

Resumen

En este trabajo hemos caracterizado los genes mir-430 en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), una especie con gran interés en acuicultura. Su similitud, organización y localización se ha comparado con los de otras especies de peces. Hemos descrito la presencia de una organización conservada de repeticiones en tándem que incluyen los genes mir-430 en diferentes órdenes de peces, detectando principalmente tres variantes de estos genes, “a”, “b” y “c”. Según nuestros datos la variante “b” es la que divergió antes y se ha perdido durante la evolución de varios clados de teleosteos. Estos estudios son de gran interés en acuicultura pues estos genes se encuentran involucrados en las primeras etapas del desarrollo del cigoto y la posterior morfogénesis.

Introducción

Los miRNAs son secuencias pequeñas (~22nt) de ARN involucradas en la regulación génica postranscripcional. La familia de miRNAs mir-430, inicialmente descrita en *Danio rerio*, forma parte de los primeros genes expresados en la activación genómica del cigoto. Estos miRNAs son los más expresados en esta etapa, promoviendo la degradación de los mRNAs maternos y permitiendo el inicio de la expresión del genoma del cigoto². Su ausencia se ha asociado a alteraciones en la morfogénesis de distintos órganos y aparatos³. En el pez cebra se ha descrito que sus genes forman tripletes de variantes denominadas “a”, “b” y “c”, los cuales a su vez están repetidos en tándem. La presencia de secuencias promotoras en estas repeticiones hace que esta zona sea la más densa en promotores del genoma y forme un cuerpo de transcripción capaz de activar otras regiones¹. Aunque en otras especies también hay múltiples copias de genes ortólogos a mir-430, la organización en tripletes no parece mantenerse y no todas las variantes se encuentran en todas las especies. De hecho, pese a que esta familia se encuentra muy conservada en peces, no se han realizado estudios previos que comprueben su evolución y comparen su organización. En el presente estudio se han caracterizado los genes mir-430 en el lenguado y comparado con los de otras especies de peces, usando esta información para analizar las características de estos genes en este grupo de vertebrados.

Materiales y métodos

01	Localización de las repeticiones en tándem en <i>S. senegalensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Aislado mediante enzimas de restricción, clonación y secuenciación. Localización en el genoma mediante búsqueda BLAST e hibridación <i>in situ</i>.
02	Localización en especies modelo y de interés en acuicultura	<ul style="list-style-type: none"> Búsqueda BLAST de los genes mir-430 depositados en miRBase.
03	Análisis de las repeticiones y caracterización de los posibles genes mir-430	<ul style="list-style-type: none"> Caracterización de la subunidad de repetición mediante TandemRepeatFinder y RepeatExplorer. Detección de los genes mir430 por homología y su estructura secundaria. Detección de posibles promotores mediante Promoter Prediction. Filogenia mediante ClustalW y MEGA11.

Resultados y discusión

En el ensamblado del genoma de *S. senegalensis* se detectaron repeticiones en tándem que ocupaban más de 70 kb (Figura 1). Mediante RepeatExplorer caracterizamos la subunidad de repetición en esta especie que incluye un posible promotor y dos secuencias con homología a mir-430 (mir-430c y mir-430a) (Figura 2). Este microRNA se hibridó sobre cromosomas de *S. senegalensis* encontrándose señal de hibridación en la pareja número 5 (Figura 3).

Hemos comprobado que la familia mir-430 está conservada y su organización en tándem se mantiene en todas las especies estudiadas. Estas repeticiones se encuentran en un solo locus, excepto en los salmónidos donde se encuentran en dos (Figura 4), posiblemente debido a la duplicación del genoma en este grupo. El número y tamaño de las repeticiones, así como el número de genes mir-430 varía considerablemente en función de la especie. En el análisis filogenético hemos podido clasificar tres variantes principales “a”, “b” y “c” y comprobar que la variante “b” parece ser la más ancestral y la que se encuentra ausente en más especies (Figura 4). Estos resultados son útiles en el conocimiento del control génico en el desarrollo embrionario de los peces y con posibles aplicaciones en especies con interés acuícola.

