

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Revelando el lado oscuro del Genoma	10
1.2 RNA interferente: Mecanismos mediados por RNAs pequeños.....	11
1.3 Las Proteínas Argonauta y sus parejas de RNAs pequeños.	13
II. ANTECEDENTES	14
2.1 Diversidad de sRNAs	14
2.1.1 Diversidad de RNAs pequeños en plantas.....	14
2.2 Función y Biogénesis de sRNAs en plantas.....	16
2.2.1 Función de miRNAs	16
2.2.2 Biogénesis de los miRNAs.....	17
2.2.3 Funcion de siRNAs.	19
2.2.4 Biogénesis de los siRNAs.	20
2.2.5 RNAs pequeños particulares: nat-miRNAs, epi-siRNAs y qi-siRNAs	21
2.3 Estructura y función de las proteínas ARGONAUTA.....	22
2.3.1 Función y características moleculares del dominio PAZ.....	24
2.3.2 Función y características moleculares del dominio PIWI.....	25
2.3.3 Las proteínas AGO de Arabidopsis thaliana.....	25
2.3.4 Argonautas especializadas: proteínas de la subfamilia PIWI.....	27
2.4 Desarrollo reproductivo en plantas	27
2.4.1 Desarrollo del gametofito femenino.	28
2.4.2 Apomixis	29
2.4.3 ARGONAUTA9 controla la gametogénesis femenina en Arabidopsis thaliana.....	30
2.4.2. Localización celular de AGO9 en tejido reproductivo de Arabidopsis.....	32
III. HIPOTESIS.	35
IV. OBJETIVOS.....	36
4.1 General.	36
4.2 Específicos.	36
V. MATERIALES Y METODOS.....	37
5.1 Material biológico.	37

5.2 Producción de anticuerpos policlonales anti-AGO9 y anti-AGO5.....	38
5.2.1 Diseño y selección del antígeno anti-AGO9 y anti-AGO5.....	38
5.2.2 Síntesis de péptido antigénico e inmunización en conejos.....	40
5.3 Northern blot.....	41
5.4 Extracción total de Proteínas.....	43
5.4.1 Extracción de proteínas nativas.....	43
5.4.2 Extracción de proteínas desnaturalizantes.....	44
5.5 Determinación de concentración de proteínas	44
5.6 Electroforesis en Geles Desnaturalizantes de Poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)	44
5.7 Tinción de proteínas en geles SDS-PAGE.	45
5.8 Ensayo de inmunodetección (Western Blot).....	45
5.9 Ensayos de Inmunoprecipitación	46
5.9.1 Aislamiento del complejo AGO9-RNA y Clonación de RNAs pequeños.....	46
5.9.2 Aislamiento del complejo AGO9-proteínas.....	47
5.10 Análisis por espectrometría de masas.	47
5.11 Ensayo in vitro de interacción AGO9-RNA (UV crosslinking assay).....	47
5.12 Transcripción Reversa con amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).	48
5.13 Herramientas Bioinformáticas.....	48
5.14 Citología por clareos.....	48
VI. RESULTADOS	49
6.1 Expresión de los genes ARGONAUTA9 (AGO9) y ARGONAUTA5 (AGO5).....	49
6.2 Identificación de AGO9 en tejido reproductivo de Arabidopsis.....	50
6.2.1 Detección de ARGONAUTA9 por Western blot.	50
6.2.2 Identificación de AGO9 por espectrometría de masas.....	52
6.2.2.1 Candidatos a Interactores proteína-proteína de AGO9.....	53
Figura 22. Inmunoprecipitación de AGO9.....	54
6.3 Identificación de RNAs pequeños interactores de AGO9.....	55
6.3.1 Análisis de secuencias de RNAs pequeños interactores de AGO9.	55
6.3.1.1 Preferencia de nucleótido en posición 5' y comparación con complejos AGO-sRNA.....	61
6.3.2 Posición genómica de AGO9-sRNAs que pertenecen a TEs.	62
6.3.2.1 Candidatos AGO9-sRNAs dependientes de Pol IV.....	64
6.3.3 Análisis de expresión de RNAs interactores de AGO9.....	64



6.3.3.1 Evaluación in silico de la expresión en óvulo de AGO9-sRNAs.	64
6.3.3.2 Expresión de AGO9-sRNAs en tejido reproductivo.	66
6.4 Ensayo bioquímico de interacción AGO9-sRNA	68
6.5 Expresión de Retrotransposones en fondo mutante ago9.....	69
VII. DISCUSION.....	70
7.1 ARGONAUTA9 se expresa en tejido reproductivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
7.2 ARGONAUTA9 coprecipita con una proteína de la familia HSP90.	72
7.3 Los RNAs pequeños interactores de AGO9 se expresan en tejido reproductivo femenino.	73
7.4 AGO9 funciona por un mecanismo célula no autónomo en el desarrollo del óvulo..	74
7.5 ARGONAUTA 9 reprime la actividad de TEs en el óvulo de <i>Arabidopsis</i>	75
7.5.1 La ruta de sRNAs de 24 nt como regulador de destino celular.	76
7.5.2 Modelo especulativo de regulación epigenética de TEs en gametofito femenino.....	77
VIII. CONCLUSIONES.....	81
IX. PERSPECTIVAS	82
X. BIBLIOGRAFIA	84
XI. ANEXO.	91