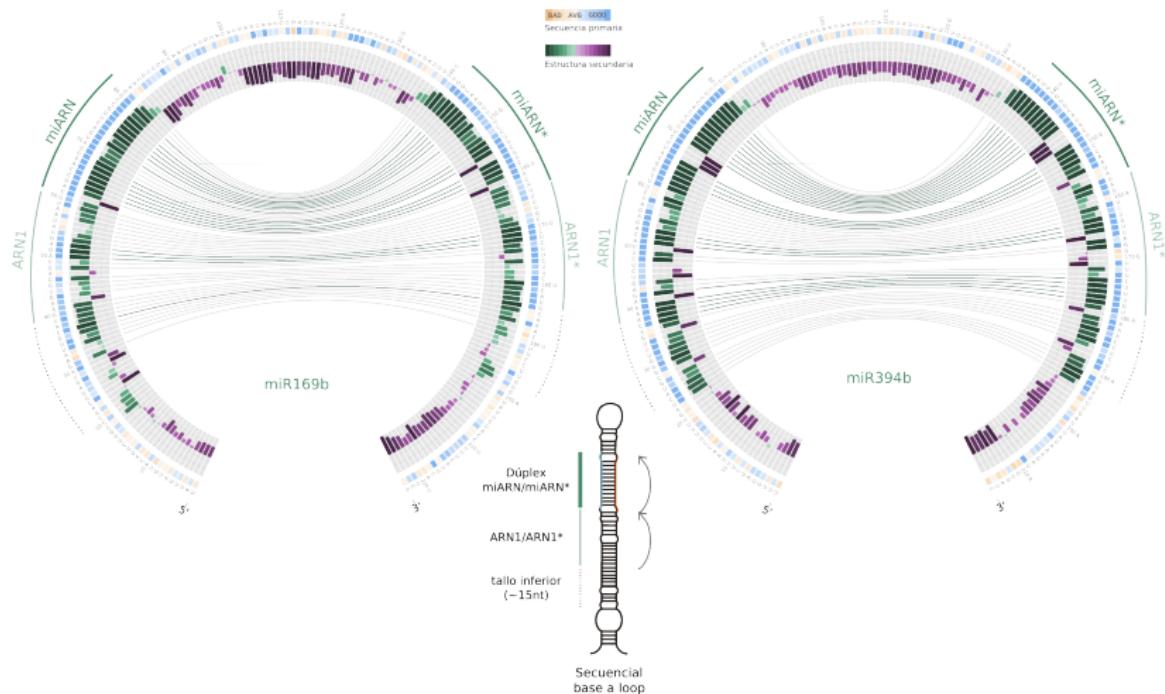
Mismatches conservados



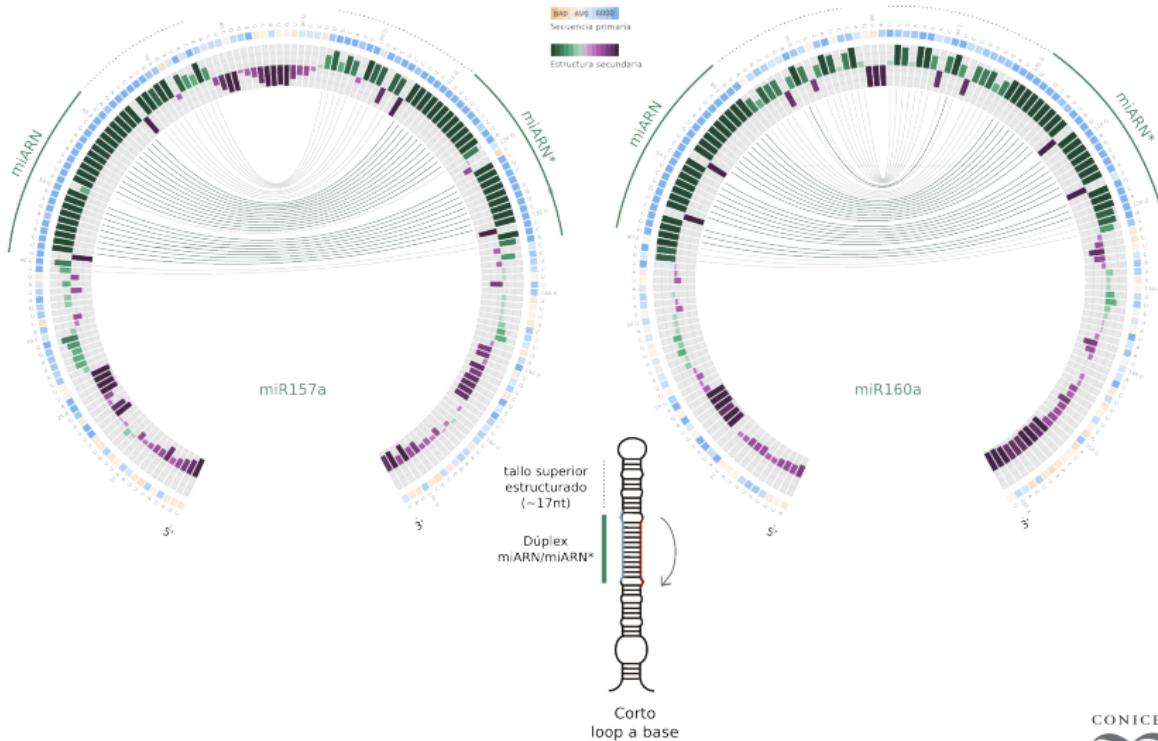
Mismo patrón de conservación en otros precursores que se procesan desde la base



