



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RNA
LARGO NO CODIFICANTE *LNCTATA* SOBRE SUS
GENES ALEDAÑOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

**Lic. en Biología Susana Isabel Vargas
Camacho**

DIRECTOR DE TESIS: DRA.

**CATALINA ARENAS
HUERTERO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RNA
LARGO NO CODIFICANTE *LNCTATA* SOBRE
SUS GENES ALEDAÑOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

**LIC. EN BIOLOGÍA SUSANA ISABEL VARGAS
CAMACHO**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CATALINA ARENAS HUERTERO

SINODALES:

PRESIDENTE:

DR.

SECRETARIO:

DRA.

VOCAL:

DR.



SAN LUIS POTOSÍ 31 de enero 2021

San Luis Potosí, 19 de enero del 2022.



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

**Comité Académico del Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos (PCBP)
Facultad de Ciencias Químicas
UASLP
Presente**

Respetables Señores del CAP:

Por este conducto les hago de su conocimiento que la **Biol. Susana Isabel Vargas Camacho** estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos, quien actualmente finalizó satisfactoriamente sus créditos del presente programa, también ha terminado satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado: **“Caracterización de la función del RNA largo no codificante LNCTATA sobre sus genes aledaños”**.

El trabajo de tesis se encuentra avalado por el comité tutorial. Por tal motivo les hago la atenta petición para que sea considerada la fecha del 31 de enero del presente, con horario de las 16 horas, para que se lleve a cabo el examen de grado.

Dra. Margarita Rodríguez Kesller, Facultad de Ciencias, UASLP.
Dra. Claudia Escudero Lourdes, Fac. de Ciencias Químicas, UASLP.
Dra. Catalina Arenas Huertero, Facultad de Ciencias, UASLP.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su atención y quedo de Ustedes.

Atentamente,

Dra. Catalina Arenas Huertero
Profesor Investigador de tiempo completo Nivel VI
Laboratorio de Metabolismo del RNA
Facultad de Ciencias, UASLP.
Av. Chapultepec #1570. Priv. del Pedregal,
San Luis Potosí., SLP
México. CP 78295
Tel oficina(444) 826-2300 Ext. 5681
Laboratorio (444) 826-2300 Ext. 5754



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

Av. Dr. Salvador Nava Martínez S/N
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
tel. (444) 826 2316 y 2321
fax 826 2384
www.uaslp.mx

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Metabolismo del RNA de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección de la Dra. Catalina Arenas Huertero

Con financiamiento de:

- Fronteras de la Ciencia CONACYT, convenio 2016-01-1538
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Beca de tesis: 706048 y CVU de Becario (CONACYT) 886774
- Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) C18-FAI-05-04.04

“El programa de Maestría o Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000588 (Maestría) 000590 (Doctorado), en el Nivel Maestría (Consolidado) Doctorado (En Desarrollo). Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 706048”



Función regulatoria del RNA largo no codificante LNCTATA sobre el desarrollo de Arabidopsis by Vargas Camacho Susana Isabel is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

“A mi tía Elena, tía Cristi, tío Mauro y tío Carlos, personas que me acompañaron durante tantos años y que perdí recientemente, por enseñarme la nobleza, el amor por mi familia, amigos, pareja y mascotas”.



Función regulatoria del RNA largo no
codificante LNCTATA sobre el desarrollo
de Arabidopsis by Vargas Camacho
Susana Isabel is licensed under a [Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-
SinObraDerivada 4.0 Internacional
License](#).



Función regulatoria del RNA largo no
codificante LNCTATA sobre el desarrollo
de Arabidopsis by Vargas Camacho
Susana Isabel is licensed under a [Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-
SinObraDerivada 4.0 Internacional
License](#).

Agradecimientos.

Gracias a mi familia, a mis papás Isabel y Felipe, por apoyarme durante tanto tiempo, ayudarme sentimental y económicamente durante toda esta travesía y por aceptar mis decisiones, darme ánimos, abrazos y besos cuando más los necesite, a mis hermanos Felipe (gordito), Catalina (Gatito) y Josué (gordito2) por todo el apoyo y el cariño, por cuidarme y hacerme reír, los amo muchísimo, a mi Chaparrina por ser la mejor sobrina del mundo, a Sarita la mejor cuñiamiga que puedo tener.

Gracias a la Dra. Catalina por todos sus consejos por permitirme estar en su laboratorio y ser parte de este proyecto el cual adoro, a Jaime por enseñarme todos los tips para hacer mejor mi trabajo y tenerme la paciencia de enseñarme, a la Dra. Margarita por todos sus consejos y aportaciones, a Dany por siempre tener controlado el laboratorio y sus grandes y graciosas platicas, a la Dra. Claudia por sus aportaciones para este trabajo y a mis maestros de la Maestría por todo su conocimiento.

Gracias a mi segunda familia, Chuy, Gaby, Lau, Manolo, Nacho, Emmanuel y Byanka, gracias por hacer del laboratorio un hogar, gracias por sus pláticas, risas, debates, consejos, esas platicas en la cafetería, esos días de congreso, gracias por su amistad.

Gracias a mi Richi por todo su amor, su paciencia, por apoyarme, por levantarme cuando estaba en el fondo, por no dejarme renunciar, por estar ahí, a la Sra. Ruth y al Sr. Ricardo por todo el apoyo y los ánimos que me brindaron así como abrirme las puertas de su casa, a Manza un gran amigo que últimamente conocí, gracias por tu amistad tu apoyo y por enseñarme a jugar juegos de mesa.