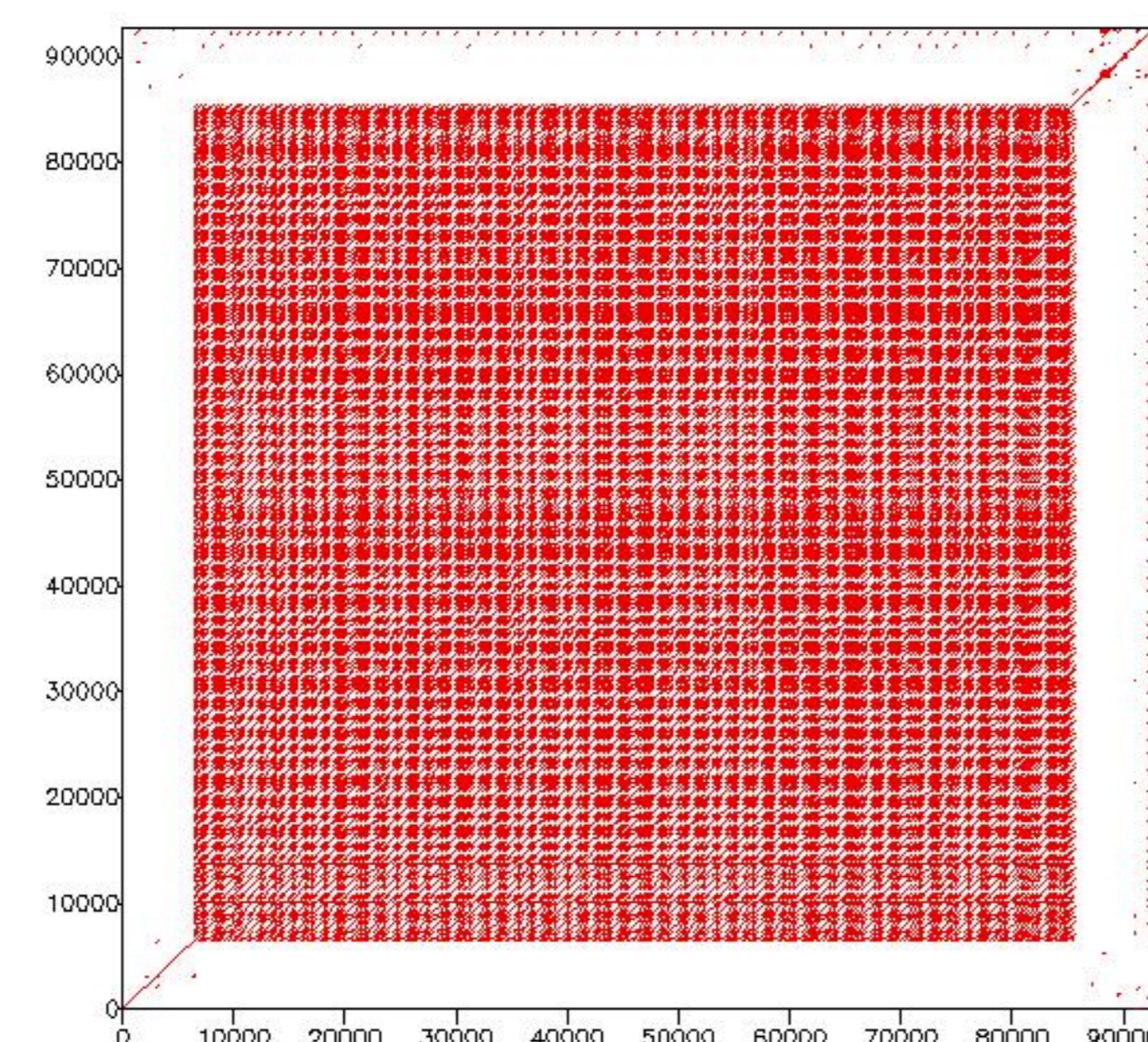


Figura 1. Dotplot de la región del genoma de *Solea senegalensis* que contiene las repeticiones que incluyen los genes mir-430.