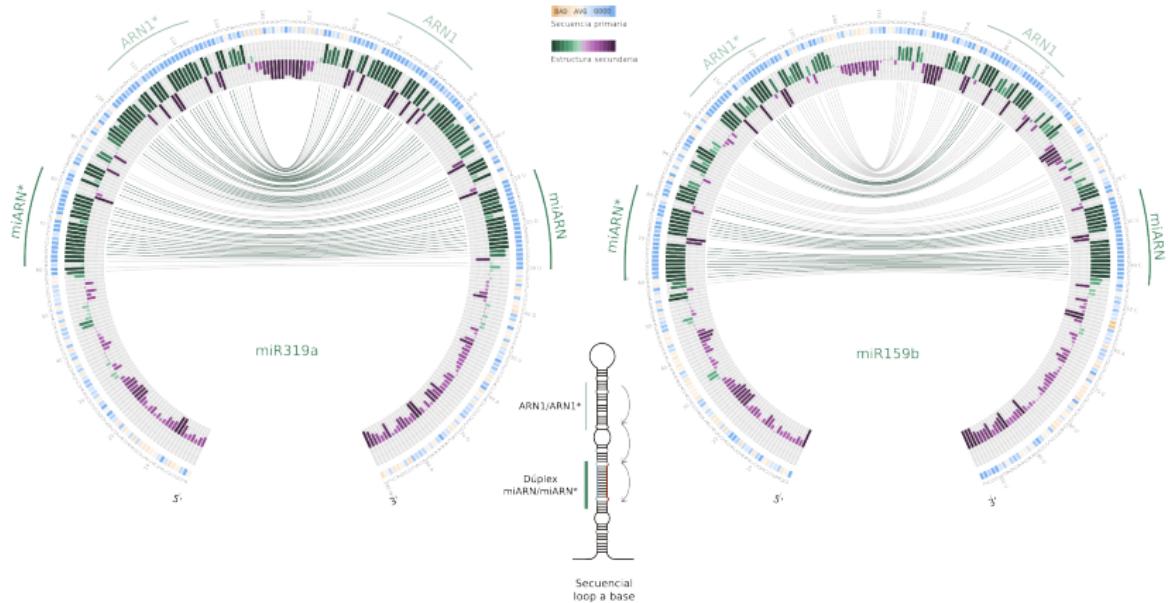
Precursors que se procesan desde la base en forma secuencial



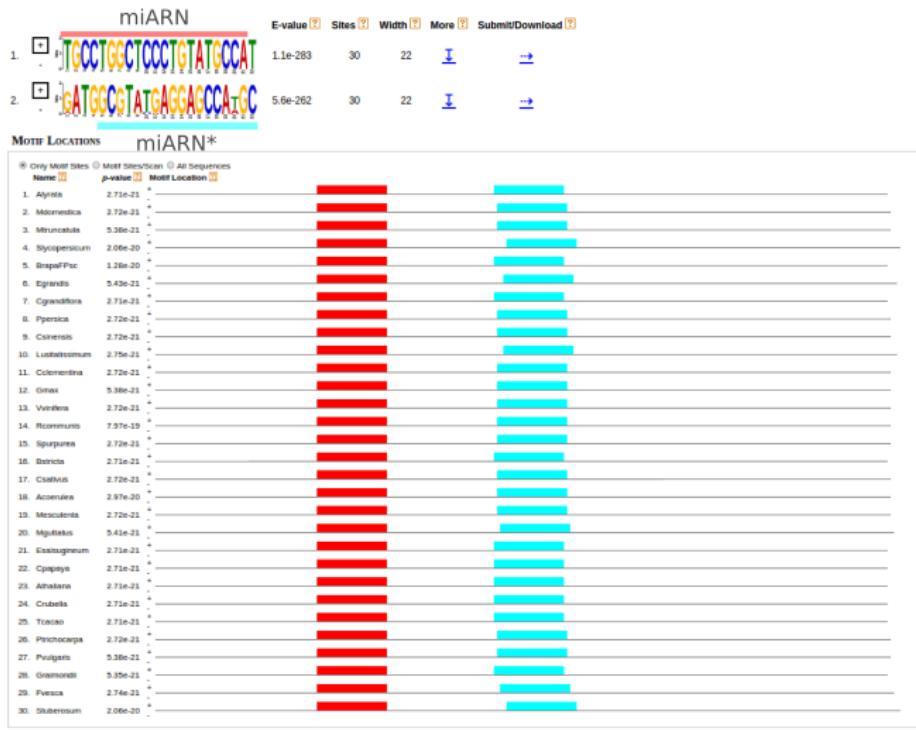
Precursors que se procesan desde el loop cortos