A mis amigos Jacky, Raúl, Gaby B, Hal, Gaby, a mis amigos de “martes de pecados”, a mis amigos de Beocia, gracias por estar ahí, su apoyo y su amistad.

Gracias a mi Monche por ser la mejor compañera-prima de casa, me da gusto verte crecer y ser parte de eso. A todos mis tíos y tías a mi abuelito por todas esas reuniones, risas y platicas

A mi Cleo por ser la mejor roommate.

Gracias a la vida, por permitirme cumplir una meta más.

Índice

Capítulo I. Introducción	8
Regulación en la expresión de genes	12
Regulación a nivel transcripcional	13
Activación y Represión de la transcripción.....	15
Remodeladores de la cromatina	18
POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX.....	20
RNAs no codificantes.....	23
Pequeños RNAs (smallRNAs)	24
microRNAs en plantas (miRNAs).....	25
RNAs largos no codificantes.....	29
Capítulo II. Justificación	33
Capítulo III. Hipótesis.....	33
Capítulo IV Objetivo General.	33
Capítulo V Objetivos específicos	34
Capítulo VII. Metodología	34
Complementación de la línea de inserción de T-DNA.....	34
Transformación de las plantas pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS con la construcción pMDC32-amiRLNCTATA.	35
Transformación de plantas pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS con la construcción 35s: LNCTATA.....	35
Extracción de RNA.....	36
Síntesis de cDNA para mRNAs.....	36
Síntesis de cDNA para miRNAs.....	36
Análisis estadístico.....	37
Expresión transitoria de GUS en líneas pmiR396b-GUS-35s:LNCTATA	37
Localización sub-celular del RNA LNCTATA en <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
Capítulo VIII. Anexos	39
Capítulo IX. Bibliografía	40

Resumen

Los RNAs largos no codificantes (lncRNA) se han descrito como RNAs que no codifican a proteínas, que presentan función reguladora sobre otros genes, una de sus funciones es regular la expresión por medio de la interacción con proteínas, ya sea reclutando complejos remodelares de la cromatina, secuestrando la maquinaria de inicio de la transcripción, etc. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se encontró un lncRNA codificado entre dos genes, este lncRNA tiene una alta expresión en condiciones de estrés, similar a sus genes aledaños en determinadas condiciones de crecimiento, debido a su ubicación en el genoma se nombró como *LNCTATA*. Para la caracterización de su función se ensayaron diversos experimentos utilizando plantas que presentaban diferentes estrategias de silenciamiento del *LNCTATA* como una línea de inserción (T-DNA), una línea de RNA de interferencia (Ri) y una línea con un micro RNA artificial (amiR), en donde las tres líneas (T-DNA, Ri y amiR) presentaron mayor acumulación de los transcritos sus genes aledaños, así como un efecto en el desarrollo. Estos resultados sugieren que *LNCTATA* tiene una regulación negativa sobre su *loci*, abriendo una amplia posibilidad de su mecanismo de acción.

Palabras clave: RNAs largos no codificantes (lncRNA), *Arabidopsis thaliana*, regulación de la expresión génica, desarrollo de plantas

Summary

Long non-coding RNAs (lncRNAs) have been described as RNAs that do not code for proteins with regulatory function on other genes. One of their functions is the gene expression regulation through the interaction with proteins, for instance, lncRNAs can recruit chromatin remodeling complexes, sequestering components from the transcription initiation machinery. In the plant model, *Arabidopsis thaliana*, a lncRNA was found encoded between two genes *E3-RING-U* and *TBP2*. This lncRNA has high expression levels under stress conditions which is like its neighbor genes and under certain growth conditions; therefore it was named as *LNCTATA*. To characterize its function several experiments were performed using different strategies for silencing *LNCTATA* such as an insertion line (T-DNA), an interference RNA line (Ri) and an artificial microRNA encoded line (amiR). The three different lines showed a higher accumulation of *TBP2* and *E3-RING-U* transcripts suggesting the participation of *LNCTATA* on the regulation of the expression of these genes. Moreover, these plants showed a significant decrease of the foliar area besides having a lower number of serrations on the leaf margin which may indicate a deregulation in leaf development. These results together, suggest that *LNCTATA* participates as a regulator of *TBP2* and *E3-RING-U* expression and its absence triggers a deregulation of some genes involved in leaf development of *Arabidopsis thaliana* affecting the plant growth.

Key words: long non-coding RNAs, *Arabidopsis thaliana*, gene expression and regulation, plant development.

