



Universidad Miguel Hernández de Elche

**El gen *MAS2* de *Arabidopsis*  
es esencial, codifica una proteína ortóloga de las  
NKAP animales y participa en el silenciamiento del  
ADN ribosómico 45S**

Ana Belén Sánchez García

Elche, 2016



**El gen *MAS2* de Arabidopsis  
es esencial, codifica una proteína ortóloga de las  
NKAP animales y participa en el silenciamiento del  
ADN ribosómico 45S**



Trabajo realizado por la Licenciada Ana Belén Sánchez García, en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

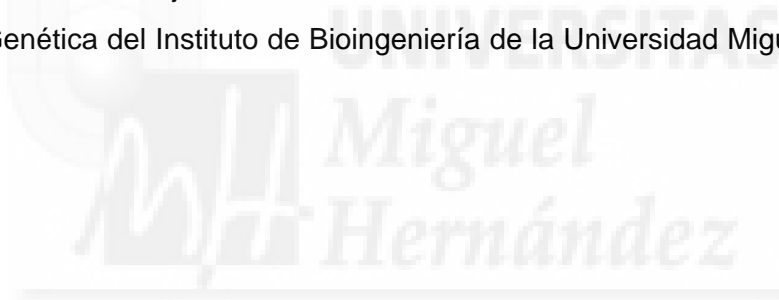
Elche, 24 de junio de 2016.



MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HAGO CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por la Licenciada Ana Belén Sánchez García para optar al Grado de Doctor. Las investigaciones reflejadas en esta Tesis se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



María Rosa Ponce Molet

Elche, 24 de junio de 2016.





Instituto de Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández

Avenida de la Universidad s/n  
03202 ELCHE (Alicante)  
Telf: 96 591 8817 - Fax: 96 522 2033  
e-mail: bioingenieria@umh.es

A quien corresponda:

**Eugenio Vilanova Gisbert**, Catedrático de Toxicología y Director del Instituto de Bioingeniería,

HACE CONSTAR:

Que da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Doña **Ana Belén Sánchez García**, titulada “**El gen MAS2 de Arabidopsis es esencial, codifica una proteína ortóloga de las NKAP animales y participa en el silenciamiento del ADN ribosómico 45S**”, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería de este Instituto, bajo la dirección de la profesora Dña. María Rosa Ponce Molet.

Lo que firmo en Elche, a instancias de la interesada y a los efectos oportunos, a veintitrés de junio de dos mil dieciséis.

Eugenio Vilanova Gisbert  
Catedrático de Toxicología  
Director del Instituto de Bioingeniería



Universidad Miguel Hernández





A mi familia

A Manuel Ginés

A Esperanza del Mar y Miriam





# ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
I.- PREFACIO .....	1
II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	3
III.- INTRODUCCIÓN .....	5
III.1.- Arabidopsis, un sistema modelo para el estudio de la biología vegetal .....	5
III.2.- Mecanismos de regulación de la expresión génica en los eucariotas .....	6
III.2.1.- Regulación transcripcional .....	7
III.2.1.1.- Regulación mediante factores de transcripción .....	7
III.2.1.2.- Regulación mediante marcas epigenéticas .....	7
III.2.1.2.1.- Modificación química de las histonas .....	8
III.2.1.2.2.- Metilación del ADN .....	9
III.2.2.- Regulación postranscripcional .....	9
III.2.2.1.- Silenciamiento génico mediado por ARN .....	9
III.2.2.2.- Maduración de los ARNm .....	13
III.2.2.2.1.- <i>Splicing</i> constitutivo y alternativo .....	13
III.2.2.2.2.- Funciones de las proteínas SR en el <i>splicing</i> .....	15
III.2.2.2.3.- Funciones de las hnRNP en el <i>splicing</i> .....	18
III.3.- Biogénesis del ribosoma citoplásmico de Arabidopsis .....	21
III.3.1.- Componentes del ribosoma citoplásmico de los eucariotas .....	21
III.3.2.- Organización y expresión del ADNr de Arabidopsis .....	21
III.4.- Las proteínas multifuncionales NKAP .....	24
III.4.1.- Relación entre las proteínas NKAP y los ácidos nucleicos .....	24
III.4.2.- Funciones de la NKAP humana en el procesamiento del ARN .....	25
III.5.- Mecanismos de supresión genética .....	28
III.6.- Antecedentes y objetivos .....	30
III.6.1.- Aislamiento de alelos <i>ago1</i> hipomorfos .....	30
III.6.2.- Búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de <i>ago1-52</i> .....	31
III.6.3.- Objetivos .....	32
IV.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN .....	35
V.- PUBLICACIONES .....	45
VI.- ANEXO: COMUNICACIONES A CONGRESOS .....	95
VII.- AGRADECIMIENTOS .....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Mecanismos de represión génica mediante metilación del ADN.....	10
<b>Figura 2.-</b> Árbol filogenético de las proteínas AGO de las plantas.....	12
<b>Figura 3.-</b> Patrones de <i>splicing</i> alternativo.....	14
<b>Figura 4.-</b> Estructura de un intrón de tipo U2 .....	15
<b>Figura 5.-</b> Mecanismo del <i>splicing</i> de los pre-ARNm por el spliceosoma de tipo U2 .....	16
<b>Figura 6.-</b> Interacciones de las proteínas SR en los exones de tipo U2 durante la formación del complejo E del spliceosoma.....	17
<b>Figura 7.-</b> Mecanismos de regulación del <i>splicing</i> mediados por hnRNP .....	20
<b>Figura 8.-</b> Localización cromosómica y estructura de los genes que codifican los ARNr de Arabidopsis .....	23
<b>Figura 9.-</b> Representación esquemática de la proteína AGO1, con indicación de los efectos de las mutaciones <i>ago1-51</i> y <i>ago1-52</i> sobre su secuencia. ....	31
<b>Figura 10.-</b> Rosetas de las líneas supresoras identificadas tras una mutagénesis con EMS del mutante <i>ago1-52</i> .....	32



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Genes SynMuv B de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	26
<b>Tabla 2.-</b> Interactores de la NKAP humana de función conocida o predicha.....	28







## **I.- PREFACIO**





## I.- PREFACIO

Este documento se ha elaborado siguiendo la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de Tesis Doctorales con un conjunto de publicaciones” y se ha dividido en las partes siguientes:

- 1.- Un apartado de *Resumen y Conclusiones*.
- 2.- Una *Introducción*, en la que se presenta el tema de la Tesis y los antecedentes y objetivos del trabajo realizado.
- 3.- Una *Bibliografía de la Introducción*.
- 4.- Un apartado de *Publicaciones*, que contiene la siguiente (se indica su factor de impacto [FI] de 2014):

Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., y Ponce, M.R. (2015). Arabidopsis *MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF-kappa B Activating Protein, is involved in 45S rDNA silencing. *Plant Cell* **27**, 1999-2015 (FI: 9,338).

- 5.- Un *Anexo*, que incorpora 9 comunicaciones a congresos: 3 nacionales y 6 internacionales.

La introducción de esta Tesis no incluye un apartado de Materiales y Métodos, que están descritos en el artículo. Este documento incorpora dos bibliografías: la del artículo y la de la introducción. Todas las citas que se intercalan en la introducción de esta memoria se corresponden con referencias que aparecen en la bibliografía del mismo apartado; algunas de dichas citas se repiten en la bibliografía del artículo.

Durante mi periodo predoctoral también he publicado tres artículos que no se incluyen en esta Tesis:

Ferrández-Ayela, A., Alonso-Peral, M.M., Sánchez-García, A.B., Micol-Ponce, R., Pérez-Pérez, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2013). Arabidopsis *TRANSCURVATA1* encodes NUP58, a component of the nucleopore central channel. *PLOS ONE* **8**, e67661 (FI: 3,234).

Ferrández-Ayela, A., Micol-Ponce, R., Sánchez-García, A.B., Alonso-Peral, M.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2013). Mutation of an Arabidopsis NatB N-alpha-terminal acetylation complex component causes pleiotropic developmental defects. *PLOS ONE* **8**, e80697 (FI: 3,234).

Micol-Ponce, R.\* , Sánchez-García, A.B.\* , Xu, Q., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2015). *Arabidopsis INCURVATA2* regulates salicylic acid and abscisic acid signaling, and oxidative stress responses. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2207-2219 (FI: 4,931).





## **II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES**



## II.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

Una parte importante de la regulación de la expresión de muchos genes eucarióticos es postranscripcional. Participan en este proceso en *Arabidopsis* los complejos del silenciamiento génico inducido por ARN (RISC), cuyo componente principal es la proteína AGO1 (ARGONAUTE1). La insuficiencia de función del gen *AGO1* perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad. Para comprender mejor la actividad y las interacciones de *AGO1*, se realizó en el laboratorio de María Rosa Ponce una búsqueda de modificadores del fenotipo morfológico de su alelo *ago1-52*, que es hipomorfo, viable y fértil. Se aislaron así 23 mutantes inducidos por metanosulfonato de etilo, de fenotipo similar al silvestre, y se denominó *MAS* (*MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED*) a sus genes supresores. La clonación posicional de uno de ellos, *MAS2*, reveló que codifica una proteína homóloga de las NKAP (*NF-kappa B Activating Protein*) de los metazoos.

*MAS2* es un gen de copia única y esencial: sus alelos insercionales *mas2-2* y *mas2-3* son recesivos y letales embrionarios. Hemos identificado 9 alelos portadores de mutaciones puntuales supresoras, 8 de las cuales (*mas2-1* y de *mas2-4* a *mas2-10*) se agrupan en la región que codifica el dominio conservado SynMuv, que caracteriza a las NKAP.

*mas2-1* suprime el fenotipo de *ago1-51* y *ago1-52*, cuyo *splicing* está alterado, pero no el de *ago1-25* y *ago1-27*, que causan sustituciones de aminoácidos. Tanto la sobreexpresión constitutiva del alelo silvestre *MAS2* como la del mutante *mas2-1* carecen de efecto fenotípico en la estirpe silvestre; la sobreexpresión de *mas2-1*, pero no la de *MAS2*, suprime el fenotipo de *ago1-52*. Estos resultados sugieren que *mas2-1* es un alelo antimorfo del gen *MAS2*.

El mutante *ago1-52* produce dos variantes del ARN mensajero (ARNm) de *AGO1*, una mutante y mayoritaria y otra silvestre y casi indetectable. La proporción relativa de la variante de ARNm silvestre se incrementa en casi todos los dobles mutantes *ago1-52 mas2* estudiados. Estos resultados indican que los alelos *mas2* portadores de mutaciones puntuales son supresores informacionales y que la proteína *MAS2* participa en el procesamiento del ARN en general o el de *AGO1* en particular.

Hemos construido un microARN artificial que reprime parcialmente a *MAS2* (*amiR-MAS2*) y causa floración temprana, deforma las hojas y las flores y reduce la fertilidad. La proporción relativa de la proteína *AGO1* silvestre es mucho mayor en los dobles mutantes *ago1-52 mas2* que en el mutante simple *ago1-52*. En las plantas *ago1-52 amiR-MAS2*,

por el contrario, los niveles de la proteína AGO1 silvestre se reducen. Nuestros resultados sugieren que MAS2 participa en algún mecanismo de control de la calidad de los ARNm, favoreciendo la traducción de la variante silvestre o dificultando la de la mutante.

Hemos obtenido una fusión transcripcional *MAS2<sub>pro</sub>:GUS*, con la que hemos visualizado la expresión de MAS2 en todos los tejidos estudiados, que alcanza valores máximos en células en división activa, como las de los ápices de la raíz y de las hojas vegetativas. También hemos obtenido los transgenes *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* y *MAS<sub>pro</sub>:MAS2:GFP*, que nos han permitido establecer que MAS2 es una proteína nuclear en células en división muy activa, y perinucleolar en las restantes. Hemos demostrado mediante hibridación *in situ* fluorescente que MAS2 se acumula en el ADN ribosómico (ADNr) 45S de los organizadores nucleolares.

El gen *NUC-L1* de Arabidopsis codifica la NUCLEOLINA1, que participa en el control epigenético de la expresión del ADNr 45S. Tanto *mas2-1* como *amiR-MAS2* interaccionan genéticamente con un alelo nulo de *NUC-L1*. Hemos comprobado que los promotores del ADNr 45S están hipometilados en las plantas *amiR-MAS2*, una observación que indica que MAS2 regula negativamente al ADNr 45S.

Hemos realizado una búsqueda de interactores basada en el ensayo del doble híbrido de la levadura, identificando proteínas presuntamente implicadas en el control del *splicing*, en la biogénesis del ribosoma y en la reparación de roturas dobles en el ADN. Estos interactores de MAS2 son similares a los descritos para la NKAP humana.

Las proteínas SR deben su nombre a su dominio RS, que es rico en serina (S) y arginina (R); su participación en el *splicing* está sobradamente demostrada en diferentes especies de hongos, animales y plantas. La NKAP humana presenta una región aminoterminal a la que se ha considerado un dominio RS no canónico y se ha encontrado asociada a diferentes complejos del spliceosoma. Nuestros resultados indican que MAS2, la ortóloga en Arabidopsis de la NKAP humana, es una proteína multifuncional que participa en el control del *splicing*, en la traducción del ARNm y en la regulación transcripcional y el procesamiento de los genes del ADNr 45S. La letalidad embrionaria asociada a la insuficiencia de función de MAS2, su localización subcelular, la naturaleza de sus interactores y los procesos en los que participa revelan una conservación no solo estructural sino también funcional respecto a la NKAP humana.



### **III.- INTRODUCCIÓN**





### III.- INTRODUCCIÓN

#### III.1.- *Arabidopsis*, un sistema modelo para el estudio de la biología vegetal

*Arabidopsis thaliana* (en adelante, *Arabidopsis*) es una dicotiledónea de la familia de las Brassicáceas, descubierta en el siglo XVI por Johannes Thal. Friedrich Laibach, uno de los discípulos de Eduard Strasburger, comenzó a estudiarla en 1907 (Bowman, 1994). Se convirtió en uno de los organismos experimentales de elección preferente en Biología vegetal a finales de la década de los ochenta (Meyerowitz, 1994).

La comunidad científica de *Arabidopsis* es muy activa y cooperativa. Comenzó a vertebrarse en 1964 en torno al boletín *Arabidopsis Information Service (AIS)* que dejó de publicarse en 1990. En la actualidad existe un amplísimo repertorio de recursos informáticos disponibles para quienes estudian esta planta, el más importante de los cuales es la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org>), que contiene mucha información sobre genes, marcadores moleculares, polimorfismos, análisis transcriptómicos y epigenómicos y numerosas herramientas bioinformáticas. Son varios los centros de conservación y distribución de estirpes y clones de ADN de *Arabidopsis*, entre los que destacan el norteamericano (ABRC; *Arabidopsis Biological Resource Center*; <https://abrc.osu.edu/>) y el europeo (NASC; *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*; <http://nasc.nott.ac.uk/>). La primera conferencia internacional sobre *Arabidopsis* (ICAR; *International Conference on Arabidopsis Research*), se celebró en Göttingen (Alemania) en 1965 (Provar *et al.*, 2016). Desde 1995 se celebra anual y cíclicamente en Asia-Oceanía, Norteamérica y Europa.

El genoma haploide de *Arabidopsis* es uno de los más pequeños de las plantas superiores: su tamaño, 125 Mb, mucho menor que los de las especies cultivadas, propició su secuenciación entre 1996 a 2000. Fue el primer genoma vegetal secuenciado completamente y el tercero de los organismos pluricelulares, solo precedido por los de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000) y *Caenorhabditis elegans* (The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, 1998). Su anotación más reciente indica que contiene 27.655 genes que codifican proteínas, 5.051 genes no codificantes, 952 pseudogenes y 35.846 loci de ARN pequeños (Cheng *et al.*, 2016; <https://apps.araport.org/thalemine/dataCategories.do>).

Los procedimientos de mutagénesis clásica han resultado muy eficaces para la disección genética de numerosos procesos biológicos en *Arabidopsis*. El análisis funcional de los genes de esta planta se ha visto facilitado por los miles de mutantes aislados tras mutagénesis química y los centenares de miles de mutantes señalizados,

obtenidos mediante transformación por infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). La anotación inicial del genoma de *Arabidopsis* evidenció que se desconocía la función de la mayor parte de sus genes, que está siendo comprendida progresivamente mediante la acumulación de grandes cantidades de datos sobre sus patrones de expresión, la localización subcelular de sus productos, los fenotipos causados por su sobreexpresión o la ausencia de su función y el proteoma e interactoma de esta planta.

### **III.2.- Mecanismos de regulación de la expresión génica en los eucariotas**

Comprender los mecanismos de la regulación de la expresión génica implica analizar la capacidad de los ácidos nucleicos para contener información genética, los diferentes modos en que se ha resuelto el problema de su empaquetamiento en las células a lo largo de la evolución, los mecanismos por los cuales tal información fluye y es ejecutada, la inducción o represión de los genes en el momento y lugar adecuados y la modificación de sus productos proteicos.

Se acepta generalmente la universalidad de la lógica de la regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción que se unen a sus secuencias reguladoras diana en el ADN. Este concepto tiene su punto de partida en el abordaje experimental genético y bioquímico llevado a cabo principalmente por Jacob y Monod a mediados del siglo XX, que analizaron el operón de la lactosa de la bacteria *Escherichia coli* (Jacob y Monod, 1961). El descubrimiento de Jacob y Monod permitió comenzar a entender la complejidad que subyace en la regulación de la expresión génica tanto en los procariontes como en los eucariotas.

Los eucariotas son más complejos estructural y funcionalmente y presentan más mecanismos de regulación de la expresión génica que los procariontes. El núcleo celular compartimenta la transcripción y la traducción, y genera la necesidad de una etapa adicional en el flujo de la información genética: la exportación de los ARNm del núcleo al citoplasma. La regulación de la expresión génica en los eucariotas es transcripcional, se controla el inicio de la transcripción, tal como ocurre en las bacterias, pero también postranscripcional y postraduccional, ya que existen mecanismos que operan sobre la maduración de los transcritos, su longevidad y exportación al citoplasma. A los anteriores se añaden los que regulan la activación, inactivación, degradación y localización subcelular de las proteínas.

### **III.2.1.- Regulación transcripcional**

#### **III.2.1.1.- Regulación mediante factores de transcripción**

La expresión de los genes eucarióticos y procarióticos está regulada a varios niveles, el primero de los cuales es la iniciación de la transcripción. La unión de factores de transcripción generales a una región próxima al lugar en el que se iniciará la transcripción, que se conoce como promotor basal, tiene como consecuencia final el ensamblaje de la maquinaria transcripcional. A la decisión de si la transcripción comienza o no también contribuyen otros factores, que actúan como activadores o represores, uniéndose a secuencias potenciadoras (*enhancers*) o silenciadoras, respectivamente. Estas últimas proteínas pueden actuar en solitario o formando parte de complejos (Struhl, 1999).

Una sola ARN polimerasa (ARN pol) transcribe todos los genes en un procarionte; en los eucariotas existen varias, siendo la ARN pol II la que transcribe los genes que codifican proteínas, generando un pre-ARNm que debe madurar y ser exportado al citoplasma para su traducción a proteína. Los factores necesarios para la maduración del pre-ARNm y la exportación del ARNm al citoplasma son incorporados a la ARN pol II durante la elongación de la transcripción (Maniatis y Reed, 2002).

#### **III.2.1.2.- Regulación mediante marcas epigenéticas**

La gran longitud del ADN respecto al volumen del núcleo celular que lo alberga hace necesaria su compactación. Esta última, sin embargo, complica los procesos de replicación, reparación y transcripción. Para compactarse, el ADN eucariótico se asocia con histonas para formar la cromatina junto con otras proteínas y ARN. Las histonas son proteínas relativamente pequeñas y básicas, con residuos de arginina y lisina cargados positivamente, que les confieren una gran afinidad por el ADN. Las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 forman parte de la cromatina de todos los eucariotas. Dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman un octámero en torno al cual se enrolla el ADN para formar un nucleosoma, que constituye la unidad básica de empaquetamiento de la cromatina (Kornberg y Lorch, 1999).

La cromatina se condensa y descondensa a lo largo del ciclo celular. La heterocromatina es la cromatina interfásica altamente condensada, en la que el acceso de la maquinaria transcripcional a los promotores de los genes se ve dificultado (Luger y Hansen, 2005; Li y Reinberg, 2011; Zhou *et al.*, 2011). La actividad de los genes también depende de la modificación de las histonas y la metilación del ADN. En la compactación y descompactación de la cromatina intervienen complejos proteicos que modifican las

histonas, sustituyen unas variantes por otras o desplazan los nucleosomas. Por ejemplo, la sustitución de las histonas canónicas H2A, H2B y H3 en los nucleosomas de los mamíferos por sus variantes H2A.Z, H2A.X y H3.3 propicia las interacciones de la cromatina con complejos remodeladores o con chaperonas de histonas (Klose y Bird, 2006; Kouzarides, 2007; Narlikar, 2010; Talbert y Henikoff, 2010; Bannister y Kouzarides, 2011; Burgess y Zhang, 2013; Das y Tyler, 2013; Harshman *et al.*, 2013; Maze *et al.*, 2014; Rothbart y Strahl, 2014).

### III.2.1.2.1.- Modificación química de las histonas

La modificación postraducciona del extremo amino de las histonas juega un papel clave en la regulación de la estructura y empaquetamiento de la cromatina, y por tanto en el control de la transcripción. Existen diferentes tipos de modificación, que afectan a diferentes aminoácidos, siendo las acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones las que mejor se conocen (Patel y Wang, 2013; Rothbart y Strahl, 2014). Aunque las primeras modificaciones de las histonas se describieron a mediados del siglo XX (Allfrey y Mirsky, 1964; Gutierrez y Hnilica, 1967), su significado biológico permaneció incierto durante tres décadas, hasta que se estableció que las N-acetiltransferasas p55 de *Tetrahymena thermophila* y Gcn5 (*general control nonderepressible 5*) de *Saccharomyces cerevisiae* y las desacetilasas HDAC1 (*histone deacetylase 1*) humana y Rpd3 (*reduced potassium dependency 3*) de *Saccharomyces cerevisiae* regulaban la transcripción (Brownell *et al.*, 1996; Taunton *et al.*, 1996; Struhl, 1998).

Se denomina marcas epigenéticas a las modificaciones químicas de la cromatina que afectan a las histonas y al ADN pero que no alteran la secuencia primaria de este último. Aunque se asociaron inicialmente algunas marcas epigenéticas a determinados estados de actividad o inactividad de los genes (Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000), se está generalizando una visión mucho más compleja del papel de las modificaciones químicas de las histonas en la regulación génica (Taverna *et al.*, 2007). Se han descrito diferentes complejos multiproteicos que incorporan, eliminan o reconocen las marcas epigenéticas de las histonas, que actúan coordinadamente con los complejos metiladores o desmetiladores del ADN (Musselman *et al.*, 2012). El advenimiento de la secuenciación masiva ha facilitado la caracterización de las marcas epigenéticas a escala genómica (Vermeulen *et al.*, 2010; Bartke *et al.*, 2013; Han y Garcia, 2013; Soldi *et al.*, 2013).

### III.2.1.2.2.- Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso que ocurre en los procariotas y los eucariotas, pero las bases nitrogenadas que se metilan y su función biológica son distintos. En los procariotas se metilan las adeninas y citosinas, en la mayoría de los casos como parte de mecanismos de defensa contra ADN exógeno, en los que también participan las restrictasas (Arber y Dussoix, 1962; revisado en Noyer-Weidner y Trautner, 1993); solo en algunos casos la metilación está asociada al control del inicio de la replicación y a la reparación del ADN (revisado en Wion y Casadesús, 2006).

En los animales se metilan las citosinas de los dinucleótidos CG, y en las plantas, en los contextos CG, CHG y CHH (H indica A, C o T) (Cokus *et al.*, 2008; Rothbart y Strahl, 2014). La metilación de las citosinas tiene dos funciones alternativas en los eucariotas, según la región metilada: en los promotores se asocia a inactivación génica, como en la impronta génica, el silenciamiento de retrotransposones o la inactivación del cromosoma X de las hembras de los mamíferos (Klose y Bird, 2006). La metilación de las regiones codificantes de los genes, en cambio, se ha asociado a su activación (Zhang *et al.*, 2006).

La presencia de adeninas metiladas (6mA) en los promotores de los genes de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Drosophila melanogaster* se ha correlacionado con el incremento de su actividad (Fu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; revisado en Heyn y Esteller, 2015). La 6mA se ha asociado en *Caenorhabditis elegans* al mantenimiento transgeneracional de la herencia epigenética (Greer *et al.*, 2015).

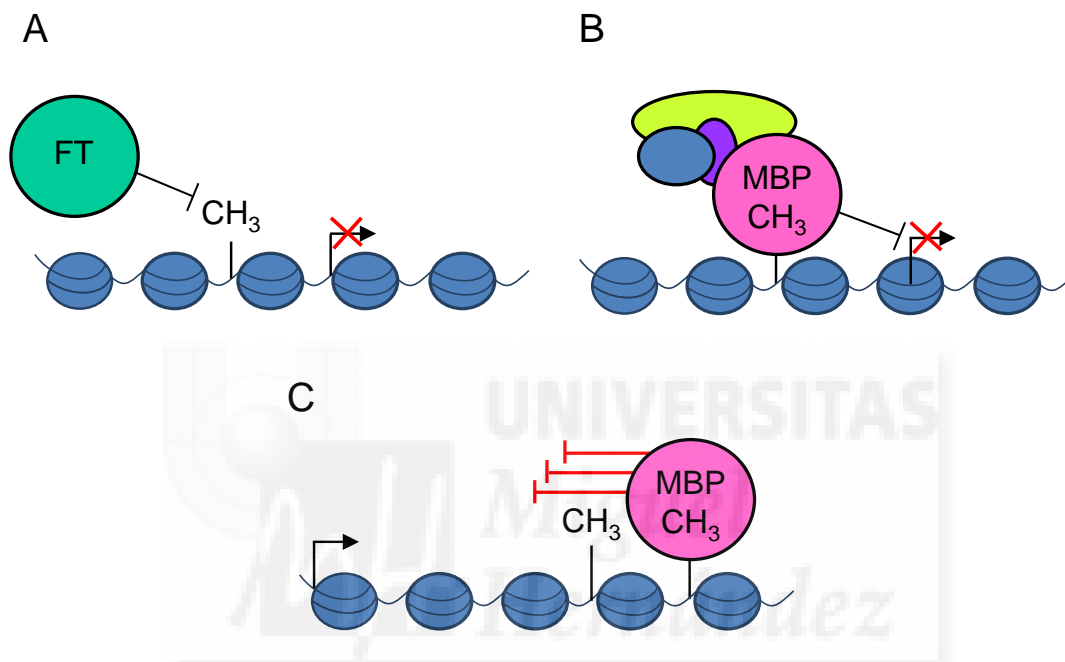
La metilación del ADN reprime la transcripción de dos modos: directamente, impidiendo la unión de los activadores transcripcionales a sus secuencias reguladoras, e indirectamente, reclutando proteínas de unión a dinucleótidos CG metilados (MBP; *methyl-CpG-binding proteins*) que modifican la cromatina y atraen a correpresores de la transcripción (Figura1, en la página 10; Klose y Bird, 2006).

### III.2.2.- Regulación postranscripcional

#### III.2.2.1.- Silenciamiento génico mediado por ARN

Se denomina silenciamiento génico mediado por ARN al conjunto de los procesos en que intervienen moléculas de ARN no codificantes que reprimen la expresión génica de manera específica de secuencia (Brodersen y Voinnet, 2006). Estos mecanismos han recibido diferentes nombres según el organismo en que se han descrito: cosupresión en las plantas, extinción (*quelling*) en los hongos y ciliados, e interferencia de ARN en los animales (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990; Cogoni *et al.*, 1994; Fire *et al.*,

1998; Kennerdell y Carthew, 1998; Ruiz *et al.*, 1998). Se trata de rutas de regulación muy conservadas en los eucariotas (Chapman y Carrington, 2007), cuya función es la protección del genoma frente al ARN viral, y la expresión inadecuada de transgenes, transposones y otras secuencias endógenas altamente repetitivas como los genes que codifican los ARN ribosómicos (Earley *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Pumplin y Voinnet, 2013; Rajeevkumar *et al.*, 2015).



**Figura 1.-** Mecanismos de represión génica mediante metilación del ADN. (A) La presencia de nucleótidos metilados en ciertas secuencias reguladoras pueden impedir su unión a factores de transcripción (FT). (B) Las proteínas de unión a dinucleótidos CG metilados (MBP) reconocen directamente el ADN metilado y reclutan moléculas represoras que modifican la estructura de la cromatina de su entorno y silencian la transcripción. (C) La metilación de regiones internas de los genes también puede inhibir la elongación de la transcripción, al impedir el avance de la maquinaria transcripcional. Los símbolos —| y ↗ representan represión y sitio de inicio de la transcripción, respectivamente. Modificado a partir de Klose y Bird (2006).

Se han descrito diversos tipos de ARN pequeños (20-30 nt) relacionados con procesos de silenciamiento génico, que reciben el nombre genérico de ARN pequeños interferentes (ARNpi; *siRNA*; *small interfering RNA*). Estos ARNpi se organizan en complejos riboproteicos denominados RITS (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*) y RISC (*RNA-induced silencing complex*), que actúan en procesos de silenciamiento transcripcional (TGS; *transcriptional gene silencing*) y postranscripcional

(PTGS; *posttranscriptional gene silencing*), respectivamente (Tang, 2005; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007; Chen, 2009; Rajeevkumar *et al.*, 2015; revisado en Pumplin y Voinnet, 2013). El agente inductor del silenciamiento en ambos procesos es un ARN bicatenario (ARN<sub>dc</sub>), sustrato de una ribonucleasa de tipo III de la familia Dicer (DCL; *ribonuclease III-type Dicer-like*), que lo procesa generando los ARN<sub>pi</sub> (revisado en Gomes *et al.*, 2013; y en Pumplin y Voinnet, 2013). A pesar de que las rutas del TGS y el PTGS regulan la expresión génica a diferentes niveles, sus respectivas maquinarias comparten componentes (Brodersen y Voinnet, 2006; Voinnet, 2008; Xie y Qi, 2008; Chen, 2009; Hoffer *et al.*, 2011).

La clasificación de los ARN<sub>pi</sub> se basa en su biogénesis y funciones (Axtell, 2013; Gomes *et al.*, 2013). Los microARN (miARN) son ARN<sub>pi</sub> producidos por genes endógenos, denominados *MIRNA*, cuya transcripción por la ARN pol II genera un precursor en el que se forma una horquilla por apareamiento intracatenario, que es procesada por una ribonucleasa Dicer, rindiendo el miARN maduro, de unos 21 nt de longitud (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Los miARN silencian a nivel postranscripcional la expresión de numerosos genes endógenos (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

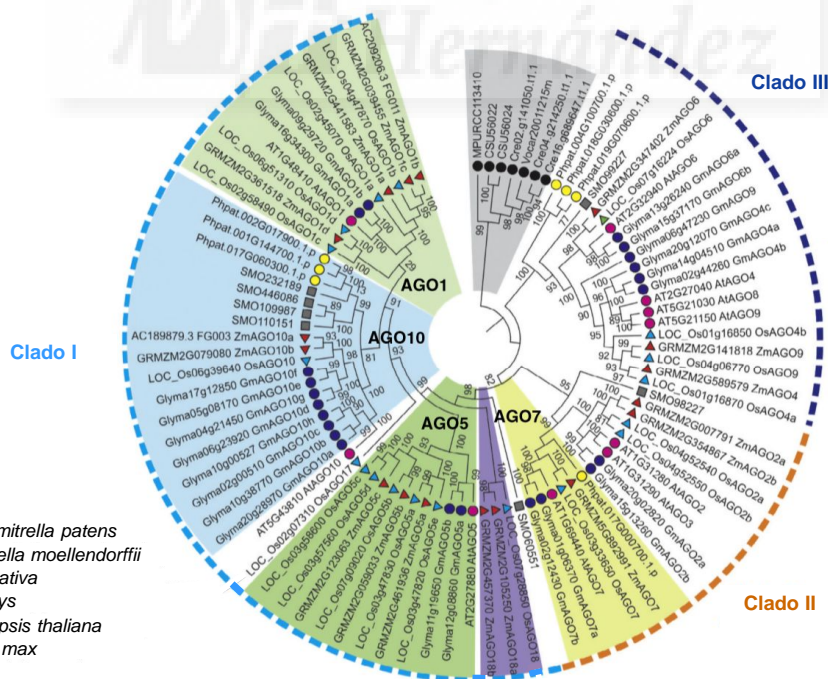
La transcripción de transposones, repeticiones invertidas y regiones intergénicas o altamente repetitivas activa la maquinaria del PTGS, induciéndose la síntesis de ARN<sub>pi</sub>, de 21-22 o 24 nt (Kasschau *et al.*, 2007). La unión de los ARN<sub>pi</sub> de 21-22 nt a su ARN diana atrae a una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP; *RNA-dependent RNA polymerase*) que genera copias adicionales del ARN<sub>pi</sub> (Lu *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007; Xie y Qi, 2008; Axtell, 2013). Los ARN<sub>pi</sub> más largos, de 24 nt, parecen estar implicados en la metilación *de novo* de las citosinas de sus secuencias complementarias en el ADN (Matzke *et al.*, 2009; Law y Jacobsen, 2010; Axtell, 2013).

La etapa final de la regulación de la expresión génica mediada por moléculas de ARN es la asociación de los ARN<sub>pi</sub> a los complejos RISC y RITS, cuyo elemento más importante es un miembro de la familia ARGONAUTE (AGO), responsable de la actividad silenciadora del complejo (revisado en Kawamata y Tomari, 2010). Las proteínas AGO presentan tres dominios funcionales, denominados PAZ, MID y PIWI, organizados en una arquitectura bilobulada con su región aminoterminal y el dominio PAZ en uno de los lóbulos, y MID, PIWI y la región carboxiterminal en el otro (Wang *et al.*, 2009). El dominio PAZ se une al extremo 3' de los ARN<sub>pi</sub>, mientras que los dominios MID y PIWI lo hacen al 5' (Wang *et al.*, 2009; Mallory y Vaucheret, 2010; Parker, 2010), posicionando así correctamente al ARN<sub>pi</sub> respecto a su ARNm diana. Aunque el dominio PIWI contiene un sitio catalítico de tipo RNasa H (Wang *et al.*, 2009; Parker, 2010), no todas las proteínas

AGO son capaces de cortar a sus ARNm diana (Mallory *et al.*, 2009; Mallory y Vaucheret, 2010).

Las proteínas AGO están muy conservadas y se han identificado tanto en los procariontas como en los eucariotas (Swarts *et al.*, 2014). Las procarióticas participan en la defensa contra elementos genéticos móviles y ADN exógeno (Swarts *et al.*, 2014). También están muy conservadas las AGO eucarióticas, aunque el número de parálogos es 1 en *Schizosaccharomyces pombe*, 2 en *Neurospora crassa*, 5 en *Drosophila melanogaster*, 8 en los mamíferos, 10 en *Arabidopsis* y 27 en *Caenorhabditis elegans* (revisado en Höck y Meister, 2008; y en Mallory y Vaucheret, 2010).

El número de proteínas AGO en las plantas (Figura 2) es muy diverso debido los numerosos eventos de duplicación génica seguida de diversificación que han ocurrido a lo largo de su evolución (Singh *et al.*, 2015). En organismos ancestrales como las algas verdes uni o pluricelulares (*Micromonas pusilla*, *Volvox carteri*, *Coccomyxa subellipsoidea* y *Chlamydomonas reinhardtii*) se han identificado hasta 3, y en los musgos (*Physcomitrella patens*) y helechos (*Selaginella moellendorffii*), hasta 7. En las angiospermas como *Arabidopsis*, el maíz, el arroz o la soja se han identificado 10, 17, 19 y 22, respectivamente (Zhang *et al.*, 2015).



**Figura 2.-** Árbol filogenético de las proteínas AGO de las plantas. Se han seleccionado las especies más representativas para ilustrar la evolución de esta familia en el reino vegetal. Se han coloreado diferencialmente las proteínas AGO de diferentes linajes o especies. Modificado a partir de Zhang *et al.* (2015).



Las proteínas AGO de las plantas se agrupan en tres clados (Figura 2; revisado en Vaucheret, 2008; Mallory y Vaucheret, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Al clado I de *Arabidopsis* pertenecen AGO1, AGO5 y AGO10; al II, AGO2, AGO3 y AGO7; y al III, AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 (revisado en Vaucheret, 2008).

El gen *AGO1* de *Arabidopsis* es el miembro fundador de la familia AGO, a la que ha dado nombre. Se identificó en una búsqueda de mutantes afectados en el desarrollo. Su nombre se debe al aspecto de las hojas vegetativas de sus mutantes de fenotipo más severo, que recordaron a sus descubridores los tentáculos del cefalópodo *Argonauta argo* (Bohmert *et al.*, 1998). La identificación de alelos *ago1* adicionales evidenció el papel fundamental de AGO1 en el silenciamiento mediado por ARN y su unión preferente a ARNpi de 21 nt con una uridina en su extremo 5', como la mayoría de los miARN. Además de jugar un papel central en el PTGS mediado por miARN, AGO1 también es esencial en la defensa contra los virus (revisado en Vaucheret, 2008; Jover-Gil *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

### III.2.2.2.- Maduración de los ARNm

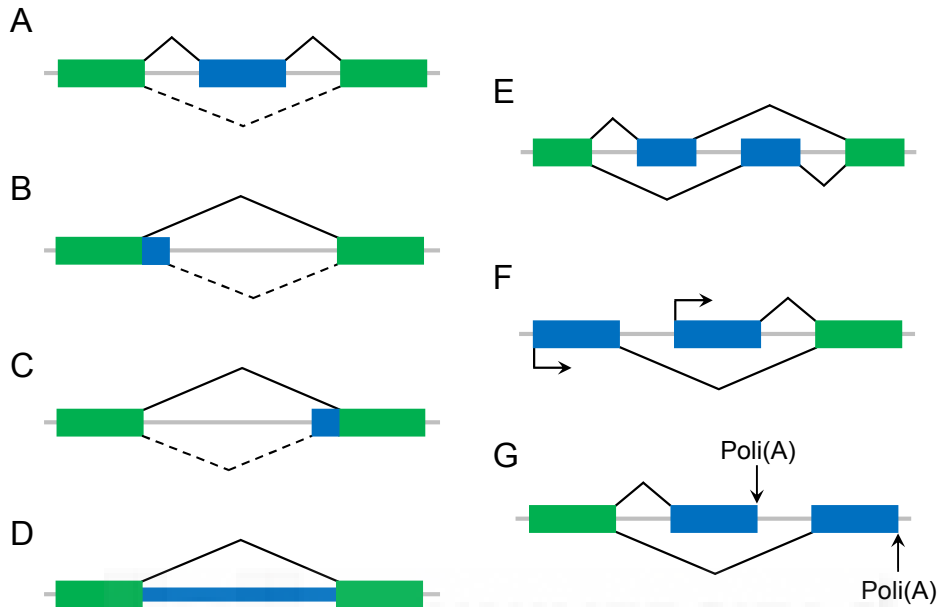
#### III.2.2.2.1.- *Splicing* constitutivo y alternativo

La maduración de los transcritos primarios de los ARNm eucarióticos (pre-ARNm) comprende varios procesos cuya discusión excede el propósito de esta Tesis. Se comenta a continuación solo uno de ellos, que elimina los intrones y reúne los exones de un pre-ARNm: el *splicing* (no existe una traducción de uso generalmente aceptado de este vocablo; algunos autores lo traducen como “ajuste”, la unión de dos cuerdas o trozos de madera por sus extremos).

Se denomina *splicing* alternativo a la eliminación o retención total o parcial de exones o intrones de un pre-ARNm, que da lugar a diferentes variantes del ARNm de un gen, que a su vez rinden proteínas que pueden diferir en su función, incluso ser antagónicas, o en su localización subcelular (Ellis *et al.*, 2012; Loraine *et al.*, 2013). Los diferentes patrones de *splicing* alternativo de un gen suelen ser específicos de tejido y consisten en la omisión de exones o la retención de intrones (Figura 3, en la página 14; Black, 2003; Kelemen *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2013; revisado en Reddy *et al.*, 2013). Un 95% de los genes con varios exones de los animales y un 61% de los de las plantas sufren *splicing* alternativo (Syed *et al.*, 2012).

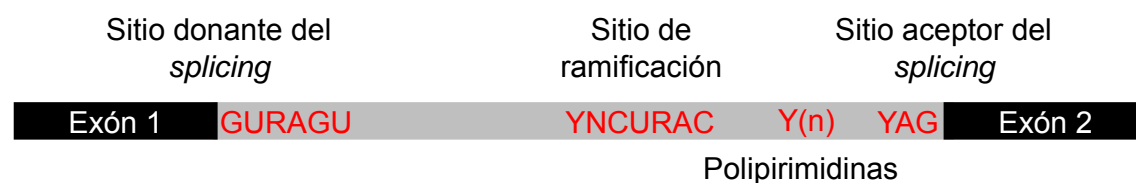
La síntesis de ARNm aberrantes, productos del *splicing* alternativo, puede activar diferentes rutas de degradación de ARNm. Una de las mejor estudiadas es la de decaimiento del ARNm mediado por secuencias sin sentido (NMD; *Nonsense-mediated*

*mRNA Decay*) que está acoplada a la traducción, degradando en el citoplasma los ARNm que contienen codones de terminación prematuros (Broyna y Wen, 2009).



**Figura 3.-** Patrones de *splicing* alternativo. Los intrones constitutivos, ausentes de todas las variantes del ARNm maduro, están representados por líneas grises, y los exones, por rectángulos coloreados. Los exones constitutivos aparecen en verde, y los exones e intrones retenidos alternativamente, en azul. Los eventos de *splicing* constitutivo o alternativo están indicados por líneas negras continuas o discontinuas, respectivamente. (A) Exclusión completa de un exón. (B y C) La presencia de sitios (B) donantes y (C) aceptores alternativos permite aumentar o disminuir la longitud de un determinado exón mediante *splicing* alternativo. (D) Retención de un intrón. (E) Exclusión mutua de exones: solo uno de los dos representados en azul está presente en cada una de las dos variantes alternativas del ARNm. (F y G) La presencia de (F) promotores y (G) señales de poliadenilación [Poli(A)] alternativas también contribuye a generar variantes del ARNm. Modificado a partir de Black (2003).

El *splicing* es casi universal en los eucariotas y se lleva a cabo mediante dos esterificaciones sucesivas que eliminan cada intrón (revisado en Sharp, 2005). El spliceosoma reconoce cuatro señales: el donante del *splicing* o sitio 5', el aceptor o sitio 3', el sitio de ramificación y la región de polipirimidina; estas dos últimas señales están dentro del intrón (Figura 4; Hoskins y Moore, 2012; Reddy *et al.*, 2013). La mutación de alguna de estas secuencias altera el *splicing*, generándose ARNm defectuosos, que habitualmente son marcados para su destrucción por los mecanismos de control de la calidad de los ARNm, que impiden su traducción (revisado en Sharp, 2005).



**Figura 4.-** Estructura de un intrón de tipo U2. Se representa esquemáticamente un intrón de tipo U2 con indicación de sus señales características: los sitios donante, aceptor y de ramificación, y la región de polipirimidina. Y, R y N indican pirimidina, purina y cualquier base, respectivamente. Modificado a partir de Will y Lührmann (2011).

---

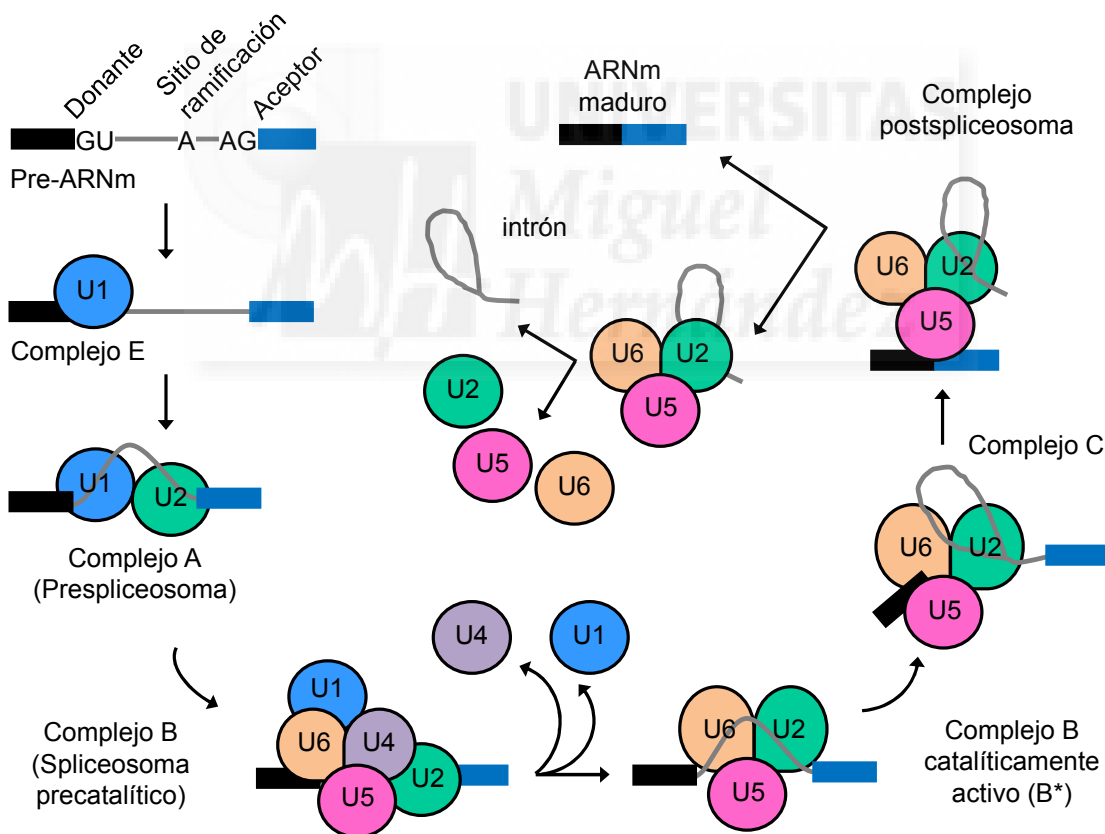
El ensamblaje de los componentes del spliceosoma es secuencial (Will y Lührmann, 2011; revisado en Meyer *et al.*, 2015). La etapa inicial del procesamiento de los intrones de tipo U2 es la formación del complejo E, compuesto por la proteína snRNP U1, que reconoce el sitio donante, y por otros factores, que reconocen el sitio de ramificación y la región de polipirimidina (Figura 5, en la página 16). El siguiente paso es la unión de la snRNP U2 al sitio de ramificación dando lugar al complejo A, también denominado prespliceosoma. La unión de las snRNP U4, U5 y U6 genera el complejo precatalítico del spliceosoma, denominado complejo B, cuya activación conlleva la salida de U1 y U4 del complejo. El complejo B catalíticamente activo (B\*) lleva a cabo la primera etapa del *splicing*, cortando el donante y ligando el extremo 5' del intrón a la región de polipirimidina. Estos dos procesos conducen a la segunda etapa del *splicing*: la formación del complejo C, que cataliza la ligación de los extremos 5' y 3' de dos exones contiguos y la liberación del intrón.

#### III.2.2.2.2.- Funciones de las proteínas SR en el *splicing*

Para el correcto procesamiento de los intrones durante el *splicing*, tanto el constitutivo como el alternativo, es esencial el reconocimiento de varias señales, como las de los sitios donante, aceptor y de ramificación y la región de polipirimidina, cuya presencia es condición necesaria pero no suficiente para inducir la formación y el correcto posicionamiento del spliceosoma (revisado en Long y Caceres, 2009; Will y Lührmann, 2011). Este último proceso también requiere otras secuencias intrónicas y exónicas: los elementos reguladores en *cis* denominados ESE (*exonic splicing enhancer*), ESS (*exonic splicing silencer*), ISE (*intronic splicing enhancer*) e ISS (*intronic splicing silencer*), que reclutan proteínas de unión a ARN durante el ensamblaje y la actuación del spliceosoma (revisado en Long y Caceres, 2009 y en Meyer *et al.*, 2015). La mayoría de estas

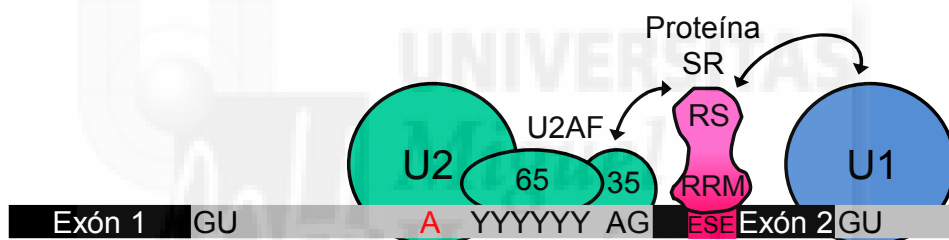
proteínas de unión a ARN pertenecen las familias SR y hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*).

Las proteínas SR se han descrito en levaduras, insectos, nematodos, mamíferos y plantas (Busch y Hertel, 2012; Rauch *et al.*, 2014). Presentan al menos un dominio de unión a ARN de tipo RRM (*RNA recognition motif*) y otro con repeticiones RS, cuyo contenido en arginina (R) y serina (S) es superior al 40%. Se denominan proteínas relacionadas con las SR (*SR-like* o *SR-related*) a las que cuentan con un dominio RS pero carecen del RRM (Busch y Hertel, 2012; Jarvelin *et al.*, 2016). Los dominios RRM están implicados en interacciones ARN-proteína; y el dominio RS, en interacciones con otras proteínas SR, con las relacionadas con las SR y con otros componentes de la maquinaria del *splicing*. Las proteínas relacionadas con las SR son componentes de la maquinaria del *splicing* y también regulan la actividad de las SR (Mueller y Hertel, 2011).



**Figura 5.-** Mecanismo del *splicing* de los pre-ARNm por el spliceosoma de tipo U2. Se simplifican las etapas del proceso de eliminación canónica de los intrones de tipo U2. Solo se muestran las snRNP U que participan en el proceso. Los complejos se denotan según la nomenclatura de los metazoos. Los rectángulos azules y negros representan exones consecutivos, y la línea gris, el intrón que los une. Modificado a partir de Will y Lührmann (2011).

Las interacciones mediadas por las proteínas SR son esenciales para el ensamblaje de los complejos del spliceosoma. Al menos una proteína de la familia SR reconoce la secuencia ESE de un exón y recluta a diferentes miembros de la maquinaria del *splicing*, que se unen al intrón adyacente (Mueller y Hertel, 2011). Para la formación y estabilización del complejo E se requiere la interacción, en primer lugar, entre el dominio RRM de una proteína SR y la secuencia ESE, y en segundo lugar, entre el dominio RS y la snRNP U1 en el sitio donante y la proteína UA2F35 en el aceptor (Figura 6). Las proteínas SR parecen promover la interacción entre la snRNP U2 y el sitio de ramificación. Durante la formación del complejo B, las proteínas SR reclutan al trímero snRNP U4/U6/U5, promoviendo la unión de U6 al sitio donante. La desfosforilación de las proteínas SR tiene como consecuencia la formación del complejo C activo, que induce la ligación de los extremos 5' y 3' del intrón que va a eliminarse (Will y Lührmann, 2011; Howard y Sanford, 2015).



**Figura 6.-** Interacciones de las proteínas SR en los exones de tipo U2 durante la formación del complejo E del spliceosoma. El dominio RRM de una proteína SR reconoce la secuencia ESE de un exón, y a continuación el dominio RS interacciona con las proteínas snRNP U1 y la subunidad 35 del complejo UA2F (UA2F35), unidas a los sitios donante y aceptor del *splicing*, respectivamente. Modificado a partir de Will y Lührmann (2011).

Se han descrito algunos casos de participación de una proteína SR en la eliminación de un exón. Por ejemplo, en células humanas en cultivo, la unión de la proteína SRSF9 a secuencias ISS presentes aguas arriba del extremo 3' de un exón del ARN del gen *HNRNPA1* promueve su eliminación (Simard y Chabot, 2002); la unión de SRSF11 a un elemento ESS promueve la eliminación de un exón del ARN del gen Tau (Wu *et al.*, 2006); y la proteína SRSF10 puede contribuir a la eliminación de exones en función de su estado de fosforilación (Shi y Manley, 2007).

Algunas proteínas SR participan en otros aspectos del metabolismo del ARN, como la elongación de la transcripción, la regulación del *splicing* alternativo, el transporte

de los ARNm del núcleo al citoplasma, la inducción de la ruta NMD y la traducción (Howard y Sanford, 2015).

Los organismos con mayor número de proteínas SR son las plantas. El arroz tiene 22, y el maíz, 21 (Barta *et al.*, 2010; Rauch *et al.*, 2014). Las proteínas SR de las plantas están agrupadas en 6 subfamilias: SR, SC, SCL, RS, RSZ y RS2Z, tres de las cuales (RS, SCL y RS2Z) son específicas del reino vegetal. También se ha descrito en las plantas un grupo de proteínas relacionadas con las SR, a las que se ha denominado SR45 (Rauch *et al.*, 2014). Se ha sugerido que el número de proteínas SR de una especie dada podría estar relacionado con la complejidad de su *splicing* (Busch y Hertel, 2012).

Se han descrito 18 proteínas SR en *Arabidopsis*: SR30, SR34, SR34a y SR34b son ortólogas de las de la familia ASF/SF2 (SRSF1) de los animales; RSZ21, RSZ22 y RSZ22a, de las de la familia SRSF7/9G8 de los animales; y SC35 es la ortóloga de su homónima animal. Las restantes proteínas SR de las plantas son específicas del reino vegetal (revisado en Meyer *et al.*, 2015). Las de la subfamilia RS2Z (RS2Z32 y RS2Z33) contienen dos dominios de dedos de cinc entre los RRM y RS, además de una región rica en residuos de serina y prolina en su región carboxiterminal. La subfamilia RS incluye a RS31, RS31a, RS40 y RS41; y la SCL a SCL28, SCL30, SCL30a y SCL33. Por último, SR45 contiene dos dominios RS, uno a cada lado del motivo RRM; es una proteína similar a las SR, ortóloga de la RNPS1 de los mamíferos, que forma parte de un complejo implicado en el *splicing*, denominado EJC (*Exon Junction Complex*) (revisado en Meyer *et al.*, 2015).