Precursors que se procesan desde el loop en forma secuencial



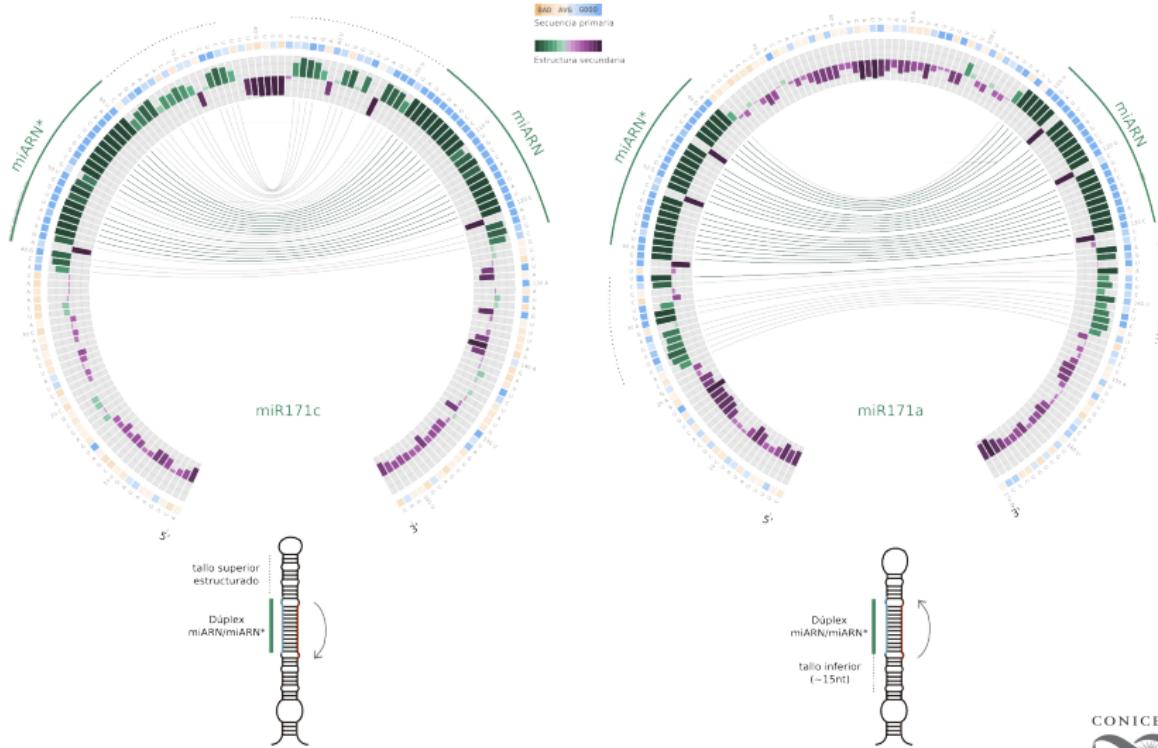
En precursores que se procesan desde el loop, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop no varía en distintas especies