Capítulo I. Introducción

Los organismos fotosintéticos como las plantas, participan en la producción de uno de los elementos fundamentales para la vida; el oxígeno, además son parte importante de la cadena alimenticia de muchos organismos, los humanos dependen de las plantas para alimentos, vestidos, muebles, principalmente; en la medicina son parte importante para la creación de medicamentos, cosméticos y biocombustibles. En el año 2000, se secuenció el genoma completo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* donde se encontró que *Arabidopsis* cuenta con 38,000 *loci* (Woodward & Bartel, 2018), los cuales se encuentran codificados en 5 cromosomas, los genes son secuencias ordenadas en el DNA que determinan de manera muy precisa la proteína que van a codificar (Lewin, 2008); sin embargo, no todos los genes codifican a proteína (Lockton & Gaut, 2005). Para que un gen sea traducido a proteína se necesitan transcurrir diversos procesos como la transcripción y traducción, además no todos los genes son necesarios en todo momento, algunos genes solo son requeridos durante el desarrollo embrionario, en la germinación, en el desarrollo de órganos, durante el crecimiento, algunos son requeridos solo en presencia de algún estrés, o durante un cambio de estación. Debido a esto, existen diferentes estrategias de control de la expresión de genes, estos controles se encuentran presentes en el conocido dogma central de la biología molecular que destaca el proceso de transformación de un gen a proteína, (figura 1A), a través de procesos como replicación, transcripción y traducción. La replicación del DNA es el proceso mediante el cual se duplica una molécula de DNA por medio de la DNA polimerasa, esto sucede cuando se lleva a cabo la división celular. Por otro lado, la transcripción es el proceso en donde una secuencia particular de DNA se transcribe a una molécula de RNA por medio de las RNAs polimerasas, el transcrito que va a dar origen a una proteína se nombra como RNA mensajero (RNAm), el RNAm es sujeto de diversas modificaciones dentro del núcleo, como la adición de diversos accesorios, los cuales le ayudaran a aumentar su tiempo de vida como: CAP (casquete de metilguanosa), el cual se encuentra en el extremo 5' del RNAm, por

otra parte, en el extremo 3' se encuentra una cadena de residuos de adenina, la cual forma una cola poli (A), estos accesorios son característicos de ser producto de la RNA polimerasa II y sirven para impedir la digestión del RNAm por medio de exonucleasas 3'-5', favorecen el transporte del RNAm fuera del núcleo y participan en el inicio de la traducción del RNAm. Uno de los procesos más importantes que le ocurren a los RNAm es el corte y empalme del RNA de intrones y exones, como último se lleva a cabo la traducción del RNAm en proteína, esta es una de las partes más complejas, donde a partir de la secuencia del RNAm se va a formar una proteína, para este proceso es necesario la participación de moléculas como los RNAs ribosomales (RNAr) y RNAs de transferencia (RNAt), los cuales son RNAs que no codifican a proteína (Gerald, 2014). Como se mencionó anteriormente, estos procesos son importantes, por lo que su regulación es fundamental; sin embargo, antes de mencionar como se lleva a cabo la regulación de los genes, es necesario saber cómo se encuentra organizado el genoma dentro de la célula.

Organización del genoma dentro del núcleo

Tanto las plantas como los animales están formados por células eucariotas esto significa que presentan un núcleo el cual contiene el DNA, una célula humana contiene 6,400 millones de pares de base de DNA divididos en 46 cromosomas, los cromosomas se componen de DNA y proteínas relacionadas, que en conjunto se conocen como cromatina, el empaquetamiento de la cromatina depende de pequeñas proteínas altamente conservadas que están compuestas por un alto contenido de aminoácidos básicos como arginina y lisina, se dividen en 5 clases las cuales se diferencian por su contenido de lisina/arginina (H1, H2A, H2B H3 y H4), las histonas y el DNA forman subunidades conocidas como nucleosomas, los nucleosomas están formados por 146 pares de bases de DNA superenrollado en un complejo formado por dos copias de 4 histonas (H2A, H2B, H3 y H4), formando un octámero como se muestra en la figura 1B. Las histonas tienen como característica una cola amino terminal flexible, la cual se proyecta fuera del octámero, la cola amino terminal de las histonas sufren diversas modificaciones químicas, ya que son blanco de diversas adiciones de grupos químicos, los cuales provocan cambios en la

estructura del nucleosoma. La histona H1 no se encuentra dentro del octámero; sin embargo, se encuentra en la parte conectora del DNA, esto quiere decir que ayuda a conectar un nucleosoma con otro nucleosoma, debido a esto se nombra como histona conectora. Los nucleosomas forman parte de la estructura básica de la cromatina, a la estructura que forman la unión de diversos nucleosomas se le conoce como “cuentas de collar” (figura 1C), posteriormente al empaquetamiento formado por los nucleosomas se les conoce como fibra de 30nm, este tipo de empaquetamiento se encuentra en los niveles superiores de la cromatina, se conocen dos posibles modelos de conformación, los modelos se diferencian de acuerdo al acomodo de los nucleosomas dentro de la fibra, el modelo “zigzag” muestra una alternancia entre nucleosomas, mientras que el modelo “soleniodes” se refiere a la unión de nucleosomas consecutivamente, se cree que el modelo “zigzag” es el más aceptado. El mantenimiento de la fibra 30nm se debe a interacción de histonas y nucleosomas vecinos, esta interacción se debe a las modificaciones químicas que se lleven a cabo en la cola amino terminal de las histonas. Las fibras de 30nm forman estructuras asas amplias y superenrolladas de 300nm, una de las proteínas que ayudan a mantener esta conformación son los anillos de cohesina. Esta estructura se conoce como cromatina relajada (eucromatina), mientras que la cromatina condensada (heterocromatina) tiene un tamaño de 700nm y finalmente, la forma más característica de la cromatina, es la estructura cromosómica visualizada durante la mitosis con un tamaño de 1µm de longitud (Gerald, 2013). Una característica importante de la cromatina es que es dinámica, esto quiere decir que siempre se va a estar en constante cambio. La cromatina se divide en heterocromatina constitutiva, heterocromatina facultativa y eucromatina. La heterocromatina constitutiva es una parte de DNA que permanece condensada en todas las células y en todo momento, por lo que esa parte de DNA no se transcribe en ningún momento, algunos genes que se encuentran con esta configuración son los genes “repetidos en tandem”, mientras la heterocromatina facultativa es cromatina que en algún momento del ciclo celular se necesita que se active y posteriormente se puede desactivar un ejemplo son los genes *HOX* (genes