### III.2.2.2.3.- Funciones de las hnRNP en el *splicing*

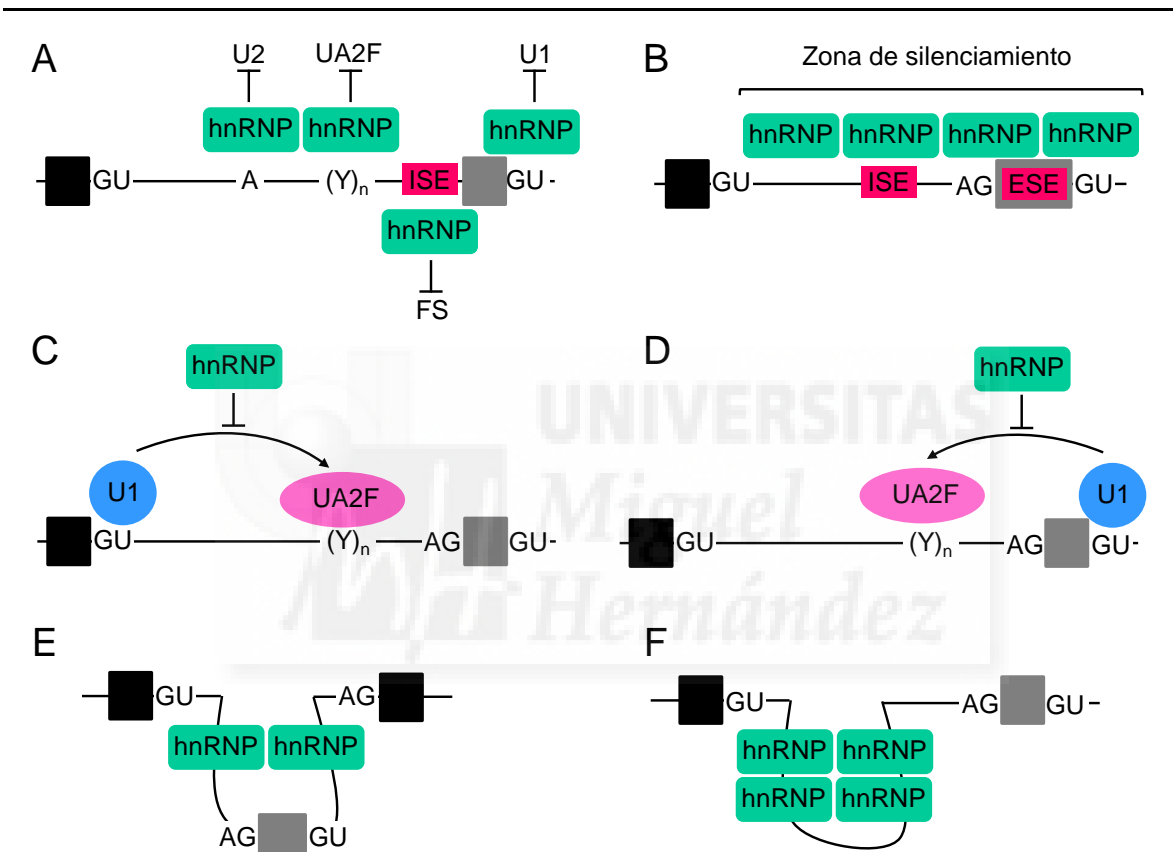
La familia hnRNP integra proteínas de unión a ARN con importantes funciones en varias facetas del metabolismo de los ácidos nucleicos, como el reconocimiento de transcritos de ARN nacientes, la regulación del *splicing* y la traducción, el mantenimiento de los telómeros, la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN (revisado en Huelga *et al.*, 2012). Estas proteínas son muy abundantes en el núcleo, aunque también se han encontrado en el citoplasma, habiéndose descrito más de 20 tipos diferentes de shRNP humanas (Martinez-Contreras *et al.*, 2007). El análisis filogenético de estas proteínas revela la presencia de 13 familias cuyos miembros están estrechamente relacionados, lo que indica que la diversidad de las hnRNP podría deberse a hechos sucesivos de duplicación génica (Busch y Hertel, 2012).

La estructura de las hnRNP es modular, con motivos de unión a ARN de los tipos RRM, KH, caja RGG o dedos de cinc, y al menos un dominio auxiliar, rico en glicina, prolina o residuos ácidos, implicado en interacciones proteína-proteína. Se conocen 10 tipos de hnRNP, entre las que cabe destacar las de los grupos hnRNP E y K, con dominios KH; los miembros de los grupos hnRNP F y H, las únicas con especificidad de secuencia en su unión al ARNm (a regiones poli G); y las del grupo hnRNP I, también conocidas como PTB (*polypyrimidine tract binding proteins*) (revisado en Han *et al.*, 2010).

Las proteínas hnRNP inhiben el *splicing*, siendo por tanto antagonistas de las SR. Solo se conoce el mecanismo de acción de algunas hnRNP, que dificultan el ensamblaje del spliceosoma, bloquean el reclutamiento de las snRNP y/o eliminan exones (Figura 7, en la página 20). Las hnRNP pueden ocluir una o más de las señales del *splicing*, impidiendo su reconocimiento por el spliceosoma. También pueden impedir interacciones entre componentes del spliceosoma. Por ejemplo, las PTB pueden dificultar la unión de la proteína U2AF al sitio donante durante la formación del complejo E o favorecer la interacción entre las snRNP U1 y U2AF (Figura 7C y D, en la página 20). Por último, varias hnRNP pueden interactuar entre sí y con el ARN, formando bucles que impiden el acceso de los componentes del spliceosoma (Figura 7E y F, en la página 20; revisado en Wachter *et al.*, 2012).

Se ha descrito en las plantas una familia de pequeñas proteínas de unión a ARN que constituyen una versión simplificada de las hnRNP de los mamíferos, ya que contienen un solo dominio RRM y una región rica en glicina. Participan en diversos aspectos del metabolismo del ARN, tal como sus homólogas animales (revisado en Wachter *et al.*, 2012; Ciuzan *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2015). POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN 1 (PTB1) y PTB2 de *Arabidopsis* son reguladores del *splicing* (Simpson *et al.*, 2010; Ruhl *et al.*, 2012). La alteración de sus niveles modifica el patrón de *splicing* de los transcritos de *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR6 (PIF6)*, *FLOWERING LOCUS K (FLK)* y *FLOWERING LOCUS M (FLM)*; PIF6 participa en el control de la germinación dependiente del ácido abscísico (ABA) y *FLK* y *FLM* en el control de la floración (Ruhl *et al.*, 2012). También son hnRNP reguladoras del *splicing* en *Arabidopsis* *GLYCINE-RICH PROTEIN7 (GRP7)* y su paróloga GRP8, que se unen al pre-ARNm promoviendo el uso de sitios alternativos de *splicing*, que genera algunos transcritos alternativos con codones de terminación prematuros, que son reconocidos y degradados por la maquinaria del NMD (revisado en Wachter *et al.*, 2012). La transcripción de GRP7 se ha asociado a la respuesta a diferentes tipos de estrés, el

control del ritmo circadiano y la defensa contra determinados patógenos (Carpenter *et al.*, 1994; Heintzen *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2008; Schoning *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010; Nicaise *et al.*, 2013). La sobreexpresión de GRP7 altera los niveles de 44 miARN, promoviendo la acumulación de ciertos precursores en detrimento de sus formas maduras, e induce el *splicing* alternativo de los precursores pri-miR172b y pri-miR162a (Koster *et al.*, 2014). Estas observaciones indican que GRP7 controla el procesamiento de los pre-ARNm y los pri-miARN (Meyer *et al.*, 2015).



**Figura 7.-** Mecanismos de regulación del *splicing* mediados por hnRNP. Los exones e intrones se representan mediante rectángulos y líneas, respectivamente. Los exones alternativos se representan en gris, y los constitutivos, en negro. Se destacan las señales reguladoras ISE y ESE y los complejos U1 y UA2F del spliceosoma. (A) Exclusión de exones por competición por los sitios de unión entre las hnRNP y los componentes del spliceosoma (U1, U2, UA2F) o entre las hnRNP y factores activadores del *splicing* (FS). (B) Cooperación entre las proteínas hnRNP para la exclusión de exones mediante el establecimiento de una zona de silenciamiento, que impide la asociación del spliceosoma y los FS. (C, D) Antagonismo entre las hnRNP y U1 y UA2F en los procesos de definición de (C) intrones y (D) exones. Las hnRNP impiden el reconocimiento de los exones e intrones dificultando el posicionamiento de los complejos U1 y UA2F en las secuencias de consenso. (E, F) Generación de bucles por interacciones entre hnRNP que (E) previene o (F) induce la inclusión de exones. Modificado a partir de Wachter *et al.* (2012).



### III.3.- Biogénesis del ribosoma citoplásmico de Arabidopsis

#### III.3.1.- Componentes del ribosoma citoplásmico de los eucariotas

El ribosoma citoplásmico es la maquinaria de la traducción de los ARNm y está constituido por unas 80 proteínas ribosómicas y cuatro tipos de ARNr. Su síntesis es muy compleja e implica a tres ARN polimerasas nucleares en todos los eucariotas. La ARN pol I transcribe el ADNr 45S, rindiendo un ARN policistrónico precursor de los ARNr 28, 26 o 25S (dependiendo de la especie), 18S y 5.8S. La ARN pol II transcribe los genes de las proteínas ribosómicas y los ARN pequeños nucleolares (ARNpno; *small nucleolar RNA*) que participan en el procesamiento del ADNr 45S. La ARN pol III sintetiza el ARNr 5S, así como los ARN transferentes (ARNt), que no forman parte del ribosoma pero son esenciales en la traducción. Los genes del ADNr 45S y 5S se encuentran agrupados en tándem, en un número mucho mayor del aparentemente necesario; de hecho, no todas sus copias se expresan en un momento o tejido dados (revisado en Layat *et al.*, 2012).

En los eucariotas, el ensamblaje del ribosoma se inicia en el núcleo con la formación independiente de las subunidades 40S y 60S, que son exportadas al citoplasma, en donde se completa. La subunidad 40S está formada por el ARNr 18S y unas 33 proteínas ribosómicas, mientras que la 60S contiene los ARNr 5.8S, 5S y 28S, 26S o 25S, que se ensamblan con otras 47 proteínas ribosómicas (revisado en Weis *et al.*, 2015).

#### III.3.2.- Organización y expresión del ADNr de Arabidopsis

La transcripción de los genes de los ARN y las proteínas ribosómicas es una etapa fundamental de la biogénesis del ribosoma, que consume una parte importante de los recursos de cualquier célula (Grummt, 2003). Las cantidades de estas moléculas están rigurosamente controladas para garantizar el ensamblaje efectivo de los ribosomas (Laferte *et al.*, 2006). Las células controlan muy estrictamente la transcripción de los ARNr, cuyos genes están muy repetidos en todos los genomas eucarióticos y en algunos procarióticos (Klappenbach *et al.*, 2000; revisado en Layat *et al.*, 2012).

El ARNr 5S de Arabidopsis tiene 120 nt y es el producto de unas 1.000 copias de ADNr 5S organizadas en tándem y rodeadas de retroelementos. En todos los accesos de Arabidopsis estudiados se han encontrado grandes agrupaciones de ADNr 5S en la heterocromatina pericentromérica de los cromosomas 4 y 5. Columbia-0 (Col-0) cuenta con otros grupos de repeticiones en los cromosomas 3 y 5, aparentemente inactivas (Figura 8A, en la página 23; Cloix *et al.*, 2000; revisado en Layat *et al.*, 2012). Existen

variantes de los ADNr 5S con diferentes patrones de expresión espacial y temporal (Mathieu *et al.*, 2003).

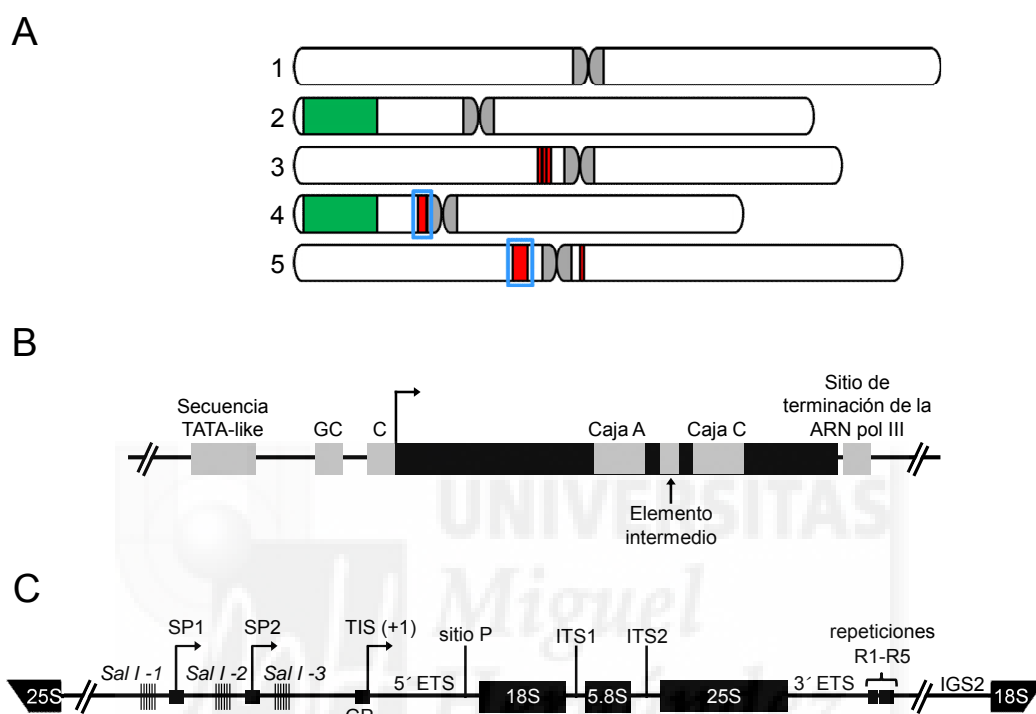
Cada repetición del ADNr 5S tiene unas 500 pb, de las que 380 corresponden a un espaciador intergénico. Su promotor está dentro de la unidad de transcripción y posee una estructura bipartita, con secuencias denominadas cajas A y C, separadas por una región intermedia de secuencia variable y longitud conservada (Figura 8B; Pontvianne *et al.*, 2010).

El factor de transcripción TFIIIA se une al promotor interno del ADNr 5S y recluta a los TFIIIB y TFIIIC y a la ARN pol III al sitio de inicio de la transcripción. La concentración de TFIIIA está regulada durante el desarrollo de *Arabidopsis* por diferentes mecanismos, entre ellos su propia traducción y proteólisis, ya que su pre-ARNm sufre *splicing* alternativo. Una de las variantes así obtenidas es un ARNm truncado, diana del NMD (Mathieu *et al.*, 2003). Durante la fase reproductiva de *Arabidopsis* se incrementa la transcripción del gen *TFIIIA* y se reduce la proteólisis de la proteína TFIIIA; como consecuencia, se acumulan TFIIIA y el ADNr 5S en la semilla. Tras la germinación, el *splicing* alternativo de *TFIIIA* rinde la variante truncada de su ARNm, que se degrada, por lo que no se produce transcripción *de novo* del ADNr 5S, cuyos niveles se reducen. Días después cambia el patrón de *splicing* rindiendo, de nuevo, un ARNm funcional cuyo producto activa la transcripción del ADNr 5S (Layat *et al.*, 2012).

Los genes del ADNr 45S se encuentran en constricciones secundarias de los cromosomas metafásicos, denominadas organizadores nucleolares (NOR; *Nucleolar Organizer Region*), cuyo número depende de cada organismo y se sitúan en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, muy próximos a los telómeros. El nucleolo se organiza en interfase en los NOR, compartimento nuclear en el que se produce gran parte de la síntesis de ribosomas y se concentra la ARN pol I. El nucleolo se reconstruye tras cada división celular alrededor de los NOR, que contienen los ADNr 45S.

En *Arabidopsis* existen dos NOR, en los cromosomas 2 y 4 (Figura 8A en la página 23; Lam *et al.*, 2005; Layat *et al.*, 2012). Tal como ocurre con las agrupaciones del ADNr 5S, el número de repeticiones de los ADNr 45S varía entre ecotipos. Col-0 contiene entre 570 y 750 copias de ADNr 45S por genoma haploide, organizadas en tándem en la misma orientación en los dos NOR. La unidad de transcripción del ADNr 45S es de unas 10 kb, y contiene dos espaciadores externos (ETS), las regiones que codifican los ARNr 5.8S, 18S y 25S, y dos espaciadores internos (ITS) que separan cada gen estructural. Un espaciador intergénico, que no se transcribe (IGS) y contiene al promotor, separa dos copias adyacentes (Figura 8C, en la página 23; y Figura 9 de Sánchez-García *et al.*,

2015, en la página 54 de esta Tesis; revisado en Layat *et al.*, 2012). La maduración del pre-ARN 45S, que rinde los ARNr maduros 5.8S, 18S y 25S, implica procesamientos endo- y exorribonucleolíticos y dos tipos de modificaciones químicas: metilaciones de las ribosas y conversiones de uridina en pseudouridina (Gruendler *et al.*, 1989; Unfried *et al.*, 1989; Gruendler *et al.*, 1991).



**Figura 8.-** Localización cromosómica y estructura de los genes que codifican los ARNr de Arabidopsis. (A) Ubicación de los ADNr 5S (destacados en rojo) y 45S (en verde) en los cromosomas (1-5) de Col-0. Las copias de los genes del ADNr 5S activas están recuadradas en azul. Las repeticiones centroméricas se destacan en gris. (B) Estructura de una unidad de ADNr 5S. El símbolo  $\rceil$  indica la posición del sitio de inicio de la transcripción. (C) Estructura de una unidad de ADNr 45S. GP: promotor. SP1 y SP2: espaciadores del promotor. *SalI*: elementos repetitivos que contienen dianas de restricción *SalI*. TIS: sitio de iniciación de la transcripción. ETS: espaciadores externos. ITS1 e ITS2: espaciadores internos. Modificado a partir de (A) Layat *et al.* (2012) y (B, C) Pontvianne *et al.* (2010).

Los ETS del extremo 3' de la región estructural de estos genes (3'ETS) contienen cinco secuencias repetidas (R1-R5) polimórficas (Figura 8C), que generan hasta 5 variantes del pre-rDNA 45S, a las que se denomina VAR, cuya presencia difiere entre accesos de Arabidopsis (Abou-Ellail *et al.*, 2011). La presencia de estos polimorfismos en genes tan conservados ha permitido establecer que no todas las repeticiones se expresan. En Col-0 se han descrito hasta la fecha cuatro VAR, con patrones de expresión

temporal y espacial diferentes. *VAR2*, *VAR3* y *VAR4* se expresan en las plantas adultas mientras que *VAR1* solo lo hace en las semillas, tras su germinación. Las repeticiones silenciadas se organizan en la heterocromatina en la región perinucleolar, mientras que las activas lo hacen en forma de eucromatina y son fácilmente distinguibles al microscopio ya que forma lazos visibles al descondensarse y ocupar el nucleolo (Shaw y Jordan, 1995; Lawrence y Pikaard, 2004; Raska *et al.*, 2004).

Se ha propuesto una relación funcional entre el *splicing* de los pre-ARNm y la biogénesis del ribosoma, y la posibilidad de que la regulación de ambos procesos esté coordinada. Por ejemplo, la helicasa de ARN Prp43p (*Pre-mRNA processing 43*) de *Saccharomyces cerevisiae* interviene tanto en el reciclaje del spliceosoma como en la biogénesis de los ARNr (Leeds *et al.*, 2006).

### III.4.- Las proteínas multifuncionales NKAP

#### III.4.1.- Relación entre las proteínas NKAP y los ácidos nucleicos

Las rutas del factor de crecimiento epidérmico (EGF; *Epidermal Growth Factor*) y la proteína transmembrana Notch confluyen en el control de muchos aspectos del desarrollo animal, actuando en unos casos antagónicamente, y en otros, cooperativamente (Sundaram, 2005). La vulva de *Caenorhabditis elegans* se desarrolla a partir de tres células hipodérmicas precursoras (Sulston y Horvitz, 1977; Felix, 2007), cuyo destino depende de su activación por la ruta del EGF o su inhibición por LIN-12, una proteína similar a Notch. Las mutaciones que reducen la señalización de la ruta del EGF o activan la de Notch producen hermafroditas sin vulva, cuyo fenotipo se denomina Vul (Vulvaless). Las mutaciones que potencian la ruta del EGF o reprimen la de Notch producen un fenotipo Multivulva (Muv).

A los dobles mutantes de *Caenorhabditis elegans* cuyo fenotipo es superaditivo se les denomina sintéticos o sinérgicos, en función de que sus correspondientes mutantes simples parentales sean fenotípicamente iguales o distintos del tipo silvestre, respectivamente (<http://www.wormbook.org/>). Los genes multivulva sintéticos (SynMuv) fueron descubiertos en escrutinios de mutantes afectados en el desarrollo de la vulva en *Caenorhabditis elegans* (Ferguson y Horvitz, 1985; 1989; Ferguson *et al.*, 1987; Howell y Rose, 1990). Los genes SynMuv actúan redundantemente para reprimir la diferenciación de la vulva (Horvitz y Sulston, 1980; Ferguson y Horvitz, 1989).

Los genes SynMuv se clasificaron inicialmente en las categorías A y B, en función de sus interacciones genéticas. Los mutantes simples synMuv A y synMuv B carecían de fenotipo Muv, que sí manifestaban los dobles mutantes synMuv AB (Ferguson y Horvitz,

1989). Muchos de los genes SynMuv B codifican factores implicados en la represión epigenética de la transcripción, entre ellos componentes de los complejos represores NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) y DREAM (2DP, RB [retinoblastoma], E2F y MuvB). También se considera SynMuv B al gen *HPL1*, homólogo del que codifica la Heterochromatin Protein 1 (HP1) de *Drosophila melanogaster* (Tabla 1, en la página 26; Fay y Yochem, 2007). HP1 es una proteína muy conservada entre los eucariotas que pertenece a una familia cuyos miembros participan en diversos procesos como el mantenimiento de marcas represoras epigenéticas, la reparación de rupturas en el ADN, el mantenimiento de los telómeros o el *splicing* (revisado en Canzio *et al.*, 2014). Dos de los tres genes SynMuv A que se conocen codifican factores de transcripción con dedos de cinc y un dominio THAP (*zinc-finger-like THanatos-Associated protein*) de unión a ADN, que se encuentra en proteínas con dedos de cinc implicadas en el control de la proliferación y división celular (Clouaire *et al.*, 2005).

Los alelos mutantes de los genes SynMuv C producen un fenotipo Muv débil, que se acentúa en sus dobles mutantes con alelos de los genes de las clases A o B (Ceol y Horvitz, 2004). Pertenecen a esta categoría genes que codifican componentes del complejo acetilador de histonas Tip60. El complejo Tip60 humano está implicado directa o indirectamente en numerosos procesos, entre ellos la reparación de ADN y el mantenimiento de la integridad del genoma (Sun *et al.*, 2010). Todos los genes SynMuv B y SynMuv C codifican proteínas nucleares implicadas en el control epigenético de la expresión génica (Tabla 1, en la página 26; Fay y Yochem, 2007).

### III.4.2.- Funciones de la NKAP humana en el procesamiento del ARN

Se sabe relativamente poco de las NKAP, ello a pesar de que se han descrito en todos los eucariotas. El ortólogo del gen de la *NKAP* humano en *Caenorhabditis elegans* es *let-504* (E01A2.4), un gen esencial (Howell y Rose, 1990) de función desconocida, que ha sido clasificado como SynMuv B (Poulin *et al.*, 2005; Tabla 1, en la página 26). Existe una paróloga de la *NKAP* humana, *NKAP-L* (*NF kappa B activating protein like*), cuya función se ignora (Burgute *et al.*, 2014).

La *NKAP* humana fue identificada por su capacidad de activar al factor nuclear kappa B (NF-κB) (Chen *et al.*, 2003), que es exclusivo de los animales y juega un papel esencial en la respuesta inmune de los vertebrados (Montgomery *et al.*, 2008). La *NKAP* humana interacciona en los linfocitos B con una secuencia potenciadora de la transcripción (*enhancer*) que forma parte de la región reguladora del gen de las cadenas

**Tabla 1.- Genes SynMuv B de *Caenorhabditis elegans***

Gen	Descripción del producto proteico
<i>dpl-1</i>	Miembro de la familia DP que heterodimeriza con factores E2F para el control del ciclo celular.
<i>efl-1</i>	Miembro de la familia E2F de proteínas implicadas en el control del ciclo celular.
<i>gei-4</i>	Función desconocida.
<i>hda-1</i>	Desacetilasa de histonas.
<i>hpl-2c</i>	<i>Heterochromatin protein 1</i> (HP1). Desregula la respuesta UPR ( <i>unfolded protein response</i> ) en el intestino <sup>1</sup>
<i>let-418</i>	Mi-2/CHD3. Helicasa de ADN del complejo NurD.
<i>let-504</i>	Ortóloga de la NKAP humana.
<i>lex-1</i>	Proteína con bromodominio. Probablemente mantiene los límites entre la heterocromatina y la eucromatina, junto con TAM-1 ( <i>Tandem Array expression Modifier 1</i> ) <sup>2</sup> .
<i>lin-9</i>	Forma parte de complejos DREAM.
<i>lin-13</i>	Factor con dedos de zinc. Atenúa la respuesta UPR <sup>1</sup> junto con HPL-2 ( <i>Heterochromatin protein 1-like</i> ).
<i>lin15b</i>	Regulador negativo de la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular <sup>3</sup> .
<i>lin-35</i>	Ortóloga de la proteína retinoblastoma (p107).
<i>lin-36</i>	Regulador negativo de la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular <sup>3</sup> .
<i>lin-37</i>	Similar a Mip40 de <i>Drosophila melanogaster</i> , componente de complejos DREAM <sup>4</sup> .
<i>lin-52</i>	Función desconocida. Su ortóloga en <i>Drosophila melanogaster</i> es antagonista de las proteínas de los complejos DREAM <sup>5</sup> .
<i>lin-53</i>	Similar a la proteína RbAP48 ( <i>Rb associated protein 48</i> ) humana.
<i>lin-54</i>	Similar a Mip120 de <i>Drosophila melanogaster</i> .
<i>lin-61</i>	Homóloga de la L3MBTL2 humana, un componente del complejo PRC1L4 ( <i>Polycomb repressive complex 1-like 4</i> ) <sup>6</sup> de proteínas Polycomb.
<i>lin-65</i>	Función desconocida.
<i>mep-1</i>	Componente del complejo NuRD ( <i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</i> ).
<i>met-2</i>	Metiltransferasa de histonas.
<i>rpb-11</i>	Subunidad B de la ARN polimerasa II, ortóloga de la subunidad J3 de la ARN polimerasa II humana (POLR2J3).
<i>tam-1</i>	Probablemente mantiene los límites entre la heterocromatina y la eucromatina, junto con Lex-1 <sup>2</sup> .
<i>tra-4</i>	Parte de un complejo represor implicado en la determinación del sexo.
<i>ubc-9</i>	Enzima conjugadora E2 de ubiquitina.

<sup>1</sup>Kozlowski *et al.* (2014); <sup>2</sup>Tseng *et al.*(2007); <sup>3</sup>Boxem y van den Heuvel (2002); <sup>4</sup>Korenjak *et al.*(2004); <sup>5</sup>Lewis *et al.* (2012); <sup>6</sup>Trojer *et al.* (2011).

ligeras kappa ( $\kappa$ ) de las inmunoglobulinas (Sen y Baltimore, 1986). La NKAP humana también se une a la desacetilasa de histonas 3 (HDAC3) y forma parte del complejo correpresor Notch (Pajeroski *et al.*, 2009). HDAC3 se une al factor de transcripción Ying

Yang 1 (YY1), una proteína del grupo Polycomb (PcG), para reprimir el desarrollo de los linfocitos B (Pan *et al.*, 2012).

Las proteínas NKAP presentan un dominio muy conservado en su región carboxiterminal, que inicialmente se denominó DUF926 y más tarde SynMuv. Presenta una región aminoterminal rica en serina y arginina, a la que se ha considerado un dominio RS no canónico, con algún parecido al de las proteínas SR (Jarvelin *et al.*, 2016) que participan en el *splicing* (apartado III.2.2.2.2.- en la página 15). De hecho, la NKAP humana se ha encontrado asociada a diferentes complejos del spliceosoma, lo que sugiere que juega un papel en el *splicing* (Jurica y Moore, 2002; Bessonov *et al.*, 2008; 2010; Ilagan *et al.*, 2013). Además, la inhibición de la expresión del gen de la NKAP humana mediante ARN interferentes, en células en cultivo, altera el *splicing* de los pre-ARNm de algunos genes (Burgute *et al.*, 2014). Sin embargo, la NKAP humana se une tanto a los ARNm de genes que contienen intrones como a los que no los contienen. También se ha encontrado a la NKAP humana unida a diversos tipos de ARN no codificantes, estructurales y reguladores (Burgute *et al.*, 2014), unión que parece estar mediada por su dominio RS no canónico (Jarvelin *et al.*, 2016).

Mediante HITS-CLIP (inmunoprecipitación de proteínas asociadas a ARN [CLIP], seguida de secuenciación masiva de ARN [HITS; *High-throughput sequencing*]), se han detectado interacciones entre la NKAP humana y moléculas de ARN nuclear implicadas en el *splicing*, ARNr, ARNpno implicados en el procesamiento del pre-ARNr 45S, conocidos ARN reguladores como *XIST* y otros ARN largos no codificantes (ARNInc; *long noncoding RNA*) (Burgute *et al.*, 2014). Se ha establecido que la NKAP humana interacciona con proteínas implicadas en el *splicing* de los pre-ARNm, con factores que intervienen en el procesamiento del pre-ARNr 45S y el ensamblaje del ribosoma, con proteínas implicadas en la reparación de rupturas en las dos cadenas del ADN (DSB; *double strand break*) por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ; *non-homologous end joining*), y con factores implicados en el transporte nucleocitoplásmico de proteínas y ARNm (Tabla 2; Burgute *et al.*, 2014).

### III.5.- Mecanismos de supresión genética

La obtención de dobles mutantes permite inferir la existencia de relaciones funcionales entre los genes a estudio. Se llama sinergia a la superaditividad del fenotipo de un doble mutante respecto a los de sus mutantes simples parentales (Pérez-Pérez *et al.*, 2009). Se denomina supresión a la atenuación o anulación en un doble mutante del fenotipo de una de sus líneas parentales.

La identificación de mutaciones supresoras se realiza mutagenizando una estirpe mutante (*second site mutagenesis*). Aunque no puede descartarse la posibilidad de que se obtengan reversiones y mutaciones supresoras intragénicas, la probabilidad de estos eventos, especialmente el primero, es muy baja. Debe tenerse en cuenta que en las búsquedas de supresores no siempre se aíslan genes funcionalmente relacionados con el portador de la mutación suprimida, ya que los mecanismos de supresión pueden implicar a procesos generales como el *splicing*, la degradación, exportación o traducción de ARNm aberrantes. Se denomina informacionales a estos supresores, que en ocasiones son específicos de uno o unos pocos alelos del gen suprimido y no informan necesariamente de la función de este último (revisado en Hodgkin, 2005).

**Tabla 2.-** Interactores de la NKAP humana de función conocida o predicha

Proteína	Función <sup>a</sup>
AKAP17A/ SFRS17A	Regulación del <i>splicing</i> alternativo en precursores del ARNm <sup>1</sup>
ANXA1	Inhibición de la fosfolipasa A2. Actividad antiinflamatoria
CSE1L	Transporte nucleocitoplásmico de proteínas
DDX21	Reparación de rupturas dobles del ADN por el mecanismo de unión de extremos no homólogos <sup>2</sup>
DDX27	Ensamblaje del ribosoma en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>
DDX41	Modificación de la estructura secundaria del ARN, regulación del <i>splicing</i> nuclear y mitocondrial, y ensamblaje de los ribosomas y el spliceosoma
DDX54	Ensamblaje del ribosoma en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>4</sup>
DDX17/p72	Regulación del <i>splicing</i> alternativo <sup>5</sup>
FUS	<i>Splicing</i> de pre-ARNm y exportación de ARNm maduros al citoplasma
HEATR1	Maduración de los pre-ARNr 45S y síntesis del ribosoma
hnRNP A2/B1	Asociación con pre-ARNm en el núcleo y control del tráfico de miARN en los exosomas <sup>6</sup>
hnRNP L	Factor del <i>splicing</i>
hnRNP M	Control del <i>splicing</i> bajo condiciones de estrés térmico <sup>7</sup>
hnRNP Q	Metabolismo y transporte de los ARNm
hnRNP/SAF-A	Control global del <i>splicing</i> alternativo mediante la regulación de la maduración de la snRNP U2 <sup>8</sup>
IFI16	Inhibición de la proliferación celular
KPNB1	Transporte nucleocitoplásmico de proteínas
LFTD	Almacenamiento de hierro en estado soluble y no tóxico
LMNB1	Mantenimiento de la estabilidad del genoma y la estructura de la cromatina
NOP2/SUN2	Reparación de rupturas dobles del ADN por el mecanismo de unión de extremos no homólogos
PDCD11/RRP5	Maduración del pre-ARNr 45S <sup>9</sup>



**Tabla 2 (continuación).**- Interactores de la NKAP humana de función conocida o predicha

Proteína	Función <sup>a</sup>
PRKDC	Reparación de rupturas dobles del ADN por el mecanismo de unión de extremos no homólogos
PRPF3/PRP3	Componente del spliceosoma; se asocia con las snRNP U4 y U6
PSMD2	Componente del proteasoma
RBM39/CAPER/ CAPER- $\alpha$	Inducción de la transcripción mediada por señales hormona esteroidea-receptor. Interviene en el <i>splicing</i> alternativo <sup>10</sup>
RNPS1	Activación del <i>splicing</i> constitutivo y alternativo <sup>11</sup>
SFPQ	Factor del <i>splicing</i>
SLC3A2/4F2	Regulación de los niveles de calcio intracelular y del transporte de aminoácidos como la leucina
SNRNP200/ U5-200KD	Componente del spliceosoma
TFRC	Receptor de la transferrina
TRIM28/KAP1	Reclutamiento de metiltransferasas de histonas a la cromatina <sup>12</sup>

<sup>a</sup>Según lo anotado en el NCBI, excepto en los casos siguientes: <sup>1</sup>Jarnaess *et al.* (2009); <sup>2</sup>Zhou *et al.* (2010); <sup>3</sup>Ripmaster *et al.* (1992); <sup>4</sup>Burger *et al.* (2000); <sup>5</sup>Dardenne *et al.* (2012); <sup>6</sup>Villarroya-Beltri *et al.* (2013); <sup>7</sup>Gattoni *et al.* (1996); <sup>8</sup>Xiao *et al.* (2012); <sup>9</sup>Venema y Tollervey (1996); <sup>10</sup>Huang *et al.* (2012); <sup>11</sup>Mayeda *et al.* (1999); <sup>12</sup>Schultz *et al.* (2002).

Existen alelos mutantes de muchos de los genes que codifican diferentes componentes del spliceosoma, que alteran el *splicing*. Estos alelos se han usado en búsquedas de supresores que han permitido identificar nuevos genes cuyos productos están relacionados con el *splicing*. Son ejemplo de ello las mutaciones supresoras en genes que codifican proteínas que reconocen las señales del *splicing*. Por ejemplo, los alelos supresores *prp8* del gen *Prp8*, que codifica uno de los componentes del complejo snRNP U4/U6/U5 del spliceosoma de *Saccharomyces cerevisiae*, han hecho posible la caracterización funcional de PRP22 y PRP16, entre otras (Query y Konarska, 2004; Liu *et al.*, 2007; Hebeisen *et al.*, 2008); las mutaciones supresoras U1-3G y U1-9G restauran el defecto en el *splicing* que causa el alelo  $w^{DR18}$  del gen *white* de *Drosophila melanogaster* (Lo *et al.*, 1994); y las alteraciones del *splicing* producidas por las mutaciones en *unc-13* y *unc-73* son suprimidas por alelos de los genes que codifican las proteínas U1 de *Caenorhabditis elegans* (Zahler *et al.*, 2004; Dassah *et al.*, 2009).

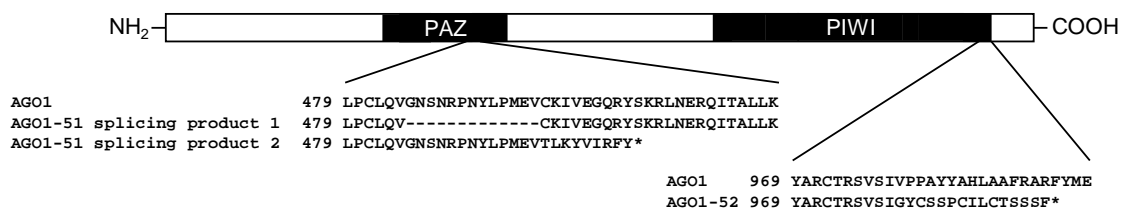
Un segundo tipo de supresores informacionales está relacionado con el *splicing* alternativo. En este caso la mutación supresora induce la inclusión o eliminación de intrones y/o exones mediante eventos de *splicing* alternativo. El *splicing* del pre-ARNm del gen *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)* genera dos transcritos alternativos que

difieren en un intrón, que está presente en la variante *ABI3-*, que codifica la proteína silvestre, y ausente de *ABI3-*, que codifica una proteína truncada (Sugliani *et al.*, 2010). El alelo *abi3-5* del gen *ABI3* es portador de una delección de un nucleótido, que altera la pauta de lectura, apareciendo un codón de terminación prematuro que trunca la proteína (Sugliani *et al.*, 2010). En una búsqueda de supresores de *abi3-5* se identificó el gen *SUA* (*SUPPRESSOR OF abi3-5*), presunto ortólogo de la RBM5 (*RNA binding motif protein 5*) humana, que suprime el *splicing* del intrón alternativo de *ABI3* (Sugliani *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2012). En los dobles mutantes *abi3-5 sua-1*, la combinación de la delección *abi3-5* y la eliminación del intrón alternativo de *sua-1* restaura la pauta de lectura del ARNm de *ABI3*, originando un transcrito *ABI3-β* que codifica una proteína funcional (Sugliani *et al.*, 2010).

### III.6.- Antecedentes y objetivos

#### III.6.1.- Aislamiento de alelos *ago1* hipomorfos

En el laboratorio de José Luis Micol se realizó un escrutinio de mutantes de morfología foliar alterada tras una mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS). Once de estos mutantes fueron agrupados en la clase fenotípica *INCURVATA* (*ICU*), por su limbo hiponástico, recurvado hacia el haz (Berná *et al.*, 1999; Robles y Micol, 2001). La clonación posicional en el laboratorio de María Rosa Ponce de las mutaciones recesivas inicialmente denominadas *icu9-1* e *icu9-2* reveló que eran nuevos alelos del gen *AGO1*, por lo que se renombraron como *ago1-51* y *ago1-52*, respectivamente (Jover-Gil *et al.*, 2005; 2012). Tal como suele ser habitual en las mutaciones inducidas por el EMS, *ago1-51* y *ago1-52* son transiciones G→A; las cuales modifican el *splicing* de *AGO1*, alterando la pauta de lectura de su ARNm (Jover-Gil *et al.*, 2012). La mutación *ago1-51* provoca la aparición de dos transcritos aberrantes, de mayor y menor tamaño que el silvestre. La variante menor codifica una proteína truncada en la que falta todo el dominio PIWI y parte del PAZ. La variante más larga se traduce a una proteína que pierde 13 aminoácidos del dominio PAZ (Jover-Gil *et al.*, 2012). Por el contrario, en los mutantes *ago1-52* solo se detectó inicialmente un transcrito que rinde una proteína truncada, con 55 aminoácidos menos que la silvestre, entre ellos los tres últimos del dominio PIWI (Figura 9; Jover-Gil *et al.*, 2012). Los mutantes *ago1-51* y *ago1-52* son viables y relativamente fértiles y su fenotipo morfológico es claramente distinguible del silvestre.



**Figura 9.-** Representación esquemática de la proteína AGO1, con indicación de los efectos de las mutaciones *ago1-51* y *ago1-52* sobre su secuencia. Se destacan en negro los dominios PAZ y PIWI. Se indican las consecuencias de las alteraciones del *splicing* que sufren los alelos *ago1-51* y *ago1-52*. Los valores numéricos indican posiciones en la secuencia aminoacídica. Tomado de Jover-Gil *et al.* (2012).

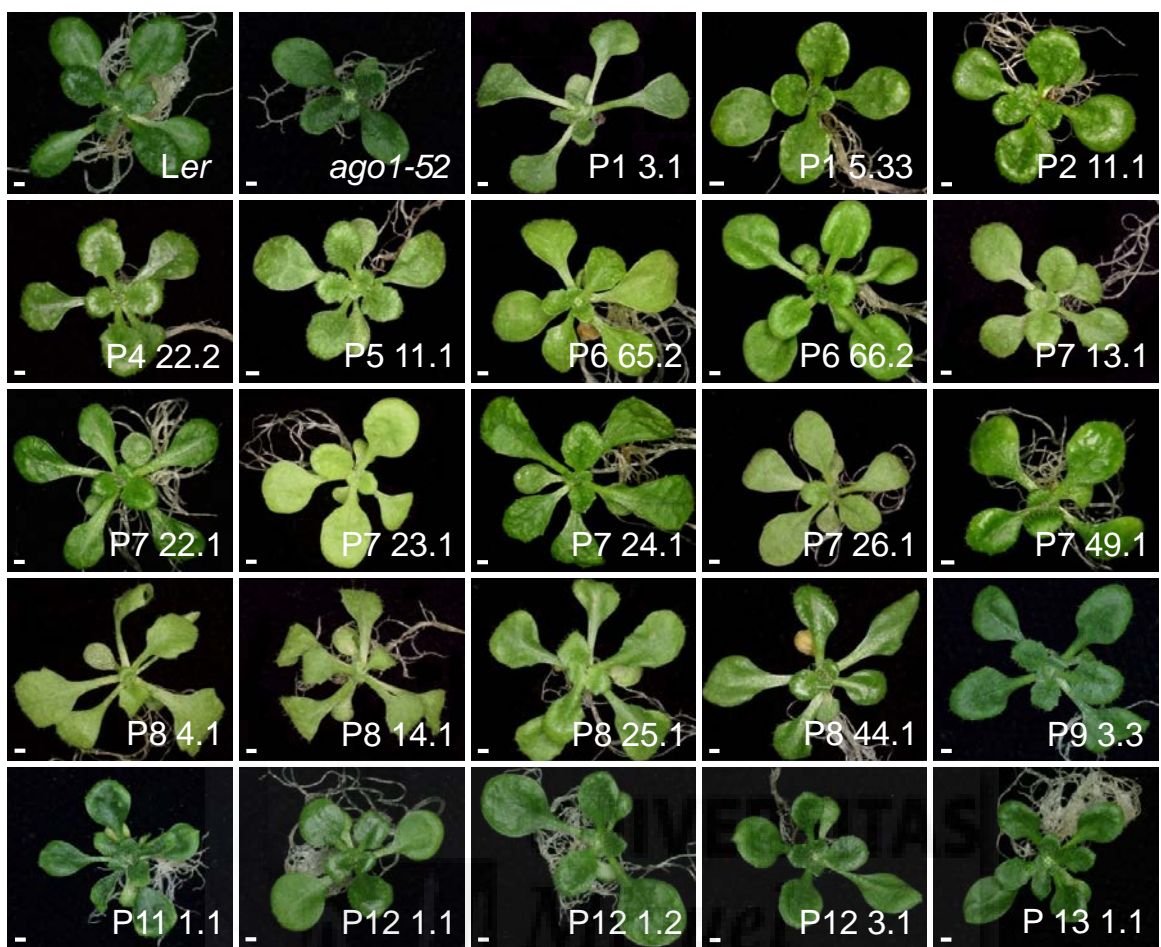
### III.6.2.- Búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de *ago1-52*

En el laboratorio de M.R. Ponce se constató que las combinaciones de alelos hipomorfos o nulos de dos genes cualesquiera de la maquinaria de los miARN manifiestan fenotipos sinérgicos (Jover-Gil *et al.*, 2005). Esta observación sugirió que la mutagénesis de *ago1-51* o *ago1-52* con EMS rendiría dobles mutantes sinérgicos cuya segunda mutación afectaría a un gen modificador, de función relacionada con AGO1. Se identificaron 4.189 presuntos dobles mutantes en los que el fenotipo de *ago1-52* se debilitaba o acentuaba, o manifestaron rasgos que la estirpe parental no mostraba (Micol-Ponce *et al.*, 2014). Solo 302 dobles mutantes completaron su ciclo de vida y resultaron fértiles, 23 de los cuales manifestaron supresión, en algunos casos completa, del fenotipo morfológico de *ago1-52* (Figura 10, en la página 32). Estas mutaciones supresoras fueron denominadas *mas* (*morphology of argonaute 1-52 suppressed*) (Micol-Ponce *et al.*, 2014).

### III.6.3.- Objetivos

Tal como se ha comentado en el apartado III.2.2.2.2 en la página 15, la participación de las proteínas SR en el *splicing* está sobradamente demostrada en diferentes sistemas biológicos. La clonación posicional del gen *MAS2* en el laboratorio de M.R. Ponce reveló que codifica una proteína homóloga de las NKAP (*NF-kappa B Activating Protein*) de los metazoos. La NKAP humana presenta una región aminoterminal a la que se ha considerado un dominio RS no canónico y se ha encontrado asociada a diferentes complejos del spliceosoma.

El objetivo inicial de esta tesis fue caracterizar funcionalmente el gen *MAS2* de *Arabidopsis*. Se planteó para ello (1) la identificación del máximo número posible de



**Figura 10.-** Rosetas de las líneas supresoras identificadas tras una mutagénesis con EMS del mutante *ago1-52*. Las líneas mutantes se denotan con su número de protocolo, en la forma PN X.Y, en donde PN indica el grupo parental de procedencia, X es el número de la placa de Petri en la que se aisló el mutante M2, e Y es el ordinal que corresponde a cada uno de los mutantes encontrados en una misma placa. Las fotografías fueron tomadas 21 días después de la estratificación. Las barras de escala indican 1 mm. Tomado de Micol-Ponce *et al.* (2014).

presuntos alelos *mas2* puntuales e insercionales, la realización de los correspondientes ensayos de alelismo y la determinación de su dominancia, recesividad y eventual letalidad, (2) la obtención de miARN artificiales *amiR-MAS2* que produjeren una insuficiencia genuina pero parcial de la función del gen *MAS2*, (3) la obtención de construcciones que permitiesen el rescate fenotípico de los mutantes *mas2*, la visualización del patrón de expresión espacial y temporal del gen *MAS2* y la determinación de la localización subcelular de la proteína *MAS2*, (4) la determinación de la naturaleza molecular del efecto supresor de las mutaciones *mas2* sobre *ago1-52* y otros alelos mutantes de *AGO1*, (5) la realización de los ensayos genéticos y moleculares que se requiriesen para definir la función y las interacciones del gen *MAS2* y la proteína

MAS2, que en principio debían incluir al menos la obtención y el estudio de dobles mutantes y una búsqueda de interactores de MAS2 basada en el ensayo del doble híbrido de la levadura, y (6) la formulación de una hipótesis sobre la función de MAS2, al que inicialmente suponíamos relacionado con alguna faceta del metabolismo del ARN.

La constatación de que las mutaciones *mas2* solo suprimen el fenotipo de los alelos de *AGO1* cuyo *splicing* está alterado nos indujo a proponernos un objetivo sobrevenido: el análisis de los productos del gen *AGO1* en los dobles mutantes *ago1 mas2*, tanto a nivel de transcritos como de proteínas. Los indicios de la relación de MAS2 con los organizadores nucleolares y la regulación de la expresión del ADNr 45S también nos hicieron proponernos objetivos adicionales a los iniciales: la realización de ensayos de hibridación *in situ* fluorescente para establecer la eventual colocalización de MAS2 y los genes del ADNr 45S y el estudio de la metilación de las regiones reguladoras de estos últimos.







## **IV.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN**





## IV.- BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN

- Abou-Ellail, M., Cooke, R., y Saez-Vasquez, J. (2011). Variations in a team: major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**, 294-299.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Allfrey, V.G., y Mirsky, A.E. (1964). Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science* **144**, 559.
- Arber, W., y Dussoix, D. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *Journal of Molecular Biology* **5**, 18-36.
- Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Reviews of Plant Biology* **64**, 137-159.
- Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K.A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* **13**, 152-156.
- Bannister, A.J., y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**, 381-395.
- Barta, A., Kalyna, M., y Reddy, A.S. (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell* **22**, 2926-2929.
- Bartke, T., Borgel, J., y DiMaggio, P.A. (2013). Proteomics in epigenetics: new perspectives for cancer research. *Briefings of Functional Genomics* **12**, 205-218.
- Berná, G., Robles, P., y Micol, J.L. (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., y Luhrmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**, 846-850.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Urlaub, H., Stark, H., y Luhrmann, R. (2010). Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* **16**, 2384-2403.
- Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Reviews of Biochemistry* **72**, 291-336.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., y Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO Journal* **17**, 170-180.
- Bowman, J., 1994. Embryogenesis. En *Arabidopsis. An Atlas of Morphology and Development*. pp. 349-401. Bowman, J. (ed.). Springer-Verlag.
- Boxem, M., y van den Heuvel, S. (2002). *C. elegans* class B synthetic multivulva genes act in G(1) regulation. *Current Biology* **12**, 906-911.
- Brodersen, P., y Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**, 268-280.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., y Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- Burger, F., Daugeron, M.C., y Linder, P. (2000). Dbp10p, a putative RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Research* **28**, 2315-2323.
- Burgess, R.J., y Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nature Structural and Molecular Biology* **20**, 14-22.

- Burgute, B.D., Peche, V.S., Steckelberg, A.L., Glockner, G., Gassen, B., Gehring, N.H., y Noegel, A.A. (2014). NKAP is a novel RS-related protein that interacts with RNA and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Research* **42**, 3177-3193.
- Busch, A., y Hertel, K.J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA* **3**, 1-12.
- Canzio, D., Larson, A., y Narlikar, G.J. (2014). Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends in Cell Biology* **24**, 377-386.
- Carpenter, C.D., Kreps, J.A., y Simon, A.E. (1994). Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology* **104**, 1015-1025.
- Ceol, C.J., y Horvitz, H.R. (2004). A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signaling. *Developmental Cell* **6**, 563-576.
- Ciuzan, O., Hancock, J., Pamfil, D., Wilson, I., y Ladomery, M. (2015). The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. *Physiologia Plantarum* **153**, 1-11.
- Cloix, C., Tutois, S., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G., y Tourmente, S. (2000). Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Research* **10**, 679-690.
- Clouaire, T., Roussigne, M., Ecochard, V., Mathe, C., Amalric, F., y Girard, J.P. (2005). The THAP domain of THAP1 is a large C2CH module with zinc-dependent sequence-specific DNA-binding activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **102**, 6907-6912.
- Cogoni, C., Romano, N., y Macino, G. (1994). Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 205-209.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., y Jacobsen, S.E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**, 215-219.
- Chapman, E.J., y Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* **8**, 884-896.
- Chen, D., Li, Z., Yang, Q., Zhang, J., Zhai, Z., y Shu, H.B. (2003). Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**, 720-724.
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* **25**, 21-44.
- Dardenne, E., Pierredon, S., Driouch, K., Gratadou, L., Lacroix-Triki, M., Espinoza, M.P., Zonta, E., Germann, S., Mortada, H., Villemin, J.P., Dutertre, M., Lidereau, R., Vagner, S., y Auboeuf, D. (2012). Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**, 1139-1146.
- Das, C., y Tyler, J.K. (2013). Histone exchange and histone modifications during transcription and aging. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**, 332-342.
- Dassah, M., Patzek, S., Hunt, V.M., Medina, P.E., y Zahler, A.M. (2009). A genetic screen for suppressors of a mutated 5' splice site identifies factors associated with later steps of spliceosome assembly. *Genetics* **182**, 725-734.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., y Pikaard, C.S. (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes and Development* **24**, 1119-1132.