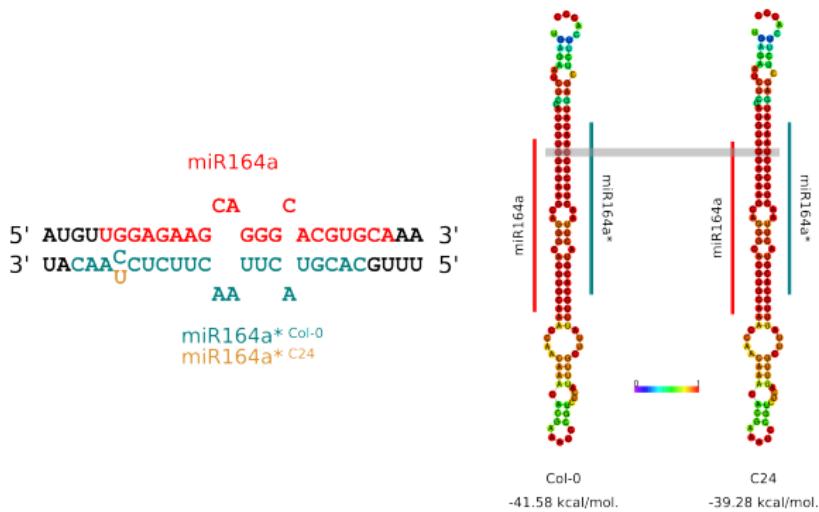
En precursores que se procesan desde la base, el tamaño de la región que comprende al tallo superior y al loop es muy variado en distintas especies



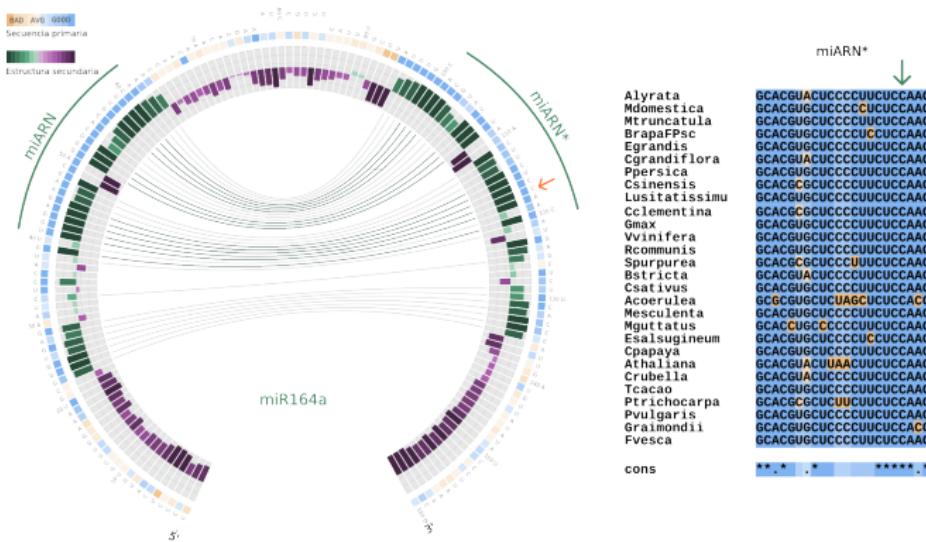
Procesamiento mixto de miembros de la familia del miR170/miR171



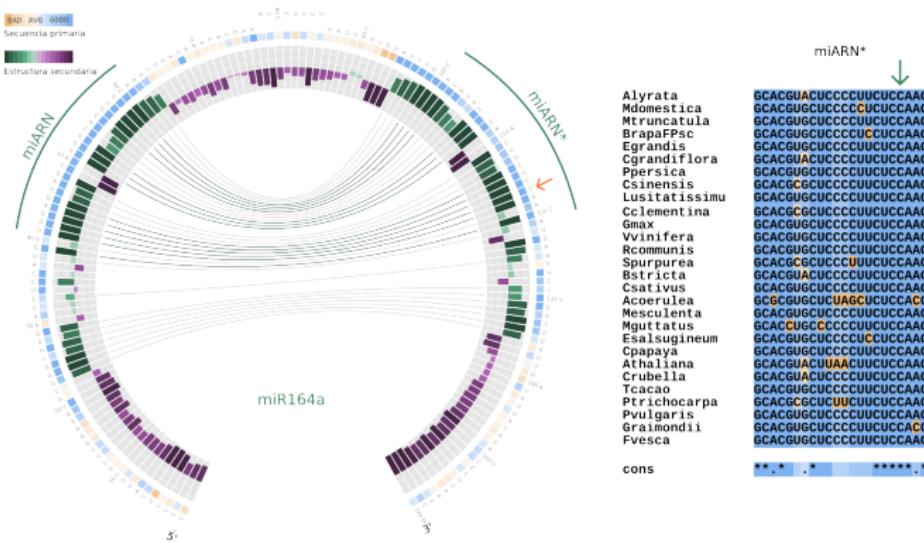
Mutaciones puntuales que afectan el procesamiento de miARNs en plantas



Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

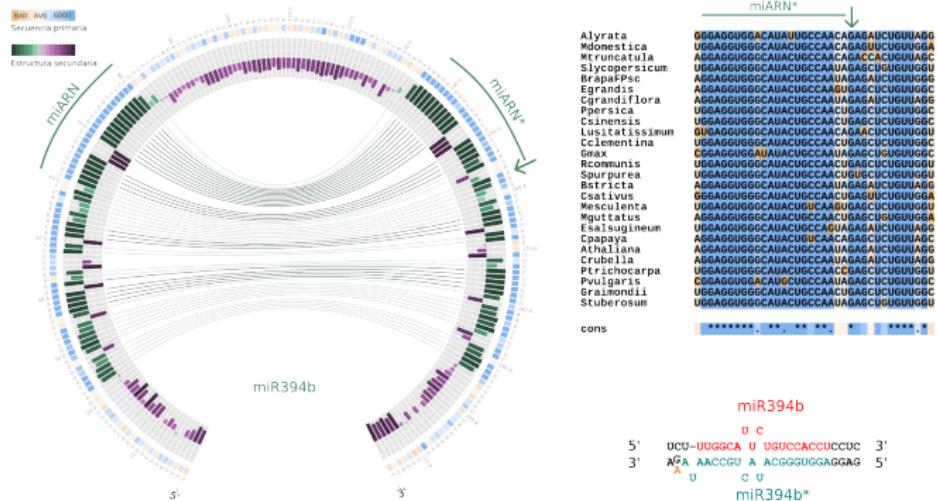


Posición *2 del miR164a* está conservada en dicotiledóneas

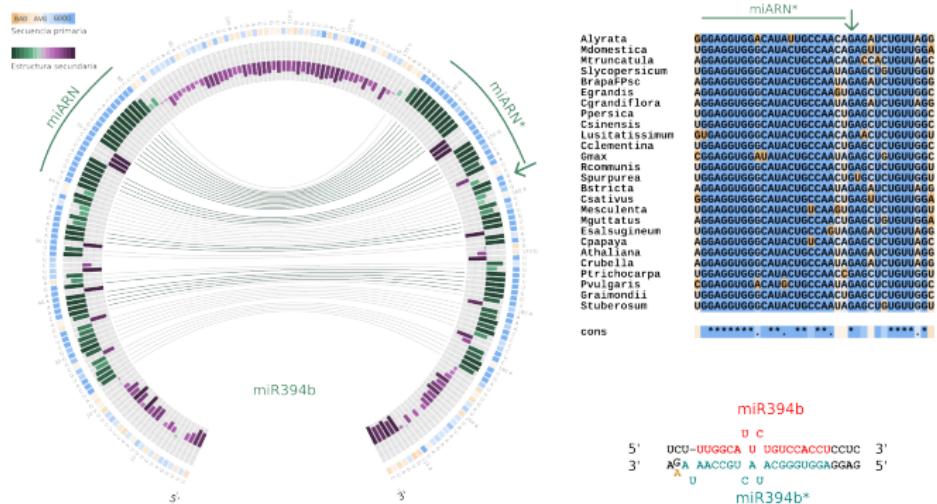


La posición *2 es importante para la estabilidad del precursor y su buen procesamiento.