homeóticos). Finalmente, la eucromatina es una configuración de la cromatina donde esta se encuentra en estado laxo permitiendo la transcripción de los genes (Allis, 2015). El estado de heterocromatina constitutiva, heterocromatina facultativa y eucromatina están definidas por una serie de señales que se encuentran a lo largo del genoma, el estado de la cromatina depende del tipo de señales y donde se encuentran. La estructura de la cromatina y como se modifica a través de diferentes señales permite o inhibe la transcripción de genes, ayudando a su regulación, como anteriormente se había mencionado la regulación de la expresión génica es llevada a cabo a través de diferentes procesos, como en la transcripción y traducción.

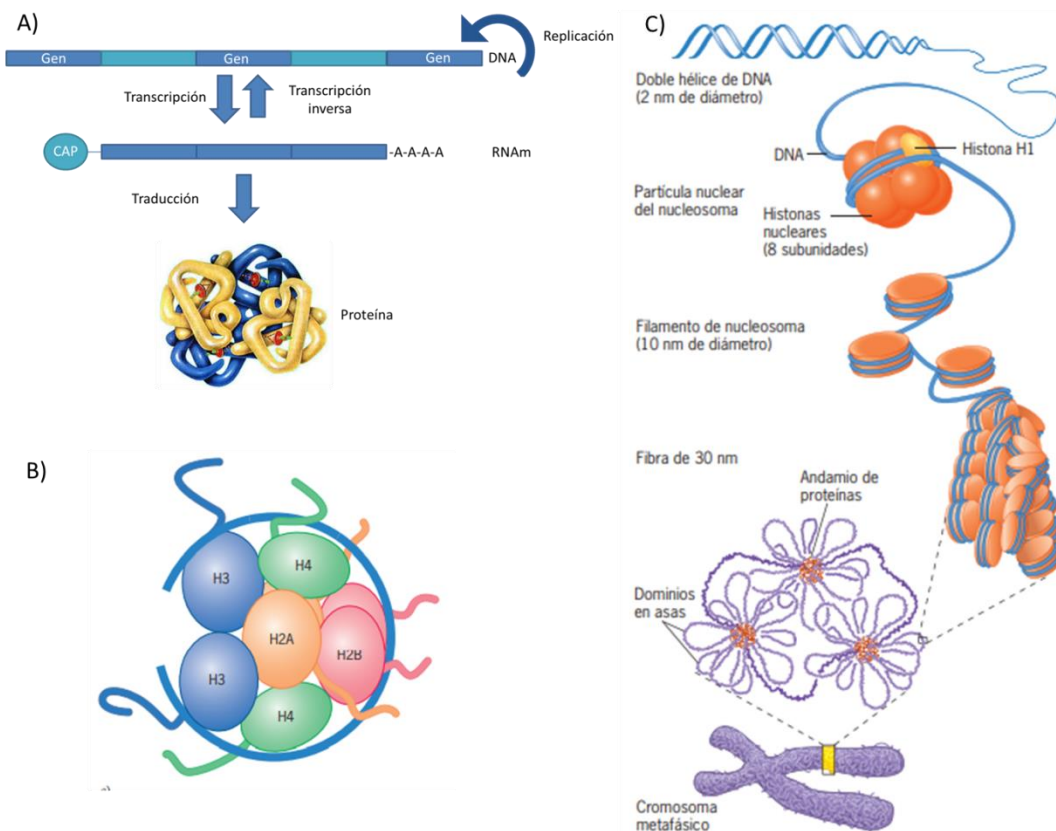


Figura 1 Dogma central de la biología molecular y estructura del DNA, en A) se muestra un esquema representativo del dogma central de la biología molecular donde se muestra los procesos clave como la replicación, la transcripción y la traducción, en B) representación de un nucleosoma, el cual está formado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, las cuales se encuentran como dímeros que

forman un octámero, las histonas tiene un extremo N-terminal el cual sobresale del octámero, la histona H1 no se encuentra formando parte del octámero pero si participa como anclaje con otro nucleosoma, en C) se muestran los niveles de organización del DNA, la doble hélice de DNA se enrolla alrededor de los nucleosomas, la interacción del DNA con los nucleosomas forman un filamento, estos a su vez conforman la fibra de 30 nm, estas fibras se organizan en dominios de asas, durante la mitosis estos dominios se compactan más generando los cromosomas mitóticos. Figura tomada y modificada de (Janet- Iwasa, Marshall-Wallace., 2018).

Regulación en la expresión de genes

La regulación de los genes se lleva a cabo en diferentes procesos (figura 2):

- A nivel transcripcional: determina si el gen se puede transcribir y con cuanta frecuencia (figura 2A).
- A nivel de control de procesamiento: determinan la vía de procesamiento del RNAm primario a RNAm maduro, donde y como se lleva a cabo la maduración del RNAm (Figura 2B).
- A nivel traduccional: determina si un RNAm se traduce y con qué frecuencia (Figura 2C)
- A nivel postraduccional: regula la actividad y la estabilidad de las proteínas (figura 2D).