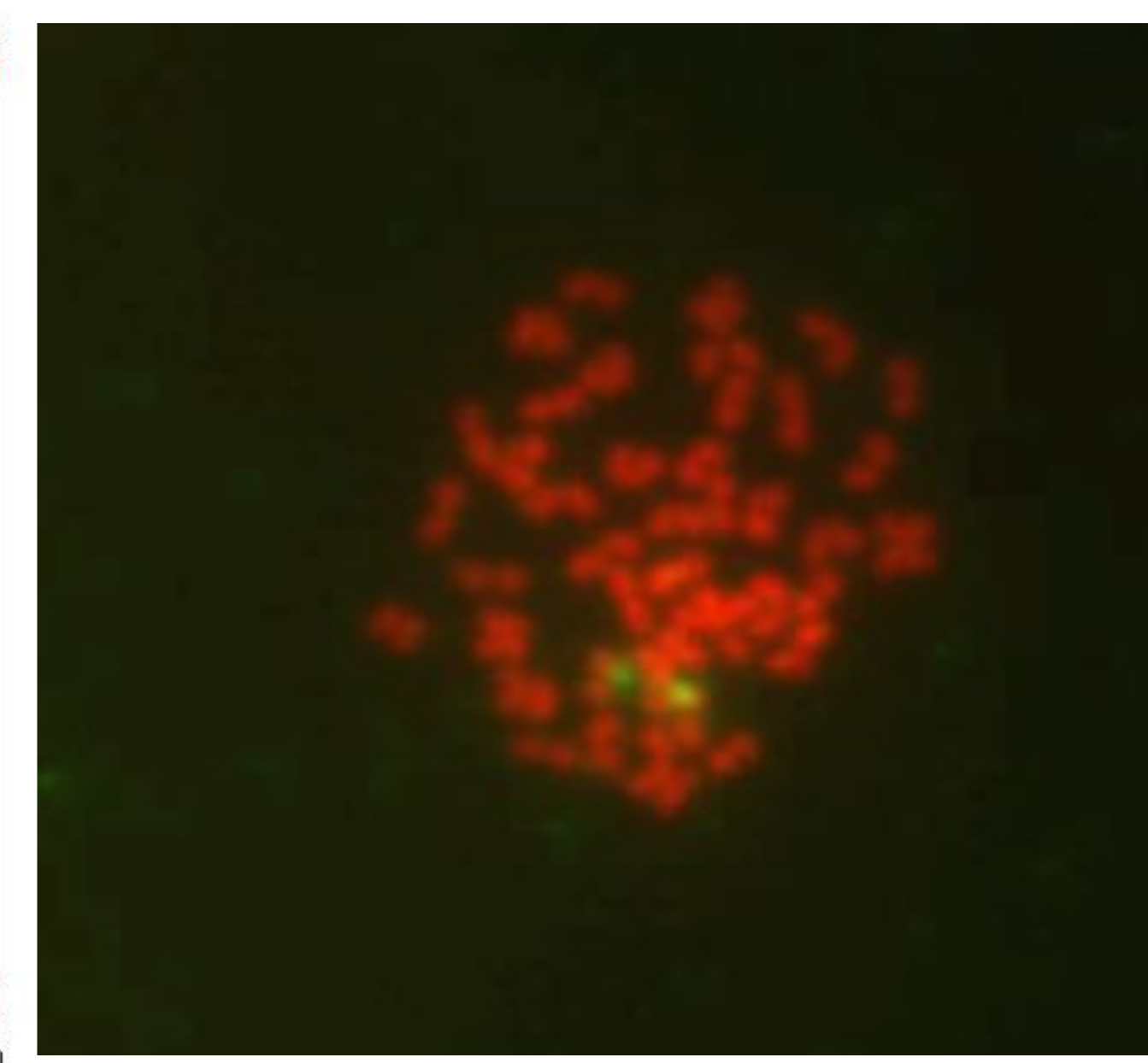


Figura 3. Hibridación *in situ* de mir430 en metafases mitóticas de *Solea senegalensis*.