- Ellis, J.D., Barrios-Rodiles, M., Colak, R., Irimia, M., Kim, T., Calarco, J.A., Wang, X., Pan, Q., O'Hanlon, D., Kim, P.M., Wrana, J.L., y Blencowe, B.J. (2012). Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Molecular Cell* **46**, 884-892.
- Fay, D.S., y Yochem, J. (2007). The SynMuv genes of *Caenorhabditis elegans* in vulval development and beyond. *Developmental Biology* **306**, 1-9.
- Felix, M.A. (2007). Cryptic quantitative evolution of the vulva intercellular signaling network in *Caenorhabditis*. *Current Biology* **17**, 103-114.
- Ferguson, E.L., y Horvitz, H.R. (1985). Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **110**, 17-72.
- Ferguson, E.L., Sternberg, P.W., y Horvitz, H.R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **326**, 259-267.
- Ferguson, E.L., y Horvitz, H.R. (1989). The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics* **123**, 109-121.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fu, Y., Luo, G.Z., Chen, K., Deng, X., Yu, M., Han, D., Hao, Z., Liu, J., Lu, X., Dore, L.C., Weng, X., Ji, Q., Mets, L., y He, C. (2015). N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell* **161**, 879-892.
- Gattoni, R., Mahe, D., Mahl, P., Fischer, N., Mattei, M.G., Stevenin, J., y Fuchs, J.P. (1996). The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Research* **24**, 2535-2542.
- Gomes, A.Q., Nolasco, S., y Soares, H. (2013). Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International Journal of Molecular Science* **14**, 16010-16039.
- Greer, E.L., Blanco, M.A., Gu, L., Sendinc, E., Liu, J., Aristizabal-Corrales, D., Hsu, C.H., Aravind, L., He, C., y Shi, Y. (2015). DNA methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell* **161**, 868-878.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pointner, R., y Schweizer, D. (1989). Nucleotide sequence of the 25S-18S ribosomal gene spacer from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **17**, 6395-6396.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K., y Schweizer, D. (1991). rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana*. Structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *Journal of Molecular Biology* **221**, 1209-1222.
- Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes and Development* **17**, 1691-1702.
- Gutierrez, R.M., y Hnilica, L.S. (1967). Tissue specificity of histone phosphorylation. *Science* **157**, 1324-1325.
- Han, S.P., Tang, Y.H., y Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochemical Journal* **430**, 379-392.
- Han, Y., y Garcia, B.A. (2013). Combining genomic and proteomic approaches for epigenetics research. *Epigenomics* **5**, 439-452.
- Harshman, S.W., Young, N.L., Parthun, M.R., y Freitas, M.A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Research* **41**, 9593-9609.
- Hebeisen, M., Drysdale, J., y Roy, R. (2008). Suppressors of the *cdc-25.1(gf)*-associated intestinal hyperplasia reveal important maternal roles for *prp-8* and a subset of splicing factors in *C. elegans*. *RNA* **14**, 2618-2633.
- Heintzen, C., Melzer, S., Fischer, R., Kappeler, S., Apel, K., y Staiger, D. (1994). A light- and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant Journal* **5**, 799-813.

- Heyn, H., y Esteller, M. (2015). An adenine code for DNA: a second life for N6-methyladenine. *Cell* **161**, 710-713.
- Höck, J., y Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology* **9**, 210.
- Hodgkin, J. (2005). Genetic suppression. *WormBook* 1-13.
- Hoffer, P., Ivashuta, S., Pontes, O., Vitins, A., Pikaard, C., Mroczka, A., Wagner, N., y Voelker, T. (2011). Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **108**, 409-414.
- Horvitz, H.R., y Sulston, J.E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **96**, 435-454.
- Hoskins, A.A., y Moore, M.J. (2012). The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 179-188.
- Howell, A.M., y Rose, A.M. (1990). Essential genes in the hDf6 region of chromosome I in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **126**, 583-592.
- Huang, G., Zhou, Z., Wang, H., y Kleinerman, E.S. (2012). CAPER-alpha alternative splicing regulates the expression of vascular endothelial growth factor(1)(6)(5) in Ewing sarcoma cells. *Cancer* **118**, 2106-2116.
- Huelga, S.C., Vu, A.Q., Arnold, J.D., Liang, T.Y., Liu, P.P., Yan, B.Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Hoon, S., Brenner, S., Ares, M., Jr., y Yeo, G.W. (2012). Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Reports* **1**, 167-178.
- Ilagan, J.O., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., y Jurica, M.S. (2013). Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *RNA* **19**, 400-412.
- Jacob, F., y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* **3**, 318-356.
- Jarnaess, E., Stokka, A.J., Kvissel, A.K., Skalhegg, B.S., Torgersen, K.M., Scott, J.D., Carlson, C.R., y Tasken, K. (2009). Splicing factor arginine/serine-rich 17A (SFRS17A) is an A-kinase anchoring protein that targets protein kinase A to splicing factor compartments. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35154-35164.
- Jarvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I., y Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Communication Signaling* **14**, 9.
- Jin, W., Niu, Z., Xu, D., y Li, X. (2012). RBM5 promotes exon 4 skipping of AID pre-mRNA by competing with the binding of U2AF65 to the polypyrimidine tract. *FEBS Letters* **586**, 3852-7.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., y Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review in Plant Biology* **57**, 19-53.
- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.R. (2005). Plant microRNAs and development. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 733-744.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., y Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1322-1333.
- Jurica, M.S., y Moore, M.J. (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* **28**, 336-345.
- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., y Carrington, J.C. (2007). Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biology* **5**, e57.
- Kawamata, T., y Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 368-376.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., y Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. *Gene* **514**, 1-30.
- Kennerdell, J.R., y Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.

- Kim, C.Y., Bove, J., y Assmann, S.M. (2008). Overexpression of wound-responsive RNA-binding proteins induces leaf senescence and hypersensitive-like cell death. *New Phytologist* **180**, 57-70.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., y Schmidt, T.M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1328-1333.
- Klose, R.J., y Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 89-97.
- Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binne, U.K., Satterlee, J.S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., y Brehm, A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* **119**, 181-193.
- Kornberg, R.D., y Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Koster, T., Meyer, K., Weinholdt, C., Smith, L.M., Lummer, M., Speth, C., Grosse, I., Weigel, D., y Staiger, D. (2014). Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* **42**, 9925-9936.
- Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* **128**, 802.
- Kozlowski, L., Garvis, S., Bedet, C., y Palladino, F. (2014). The Caenorhabditis elegans HP1 family protein HPL-2 maintains ER homeostasis through the UPR and hormesis. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* **111**, 5956-5961.
- Laferte, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., y Chedin, S. (2006). The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes and Development* **20**, 2030-2040.
- Lam, S.Y., Horn, S.R., Radford, S.J., Housworth, E.A., Stahl, F.W., y Copenhaver, G.P. (2005). Crossover interference on nucleolus organizing region-bearing chromosomes in Arabidopsis. *Genetics* **170**, 807-812.
- Law, J.A., y Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* **11**, 204-220.
- Lawrence, R.J., y Pikaard, C.S. (2004). Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle* **3**, 880-883.
- Layat, E., Saez-Vasquez, J., y Tourmente, S. (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* **53**, 267-276.
- Leeds, N.B., Small, E.C., Hiley, S.L., Hughes, T.R., y Staley, J.P. (2006). The splicing factor Prp43p, a DEAH box ATPase, functions in ribosome biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 513-522.
- Lewis, P.W., Sahoo, D., Geng, C., Bell, M., Lipsick, J.S., y Botchan, M.R. (2012). Drosophila *lin-52* acts in opposition to repressive components of the Myb-MuvB/dREAM complex. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 3218-3227.
- Li, G., y Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current Opinion in Genetics and Development* **21**, 175-186.
- Liu, L., Query, C.C., y Konarska, M.M. (2007). Opposing classes of *prp8* alleles modulate the transition between the catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 519-526.
- Lo, P.C., Roy, D., y Mount, S.M. (1994). Suppressor U1 snRNAs in Drosophila. *Genetics* **138**, 365-378.
- Long, J.C., y Caceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal* **417**, 15-27.
- Loraine, A.E., McCormick, S., Estrada, A., Patel, K., y Qin, P. (2013). RNA-seq of Arabidopsis pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiology* **162**, 1092-1109.
- Lu, C., Kulkarni, K., Souret, F.F., MuthuValliappan, R., Tej, S.S., Poethig, R.S., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., Wang, W., Green, P.J., y Meyers, B.C. (2006). MicroRNAs and other small

- RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Research* **16**, 1276-1288.
- Luger, K., y Hansen, J.C. (2005). Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 188-196.
- Mallory, A., y Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* **22**, 3879-3889.
- Mallory, A.C., Hinze, A., Tucker, M.R., Bouché, N., Gascioli, V., Elmayan, T., Laressergues, D., Jauvion, V., Vaucheret, H., y Laux, T. (2009). Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genetics* **5**, e1000646.
- Maniatis, T., y Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**, 499-506.
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J.F., Revil, T., y Chabot, B. (2007). hnRNP proteins and splicing control. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **623**, 123-147.
- Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A.V., Colot, V., Schubert, I., y Tourmente, S. (2003). Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2929-2939.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., y Matzke, A.J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 367-376.
- Mayeda, A., Badolato, J., Kobayashi, R., Zhang, M.Q., Gardiner, E.M., y Krainer, A.R. (1999). Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO Journal* **18**, 4560-4570.
- Maze, I., Noh, K.M., Soshnev, A.A., y Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nature Reviews Genetics* **15**, 259-271.
- Meyer, K., Koester, T., y Staiger, D. (2015). Pre-mRNA splicing in plants: *in vivo* functions of RNA-binding proteins implicated in the splicing process. *Biomolecules* **5**, 1717-1740.
- Meyerowitz, E.M. (1994). Pattern formation in plant development: four vignettes. *Current Opinion in Genetics and Development* **4**, 602-608.
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., y Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of Arabidopsis *ARGONAUTE1*. *Scientific Reports* **4**, 5533.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., y Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**, 128-141.
- Mueller, W.F., y Hertel, K.J., 2011. The role of SR and SR-related proteins in pre-mRNA splicing. En *RNA Binding Proteins*. Lorkovic, Z. (ed.). Landes Bioscience and Springer Science.
- Musselman, C.A., Lalonde, M.E., Côté, J., y Kutateladze, T.G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**, 1218-1227.
- Napoli, C., Lemieux, C., y Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Narlikar, G.J. (2010). A proposal for kinetic proof reading by ISWI family chromatin remodeling motors. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**, 660-665.
- Nicaise, V., Joe, A., Jeong, B.R., Korneli, C., Boutrot, F., Westedt, I., Staiger, D., Alfano, J.R., y Zipfel, C. (2013). *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO Journal* **32**, 701-712.
- Noyer-Weidner, M., y Trautner, T.A. (1993). Methylation of DNA in prokaryotes. En *DNA methylation: molecular Biology and biological significance*. *Experientia Supplementum* **64**, pp. 39-108. Jost, J.P. and Saluz, H.P. (ed). Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.

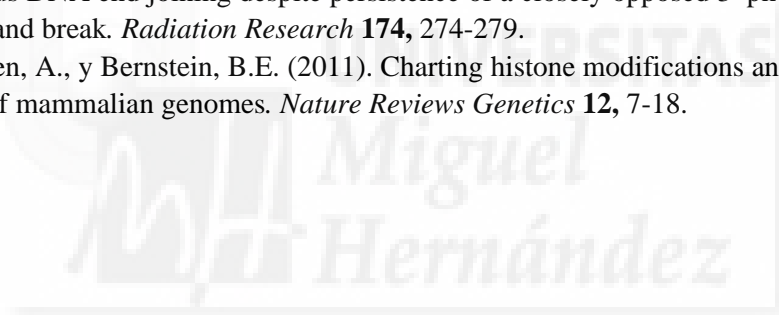
- Pajerowski, A.G., Nguyen, C., Aghajanian, H., Shapiro, M.J., y Shapiro, V.S. (2009). NKAP is a transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development. *Immunity* **30**, 696-707.
- Pan, X., Jones, M., Jiang, J., Zaprazna, K., Yu, D., Pear, W., Maillard, I., y Atchison, M.L. (2012). Increased expression of PcG protein YY1 negatively regulates B cell development while allowing accumulation of myeloid cells and LT-HSC cells. *PLoS One* **7**, e30656.
- Parker, J.S. (2010). How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* **1**, 3.
- Patel, D.J., y Wang, Z. (2013). Readout of epigenetic modifications. *Annual Review of Biochemistry* **82**, 81-118.
- Pérez-Pérez, J.M., Candela, H., y Micol, J.L. (2009). Understanding synergy in genetic interactions. *Trends in Genetics* **25**, 368-376.
- Pontvianne, F., Abou-Elail, M., Douet, J., Comella, P., Matia, I., Chandrasekhara, C., Debures, A., Blevins, T., Cooke, R., Medina, F.J., Tourmente, S., Pikaard, C.S., y Saez-Vasquez, J. (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **6**, e1001225.
- Poulin, G., Dong, Y., Fraser, A.G., Hopper, N.A., y Ahringer, J. (2005). Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* **24**, 2613-2623.
- Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W.B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D., y McCourt, P. (2016). 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**, 921-944.
- Pumplin, N., y Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 745-760.
- Query, C.C., y Konarska, M.M. (2004). Suppression of multiple substrate mutations by spliceosomal *prp8* alleles suggests functional correlations with ribosomal ambiguity mutants. *Molecular Cell* **14**, 343-354.
- Rajeevkumar, S., Anunanthini, P., y Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 693.
- Raska, I., Koberna, K., Malinsky, J., Fidlerova, H., y Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell* **96**, 579-594.
- Rauch, H.B., Patrick, T.L., Klusman, K.M., Battistuzzi, F.U., Mei, W., Brendel, V.P., y Lal, S.K. (2014). Discovery and expression analysis of alternative splicing events conserved among plant SR proteins. *Molecular Biology and Evolution* **31**, 605-613.
- Reddy, A.S., Marquez, Y., Kalyna, M., y Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* **25**, 3657-3683.
- Ripmaster, T.L., Vaughn, G.P., y Woolford, J.L., Jr. (1992). A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proceeding of National Academy of Sciences of USA* **89**, 11131-11135.
- Robles, P., y Micol, J.L. (2001). Genome-wide linkage analysis of Arabidopsis genes required for leaf development. *Molecular Genetics and Genomics* **266**, 12-19.
- Rothbart, S.B., y Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta* **1839**, 627-643.
- Ruhl, C., Stauffer, E., Kahles, A., Wagner, G., Drechsel, G., Ratsch, G., y Wachter, A. (2012). Polypyrimidine tract binding protein homologs from Arabidopsis are key regulators of alternative splicing with implications in fundamental developmental processes. *Plant Cell* **24**, 4360-4375.
- Ruiz, F., Vayssié, L., Klotz, C., Sperling, L., y Madeddu, L. (1998). Homology-dependent gene silencing in Paramecium. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 931-943.

- Schmidt, F., Marnef, A., Cheung, M.K., Wilson, I., Hancock, J., Staiger, D., y Ladomery, M. (2010). A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced *Arabidopsis thaliana* RNA-binding proteins AtGRP7 and AtGRP8. *Molecular Biology Reports* **37**, 839-845.
- Schoning, J.C., Streitner, C., Meyer, I.M., Gao, Y., y Staiger, D. (2008). Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **36**, 6977-6987.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., y Rauscher, F.J., 3rd (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes and Development* **16**, 919-932.
- Sen, R., y Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928.
- Sharp, P.A., y Burge, C.B. (1997). Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* **91**, 875-879.
- Sharp, P.A. (2005). The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 279-281.
- Shaw, P.J., y Jordan, E.G. (1995). The nucleolus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**, 93-121.
- Shi, Y., y Manley, J.L. (2007). A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock. *Molecular Cell* **28**, 79-90.
- Simard, M.J., y Chabot, B. (2002). SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4001-4010.
- Simpson, C.G., Manthri, S., Raczynska, K.D., Kalyna, M., Lewandowska, D., Kusenda, B., Maronova, M., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., Barta, A., y Brown, J.W. (2010). Regulation of plant gene expression by alternative splicing. *Biochemical Society Transactions* **38**, 667-671.
- Singh, R.K., Gase, K., Baldwin, I.T., y Pandey, S.P. (2015). Molecular evolution and diversification of the Argonaute family of proteins in plants. *BMC Plant Biology* **15**, 23.
- Soldi, M., Cuomo, A., Bremang, M., y Bonaldi, T. (2013). Mass spectrometry-based proteomics for the analysis of chromatin structure and dynamics. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 5402-5431.
- Strahl, B.D., y Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes and Development* **12**, 599-606.
- Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1-4.
- Sugliani, M., Brambilla, V., Clercx, E.J., Koornneef, M., y Soppe, W.J. (2010). The conserved splicing factor SUA controls alternative splicing of the developmental regulator ABI3 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 1936-1946.
- Sulston, J.E., y Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **56**, 110-156.
- Sun, Y., Jiang, X., y Price, B.D. (2010). Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell Cycle* **9**, 930-936.
- Sundaram, M.V. (2005). The love-hate relationship between Ras and Notch. *Genes and Development* **19**, 1825-1839.
- Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E.V., Patel, D.J., y van der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* **21**, 743-753.



- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., y Brown, J.W. (2012). Alternative splicing in plants--coming of age. *Trends in Plant Science* **17**, 616-623.
- Talbert, P.B., y Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 264-275.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 106-114.
- Taunton, J., Hassig, C.A., y Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., y Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 1025-1040.
- The *Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012-2018.
- Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Farnham, P.J., y Reinberg, D. (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Molecular Cell* **42**, 438-450.
- Tseng, R.J., Armstrong, K.R., Wang, X., y Chamberlin, H.M. (2007). The bromodomain protein LEX-1 acts with TAM-1 to modulate gene expression in *C. elegans*. *Molecular Genetics and Genomics* **278**, 507-518.
- Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.
- Unfried, I., Stocker, U., y Gruendler, P. (1989). Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Co1-0. *Nucleic Acids Research* **17**, 7513.
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., y Stuitje, A.R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**, 350-8.
- Venema, J., y Tollervey, D. (1996). RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. *EMBO Journal* **15**, 5701-5714.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., y Mann, M. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* **142**, 967-980.
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Madrid, F., y Mittelbrunn, M. (2013). Analysis of microRNA and protein transfer by exosomes during an immune synapse. *Methods in Molecular Biology* **1024**, 41-51.
- Voinnet, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* **13**, 317-328.
- Wachter, A., Ruhl, C., y Stauffer, E. (2012). The role of polypyrimidine tract-binding proteins and other hnRNP proteins in plant splicing regulation. *Frontiers in Plant Science* **3**, 81.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G.S., Tuschl, T., y Patel, D.J. (2009). Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754-761.
- Weis, B.L., Kovacevic, J., Missbach, S., y Schleiff, E. (2015). Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends in Plant Science* **20**, 729-740.
- Will, C.L., y Lührmann, R., 2011. En *Spliceosome Structure and Function*. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* **3**, pp. a003707. Atkins, J. F., Gesteland, R.F., y Cech, T.R. (ed). Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Wion, D., y Casadesús, J. (2006). N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 183-192.

- Wu, J.Y., Kar, A., Kuo, D., Yu, B., y Havlioglu, N. (2006). SRp54 (SFRS11), a regulator for Tau exon 10 alternative splicing identified by an expression cloning strategy. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 6739-6747.
- Xiao, R., Tang, P., Yang, B., Huang, J., Zhou, Y., Shao, C., Li, H., Sun, H., Zhang, Y., y Fu, X.D. (2012). Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation. *Molecular Cell* **45**, 656-668.
- Xie, Z., y Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1779**, 720-724.
- Zahler, A.M., Tuttle, J.D., y Chisholm, A.D. (2004). Genetic suppression of intronic +1G mutations by compensatory U1 snRNA changes in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **167**, 1689-1696.
- Zhang, G., Huang, H., Liu, D., Cheng, Y., Liu, X., Zhang, W., Yin, R., Zhang, D., Zhang, P., Liu, J., Li, C., Liu, B., Luo, Y., Zhu, Y., Zhang, N., He, S., He, C., Wang, H., y Chen, D. (2015). N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* **161**, 893-906.
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B.C., y Walbot, V. (2015). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 84-90.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., y Ecker, J.R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**, 1189-1201.
- Zhou, R.Z., Akopiants, K., y Povirk, L.F. (2010). Patching and single-strand ligation in nonhomologous DNA end joining despite persistence of a closely opposed 3'-phosphoglycolate-terminated strand break. *Radiation Research* **174**, 274-279.
- Zhou, V.W., Goren, A., y Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* **12**, 7-18.





## **V.- PUBLICACIONES**



The Plant Cell, Vol. 27: 1999–2015, July 2015, www.plantcell.org © 2015 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

# Arabidopsis *MAS2*, an Essential Gene That Encodes a Homolog of Animal NF- $\kappa$ B Activating Protein, Is Involved in 45S Ribosomal DNA Silencing

Ana Belén Sánchez-García,<sup>1</sup> Verónica Aguilera,<sup>1,2</sup> Rosa Micol-Ponce, Sara Jover-Gil, and María Rosa Ponce<sup>3</sup>

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche, Alicante, Spain

ORCID IDs: 0000-0002-1315-8400 (A.B.S.-G.); 0000-0003-3885-6624 (V.A.); 0000-0001-9389-2906 (R.M.-P.); 0000-0003-0770-4230 (M.R.P.)

**Ribosome biogenesis requires stoichiometric amounts of ribosomal proteins and rRNAs. Synthesis of rRNAs consumes most of the transcriptional activity of eukaryotic cells, but its regulation remains largely unclear in plants. We conducted a screen for ethyl methanesulfonate-induced suppressors of *Arabidopsis thaliana ago1-52*, a hypomorphic allele of *AGO1* (*ARGONAUTE1*), a key gene in microRNA pathways. We identified nine extragenic suppressors as alleles of *MAS2* (*MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED2*). Positional cloning showed that *MAS2* encodes the putative ortholog of NKAP (NF- $\kappa$  B activating protein), a conserved eukaryotic protein involved in transcriptional repression and splicing in animals. The *mas2* point mutations behave as informational suppressors of *ago1* alleles that cause missplicing. *MAS2* is a single-copy gene whose insertional alleles are embryonic lethal. In yeast two-hybrid assays, *MAS2* interacted with splicing and ribosome biogenesis proteins, and fluorescence in situ hybridization showed that *MAS2* colocalizes with the 45S rDNA at the nucleolar organizer regions (NORs). The artificial microRNA *amiR-MAS2* partially repressed *MAS2* and caused hypomethylation of 45S rDNA promoters as well as partial NOR decondensation, indicating that *MAS2* negatively regulates 45S rDNA expression. Our results thus reveal a key player in the regulation of rRNA synthesis in plants.**

## INTRODUCTION

The regulation of eukaryotic gene expression involves multiple precisely controlled and coordinated transcriptional and post-transcriptional processes. For example, nuclear rRNA genes are tightly regulated, as transcription of rRNAs involves a vast amount of cell resources, representing ~50% of transcription in many eukaryotic cells (reviewed in Grummt, 2003). Assembly of the ribosome requires stoichiometric amounts of rRNAs and ribosomal proteins (Laferté et al., 2006). *Arabidopsis thaliana* contains ~1000 tandemly arrayed copies of the 5S rRNA gene and 570 to 750 copies of the 45S rRNA gene per haploid genome (Layat et al., 2012). Not all rRNA genes are transcribed at a given cell; active genes are enriched in euchromatin and silenced genes in heterochromatin (Lawrence et al., 2004). Transcription of the genes in rDNA depends on the action of enzymes that regulate histone methylation and acetylation, DNA methylation, and nucleosome positioning (Layat et al., 2012).

In humans, the NF- $\kappa$  B activating protein (NKAP) activates nuclear factor- $\kappa$  B (Chen et al., 2003) and is a component of the Notch corepressor complex (Pajeroski et al., 2009). NOTCH proteins are transmembrane receptors involved in several conserved pathways that regulate cellular differentiation,

proliferation, and apoptosis in animals (Bray, 2006). Human NKAP has also been found bound to different spliceosomal complexes (Jurica and Moore, 2002; Bessonov et al., 2008, 2010; Ilagan et al., 2013) and to pre-mRNAs and spliced mRNAs (Burgute et al., 2014). A role has been proposed for human NKAP in regulating constitutive splicing. NKAP interacts with several RNA binding proteins, including splicing factors; it binds to exons in pre-mRNAs as well as to small nuclear RNAs, small nucleolar RNAs, rRNAs, and long intergenic noncoding RNAs. *XIST* (*X-inactive-specific transcript*) regulatory RNA, the major effector of X chromosome epigenetic inactivation, has also been found bound to NKAP (Burgute et al., 2014).

NKAP is a conserved eukaryotic protein that was first discovered in *Caenorhabditis elegans* and named E01A2.4 or LET-504 (Howell and Rose, 1990). Based on the interactions of its mutant alleles and their effects on vulvar development, *let-504* was classified as a class B Synthetic Multivulva (SynMuv) gene (Poulin et al., 2005); genes of this class encode proteins involved in epigenetic repression of gene expression (Saffer et al., 2011). The NKAP family is defined by the presence of a domain that was initially named DUF926 and later SynMuv.

One posttranscriptional regulatory mechanism is mediated by microRNAs, a class of eukaryotic endogenous small RNAs (20 to 24 nucleotides) that modulate a wide variety of processes (Jones-Rhoades et al., 2006; Bartel, 2009; Voinnet, 2009). Plant microRNAs play their regulatory role in the cytoplasm, through their selective loading into an ARGONAUTE (AGO) protein, the best known of which is AGO1 (Bartel, 2009; Mallory and Vaucheret, 2010). AGO proteins form the core component of RNA-induced silencing complexes (Voinnet, 2009; Rogers and Chen, 2013).

Here, we describe a characterization of *MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED2* (*MAS2*), the *Arabidopsis* putative

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Current address: Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Address correspondence to mrponce@umh.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: María Rosa Ponce (mrponce@umh.es).

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.15.00135

ortholog of human *NKAP*. We isolated 11 *mas2* alleles, nine of which behave as informational suppressors of two hypomorphic *ago1* alleles that exhibit missplicing. We found *MAS2* to be an essential gene whose protein product colocalizes with and regulates expression of the 45S rDNA.

## RESULTS

### The *mas2-1* Mutation Is an Extragenic Suppressor of *ago1-52*

We previously isolated and studied *ago1-52* (Berná et al., 1999; Jover-Gil et al., 2005; Jover-Gil et al., 2012), a hypomorphic, viable allele of *AGO1*. To study the regulation, action, and interactions of *AGO1*, we conducted a genetic screen to identify ethyl methanesulfonate (EMS)-induced second-site mutations suppressing the morphological phenotype of *ago1-52*; we termed these extragenic suppressors *morphology of argonaute1-52 suppressed (mas)* mutations (Micol-Ponce et al., 2014). One of the lines isolated was given the P2 11.1 protocol number and carried a suppressor mutation that we named *mas2-1*.

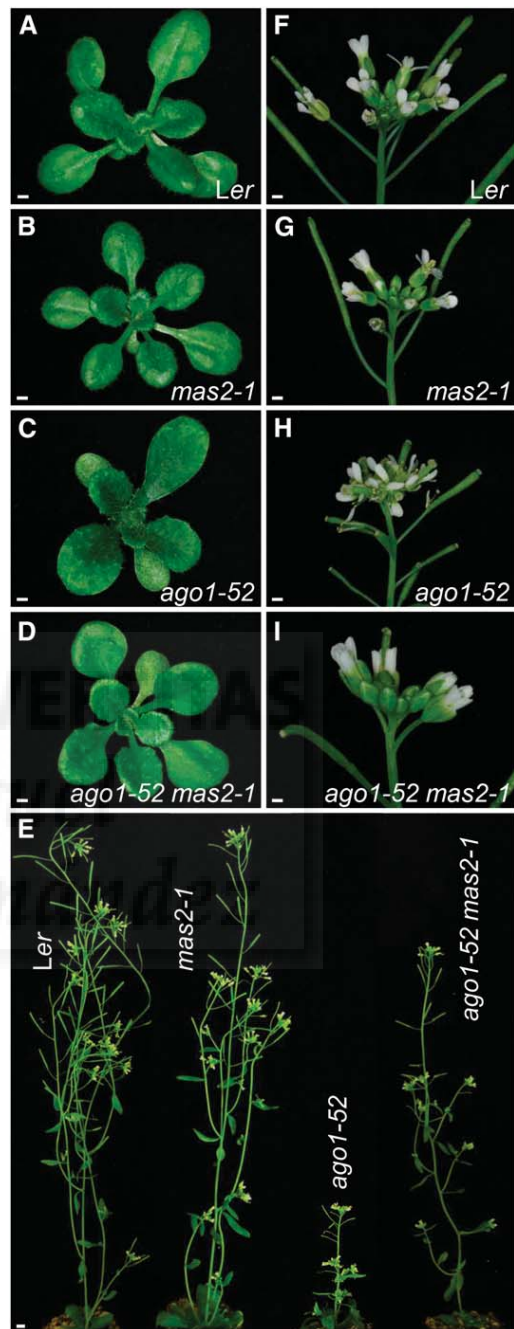
The *ago1-52* mutant exhibits a pleiotropic phenotype, consisting of leaves with no clear boundary between petiole and lamina, partial loss of adaxial-abaxial polarity in leaves and floral organs, compact inflorescences, moderately low fertility, slow growth, reduced plant size and number of vegetative leaves, and late flowering (Jover-Gil et al., 2012; Micol-Ponce et al., 2014). The *ago1-52 mas2-1* plants were closer in phenotype to the wild-type *Landsberg erecta (Ler)* than to the *ago1-52* mutant. In these double mutant plants, we observed a clear boundary between leaf lamina and petiole (Figures 1A to 1D). Also, their growth rate, height, flowering time, and fertility were intermediate between those of *ago1-52* and *Ler*, and their general body architecture, inflorescences, and fruits looked almost wild type (Figures 1E to 1I).

To reduce the number of EMS-induced mutations, we backcrossed P2 11.1 twice to *Ler*. In the progeny of these backcrosses, the *mas2-1* mutation did not cause any visible phenotype on its own in an *AGO1/AGO1* background (Figure 1B), and its suppressor effect seemed to be dominant.

### *MAS2* Encodes the Putative Arabidopsis Ortholog of Human *NKAP*

To identify the *MAS2* gene, we subjected the *ago1-52 mas2-1* (P2 11.1) double mutant to iterative linkage analysis (Supplemental Table 1), as previously described (Ponce et al., 1999, 2006). The results indicated that *mas2-1* is a dominant mutation that maps to the upper telomere of chromosome 4, within a 157-kb candidate region encompassing 39 annotated genes (Supplemental Figure 1). A G→A mutation in the coding region of one of the candidate genes, *At4g02720*, was present in *ago1-52 mas2-1* plants but absent from *Ler* and *ago1-52* plants (Supplemental Figure 2).

*At4g02720* is an intronless, single-copy gene that encodes a protein of 422 amino acids, which contains the SynMuv domain characteristic of *NKAP* family members. The G→A mutation



**Figure 1.** Suppression of the Phenotype of *ago1-52* by *mas2-1*.

(A) to (D) Rosettes of *Ler* (A), *mas2-1* (B), *ago1-52* (C), and *ago1-52 mas2-1* (D) plants.

(E) Adult plants of *Ler*, *mas2-1*, *ago1-52*, and *ago1-52 mas2-1*.

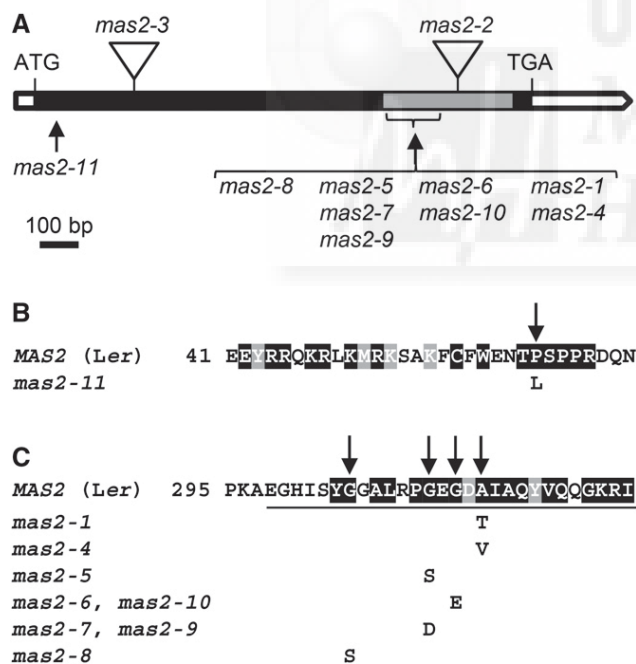
(F) to (I) Inflorescences of *Ler* (F), *mas2-1* (G), *ago1-52* (H), and *ago1-52 mas2-1* (I) plants.

Pictures were taken at 21 ([A] to [D]) and 48 (E) DAS. Bars = 1 mm (A) to (D) and (F) to (I) and 1 cm in (E).

carried by *mas2-1* is predicted to cause an Ala312→Trp substitution within the SynMuv domain (Figure 2). We also sequenced At4g02720 in the remaining 22 suppressor lines that we isolated, finding that nine of them bore additional *mas2* alleles, which we named *mas2-4* to *mas2-11*. All these alleles, except *mas2-11*, carry missense mutations mapping to a narrow (32 bp) region of At4g02720 encoding the SynMuv domain (Figure 2A; Supplemental Figure 2). Such a large allelic series found in a single genetic screen strongly supports the hypothesis that At4g02720 (hereafter, *MAS2*) is the causal gene for the suppression of the phenotype of *ago1-52* exhibited by P2 11.1.

### All EMS-Induced *mas2* Alleles Carry Point Mutations Affecting Conserved Regions of MAS2

To ascertain whether the *mas2* mutations affect residues conserved among NKAP family members, we aligned *MAS2* with other NKAP proteins. Full-length *MAS2* has 32.4% identity to human NKAP, 30.0% to *Drosophila melanogaster* CG6066, and 33.5% to *C. elegans* LET-504. The SynMuv domain, which is 109 amino acids in the human NKAP, showed sequence



**Figure 2.** *MAS2* Gene Structure and Alleles.

(A) Schematic representation of the *MAS2* (At4g02720) gene, showing the nature and position of the *mas2* mutant alleles. White and black boxes represent untranslated and coding regions, respectively. The region encoding the SynMuv domain is shown in gray. Arrows indicate nucleotide substitutions, and triangles indicate T-DNA insertions.

(B) and (C) Predicted effects of the *mas2* mutations on the *MAS2* protein. Residues conserved among plants (B) or eukaryotes (C) are shaded black (identical) and gray (similar). The full-length alignments are shown in Supplemental Figures 3 and 4. The amino acids underlined belong to the SynMuv domain.

similarities of 81 to 82%. By selecting putative NKAPs from a single representative of each of the supergroups identified in recent phylogenies based on massive sequencing (He et al., 2014), we only found conservation in the SynMuv domain: Its identity was 43.2% between *Arabidopsis* and the fungus *Mucor circinelloides* and 57.8% between *Homo sapiens* and the protozoan *Eimeria mitis*. All *mas2* mutations, except *mas2-11*, affected SynMuv domain residues that were highly conserved among all eukaryotes (Figures 2B and 2C; Supplemental Figure 3).

We also found very high conservation in a multiple alignment of several angiosperm NKAPs, to which we added that of the moss *Physcomitrella patens*: Only four of the 106 amino acids of the SynMuv domain differed between *Arabidopsis* and *P. patens* or rice (*Oryza sativa*). We detected a short conserved region, at the N terminus of *MAS2* (residues 42 to 68), to which the *mas2-11* mutation maps (Pro64→Leu; Figure 2B; Supplemental Figure 4). The latter domain seems to be unique to moss and chlorophyta, as animals, red algae, and protists lack this domain. The conservation of this region suggests its relevance for NKAP function in plants.

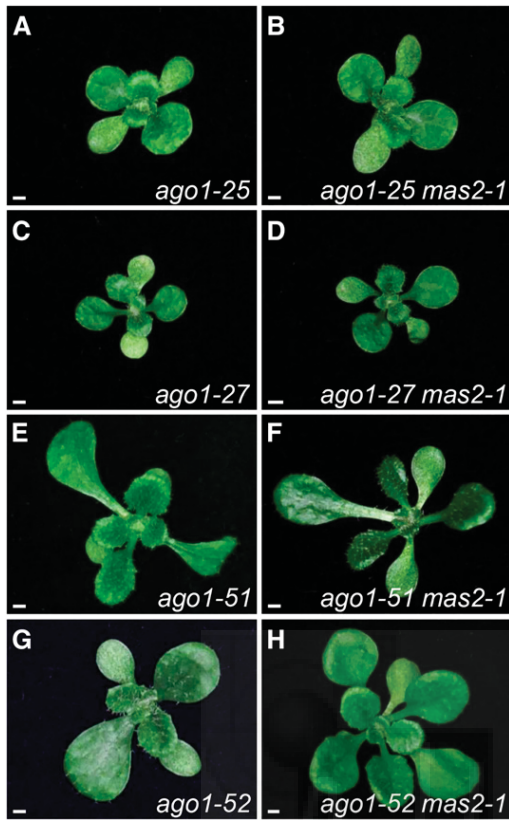
### *mas2-1* Suppresses the Phenotype of Two *ago1* Alleles That Exhibit Missplicing

To ascertain if suppression of *ago1-52* by *mas2-1* is allele specific, we crossed *mas2-1* single mutant plants to the *ago1-25*, *ago1-27* (Morel et al., 2002), and *ago1-51* (Jover-Gil et al., 2012) single mutants. Both *ago1-25* and *ago1-27* carry missense mutations, whereas *ago1-51* and *ago1-52* exhibit missplicing of the *AGO1* pre-mRNA (Supplemental Figure 5).

The *ago1-25 mas2-1* and *ago1-27 mas2-1* double mutants were indistinguishable from their *ago1-25* and *ago1-27* single mutant F2 siblings (Figures 3A to 3D). By contrast, the *ago1-51 mas2-1* double mutant exhibited suppression, though to a lesser extent than that seen in *ago1-52 mas2-1* plants (Figures 3E to 3H). For example, one of the most conspicuous traits of hypomorphic *ago1* mutants, the absence of a well-defined petiole (Jover-Gil et al., 2012), is suppressed in *ago1-51 mas2-1* leaves. In addition, *ago1-51 mas2-1* plants were slightly taller than the *ago1-51* plants, but the inflorescences and fruits of the double mutant were less compact and longer, respectively, than those of *ago1-51* (Supplemental Figure 6). These results indicate that *mas2-1* suppresses the mutant phenotype of *ago1-51* and *ago1-52*, which carry mutations causing missplicing, but not those of *ago1-25* and *ago1-27*, which carry missense mutations.

### The *mas2* Mutations Modify the Ratio between Splice Variants from *ago1-51* and *ago1-52*

The G→A transition carried by *ago1-51* and *ago1-52* (Supplemental Figure 5) causes missplicing. Two abnormal splice forms are detectable by RT-PCR from *ago1-51* mRNA: The short splice form (*ago1-51.1*) is 3468 nucleotides long and lacks the last 39 nucleotides of the 7th exon and the 7th intron, and the long form (*ago1-51.2*) is 3578 nucleotides long and includes the entire 7th intron. Translation of the short splice form should produce an *AGO1* protein similar to wild type but lacking



**Figure 3.** Genetic Interactions of *mas2-1* with *ago1-25*, *ago1-27*, *ago1-51*, and *ago1-52*.

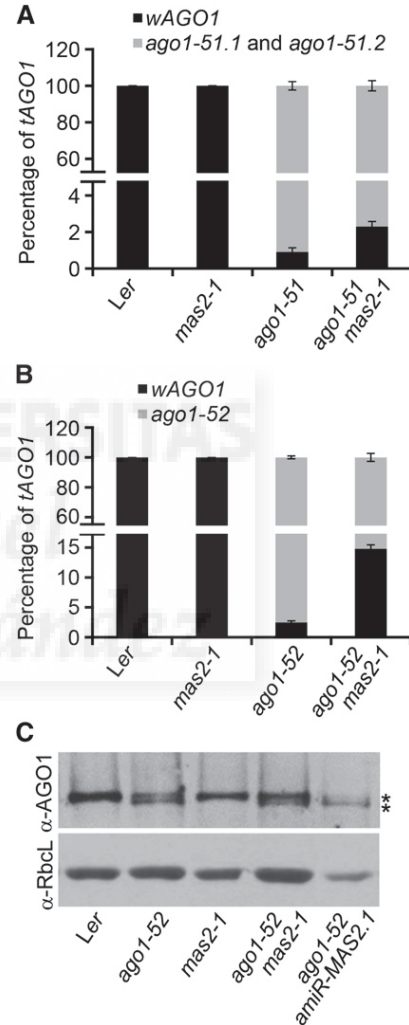
Rosettes of *ago1-25* (A), *ago1-25 mas2-1* (B), *ago1-27* (C), *ago1-27 mas2-1* (D), *ago1-51* (E), *ago1-51 mas2-1* (F), *ago1-52* (G), and *ago1-52 mas2-1* (H) plants. Pictures were taken at 21 DAS. Bars = 1 mm.

13 amino acids of the PAZ domain, but translation of the long splice form should produce a truncated protein. A single splice form of *AGO1* was detected from *ago1-52* RNA; this form is 3517 nucleotides long and includes 10 nucleotides of the 20th intron (Jover-Gil et al., 2012).

The *mas2-1* mutation suppresses the morphological phenotype of *ago1-51* and *ago1-52*; therefore, we wondered if *mas2-1* modifies the number and/or relative amounts of *AGO1* splice variants in these *ago1* mutants. We designed PCR primers to amplify the wild type (abbreviated as *wAGO1*) and mutant (*ago1-51.1*, *ago1-51.2*, and *ago1-52*) splice forms (Supplemental Table 2). Using primers designed to amplify all possible splice forms (total *AGO1* mRNAs, abbreviated as *tAGO1*), we could not detect the *wAGO1* splice form in *ago1-51* plants by RT-PCR, as previously reported (Jover-Gil et al., 2012) (Supplemental Figure 7A). However, using primers that selectively amplify *wAGO1*, we did detect this splice form at a very low level in the *ago1-51* mutant (Supplemental Figure 7A). We confirmed the presence of the *wAGO1*, *ago1-51.1*, and *ago1-51.2* mRNA variants by reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR). These results indicated that the *wAGO1* splice form represents 0.8 and

2.1% of *tAGO1* in *ago1-51* and *ago1-51 mas2-1* plants, respectively (Figure 4A).

We also detected *wAGO1* in *ago1-52* and *ago1-52 mas2-1* plants by RT-PCR using specific primers (Supplemental Figure 7B and Supplemental Table 2) and found by RT-qPCR that *wAGO1* represents 2.5 and 14.8% of *tAGO1* in *ago1-52* and *ago1-52 mas2-1*, respectively (Figure 4B).



**Figure 4.** Effects of *mas2-1* on the Levels of *ago1-51* and *ago1-52* mRNA and Protein Products.

(A) and (B) RT-qPCR analyses using primers to amplify all of the splice forms of *AGO1* (*tAGO1*) or specifically the wild-type *AGO1* mRNA (*wAGO1*). The percentages of *wAGO1* and the mutant splice forms with respect to *tAGO1* were estimated in *Ler*, *mas2-1*, *ago1-51*, and *ago1-51 mas2-1* plants (A) and in *Ler*, *mas2-1*, *ago1-52*, and *ago1-52 mas2-1* plants (B).

(C) Detection of *AGO1* proteins by immunoblot using a primary antibody against *AGO1* ( $\alpha$ -*AGO1*). Total proteins from *Ler*, *mas2-1*, *ago1-52*, *ago1-52 mas2-1*, and *ago1-52 amiR-MAS2.1* plants were used. Asterisks indicate the *AGO1* (upper band) and the *AGO1-52* (lower band) proteins.  $\alpha$ -RbcL was used as the loading control.



To study the effects of *mas2-4* to *mas2-11* on the splicing of *ago1-52* in all the *ago1-52 mas2* lines isolated in our screen, we used RT-qPCR to measure the ratio between the *wAGO1* and *ago1-52* splice forms, which remained as in *ago1-52 mas2-1*. The only exception was the P1 5.33 (*ago1-52 mas2-5*) line, in which the ratio was the same as in the *ago1-52* mutant (Supplemental Figure 7C).

### The *mas2* Mutations Modify the Ratio between Protein Variants Encoded by *ago1-51* and *ago1-52*

The increased *wAGO1* level we observed in *ago1-51 mas2-1* and *ago1-52 mas2-1* plants compared with *ago1-51* and *ago1-52*, respectively, seemed to be too modest to explain the strong phenotypic suppression observed. Hence, we performed immunoblot assays using an  $\alpha$ -AGO1 antibody, extracting proteins from plants carrying different *ago1* alleles: the null *ago1-2* (Bohmert et al., 1998) and the hypomorphic *ago1-25*, *ago1-27* (Morel et al., 2002), *ago1-51*, and *ago1-52* (Jover-Gil et al., 2012) alleles. As expected, we detected no AGO1 protein in the *ago1-2* mutant; a single protein of ~130 kD in *ago1-25* and *ago1-27*, likely the AGO1-25 and AGO1-27 proteins, respectively; and ~130- and ~60-kD proteins in *ago1-51* plants, likely the AGO1-51.1 and AGO1-51.2 mutant proteins, respectively (Supplemental Figure 8). Due to the difference between the wild-type (AGO1) and the AGO1-51.1 protein, which is only 13 amino acids smaller than AGO1, we could not discriminate them in immunoblots. The largest amount of protein corresponded to the ~130-kD band, while the ~60-kD band was very weak (Supplemental Figure 8), suggesting that the truncated AGO1-51.2 protein is degraded or is less translatable than AGO1-51.1 or the wild-type protein. In *ago1-52* plants, two different proteins were also detected: one of ~130 kD, the size of the wild-type AGO1 protein, and another of ~125 kD, likely the AGO1-52 protein (Figure 4C; Supplemental Figure 8). Both AGO1 and AGO1-52 proteins were present in similar amounts in *ago1-52* (Figure 4C; Supplemental Figure 8), which suggests a greater translatability of the wild-type AGO1 splice form compared with the *ago1-52* form or a higher stability of AGO1 protein.

These results suggest that *mas2-1* suppresses the phenotypes of *ago1-51* and *ago1-52* by increasing the translatability of *wAGO1* mRNA and/or stability of AGO1 protein more than modifying the splicing of *ago1-51* and *ago1-52* mRNAs. This assumption is also consistent with our results with the other *mas2* suppressor alleles described above, because one of them (*mas2-5*) does not change the ratio between *wAGO1/ago1-52* splice forms in *ago1-52 mas2-5* plants.

### Overexpression of *mas2-1*, but Not *MAS2*, Suppresses *ago1-52* and *ago1-51*

To further examine the effect of *mas2-1* on the phenotypes of *ago1-51* and *ago1-52*, and to compare the effects of the overexpression of the *MAS2* and *mas2-1* alleles in wild-type *AGO1/AGO1* and mutant *ago1/ago1* backgrounds, we generated  $35S_{pro}::MAS2$  and  $35S_{pro}::mas2-1$  constructs, which were transferred into *Ler*, *ago1-51*, and *ago1-52* plants. The  $35S_{pro}::MAS2$ ,  $35S_{pro}::mas2-1$ , and *Ler* plants were indistinguishable (Supplemental

Figures 9A to 9C), and the  $35S_{pro}::MAS2$  transgene did not suppress the mutant phenotype of *ago1-51* and *ago1-52* plants (Supplemental Figures 9E to 9H). By contrast,  $35S_{pro}::mas2-1$  suppressed the mutant phenotype of *ago1-52* (Supplemental Figures 9I and 10) and *ago1-51*. Suppression of *ago1-51* by *mas2-1* was stronger in the  $35S_{pro}::mas2-1 ago1-51$  transgenic plants (Supplemental Figures 9F and 11) than in the *ago1-51 mas2-1* double mutant (Figure 3F). These results reconfirm that *mas2-1* is a true extragenic suppressor of *ago1-51* and *ago1-52* and that it is antimorphic, rather than hypermorphic, as suggested by the absence of suppression seen in  $35S_{pro}::MAS2 ago1$  plants.

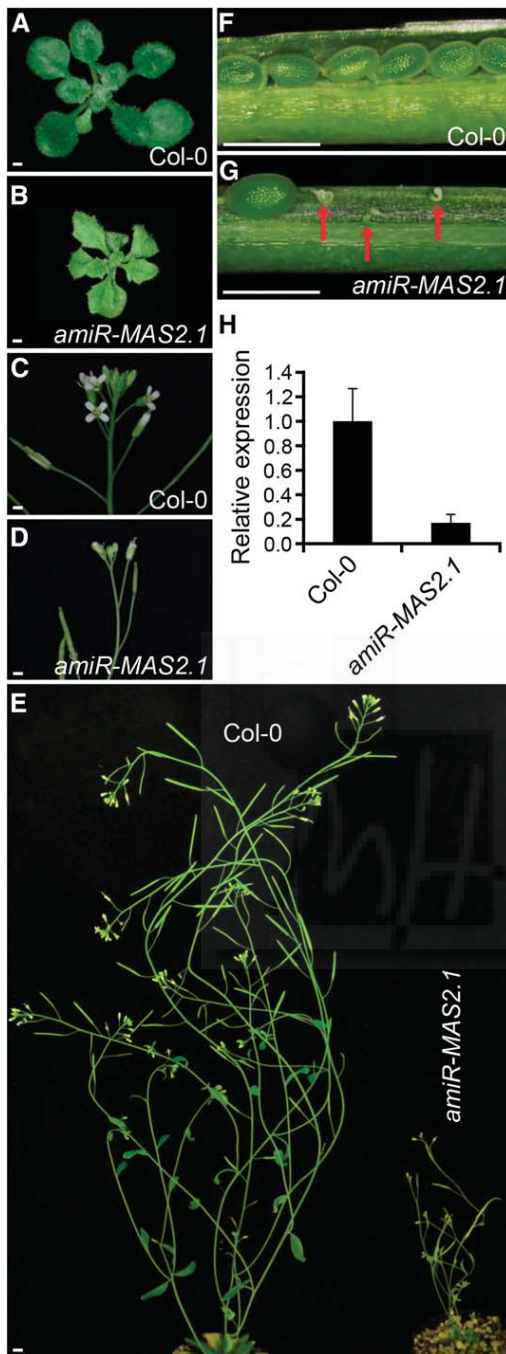
### Insertional *mas2* Alleles Are Embryonic Lethal

We also searched for insertional alleles of *MAS2* and identified three publicly available lines. The GABI\_318G03 line (Supplemental Figure 12A) was phenotypically wild type and not studied further. SAIL\_335\_C06, which we named *mas2-2*, is in the Col-3 background and carries a T-DNA insertion 1074 bp downstream of the translation start codon of At4g02720, in the region encoding the SynMuv domain (Figure 2A). We found no *mas2-2/mas2-2* homozygotes among 274 T4 genotyped plants. Aborted seeds accounted for  $0.28\% \pm 0.97\%$  of seeds ( $n = 353$ ,  $n$  being the number of embryos from fertilized ovules) in the siliques from six *MAS2/MAS2* plants, where no unfertilized ovules were seen. By contrast, the siliques of six *MAS2/mas2-2* plants showed  $29.78\% \pm 8.38\%$  aborted seeds ( $n = 339$ ) and  $3.42\% \pm 4.68\%$  unfertilized ovules ( $n = 351$ ,  $n$  being the sum of the number of unfertilized ovules plus the number of embryos from fertilized ovules; Supplemental Figure 13).

We named the At4g02720 allele carried by CSHL\_GT188551 (in a *Ler* background) *mas2-3* and found the coding region in *mas2-3* is interrupted by a T-DNA insertion 233 bp downstream of the translation start codon (Figure 2A). We genotyped 31 CSHL\_GT188551 plants, none of which was *mas2-3/mas2-3*. Aborted seeds were found in dissected siliques from five *MAS2/MAS2* ( $0.75\% \pm 1.3\%$ ;  $n = 532$ ) and five *MAS2/mas2-3* plants ( $26.33\% \pm 5.19\%$ ;  $n = 433$ ). No unfertilized ovules were found in the *mas2-3/MAS2* plants studied or in their *MAS2/MAS2* siblings. Taken together, these results suggest that *MAS2* is an essential gene whose null alleles are embryonic lethal.

### Partial Silencing of *MAS2* by *amiR-MAS2* Causes a Pleiotropic Phenotype

The recessive embryonic lethality exhibited by the null *mas2-2* and *mas2-3* alleles, together with the likely antimorphic effects of the *mas2* suppressor mutations, prompted us to attempt to obtain viable plants with a partial loss of *MAS2* function. To this end, we designed and constructed a transgene carrying an artificial microRNA targeting At4g02720 ( $35S_{pro}::amiR-MAS2$ ), which was transferred into wild-type Col-0, *Ler*, and En-2 plants, producing 72, 15, and 13 independent T1 transformant lines, respectively. Among these transformants, we identified 10 (Col-0), 3 (*Ler*), and 6 (En-2) plants with pointed and serrated leaves, to a greater or lesser extent (Supplemental Figure 14; Figure 5B). We analyzed by RT-qPCR the degree of *MAS2* silencing in several of these *amiR-MAS2* lines in the Col-0 background.



**Figure 5.** Phenotypic Effects of the *amiR-MAS2.1* Transgene in the *Col-0* Background.

(A) and (B) Rosettes of *Col-0* (A) and *amiR-MAS2.1* (B) (in the *Col-0* background) plants.

(C) and (D) Inflorescences of *Col-0* (C) and *amiR-MAS2.1* (D) plants.

(E) Adult *Col-0* and *amiR-MAS2.1* plants.

(F) and (G) Dissected siliques from *Col-0* (F) and *amiR-MAS2.1* (G) plants. Red arrows indicate unfertilized ovules.

(H) *MAS2* expression levels in *Col-0* and *amiR-MAS2.1* plants. Three biological replicates with three technical replicates each were performed. Error bars represent standard deviations.

Homozygous plants of the line that we termed *amiR-MAS2.1* displayed the strongest mutant phenotype and also exhibited a 5-fold reduction of *MAS2* mRNA levels compared with the wild type (Figure 5H); these were chosen for further studies.

First- and third-node leaves of *amiR-MAS2.1* plants exhibited a vein pattern with reduced complexity (Supplemental Figures 15A to 15D), an increased number of air spaces in the palisade mesophyll (Supplemental Figures 15E to 15H), fewer vegetative leaves ( $7.82 \pm 0.56$  in *amiR-MAS2.1* and  $12.87 \pm 0.61$  in *Col-0*, scored at 27 d after stratification [DAS];  $n \geq 47$ ), and early flowering (bolting was apparent in 51.3% of *amiR-MAS2.1* plants and 2.1% of *Col-0* at 20 DAS;  $n \geq 39$ ). These transgenic plants were also dwarfed, with thinner stems and fewer flowers than *Col-0* (Figures 5A to 5E). We dissected siliques from 10 *amiR-MAS2.1* homozygous plants and found  $18.46\% \pm 16.87\%$  aborted seeds ( $n = 260$ ) and  $17.46\% \pm 23.05\%$  unfertilized ovules ( $n = 315$ ; Figure 5G).