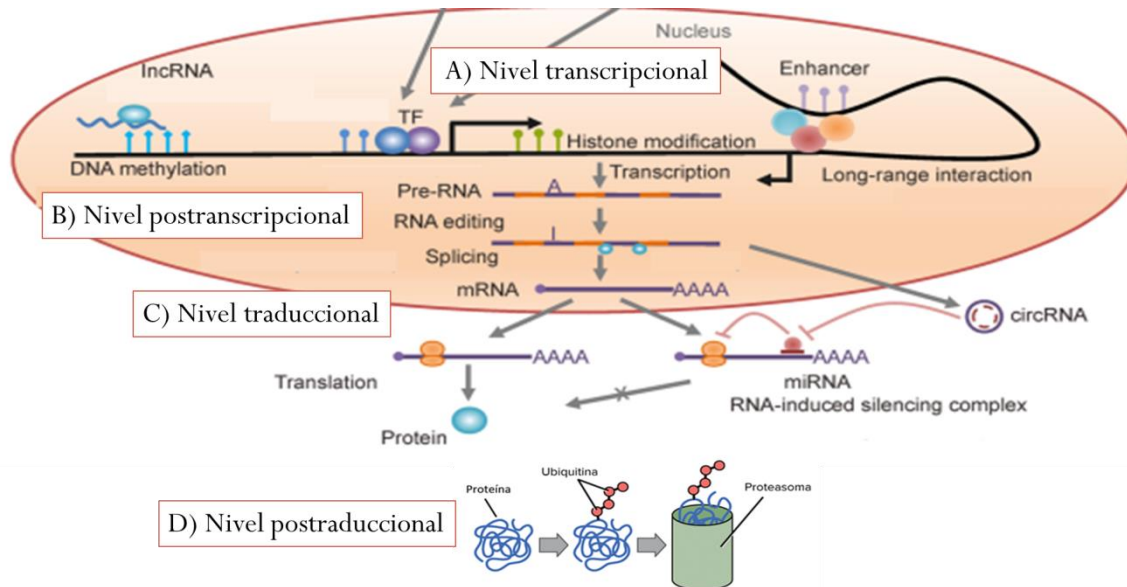


Figura 2. Niveles de regulación de la expresión de genes, en el siguiente esquema se representan los diferentes niveles de regulación de la expresión de genes, A) a nivel transcripcional se determina que genes se deben de transcribir y con qué frecuencia, a nivel de procesamiento B) se identifica a los mRNA que deben de ser madurados y unirse a los mRNA celulares, a nivel traduccional C) regula que mRNA debe de ser traducido con qué frecuencia y por cuanto tiempo, a nivel postraduccional D) se determina la longevidad de las proteínas. Figura tomada y modificada de (Jing Qin, *et al.*, 2016)

Regulación a nivel transcripcional

El control de la transcripción es llevado a cabo por un conjunto de proteínas llamadas factores de transcripción (FT), estos se pueden dividir en dos grupos: los FT generales, los cuales se unen a sitios centrales en los promotores y la RNA polimerasa, activando la transcripción, por otra parte están los FT de secuencia específicos, son factores que se unen a sitios reguladores de genes particulares, estos pueden actuar como activadores transcripcionales, activando o inhibiendo la transcripción del gen adyacente, los genes individuales están generalmente controlados por diversos sitios reguladores de DNA, que se unen con diferentes FT, mientras un factor de transcripción se puede unir a numerosos sitios alrededor del

genoma, controlando la expresión de una gran cantidad de genes. Cabe recalcar que cada tipo de célula tiene un patrón de transcripción característico, el cual está determinado por los FT contenidos en esa célula. Generalmente para dar inicio a la transcripción se requiere la unión de múltiples FT, la expresión de los mismos dependen de condiciones externas e internas, las cuales le indican a la célula que factores son necesarios para que estos sean transcritos (Rodwell *et al.*, n.d.)

Los factores de transcripción regularmente tienen dos sitios, uno de unión a DNA y otro dominio de activación, entre los sitios más importantes de unión a DNA se encuentran los dedos de zinc (zinc finger proteins), involucrados en procesos críticos, incluido la regulación de la transcripción, unión a RNA, regulación de apoptosis e interacción proteína-proteína, se dividen en diferentes tipos basados en el número y orden de residuos de Cys (cisteína) y His (histidina), el tipo C2H2 es el más común y más abundante en eucariotas, en *Arabidopsis* el $\approx 0.7\%$ de los genes tienen este dominio (Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008). El dominio hélice-asa-hélice se caracteriza por la unión de dos segmentos helicoidales unidos por una asa (HLH), una de las características principales de este dominio es que las proteínas que lo presentan se encuentran comúnmente como dímeros, los FT con dominio HLH desempeñan un papel clave en la diferenciación de tejidos (Janet-Iwasa, Marshall-Wallace., 2018). Finalmente, el dominio zipper leucine (bZIP, cremallera de leucina) se han identificado 75 miembros de proteínas que contienen este dominio en *Arabidopsis*, además se ha descrito que este dominio se encuentra involucrado en la defensa de patógenos, estrés y señalización de luz, maduración de semillas y desarrollo de flores (Jakoby *et al.*, 2002). La mayoría de los factores de transcripción se unen a diferentes regiones, existe la región promotora basal o mínima, en la cual encontramos elementos como la caja TATA la cual determina el sitio de inicio de transcripción (Loganatharaj *et al.*, 2006), caja CAAT (NFI) y CG (SPI) las cuales regulan la frecuencia con la cual se une POL II (Laloum *et al.*, 2013). La región promotora basal es donde se ensambla el complejo de pre-iniciación de la transcripción, se une la RNA polimerasa II así como Factores Generales de la