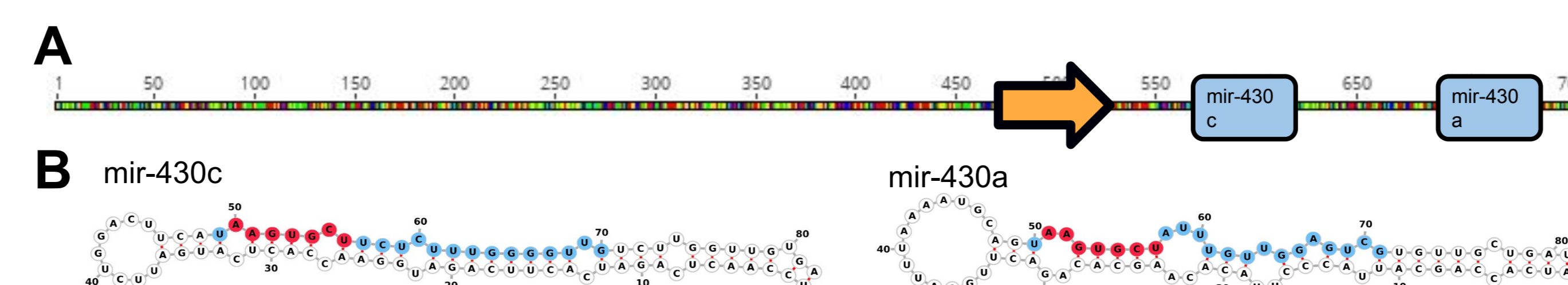


Figura 2. (A) Subunidad de repetición encontrada en *Solea senegalensis* mediante RepeatExplorer (762 pb) donde se marca la posición del promotor (flecha) y los dos posibles genes mir-430. (B) Horquillas formadas por las dos regiones con homología a mir-430 destacando la posible secuencia madura (azul) que incluye la secuencia semilla (rojo) que se mantiene en todas las especies.

Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias de mir-430 encontradas en especies modelo (*Danio rerio*, *Gasterosteus aculeatus*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Oryzias latipes*, *Oreochromis niloticus* y *Gadus morhua*) y especies de interés en acuicultura (*Solea senegalensis*, *Acipenser ruthenus*, *Salmo salar* y *Salmo trutta*), obtenido a partir de un alineamiento mediante ClustalW y el método Neighbor-joining con 1000 pseudo-réplicas, enraizado con el gen mir430 descrito en *Petromyzon marinus*. Se han resaltado los genes que corresponden a cada una de las variantes (“a”, “b” y “c”).

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado dentro del proyecto “Desarrollo del mapa de ligamiento diploide del lenguado y caracterización de secuencias repetidas y genes con expresión diferencial entre sexos” RTI2018-096847-B-C22, financiado por el Plan Nacional de I+D+I (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades)

Referencias

- Hadzhiev, Y., L. Wheatley, L. Cooper, F. Ansaloni, C. Whalley, Z. Chen, ... y F.D. Mueller (2021). The miR-430 locus with extreme promoter density is a transcription body organizer, which facilitates long range regulation in zygotic genome activation. *bioRxiv*. [https://doi.org/10.1101/2021.08.09.455629]
- Giraldez, A.J., Y. Mishima, J. Rihel, R.J. Grocock, S. Van Donge, K. Inoue, ... y A.F. Schier. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*. 312(5770): 75-79.
- Li, W.M., C.M. Chan, A.L. Miller y C.H. Lee (2017). Dual functional roles of molecular beacon as a MicroRNA detector and inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. 292(9): 3568-3580.