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

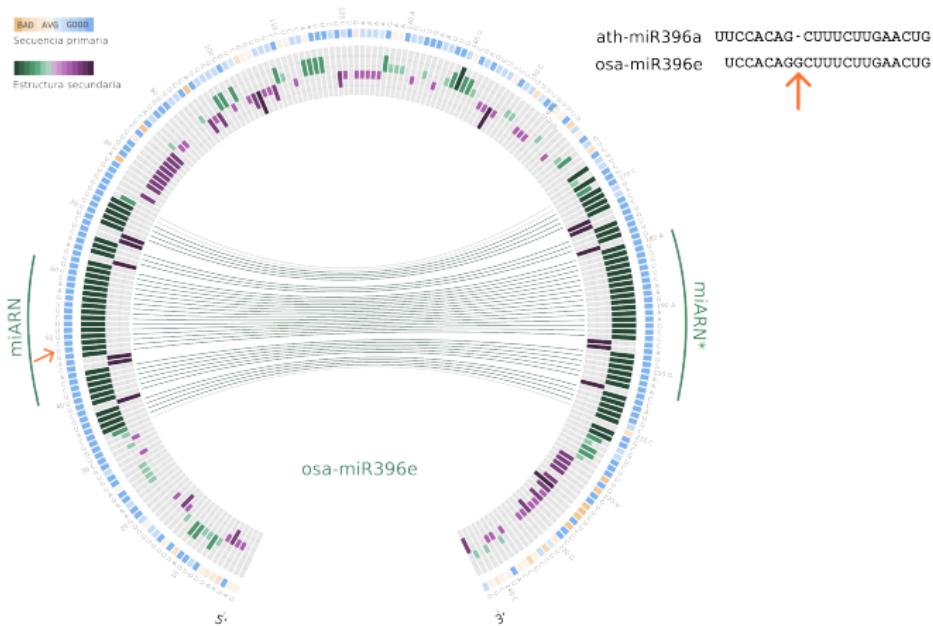


Alelo mir394b-1 con un “mismatch” en el tallo inferior del precursor del miR394b

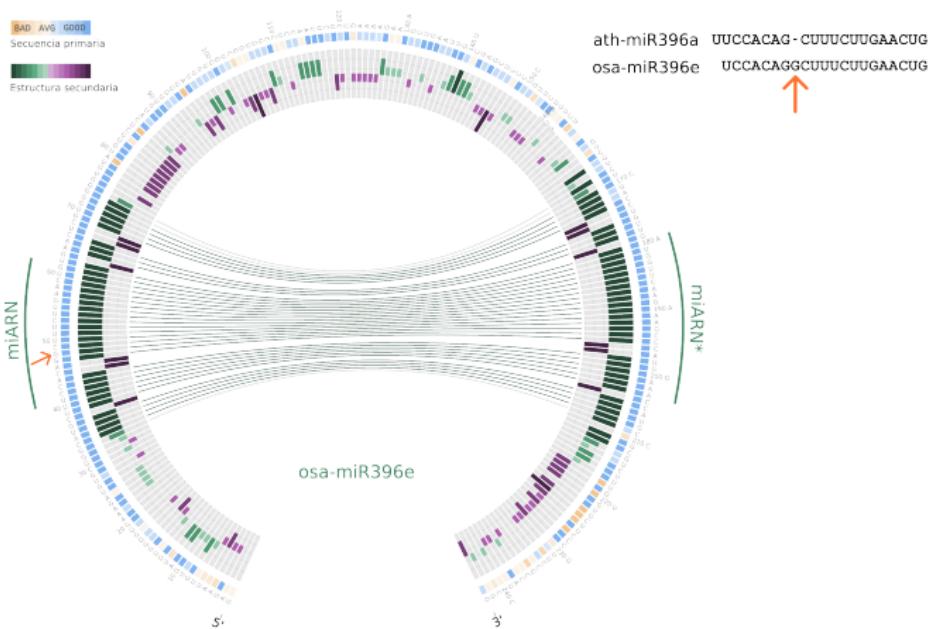


Mutaciones simples en el precursor puede afectar el reconocimiento de DICER.

Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



Variante del miR396 específica de monocotiledóneas



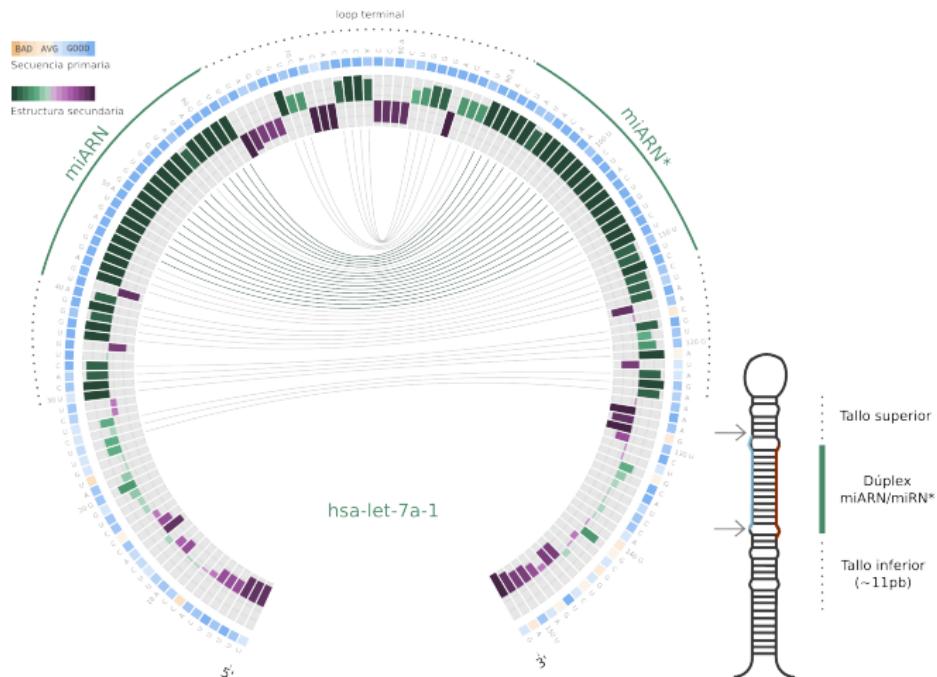
El nucleótido extra, que le da identidad a la variante de monocotiledóneas, está conservado.