Transcripción (GFT). La expresión de la mayoría de los genes no solo está determinada por cajas o FT, existen también elementos potenciadores que se pueden encontrar corriente arriba, corriente abajo o invertidos del sitio de inicio de la transcripción, tienen múltiples sitios de unión, algunos potenciadores se pueden encontrar a cientos de pares de bases del gen que regulan, esto se logra gracias a que los promotores y potenciadores se pueden acercar debido a la capacidad del DNA intermedio de doblarse y permitir la interacción (Alexander P. *et al.*, 2017). Tanto los FT como los potenciadores necesitan de intermediarios que ayuden a realizar su función, estos se nombran como coactivadores, los coactivadores son grandes complejos que tienen diversas subunidades (Yankulov, 2015), se dividen en dos grupos importantes, los que interactúan con los GFT y la RNA polimerasa II, uno de los ejemplos es TFIID complejo coactivador el cual tiene a TBP (TATA binding protein) como proteína principal, otro coactivador que se une a los FT y potenciadores es el complejo mediador el cual es requerido por una amplia cantidad de activadores transcripcionales, por otra parte existe los coactivadores que interactúan con la cromatina haciendo que el DNA sea accesible o inaccesible. (Yankulov, 2015)

Activación y Represión de la transcripción

Como se mencionó anteriormente existen coactivadores que interactúan con la cromatina modificando su conformación y haciendo accesible o inaccesible al DNA, los coactivadores tienen diferentes dominios por lo que su modo de acción es diferente, algunos actúan metilando el DNA, otros afectando la estructura de los nucleosomas por medio de la modificación de las histonas (Yankulov, 2015).

Metilación del DNA

La metilación del DNA ocurre cuando en la posición 5' de la citosina ocurre una adición de un grupo metilo (CH₃) (Robertson, 2005), causando la condensación del DNA. La metilación del DNA es un proceso que se encuentra conservado tanto en animales como plantas (Zhang *et al.*, 2018). Las proteínas encargadas de realizar estas modificaciones son las metiltransferasas, las cuales ocupan el grupo metilo de

la *S-adenosilmetionina* para realizar la metilación (X. J. He *et al.*, 2011). En plantas la metilación ocurre en la citosina específicamente en las que se encuentran dentro de secuencias consenso como CG, CHG y CHH (H representa a A, T o C) (Lister R *et al.*, 2008). La metilación del DNA es crucial para el desarrollo y la respuesta a estrés en plantas con genomas complejos; la alteración de la metilación del DNA puede provocar anomalías en el desarrollo, en la maduración del fruto y causa letalidad del embrión (Zhang *et al.*, 2018). En *Arabidopsis* los sitios con mayor concentración de metilación son los transposones y las secuencias repetidas de DNA (Henderson & Jacobsen, 2007), como consecuencia estos sitios se encuentran en estado de heterocromatina, evitando la transcripción de estos genes. La metilación *de novo* en plantas, esta intermediada por la maquinaria de metilación del DNA mediada por RNA (RrDM). En esta ruta se encuentran involucrados los RNAs de interferencia (siRNAs) los cuales abordaremos con mayor detalle más adelante. La metilación *de novo* tiene dos vías, una vía dependiente de POL IV la cual genera RNAs no codificantes (P4 RNAs), los que sirven como templado para la producción de un RNA de doble cadena por medio de RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2), los RNAs de doble cadena son cortados por DICER-LIKE PROTEIN (DCL3, DCL2 o DCL4) obteniendo como resultado pequeños RNAs de 24 nucleótidos llamados siRNAs, estos se unen a la proteína ARGONAUTA 4 (AGO4) o AGO6. Los siRNAs-AGO se unen por complementariedad a RNAs diana transcritos por POL V o POL II, ambos complejos reclutan a dominios DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2), el cual metila el DNA. La segunda vía de metilación *de novo* se da mediante la participación de POL II, en esta vía también se obtienen siRNAs de diferentes tamaños y participan proteínas como las DCL3, DCL4, DCL2, AGO4, o AGO6, algunos de los moldes que son utilizados para la síntesis de siRNAs son transposones (Matzke & Mosher, 2014). Cuando ya se tienen las marcas de metilación en el DNA, es necesario que exista una maquinaria que ayude a heredar estas señales a través de las múltiples divisiones celulares. El tipo de mecanismo de acción y proteínas (Zhang *et al.*, 2018) depende de la secuencia consenso donde se realizó la metilación, por ejemplo, la metilación en la secuencia CG es mantenida

gracias a la proteína METILTRANSFERASA 1 (MET1) ortóloga de la metiltransferasa DNMT1 en animales (Kankel *et al.*, 2003). Por otra parte, la secuencia consenso CHG es conservada gracias a la proteína Cromometilasa 3 CMT3 en menor medida por CMT2 (Stroud *et al.*, 2014), mientras que la secuencia CHH es mantenida por dos diferentes proteínas, en regiones ricas en transposones cortos y transposones evolutivamente jóvenes la proteína DRM2 por medio de la proteína RdDM es la encargada de mantener la metilación, por otra parte en regiones con heterocromatina unida a H1 la encargada de conservar la metilación es la proteína CMT2 (Zemach *et al.*, 2013).