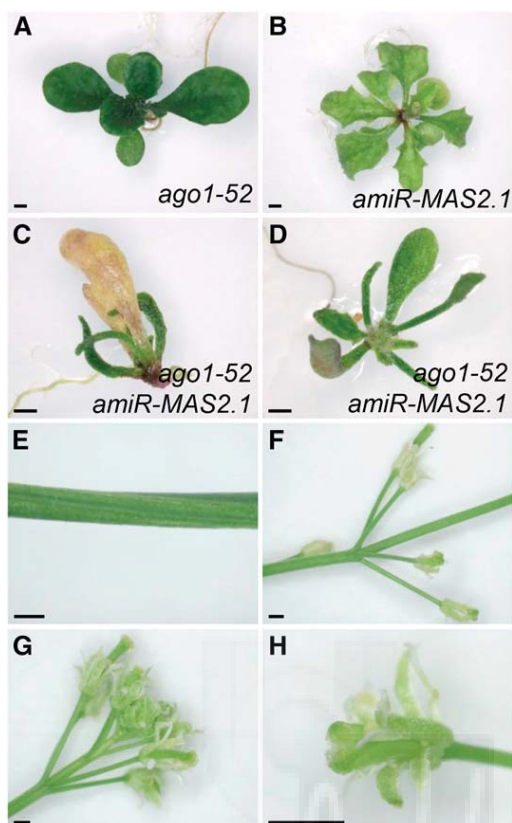
The pleiotropic phenotype exhibited by *amiR-MAS2.1* plants suggests a role for *MAS2* in Arabidopsis development. In particular, *amiR-MAS2.1* leaves are reminiscent of the leaves of mutants carrying loss-of-function alleles of genes encoding ribosomal proteins (Van Lijsebettens et al., 1994; Ito et al., 2000; Creff et al., 2010; Horiguchi et al., 2011; Casanova-Sáez et al., 2014).

#### *amiR-MAS2.1* Increases the Severity of the Mutant Phenotype of *ago1-52*

To study the effects of *MAS2* partial loss of function on the phenotype of *ago1-52*, we crossed *ago1-52/ago1-52* to *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* and sowed the F<sub>2</sub> progeny on plates supplemented with hygromycin. Only two phenotypic classes of *ago1-52/ago1-52* plants were obtained: (1) lethal seedlings that only produced cotyledons and a few rod-like leaves (Figure 6C), which we inferred to be *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; and (2) viable seedlings that developed into plants with narrow and strongly serrated leaves that exhibited fasciated stems and aberrant flowers (Figures 6D to 6H) and yielded few seeds, which we inferred to be *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1*. In the F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> progeny of the latter plants, a 3:1 (Hyg<sup>r</sup>:Hyg<sup>s</sup>) segregation was observed, confirming that they were homozygous for *ago1-52* but hemizygous for *amiR-MAS2.1*. The phenotype of the *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* lethal seedlings resembled that of plants homozygous for null alleles of *AGO1*, whereas the *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1* plants were very similar to those homozygous for the *ago1-103* mutation, a very strong but viable allele of *AGO1* (Fernández-Nohales et al., 2014).

We also quantified the percentage of *AGO1* mRNAs in the *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* lethal seedlings. In these plants, the *wAGO1* and *ago1-52* splice forms represented 0.7 and 99.3% of *tAGO1*, respectively (Supplemental Figure 16). The percentage of *wAGO1* in *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* (0.7%) is almost half of that found

Pictures were taken at 21 (A) and (B) and 48 (C) to (G) DAS. Bars = 1 mm in (A) to (D), (F), and (G), and 1 cm in (E).



**Figure 6.** Phenotypic Effects of the *amiR-MAS2.1* Transgene in the *ago1-52* Background.

(A) to (C) Rosettes of *ago1-52/ago1-52* (A), *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* (B), and *ago1-52/amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* (C) plants.

(D) to (H) Rosette (D), stems (E) and (F), inflorescence (G), and flower (H) of *ago1-52/ago1-52; amiR-MAS2.1* plants.

Pictures in (A) to (D) were taken at 21 DAS. Bars = 1 mm.

in *ago1-52* plants (1.2%) and could explain their extreme phenotype.

We also detected both the AGO1 and AGO1-52 proteins in the immunoblot assay of *ago1-52 mas2-1* and *ago1-52 amiR-MAS2.1* homozygous plants. The AGO1 protein was more abundant than AGO1-52 in *ago1-52 mas2-1* plants, whereas *ago1-52 amiR-MAS2.1* plants displayed an opposite pattern, with the AGO1-52 protein as the predominant variant (Figure 4C).

### MAS2 Interacts in a Yeast Two-Hybrid Assay with Proteins Involved in Splicing and Translation

To better understand the function of MAS2, we decided to look for its interactors in a yeast two-hybrid (Y2H) assay. Two Arabidopsis cDNA libraries obtained from whole Arabidopsis plants, totaling 21 million prey clones, were used in the screening, which was performed at PanBioNet (<http://www.panbionet.com>). The bait contained the full-length coding region of MAS2. The screen identified 91 prey clones, representing 14 different genes, and these clones were confirmed by directed Y2H assays (Supplemental

Table 3). These genes have not been previously studied in Arabidopsis, except for At1g20920, but their annotated functions are related to RNA processing and ribosome-related processes, as indicated by sequence similarity to known proteins.

Three of the interactors were related to ribosome biogenesis, including RPS24B, the second most represented interactor, which is one of the two Arabidopsis S24-type proteins in the 40S ribosomal subunit. Two other interactors, the putative ortholog of the Nucleolar protein 53 (NOP53) of *Saccharomyces cerevisiae* and RRNA-processing Protein 7 (RRP7), are nucleolar proteins involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly in yeast (Granato et al., 2008).

The most represented interactor in the Y2H-based screen, in 23 of the 55 clones (Supplemental Table 3), was CAX INTERACTING PROTEIN4 (CXIP4), a protein of unknown function that was previously identified as interacting with the high-affinity vacuolar calcium antiporter CAX1 (Cheng et al., 2004). CXIP4 occurs exclusively in plants and 30 amino acids of its N-terminal region show 70% similarity to the mammalian splicing factor SREK1-interacting protein 1, as shown in the Aramemnon database (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>; Schwacke et al., 2003). Other interactors were also involved in pre-mRNA splicing (Supplemental Table 3), including REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION1/RH42, a DEAD box RNA helicase (Guan et al., 2013).

The interaction between MAS2 and the protein encoded by At4g33690, annotated as an unknown protein, has also been found among the more than 6200 Y2H interactions included in the Arabidopsis interactome map ([http://interactome.dfci.harvard.edu/A\\_thaliana/index.php](http://interactome.dfci.harvard.edu/A_thaliana/index.php); Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011).

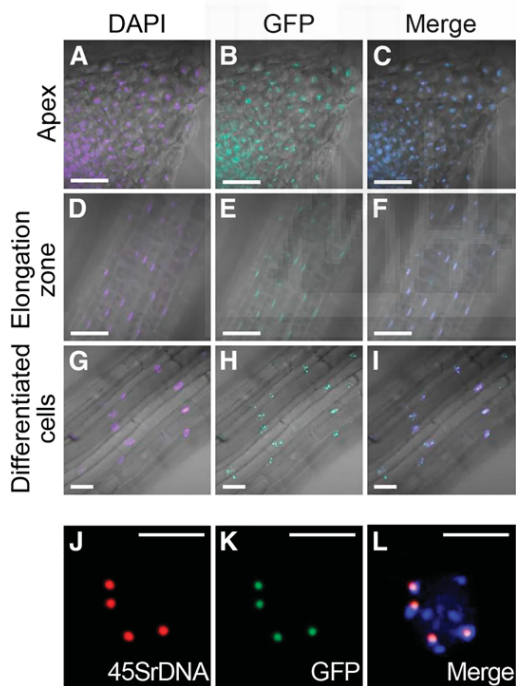
Our results suggest a role for MAS2 in the regulation of pre-mRNA alternative splicing and translation. Our results also agree with those obtained with the mammalian NKAPs, which localize to nuclear speckles and interact with nuclear ribonuclear proteins, splicing factors, several RNA helicases, and other factors involved in the maturation of 45S pre-rRNA and ribosome biogenesis (Burgute et al., 2014).

### MAS2 Expression and MAS2 Nuclear Localization

To determine the spatial expression pattern of MAS2, we generated a *MAS2<sub>pro</sub>:GUS* construct in which the MAS2 promoter drives the expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene and transferred this construct into Col-0. Homozygous *MAS2<sub>pro</sub>:GUS* plants were selected and used to detect GUS activity, which was found in roots, cotyledons, young vegetative and cauline leaves, stems, and flower buds (Supplemental Figure 17). GUS activity changed depending on the developmental stage, being more intense in seedlings and young plants; we did not detect GUS staining in vegetative leaves after bolting (48 DAS) or in fully expanded cauline leaves (Supplemental Figures 17F and 17H). Additionally, we performed RT-qPCR amplifications using cDNA from assorted organs of *Ler* and Col-0 and found that MAS2 was expressed in all the studied tissues at similar levels (Supplemental Figure 18).

To ascertain if MAS2 is nuclear, similar to all animal NKAP proteins already studied, we generated *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* and

*MAS2<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* constructs, which we transformed into Col-0 and *Ler* plants. As expected, we detected GFP signal in the nucleus for both constructs (Figure 7; Supplemental Figures 19A and 19B). *MAS2* subcellular localization depended on the cell cycle: In cells with a high rate of nuclear division, such as those located at the root apex or emerging lateral roots, *MAS2:GFP* occurred in a diffuse pattern throughout the nucleus (Figures 7A to 7C). By contrast, in cells of the root elongation zone, *MAS2:GFP* was nuclear with an exclusion zone at the nucleolus (Supplemental Figure 20). Furthermore, *MAS2:GFP* had a punctuate distribution (Figures 7D to 7F; Supplemental Figure 20), which became more evident in differentiated cells where it appeared only in discrete foci in the nucleus (Figures 7G to 7I). These perinucleolar foci perfectly matched the heterochromatic chromocenters, which were visualized as bright fluorescent dots by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. These regions contain centromeric and other heterochromatic repeats, including those corresponding to silent rRNA 45S genes (Costa-Nunes et al., 2010). We obtained identical results with the *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* and *MAS2<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* transgenes (Supplemental Figures 19A and 19B).



**Figure 7.** Subcellular Localization of the *MAS2* Protein.

Confocal laser scanning microscopy of plants homozygous for the *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* transgene.

(A) to (I) Different root zones from root apex [(A) to (C)], root elongation zone [(D) to (F)], and differentiated root cells [(G) to (I)]. Fluorescence signals are DAPI [(A), (D), and (G)], GFP [(B), (E), and (H)], and their overlay [(C), (F), and (I)]. Fluorescence and transmitted light contrast images were merged in (A) to (I).

(J) to (L) Mitotic prophase nucleus from a flower bud cell showing the fluorescent signals from a hybridized 45S rDNA probe (J), GFP (K), and their overlay (L) with DAPI.

Bars = 30  $\mu$ m in (A) to (I) and 50  $\mu$ m in (J) to (L).

To ascertain if the subcellular localization of *MAS2* is modified by the *mas2-1* mutation, we generated the *MAS2<sub>pro</sub>:mas2-1:GFP* construct, finding the fluorescent emission of *MAS2-1:GFP* indistinguishable from that of *MAS2:GFP* (Supplemental Figures 19C and 19D). These results indicate that overexpression of *MAS2* and the *mas2-1* mutation do not alter the nuclear localization of the *MAS2* protein.

#### **MAS2 Colocalizes with the 45S rDNA**

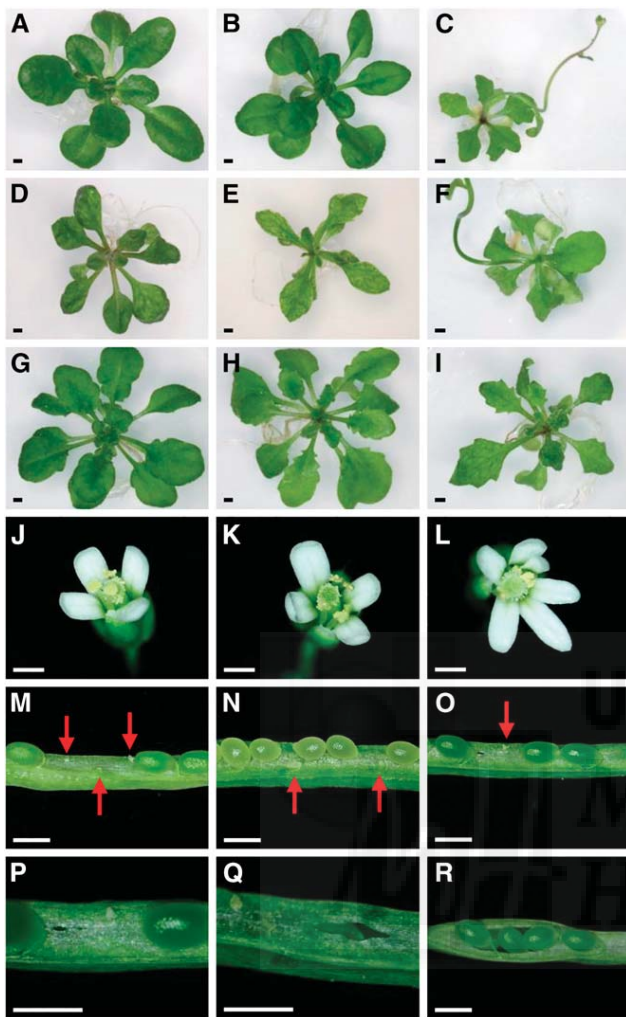
In eukaryotes, tandem arrays of the genes encoding the four classes of nuclear rRNAs occur in different clusters. In the Arabidopsis Col-0 accession, the 5S rRNA genes occur within the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 3, 4, and 5 (Campbell, 1992), and the 45S rRNA genes occur in the nucleolar organizer regions (NORs) at the tips of the short arms of the acrocentric chromosomes 2 and 4 (NOR2 and NOR4) (Lam et al., 2005; Layat et al., 2012). Transcription of the 5S rRNA gene by RNA polymerase III (Pol III) produces a 5S rRNA transcript (Cloix et al., 2002), and transcription of the 45S rRNA gene by RNA polymerase I (Pol I) produces a long polycistronic 45S pre-rRNA that is processed into the 5.8S, 18S, and 25S rRNA mature forms (Gruendler et al., 1989, 1991; Unfried et al., 1989).

The nuclear localization of *MAS2* in discrete foci, together with the Y2H results, prompted us to analyze whether *MAS2* colocalized with the 45S rRNA genes. To answer this question, we performed a fluorescence in situ hybridization (FISH) assays with plants expressing *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP*. In the root cells of these plants, the GFP signal perfectly matched the signal of a 45S rDNA probe (Sanchez Moran et al., 2001), indicating that *MAS2* colocalizes with 45S rDNA (Figures 7J to 7L).

#### ***mas2-1* and *amiR-MAS2.1* Genetically Interact with *nuc-L1***

In Arabidopsis, *HISTONE DEACETYLASE6* (*HDA6*) and *NUCLEOLIN-LIKE PROTEIN1* (*NUC-L1*; also known as *PARALLEL1* [*PARL1*]) have been implicated in nuclear organization and transcriptional regulation of the 45S rDNA (Petricka and Nelson, 2007; Layat et al., 2012). The *amiR-MAS2.1* plants share some phenotypes, including reticulated and serrated leaves and altered leaf vein patterning, with the *nuc-L1* and *parl1* mutants and with mutants in genes encoding ribosomal proteins (Petricka and Nelson, 2007; Pontvianne et al., 2007).

Based on our interaction, localization, and phenotypic data for *MAS2*, we tested for a genetic interaction by crossing *mas2-1* and *amiR-MAS2.1* plants to the *parl1-2* nucleolin mutant (Petricka and Nelson, 2007). Although *mas2-1* plants show no morphological phenotype, the *mas2-1 parl1-2* double mutant plants displayed a synergistic phenotype, with small rosettes and pointed, serrated, and reticulated leaves resembling those of strong loss-of-function alleles of genes encoding ribosomal proteins (Van Lijsebettens et al., 1994; Ito et al., 2000; Creff et al., 2010; Horiguchi et al., 2011; Casanova-Sáez et al., 2014) (Figure 8E). Furthermore, the *mas2-1 parl1-2* double mutant had flowers with abnormal numbers of petals (5 to 6) and/or stamens (4 to 5), traits that we did not observe in either *mas2-1* or *parl1-2* single mutants (Figures 8J to 8L).



**Figure 8.** Genetic Interactions of *mas2-1* and *amiR-MAS2.1* with *par1-2* and *hda6*.

(A) to (I) Rosettes of *Ler* (A), *mas2-1* (B), *amiR-MAS2.1* (C), *par1-2* (D), *mas2-1 par1-2* (E), *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* (F), *hda6-7* (G), *mas2-1 hda6-7* (H), and *amiR-MAS2.1 hda6-7* (I) plants.

(J) to (L) Flowers of *mas2-1* (J), *par1-2* (K), and *mas2-1 par1-2* (L) plants.

(M) to (O) Dissected siliques of *amiR-MAS2.1* (M), *par1-2* (N), and *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* (O) plants. Red arrows indicate unfertilized ovules.

(P) to (R) *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* siliques exhibiting interrupted septa.

Pictures in (A) to (I) were taken at 28 DAS. Bars = 1 mm in (A) to (I) and 0.5 mm in (J) to (R).

After genotyping 84 plants of different F2 and F3 families, we did not find any *amiR-MAS2.1*;*par1-2/par1-2* plant, and the *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* and *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants were indistinguishable (Figures 8C and 8F). Since combined loss-of-function of *MAS2* and *PARL1* seemed to be lethal, we dissected siliques of *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*, *par1-2/par1-2*, and *amiR-MAS2.1/*

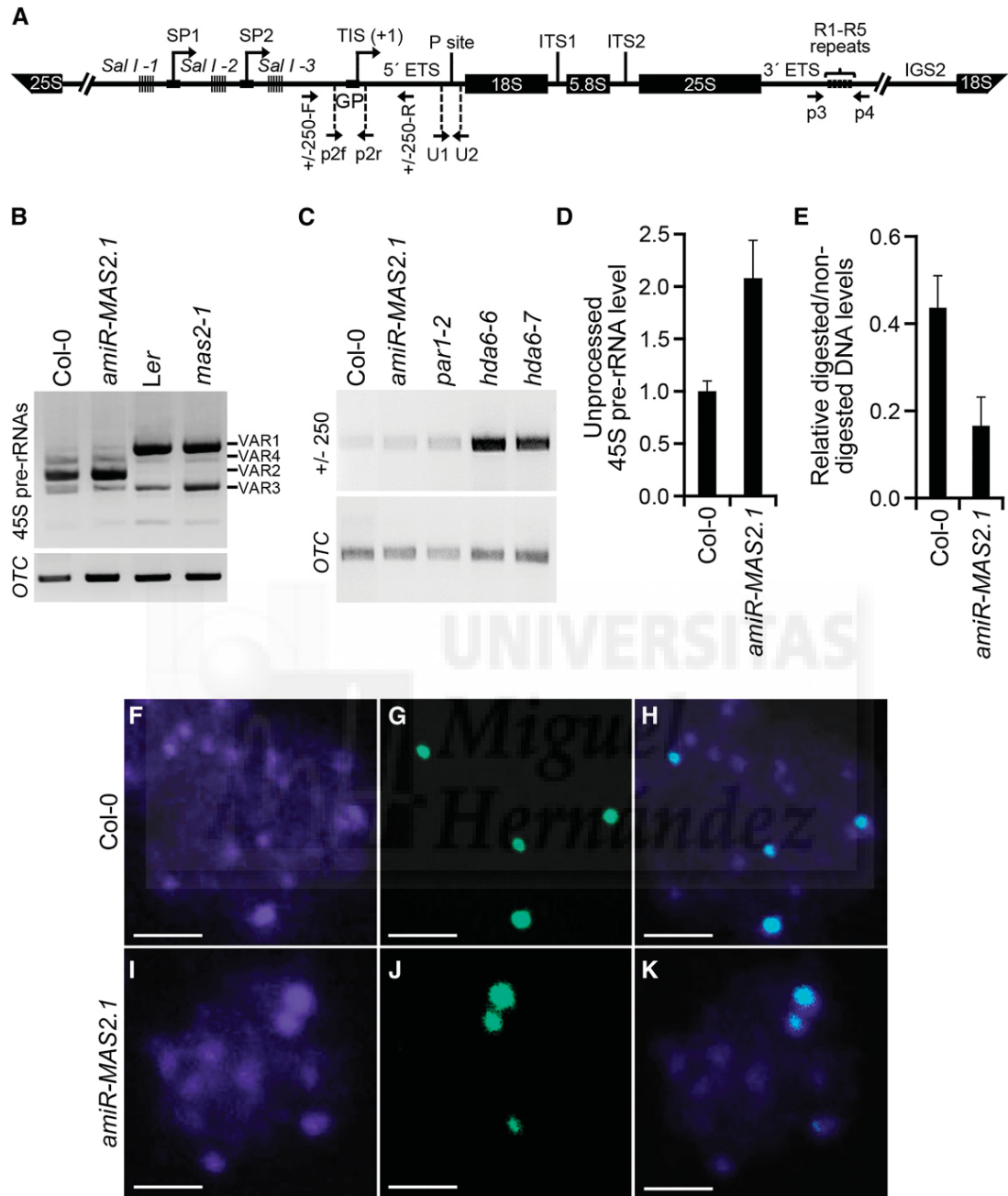
*amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* plants (Figures 8M to 8O), in which the unfertilized ovules and undeveloped seeds represented 42.9, 31.5, and 33.7% of the total, respectively. Moreover, around 25% of the siliques of *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* plants displayed a disrupted septum between the two valves, a trait that we never observed in *amiR-MAS2.1*- or *par1-2/par1-2* plants (Figures 8P to 8R). These results indicate that the combined loss of function of *MAS2* and *PARL1* is synergistic in *amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* plants.

We also found that *mas2-1 hda6-7* leaves were strongly serrated (Figure 8H), suggesting that *HDA6* and *MAS2* are functionally related. The phenotype of *mas2-1 hda6-7* leaves is reminiscent of those of double mutants involving alleles of the *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) or *AS2* genes and *axe1-5*, another loss-of-function allele of *HDA6* (Murfett et al., 2001). *HDA6*, *AS1*, and *AS2* form a complex to repress *KNOX* genes and regulate leaf development (Luo et al., 2012). The morphological phenotype of *hda6-7* was hard to distinguish from the wild type in our growth conditions. The *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *hda6-7/hda6-7* and *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants were also indistinguishable (Figure 8I).

The phenotype of the *mas2-1 par1-2* double mutant and, in particular, that of *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*; *PARL1/par1-2* plants suggest that *MAS2* and *PARL1* are functionally related. The observation that both the *mas2-1* allele and the partial silencing of *MAS2* caused by *amiR-MAS2.1* synergistically interact with *par1-2* reinforces the hypothesis that *mas2-1* is an antimorphic rather than a gain-of-function allele of *MAS2*.

#### ***amiR-MAS2.1* Alters Transcription of 45S rDNA, 45S Pre-rRNA Processing, and NOR Condensation**

In Arabidopsis, each 45S rDNA unit has an intergenic spacer (IGS), two external transcribed spacers (ETSs), and the rRNA genes (18S, 5.8S, and 25S), which are separated by two internal transcribed spacers (ITSs) (Figure 9A). The IGS region separates adjacent genes and includes three repeat elements containing *SalI* restriction sites that are separated by two spacer promoters, the promoter region, and the 5'ETS. The 3'ETS contains five repeated sequences (R1-R5) whose polymorphisms generate different variants of 45S rDNA genes (Abou-Elail et al., 2011). The number of these variants differs among Arabidopsis accessions, with four (VAR1-VAR4) in Col-0 and other related accessions (Abou-Elail et al., 2011). VAR2, VAR3, and VAR4 are expressed in Col-0 adult plants, while VAR1 is only expressed in germinating seeds or in mutants of genes involved in epigenetic regulation of the expression of 45S rDNA, such as *nuc-L1* and *hda6* (Pontvianne et al., 2010). We examined the expression of the 45S rDNA variants in *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* and *mas2-1/mas2-1* plants using p3/p4 primers (Figure 9A; Supplemental Table 2), which amplify the 3'ETS region of the 45S pre-rRNA and allow detection of all VAR variants (Pontvianne et al., 2010). RT-PCR amplifications showed no differences in the number or amount of rRNA variants between *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* and *mas2-1/mas2-1* plants and their respective backgrounds, Col-0 and *Ler* (Figure 9B).



**Figure 9.** Effects of the *amiR-MAS2.1* Transgene on 45S Pre-rRNA Expression and NOR Condensation.

(A) Schematic representation of a 45S rDNA unit, modified from Pontvianne et al. (2010). GP, gene promoter; SP1 and SP2, spacer promoters; TIS, transcription initiation site. *SalI*, repeat elements containing *SalI* restriction sites. Upwards arrows with tip rightwards, transcription initiation sites. ITS1 and ITS2, internal transcribed spacers. Horizontal arrows indicate the positions of primers (not drawn to scale) used to detect pre-rRNA sequences. (B) RT-PCR analysis of the expression of the VAR1-VAR4 45S rRNA variants in Col-0, *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*, *Ler*, and *mas2-1/mas2-1* plants using the p3 and p4 primers (Supplemental Table 2).

(C) RT-PCR analysis of 45S pre-rRNA accumulation in Col-0, *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*, *par1-2*, *hda6-6*, and *hda6-7* plants using the +/-250-F and +/-250-R primers.

(D) RT-qPCR analysis of unprocessed 45S pre-rRNAs in Col-0 and *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants using the U1 and U2 primers.

(E) Quantitative PCR analysis of 45S rDNA gene promoter methylation in Col-0 and *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants.

(D) and (E) Two biological replicas with three technical replicas each were performed. Error bars represent standard deviations.

In the *nuc-L1* and *hda6* mutants, NORs are decondensed (Probst et al., 2004; Pontvianne et al., 2007) and 45S pre-rRNA accumulates due to spurious transcription from the IGS region by Pol I and Pol II (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010), which in turn leads to the overproduction of small interfering RNAs (siRNAs) from the IGS region as a consequence of RNA-directed DNA methylation (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010). We also analyzed the accumulation of the 45S pre-rRNA transcripts produced by spurious transcription from the IGS region and the processing of these transcripts at the first step of cleavage (P site; Figure 9A). To amplify the 45S pre-rRNA, we used the +/-250-F and +/-250-R primers (Supplemental Table 2), which amplify the -250 to +250 region (Figure 9A; Earley et al., 2010). The 45S pre-rRNA processing was analyzed with the U1 + U2 primer pair (Supplemental Table 2), which amplify the sequences flanking the P site at the 5'ETS (Figure 9A; Shi et al., 2005). *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* and Col-0 plants accumulated comparable amounts of 45S pre-rRNA, while in *par1-2* the level was far lower than that of *hda6* mutants (Figure 9C). Additionally, RT-qPCR analysis revealed that *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants accumulated approximately twice the amount of unprocessed 45S pre-rRNAs compared with Col-0 (Figure 9D). Mature rRNAs from processed 45S pre-rRNA were similar in *amiR-MAS2.1* and Col-0 plants (Supplemental Figure 21).

To study the effects of the silencing on NOR condensation, we analyzed NOR status in *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants by FISH assays, using a 45S rDNA probe (Sanchez-Moran et al., 2001). Similar to the phenotype observed in *nuc-L1* and *hda6* mutants, we observed NOR decondensation in *amiR-MAS2.1* plants compared with Col-0 (Figures 9F to 9K).

#### ***amiR-MAS2.1* Affects Cytosine Methylation in the 45S Pre-rRNA 5'ETS**

DNA methylation and histone modification epigenetically regulate the levels of rRNAs (Lawrence et al., 2004). Loss of *NUC-L1* and *HDA6* function in *nuc-L1* and *hda6* mutants leads to hypomethylation at the 5'ETS region affecting mainly the CG and, to a lesser extent, CHG contexts (where H indicates non-G nucleotides) (Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010). To determine the DNA methylation status of the 5'ETS region in *amiR-MAS2.1* plants, we digested genomic DNA with the methylation-sensitive endonuclease *HpaII*. Digested or non-digested DNA was used as template for quantitative PCR amplification using primers that flank the restriction sites (p2f and p2r) and hybridize downstream of the transcription initiation site (Figure 9A; Harscoët et al., 2010). We found that the ratio between digested and nondigested DNA was strongly reduced in *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants compared with Col-0 (Figure 9E), indicating that the promoter was hypomethylated in *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1* plants, as occurred in the *nuc-L1* and *hda6* mutants.

## DISCUSSION

### **Mutation of the SynMuv Domain of Arabidopsis MAS2 Causes Informational Suppression of *ago1* Alleles That Undergo Missplicing**

The existence of SynMuv genes was first shown in *C. elegans* by screens for mutants deficient in vulval development (Ferguson and Horvitz, 1985, 1989; Ferguson et al., 1987; Howell and Rose, 1990). SynMuv genes act redundantly to prevent inappropriate vulval development (Horvitz and Sulston, 1980; Ferguson and Horvitz, 1989) and were initially classified into SynMuv A and B categories, based on their genetic interactions. SynMuv A and B single mutants are phenotypically wild type, but the AB double mutant combinations exhibit a synergistic, multivulva phenotype (Ferguson and Horvitz, 1989). Most SynMuv B genes encode epigenetic repressors, such as LHP1, the putative ortholog of Heterochromatin Protein 1, or are components of the NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) or DREAM (2DP, Retinoblastoma, E2F, and MuvB) repressor complexes (Saffer et al., 2011). The NuRD lysine deacetylase complex acts in a wide variety of cells (Yildirim et al., 2011), while DREAM is more specific and represses most cell cycle genes in mammalian quiescent G0 cells (Sadasivam and DeCaprio, 2013). Several genes encoding components of the splicing machinery behave as SynMuv B genes; their role in this process is still unknown (Ceron et al., 2007).

Second-site mutagenesis screens allow the identification of genes functionally related to a given gene of interest; the phenotype caused by a mutation can be modified, enhanced, or suppressed by a second-site mutation. One type of extragenic modifier that can be isolated by second-site mutagenesis is informational suppressors, mutations affecting any molecule involved in the transmission of information from DNA to protein (Prelich, 1999). Informational suppressors include those modifying pre-mRNA splicing, which suppress the splicing defects of some alleles of different genes. Some of these suppressors have helped in the elucidation of the regulation of alternative splicing in *C. elegans* (Hodgkin, 2005).

Here, we describe our characterization of the *MAS2* gene, which we identified from a second-site mutagenesis screen for suppressors of the morphological phenotype of *ago1-52*. *MAS2* is the putative Arabidopsis ortholog of human *NKAP* and *let-504* (*E01A2.4*), a SynMuv B gene of *C. elegans* (Poulin et al., 2005). *MAS2* orthologs exist in almost all eukaryotes, and their sequence similarity is almost exclusively restricted to the SynMuv domain. *NKAP* family members encode nuclear proteins and, in most organisms except mammals, they exist as single-copy genes. Eight out of the nine *mas2* suppressor mutations that we isolated affect conserved residues within the SynMuv domain; the remaining *mas2* mutation maps to another conserved region that seems to be exclusive to plants.

**Figure 9.** (continued).

**(F) to (K)** FISH assay. Representative mitotic prophase nuclei from Col-0 (**(F)** to **(H)**) and *amiR-MAS2.1* (**(I)** to **(K)**) cells. Fluorescent emissions are DAPI (**(F)** and **(I)**), hybridized 45S rDNA probe (**(G)** and **(J)**), and their overlay (**(H)** and **(K)**). Bars = 2.5  $\mu$ m.

We found that *mas2* point alleles function as true extragenic suppressors of *ago1-52*, partially correcting *AGO1* missplicing in the *mas2 ago1-52* double mutants, hence increasing the ratio of *AGO1* wild-type and mutant proteins. *mas2-1* also partially suppresses *ago1-51* missplicing. Immunoblot assays using an  $\alpha$ -*AGO1* antibody showed that the amount of wild-type *AGO1* protein in *ago1-51* and *ago1-52* plants increased in the presence of *mas2-1* and decreased in the presence of the *amiR-MAS2.1* transgene.

Human NKAP interacts with pre-mRNAs and intronless mRNAs; it also interacts with FUSED IN SARCOMA (Burgute et al., 2014), a multifunctional protein involved in the regulation of alternative splicing and mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. Taking together the recent results on human NKAP and our study of Arabidopsis *MAS2*, it seems plausible that NKAPs function in the regulation of the translation of aberrant or unspliced mRNAs, by regulating their nuclear export. This hypothesis provides an explanation for the observed suppression of *ago1-51* and *ago1-52* by the EMS-induced *mas2* alleles studied here, which seems to be due to partial correction of missplicing.

#### **MAS2 Is an Essential Gene That Encodes a Multifunctional Protein**

Whereas mammalian genes encoding NKAPs have been studied in some depth, little is known about NKAPs in *C. elegans* (LET-504) and *Drosophila* (CG6066). Human NKAP seems to be a multifunctional protein: It is a component of the Notch co-repressor complex, it is required for proper T cell development (Pajeroski et al., 2009), and it plays an unknown role in splicing (Burgute et al., 2014).

Insertional disruption of the coding region of *MAS2* in the *mas2-2* and *mas2-3* lines caused embryonic lethality, as expected from the lethal phenotypes described for the lack-of-function mutations of *C. elegans*, *Drosophila*, and mammalian NKAP orthologs (Giot et al., 2003; Poulin et al., 2005; Pajeroski et al., 2009). The generation of transgenic plants carrying an artificial microRNA targeting *MAS2* mRNA allowed us to study the effects of the partial loss of function of *MAS2*; these plants displayed altered leaf morphology, early flowering, dwarfism, and partial loss of fertility. The embryonic lethality of *mas2-2* and *mas2-3* and the pleiotropic phenotype of *amiR-MAS2.1* plants indicate that *MAS2* is an essential gene required in multiple developmental processes.

#### **MAS2 Is a Perinucleolar Protein That Interacts with Splicing and Ribosome Biogenesis Factors and Negatively Regulates 45S rRNA Expression**

We found expression of *MAS2* was higher in cells undergoing active division, which require a continuous provision of proteins. *MAS2* localized to the nucleus in a pattern that changed depending on the cell cycle: It was diffuse through the entire nucleus in actively dividing cells but became punctuate in differentiated cells. FISH analysis showed that *MAS2* is a perinucleolar protein that colocalizes with the 45S rDNA genes.

The nucleolus is a multifunctional cellular compartment. In addition to ribosomal proteins, the Arabidopsis nucleolar proteome includes factors involved in mRNA biogenesis, splicing factors, and components of the exon-junction complex and the nonsense-mediated decay pathway, which participate in the degradation of aberrant mRNAs (Pendle et al., 2005). Aberrantly spliced mRNAs have been found to be enriched in the Arabidopsis nucleolus (Kim et al., 2009).

Perinucleolar localization of *MAS2* is in agreement with our Y2H screen, which detected proteins predicted to function in nucleolar processes (Supplemental Table 3); this finding reinforces the hypothesis of a role for *MAS2* in ribosome biogenesis and splicing. An indirect role for *MAS2* in splicing is also plausible, as *MAS2* interacts with factors directly acting in splicing or in regulation of splicing. *MAS2* might also participate in mRNA quality control, preventing the translation of aberrant mRNAs. Further research will be required to analyze these possibilities.

The reduced methylation at the 45S rDNA promoters and the accumulation of unprocessed 45S pre-rRNAs observed in *amiR-MAS2.1* plants suggest that *MAS2* participates in the regulation of 45S rDNA transcription and pre-45S rDNA processing. These molecular phenotypes are shared by the *nuc-L1* and *hda6* mutants; *NUC-L1* and *HDA6* participate in the silencing, transcription, and processing of 45S rDNA genes (Probst et al., 2004; Pontvianne et al., 2007; Earley et al., 2010; Pontvianne et al., 2010).

In addition, the similarity of the phenotype of *amiR-MAS2.1* plants and the phenotypes of mutants affecting ribosomal proteins and nucleolin as well as the synergistic interactions of *mas2* alleles and *nuc-L1* strongly suggest that *MAS2* plays a key role in ribosome biogenesis together with or in parallel to nucleolin. The effects of *amiR-MAS2.1* on the methylation and accumulation of unprocessed 45S pre-rRNA were not as strong as those observed in the *nuc-L1* and *hda6* mutants, probably because *MAS2* expression is not completely abolished in *amiR-MAS2.1* plants.

*NUC-L2* is a partially redundant paralog of *NUC-L1*. In contrast to the consequences of loss of function of *NUC-L1* and *MAS2*, loss of *NUC-L2* function causes hypermethylation of the 45S rDNA (Durut et al., 2014). Since our results suggest a functional relationship between *MAS2* and *NUC-L1*, and since loss of function of *NUC-L2* causes late flowering, a phenotype that is also opposite to that of *amiR-MAS2.1* plants, it should be interesting to examine whether *MAS2* and *NUC-L2* play antagonistic roles in the regulation of the expression of 45S rDNA and perhaps in the control of the transcription of other genes regulating flowering.

#### **MAS2 and Human NKAP Likely Share DNA, RNA, and Protein Binding Preferences**

Several lines of evidence indicate that *MAS2* and human NKAP might share DNA, RNA, and protein binding preferences. A chromatin immunoprecipitation sequencing analysis revealed that human NKAP mainly binds to heterochromatic sequences, including those of centromeres (Burgute et al., 2014). Our FISH assays allowed us to visualize the colocalization of *MAS2* and



the Arabidopsis NORs, which contain 45S rDNA linked to other heterochromatic regions, including the telomeric ends.

With regard to RNA binding preferences, several noncoding RNAs (ncRNAs), mainly small nucleolar RNAs and rRNAs, immunoprecipitate with human NKAP (Burgute et al., 2014). We did not carry out RNA binding assays, but we found that our suppressor *mas2* mutations modified the splicing and/or translational efficiency of the different *AGO1* or *ago1* mRNAs present in the *ago1-51* and *ago1-52* mutants. Additionally, MAS2 seems to be involved in the methylation of the promoters of 45S rDNA genes, which involves siRNAs (Earley et al., 2010). The SynMuv domain of human NKAP binds to RNA, and it has been suggested that the regulatory role of NKAP is mediated by its interaction with ncRNAs (Burgute et al., 2014). Due to the high sequence similarity between the SynMuv domains of MAS2 and human NKAP, we think it likely that MAS2 binds rRNAs, siRNAs, and other regulatory ncRNAs.

Finally, with regard to protein-protein interactions, human NKAP interacts with several types of RNA binding proteins, nuclear ribonuclear proteins, splicing factors, and RNA helicases involved in rRNA processing and splicing (Burgute et al., 2014). Our Y2H assays showed that MAS2 interacts with the previously mentioned classes of proteins (Supplemental Table 3). NKAP homologs have also been found in corepressor complexes in *Drosophila* and mammals. *Drosophila* CG6066 interacts with the ortholog of human CBF1-interacting corepressor (CIR) (CG6843) (Hsieh et al., 1999), a Notch corepressor complex component. NKAP associates with CIR and histone HDAC3 in human cells and its repressor activity depends on the interaction between its SynMuv domain and HDAC3 (Pajerowski et al., 2009). The Biological General Repository for Interaction Data sets (BioGRID; <http://thebiogrid.org/>; Stark et al., 2006) includes the interactions found in Y2H assays between E01A2.4, the *C. elegans* NKAP ortholog, and CIR-1 and the ribosomal protein RPL-22 (Boxem et al., 2008). In agreement with these results, we found that MAS2 physically interacts in a Y2H assay with a protein containing a CIR domain (encoded by At2g44200) and with the ribosomal protein RPS24B (Supplemental Table 3). Although we have not detected any physical interaction between MAS2 and any other protein with a known epigenetic role, our results suggest that MAS2 functions in both epigenetic regulation and splicing site selection or regulation of mRNA translation.

In conclusion, our study shows that MAS2, the single NKAP homolog present in the Arabidopsis genome, is a perinucleolar protein that colocalizes with 45S rDNA repeats and regulates 45S rRNA expression. The functional similarity between human NKAP and MAS2 seems to be very high. We consider that our work contributes to the characterization of a conserved factor that likely plays a key role in the regulation of plant gene expression.

## METHODS

### Plant Material and Growth Conditions

*Arabidopsis thaliana* Ler and Col-0 wild-type accessions were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) and then propagated at our institute for further analysis. Seeds of the SAIL\_335\_C06

and GABI\_318G03 lines and the *par1-2*, *hda6-6*, and *hda6-7* mutants were provided by NASC, and those of the CSHL\_GT188551 line were provided by R. Martienssen. Seed sterilization and sowing, plant culture, and crosses were performed as previously described (Ponce et al., 1998; Berná et al., 1999). When required, culture media were supplemented with kanamycin (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), hygromycin (15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), or Basta (5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

### Positional Cloning and Molecular Characterization of MAS2 and Its Mutant Alleles

Genomic DNA was extracted as described by Ponce et al. (2006). Fine mapping of the *mas2-1* mutation was performed by iterative linkage analysis as previously described (Ponce et al., 1999, 2006) using the primers listed in Supplemental Table 1. The *mas2* point mutations were identified by sequencing, using the At402720\_F1, At402720\_R1, At402720\_F2, and At402720\_R2 primers (Supplemental Table 2). Sequencing reactions and electrophoresis were performed with ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kits and on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), respectively. The presence of T-DNA insertions was verified by PCR using the SAIL\_LB1 and At402720\_R2 primers (SAIL\_335\_C06; *mas2-2*) and At402720\_F1, Ds3\_1, At402720\_F1, and At402720\_R1 (CSHL\_GT188551; *mas2-3*) primers (Supplemental Table 2). Discrimination between MAS2 and *mas2-1* alleles was done by PCR amplification with At402720\_F2 and At402720\_R1 primers followed by digestion with *Bsa*HI, as the *mas2-1* mutation (GACGCC→GACACC) eliminates the *Bsa*HI restriction site.

### RNA Isolation, Reverse Transcription, and RT-qPCR Analysis

Total RNA was isolated from 50 to 100 mg of rosettes with the TRI RNA isolation reagent (Sigma-Aldrich). Since MAS2 lacks introns, prior to cDNA synthesis the RNA was treated with TURBO DNase (Ambion). Reverse transcription and RT-qPCR analyses were performed as described by Jover-Gil et al. (2012). RT-qPCR amplifications were performed on a Step-One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The *OTC* housekeeping gene (Quesada et al., 1999) was used as an internal control, as previously described (Cnops et al., 2004).

### Construction of Transgenes and Transgenic Lines

To generate constructs for Gateway cloning, we performed PCR amplifications with the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) and primers containing the attB1 (forward) or attB2 (reverse) sequences at their 5' ends (Supplemental Table 2). Before being cloned into the pGEM-T Easy221 entry vector, PCR products were purified with the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Bio-Sciences). The entry and destination clones were obtained in 2.5- $\mu\text{L}$  reactions using 1  $\mu\text{L}$  of the BP and LR Clonase II kit (Life Technologies), respectively. Chemically competent *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells were transformed by the heat shock method; *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 cells carrying the pSOUP helper plasmid were electroporated.

To obtain the 35S<sub>pro</sub>:MAS2, 35S<sub>pro</sub>:*mas2-1*, and 35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP overexpression constructs, the full-length coding sequences of MAS2 and *mas2-1* were PCR amplified from Ler and *ago1-52 mas2-1* plants, respectively. The destination vector pMDC32 was used for 35S<sub>pro</sub>:MAS2 and 35S<sub>pro</sub>:*mas2-1*, and pMDC85 for 35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP. A 1.1-kb DNA region upstream of the translation start codon of the MAS2 gene was used as promoter in the MAS2<sub>pro</sub>:GUS and MAS2<sub>pro</sub>:MAS2:GFP constructs. The fragments were obtained by PCR and subcloned into the pMDC162 and pMDC111 destination vectors, respectively. To obtain GFP translational fusions, the coding regions of MAS2 and *mas2-1* lacking their stop codons were PCR amplified from Ler and *ago1-52 mas2-1* plants,

2012 The Plant Cell

respectively. All constructs were sequence verified before being transferred into plants, which was performed by the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Primers used for obtaining these constructs and for sequencing them are described in Supplemental Table 2.

Arabidopsis transgenic lines expressing the *amiR-MAS2* artificial microRNA (5'-UAUACGUUUACCUUGCUGGAC-3') were obtained as described in Jover-Gil et al. (2014).

### Plant Gross Morphology and Histology, and Histochemical Assays

Leaf venation diagrams were obtained from first- and third-node leaves as described previously (Candela et al., 1999; Alonso-Peral et al., 2006). For histological analyses, first- and third-node leaves were fixed with FAA/Triton (1.85% formaldehyde, 45% ethanol, 5% acetic acid, and 1% Triton X-100) as described by Serrano-Cartagena et al. (2000). After dehydration, tissues were embedded in Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer) following the manufacturer's instructions. Sections of 7-mm thickness were cut on a Microm International HM350S microtome and stained with 0.1% (w/v) Toluidine blue. GUS assays were performed as described by Robles et al. (2010). In vivo visualization of MAS2 subcellular localization was performed in root cells of plants carrying MAS2-GFP fusion proteins. For nuclear staining, plant tissue was submerged in 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DAPI for 30 s and then rinsed in water. Micrographs were taken on a Nikon D-Eclipse C1 confocal microscope.

### Immunoblot Assay

Proteins were extracted with TRI reagent (Sigma-Aldrich) from 50 to 100 mg of material of plants collected at 15 DAS, precipitated with isopropanol, washed three times with 0.3 M guanidine-HCl (96% ethanol), and resuspended into resuspension buffer (8 M urea, 40 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 mM EDTA, and 1% SDS). Each protein extract (160  $\mu\text{g}$ ) was loaded in a 7% polyacrylamide gel. SDS-PAGE and electrotransfer to nitrocellulose were performed as previously described (Esteve-Bruna et al., 2013). Two primary antibodies were used: against AGO1 (Agrisera; AS09 527P) at 1:500 dilution and against the large subunit of Rubisco (Agrisera; AS03 037) at 1:500 to 1:2500 dilution.

### FISH

Tissue preparation and FISH were performed as previously described (Armstrong and Hultén, 1998; Fransz et al., 1998; Sanchez Moran et al., 2001) with minor modifications. Flower buds were collected into a 50-mL Falcon tube and kept in ice-cold water at 4°C for 64 h to accumulate cells in mitotic metaphase. After three washes in citrate buffer (pH 4.5), tissue was incubated with a mixture of 2% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 and 2% (w/v) Macerozyme R-10 (Duchefa Biochemie) in citrate buffer at 37°C for 2 h in a humid hybridization chamber before being macerated with a needle. A biotin-labeled 45S rDNA probe (pTa71; Gerlach and Bedbrook, 1979) and a 1:260 dilution of streptavidin-Cy3 (Roche) antibody in TNB buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.5% nonfat dry milk as a blocking reagent) were used. Confocal laser scanning microscopy images were obtained and digitally processed using the EZ-C1 operation software for a Nikon D-Eclipse C1 microscope.

### Analysis of the Methylation Status of the 45S rDNA Promoter

Genomic DNA was extracted and digested with the methylation-sensitive *HpaII* restriction endonuclease. Cleavage by *HpaII* of the 5'-CCGG-3' tetranucleotide is blocked by the presence of 5-MeC at this site (5'-C<sup>me</sup>CGG-3'). Digested and nondigested DNA was used as template for quantitative PCR amplifications using the p2f and p2r primers, which flank the restriction sites (Supplemental Table 2; Harscoët et al., 2010). The 25S

rRNA gene was amplified with the 25SrRNA\_F/R primer set and used as an endogenous control for quantitative PCR experiments. Bars represent the ratio between levels of PCR amplification products representing digested and nondigested fragments.

### Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>) under the following accession numbers: *MAS2* (At4g02720), *AGO1* (At1g48410), *NUC-L1* (At1g48920), and *HDA6* (At5g63110).

### Supplemental Data

**Supplemental Figure 1.** Positional cloning of the *MAS2* gene.

**Supplemental Figure 2.** Molecular nature and position of *mas2* point mutations.

**Supplemental Figure 3.** Sequence conservation among eukaryotic NKAPs.

**Supplemental Figure 4.** Sequence conservation among plant NKAPs.

**Supplemental Figure 5.** *ago1* alleles used in this work.

**Supplemental Figure 6.** Morphological phenotype of *ago1-51 mas2-1* adult plants.

**Supplemental Figure 7.** Effects of the *mas2* mutations on the levels of *AGO1* splice variants.

**Supplemental Figure 8.** Visualization of AGO1 protein isoforms in *ago1* mutants.

**Supplemental Figure 9.** Phenotypic effects of the overexpression of *MAS2* and *mas2-1* on the *Ler*, *ago1-51*, and *ago1-52* backgrounds at the rosette stage.

**Supplemental Figure 10.** Phenotypic effects of the overexpression of *mas2-1* on the *ago1-52* background in adult plants.

**Supplemental Figure 11.** Phenotypic effects of the overexpression of *mas2-1* on the *ago1-51* background in adult plants.

**Supplemental Figure 12.** Analysis of the of GABI\_318G03 insertional line.

**Supplemental Figure 13.** Seeds and embryos of *MAS2/mas2-2* plants.

**Supplemental Figure 14.** Morphological phenotypes caused by the *amiR-MAS2* transgene in different genetic backgrounds.

**Supplemental Figure 15.** Histology of *amiR-MAS2.1* leaves.

**Supplemental Figure 16.** Levels of the *AGO1* splice variants in *ago1-52 amiR-MAS2.1* plants.

**Supplemental Figure 17.** Visualization of *MAS2<sub>pro</sub>:GUS* activity in wild-type plants.

**Supplemental Figure 18.** Spatial pattern of expression of *MAS2*.

**Supplemental Figure 19.** Subcellular localization of the *MAS2:GFP* and *MAS2-1:GFP* proteins.

**Supplemental Figure 20.** Subcellular localization of the *MAS2:GFP* protein in cells of the root elongation zone from homozygous *35S<sub>pro</sub>:MAS2:GFP* plants.

**Supplemental Figure 21.** Effects of *amiR-MAS2.1* on 45S rRNA processing.

**Supplemental Table 1.** Primer sets used for the fine mapping of *MAS2*.

**Supplemental Table 2.** Other primer sets used in this work.

**Supplemental Table 3.** Results of a Y2H-based screen using MAS2 as a bait.

**Supplemental References.**

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Sarmiento-Mañús, J.M. Serrano, F.M. Lozano, T. Trujillo, and D. Navarro for their excellent technical assistance, J.L. Santos, M. Pradillo, and F.J. Medina for their help and advice, J.L. Micol for useful discussions and comments on the article as well as for the use of his facilities, B. Scheres for the pGEM-T Easy221 vector, and J. Simorowski and R. Martienssen for the CSHL\_GT188551 line. This research was supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BIO2008-01900 and BIO2014-56889-R) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 and PROMETEOII/2014/006) to M.R.P.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.R.P. conceived and designed research. M.R.P., A.B.S.-G., V.A., R.M.-P., and S.J.-G. performed research and analyzed data. M.R.P., R.M.-P., S.J.-G., and A.B.S.-G. wrote the article.

Received February 12, 2015; revised June 2, 2015; accepted June 12, 2015; published July 2, 2015.

## REFERENCES

- Abou-Elail, M., Cooke, R., and Sáez-Vásquez, J.** (2011). Variations in a team: major and minor variants of *Arabidopsis thaliana* rDNA genes. *Nucleus* **2**: 294–299.
- Alonso-Peral, M.M., Candela, H., del Pozo, J.C., Martínez-Laborda, A., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2006). The *HVE/CAND1* gene is required for the early patterning of leaf venation in *Arabidopsis*. *Development* **133**: 3755–3766.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium** (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science* **333**: 601–607.
- Armstrong, S.J., and Hultén, M.A.** (1998). Meiotic segregation analysis by FISH investigations in sperm and spermatocytes of translocation heterozygotes. *Eur. J. Hum. Genet.* **6**: 430–431.
- Bartel, D.P.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215–233.
- Berná, G., Robles, P., and Micol, J.L.** (1999). A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**: 729–742.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., and Lührmann, R.** (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**: 846–850.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Urlaub, H., Stark, H., and Lührmann, R.** (2010). Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* **16**: 2384–2403.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C.** (1998). *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.* **17**: 170–180.
- Boxem, M., et al.** (2008). A protein domain-based interactome network for *C. elegans* early embryogenesis. *Cell* **134**: 534–545.
- Bray, S.J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 678–689.
- Burgute, B.D., Peche, V.S., Steckelberg, A.L., Glöckner, G., Gaßen, B., Gehring, N.H., and Noegel, A.A.** (2014). NKAP is a novel RS-related protein that interacts with RNA and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **42**: 3177–3193.
- Campbell, D.A.** (1992). *Bodo caudatus* medRNA and 5S rRNA genes: tandem arrangement and phylogenetic analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 1053–1058.
- Candela, H., Martínez-Laborda, A., and Micol, J.L.** (1999). Venation pattern formation in *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Dev. Biol.* **205**: 205–216.
- Casanova-Sáez, R., Candela, H., and Micol, J.L.** (2014). Combined haploinsufficiency and purifying selection drive retention of *RPL36a* paralogs in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **4**: 4122.
- Ceron, J., Rual, J.F., Chandra, A., Dupuy, D., Vidal, M., and van den Heuvel, S.** (2007). Large-scale RNAi screens identify novel genes that interact with the *C. elegans* retinoblastoma pathway as well as splicing-related components with synMuv B activity. *BMC Dev. Biol.* **7**: 30–45.
- Chen, D., Li, Z., Yang, Q., Zhang, J., Zhai, Z., and Shu, H.B.** (2003). Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**: 720–724.
- Cheng, N.H., Liu, J.Z., Nelson, R.S., and Hirschi, K.D.** (2004). Characterization of CXIP4, a novel *Arabidopsis* protein that activates the H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter, CAX1. *FEBS Lett.* **559**: 99–106.
- Cloix, C., Tutois, S., Yukawa, Y., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnol, M.C., Picard, G., and Tourmente, S.** (2002). Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res.* **12**: 132–144.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Cnops, G., Jover-Gil, S., Peters, J.L., Neyt, P., De Block, S., Robles, P., Ponce, M.R., Gerats, T., Micol, J.L., and Van Lijsebetens, M.** (2004). The *rotunda2* mutants identify a role for the *LEUNIG* gene in vegetative leaf morphogenesis. *J. Exp. Bot.* **55**: 1529–1539.
- Costa-Nunes, P., Pontes, O., Preuss, S.B., and Pikaard, C.S.** (2010). Extra views on RNA-dependent DNA methylation and MBD6-dependent heterochromatin formation in nucleolar dominance. *Nucleus* **1**: 254–259.
- Creff, A., Sormani, R., and Desnos, T.** (2010). The two *Arabidopsis* *RPS6* genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Mol. Biol.* **73**: 533–546.
- Durut, N., et al.** (2014). A duplicated *NUCLEOLIN* gene with antagonistic activity is required for chromatin organization of silent 45S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1330–1344.
- Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S.** (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* **24**: 1119–1132.
- Esteve-Bruna, D., Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (2013). *incurvata13*, a novel allele of *AUXIN RESISTANT6*, reveals a specific role for auxin and the SCF complex in *Arabidopsis* embryogenesis, vascular specification, and leaf flatness. *Plant Physiol.* **161**: 1303–1320.
- Ferguson, E.L., and Horvitz, H.R.** (1985). Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **110**: 17–72.