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

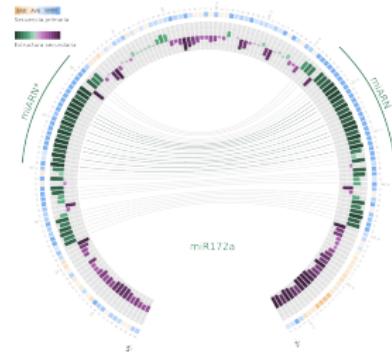
Animales

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

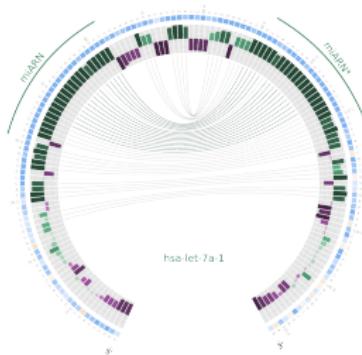
El loop terminal está conservado en la mayoría de los precursores de animales estudiados.



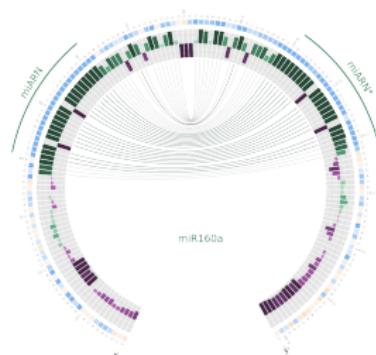
Circos animales vs plantas



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.

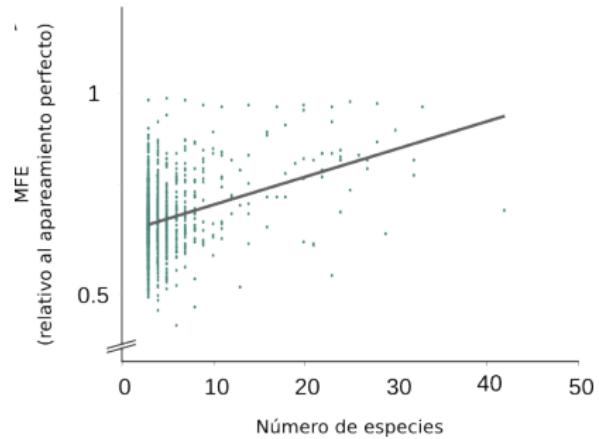
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.

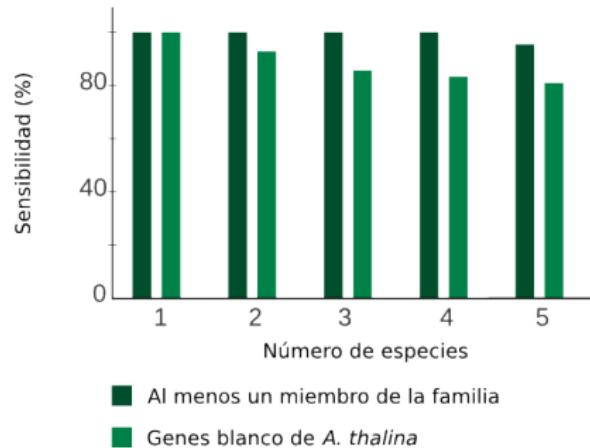
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.

- ▶ 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.