La metilación puede ocurrir en diferentes regiones del DNA, en la región promotora o dentro del cuerpo del gen, la metilación en la región promotora inhibe la transcripción al impedir la unión de activadores de la transcripción o promoviendo la unión de represores, (Domcke *et al.*, 2015) aunque se ha descrito que en algunos casos la metilación de DNA en regiones promotoras pueden promover la transcripción como el caso del gen *ROS 1* (REPRESSOR OF SILENCING 1) así como cientos de genes involucrados en formación de fruto en tomate (Williams *et al.*, 2015). La presencia de promotores metilados se encuentra relacionada con la presencia de transposones cercanos y secuencias repetidas en *A. thaliana*, solo el 5% de los genes están metilados en regiones promotoras, mientras que en plantas de cultivo con DNA más complejo, tienen una mayor cantidad de transposones por lo cual tienen una mayor cantidad de promotores metilados. Se ha encontrado que la metilación del DNA tiene dos funciones principales dentro de la célula vegetal, silenciamiento de transposones así como influencia en las interacciones cromosómicas (Zhang *et al.*, 2018).

Los niveles de metilación de DNA en los diferentes tejidos y células son controlados durante el crecimiento y desarrollo de plantas jugando importantes roles en la fisiología de la planta.

La metilación del DNA se encuentran involucrada en el desarrollo del embrión y endospermo (Choi *et al.*, 2002), en los procesos de vernalización y rigor hídrico

(Groszmann *et al.*, 2011) así como en la maduración del fruto (Zhong *et al.*, 2013), también se ha descrito que los niveles de metilación de DNA cambia durante el desarrollo de las hojas, lo cual ayuda a dirigir la expresión específica de ciertos genes en maíz (*Zea mays*) (Tolley *et al.*, 2012). Por otra parte también se encontró que la metilación de DNA participa en la respuesta a estímulos ambientales, como estrés biótico y abiótico (Zhang *et al.*, 2018).

Remodeladores de la cromatina

Como se mencionó anteriormente la metilación de DNA no es el único método de regulación transcripcional, esta regulación también se puede ejercer por medio de la modificación estructural de las histonas remodelando a la cromatina, esta se puede llevar a cabo por modificaciones químicas en la cola N-terminal modificando la estructura y cambiando su función (Rodwell *et al.*, n.d.). Las células tiene una gran variedad de enzimas que pueden agregar o eliminar grupos químicos de residuos de aminoácidos específicos en las colas de histonas, en la figura 3 se muestran los aminoácidos vulnerables a alguna modificación como la metilación, acetilación fosforilación o ubiquitinación, a esto se le conoce como código de histonas el cual postula que; “El estado y la actividad de una región en particular de la cromatina depende de las modificaciones específicas, o combinación de modificaciones en las colas de las histonas” (Yankulov, 2015), estas modificaciones pueden actuar de dos maneras: i) Los residuos modificados pueden funcionar como blanco de diversas proteínas no histónicas las cuales determinan la estructura de la cromatina, ii) los residuos modificados perturban la interacción entre las colas de histonas vecinas o con el DNA, influyendo en la estructura de la cromatina, estas modificaciones afecta a los nucleosomas ya sea; i) desplazando el nucleosoma liberando o encerrando sitios de unión de las RNA polimerasas, ii) provocando cambios conformacionales en los nucleosomas, iii) promoviendo el intercambio de histonas que conforman al octámero o iv) causando la disociación del octámero con el DNA, estas modificaciones de la cromatina puede causar una compactación en la cromatina o hacer la cromatina laxa esto puede estimular o inhibir la transcripción, estas alteraciones son causadas no solo por el tipo de modificación, también por el lugar

donde se lleva a cabo y por el mecanismo que la causo. Es importante mencionar que no solo las modificaciones químicas en las histonas pueden causar alteraciones en la estructura de la cromatina, en *Arabidopsis* se han descrito diversas proteínas, que participan en la remodelación de la cromatina tienen diversos métodos de acción y participan en diversos procesos (Yankulov, 2015)

Algunas de las modificaciones químicas que se han encontrado son la metilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1) en regiones “Enhancer”, la triple metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) en regiones promotoras y la triple metilación en lisina 36 de la histona 3 (H3K36me3) son algunos ejemplos de marcas positivas que promueven la formación de eucromatina (cromatina relajada) permitiendo la transcripción. Por otra parte, están las marcas negativas de la transcripción como la triple metilación de la lisina 27 en histona 3 (H3K27me3) en regiones de “genes cluster” la cual provoca una compactación de la cromatina formando heterocromatina facultativa, mientras que la triple metilación en lisina 9 en histona 3 (H3K9me3) en regiones de genes repetidos promueve la formación de la heterocromatina constitutiva (Yankulov, 2015) figura 3B. Uno de los complejos que participan en la remodelación de la cromatina es POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PCR2).