- Ferguson, E.L., and Horvitz, H.R.** (1989). The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics* **123**: 109–121.
- Ferguson, E.L., Sternberg, P.W., and Horvitz, H.R.** (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **326**: 259–267.
- Fernández-Nohales, P., Domenech, M.J., Martínez de Alba, A.E., Micol, J.L., Ponce, M.R., and Madueño, F.** (2014). AGO1 controls arabidopsis inflorescence architecture possibly by regulating *TFL1* expression. *Ann. Bot. (Lond.)* **114**: 1471–1481.
- Franz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T.C., Torres-Ruiz, R.A., and Jones, G.** (1998). Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**: 867–876.
- Gerlach, W.L., and Bedbrook, J.R.** (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1869–1885.
- Giot, L., et al.** (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**: 1727–1736.
- Granato, D.C., Machado-Santelli, G.M., and Oliveira, C.C.** (2008). Nop53p interacts with 5.8S rRNA co-transcriptionally, and regulates processing of pre-rRNA by the exosome. *FEBS J.* **275**: 4164–4178.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pointner, R., and Schweizer, D.** (1989). Nucleotide sequence of the 25S-18S ribosomal gene spacer from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6395–6396.
- Gruendler, P., Unfried, I., Pascher, K., and Schweizer, D.** (1991). rDNA intergenic region from *Arabidopsis thaliana*. Structural analysis, intraspecific variation and functional implications. *J. Mol. Biol.* **221**: 1209–1222.
- Grummt, I.** (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* **17**: 1691–1702.
- Guan, Q., Wu, J., Zhang, Y., Jiang, C., Liu, R., Chai, C., and Zhu, J.** (2013). A DEAD box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 342–356.
- Harscoët, E., Dubreucq, B., Palauqui, J.C., and Lepiniec, L.** (2010). *NOF1* encodes an Arabidopsis protein involved in the control of rRNA expression. *PLoS ONE* **5**: e12829.
- He, D., Fiz-Palacios, O., Fu, C.J., Fehling, J., Tsai, C.C., and Baldauf, S.L.** (2014). An alternative root for the eukaryote tree of life. *Curr. Biol.* **24**: 465–470.
- Hodgkin, J.** (2005). Genetic suppression. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, doi/10.1895/wormbook.1.59.1.
- Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez, J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Tsukaya, H.** (2011). Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* **65**: 724–736.
- Horvitz, H.R., and Sulston, J.E.** (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **96**: 435–454.
- Howell, A.M., and Rose, A.M.** (1990). Essential genes in the *hDf6* region of chromosome I in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **126**: 583–592.
- Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B., and Hayward, S.D.** (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 23–28.
- Ilgan, J.O., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., and Jurica, M.S.** (2013). Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *RNA* **19**: 400–412.
- Ito, T., Kim, G.T., and Shinozaki, K.** (2000). Disruption of an *Arabidopsis* cytoplasmic ribosomal protein S13-homologous gene by transposon-mediated mutagenesis causes aberrant growth and development. *Plant J.* **22**: 257–264.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B.** (2006). Micro-RNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 19–53.
- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.R.** (2005). Plant microRNAs and development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 733–744.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R.** (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1322–1333.
- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., and Ponce, M.R.** (2014). Multi-gene silencing in Arabidopsis: a collection of artificial micro-RNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. *Plant J.* **80**: 149–160.
- Jurica, M.S., and Moore, M.J.** (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* **28**: 336–345.
- Kim, S.H., Koroleva, O.A., Lewandowska, D., Pendle, A.F., Clark, G.P., Simpson, C.G., Shaw, P.J., and Brown, J.W.** (2009). Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell* **21**: 2045–2057.
- Laferté, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., and Chédin, S.** (2006). The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev.* **20**: 2030–2040.
- Lam, S.Y., Horn, S.R., Radford, S.J., Housworth, E.A., Stahl, F.W., and Copenhagen, G.P.** (2005). Crossover interference on nucleolus organizing region-bearing chromosomes in Arabidopsis. *Genetics* **170**: 807–812.
- Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S.** (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* **13**: 599–609.
- Layat, E., Sáez-Vásquez, J., and Tourmente, S.** (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **53**: 267–276.
- Luo, L., Ando, S., Sasabe, M., Machida, C., Kurihara, D., Higashiyama, T., and Machida, Y.** (2012). Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 protein required for leaf morphogenesis consistently forms speckles during mitosis of tobacco BY-2 cells via signals in its specific sequence. *J. Plant Res.* **125**: 661–668.
- Mallory, A., and Vaucheret, H.** (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* **22**: 3879–3889.
- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., and Ponce, M.R.** (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of Arabidopsis *ARGONAUTE1*. *Sci. Rep.* **4**: 5533.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2002). Fertile hypomorphic *ARGONAUTE (ago1)* mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**: 629–639.
- Murfett, J., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (2001). Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* **13**: 1047–1061.
- Pajeroski, A.G., Nguyen, C., Aghajanian, H., Shapiro, M.J., and Shapiro, V.S.** (2009). NKAP is a transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development. *Immunity* **30**: 696–707.
- Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W., and Shaw, P.J.** (2005). Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol. Biol. Cell* **16**: 260–269.
- Petricka, J.J., and Nelson, T.M.** (2007). Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* **144**: 173–186.

- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L.** (1998). Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertions in the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **14**: 497–501.
- Ponce, M.R., Robles, P., and Micol, J.L.** (1999). High-throughput genetic mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 408–415.
- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotóns, M.A., and Micol, J.L.** (2006). Low-resolution mapping of untagged mutations. *Methods Mol. Biol.* **323**: 105–113.
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., and Sáez-Vásquez, J.** (2007). Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* **18**: 369–379.
- Pontvianne, F., et al.** (2010). Nucleolin is required for DNA methylation state and the expression of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **6**: e1001225.
- Poulin, G., Dong, Y., Fraser, A.G., Hopper, N.A., and Ahringer, J.** (2005). Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **24**: 2613–2623.
- Prelich, G.** (1999). Suppression mechanisms: themes from variations. *Trends Genet.* **15**: 261–266.
- Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F., Mourrain, P., Boutet, S., Earley, K., Lawrence, R.J., Pikaard, C.S., Murfett, J., Furner, I., Vaucheret, H., and Mittelsten Scheid, O.** (2004). *Arabidopsis* histone deacetylase *HDA6* is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* **16**: 1021–1034.
- Quesada, V., Ponce, M.R., and Micol, J.L.** (1999). *OTC* and *AUL1*, two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 101–106.
- Rogers, K., and Chen, X.** (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* **25**: 2383–2399.
- Robles, P., Fleury, D., Candela, H., Cnops, G., Alonso-Peral, M.M., Anami, S., Falcone, A., Caldana, C., Willmitzer, L., Ponce, M.R., Van Lijsebettens, M., and Micol, J.L.** (2010). The *RON1/FRY1/SAL1* gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 1357–1372.
- Sadasivam, S., and DeCaprio, J.A.** (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat. Rev. Cancer* **13**: 585–595.
- Saffer, A.M., Kim, D.H., van Oudenaarden, A., and Horvitz, H.R.** (2011). The *Caenorhabditis elegans* synthetic multivulva genes prevent ras pathway activation by tightly repressing global ectopic expression of *lin-3* EGF. *PLoS Genet.* **7**: e1002418.
- Sanchez Moran, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, F.C., and Jones, G.H.** (2001). Chiasma formation in *Arabidopsis thaliana* accession Wassilewskija and in two meiotic mutants. *Chromosome Res.* **9**: 121–128.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* **131**: 16–26.
- Serrano-Cartagena, J., Candela, H., Robles, P., Ponce, M.R., Pérez-Pérez, J.M., Piqueras, P., and Micol, J.L.** (2000). Genetic analysis of *incurvata* mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* **156**: 1363–1377.
- Shi, D.Q., Liu, J., Xiang, Y.H., Ye, D., Sundaresan, V., and Yang, W.C.** (2005). *SLOW WALKER1*, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. *Plant Cell* **17**: 2340–2354.
- Stark, C., Breitkreutz, B.J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., and Tyers, M.** (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **34**: D535–D539.
- Unfried, I., Stocker, U., and Gruendler, P.** (1989). Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene from *Arabidopsis thaliana* Col-0. *Nucleic Acids Res.* **17**: 7513.
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villarroel, R., and Van Montagu, M.** (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PFL* locus affects plant development by its specific expression in meristems. *EMBO J.* **13**: 3378–3388.
- Voinnet, O.** (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**: 669–687.
- Yildirim, O., Li, R., Hung, J.H., Chen, P.B., Dong, X., Ee, L.S., Weng, Z., Rando, O.J., and Fazio, T.G.** (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell* **147**: 1498–1510.



**Arabidopsis *MAS2*, an essential gene that encodes a homolog of animal NF-kappa B Activating Protein, is involved in 45S ribosomal DNA silencing**

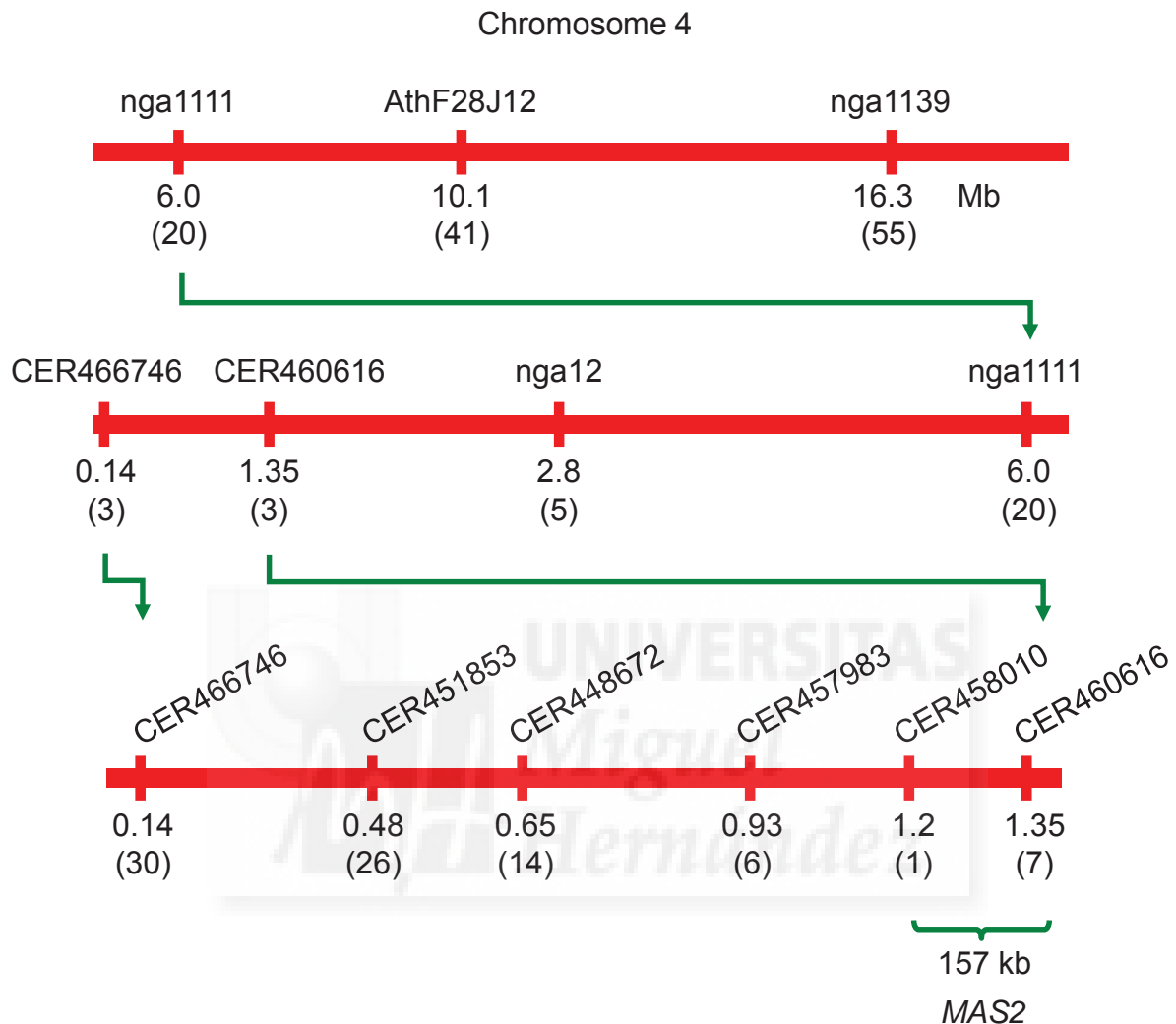
**Ana Belén Sánchez-García, Verónica Aguilera,  
Rosa Micol-Ponce, Sara Jover-Gil and María Rosa Ponce**



Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández,  
Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.

**Supplemental figures, tables and references**

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

**Supplemental Figure 1.** Positional cloning of the *MAS2* gene.

The molecular markers used for linkage analysis, their map positions (in Mb) and the number of informative recombinants identified (in parentheses) are indicated.  $F_2$  mapping populations were obtained from two P2 11.1 x Col-0 crosses. A total of 319  $F_2$  plants, exhibiting either the Ago1-52 suppressed or Ago1-52 phenotypes, were separately subjected to linkage analysis. Linkage to the *Ler* alleles of the markers tested was detected at the proximity to the *AGO1* locus (at chromosome 1), among plants from both phenotypic classes. Unequivocal linkage to the Col-0 alleles of the markers under study was only seen at the top of chromosome 4 in plants of the Ago1-52 class, as expected for the wild-type allele (*MAS2*) of a dominant mutation (*mas2-1*; Micol-Ponce et al., 2014). The genotypes of the Ago1-52 suppressed and Ago1-52 phenotypic classes were then inferred to be *ago1-52/ago1-52*; *mas2-1/-* and *ago1-52/ago1-52*; *MAS2/MAS2*, respectively.



## Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

Ler	( <i>MAS2</i> )	162	GCCAAGTTCTGCTTTTTGGGAGAACACACCGAGTCCACCTAGAGATCAGAACGTTTCAGCA
P7	13.1 ( <i>mas2-11</i> )		GCCAAGTTCTGCTTTTTGGGAGAACACACTGAGTCCACCTAGAGATCAGTATGTTTCAGCA
Ler	( <i>MAS2</i> )	898	AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGGAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P2	11.1 ( <i>mas2-1</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGGAGACACCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P1	3.1 ( <i>mas2-4</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGGAGACGTTCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P1	5.33 ( <i>mas2-5</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCAGTGAAGGAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P6	65.2 ( <i>mas2-6a</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGAAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P6	66.2 ( <i>mas2-6b</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGAAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P8	44.1 ( <i>mas2-7</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGATGAAGGAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P11	1.1 ( <i>mas2-8</i> )		AGTTATAGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGGAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCG
P12	1.1 ( <i>mas2-9</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGATGAAGGAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA
P13	1.1 ( <i>mas2-10</i> )		AGTTATGGTGGTGCTTTAAGACCCGGTGAAGAAGACGCCATAGCACAGTATGTTTCAGCA

**Supplemental Figure 2.** Molecular nature and position of *mas2* point mutations.

Multiple alignment of the sequences of the regions of the *MAS2* gene where the *mas2* point mutations map. Numbers (162 and 898) indicate nucleotide positions, counting from the start codon. The mutated nucleotides are shown in red. Both protocol numbers (PX Y.Z) and allele names are indicated for each suppressor line. The *mas2-6* allele was isolated twice (*mas2-6a* and *mas2-6b*); it was carried by two different suppressor lines (P6 65.2 and P6 66.2) obtained from seeds of the same parental group (P6).

## Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell 2015 10.1105/tpc.15.00135

```

Mucor circinelloides      1  -----MASRSRSPSPYRRRSPSPRGRS-----
Phytophthora parasitica 1  -----MKKSCYRHGSPWNTSMGRSSSPRRYRSPSPRRSRSRRTSY
Dictyostelium fasciculatum 1  MGDRDNNNDRDRDRDRDIERDRDRDYEDNNNRDRDRDRDYDKERDRGGDRDRDYRDN
Arabidopsis thaliana      1  -----MTMNSLPRDFGKNHGYLDRDYRNGRRSGDSDEELKGLSH
Reticulomyxa filosa      1  -----MSARDHPSAVEKMHSHNNSRSQSONHYDRSEHTENRQRESEPKKEEPTYS
Homo sapiens             1  -----MAPVSGSRSPDREASGSGGRRRSSSKSPKPSKSARS PRGRSRSRSHSC
Eimeria mitis           1  -----MTEEEIKQKEWRERIQRARGGTAAEISAAAAAPAAA
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     25  -GSSRRRSPSPRRRSPS---PRR-RDDNRKRYRDRSNERYSRHSPNGYHRQQRSTDIDG
Phytophthora parasitica  43  RDSRRRSRSNNRRSPSRSRSPRRGRPRSSSYHRDHEHEVMGRYGPSSGPGFKGGGGRG
Dictyostelium fasciculatum 61  RDNNRDNNNNNRDRDYRDNNNRDRNNNNNRDNYNRDNRDNNSSSSSYDRNRDNGNG
Arabidopsis thaliana     41  EEYRRORLKMKRSKAKFCFWENTPSPRDQNESSDENADEIQDKNGGERDNNKSKKERKRG
Reticulomyxa filosa     53  KNGSNNGIIDEAMPENLQQAHLREELIKSANGGNGWTTSTYPOOSTYSEELMKRAQQR
Homo sapiens           48  SRSGDRNGLTHQLGGLSQGSRNQSYRSRSPRRSPAPRGPFPASASSSVYYSYSRP
Eimeria mitis          40  AAAANRKKKNKRASSSSSSSSSSSDSSSDSDSDSSTAAPNHQQQQQQQQQQORA
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     79  -----ITIRPEESYTDFTVFNSTKTIWA-----
Phytophthora parasitica  103 RGR-----YSANDQTDFFFEERKQDSIDFSIWAGI-----
Dictyostelium fasciculatum 121  NGYGNNGMGKDNGVKTYEDTYSTTTTTTTNTSRGRSSSPVPRDITYSSSYQKYGSS
Arabidopsis thaliana     101  KSD-----SESESDGLRSRKRSSSRSKRRRKRSS-----
Reticulomyxa filosa     113  QMKCPVKIWIQNESSDEDENEIVENLNTKGIELFDEERKHEKERAELHLFEKLOKQKTY
Homo sapiens           108  YGS-----DKPWPSLIDKEREESLRQKRLSEREIG-----
Eimeria mitis          100  PCMG-----GVQLETAIEANYKETE-----
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     105  -----PSP-----ERARSMPE-DRPRK---SKKSKRYDT
Phytophthora parasitica  135  -----PSPPPMQKKVKKEKREHPSPSRSRSRFSRSPSRRS
Dictyostelium fasciculatum 181  GGSGGGGRHHRGGGGQAGDQSQSFVEYRKNLRENADVSPWIERSPTPPREKKRKDKDQ
Arabidopsis thaliana     131  -----YDSDESEGESDSEEDRRRRRKRSSSKR
Reticulomyxa filosa     173  YKSIETKDDDKMRNSEADKSISSRSQFRSRSSSPARVKSNTKSKSRSRSR
Homo sapiens           139  -----ELGAPEVWGLSPKNPEPDSDEHTPVEDE
Eimeria mitis          120  -----KRRQENKIQKKIHKNKLKGEKMQQ
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     131  DSADSSSEEEEDRHRRHRR---SRSSKHKSSGSSSRHKSSRHKSSSRHSSRHKS
Phytophthora parasitica  174  RSLSDVSRSDSKEERRRRRKSKKKAKSSSRSHKRSKSKKHKKE-SKSRKRKRYSYS
Dictyostelium fasciculatum 241  DEKRSSSSKSSSSSKDRSRSRSPRKSFRDRDRSSSQEHDSDYESRKRKKKEKQKQ
Arabidopsis thaliana     160  KKSRSRFRKRRSHRRKTKYSDSDESDSDSKAEISASSSGEEEDTKSKSKRRKSSDS
Reticulomyxa filosa     233  RTRLRSKSKSRSRNSRSTSSSSSQSSASSANGDSASEADDKKRDRHKRRKKNES
Homo sapiens           167  EPKKSITTSASTSEEEKKKSSRSKERSKRRKKSSKRKHKKYSEDSDSDSDSETDSSDE
Eimeria mitis          146  QEYKFIASSKFRGGRLGYVFKKGEQKRRKRASSSSSSSSSSSEDEKETVKPAAA
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     187  SSHRSKRRSSSSSASSEEE---STGRKPALV-----VDQSQLDQVQDLW
Phytophthora parasitica  233  DSESDSRSGSESDASVASEREKERKISVDTGDSMSB-----LDENEKREAAKFK
Dictyostelium fasciculatum 301  RKKDKKDKKERKRRKKRKS---SLDD---SDSGSDSDS-----MSSETDPVGIN
Arabidopsis thaliana     220  SKRSKGEKTKSGSDSDCTEEDSKMQVDEIVKNTLE-----LDEELKFKKEMI
Reticulomyxa filosa     293  ANEKHSKRRQKDRSRSKDQNRITDNSVISEDCKPDSNSDISNHKQKDEPKVNVQTET
Homo sapiens           227  DNKRRAKKAKKEKKKHSRKKYKRRSKSRKESD-----SSSKESQEEFL
Eimeria mitis          206  AAAAVSPGAAAGAAAEAAATAAAAAAACAARPVA-----VLEAAAAEIQHKT
consensus                    . . . . .

Mucor circinelloides     234  VE-----
Phytophthora parasitica  283  EA-----
Dictyostelium fasciculatum 348  LN-----
Arabidopsis thaliana     270  EL-----
Reticulomyxa filosa     353  VTNSVTIKVEEGVVNEQQPSASIANNEKITNGATHSKMSNTMNQKDEEETEFVWVESAK
Homo sapiens           275  EN-----
Eimeria mitis          256  EE-----
consensus                    .

```

## Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell 2015 10.1105/tpc.15.00135

```

Mucor circinelloides      236 -----KQVDLP--DDLAPVGPVPLAENEDNDR---AYGSQLLPGECSAMA
Phytophthora parasitica  285 -----VQGSHKEEEDDEEIGPKPLVAADETSAASSMNYGKALLPGECAATA
Dictyostelium fasciculatum 350 -----DKSLWEEKTQENVSFQTSVGPKPLPQVLVGSYGGALMPGECEAIA
Arabidopsis thaliana     272 -----KKKSSAVDEEEEGDVGPMPLPKAEGHIS---YGGALRPGECEAIA
Reticulomyxa filosa     413 HSANGSDSDSDGDKHGSNRNHDDNGAVDTGEPQPAEELVTKMDRRDYGGALLPGECEAIA
Homo sapiens            277 -----PWKDRTKAEEPSDIGPEAPKTLTSQDDKPLNYGHALLPGECAATA
Eimeria mitis          258 -----KEESSSEDEMGPPEMEVTNKLAQKN-VDYGFALRPGECEAIA
consensus                ... .. ** * .****.*

```

```

Mucor circinelloides      277 AYVKEGKRIPRRGEI GLSGDQIAEFKA GYVMSGSRHRMNAVRI RKENQVLSAEKRLV
Phytophthora parasitica  331 QFVQKNMRIPRRGEVGN GEEIENLENLGYVMSGSRHRMNAVRI RKENQVLSAEKRAL
Dictyostelium fasciculatum 396 QFVQKNMRIPRRGEVGLT SDEITVFE DS GYVMSGSRHRMNAIRLRKEQVYSAEKRAL
Arabidopsis thaliana     315 QYVQGGKRIPRRGEVGLN EEIQKFEDLGYVMSGSRHRMNAIRLRKENQVYSAEKRAL
Reticulomyxa filosa     473 NFVQGGMRIPRRGEVGLT SEEIEAFESLGYVMSGSRHRMNAIRLRKENQVYSAEKRAL
Homo sapiens            323 EYVKA GKRIPRRGEI GLTSEEIASFECSGYVMSGSRHRMNAIRLRKENQVYSAEKRAL
Eimeria mitis          300 QFVQGGKRIPRRGEVGLT EEISNFENLGYVMSGSRHRMNAIRLRKENQVYSAEKRAL
consensus                ..* ..*****.*.....* * .*****.*.*.*.*.*.....*

```

```

Mucor circinelloides      337 LQHAQEQIKKRENEIISGFRFELSDKFKKED-----
Phytophthora parasitica  391 ALINFEKQORENAIINDFKEMLTARLTKKHGSRLVEDMESAAKD---
Dictyostelium fasciculatum 456 AMLNKEEKAKRENRLISDFRSLVNSQIQDADK-----
Arabidopsis thaliana     375 AMFNFEKAKREKVMSDLQRLVQRHMGEVGNHDPFGAGKTEEDDD
Reticulomyxa filosa     533 AMVNFEKLNREKKLMAAYQKMLNKKKMSQSGIV-----
Homo sapiens            383 ASFNQEEKRENKIISAFREMVYRKTGKDDK-----
Eimeria mitis          360 AMLNQEKAAREAQLLYDLRELKKNESLFAEEIEDKEKKK-----
consensus                .....**.....

```

**Supplemental Figure 3.** Sequence conservation among eukaryotic NKAPs.

Sequence alignment of full-length putative MAS2 orthologs from *Mucor circinelloides* (representing Fungi), *Phytophthora parasitica* (Stramenopiles), *Dictyostelium fasciculatum* (Amoebozoa), *Arabidopsis thaliana* (Viridiplantae), *Reticulomyxa filosa* (Rhizaria), *Homo sapiens* (Holozoa), and *Eimeria mitis* (Alveolata). We found NKAP homologs in all of the eukaryotic supergroups except Excavata. Bacteria do not have NKAP homologs. Identical or similar residues shared by at least 50% of proteins are shaded black or gray, respectively. The order in which the sequences appear is determined by the guide tree (Higgins et al., 1992). Numbers indicate residue positions. The SynMuv domain (as described at NCBI) is indicated with a continuous black line under the consensus sequence shown at the bottom of the alignment. Amino acid substitutions caused by the *mas2* mutations are shown in red. Protein sequences were obtained using the BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool) at NCBI (Altschul et al., 1990). This alignment and that of Figure S4 were obtained using ClustalW2 (Larkin et al., 2007) and shaded with Boxshade 3.21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

## Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell 2015 10.1105/tpc.15.00135

```

Oryza sativa      1 MGRTEG-----RLASVHLPGRSRVSAKSPRRRRRSPSRSPSPRRNRRRRDRSPSPYRS
Phoenix dactylifera 1 MGRDEARKPKS--RLASTIAFTGRSR--ASPSPLSDADGSDDPYNRHRRSRRSPRSETP
Populus trichocarpa 1 MGRPLSTVEIPDRRYIPDRQNSRYTPESDASPDRRRRRDRGSPSYQSYDDRHREIDRGRR
Vitis vinifera    1 MGRPSSTVEIPDKRHRIE--NGGHSPLSDSPRDHRRRR--SPDYGRYDP--DSERRHR
Glycine max       1 MGRPSSTIEIPHERHRHN---GRRTPDSDISDDYRRRR--SPSYDR--HTRHR
Arabidopsis thaliana -----
Nicotiana sylvestris 1 MGRLASVVEISDERHRSY---RNGDGGRYSPQRRRYRSRSPSPINRNRRSRSRSLSGSR
Physcomytrella patens 1 -----MQMDR
consensus

Oryza sativa      54 RDRSPSPY-----RDRRRQWSPYHRDRGRDVEREWARDRDHPAPRRGGGGAGAGA
Phoenix dactylifera 57 PR-RSLTPD-----RPRRR-----GRGDGRWSPYHDRAS--RNGKPPSLGD
Populus trichocarpa 61 RRSASPDPYRSRPRRTTTRSPSPRQ-----RQTLDHPLPKKFKGK-RSFLDR---NGR
Vitis vinifera    53 RRSASPDPY-----NPRRSRPSDA-----RRVSGS---DRKNRS-ATFLDRDYKNGR
Glycine max       51 RCSESEPHR-----SPRHTN-----GTHNDNTLPKKFGRNGAYLDRDRGDWQ
Arabidopsis thaliana 1 -----MTMNSLPRRFGKN-HGYLDRDYRNGR
Nicotiana sylvestris 57 SRSRSPAYSPYRQQPNGRNRRSYPDRLYRRPSPNEPPRRFGRAKQPYLDRDYRNGK
Physcomytrella patens 6 GRERGRDGY-----VHSHLRSVAVPVRDSNNYRHREHNR
consensus

Oryza sativa      105 WSASDDDDDEQLGLTYFEYRRLKROKRLRSMKRCIWNITPSPPRREG-----DEDYGY
Phoenix dactylifera 96 GSSSDDDE--LKGLSYFEYRRLKROKRLRKLKNCIWRVTPSPPRGERDPSEPLDGPNGA
Populus trichocarpa 110 ESDEESDEELK--GLSFEERRRLKROKRLRSMYSYCIWNVSPSPPRGDNEE-----EFEEK
Vitis vinifera    96 YSESEDEELK--GLSFEYRRLKROKRLRMLRNCIWNVTPSPPRNANEE-----EFEPE
Glycine max       94 RSDSEDEELK--GLNYEERRLKROKRLRSLKHCINVTSPSPPRDNEDP-----EDYSK
Arabidopsis thaliana 26 RSGSDSDEELK--GLSHEEYRRLKROKRLRSAKFCFEWNTSPSPPRQDNEE-----SDEN
Nicotiana sylvestris 117 IADSDSDEELKAKGLNFEYRRLKROKRLRQKLNKNCIWNCTSPSPPRNENEP-----EYDE
Physcomytrella patens 41 LEDSDSDESELR-RTQDPSEYRRLKROKRLRQKLNKNCIWNVTSPSPPRHGE-----
consensus
      * . * * * * * * * * * * *

```

```

Oryza sativa      160 SDEEEEBEEKESPKKVASS--DKSEEDSKGSSESSEDSDSLSDDSRKSKDDTRKKKGR
Phoenix dactylifera 154 TDLPAEDDEEAEEKGKDRIGSSESDSDGASATNLASERSDSDS---ESPPKRGR
Populus trichocarpa 163 ADKIEBKHGEEKSDSSGK--EKEKGN--NGKGRMESESESESESDSDSREKRRRGL
Vitis vinifera    149 PDEETEKYVVEEDKRENNDLK--KEIKG---SAKSELERSESESESE-----
Glycine max       148 PDEISDRDDGAGKIDKEIKAK--AKAKSES--ESDSDSESEKSVSESDGSRSRKRRKSS
Arabidopsis thaliana 78 ADEIQDKNNGE---RDDNSKG--KERKGS--DSESESDGLRSRKRKSKSRSRKRRRKY
Nicotiana sylvestris 171 PDEIVEKSVDEKVKDAESKDLKFSKSESEASDSDSEASDSESESDLESRKSKRRKSR
Physcomytrella patens 90 PDEQESSESDSDVDRKRRHKKM--HSRRVESEEDSDVDRKRRHKSRRSRSHKREAS-
consensus
      . .

```

```

Oryza sativa      218 KGSHRSSKRSHRRRHSSDTEGDDNSKAAE--DSEGSYDSEDMDRRKKRSRRHKKS
Phoenix dactylifera 210 GRRSRKGRSRRRRHLDSEEDSEDASYEDSSTESESSYNPSPEDDVRKQKRRSRSRSH
Populus trichocarpa 219 S-SKRRRRRNSDSESD-VSESEPDSEEDRKRKRKSRSKSISRRRNSKSGRKRKSTRKKS
Vitis vinifera    194 -----SDSESE--DSRSRKRKRGRSRRRTGKSSYS---DSESDGDDSEKDDASE
Glycine max       205 AGSRRRSYSESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESE
Arabidopsis thaliana 132 D-----SDSESE---GSESDSEEDRRRRRKSSSKRKRKSRSRFRKRR-SHRRKT
Nicotiana sylvestris 231 S-RRRNRSRRESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESESE
Physcomytrella patens 147 -----DSDQSDKSVRRSRVKSSKRRRSDDSSEE---DSDVERKERARTKRGSS
consensus

Oryza sativa      276 RGRSSRRKRSKNDTASEGSEEEAVAAAGSSPPLRDSKRSRRRKRKSKQSDSED
Phoenix dactylifera 270 KRSRSTRSNRRKTRSSRATSSDEEEESD-SSPRP---KRSRSKTSKRPKYESS--
Populus trichocarpa 277 KYSDSDYSGSEESDDRVKSKRRSRSSGSQKSGSKK--RTTETEGENLDSNEG---SGSE
Vitis vinifera    239 NESDSEVSGSDESD--RPRSQKQGAALSTKSKRKS--SRSETYSESSYSK---SDSE
Glycine max       265 EDSESDSDSSGRRKKKRSKSKSKRRKRIRSRKRITN-RSPETEGEGSLEEE---NGSG
Arabidopsis thaliana 179 KYSDSDS--SDESKAEISASSSGEEDTKSKSKRRK--KSSDSSSKRSGEKTKSGSDSD
Nicotiana sylvestris 286 RKSYSDESESESKSQQESDSDSDASKKQKRALKS--KKKDEDSDIPEKS---LELD
Physcomytrella patens 194 RRSSERRSKESRKLKRLKLEDSEETEEVDLKLGLMS--KEGLKPSGPPHSDGAAESSGG
consensus

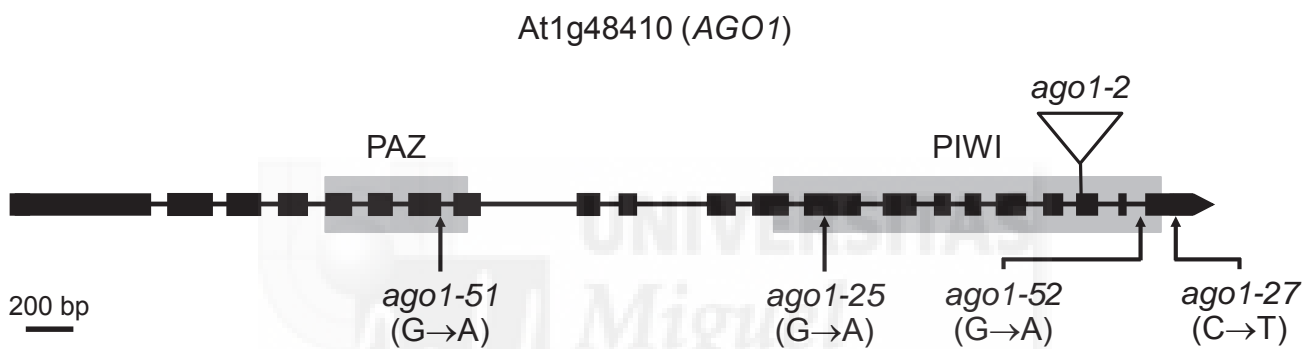
```

## Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

<i>Oryza sativa</i>	336	QAPSDADLGVKEIDETNEPEIDPEAIK-FKEMLEAQKKA---ALNEEMP---VGPMPILPR
<i>Phoenix dactylifera</i>	323	---SDLADARQDDEK-KPEIDPEALK-FKEMLESHKKP---ALDNEPF---VGPVPLPR
<i>Populus trichocarpa</i>	333	K-NEVN--DDDDADKA---ETDVEALM-FKEMLEAQKKP---ALDNEPE---VGPMPILPR
<i>Vitis vinifera</i>	293	V-DAKSKMKAEDVMIN---EVNAEALI-FKEMIESQKKP---ALDNEPT---VGPMPILPR
<i>Glycine max</i>	321	SGDAKSKTTVDEVMT---EINAEAIK-LKELFESQKKP---ALDNEPA---VGPMPILPR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	237	GTEEDSKMQVDETVKNTLELDEELKKFKEMLELKKKSS--AVDEEEEGDVGPMPILPK
<i>Nicotiana sylvestris</i>	342	G-EAGINEKADELITD---EVDSEELLE-FKELLEARKKS---NLDNEPQ---VGPMPILPR
<i>Physcomytrella patens</i>	253	SDSDEADVVEEIGEEVANQNEVDEBAFK-FKELLEAQKKAAGGLENEBPM---IGPAPAPR
consensus		* * ** * *
<i>Oryza sativa</i>	389	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Phoenix dactylifera</i>	372	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Populus trichocarpa</i>	380	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Vitis vinifera</i>	342	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Glycine max</i>	371	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Arabidopsis thaliana</i>	295	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLNAEETQKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Nicotiana sylvestris</i>	391	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETSKFEFLGYVMGSRHQRM
<i>Physcomytrella patens</i>	309	AEGHISYGGALRPEGDAIAQYVQQKRIPRRGEVGLSAEETISTFEFLGYVMGSRHQRM
consensus		***** * ** * *****
<i>Oryza sativa</i>	449	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREHKVMADLQRLVQRHIGNDVGPSTHDPFAT
<i>Phoenix dactylifera</i>	432	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREAKVMVDLQRLVQRHIGQDMGPTHDPFAP
<i>Populus trichocarpa</i>	440	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREHKVMADLQRLVQRHIGEDVGPSTHDPFAA
<i>Vitis vinifera</i>	402	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREHKVMADLQRLVQRHIGQDVGPSTHDPFAV
<i>Glycine max</i>	431	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREHKVMADLQRLVQRHIGQDVGPSTHDPFAA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	355	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREAKVMSDLQRLVQRHIGEEVGPSTHDPFGA
<i>Nicotiana sylvestris</i>	451	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREKVMADLQRLVQRHIGQDTGPSTHDPFQG
<i>Physcomytrella patens</i>	369	NAIRIRKENQVYSAEDKRALAMFNYYEESKREHKVMSDLQRLVQRHIGQEVAPNHDPFGT
consensus		***** ** ** ***** * . * . * *****
<i>Oryza sativa</i>	509	ADG----
<i>Phoenix dactylifera</i>	492	KASDAADS
<i>Populus trichocarpa</i>	500	KASDDADA
<i>Vitis vinifera</i>	462	KGAEGTDT
<i>Glycine max</i>	491	KASDGADA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	415	GKTEEDDD
<i>Nicotiana sylvestris</i>	511	KSEEGADA
<i>Physcomytrella patens</i>	429	TKADEVPS
consensus		

**Supplemental Figure 4.** Sequence conservation among plant NKAPs.

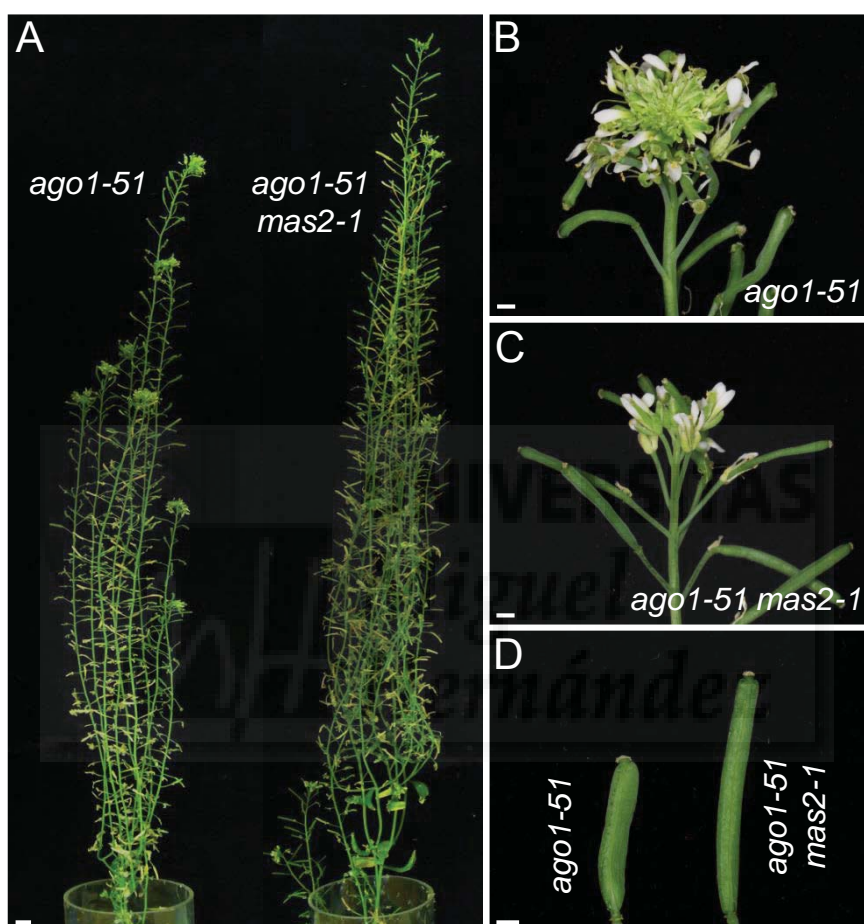
Sequence alignment of full-length putative MAS2 orthologs from different angiosperm lineages, as classified in Myburg et al. (2014), and mosses: *Oryza sativa* (representing Poales), *Phoenix dactylifera* (Arecales), *Populus trichocarpa* (Malpighiales), *Vitis vinifera* (Vitales), *Glycine max* (Fabids), *Arabidopsis thaliana* (Malvids), *Nicotiana sylvestris* (Asterids), and *Physcomitrella patens* (Bryophyte). Identical or similar residues across all of sequences are shaded in black and gray, respectively. Numbers indicates residues positions in each protein. The SynMuv domain, the amino acid changes and the consensus sequences are marked as in Figure S3.



**Supplemental Figure 5.** *ago1* alleles used in this work.

Schematic representation of the *AGO1* gene, with the position and molecular nature of the mutations used in this work. Introns and exons are represented as black lines and boxes, respectively. The regions encoding the PAZ and PIWI domains of the *AGO1* protein are shaded grey. The triangle indicates the T-DNA insertion carried by the *ago1-2* allele. The *ago1-51* mutation affects the PAZ domain of *AGO1*, and *ago1-25* and *ago1-52* affect the PIWI domain; *ago1-27* does not affect any known domain.

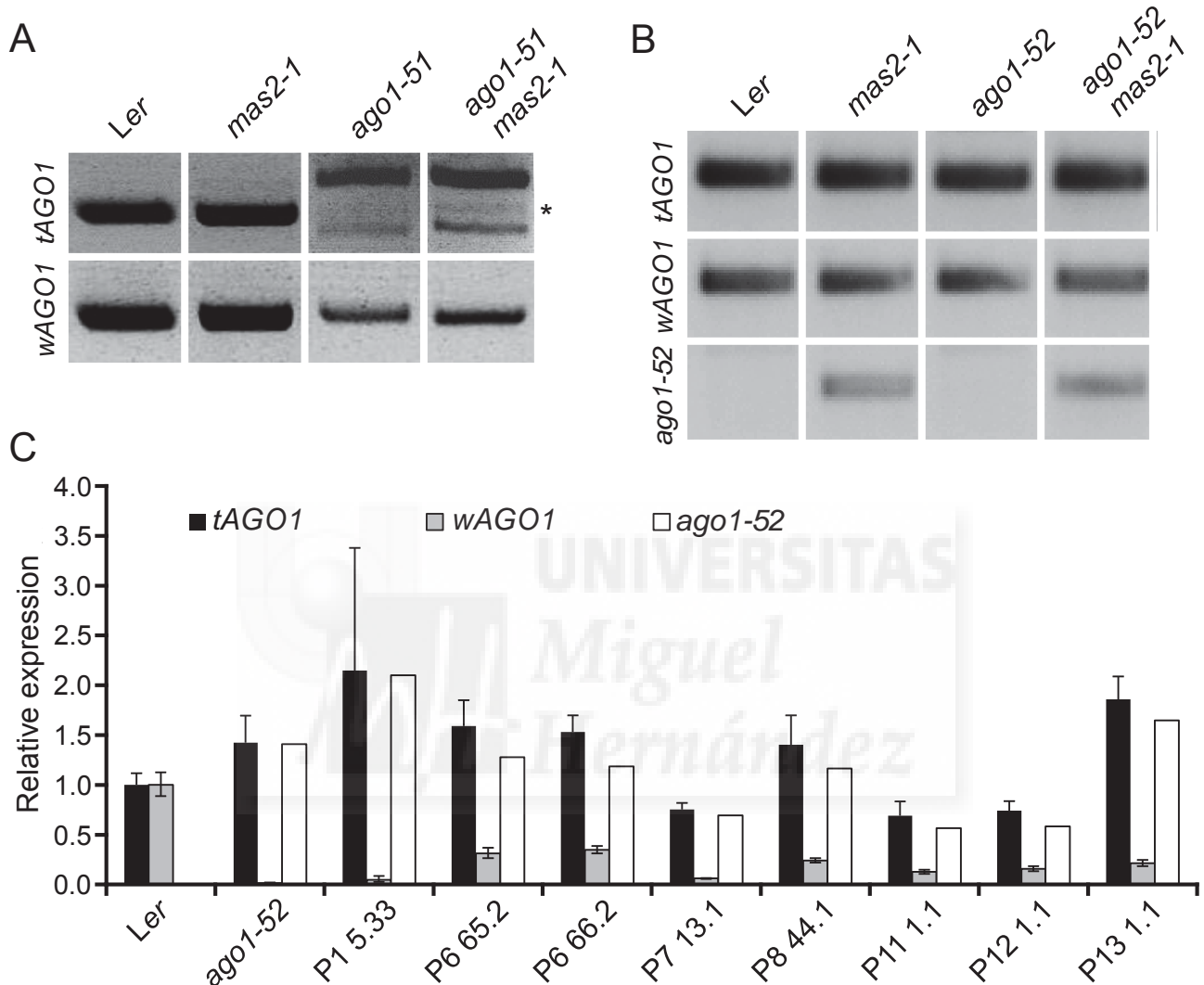
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 6.** Morphological phenotype of *ago1-51 mas2-1* adult plants.

(A) Adult *ago1-51* and *ago1-51 mas2-1* plants. (B, C) Inflorescences of (B) *ago1-51*, and (C) *ago1-51 mas2-1* plants. (D) Siliques of *ago1-51* and *ago1-51 mas2-1* plants. Pictures were taken at 75 das. Scale bars: (A) 1 cm, and (B-D) 1 mm.

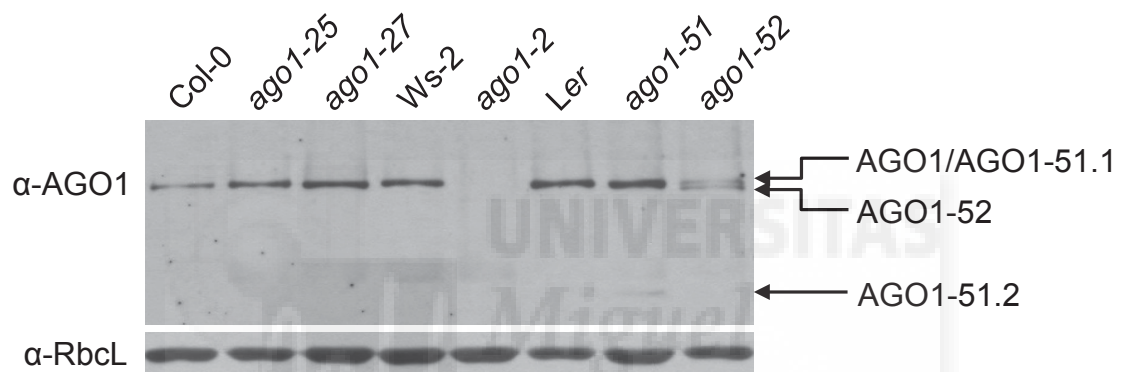
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

**Supplemental Figure 7.** Effects of the *mas2* mutations on the levels of AGO1 splice variants.

(A, B) RT-PCR analysis of RNA extracted from *Ler*, *mas2-1*, *ago1-51*, *ago1-52*, *ago1-51 mas2-1* and *ago1-52 mas2-1* plants using primers (Table S2) designed to amplify (A) *tAGO1* or *wAGO1* mRNAs, and (B) *tAGO1*, *wAGO1* or *ago1-52* mRNAs. Asterisk indicates the *wAGO1* cDNA. (C) RT-qPCR analysis of the modification of the relative levels of *wAGO1* and *ago1-52* splice forms in the eight suppressor lines identified as described in Micol-Ponce et al. (2014), other than P2 11.1 (*ago1-52 mas2-1*, whose analysis is shown in Figure 4). Error bars represent standard deviations. RNA was extracted from plants collected at 15 das. Two biological replicas with three technical replicas each were performed.

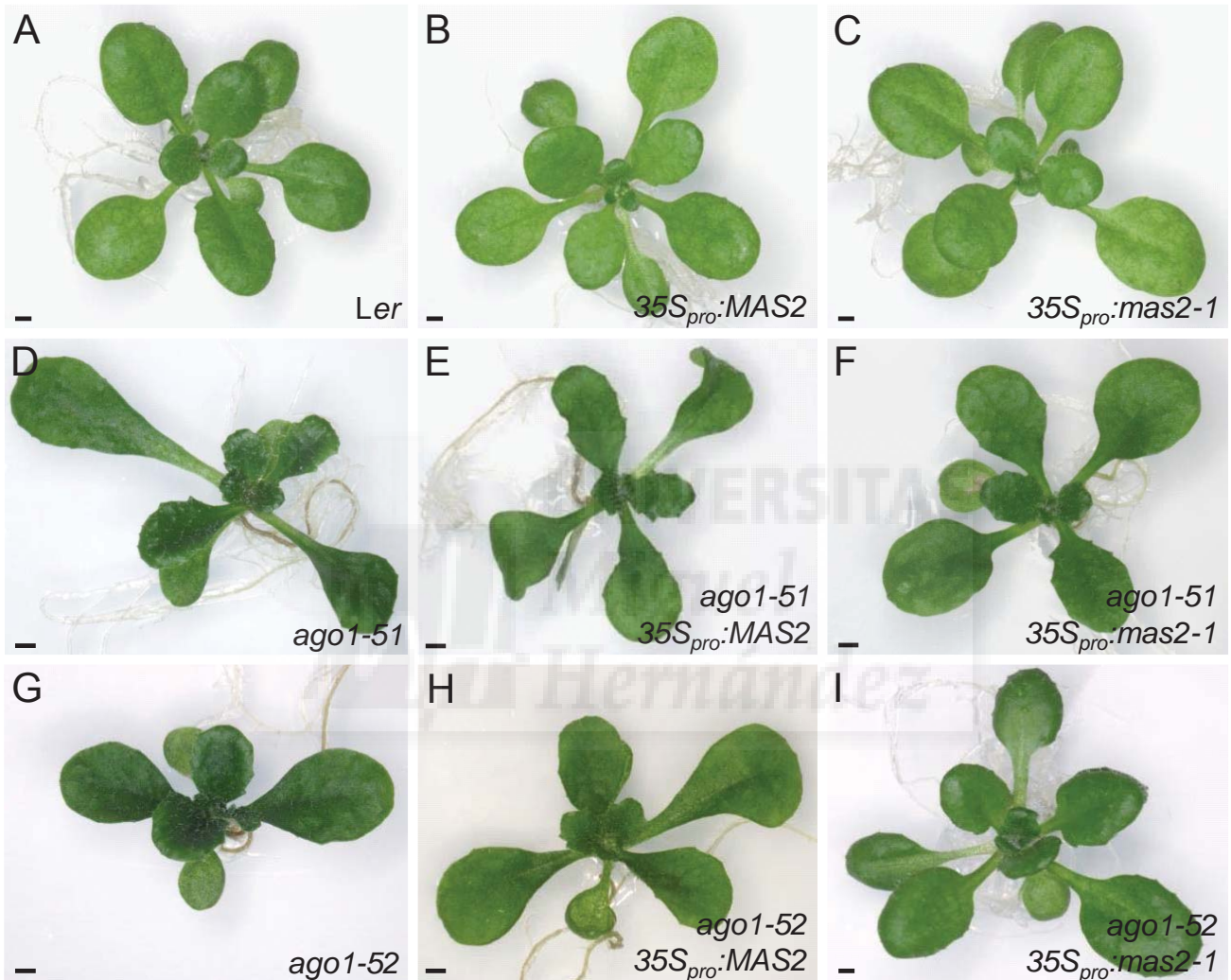


Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 8.** Visualization of AGO1 protein isoforms in *ago1* mutants. Detection of AGO1 proteins by immunoblot using a primary antibody against AGO1 ( $\alpha$ -AGO1) in protein extracts from *ago1-25* and *ago1-27* (in the Col-0 genetic background), *ago1-2* (Ws-2), and *ago1-51* and *ago1-52* (Ler). Arrows indicate bands matching the expected size for the AGO1-51.1, AGO1-51.2, and AGO1-52 isoforms. The Rubisco ( $\alpha$ -RbcL) large subunit was used as a loading control. Proteins were extracted from plants collected at 15 das.