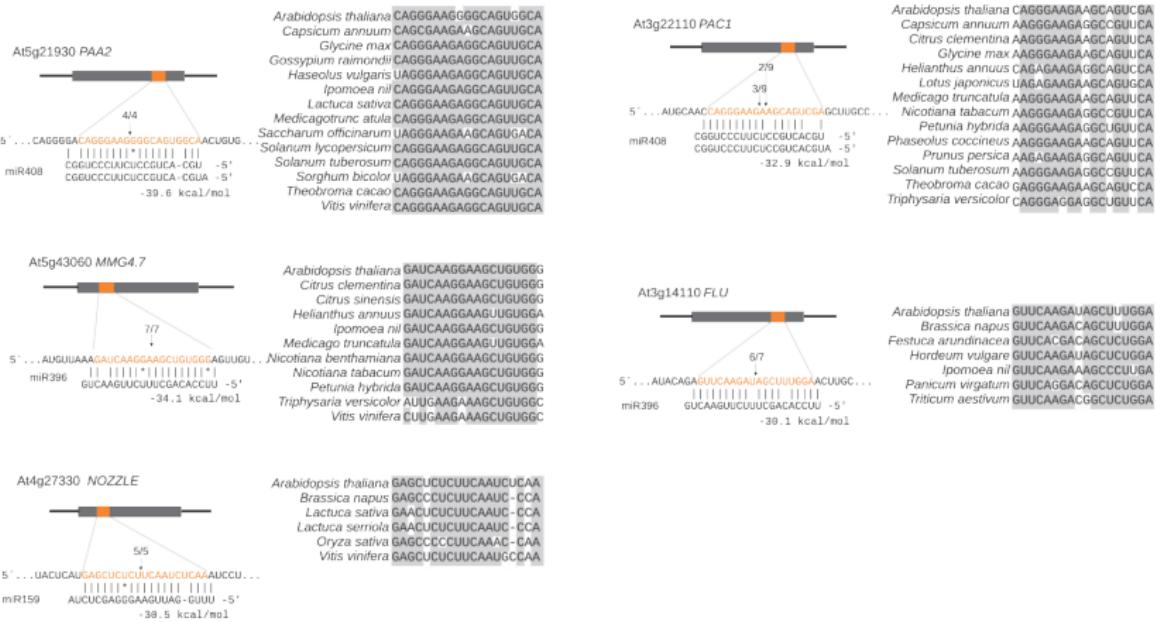
- ▶ Desarrollamos aplicaciones bioinformáticas para el estudio de interacciones miARN-gen blanco.
- ▶ Encontramos determinantes mecanísticos del procesamiento de miARNs en plantas.
- ▶ Desarrollamos una herramienta para el análisis de bibliotecas de SPARE incluyendo una interfaz gráfica.
- ▶ Analizamos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

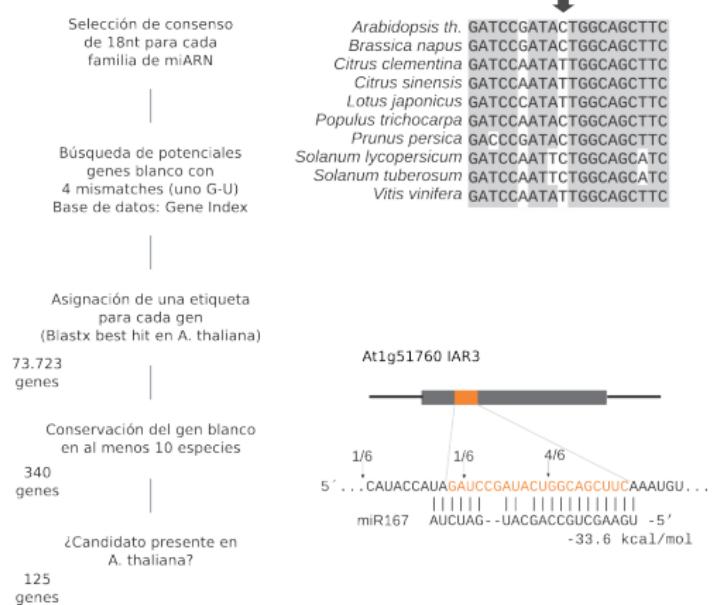




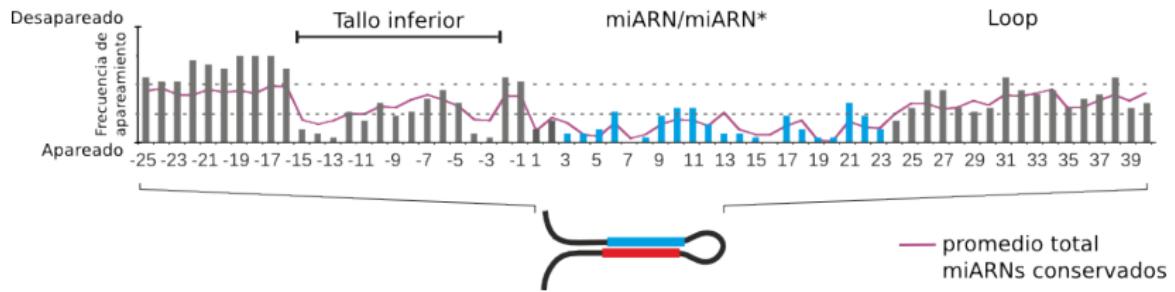
Nuevos genes blancos validados en *A. thaliana*



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