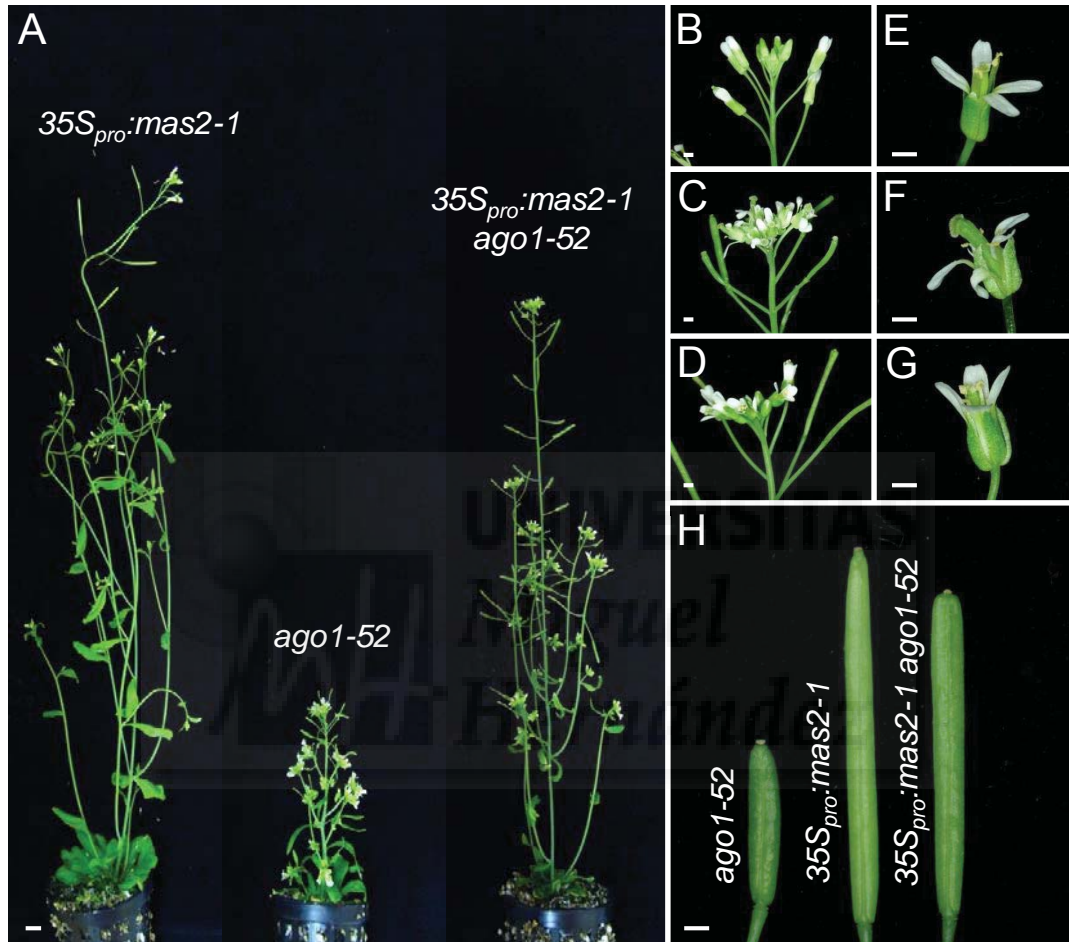
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 9.** Phenotypic effects of the overexpression of *MAS2* and *mas2-1* on the *Ler*, *ago1-51* and *ago1-52* backgrounds at the rosette stage.

Rosettes of (A) *Ler*, (B, C)  $35S_{pro}::MAS2$  and  $35S_{pro}::mas2-1$ , both in the *Ler* background, (D) *ago1-51*, (E) *ago1-51*  $35S_{pro}::MAS2$ , (F) *ago1-51*  $35S_{pro}::mas2-1$ , (G) *ago1-52*, (H) *ago1-52*  $35S_{pro}::MAS2$ , and (I) *ago1-52*  $35S_{pro}::mas2-1$  plants. Pictures were taken at 21 das. Scale bars: 1 mm.

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 10.** Phenotypic effects of the overexpression of *mas2-1* on the *ago1-52* background in adult plants. (A) Adult *35S<sub>pro</sub>:mas2-1*, *ago1-52* and *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-52* plants. (B-G) Inflorescences and flowers of (B, E) *35S<sub>pro</sub>:mas2-1*, (C, F) *ago1-52*, and (D, G) *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-52* plants. (H) *ago1-52*, *35S<sub>pro</sub>:mas2-1* and *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-52* siliques. Pictures were taken at 48 das. Scale bars: (A) 1 cm, and (B-H) 1 mm.

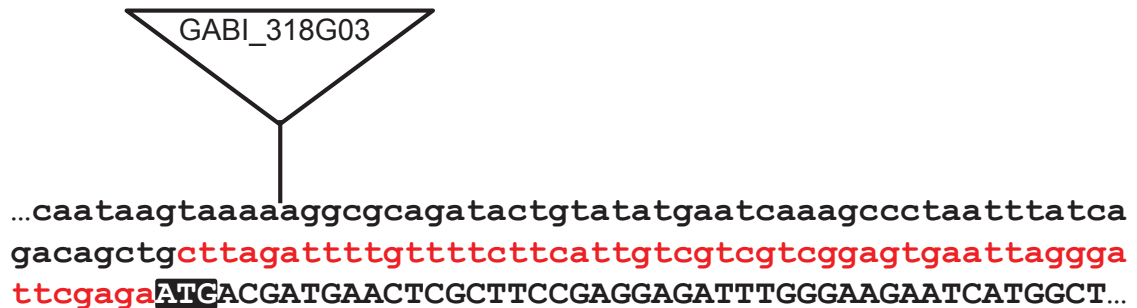


**Supplemental Figure 11.** Phenotypic effects of the overexpression of *mas2-1* on the *ago1-51* background in adult plants.

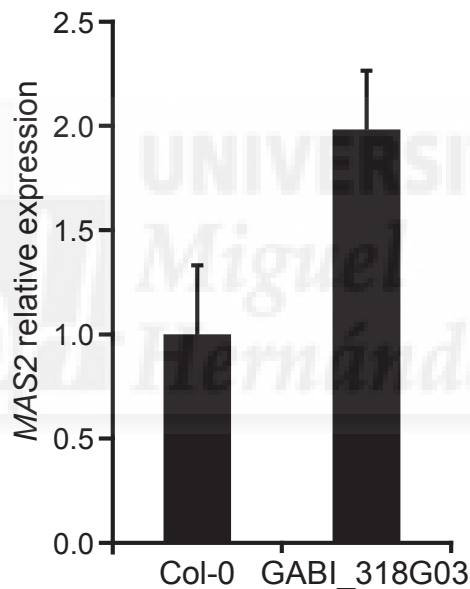
(A) Adult *35S<sub>pro</sub>:mas2-1*, *ago1-51* and *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-51* plants. (B-D) Inflorescences of (B) *35S<sub>pro</sub>:mas2-1*, (C) *ago1-51*, and (D) *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-51* plants. (E) From left to right: *ago1-51*, *35S<sub>pro</sub>:mas2-1 ago1-51* and *35S<sub>pro</sub>:mas2-1* siliques. Pictures were taken at 48 das. Scale bars: (A) 1 cm, and (B-E) 1 mm.

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

A

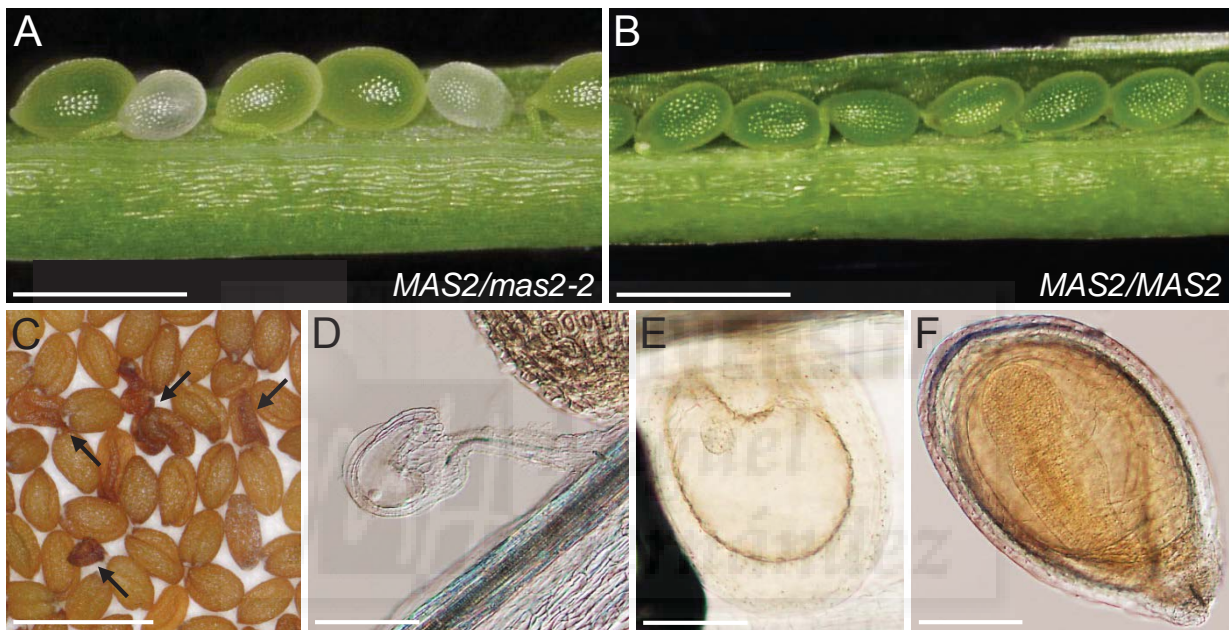


B



**Supplemental Figure 12.** Analysis of the of GABI\_318G03 insertional line.

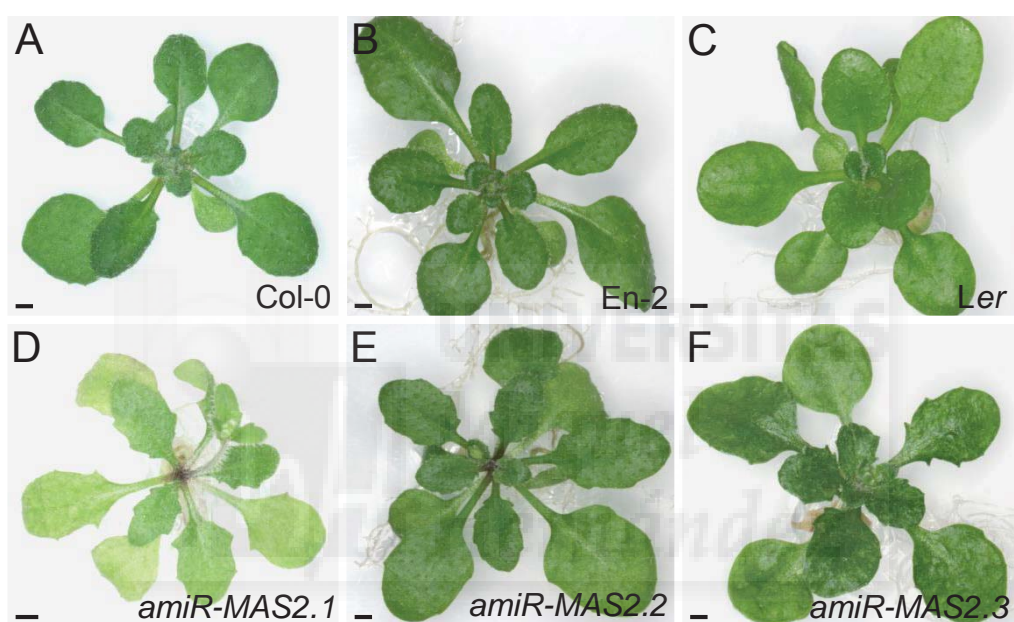
(A) The T-DNA insertion carried by the GABI\_318G03 line in the putative promoter region of *MAS2* is represented by a triangle. Plants homozygous for this insertion were viable and phenotypically wild type. The T-DNA insertion is located 103 bp upstream of the start codon of *MAS2*, probably affecting its promoter region because its annotated leader is 53-nt long. Its position was verified by amplification with the MAS2\_F2 + RB-pAC161, and LB-pAC161 + At4g02720\_FR1 primer pairs (Table S2), followed of sequencing of the corresponding PCR products. The promoter region and the 5'UTR of *MAS2* are shown in black and red lowercase letters, respectively. The coding region is shown in black capital letters and its start codon is highlighted in bold. (B) RT-qPCR analysis of *MAS2* expression in Col-0 and homozygous GABI\_318G03 plants, showing that the levels of *MAS2* transcripts were not reduced in this line. Error bars represent standard deviations. Three biological replicas with three technical replicas each were performed.



**Supplemental Figure 13.** Seeds and embryos of *MAS2/mas2-2* plants.

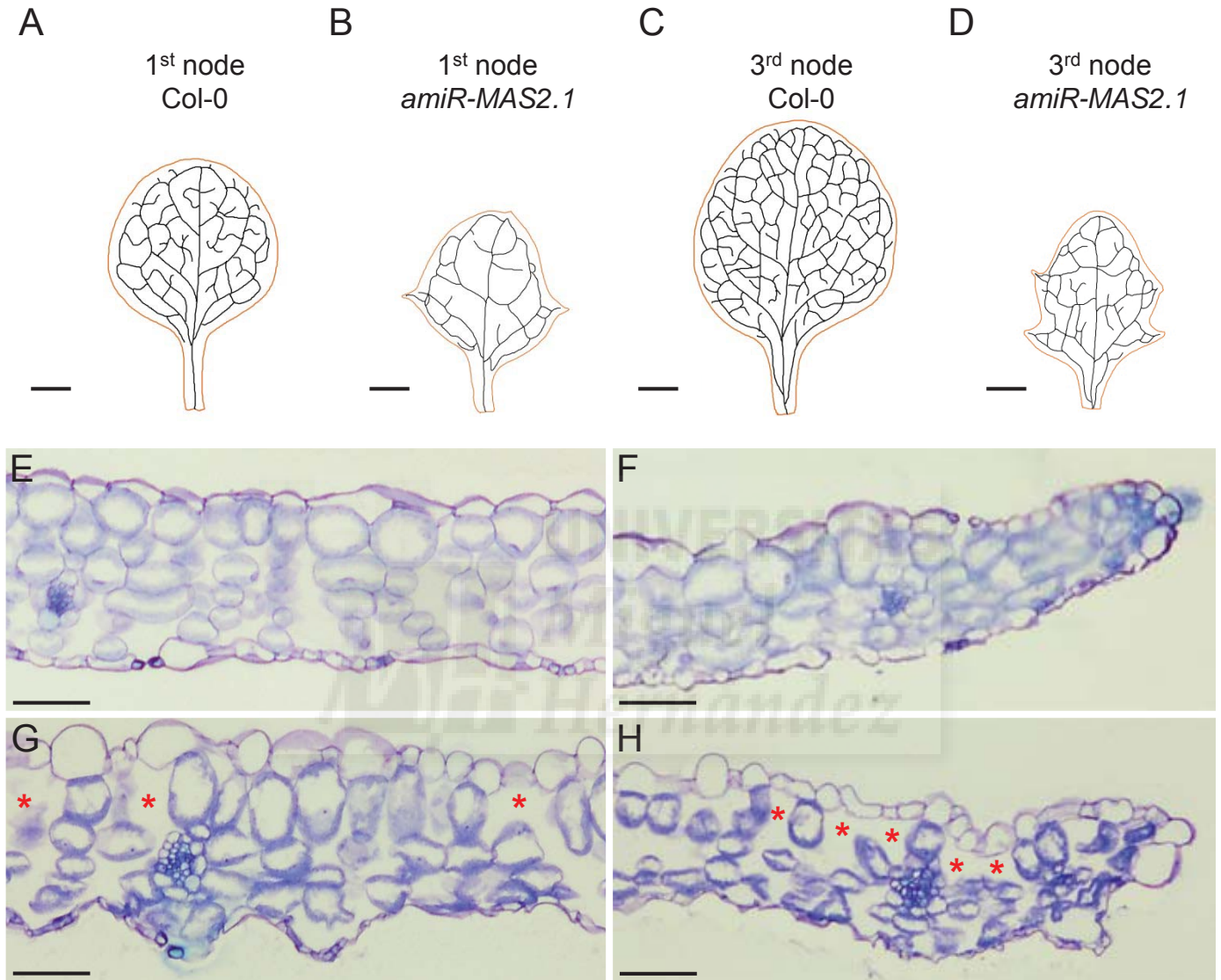
(A, B) Dissected siliques of (A) *MAS2/mas2-2*, and (B) Col-0 plants. (C) Mature seeds of *MAS2/mas2-2* plants. Arrows indicate wrinkled and abnormal seeds. (D-F) Confocal micrographs of (D) unfertilized or aborted ovules and (E, F) abnormal embryos arrested in the (E) globular and (F) linear-cotyledon stages found in the siliques of *MAS2/mas2-2* plants. Scale bars: (A-C) 1 mm, and (D-F) 200  $\mu$ m.

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 14.** Morphological phenotypes caused by the *amiR-MAS2* transgene in different genetic backgrounds. Rosettes of (A) Col-0, (B) En-2, (C) Ler, (D) *amiR-MAS2.1* (in a Col-0 background), (E) *amiR-MAS2.2* (En-2), and (F) *amiR-MAS2.3* (Ler) plants. Pictures were taken at 28 das. Scale bars: 1 mm.

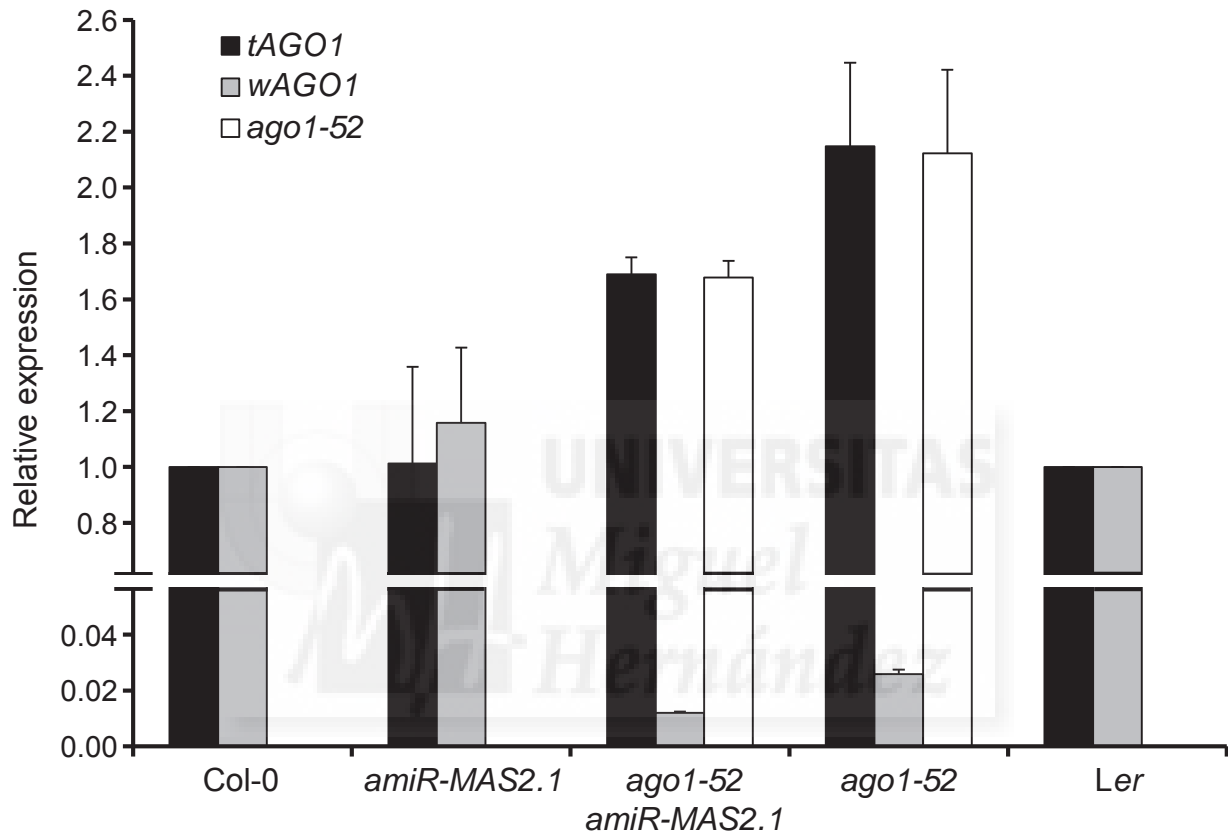
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

**Supplemental Figure 15.** Histology of *amiR-MAS2.1* leaves.

(A-D) Leaf venation pattern of *amiR-MAS2.1* plants. The leaf margin is shown in orange. Diagrams were drawn on micrographs taken from cleared (A, B) first- and (C, D) third-node leaves of (A, C) Col-0 and (B, D) *amiR-MAS2.1* plants. (E-H) Transverse sections of the (E, G) central and (F-H) marginal regions of third-node leaf lamina of (E, F) Col-0 and (G, H) *amiR-MAS2.1* plants. Asterisks highlight enlarged intercellular air spaces. Micrographs of central transects were taken midway between the primary vein and leaf margin. Plant material was collected at 21 das. Scale bars: (A-D) 1 mm, and (E-H) 50  $\mu$ m.



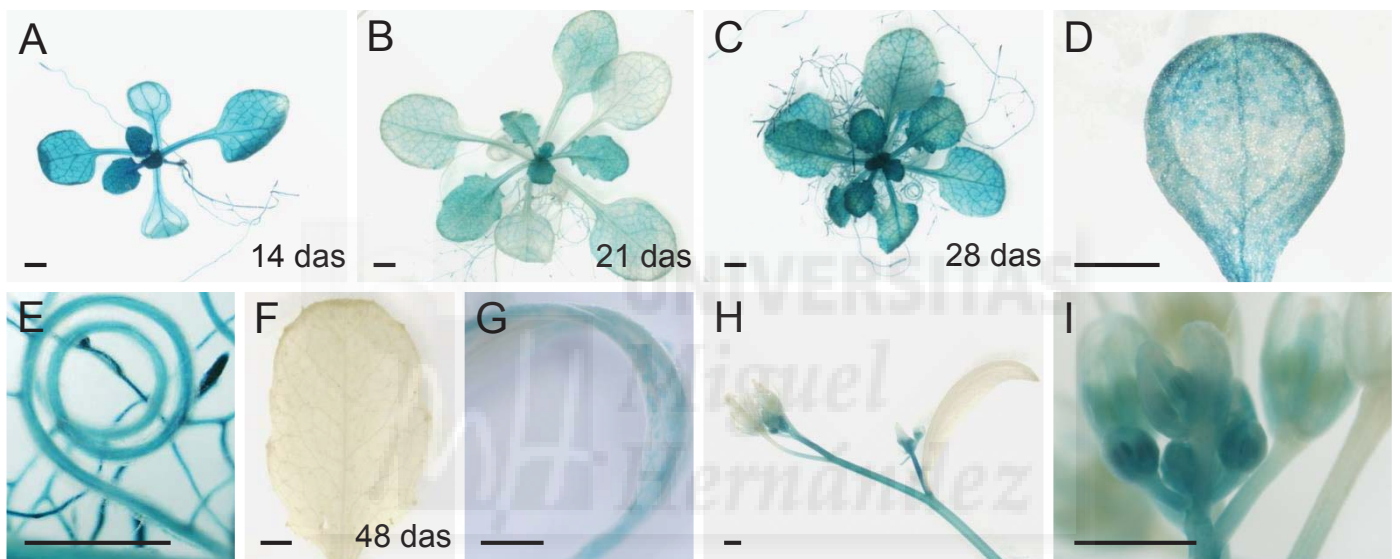
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 16.** Levels of the AGO1 splice variants in *ago1-52 amiR-MAS2.1* plants.

RT-qPCR analysis of Col-0, *amiR.MAS2.1/amiR-MAS2.1*, *ago1-52/ago1-52*; *amiR-MAS2.1/amiR-MAS2.1*, *ago1-52/ago1-52*, and Ler plants using specific primers to amplify cDNA from *tAGO1* (black bars), *wAGO1* (grey bars) and *ago1-52* (white bars) mRNAs. Error bars represent standard deviations. RNA was extracted from plants collected at 15 das. Two biological replicas with three technical replicas each were performed.

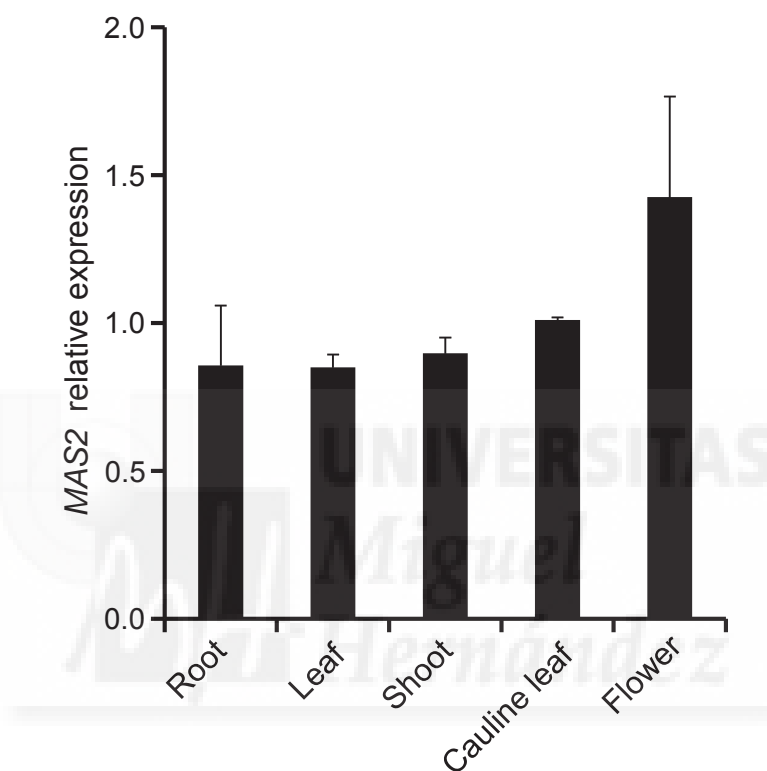
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 17.** Visualization of *MAS2<sub>pro</sub>:GUS* activity in wild-type plants.

GUS staining of *MAS2<sub>pro</sub>:GUS* transgenic plants in (A-C) rosettes collected (A) 14, (B) 21 and (C) 28 das, (D) a cotyledon, (E) roots, (F) a mature vegetative leaf (48 das), (G) an expanding cauline leaf, and (H) a shoot with a fully expanded cauline leaf and flower buds that are magnified in I. Scale bars: 1 mm.

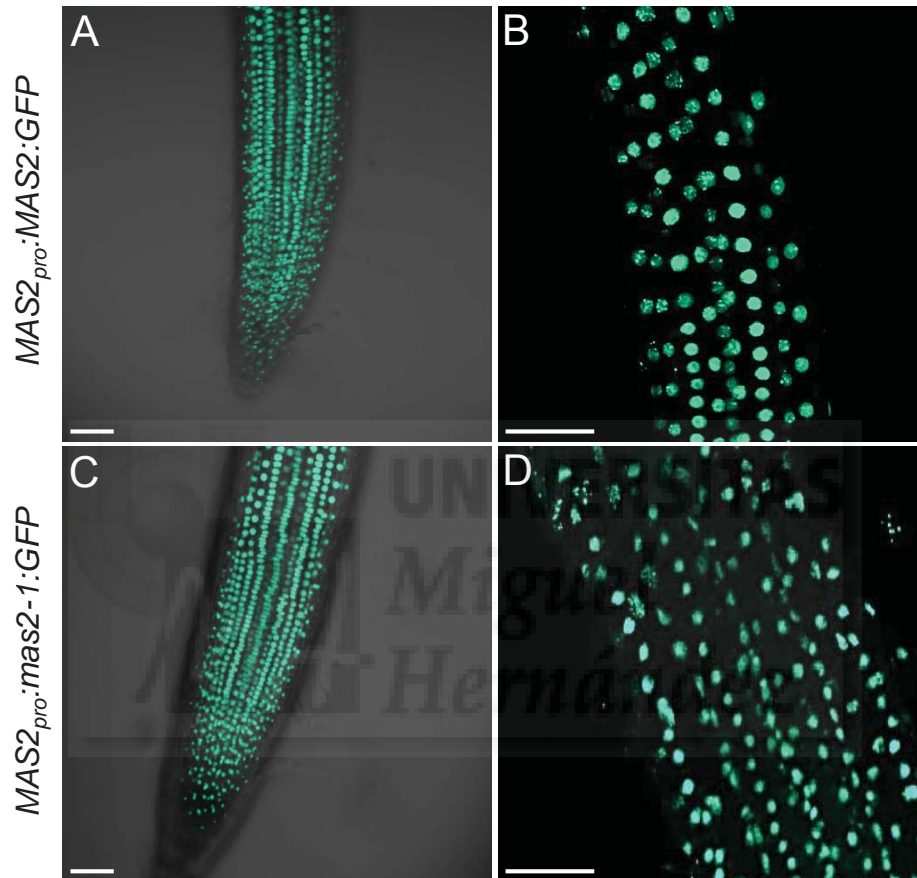
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 18.** Spatial pattern of expression of *MAS2*.

RT-qPCR analysis of *MAS2* expression in different tissues. Total RNA was isolated from the tissues indicated and used as a template. Error bars represent standard deviations. Two biological replicas with three technical replicas each were performed.

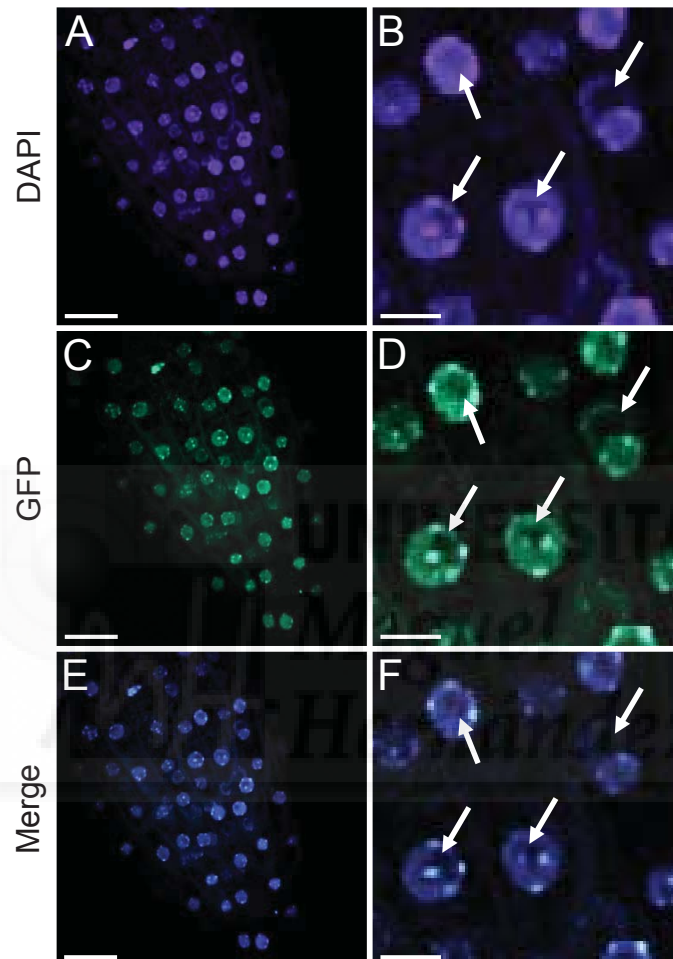
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 19.** Subcellular localization of the MAS2:GFP and MAS2-1:GFP proteins.

Confocal laser scanning microscopy of roots from plants carrying the (A, B) *MAS2<sub>pro</sub>:MAS2:GFP*, and (C, D) *MAS2<sub>pro</sub>:mas2-1:GFP* transgenes. The green signal corresponds to the fluorescent GFP emission in the root apex and root elongation zone (magnified in B, D). Scale bars: 50  $\mu$ m.

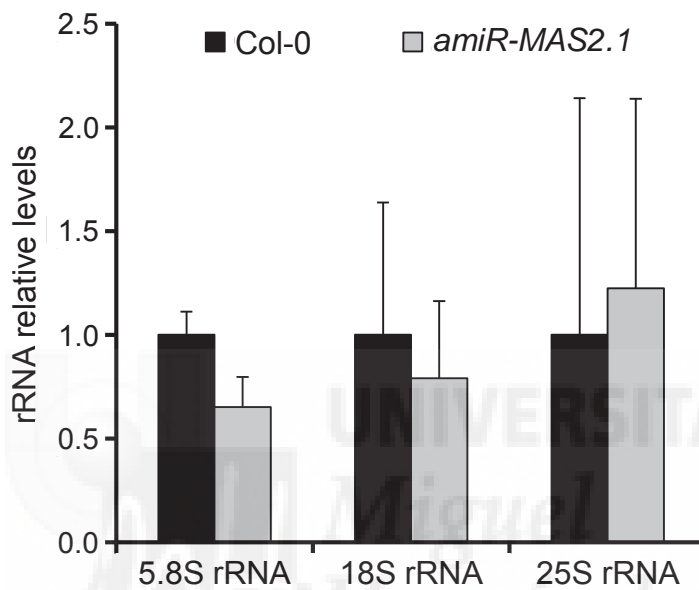
Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 20.** Subcellular localization of the MAS2:GFP protein in cells of the root elongation zone from homozygous  $35S_{pro}:MAS2:GFP$  plants.

Fluorescence signals are shown from (A, B) DAPI, (C, D) GFP, and (E, F) their overlay. A, C and E images are magnified in B, D and F, respectively. Arrows indicate nucleoli. Scale bars: (A, C, E) 50  $\mu\text{m}$ , and (B, D, F) 10  $\mu\text{m}$ .

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135



**Supplemental Figure 21.** Effects of *amiR-MAS2.1* on 45S rRNA processing.

Relative expression of mature rRNA products from the 45S rRNA processing in Col-0 and homozygous *amiR-MAS2.1* plants. rRNA levels were analyzed by RT-qPCR using the 5.8SrRNA\_F + 5.8SrRNA\_R, 18SrRNA\_F + 18SrRNA\_R and 25SrRNA\_F + 25SrRNA\_R primer pairs (Table S2). Relative expression levels of 5.8S, 18S and 25S rRNAs in *amiR-MAS2.1* plants were compared to the expression levels in Col-0 plants. Error bars represent standard deviations. Three biological replicas with three technical replicas each were performed.

**Supplemental Table 1.** Primer sets used for the fine mapping of *MAS2*

Marker	Type	Locus	Oligonucleotide sequence (5' → 3')		Ler	Col-0
			Forward primer	Reverse primer		
CER466746	In/Del	AT4G00330-AT4G00335	CGGCGTTCAGTTATCCATTCC	GAACCAAAAAATTGGAAACTAGTCCG	349	369
CER451853	In/Del	AT4G01090-AT4G01100	GTAGATGTCGGACCCACAGTTG	TCCCTAATTGATAAAAAGGCCCC	218	246
CER448672	In/Del	AT4G01540	AACCCAGCAAGGATTTGCCTAG	AAATTCAGCACAAATAGCCTACTC	277	289
CER457983	In/Del	AT4G02100-AT4G02110	CCGTCAAAGCGACTAGTCTATT	ACAAATATCGAGAAACTAAAGCC	251	229
CER458010	In/Del	AT4G02710-AT4G02715	CATGATAACACAGGGCGTAATT	GACGAAAGTACCCTTGTATATG	179	212
CER460616	In/Del	AT4G03060-AT4G03063	GAGAAATTGAAGACCCAAACGCC	AGCGAGGCCCGATGATTGTAC	342	386
nga12	SSLP	AT4G05520	AATGTTGTCTCCCTCCCTC	CCTTGATGATCTTCTGATGC*	252	262
nga1111	SSLP	AT4G09640	GGTTCGGTTACAATCGTGT	AGTCCAGATTGAGCTTTGAGC*	157	152
AthF28J12.3	SSLP	AT4G18500	GCTCCGCCGTTGGATTCTG	GCCTTTATCAATGGATGAGGAA*	257	265
nga1139	SSLP	AT4G34390	CTAGGCTCGGGTGAGTCAC	TTTTCCCTTGTGTTGCATTCC*	295	306

\*Labelled with HEX (4', 7', 2', 4', 5', 7'-Hexachloro-6-carboxyfluorescein).

**Supplemental Table 2.** Other primer sets used in this work

Purpose	Oligonucleotide name(s)	Oligonucleotide sequence (5'→3')	
		Forward primer (F)	Reverse primer (R)
MAS2 sequencing	At4g02720_F1/R1	CAAAGCCCTAATTTATCAGACAG	TCAAGTTCTAGCTCAGTGTTCCT
	At4g02720_F2/R2	AGCGGAAGAAATCTTCGGATT	GCAAGTAGCAAACAGCAGTATC
T-DNA insertion verification	Sail_LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	
	Salk_LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
	Ds3_1	ACCGACCGGATCGTATCGGT	
	LB-pAC161	ATATTGACCATCATACTCATTGC	
	RB-pAC161	GTGGATTTGATGTGATATCTCC	
Double mutant genotyping	At4g02720_F2/R2		
	AGO1_F1/R1	GGCTAATATGAGTCTTCTCTGC	CCATCCCTGTGCAGAATAACC <sup>c</sup>
	AGO1_F2/R2	TCTGCCACCCTACAGAGTTTG	GTCATAAAGATAGATAGAGGGTG <sup>c</sup>
	AGO1_F3/R3	ATCGACAGCCTTCATAGAGGC <sup>c</sup>	CTTGCATACCTGTGCAGCAAC
	AGO1_F4/R4	TTTACTGCAGATGGACTTCAATC	CAACTCAGCAGTAGAACATGAC
	HDA6_F/R	TCGATCGTTAGTTTAACATTGAG	ATCAGCGTCTGTCTGTTTTAA
Overexpression	AtNUC-L1;PARL1_F/R	AGTTGCTGTCAACCAAGAAG	TGGCCTACCATGGAATTCA
	MAS2_F1/R1	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAT GACGATGAACCTCGTCCCGA <sup>a</sup>	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AATCATCATCTTCTTCAGTCTTTTC <sup>b</sup>
GUS assays	pMDC32_F1/R1	TTCATTTGGAGAGGACCTCG	GAAATTCGAGCTCCACCGCG
	MAS2_F2/R2	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCCAT TATCGTCCATGGCTGACAC <sup>a</sup>	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CTCGAATCCCTAATTCACTCC <sup>b</sup>
Subcellular localization	pMDC164_F1/R1	AAGACTGTAACCACCGGTCTG	TTGACTGCCTCTTCGCTGTAC
	MAS2_F3/R3	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCCAT TATCGTCCATGGCTGACAC <sup>a</sup>	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGAT CATCATCTTCTTCAGTCTTTCC <sup>b</sup>
	MAS2_F4/R3	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCCAT GACGATGAACCTCGTCCCGA <sup>a</sup>	
rDNA variant	pMDC111R		TATGTTGCATCACCTTCACCCT
	pMDC85R		ATAATGATCAGCGAGTTGCAC
	p3/p4	GACAGACTTGTCCTCCAAAACGCCACC <sup>d</sup>	CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT <sup>d</sup>



Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

**Supplemental Table 2.** Other primer sets used in this work

Purpose	Oligonucleotide name(s)	Forward primer (F)	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Reverse primer (R)
expression				
45S pre-rRNA accumulation	+/-250-F and +/-250-R	CAAGCAAGCCCATCTCCTC <sup>e</sup>		CAACTAGACCATGAAAATCC <sup>e</sup>
45S pre-rRNA processing	U1/U2	CGTAACGAAGATGTTCTTGGC <sup>f</sup>		ATGCGTCCCCTCCATAAGTC <sup>f</sup>
rDNA methylation	p2f/r	GCATGCAAAAAGAAATTTCAA <sup>g</sup>		CTGGAAAAAGGCCAACAAAACC <sup>g</sup>
RT-PCR	AGO1_F3/R5			GAGGCTCGTATACTGCCTCC
RT-qPCR	At4g02720_F2/R1			
	AGO1_F5/R5	CTCCGGAAGTTACATCAAGGG		AAGATTGATTCTGAACTCCTTGG
	AGO1_F6/R6	GGCATGATAAAGGAGTTGCTCAT		CTGACTCCATCCCCTGTAGAAGA
	AGO1_F4/R7			TAATATGCAGGGGGAACAATT
	AGO1_F7/R5	ACTACCATGCTTGCAAGTATGC		
	AGO1_F3/R3			
	AGO1_F4/R8			
	5.8SrRNA_F/R	ATCTCGGCTCTCGCATCGATG		GATATTGTAGTTCCTCCCTGC
	18SrRNA_F/R	GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTT		CCCTCGGCCAGAAAGGCTTGGGG
	25SrRNA_F/R	GAACCTTTGAAGGCCGAAAGAG <sup>h</sup>		GACGGCGGGTGTACAAAAGGGC
	OTC_F/R	TGAAGGGACAAAGGTTGTGATGTT <sup>i</sup>		GACAGGGACAGTGGGAATCT <sup>h</sup> CGCAGACAAAGTGGAAATGGA <sup>i</sup>

<sup>a,b</sup>These oligonucleotides include at their 5' ends <sup>a</sup>attB1 and <sup>b</sup>attB2 sequences (shown in italics). <sup>c-i</sup>Sequences of these oligonucleotides are as described in <sup>c</sup>Jover-Gil et al. (2012); <sup>d</sup>Pontvianne et al. (2010); <sup>e</sup>Earley et al. (2010); <sup>f</sup>Shi et al. (2005); <sup>g</sup>Harscoet et al. (2010); <sup>h</sup>Ren et al. (2011); and <sup>i</sup>Cnops et al. (2004).

**Supplemental Table 3.** Results of the Y2H screen using MAS2 as a bait

Prey identifier	Description: The activation domain (AD) is fused
1	in frame to the 178th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
2, 17	in frame to the 44th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
3-10	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
11	to the sequence encoding <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) which is followed by <i>Arabidopsis thaliana</i> ATPPC2 (PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 2); catalytic/phosphoenolpyruvate carboxylase (ATPPC2) encoding sequence
12, 21	in frame to the 110th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
13	in frame to the 21st aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
14	in frame to the 53rd aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
15	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450).
16	to 5' UTR (untranslated region) of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) mRNA at -6 nt (NM_128450)
18-20	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
22-23	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
24	in frame to the 617th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein (AT5G55100) (NM_180863)
25, 29-31, 33, 34, 36	in frame to the 20th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> 40S ribosomal protein S24 (RPS24B) (AT5G28060) (NM_122689)
26, 42	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> DEAD box RNA helicase, putative (AT1G20920) mRNA at -100 nt (NM_101945)
27	in frame to the 734th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> kinase interacting family protein (AT4G02710) (NM_116505)
28, 41	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT2G44200) mRNA at -40 nt (NM_129984)
32, 37	in frame to the 4th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> endo/excinuclease amino terminal domain-containing protein (AT2G30350) (NM_128588)

**Supplemental Table 3.** Results of the Y2H screen using MAS2 as a bait

Prey identifier	Description: The activation domain (AD) is fused
35	in frame to the 6th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> NF-YC10 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C10); transcription factor (NF-YC10) (NM_100672)
38	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> phototropic-responsive NPH3 family protein (AT5G47800) mRNA at -65 nt (NM_124154)
39	in frame to the 456th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein (AT5G55100) (NM_124892)
40, 44	in frame to the 45th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT4G33690) (NM_119527)
43	to <i>Arabidopsis thaliana</i> DEAD box RNA helicase, putative (AT1G20920) (NM_101945)
45	in frame to the 3rd aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> PPCK1 (PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE KINASE); kinase/ protein serine/threonine kinase (PPCK1) (NM_100738)
46	in frame to the 143rd aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
47, 48, 50	in frame to the 44th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
49	in frame to the 110th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
51-54	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
55	in frame to the 617th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein (AT5G55100) (NM_180863)
56, 57	to 5' UTR (untranslated region) of <i>Arabidopsis thaliana</i> DEAD box RNA helicase, putative (AT1G20920) mRNA at -100 nt (NM_101945)
58, 59	in frame to the 20th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> 40S ribosomal protein S24 (RPS24B) (AT5G28060) (NM_122689)
60-65	to <i>Arabidopsis thaliana</i> 40S ribosomal protein S24 (RPS24B) (AT5G28060) (NM_122689)
66, 67	in frame to the 4th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> endo/excinuclease amino terminal domain-containing protein (AT2G30350) (NM_128588)
68-71	to <i>Arabidopsis thaliana</i> endo/excinuclease amino terminal domain-containing protein (AT2G30350) (NM_128588)
72	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT2G40430) mRNA at -6 nt (NM_129603)
73	in frame to the 163rd aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> myosin heavy chain-related (AT2G46250) (NM_130188)
74, 75	to <i>Arabidopsis thaliana</i> myosin heavy chain-related (AT2G46250) (NM_130188)

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

**Supplemental Table 3.** Results of the Y2H screen using MAS2 as a bait

Prey identifier	Description: The activation domain (AD) is fused
76, 77	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT2G44200) mRNA at -40 nt (NM_129984)
78	to 5' UTR of <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT5G38720) mRNA at -67nt (NM_123233)
79, 80	in frame to the 206th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
81, 82	out of frame to the 154th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
83-87	to <i>Arabidopsis thaliana</i> CXIP4 (CAX INTERACTING PROTEIN 4); nucleic acid binding / zinc ion binding (CXIP4) (NM_128450)
88	in frame to the 7th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> PPCK1 (PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE KINASE); kinase/protein serine/threonine kinase (PPCK1) (NM_100738)
89, 90	to <i>Arabidopsis thaliana</i> PPCK1 (PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE KINASE); kinase/ protein serine/threonine kinase (PPCK1) (NM_100738)
91	to the 456th aa of <i>Arabidopsis thaliana</i> SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein (AT5G55100) (NM_180863)

Supplemental Data. Sánchez-García et al. Plant Cell (2015) 10.1105/tpc.15.00135

#### **SUPPLEMENTAL REFERENCES**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Tuskan, G.A., Hellsten, U., Hayes, R.D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., Goodstein, D.M., Dubchak, I., Poliakov, A., Mizrachi, E., Kullam, A.R., Hussey, S.G., Pinard, D., van der Merwe, K., Singh, P., van Jaarsveld, I., Silva-Junior, O.B., Togawa, R.C., Pappas, M.R., Faria, D.A., Sansaloni, C.P., Petrolis, C.D., Yang, X., Ranjan, P., Tschaplinski, T.J., Ye, C.Y., Li, T., Sterck, L., Vanneste, K., Murat, F., Soler, M., Clemente, H.S., Saidi, N., Cassan-Wang, H., Dunand, C., Hefer, C.A., Bornberg-Bauer, E., Kersting, A.R., Vining, K., Amarasinghe, V., Ranik, M., Naithani, S., Elser, J., Boyd, A.E., Liston, A., Spatafora, J.W., Dharmwardhana, P., Raja, R., Sullivan, C., Romanel, E., Alves-Ferreira, M., Kulheim, C., Foley, W., Carocha, V., Paiva, J., Kudrna, D., Brommonschenkel, S.H., Pasquali, G., Byrne, M., Rigault, P., Tibbits, J., Spokevicius, A., Jones, R.C., Steane, D.A., Vaillancourt, R.E., Potts, B.M., Joubert, F., Barry, K., Pappas, G.J., Strauss, S.H., Jaiswal, P., Grima-Pettenati, J., Salse, J., Van de Peer, Y., Rokhsar, D.S., and Schmutz, J.** (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**, 356-362.





**VI.- ANEXO:  
COMUNICACIONES A CONGRESOS**





**Análisis genético y molecular de los genes *MAS* de *Arabidopsis thaliana***

Sánchez-García A.B., Jover-Gil, S., Aguilera V., Quinto P., Micol-Ponce R., Micol J.L., y Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante

En *Arabidopsis thaliana*, el principal componente de los complejos del silenciamiento génico inducido por ARN (RISC) es la proteína AGO1 (ARGONAUTE1), cuya insuficiencia de función perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad. Hemos aislado el mutante *ago1-52*, que es viable, relativamente fértil y portador de un alelo hipomorfo del gen *AGO1*. Con el objetivo de identificar nuevos genes implicados en la ruta del silenciamiento génico mediado por los microARN, hemos mutagenizado semillas  $M_1$  de *ago1-52* con metanosulfonato de etilo. Hemos sometido a escrutinio 36.810 semillas  $M_2$ , identificando 17 líneas en las que el fenotipo morfológico de *ago1-52* se suprime total o parcialmente. Hemos cartografiado hasta el momento 5 mutaciones supresoras y clonado tres de ellas, que hemos denominado *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed). Estamos obteniendo construcciones para la sobreexpresión de los alelos mutantes y silvestres de los genes *MAS*, así como para visualizar sus patrones de expresión espacial y temporal, y para determinar la localización subcelular de las proteínas *MAS*. También estamos intentando desentrañar los mecanismos moleculares por los cuales *mas1-1*, *mas2-1* y *mas3-1* suprimen el fenotipo morfológico de *ago1-52*.

2010

X Reunión de Biología Molecular de Plantas  
Valencia

Póster presentado por A.B. Sánchez-García



Miguel Hernández



# Análisis genético y molecular de los genes *MAS* de *Arabidopsis thaliana*

A.B. Sánchez-García, S. Jover-Gil, V. Aguilera, P. Quinto, R. Micol-Ponce, J.L. Micol y M.R. Ponce

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

mrponce@umh.es

genetica.umh.es

En *Arabidopsis thaliana*, el principal componente de los complejos de silenciamiento génico mediado por los microARN (RISC) es la proteína AGO1 (ARGONAUTE1), cuya insuficiencia de función perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad<sup>1-3</sup>. Con el objetivo de identificar nuevos genes implicados en el silenciamiento génico mediado por los miARN, hemos mutagenizado con EMS semillas M<sub>1</sub> de ago1-52, un mutante aislado anteriormente en nuestro laboratorio<sup>4</sup>.

Tras el escrutinio de 36.810 semillas M<sub>2</sub>, identificamos 4.189 presuntos dobles mutantes (Tabla 1), muchos de los cuales fueron estériles y mostraron un fenotipo Ago1-52 extremo. Sólo 302 presuntos dobles mutantes M<sub>2</sub> fueron fértiles y viables, y 21 de ellos mostraron una supresión parcial del fenotipo Ago1-52. Entre estos 21 mutantes, 4 presentaron una supresión muy débil y fueron descartados. Las 17 líneas restantes mostraron un fenotipo muy similar al de la estirpe silvestre Ler. El porte y otros rasgos morfológicos del fenotipo Ago1-52 se normalizaron en la mayoría de estas líneas (Fig. 1).

Hemos cartografiado hasta el momento siete de estas mutaciones supresoras, a las que hemos llamado *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed), y hemos clonado tres de ellas (Fig. 2). La clonación posicional de la mutación *mas2-1* nos ha permitido determinar que *MAS2* es un gen de copia única, que codifica una proteína de función desconocida y que está conservada en animales y plantas. Nuestros resultados sugieren que *mas2-1* es un alelo de ganancia de función, que contiene una mutación puntual que no causa un fenotipo visible en las plantas *mas2-1/mas2-1;AGO1/AGO1*. Hemos identificado una línea portadora de una inserción de ADN-T en el gen *MAS2* y la hemos llamado *mas2-2*. *MAS2* parece ser un gen esencial, ya que los embriones *mas2-2/mas2-2* sufren letalidad (Fig. 3).

La expresión constitutiva de *MAS2* no causa efectos fenotípicos en un fondo silvestre pero es capaz de suprimir el fenotipo mutante de las plantas *ago1-52* y *hen1-13* (Fig. 3). Estas observaciones confirman que *mas2-1* es un alelo hipermorfo, capaz de suprimir los fenotipos de la insuficiencia de función de los genes *AGO1* y *HEN1*, que participan en las rutas de los miARN y los ARN cortos interferentes (siARN). La sobreexpresión de *mas2-1* en un fondo silvestre no tiene efectos fenotípicos.

Otra aproximación llevada a cabo para determinar la función de *MAS2* ha sido la generación de plantas transgénicas portadoras de una construcción que contenía un miARN artificial (amiARN) diseñado contra el ARNm de *MAS2*. La expresión de este amiARN en plantas transgénicas causa un fenotipo de hojas aserradas, que muestran una senescencia prematura (Fig. 3), lo que sugiere que *MAS2* podría estar implicado en la senescencia o la muerte celular en *Arabidopsis*.

Tabla 1.- Presuntos dobles mutantes identificados tras la mutagénesis de ago1-52 con EMS

	M <sub>2</sub>			M <sub>3</sub>
	Letal	Estériles	Fértiles	
Total	3.366	521	302	92
Fenotipo Ago1-52 extremo	23	67	42	11
Fenotipo Ago1-52 débil	29	91	93	21
Sinergia	3.130	3	0	0
Otros fenotipos mutantes	184	360	167	60

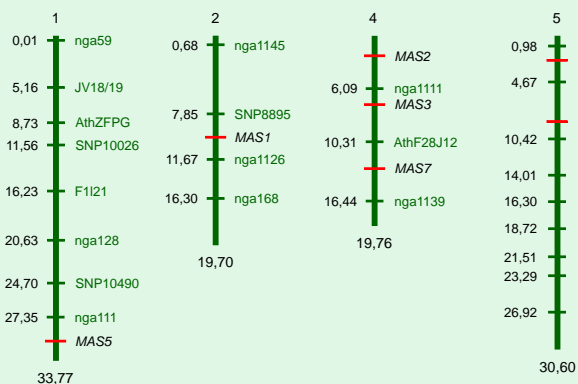


Figura 2.- Mapa físico de 4 de los 5 cromosomas de *Arabidopsis thaliana* en el que se indican las posiciones de los siete genes supresores que estamos analizando. La cartografía se realizó según se describe en la referencia 6. Todos los números indican Mb, excepto los que aparecen sobre los cromosomas. Se ha omitido deliberadamente el cromosoma 3.

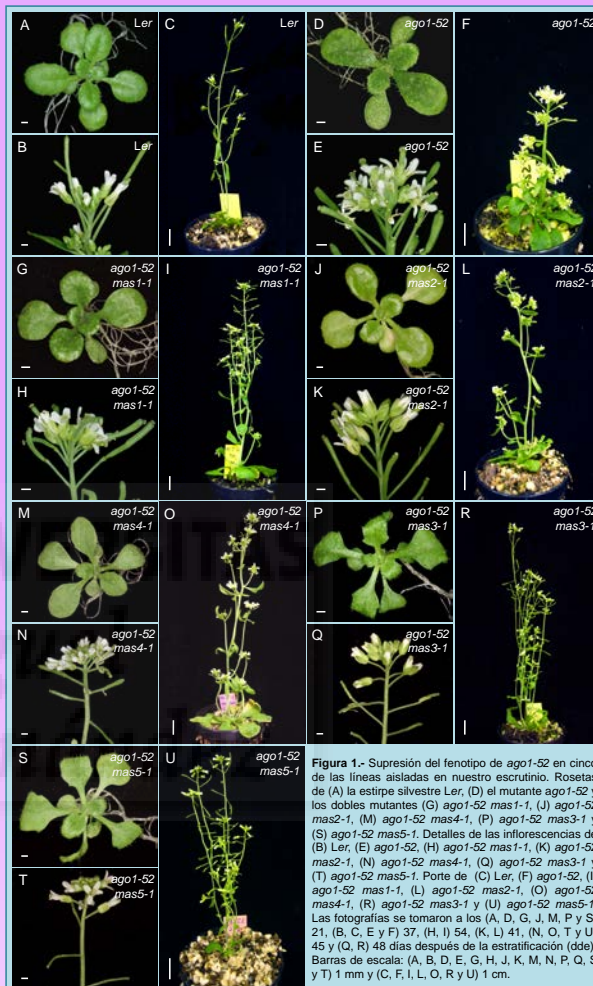


Figura 1.- Supresión del fenotipo de ago1-52 en cinco de las líneas aisladas en nuestro escrutinio. Rosetas de (A) la estirpe silvestre Ler, (D) el mutante ago1-52 y los dobles mutantes (G) ago1-52 mas1-1, (J) ago1-52 mas2-1, (M) ago1-52 mas4-1, (P) ago1-52 mas3-1 y (S) ago1-52 mas5-1. Detalles de las inflorescencias de (B) Ler, (E) ago1-52, (H) ago1-52 mas1-1, (K) ago1-52 mas2-1, (N) ago1-52 mas4-1, (O) ago1-52 mas3-1 y (T) ago1-52 mas5-1. Porte de (C) Ler, (F) ago1-52, (I) ago1-52 mas1-1, (L) ago1-52 mas2-1, (Q) ago1-52 mas4-1, (R) ago1-52 mas3-1 y (U) ago1-52 mas5-1. Las fotografías se tomaron a los (A, D, G, J, M, P y S) 21, (B, C, E y F) 37, (H, I) 54, (K, L) 41, (N, O, T y U) 45 y (Q, R) 48 días después de la estratificación (dde). Barras de escala: (A, B, D, E, G, H, I, J, K, M, N, P, Q, S) 1 mm y (C, F, I, L, O, R, U) 1 cm.

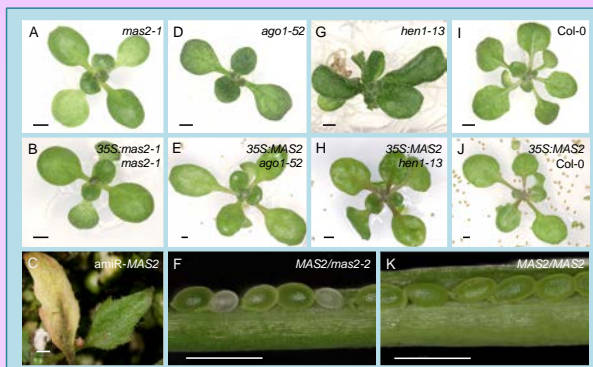


Figura 3.- Rosetas de (A) el mutante mas2-1, (B) una planta Ler portadora del transgén 35S:mas2-1, (D) el mutante ago1-52, (E) una planta ago1-52 portadora del transgén 35S:MAS2, (G) el mutante hen1-13, (H) una planta hen1-13 portadora del transgén 35S:MAS2, (I) la estirpe silvestre Col-0 y (J) una planta Col-0 portadora del transgén 35S:MAS2. (C) Detalles de las hojas de una planta transgénica que expresa un amiARN diseñado contra MAS2. (F) Silicuas inmaduras de plantas MAS2/mas2-2 (obsérvese la letalidad embrionaria) y (K) MAS2/MAS2. Las fotos se tomaron (A, B, D, E, G, H, I, J) 15, (F, K) 28 y (C) 45 dde. Barras de escala: 1 mm.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bohmer, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., y Benning, C. (1998). *EMBO J* **17**, 170-180.
- Baumberger, N., y Baulcombe, D.C. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11928-11933.
- Qi, Y., Denli, M., y Hannon, G.J. (2005). *Mol. Cell* **19**, 421-428.
- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 733-744.
- Ponce, M.R., Quesada, V., y Micol, J.L. (1998). *Plant J* **14**, 497-501.
- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotóns, M.A., y Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* **323**, 105-113.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Los cultivos se realizaron a 20±1°C y 60-70% de humedad relativa, bajo iluminación continua (5,000 lux)<sup>5</sup>.

**AGRADECIMIENTOS**

El trabajo en el laboratorio de M.R.P. ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto BIO2008-01900) y por la Generalitat Valenciana (proyectos PROMETEO/2009/112 y ACOMP/2009/049). A.B.S.G. disfruta de una beca concedida por la Generalitat Valenciana.

## The Arabidopsis MAS genes

Sánchez-García A.B., Jover-Gil, S., Aguilera V., Quinto P., Micol-Ponce R., Micol J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante

In *Arabidopsis thaliana*, the core component of the miRNA mediated silencing complex (RISC) is encoded by the *ARGONAUTE1* (*AGO1*) gene, whose *ago1* loss-of-function mutant alleles disturb many developmental processes and often cause lethality or sterility. With a view to identify novel genes involved in miRNA-guided gene silencing, we mutagenized with EMS M<sub>1</sub> seeds of the viable and fertile *ago1-52* line, which had been isolated in our laboratory. After screening 36,810 M<sub>2</sub> seeds, we identified 4,189 putative double mutants, most of which were sterile and displayed a mutant phenotype stronger than that of *ago1-52*. Only 302 M<sub>2</sub> putative double mutants were viable and fertile, 21 of which displayed partial suppression of the *Ago1-52* phenotype. Four of them exhibited only weak suppression and were discarded. Some of the remaining 17 were not easily distinguishable from the *Ler* wild type. Plant body architecture and other morphological traits of the *Ago1-52* phenotype became normalized in most of these lines carrying suppressor mutations.

We have mapped so far seven of these suppressor mutations, which we named *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed), and positionally cloned three of them. Positional cloning of the *mas2-1* mutation allowed us to determine that *MAS2* is a single-copy gene encoding a protein of unknown function, conserved among plants and animals. *mas2-1* seems to be a gain-of-function allele and carries a point mutation that causes no visible phenotype in *mas2-1/mas2-1;AGO1/AGO1* plants. We identified a line carrying a T-DNA insertion in the *MAS2* gene, which we named *mas2-2*. *MAS2* seems to be an essential gene as suggested by lethality of *mas2-2/mas2-2* embryos.

Constitutive expression of *MAS2* had no phenotypic effects in a wild-type background but suppressed the mutant phenotype in *ago1-52* and *hen1-13* plants. This observation confirms that gain of function of *MAS2* is able to suppress the phenotypes of loss-of-function mutations affecting the *AGO1* and *HEN1* genes, which participate in the miRNA and short interfering RNA (siRNA) pathways. We have also obtained transgenic

plants overexpressing *mas2-1* in a wild-type background, which show a wild-type phenotype.

Another approach taken to determine the function of *MAS2* was the generation of transgenic plants carrying a construct for the expression of an artificial miRNA (amiRNA) designed to target *MAS2* mRNA. These transgenic plants rendered a phenotype of serrated leaves that exhibited premature senescence, suggesting that *MAS2* might be involved in senescence or cell death pathways in *Arabidopsis*.



2010

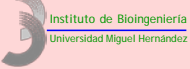
Plant Biology 2010 (Joint Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists and  
the Canadian Society of Plant Physiologists)

Montreal, Canadá

Póster presentado por M.R. Ponce



Miguel Hernández



# The Arabidopsis MAS genes

A.B. Sánchez-García, S. Jover-Gil, V. Aguilera, P. Quinto,  
R. Micol-Ponce, J.L. Micol and M.R. Ponce

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.

mrponce@umh.es

genetica.umh.es

In *Arabidopsis thaliana*, the core component of the miRNA mediated silencing complex (RISC) is encoded by the *ARGONAUTE1* (*AGO1*) gene, whose *ago1* loss-of-function mutant alleles disturb many developmental processes and often cause lethality or sterility<sup>1-3</sup>. With a view to identify novel genes involved in miRNA-guided gene silencing, we mutagenized with EMS M<sub>1</sub> seeds of the viable and fertile *ago1-52* line, which had been isolated in our laboratory<sup>4</sup>. After screening 36,810 M<sub>2</sub> seeds, we identified 4,189 putative double mutants (Table 1), most of which were sterile and displayed a mutant phenotype stronger than that of *ago1-52*. Only 302 M<sub>2</sub> putative double mutants were viable and fertile, 21 of which displayed partial suppression of the *Ago1-52* phenotype. Four of them exhibited only weak suppression and were discarded. Some of the remaining 17 were not easily distinguishable from the *Ler* wild type. Plant body architecture and other morphological traits of the *Ago1-52* phenotype became normalized in most of these lines carrying suppressor mutations (Fig. 1).

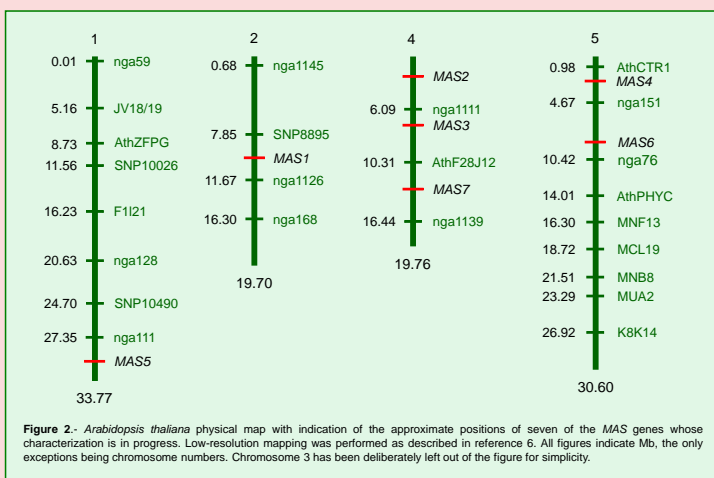
We have mapped so far seven of these suppressor mutations, which we named *mas* (*m*orphology of *argonaute1-52* *s*uppressed), and positionally cloned three of them (Fig. 2). Positional cloning of the *mas2-1* mutation allowed us to determine that *MAS2* is a single-copy gene encoding a protein of unknown function, conserved among plants and animals. *mas2-1* seems to be a gain-of-function allele and carries a point mutation that causes no visible phenotype in *mas2-1/mas2-1;AGO1/AGO1* plants. We identified a line carrying a T-DNA insertion in the *MAS2* gene, which we named *mas2-2*. *MAS2* seems to be an essential gene as suggested by lethality of *mas2-2/mas2-2* embryos (Fig. 3).

Constitutive expression of *MAS2* had no phenotypic effects in a wild-type background but suppressed the mutant phenotype in *ago1-52* and *hen1-13* plants (Fig. 3). This observation confirms the gain of function of *MAS2* is able to suppress the phenotypes of loss-of-function mutations affecting the *AGO1* and *HEN1* genes, which participate in the miRNA and short interfering RNA (siRNA) pathways. We have also obtained transgenic plants overexpressing *mas2-1* in a wild-type background, which show a wild-type phenotype.

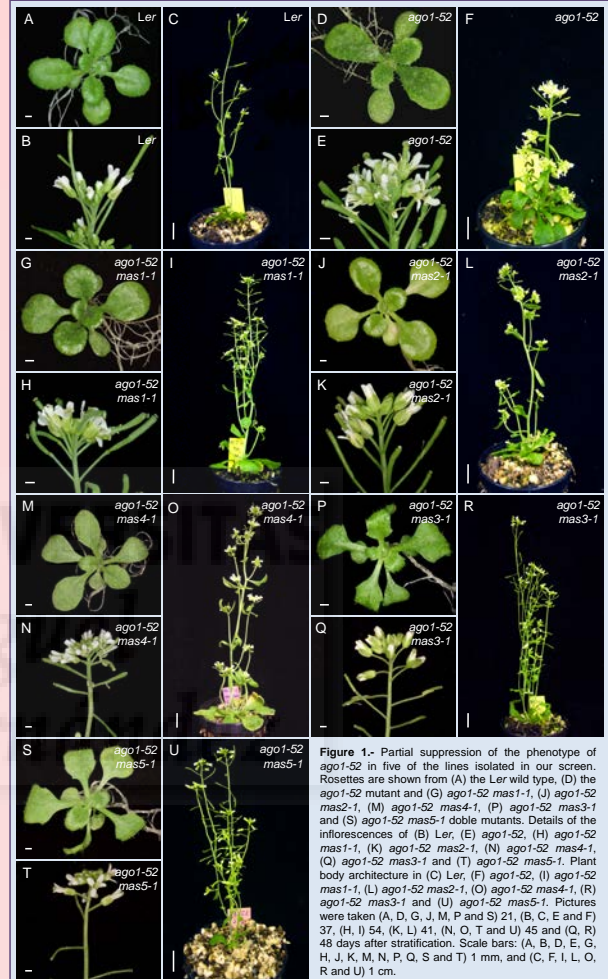
Another approach taken to determine the function of *MAS2* was the generation of transgenic plants carrying a construct for the expression of an artificial miRNA (amiRNA) designed to target *MAS2* mRNA. These transgenic plants rendered a phenotype of serrated leaves that exhibited premature senescence (Fig. 3), suggesting that *MAS2* might be involved in senescence or cell death pathways in Arabidopsis.

**Table 1.-** Putative double mutants isolated in our screening

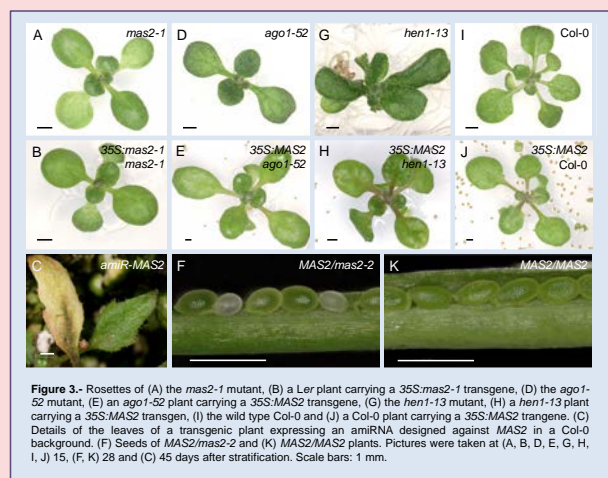
	M <sub>2</sub>			M <sub>3</sub>
	Lethal	Esterile	Fertile	
Total	3,366	521	302	92
Extremed Ago1-52 phenotype	23	67	42	11
Partially suppressed Ago1-52 phenotype	29	91	93	21
Synergistic	3,130	3	0	0
Other mutant phenotypes	184	360	167	60



**Figure 2.-** *Arabidopsis thaliana* physical map with indication of the approximate positions of seven of the *MAS* genes whose characterization is in progress. Low-resolution mapping was performed as described in reference 6. All figures indicate Mb, the only exceptions being chromosome numbers. Chromosome 3 has been deliberately left out of the figure for simplicity.



**Figure 1.-** Partial suppression of the phenotype of *ago1-52* in five of the lines isolated in our screen. Rosettes are shown from (A) the *Ler* wild type, (D) the *ago1-52* mutant and (G) *ago1-52 mas1-1*, (J) *ago1-52 mas2-1*, (M) *ago1-52 mas4-1*, (P) *ago1-52 mas3-1* and (S) *ago1-52 mas5-1* double mutants. Details of the inflorescences of (B) *Ler*, (E) *ago1-52*, (H) *ago1-52 mas1-1*, (K) *ago1-52 mas2-1*, (N) *ago1-52 mas4-1*, (Q) *ago1-52 mas3-1* and (T) *ago1-52 mas5-1*. Plant body architecture in (C) *Ler*, (F) *ago1-52*, (I) *ago1-52 mas1-1*, (L) *ago1-52 mas2-1*, (O) *ago1-52 mas4-1*, (R) *ago1-52 mas3-1* and (U) *ago1-52 mas5-1*. Pictures were taken (A, D, G, J, M, P and S) 21, (B, C, E and F) 37, (H, I) 54, (K, L) 41, (N, O, T and U) 45 and (Q, R) 48 days after stratification. Scale bars: (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N, P, Q, S and T) 1 mm, and (C, F, I, L, O, R and U) 1 cm.



**Figure 3.-** Rosettes of (A) the *mas2-1* mutant, (B) a *Ler* plant carrying a 35S:*mas2-1* transgene, (D) the *ago1-52* mutant, (E) an *ago1-52* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene, (G) the *hen1-13* mutant, (H) a *hen1-13* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene, (I) the wild type *Col-0* and (J) a *Col-0* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene. (C) Details of the leaves of a transgenic plant expressing an amiRNA designed against *MAS2* in a *Col-0* background. (F) Seeds of *MAS2/mas2-2* and (K) *MAS2/MAS2* plants. Pictures were taken at (A, B, D, E, G, H, I, J) 15, (F, K) 28 and (C) 45 days after stratification. Scale bars: 1 mm.

**REFERENCES**

1.- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). *EMBO J.* 17, 170-180.  
2.- Baumbenger, N., and Baulcombe, D.C. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11928-11933.  
3.- Qi, Y., Denli, M., and Hannon, G.J. (2005). *Mol. Cell* 19, 421-428.  
4.- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* 49, 733-744.  
5.- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L. (1998). *Plant J.* 14, 497-501.  
6.- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotóns, M.A., and Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* 323, 105-113.

**METHODS**

Plants were grown at 20±1°C and 60-70% relative humidity, under constant fluorescent light (5,000 lux)<sup>5</sup>.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (BIO2008-01900) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 and ACOMP/2009/049). A.B.S.G. holds a fellowship from the Generalitat Valenciana.



**Genetic and molecular analysis of the Arabidopsis MAS genes**

Sánchez-García, A.B., Jover-Gil, S., Aguilera, V., Quinto, P., Micol-Ponce, R., Micol, J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain

The Arabidopsis ARGONAUTE1 (AGO1) protein is the core component of the RNA-induced silencing complex (RISC) that mediates the regulation of gene expression by microRNAs (miRNAs). The *ago1* loss-of-function alleles of the *AGO1* gene alter many developmental processes and often cause lethality or sterility. With a view to identify novel genes involved in miRNA-guided gene silencing, we mutagenized with EMS M<sub>1</sub> seeds of the viable and fertile *ago1-52* mutant, which had been isolated in our laboratory. We screened 36,810 M<sub>2</sub> seeds and identified 17 lines in which the phenotype caused by *ago1-52* is from partially to almost completely suppressed. We have already mapped five of the suppressor mutations, which we named *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed), and have positionally cloned three of them. We will present our results on the genetic and molecular characterization of the *MAS* genes.

2010

XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology  
Valencia

Póster presentado por A.B. Sánchez-García



# Genetic and molecular analysis of the Arabidopsis MAS genes

A.B. Sánchez-García, S. Jover-Gil, V. Aguilera, P. Quinto, R. Micol-Ponce, J.L. Micol and M.R. Ponce

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.

mrponce@umh.es

genetica.umh.es

In *Arabidopsis thaliana*, the core component of the miRNA mediated silencing complex (RISC) is encoded by the *ARGONAUTE1 (AGO1)* gene, whose *ago1* loss-of-function mutant alleles disturb many developmental processes and often cause lethality or sterility<sup>1-3</sup>. With a view to identify novel genes involved in miRNA-guided gene silencing, we mutagenized with EMS M<sub>1</sub> seeds of the viable and fertile *ago1-52* line, which had been isolated in our laboratory<sup>4</sup>. After screening 36,810 M<sub>2</sub> seeds, we identified 4,189 putative double mutants (Table 1), most of which were sterile and displayed a mutant phenotype stronger than that of *ago1-52*. Only 302 M<sub>2</sub> putative double mutants were viable and fertile, 21 of which displayed partial suppression of the *Ago1-52* phenotype. Four of them exhibited only weak suppression and were discarded. Some of the remaining 17 were not easily distinguishable from the *Ler* wild type. Plant body architecture and other morphological traits of the *Ago1-52* phenotype became normalized in most of these lines carrying suppressor mutations (Fig. 1).

We have mapped so far seven of these suppressor mutations, which we named *mas (morphology of argonaute1-52 suppressed)*, and positionally cloned three of them (Fig. 2). Positional cloning of the *mas2-1* mutation allowed us to determine that *MAS2* is a single-copy gene encoding a protein of unknown function, conserved among plants and animals. *mas2-1* seems to be a gain-of-function allele and carries a point mutation that causes no visible phenotype in *mas2-1/mas2-1;AGO1/AGO1* plants. We identified a line carrying a T-DNA insertion in the *MAS2* gene, which we named *mas2-2*. *MAS2* seems to be an essential gene as suggested by lethality of *mas2-2/mas2-2* embryos (Fig. 3).

Constitutive expression of *MAS2* had no phenotypic effects in a wild-type background but suppressed the mutant phenotype in *ago1-52* and *hen1-13* plants (Fig. 3). This observation confirms the gain of function of *MAS2* is able to suppress the phenotypes of loss-of-function mutations affecting the *AGO1* and *HEN1* genes, which participate in the miRNA and short interfering RNA (siRNA) pathways. We have also obtained transgenic plants overexpressing *mas2-1* in a wild-type background, which show a wild-type phenotype.

Another approach taken to determine the function of *MAS2* was the generation of transgenic plants carrying a construct for the expression of an artificial miRNA (amiRNA) designed to target *MAS2* mRNA. These transgenic plants rendered a phenotype of serrated leaves that exhibited premature senescence (Fig. 3), suggesting that *MAS2* might be involved in senescence or cell death pathways in Arabidopsis.

Table 1.- Putative double mutants isolated in our screening

	M <sub>2</sub>			M <sub>3</sub>
	Lethal	Esterile	Fertile	
Total	3,366	521	302	92
Extremed Ago1-52 phenotype	23	67	42	11
Partially suppressed Ago1-52 phenotype	29	91	93	21
Synergistic	3,130	3	0	0
Other mutant phenotypes	184	360	167	60

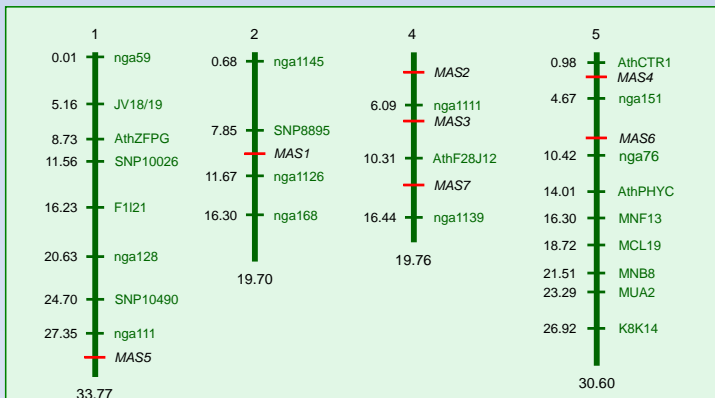


Figure 2.- Arabidopsis thaliana physical map with indication of the approximate positions of seven of the MAS genes whose characterization is in progress. Low-resolution mapping was performed as described in reference 6. All figures indicate Mb, the only exceptions being chromosome numbers. Chromosome 3 has been deliberately left out of the figure for simplicity.

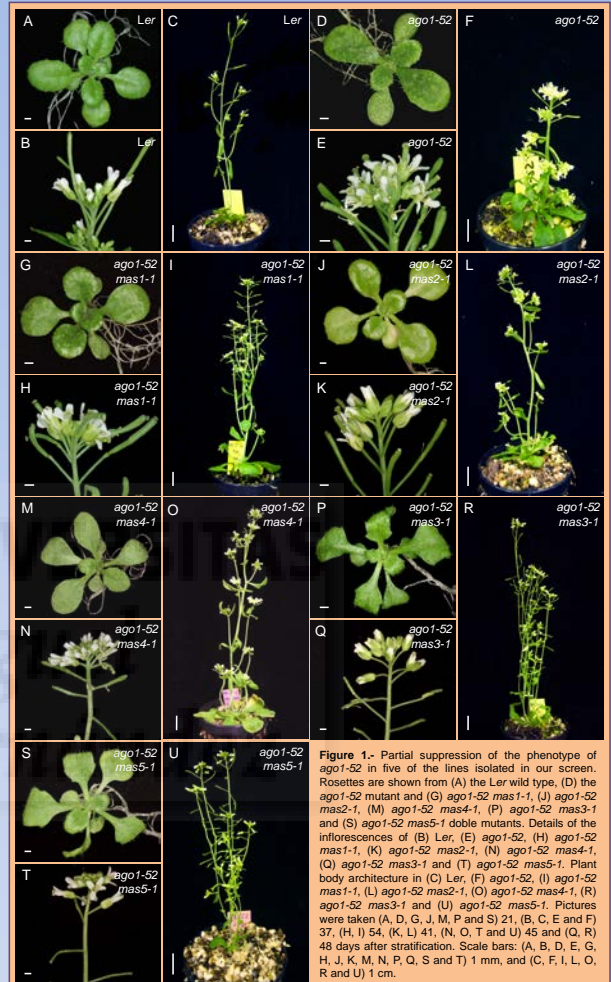


Figure 1.- Partial suppression of the phenotype of *ago1-52* in five of the lines isolated in our screen. Rosettes are shown from (A) the *Ler* wild type, (D) the *ago1-52* mutant and (G) *ago1-52 mas1-1*, (J) *ago1-52 mas2-1*, (M) *ago1-52 mas4-1*, (P) *ago1-52 mas3-1* and (S) *ago1-52 mas5-1* double mutants. Details of the inflorescences of (B) *Ler*, (E) *ago1-52*, (H) *ago1-52 mas1-1*, (K) *ago1-52 mas2-1*, (N) *ago1-52 mas4-1*, (Q) *ago1-52 mas3-1* and (T) *ago1-52 mas5-1*. Plant body architecture in (C) *Ler*, (F) *ago1-52*, (I) *ago1-52 mas1-1*, (L) *ago1-52 mas2-1*, (O) *ago1-52 mas4-1*, (R) *ago1-52 mas3-1* and (U) *ago1-52 mas5-1*. Pictures were taken (A, D, G, J, M, P and S) 21, (B, C, E and F) 37, (H, I) 54, (K, L) 41, (N, O, T and U) 45 and (Q, R) 48 days after stratification. Scale bars: (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N, P, Q, S and T) 1 mm, and (C, F, I, L, O, R and U) 1 cm.

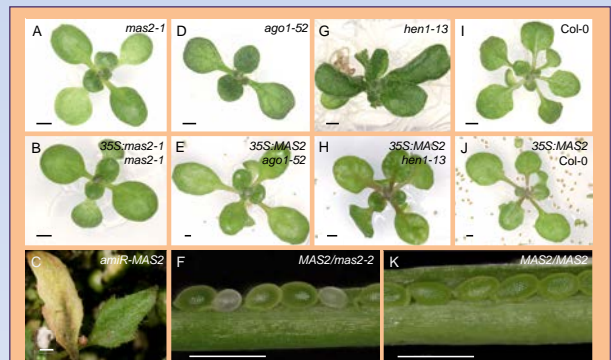


Figure 3.- Rosettes of (A) the *mas2-1* mutant, (B) a *Ler* plant carrying a 35S:*mas2-1* transgene, (D) the *ago1-52* mutant, (E) an *ago1-52* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene, (G) the *hen1-13* mutant, (H) a *hen1-13* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene, (I) the wild type *Col-0* and (J) a *Col-0* plant carrying a 35S:*MAS2* transgene. (C) Details of the leaves of a transgenic plant expressing an amiRNA designed against *MAS2* in a *Col-0* background. (F) Seeds of *MAS2/mas2-2* and (K) *MAS2/MAS8* plants. Pictures were taken at (A, B, D, E, G, H, I, J) 15, (F, K) 28 and (C) 45 days after stratification. Scale bars: 1 mm.

REFERENCES

1.- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). *EMBO J.* 17, 170-180.  
 2.- Baumbarger, N., and Baulcombe, D.C. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11928-11933.  
 3.- Qi, Y., Denli, M., and Hannon, G.J. (2005). *Mol. Cell* 19, 421-428.  
 4.- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* 49, 733-744.  
 5.- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L. (1998). *Plant J.* 14, 497-501.  
 6.- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotóns, M.A., and Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* 323, 105-113.

METHODS

Plants were grown at 20±1°C and 60-70% relative humidity, under constant fluorescent light (5,000 lux)<sup>5</sup>.

ACKNOWLEDGMENTS

Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (BIO2008-01900) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 and ACOMP/2009/049). A.B.S.G. holds a fellowship from the Generalitat Valenciana.



**Genetic and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* MAS2 gene**

Sánchez-García, A.B., Jover-Gil, S., Aguilera, V., Quinto, P., Micol-Ponce, R., Kahveci, Z., Olechwiec, A.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain

In eukaryotes, small non-coding RNAs mediate transcriptional and post-transcriptional gene silencing by binding to ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs). AGO1 is the main component of the miRNA pathway in *Arabidopsis*. We had previously isolated *ago1-52*, a hypomorphic allele of AGO1. We isolated suppressor mutations that were named *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) after an EMS second-site mutagenesis of *ago1-52* plants. Positional cloning of the MAS2 gene revealed that it is a single copy *Arabidopsis* gene that encodes a protein of unknown function and conserved among plants and animals. The *mas2-1* point mutation causes an alanine-to-threonine substitution at a highly conserved position of the MAS2 protein and has no visible phenotype by its own. A T-DNA insertion that disrupts MAS2 (*mas2-2*) causes embryonic lethality. We are obtaining transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting MAS2. Overexpression of the wild-type allele of MAS2 in *ago1-52* background suppressed the mutant phenotype of *ago1-52*. We have also obtained constructs that showed the ubiquitous expression of MAS2 and the nuclear localization of its protein product, as already known for its animal's orthologs.

2011

Plant Growth Biology and Modeling workshop  
Elche, Alicante  
Póster presentado por A.B. Sánchez-García



# Genetic and molecular analysis of the *MAS2* gene of *Arabidopsis thaliana*

Sánchez-García, A.B., Jover-Gil, S., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Kahveci, Z., Olechwiec, A.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain  
 ana.sanchezg@umh.es mrponce@umh.es http://genetica.umh.es

In eukaryotes, small non-coding RNAs mediate transcriptional and post-transcriptional gene silencing by binding to ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs). AGO1 is the main component of the microRNA pathway in *Arabidopsis*, which also participates in other small interfering RNA-mediated pathways.

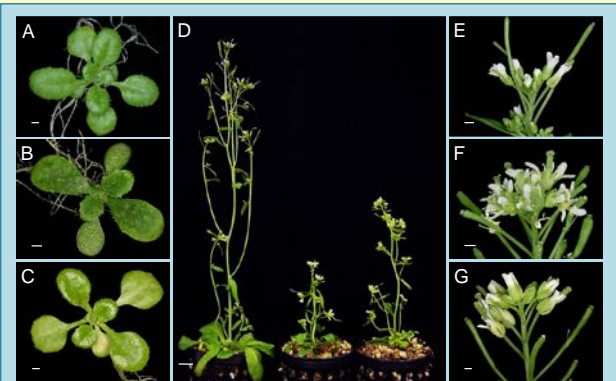
Aiming to identify novel genes functionally related to *AGO1*, we performed a screen for suppressors of the phenotype of *ago1-52*, a hypomorphic allele of *AGO1* previously isolated in our laboratory<sup>1</sup>. We have named *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed) the suppressor mutations isolated after an EMS second-site mutagenesis of *ago1-52* plants, *MAS2* to the mutated gene in the P2 11.1 line (Fig. 1) and *mas2-1* to its mutant allele.

Positional cloning of the *MAS2* gene (Fig. 2A) revealed that it is a single copy *Arabidopsis* gene that encodes a protein of unknown function and conserved among plants and animals. The *mas2-1* point mutation causes an alanine-to-threonine substitution at a highly conserved position of the *MAS2* protein (Fig. 2B) and has an almost wild-type phenotype, consisting of wider apexes of the fruits and more roundish leaves than those of the wild type (Fig. 3A-G).

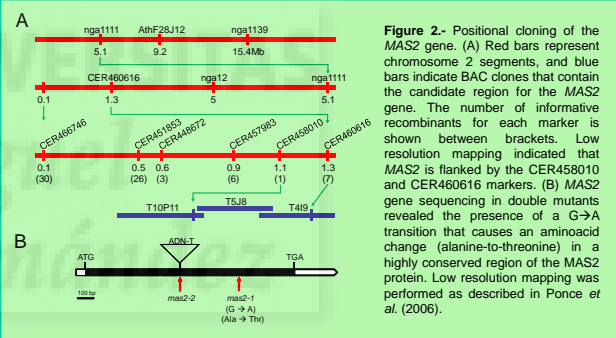
We identified a T-DNA insertion that disrupts *MAS2*, which was named *mas2-2* (Fig. 2B). This insertional allele causes embryonic lethality (Fig. 3H-N), which suggests that *MAS2* is essential during embryogenesis.

We obtained transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting *MAS2*, which allow us to study different degrees of loss of function of the *MAS2* gene throughout the plant life cycle (Fig. 4).

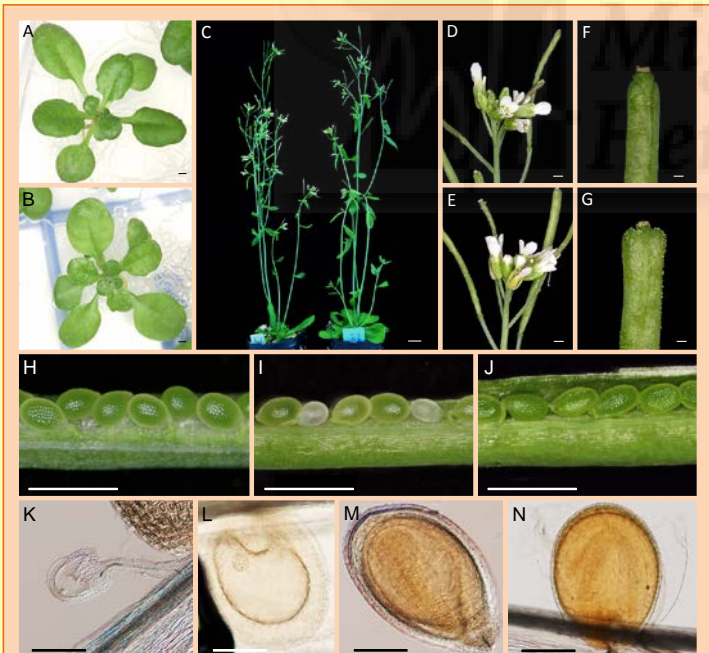
We also obtained constructs that showed the ubiquitous expression of *MAS2* (Fig. 5A-I) and the nuclear localization of the *MAS2* protein (Fig. 5J-L), as already known for its animal's orthologs.



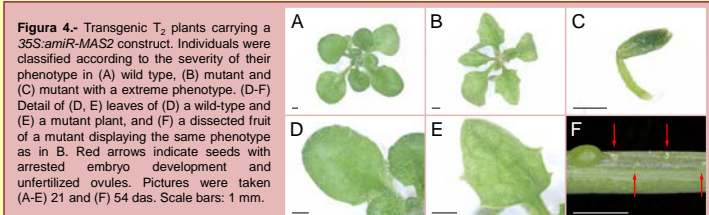
**Figure 1.-** Some phenotypic traits of the P2 11.1 (*ago1-52 mas2-1*) line. (A-C) Rosettes of (A) Ler, (B) *ago1-52* and (C) P2 11.1. (D) From left to right, adult plants of Ler, *ago1-52* and P2 11.1. (E-G) Inflorescences of (E) Ler, (F) *ago1-52* and (G) P2 11.1. Pictures were taken (A-C) 21 and (D-G) 43 days after stratification (das). Scale bars: (A-C) 1 mm and (D-G) 1 cm.



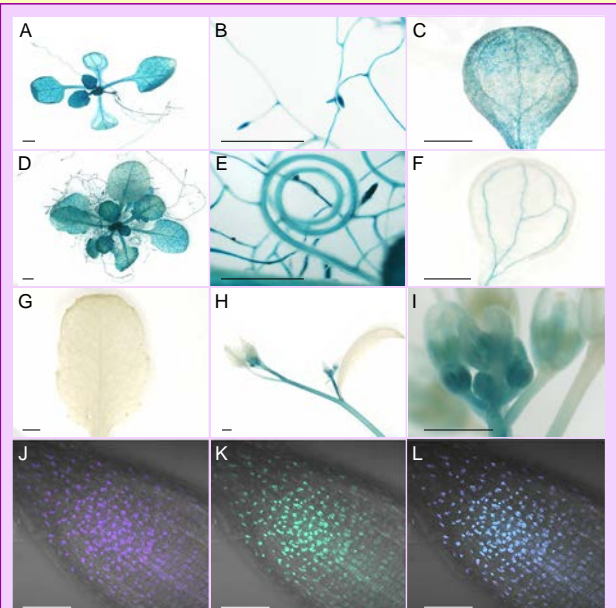
**Figure 2.-** Positional cloning of the *MAS2* gene. (A) Red bars represent chromosome 2 segments, and blue bars indicate BAC clones that contain the candidate region for the *MAS2* gene. The number of informative recombinants for each marker is shown between brackets. Low resolution mapping indicated that *MAS2* is flanked by the CER458010 and CER460616 markers. (B) *MAS2* gene sequencing in double mutants revealed the presence of a G→A transition that causes an amino acid change (alanine-to-threonine) in a highly conserved region of the *MAS2* protein. Low resolution mapping was performed as described in Ponce et al. (2006).



**Figure 3.-** (A, B) Rosettes of (A) Ler and (B) *mas2-1*. (C) From left to right, plants of Ler and *mas2-1* collected at 45 das. (D, E) Inflorescences of (D) Ler and (E) *mas2-1*. (F, G) Siliques of (F) Ler and (G) *mas2-1*. (H-J) Seeds of (H) *mas2-1*, (I) *mas2-2* and (J) Ler. (K) Unfertilized ovule in a *MAS2/mas2-2* plant. (L-N) Embryos of *MAS2/mas2-2* plants in (L) globular, (M) globular-heart and (N) mature stages. Scale bars: (A, B, and D-J) 1 mm, (C) 1 cm and (K-N) 200 μm.



**Figure 4.-** Transgenic *T<sub>2</sub>* plants carrying a 35S:amiR-*MAS2* construct. Individuals were classified according to the severity of their phenotype in (A) wild type, (B) mutant and (C) mutant with an extreme phenotype. (D-F) Detail of (D, E) leaves of (D) a wild-type and (E) a mutant plant, and (F) a dissected fruit of a mutant displaying the same phenotype as in B. Red arrows indicate seeds with arrested embryo development and unfertilized ovules. Pictures were taken (A-E) 21 and (F) 54 das. Scale bars: 1 mm.



**Figure 5.-** Expression analysis of the *MAS2* gene. (A-I) Detection of β-glucuronidase activity in *T<sub>2</sub>* plants carrying a *MAS2<sub>pro</sub>::GUS* construct. (A, D) Rosettes, (B, E) roots and (C, F) cotyledons of (A-C) 15 and (D-F) of plants collected at 28 das. (G) Leaf, (H) shoot and (I) inflorescence of a 48-das plant. (J-L) Subcellular localization of the *MAS2* protein. (J) Detection of the fluorescent emission of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), (K) GFP and (L) their overlay in roots of transgenic plants expressing a *MAS2::GFP* construct. Scale bars: (A-I) 1 mm and (J-L) 50 μm.

**METHODS**  
 Plants were grown as described in ref. 3.  
**ACKNOWLEDGEMENTS**  
 Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación de Spain (BIO2008-01900) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 and ACOMP/2009/049).

**REFERENCES**  
 1.- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 733-744.  
 2.- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotons, M.A., and Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* **323**, 105-113.  
 3.- Ponce, M.R., Quesada, V., and Micol, J.L. (1998). *Plant J.* **14**, 497-501.

## **Análisis genético y molecular del gen *MAS2* de *Arabidopsis thaliana***

Sánchez-García AB, Jover-Gil S, Aguilera V, Micol-Ponce R, Kahveci Z, Micol JL, y Ponce MR

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

El silenciamiento génico postranscripcional mediado por ARN pequeños no codificantes tiene lugar en los eucariotas en complejos denominados RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*), cuyo componente principal es un miembro de la familia ARGONAUTE (AGO). En *Arabidopsis* existen 10 proteínas AGO, siendo AGO1 la más implicada en la regulación génica mediada por los microARN (miARN). AGO1 también participa en rutas mediadas por otros ARN pequeños interferentes (siARN).

Pretendemos identificar nuevos genes implicados en las rutas de silenciamiento génico en las que participa AGO1. Hemos llevado a cabo con este fin una búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de *ago1-52*, una estirpe portadora de un alelo hipomorfo de *AGO1* anteriormente aislada en nuestro laboratorio. Hemos denominado *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) a las mutaciones supresoras que hemos identificado tras la mutagénesis de *ago1-52* con EMS.

La clonación posicional de *mas2-1* nos ha permitido determinar que *MAS2* es un gen de copia única en *Arabidopsis*, que codifica una proteína de función desconocida, presente tanto en los animales como en las plantas. La mutación puntual *mas2-1* causa un cambio de alanina por treonina en una posición muy conservada de la proteína *MAS2*.

Hemos obtenido una inserción de ADN-T que interrumpe el único exón de *MAS2*, a la que hemos denominado *mas2-2*. Su letalidad recesiva indica que *MAS2* es un gen esencial durante la embriogénesis. Hemos generado un microARN artificial para silenciar *MAS2*, con el objetivo de estudiar los fenotipos de su insuficiencia parcial de función a lo largo de todo el ciclo de la planta.

Hemos sobreexpresado el alelo silvestre del gen *MAS2* en los mutantes *ago1-52* y *hen1-13*. Este último es portador de un alelo posiblemente nulo del gen *HUA*

*ENHANCER1 (HEN1)*, que codifica una metilasa que estabiliza los miARN y siARN. En ambos casos se suprimieron los fenotipos mutantes. Hemos obtenido además construcciones que nos han permitido establecer que el gen *MAS2* se expresa ubicuamente y que su producto proteico es nuclear, tal como ocurre con sus ortólogos animales.



2011  
XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Genética  
Murcia  
Póster presentado por A.B. Sánchez-García  
Premio al mejor póster del congreso



# Análisis genético y molecular del gen *MAS2* de *Arabidopsis thaliana*

Sánchez-García, A.B., Jover-Gil, S., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Kahveci, Z., Micol, J.L., y Ponce, M.R.

Miguel Hernández



Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.  
 ana.sanchez@umh.es mrponce@umh.es http://genetica.umh.es

El silenciamiento génico postranscripcional mediado por pequeños ARN no codificantes tiene lugar en los eucariotas en complejos denominados RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*), cuyo componente principal es un miembro de la familia ARGONAUTE (AGO). En *Arabidopsis* existen 10 proteínas AGO, siendo AGO1 la más implicada en la regulación génica mediada por los microARN (miARN). AGO1 también participa en rutas mediadas por otros pequeños ARN interferentes.

Pretendemos identificar nuevos genes relacionados funcionalmente con AGO1. Hemos llevado a cabo con este fin una búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de *ago1-52*, una estirpe portadora de un alelo hipomorfo de AGO1 anteriormente aislada en nuestro laboratorio<sup>1</sup>. Hemos denominado *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) a las mutaciones supresoras que hemos identificado tras la mutagénesis de *ago1-52* con EMS, *MAS2* al gen mutado en la línea P2 11.1 (Fig. 1) y *mas2-1* a su alelo mutante.

La clonación posicional de *mas2-1* (Fig. 2A) nos ha permitido determinar que *MAS2* es un gen de copia única en *Arabidopsis*, que codifica una proteína de función desconocida, presente tanto en los animales como en las plantas. La mutación puntual *mas2-1* causa un cambio de alanina por treonina en una posición muy conservada de la proteína (Fig. 2B). Sin embargo, las plantas *mas2-1* son prácticamente silvestres (Fig. 3A-G).

Hemos obtenido una inserción de ADN-T que interrumpe el único exón de *MAS2*, a la que hemos denominado *mas2-2* (Fig. 2B). La letalidad recesiva que muestra este alelo (Fig. 3H-N) indica que *MAS2* es un gen esencial durante la embriogénesis.

También hemos generado diferentes construcciones que nos han permitido establecer que el gen *MAS2* se expresa ubicuamente (Fig. 4A-I) y que su producto proteico es nuclear (Fig. 4J-L), tal como ocurre con sus ortólogos animales.

La generación de un microARN artificial para silenciar *MAS2* nos está permitiendo estudiar los efectos de la insuficiencia parcial de función de este gen a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta (Fig. 5).



Figura 1.- Algunos rasgos fenotípicos de la línea P2 11.1 (*ago1-52 mas2-1*). (A-C) Rosetas de (A) Ler, (B) *ago1-52* y (C) P2 11.1. (D) De izquierda a derecha, plantas adultas de Ler, *ago1-52* y P2 11.1. (E-G) Inflorescencias terminales de (E) Ler, (F) *ago1-52* y (G) P2 11.1. Las fotografías fueron tomadas (A-C) 21 y (D-G) 43 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala indican (A-C, E-G) 1 mm y (D) 1 cm.

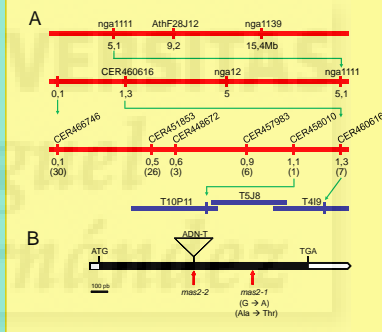


Figura 2.- Clonación posicional del gen *MAS2*. (A) Las barras rojas representan segmentos del cromosoma 2, y las azules, los clones BAC que incluyen el intervalo candidato a contener el gen *MAS2*. Se indica entre paréntesis el número de individuos recombinantes informativos obtenidos para cada marcador. La cartografía de baja resolución indicó que *MAS2* se localiza entre los marcadores CER458010 y CER460616. (B) La secuenciación del gen *MAS2* en los individuos dobles mutantes reveló la presencia de una transición G→A que se traduce en un cambio de aminoácido (alanina por treonina) en una región muy conservada de la proteína *MAS2*. La cartografía se realizó tal como se detalla en Ponce et al. (2006).

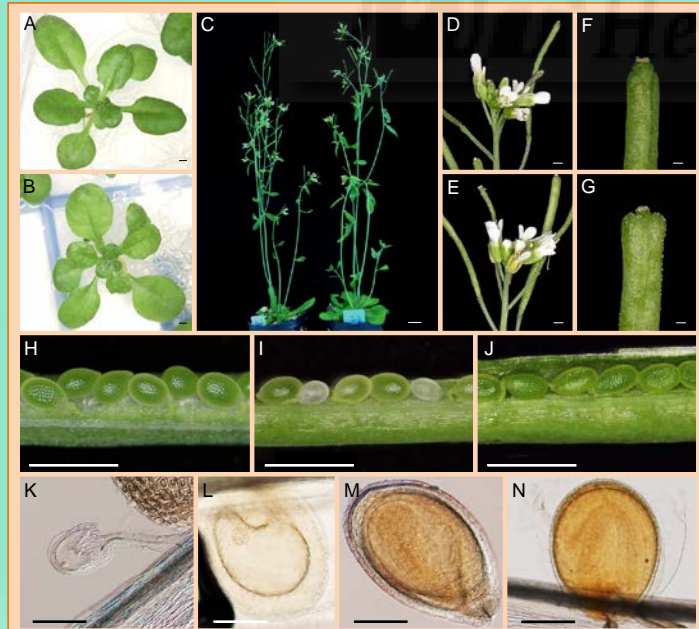


Figura 3.- Rasgos fenotípicos de los mutantes *mas2-1*. (A, B) Rosetas de (A) Ler y (B) *mas2-1*. (C) De izquierda a derecha, plantas adultas de Ler y *mas2-1*. (D, E) Inflorescencias de (D) Ler y (E) *mas2-1*. (F, G) Silicuas de (F) Ler y (G) *mas2-1*. (H-J) Semillas de (H) *mas2-1*, (I) *mas2-2* y (J) Ler. (K) Óvulo sin fecundar. (L-N) Embrións resultantes de la autofecundación de plantas *MAS2/mas2-2* en estadio (L) globular, (M) globular-corazón y (N) maduro. Las barras de escala indican (A, B y D-J) 1 mm, (C) 1 cm y (K-N) 200 µm.

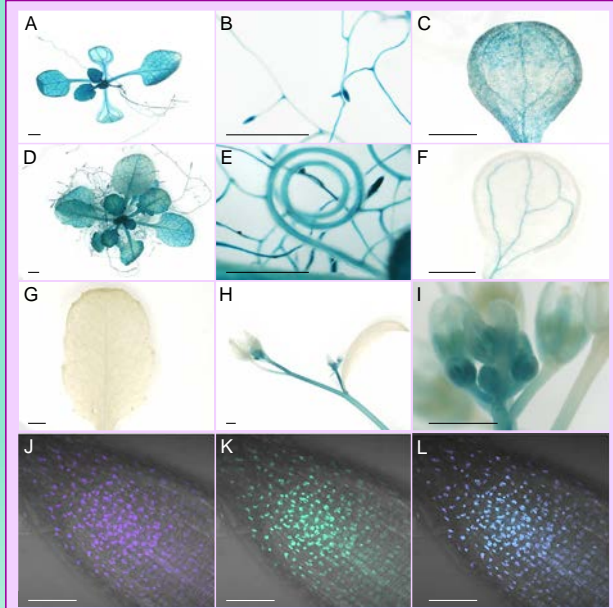


Figura 4.- Análisis de la expresión de *MAS2*. (A-I) Detección de la actividad β-glucuronidasa en plantas T<sub>2</sub> portadoras de la construcción *MAS2::GUS*. (A, D) Rosetas, (B, E) raíces y (C, F) colifloras de plantas recolectadas (A-C) 15 y (D-F) 28 dde. (G) Hoja vegetativa del tercer nudo, (H) tallo y (I) inflorescencia apical del tallo de 48 dde. (J-L) Localización subcelular de la proteína *MAS2*. (J) Detección de la emisión de fluorescencia del DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole), (K) GFP y (L) DAPI y GFP solapadas con la emisión de luz transmitida en raíces de plantas T<sub>2</sub> portadoras de la construcción *MAS2::GFP* en homocigosis. Las barras de escala indican (A-I) 1 mm y (J-L) 50 µm.

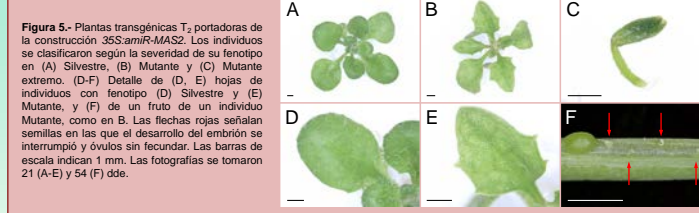


Figura 5.- Plantas transgénicas T<sub>2</sub> portadoras de la construcción *35S::amiR-MAS2*. Los individuos se clasificaron según la severidad de su fenotipo en (A) Silvestre, (B) Mutante y (C) Mutante extremo. (D-F) Detalle de (D, E) hojas de individuos con fenotipo (D) Silvestre y (E) Mutante, y (F) de un fruto de un individuo Mutante, como en B. Las flechas rojas señalan semillas en las que el desarrollo del embrión se interrumpió y óvulos sin fecundar. Las barras de escala indican 1 mm. Las fotografías se tomaron 21 (A-E) y 54 (F) dde.

**BIBLIOGRAFÍA**  
 1- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 733-744.  
 2- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotóns, M.A., y Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* **323**, 105-113.

**AGRADECIMIENTOS**  
 La investigación en el laboratorio de M.R.P. ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-01900) y por la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 y ACOMP/2009/049). A.B.S.G. disfruta de un contrato predoctoral de la Generalitat Valenciana.



## **Análisis genético y molecular del gen MAS2 de *Arabidopsis thaliana***

Sánchez-García A.B., Jover-Gil S., Micol-Ponce R., Aguilera V., Micol J.L., y Ponce M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.

La insuficiencia de función de la proteína ARGONAUTE1 (AGO1), un elemento clave de la ruta de los microARN, perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad. Con el fin de identificar nuevos genes implicados en las rutas de silenciamiento génico en las que participa AGO1, hemos llevado a cabo una búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de *ago1-52*, un alelo hipomorfo de AGO1, a los que hemos denominado *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*).

La mutación *mas2-1* suprime totalmente el fenotipo de *ago1-52*, pero carece de fenotipo por sí misma. Su clonación posicional nos ha permitido establecer que MAS2 es un gen de copia única en *Arabidopsis*, que codifica una proteína de función desconocida, presente tanto en los animales como en las plantas. *mas2-1* manifiesta un efecto supresor dominante, y causa un cambio de alanina por treonina en una posición muy conservada de la proteína MAS2. Hemos identificado entre nuestros supresores 10 alelos adicionales de MAS2, 9 de los cuales son portadores de cambios puntuales en una región muy conservada de MAS2, de solo 13 pb, todos los cuales causan presuntamente sustituciones de aminoácidos.

La letalidad embrionaria de *mas2-2*, un alelo insercional de MAS2, indica que este gen es esencial durante la embriogénesis. Hemos generado un microARN artificial para silenciar MAS2, con el objetivo de estudiar los efectos de su insuficiencia de función parcial. Hemos obtenido transgenes que nos han permitido establecer que el gen MAS2 se expresa en todos los tejidos y órganos estudiados, que su expresión constitutiva suprime el fenotipo de *ago1-52*, y que su producto proteico es nuclear, tal como ocurre con sus ortólogos animales. Hemos demostrado mediante hibridación *in situ* la colocalización de MAS2 y los ADNr 45S, en los organizadores nucleolares.

2012

XI Reunión de Biología Molecular de Plantas  
Segovia

Póster presentado por A.B. Sánchez-García



# Análisis genético y molecular del gen *MAS2* de *Arabidopsis thaliana*

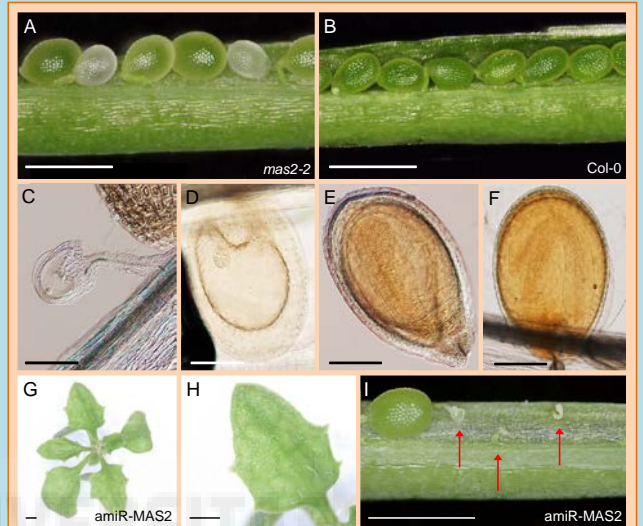
Sánchez-García, A.B., Jover-Gil, S., Micol-Ponce, R., Aguilera, V., Micol, J.L., y Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante.  
 ana.sanchezg@umh.es      mrponce@umh.es      http://genetica.umh.es

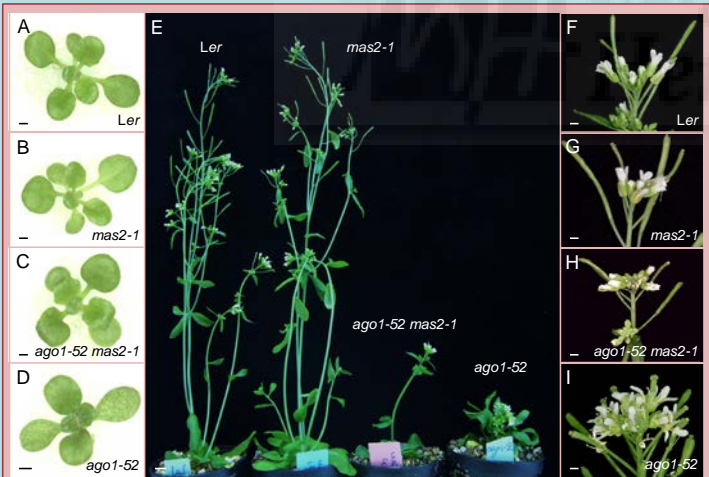
La insuficiencia de función de la proteína ARGONAUTE1 (AGO1), un elemento clave de la ruta de los microARN, perturba numerosos procesos de desarrollo y suele causar esterilidad o letalidad. Con el fin de identificar nuevos genes implicados en las rutas de silenciamiento génico en las que participa AGO1, hemos llevado a cabo una búsqueda de supresores del fenotipo morfológico de *ago1-52*, un alelo hipomorfo de *AGO1* aislado anteriormente en nuestro laboratorio<sup>1</sup>, a los que hemos denominando *mas* (*m*orphology of *argonaute1-52* *s*uppressed).

La mutación *mas2-1* suprime en gran medida el fenotipo de *ago1-52* (Fig. 1). Su clonación posicional (Fig. 2A) nos ha permitido establecer que *MAS2* es un gen de copia única en *Arabidopsis* y que codifica una proteína de función desconocida, presente tanto en los animales como en las plantas. *mas2-1* manifiesta un efecto supresor dominante, y causa un cambio de alanina por treonina en una posición muy conservada de la proteína *MAS2* (Fig. 2B). Hemos identificado entre nuestras 23 líneas supresoras 10 alelos adicionales de *MAS2*, 9 de los cuales son portadores de cambios puntuales en una región muy estrecha, de solo 13 pb, y que causan sustituciones de aminoácidos muy conservados entre la proteína *MAS2* y sus ortólogos.

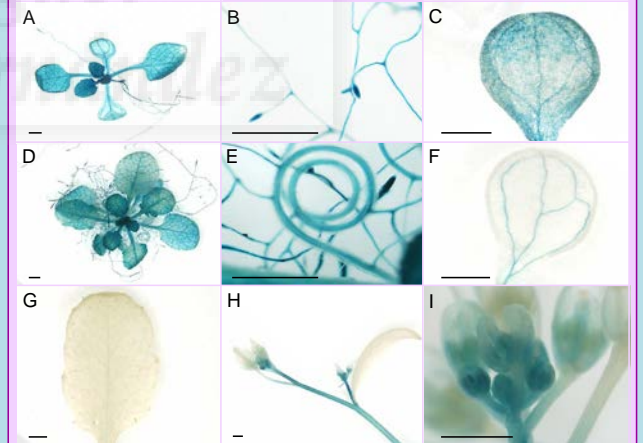
La letalidad embrionaria de *mas2-2*, un alelo insercional de *MAS2* (Fig. 2B), revela su papel esencial durante la embriogénesis (Fig. 3A-F). Hemos generado un microARN artificial para silenciar *MAS2* (*amiR-MAS2*) (Fig. 3G-I), con el objetivo de estudiar los efectos de su insuficiencia de función parcial. Hemos obtenido transgenes que nos han permitido establecer que el gen *MAS2* se expresa en todos los tejidos y órganos estudiados (Fig. 4A-I), que su expresión constitutiva suprime el fenotipo de *ago1-52*, y que su producto proteico es nuclear (Fig. 5A-D), tal como ocurre con sus ortólogos animales. Hemos demostrado mediante hibridación *in situ* la colocalización de *MAS2* y los ADNr 45S, en los organizadores nucleolares (Fig. 5A-D).



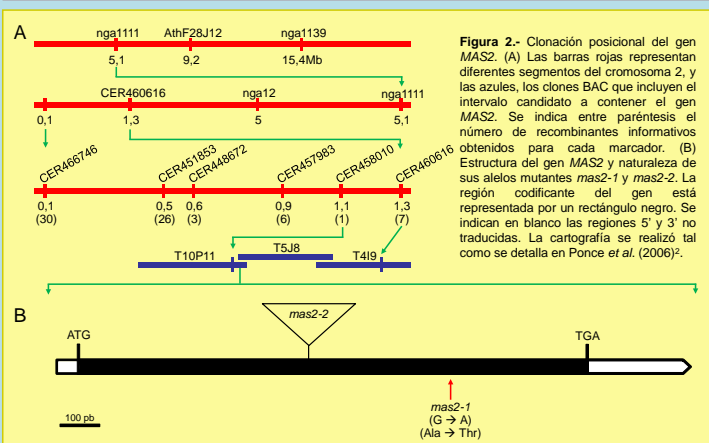
**Figura 3.** Algunos rasgos fenotípicos del mutante *mas2-2* y la línea transgénica *amiR-MAS2*. (A, B) Siliculas inmaduras de (A) *mas2-2* y (B) Col-0. (C) Óvulo sin fecundar. (D-F) Embriones resultantes de la autofecundación de plantas *MAS2/mas2-2* en estadio (D) globular, (E) globular-corazón y (F) maduro. (G) Roseta de una planta transgénica T<sub>3</sub> *amiR-MAS2*, fotografiada 21 dde. (H) Hoja vegetativa del tercer nudo y (I) silicua inmadura de la planta representada en G. Las flechas rojas señalan semillas abortivas y óvulos sin fecundar. Las barras de escala indican (A, B e I) 1 cm, (C-F) 200 µm y (G, H) 1 mm.



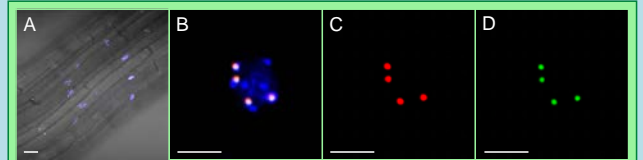
**Figura 1.** Supresión del fenotipo de *ago1-52* por *mas2-1*. (A-D) Rosetas de (A) Ler, (B) *mas2-1*, (C) *ago1-52 mas2-1* y (D) *ago1-52*. (E) De izquierda a derecha, plantas adultas de Ler, *mas2-1*, *ago1-52 mas2-1* y *ago1-52*. (F-I) Inflorescencias terminales de (F) Ler, (G) *mas2-1*, (H) *mas2-1 ago1-52* y (I) *ago1-52*. Las fotografías fueron tomadas (A-D) 15 y (E) 43 días después de la estratificación (dde). Las barras de escala indican (A-D, F-I) 1 mm y (E) 1 cm.



**Figura 4.** Análisis de la expresión de *MAS2*. (A-I) Detección de la actividad β-glucuronidasa en plantas T<sub>2</sub> portadoras de la construcción *MAS2<sub>ppv</sub>::GUS*. (A, D) Rosetas, (B, E) raíces y (C, F) cotiledones de plantas recolectadas (A-C) 15 y (D-F) 28 dde. (G) Hoja vegetativa del tercer nudo, (H) tallo e (I) inflorescencia apical del tallo, recolectados 48 dde. Las barras de escala indican 1 mm.



**Figura 2.** Clonación posicional del gen *MAS2*. (A) Las barras rojas representan diferentes segmentos del cromosoma 2, y las azules, los clones BAC que incluyen el intervalo candidato a contener el gen *MAS2*. Se indica entre paréntesis el número de recombinantes informativos obtenidos para cada marcador. (B) Estructura del gen *MAS2* y naturaleza de sus alelos mutantes *mas2-1* y *mas2-2*. La región codificante del gen está representada por un rectángulo negro. Se indican en blanco las regiones 5' y 3' no traducidas. La cartografía se realizó tal como se detalla en Ponce *et al.* (2006)<sup>2</sup>.



**Figura 5.** Localización subcelular de la proteína *MAS2* e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Micrografías confocales de (A) la raíz y (B-D) un núcleo en profase mitótica de una planta en la que se expresa el transgén *35S::MAS2::GFP*. (A) Superposición de la emisión fluorescente de la GFP (verde) y del DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (azul) con la imagen de la raíz en campo claro. (B-D) Emisión fluorescente de (B) la sonda pTa71 (detección de los ADNr 45S, Sánchez-Morán *et al.*, 2001)<sup>4</sup> (rojo), la GFP (verde) y el DAPI (azul) solapadas, (C) la sonda pTa71 y (D) la GFP. Las barras de escala indican 50 µm.

**AGRADECIMIENTOS**

La investigación en el laboratorio de M.R.P. ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-01900) y la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112). A.B.S.G. disfruta de un contrato predoctoral de la Generalitat Valenciana.

**MÉTODOS**

Las plantas fueron cultivadas tal como se describe en la referencia 3, a 20±1°C y a 60-70% de humedad relativa e iluminación continua (5.000 lx). El medio de cultivo para la selección de plantas transgénicas fue suplementado con 25 µg/ml de higromicina.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1- Jover-Gil, S., Candela, H., y Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* 49, 733-744.
- 2- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotons, M.A., y Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* 323, 105-113.
- 3- Ponce, M.R., Quesada, V., y Micol, J.L. (1998). *Plant J.* 14, 497-501.
- 4- Sánchez-Morán, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, F.C.H., y Jones, G.H. (2001). *Chromosome Research* 9, 121-128.



## Genetic and molecular analysis of the Arabidopsis *MAS2* gene

Sánchez-García, A.B., Aguilera, V.<sup>1</sup>, Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., Candela-Noguera, V., Micol, J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.

<sup>1</sup>Current address: Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, Spain.

In eukaryotes, small non-coding RNAs mediate transcriptional and post-transcriptional gene silencing by binding to ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs). In order to study the action and interactions of AGO1—a key component of the miRNA pathway in Arabidopsis—we first isolated *ago1* hypomorphic alleles of the *AGO1* gene. A second-site mutagenesis screen for suppressors of *ago1-52* allowed us to isolate a number of *mas* (*m*orphology of *a*rgonaute1-52 *s*uppressed) mutants. We identified in this way 11 alleles of the gene that we termed *MAS2*, which was positionally cloned and found to encode a protein of unknown function conserved among plants and animals. A total of 9 of these alleles cause amino acid substitutions mapping within a 13-bp highly conserved region and have no visible phenotype by their own. A T-DNA insertion that disrupts *MAS2* (*mas2-2*), however, causes embryonic lethality. In addition, we obtained transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting *MAS2*. The pleiotropic phenotype of these transgenic plants indicates essential roles for *MAS2* in many developmental stages. We have also shown that *MAS2* is broadly expressed and the nuclear localization of its protein product, as already known for its animal orthologs. *In situ* hybridization (FISH) allowed us to demonstrate that *MAS2* co-localizes with 45S rDNA.

2013

Society for Experimental Biology (SEB) Annual Meeting  
Valencia

Comunicación oral presentada por A.B. Sánchez-García



Instituto de Bioingeniería  
Universidad Miguel Hernández

# Genetic and molecular analysis of the Arabidopsis MAS2 gene

Sánchez-García, A.B., Aguilera, V., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., Candela-Noguera, V., Micol, J.L., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.  
ana.sanchezg@umh.es mrponce@umh.es http://genetica.umh.es

In eukaryotes, small non-coding RNAs mediate transcriptional and post-transcriptional gene silencing by binding to ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-Induced Silencing Complexes (RISCs). In order to study the action and interactions of AGO1—a key component of the miRNA pathway in Arabidopsis—we first isolated *ago1* hypomorphic alleles of the *AGO1* gene<sup>1,2</sup>. A second-site mutagenesis screen for suppressors of *ago1-52* allowed us to isolate 23 *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) mutants (Fig. 1). We identified in this way 10 alleles of the gene that we termed *MAS2*, which was positionally cloned (Fig. 2) and found to encode a protein of unknown function conserved among plants and animals. A total of 9 of these alleles contain a mutation which causes amino acid substitutions in a highly conserved region of the MAS2 protein. A T-DNA insertional allele of *MAS2* (*mas2-2*) causes embryonic lethality (Fig. 2B and Fig. 3).

In addition, we obtained transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting *MAS2* (*2x35S<sub>pro</sub>:amiR-MAS2*)<sup>3</sup>. The pleiotropic phenotype of these transgenic plants indicate essential roles for *MAS2* in several developmental processes (Fig. 4). We have also shown that *MAS2* is broadly expressed and the nuclear localization of its protein product, as already known for its animal orthologs (Fig. 5A-G). Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) allowed us to demonstrate that *MAS2* co-localizes with 45S rDNA (Fig. 5H-K).

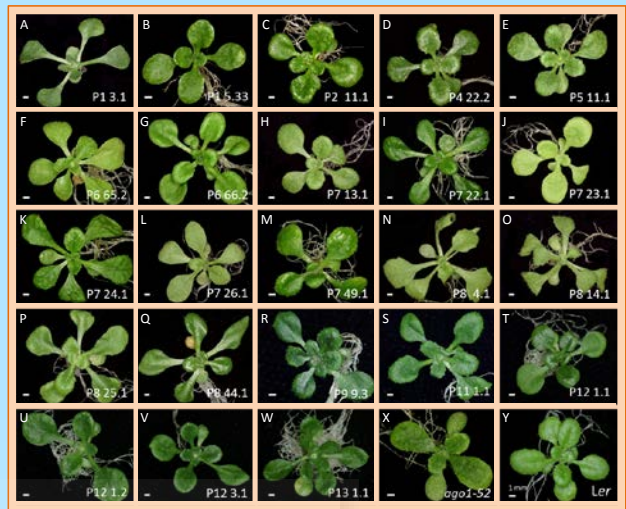


Figure 1. (A-W) *ago1-52 mas* double mutants, (X) the *ago1-52* single mutant, and (Y) the Ler wild type. Plants shown in A-C, F-H, Q, S, T and W carry *mas2* alleles. Pictures were taken 21 days after stratification (das). Scale bars: 1 mm.

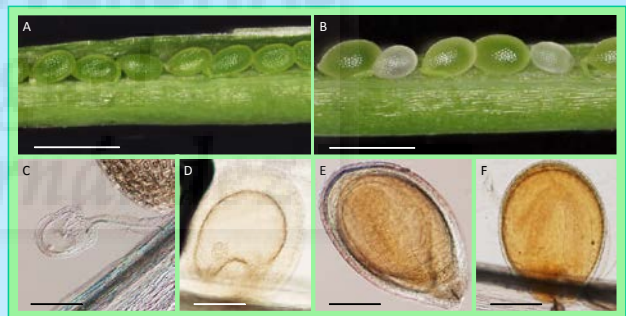
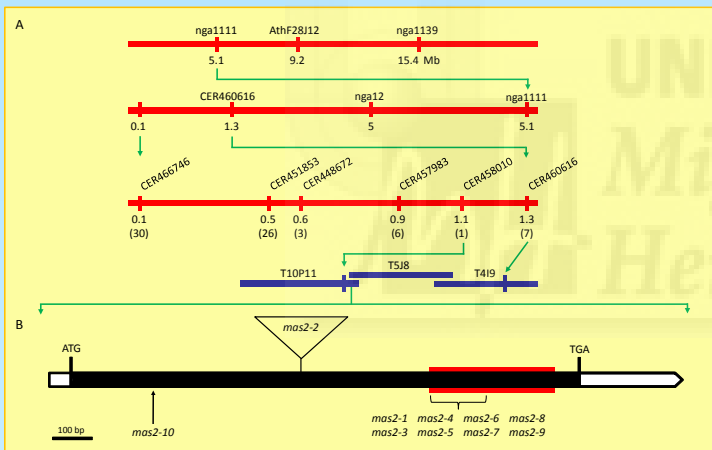


Figure 3. (A, B) Seeds of dissected siliques from (A) Col-0 and (B) *MAS2/mas2-2* plants. (C) Aborted ovule in a *MAS2/mas2-2* plant. (D-F) Embryos from *MAS2/mas2-2* siliques. (D, E) Abnormal embryos arrested in the (D) globular and (E) globular-heart stages. (F) Phenotypically wild type mature embryo. Scale bars: (A, B) 1 mm and (C-F) 200 µm.

Figure 2. Positional cloning of the MAS2 gene. (A) Red bars represent chromosome 2 segments, and blue bars indicate BAC clones that contain the candidate region for the MAS2 gene. The number of informative recombinants for each marker is shown between brackets. (B) MAS2 gene structure with indication of the nature and position of the *mas* mutations. The red box indicates the region that encodes the single domain of the MAS protein, which is highly conserved in plants and animals. Low resolution mapping was performed as previously described<sup>3</sup>.

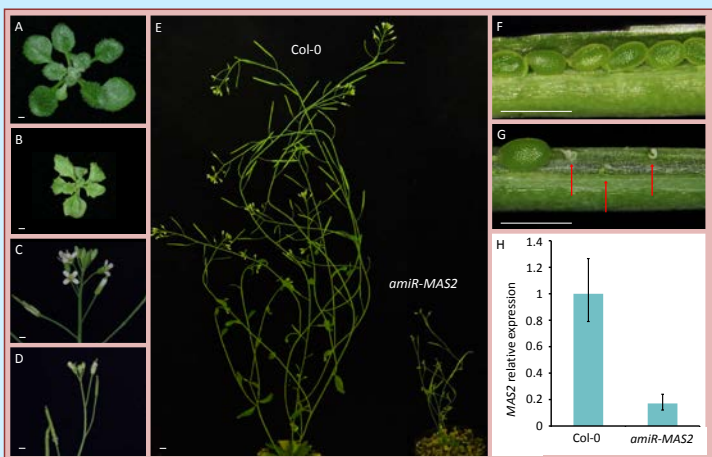


Figure 4. Phenotypes caused by the *2x35S<sub>pro</sub>:amiR-MAS2* transgene. (A, B) Rosettes of (A) Col-0 and (B) *amiR-MAS2*. (C, D) Inflorescences of (C) Col-0 and (D) *amiR-MAS2*. (E) Col-0 and *amiR-MAS2* adult plants. (F, G) Seeds of (F) Col-0 and (G) *amiR-MAS2*. Red arrows indicate aborted ovules and embryos arrested in early stages of development. (H) Expression of MAS2 in Col-0 and *amiR-MAS2* plants. Pictures were taken (A, B) 21 and (E) 48 das. Scale bars: (A-D) 1 mm and (E) 1 cm.

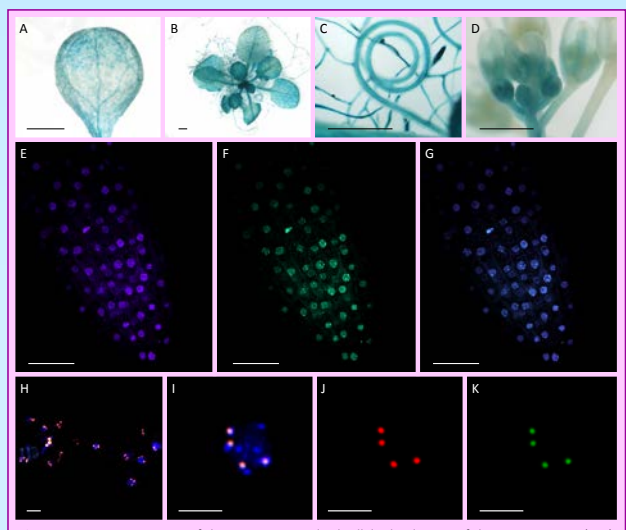


Figure 5. Expression pattern of the MAS2 gene and subcellular localization of the MAS2 protein. (A-D) Detection of β-glucuronidase activity in T<sub>3</sub> plants carrying a *MAS2<sub>pro</sub>::GUS* transgene: (A) Cotyledon, (B) rosette, (C) roots and (D) inflorescence. (E-K) MAS2 subcellular localization. (E) Detection of the fluorescent emission of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (F) GFP and (G) their overlay in roots of transgenic plants expressing a *2x35S<sub>pro</sub>:MAS2::GFP* transgene. (H-K) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH). (H, I) Overlay of DAPI, MAS2-GFP and a 45S rDNA probe (pTa71)<sup>4</sup>, (H) several nuclei and (I) magnification of a mitotic prophase nucleus. (J-K) Fluorescent emission of (J) pTa71 probe and (K) MAS2-GFP shown in I. Scale bars: (A-D) 1 mm, (E-G, I-K) 50 µm, and (H) 25 µm.

REFERENCES

- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.R. (2005). *Int. J. Dev. Biol.* 49, 733-744.
- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2012). *Plant Cell Physiol.* 53, 1322-1333.
- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotons, M.A., and Micol, J.L. (2006). *Methods Mol. Biol.* 323, 105-113.
- Sánchez-Morán, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, F.C.H., y Jones, G.H. (2001). *Chromosome Res.* 9, 121-128.
- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2013). Submitted.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BIO2008-01900) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112).

**MAS2, the Arabidopsis ortholog of human NKAP, regulates 45S rDNA transcription**

Sánchez-García, A.B., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., Nikolaeva-Koleva, M., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain

We performed a second-site mutagenesis screen for extragenic suppressors of the morphological phenotype of *ago1-52* in Arabidopsis. A total of 23 *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) lines were isolated, which exhibited suppression at a different extent. We identified in this way 10 alleles of the gene that we termed *MAS2*, which was positionally cloned and found to encode the human NKAP ortholog, a highly conserved eukaryotic protein involved in transcriptional repression. Nine of these *mas2* alleles cause amino acid substitutions, map within a 13-bp highly conserved region and cause no visible phenotype on their own. Two T-DNA insertions that disrupt *MAS2* (*mas2-2* and *mas2-3*), however, cause embryonic lethality. We also obtained transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting *MAS2* (*amiR-MAS2*); the pleiotropic phenotype of these plants indicate essential roles for *MAS2* in many developmental stages. We have also shown that *MAS2* is broadly expressed and the nuclear localization of its protein product, as already known for its animal orthologs. We demonstrated by in situ hybridization (FISH) that *MAS2* co-localizes with 45S rDNA in wild-type plants. The molecular and genetic analysis of *amiR-MAS2* plants allowed us to uncover a role for *MAS2* in the control of 45S rDNA transcription.

2014

XII Reunión Biología Molecular de Plantas

Cartagena

Póster presentado por M.R. Ponce



# MAS2, the Arabidopsis ortholog of human NKAP, regulates 45S rDNA transcription

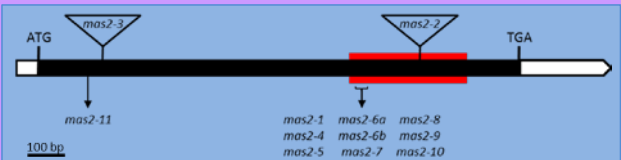
Ana Belén Sánchez-García, Rosa Micol-Ponce, Sara Jover-Gil, Magdalena Nikolaeva-Koleva, and María Rosa Ponce

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.  
 mrponce@umh.es  
 http://genetics.umh.es

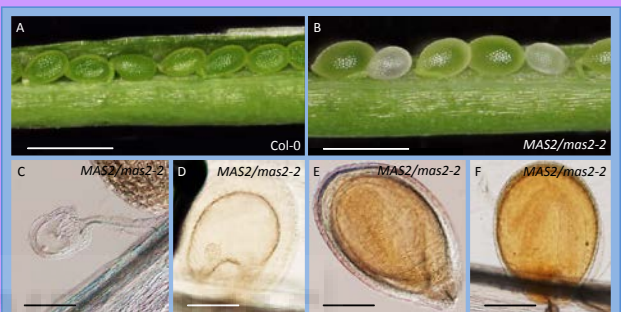
We performed a second-site mutagenesis screen for extragenic suppressors of the morphological phenotype of *ago1-52* in Arabidopsis<sup>1</sup>. A total of 23 *mas* (*morphology of argonaute1-52 suppressed*) lines were isolated, which exhibited suppression at a different extent<sup>2</sup>. We identified in this way 10 alleles of the gene that we termed *MAS2* (Fig. 1), which was positionally cloned and found to encode the human NKAP ortholog, a highly conserved eukaryotic protein involved in transcriptional repression. Nine of these *mas2* alleles cause amino acid substitutions, map within a 32-bp highly conserved region and cause no visible phenotype on their own (Fig. 2). Two T-DNA insertions that disrupt *MAS2* (*mas2-2* and *mas2-3*), however, cause embryonic lethality (Fig. 2 and 3).

We also obtained transgenic plants expressing an artificial microRNA targeting *MAS2* (*amiR-MAS2*)<sup>4</sup>; the pleiotropic phenotype of these plants indicate essential roles for *MAS2* in many developmental stages (Fig. 4). We have also shown that *MAS2* is a nuclear protein, as already known for its animal orthologs (Fig. 5A-C).

We probed that *MAS2* co-localizes with 45S rDNA (Fig. 5D-G). Further, *mas2-1* and *amiR-MAS2.1* plants interacted with mutant alleles of the *NUCLEOLIN-LIKE PROTEIN1* (*AtNUC-L1*) and *HISTONE DEACETYLASE6* (*HDA6*) genes, which are involved in transcriptional regulation of 45S rDNA (Figure 6A-J). We found that *amiR-MAS2.1* plants are deficient in cytosine methylation at the 45S rDNA promoter (Figure 6K).



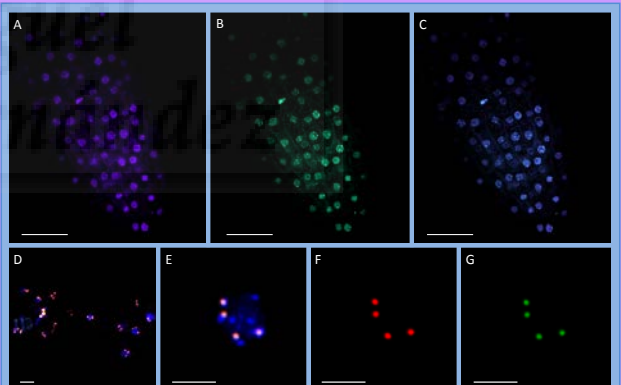
**Figure 2.-** *MAS2* gene structure with indication of the nature and position of the *mas* mutations. The red box indicates the region that encodes the single domain of the *MAS2* protein, which is highly conserved in plants and animals. Low resolution mapping was performed as previously described<sup>3</sup>.



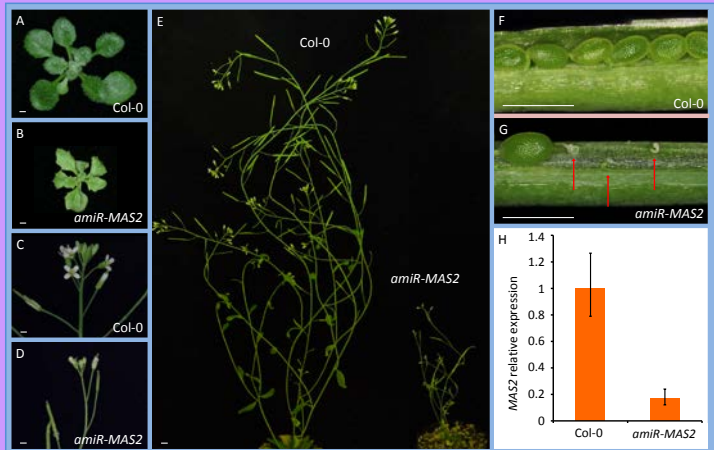
**Figure 3.-** (A, B) Seeds of dissected siliques from (A) Col-0 and (B) *MAS2/mas2-2* plants. (C) Aborted ovule in a *MAS2/mas2-2* plant. (D-F) Embryos from *MAS2/mas2-2* siliques. (D, E) Abnormal embryos arrested in the (D) globular and (E) globular-heart stages. (F) Phenotypically wild type mature embryo. Scale bars: (A, B) 1 mm and (C-F) 200 µm.



**Figure 1.-** Suppression of the *Ago1-52* phenotype in *ago1-52 mas2-1* plants. (A-D) Rosettes of (A) *Ler*, (B) *mas2-1*, (C) *ago1-52 mas2-1* and (D) *ago1-52*. (E) Adult *Ler*, *mas2-1*, *ago1-52 mas2-1* and *ago1-52* plants. (F-I) Terminal region of the inflorescences of (F) *Ler*, (G) *mas2-1*, (H) *mas2-1 ago1-52* and (I) *ago1-52*. Pictures were taken (A-D) 15 and (E) 43 days after stratification (das). Scale bars: (A-D, F-I) 1 mm and (E) 1 cm.



**Figure 5.-** Subcellular localization of the *MAS2* protein. (A-C) Detection of the fluorescent emission of (A) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), (B) GFP and (C) their overlay in roots of transgenic plants expressing a  $2 \times 35S_{::}MAS2::GFP$  transgene. (D-G) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH): (D, E) Overlay of DAPI, *MAS2::GFP* and a 45S rDNA probe (pTa71), (D) several nuclei and (E) magnification of a mitotic prophase nucleus. (F-G) Fluorescent emission of (F) pTa71 probe and (G) *MAS2::GFP*. Scale bars: (A-C, E-G) 50 µm, and (D) 25 µm.

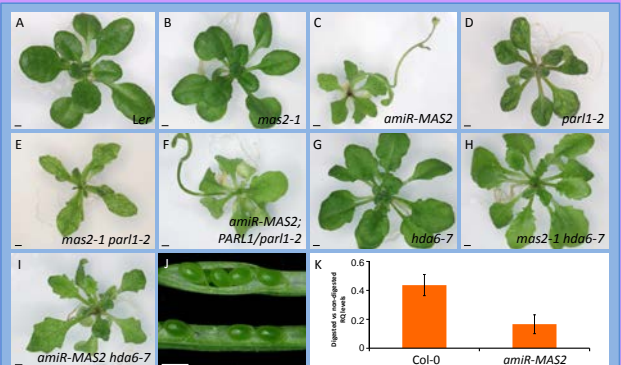


**Figure 4.-** Phenotypes caused by the  $2 \times 35S_{::}amiR-MAS2$  transgene. (A, B) Rosettes of (A) Col-0 and (B) *amiR-MAS2*. (C, D) Terminal region of the inflorescences of (C) Col-0 and (D) *amiR-MAS2*. (E) Col-0 and *amiR-MAS2* adult plants. (F, G) Dissected siliques of (F) Col-0 and (G) *amiR-MAS2*. Red arrows indicate aborted ovules and embryos arrested in early stages of development. (H) Expression of *MAS2* in Col-0 and *amiR-MAS2* plants. Pictures were taken (A-D) 21 and (E) 48 das. Scale bars: (A-D, F, G) 1 mm and (E) 1 cm.

**REFERENCES**  
 1- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 53,1322-1333.  
 2- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., and Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of Arabidopsis ARGONAUTE1. Submitted.  
 3- Ponce, M.R., Robles, P., Lozano, F.M., Brotons, M.A., and Micol, J.L. (2006). Low-resolution mapping of untagged mutations. *Methods Mol. Biol.* 323, 105-113.  
 4- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2014). Multi-gene silencing in Arabidopsis: a collection of artificial microRNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. Submitted.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BIO2008-01900) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112).



**Figure 6.-** Rosettes of (A) *Ler*, (B) *mas2-1*, (C) *amiR-MAS2.1*, (D) *par1-2* (carrying a mutant allele of *AtNUC-L1*), (E) *mas2-1 par1-2*, (F) *amiR-MAS2;PARL1/par1-2*, (G) *hda6-7*, (H) *mas2-1 hda6-7* and (I) *amiR-MAS2 hda6-7*. (J) Dissected siliques of *amiR-MAS2;PARL1/par1-2* plants. No *amiR-MAS2;par1-2/par1-2* plants were identified after genotyping 84 plants of different  $F_2$  and  $F_3$  families. (K) Quantification of DNA methylation levels of the 45S rDNA gene promoter in Col-0 and *amiR-MAS2.1* plants. The DNA methylation status was analyzed by qPCR, using genomic DNA that was digested or not with the methylation-sensitive *HpaII* endonuclease, which digests only non-methylated CCGG sequences. Bars represent the ratio between digested and undigested amplification levels. Scale bars: (A-I) 1 mm and (J) 0.5 mm.

**MAS2, the Arabidopsis ortholog of human NKAP, regulates 45S rDNA transcription**

Sánchez-García, A.B., Micol-Ponce, R., Jover-Gil, S., and Ponce, M.R.

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain

We conducted a screen for suppressors of *Arabidopsis thaliana ago1-52*, a hypomorphic allele of *AGO1 (ARGONAUTE1)*, a key gene in microRNA pathways. We identified nine extragenic suppressors as alleles of *MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED 2 (MAS2)*. Positional cloning showed that *MAS2* encodes the putative ortholog of NKAP (NF-kappa B activating protein), a conserved eukaryotic protein involved in transcriptional repression and splicing in animals. The *mas2* mutations behave as informational suppressors of *ago1* alleles that cause missplicing. *MAS2* is a single-copy gene whose insertional alleles are embryonic lethal. The artificial microRNA *amiR-MAS2* partially repressed *MAS2* and synergistically interacted with a loss-of-function allele of *AtNuc-L1*, which encodes NUCLEOLIN1, which affects epigenetic control of 45S rDNA expression. 45S rDNA promoters were hypomethylated in *amiR-MAS2* plants, indicating that *MAS2* negatively regulates 45S rDNA expression. In yeast two-hybrid assays, *MAS2* interacted with splicing and ribosome biogenesis proteins, and fluorescence *in situ* hybridization showed that *MAS2* co-localized with 45S rDNA at the Nucleolar Organizer Regions. Our results thus reveal a key player in the regulation of rRNA synthesis in plants.

2015

26<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research

París, Francia

Póster presentado por M.R. Ponce

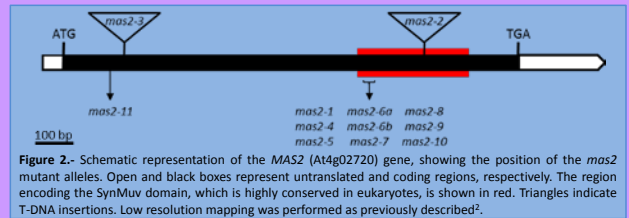


# MAS2, the Arabidopsis ortholog of human NKAP, regulates 45S rDNA transcription

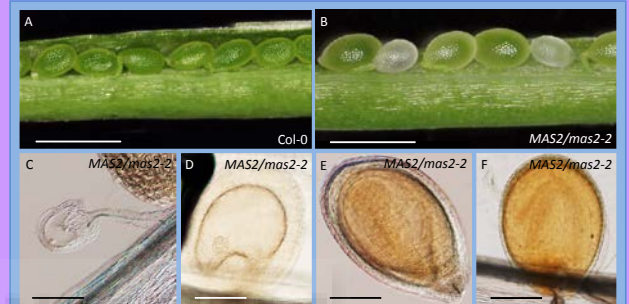
Ana Belén Sánchez-García, Rosa Micol-Ponce, Sara Jover-Gil, and María Rosa Ponce

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202 Elche, Alicante, Spain.  
 mrponce@umh.es  
<http://genetics.umh.es>

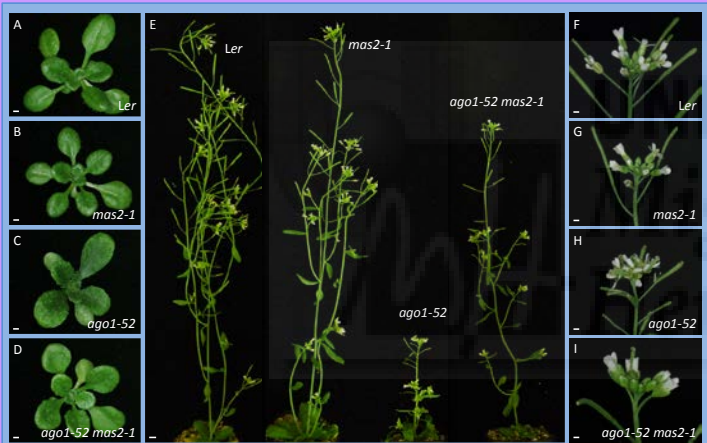
Synthesis of rRNAs consumes most of the transcriptional activity of eukaryotic cells, but its regulation remains largely unclear in plants. We conducted a screen for EMS-induced suppressors of *ago1-52*<sup>1,2</sup>, a hypomorphic allele of *AGO1* (*ARGONAUTE1*), a key gene in microRNA pathways (Fig. 1). We identified nine extragenic suppressors as alleles of *MAS2* (*MORPHOLOGY OF AGO1-52 SUPPRESSED2*; Fig. 2). *MAS2* encodes the putative ortholog of NKAP (NF-kappa B activating protein), which is involved in transcriptional repression and splicing in animals. The *mas2* point mutations behave as informational suppressors of *ago1* alleles that cause missplicing. *MAS2* is a single-copy gene whose insertional alleles are embryonic lethal (Fig. 3). In yeast two-hybrid assays, *MAS2* interacted with splicing and ribosome biogenesis proteins, and fluorescence *in situ* hybridization showed that *MAS2* co-localizes with the 45S rDNA at the NORs (Fig. 4). The artificial microRNA *amiR-MAS2.1* partially repressed *MAS2* (Fig. 5), synergistically interacted with *Atnuc-L1* mutations, and caused hypomethylation of 45S rDNA promoters as well as partial NOR decondensation (Fig. 6), indicating that *MAS2* negatively regulates 45S rDNA expression. Our results thus reveal a key player in the regulation of rRNA synthesis in plants.



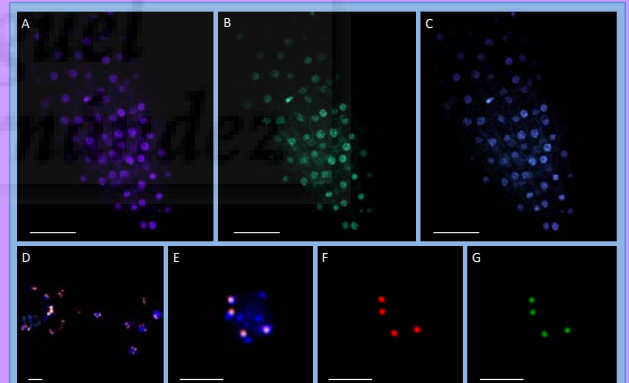
**Figure 2.-** Schematic representation of the *MAS2* (At4g02720) gene, showing the position of the *mas2* mutant alleles. Open and black boxes represent untranslated and coding regions, respectively. The region encoding the SynMuv domain, which is highly conserved in eukaryotes, is shown in red. Triangles indicate T-DNA insertions. Low resolution mapping was performed as previously described<sup>2</sup>.



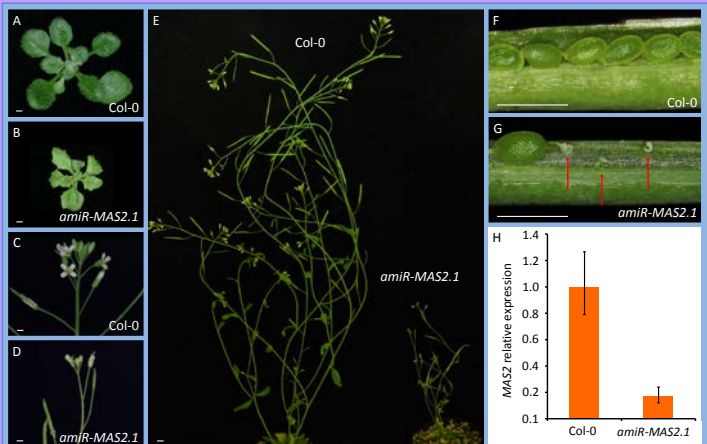
**Figure 3.-** (A, B) Seeds of dissected siliques from (A) Col-0 and (B) *MAS2/mas2-2* plants. (C) Aborted ovule in a *MAS2/mas2-2* plant. (D-F) Embryos from *MAS2/mas2-2* siliques: (D, E) Abnormal embryos arrested in the (D) globular and (E) globular-heart stages; (F) Phenotypically wild type mature embryo. Scale bars: (A, B) 1 mm and (C-F) 200 µm.



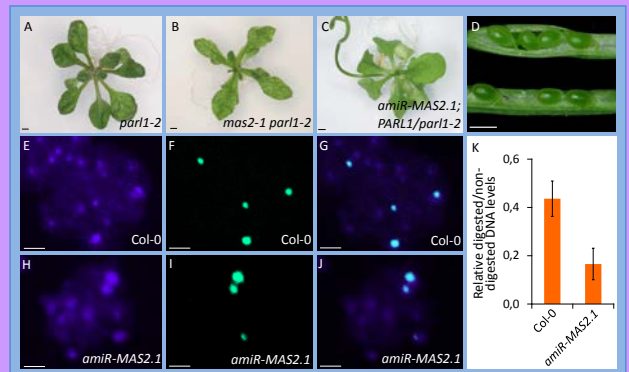
**Figure 1.-** Suppression of the phenotype of *ago1-52* by *mas2-1*. (A-D) Rosettes of (A) *Ler*, (B) *mas2-1*, (C) *ago1-52*, and (D) *ago1-52 mas2-1* plants. (E) adult plants of *Ler*, *mas2-1*, *ago1-52*, and *ago1-52 mas2-1*. (F-I) Inflorescences of (F) *Ler*, (G) *mas2-1*, (H) *ago1-52*, and (I) *ago1-52 mas2-1* plants. Pictures were taken at (A-D) 21 and (E) 48 days after stratification (das). Scale bars: (A-D and F-I) 1 mm, and (E) 1 cm.



**Figure 4.-** Subcellular localization of the *MAS2* protein. (A-C) Detection of the fluorescent emission of (A) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), (B) GFP and (C) their overlay in roots of transgenic plants expressing a 2x35S<sub>pro</sub>::*MAS2*::GFP transgene. (D-G) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH): (D, E) Overlay of DAPI, *MAS2*::GFP and a 45S rDNA probe (pTa71), (D) several nuclei and (E) magnification of a mitotic prophase nucleus. (F-G) Fluorescent emission of (F) pTa71 probe and (G) *MAS2*::GFP. Scale bars: (A-C, E-G) 50 µm, and (D) 25 µm.



**Figure 5.-** Phenotypic effects of the *amiR-MAS2.1* transgene in the Col-0 background. (A, B) Rosettes of (A) Col-0 and (B) *amiR-MAS2.1* (in the Col-0 background) plants. (C, D) Inflorescences of (C) Col-0 and (D) *amiR-MAS2.1* plants. (E) Adult Col-0 and *amiR-MAS2.1* plants. (F, G) Dissected siliques from (F) Col-0 and (G) *amiR-MAS2.1* plants. Red arrows indicate unfertilized ovules and aborted seeds. (H) *MAS2* expression levels in Col-0 and *amiR-MAS2.1* plants. Pictures were taken at 21 (A, B) and 48 (C-G) das. Scale bars: (A-D, F, G) 1 mm and (E) 1 cm.



**Figure 6.-** Rosettes of (A) *par1-2* (carrying a mutant allele of *NUC-1*), (B) *mas2-1 par1-2*, and (C) *amiR-MAS2::PARL1/par1-2*. (D) Dissected siliques of *amiR-MAS2.1::PARL1/par1-2* plants. No *amiR-MAS2.1::par1-2/par1-2* plants were identified after genotyping 84 plants of different F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> families. (E-J) FISH assay: Representative mitotic prophase nuclei from (E-G) Col-0, and (H-J) *amiR-MAS2.1* cells. Fluorescent emissions are: (E, H) DAPI, (F, I) hybridized 45S rDNA probe, and (G, J) their overlay. (K) Quantification of DNA methylation levels of the 45S rDNA gene promoter in Col-0 and *amiR-MAS2.1* plants. The DNA methylation status was analyzed by qPCR, using genomic DNA that was digested or not with the *HpaII* endonuclease, which digests only non-methylated CCGG sequences. Bars represent the ratio between digested and undigested amplification levels. Scale bars: (A-C) 1 mm, (D) 0.5 mm and (E-J) 2.5 µm.

**REFERENCES**  
 1.- Jover-Gil, S., Candela, H., Robles, P., Aguilera, V., Barrero, J.M., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2012). The microRNA pathway genes *AGO1*, *HEN1* and *HYL1* participate in leaf proximal-distal, venation and stomatal patterning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 53,1322-1333.  
 2.- Micol-Ponce, R., Aguilera, V., and Ponce, M.R. (2014). A genetic screen for suppressors of a hypomorphic allele of Arabidopsis *ARGONAUTE1*. *Scientific Reports* 4, 5533.  
 3.- Jover-Gil, S., Paz-Ares, J., Micol, J.L., and Ponce, M.R. (2014). Multi-gene silencing in Arabidopsis: a collection of artificial microRNAs targeting groups of paralogs encoding transcription factors. *Plant J.* 80, 149-160.

**ACKNOWLEDGEMENTS**  
 Research in the laboratory of M.R.P. is supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BIO2008-01900 and BIO2014-56889-R) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/112 and PROMETEOI/2014/006).



## **VII.- AGRADECIMIENTOS**





## VI.- AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la financiación por proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2008-01900; investigadora principal: María Rosa Ponce) y la Generalitat Valenciana PROMETEO/2009/112 (investigador principal: José Luis Micol).

A mi directora de Tesis, María Rosa Ponce, por haberme transmitido su pasión por la ciencia, haberme hecho crecer como científica y como persona, y por depositar su confianza en mí para la realización de esta Tesis. Gracias por tu apoyo en los momentos en dónde no era capaz de “ver el final del túnel”.

A José Luis Micol, por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la Genética, por sus valiosos y buenos consejos y sus comentarios y sugerencias sobre esta memoria de Tesis.

A Verónica Aguilera, Sara Jover-Gil y Rosa Micol-Ponce, por su contribución sustancial al artículo que se presenta en esta Tesis, del que son coautoras.

A los profesores Pedro Robles, Víctor Quesada, José Manuel Pérez y Héctor Candela por los buenos momentos y risas compartidas.

A Sara y Raquel por haberme ayudado y aconsejado siempre cuando tenía que hacer una técnica “nueva” con la que no estaba familiarizada y, por supuesto, por su valiosa amistad.

A todos los técnicos de los laboratorios de María Rosa Ponce y José Luis Micol por su labor técnica: José Manuel, Paqui, Tania, Bea, Leila, Diana, Aurelia, José María y María José.

A José Manuel Serrano por su excelente labor y ayuda en el laboratorio. Gracias por tu amistad y por los innumerables momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A Tania, por contagiarme su alegría y felicidad en las largas horas de trabajo haciendo que las horas pareciesen minutos.

A todos los que se marcharon para continuar creciendo como científicos y con los que he compartido muchos buenos momentos: Rafa, Silvia, Almudena Mollá, Almudena Ferrández, David Esteve y Rubén.

A Rebeca y Rubén porque se convirtieron en mis “almas gemelas” y me demostraron que no todo en la vida es trabajo y seriedad. Gracias por ser como sois y por hacer que sonría cada vez que me acuerdo de vosotros.

A Almudena Ferrández por las tardes y noches de piscina, playa, pelis, atracones nocturnos, risas, llantos, secretos (...y así hasta el infinito). ¡Gracias, gracias y mil gracias!

A todos los que continúan en el laboratorio y me “pisan los talones” con sus Tesis: David Wilson, Tamara, Edu, Rosa y Amani. Porque cada uno de vosotros ha dejado huella en mi vida, en mayor o menor grado. En especial Edu, por haberse convertido en una de mis personas de confianza.

A mis multiculturales alumnos Zehra, Zeynep, Agnieszka, Wissem, Vicente y Magdalena porque con sus millones de preguntas han hecho que me esfuerce al máximo por saber transmitir mis conocimientos de forma correcta en diversos idiomas.

A mis compañeros de Máster, Fernando y Arantxa, con los que he compartido muchas horas de clase y prácticas y momentos muy surrealistas.

A Zeynep porque me ha demostrado que la pasión por la ciencia es capaz de romper diferencias religiosas, culturales y lingüísticas. Gracias por enseñarme un poquito de turco y por demostrarme tu amistad a pesar de estar separadas por más de 3500 km de distancia.

A Joan, Sergio, María Salud, Marián y Aurora por hacer que me sienta valorada a nivel personal.

A mi compañero de piso David, por esos momentos “masterchef” que tanto me divertían y esas conversaciones interminables a las tantas de la noche.

A mis “superchicas”, Miriam y Esperanza del Mar. A pesar de sufrir las consecuencias de la esclerosis (ELA) o las secuelas de un ictus, continuamente lucháis por aquello en lo que creéis consiguiendo todo lo que os proponéis. Para mí sois un ejemplo a seguir. Como se suele decir: “de mayor quiero ser como vosotras”.

A Patri y Bea, mis “chicas del insti”. Porque desde que nos conocimos hace más de 10 años, congeniamos a la perfección formando un trio muy particular: la morena, la castaña y la pelirroja. Porque siempre habéis entendido todas las cosas que os contado, aunque no compartieseis mis ideas locas.

A todas mis “chicas del cole”: Sandra, Rosi, Saray, Susana, Noelia y Laura. Porque nuestra amistad de más de 27 años posiblemente sea una de las más largas del mundo. Pese a seguir diferentes caminos en la vida, a la hora de la verdad siempre encontramos la forma de estar juntas.

A mis compañeros de Protección Civil: Pedro, Pilar, Nerea, David, Jorge, Antoni, Kike, Susi y Josema y Cristian. Por ser un grupo excelente, por haberme recibido con tanto cariño, por darme la oportunidad de demostrar quién soy sin juzgarme a la primera de cambio y porque... ¡todos para uno y uno para todos!

A mi “pequeño saltamontes” Dani. Por su apoyo, consejos y buenos momentos vividos. Eres una de esas pocas personas que, aunque no las veas ni hables con ellas en mucho tiempo, siempre están cuando las necesitas.

A mi familia y familia política por aguantar mis cambios de humor y salidas de tono en los momentos de estrés. Porque me han demostrado su amor incondicional. Y en especial a mis sobrinos Erica, Aitana y Pedro, porque cuando me llaman “tía” hacen que se me disparen las endorfinas.

A mis hermanos, Verónica y Samuel, por ser la fuente de mi inspiración y por todo el amor y cariño que me dan. En especial a “mi pequeño Samuel”, por esos abrazos y “te quiero” que tanto me reconfortan.

A Manuel Ginés, porque como dice una canción que me gusta mucho “somos paralelas cruzadas por casualidad”. Porque desde que te conocí, mi forma de ser y de pensar se ha vuelto más optimista. Porque siempre estás ahí cuando te necesito e intentas ayudarme aunque no tengas ni idea de lo que te hablo. Eres “la sal de mi vida”. ¡Gracias!

A mis mascotas. En especial a Perro por demostrarme su total inteligencia y porque por muy mal que me haya ido el día, siempre me recibe con alegría al llegar a casa.