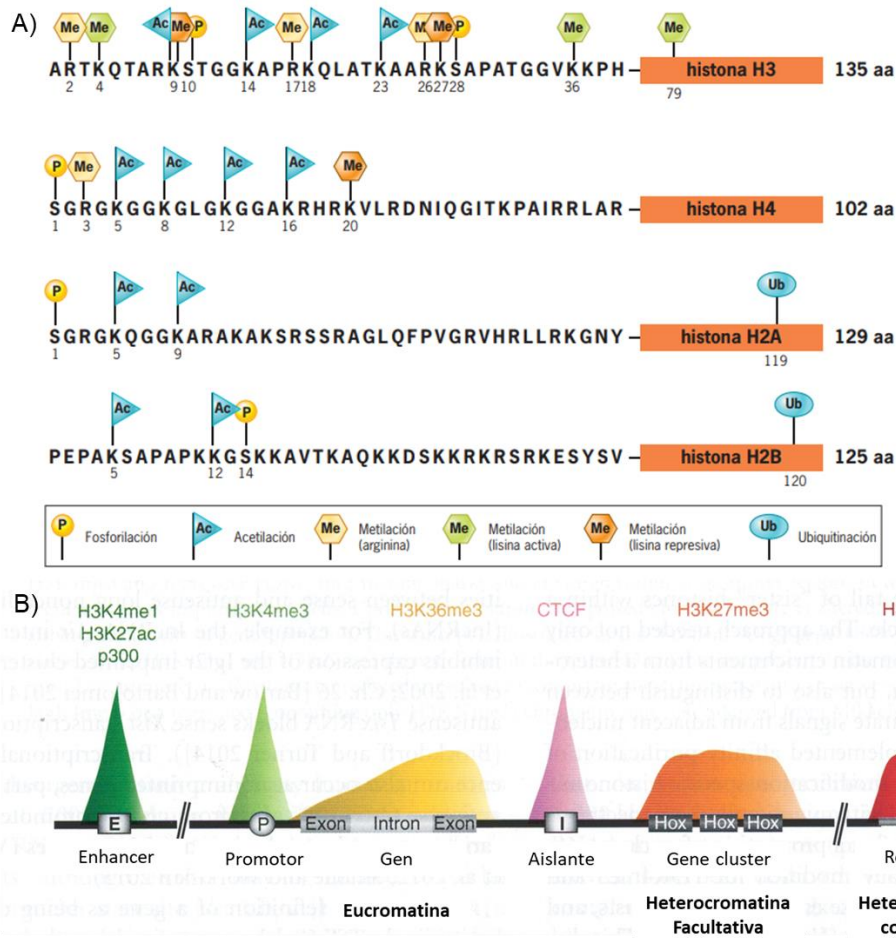


Figura 3. Marcas de modificación en las histonas, en A) se muestra el código de histonas donde se muestran los residuos que pueden ser afectados por diferentes modificaciones químicas como la fosforilación, ubiquitinación y acetilación, en B) mapa epigenómico donde se muestran en que regiones se llevan a cabo las modificaciones químicas dentro del DNA y que tipo de cromatina se va a generar. Imágenes tomadas y modificadas de (Yankulov, 2015 y Janet- Iwasa, Marshall-Wallace., 2018).

POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX

Es un grupo de proteínas (PcG) que inicialmente fue identificado en *Drosophila*, se sabe que Polycomb regula y suprime los genes homeóticos (*Hox*). En plantas este complejo se encuentra conservado además es responsable de la H3K27me3 como en los animales. Es importante indicar que PcG está compuesto por dos complejos PCR1 y PCR2, cada subunidad en los complejos PcG de *Drosophila* tiene varios

equivalentes homólogos en *Arabidopsis*. PCR1 está compuesta por diferentes proteínas como se muestra en la tabla 1 que tienen diferentes funciones, como la ubiquitinación en lisina 118 en la histona H2A (H2AK118ub) así como proteínas que se unen al DNA permitiendo una mayor compactación y dificultando la unión de factores de activación de la transcripción (Geisler & Paro, 2015). Como anteriormente se mencionó PCR2 está compuesto por proteínas que tienen dominio SET y participa en la triple metilación así como proteínas de unión a DNA que permiten la interacción y metilación inhibiendo de esta manera la transcripción de los genes que se encuentran alrededor.

Tabla 1 Componentes del complejo POLYCOMB en *Arabidopsis*

Subunidad	Complejo	Homólogo en plantas	función
Pc	PCR1	LHP1	Tiene unión a sitio H2K27me3
PcS	PCR1	AtBMI1a/b	Proteína con dominio Zinc finger, sitio de unión a DNA
Ph	PCR1	VRN1/EMF1	Tiene dominio Zinc finger SAM el cual promueve la auto asociación
Sce	PCR1	AtRING1a/b/c	E3 ubiquitin ligasa monouniquitina la lisina 118 histona H2A
E(z)	PCR2	CFL;SWN;MEA	Dominio SET metilación H3k27
Su(z) 12	PCR2	FIS;EMF2;VRN2	Potencia la actividad de E(z)
Esc	PCR2	FIE	promueve la interacción proteína-proteína
P55	PCR2	MSI1"5	Interacciona con Su(z) y las histonas

Como se observa en la tabla 1, PCR2 puede estar constituido por alguna de las tres proteínas con dominio SET, este dominio es esencial para realizar la metilación. Estas proteínas se utilizan en diferentes etapas del desarrollo en plantas, durante el desarrollo de gametofito, de la semilla y la germinación podemos encontrar PCR2 formados con las tres proteínas CURLY LEAF (CFL), SWINGER (SWN) y MEDEA (MEA), durante el crecimiento vegetativo, transición a planta reproductiva y la formación de flores, se encuentran presentes solo dos proteínas CFL y SWN. Es importante mencionar que no son las únicas proteínas que varían en el complejo de PCR2 igual que MEA FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2) solo participa

en la etapa de desarrollo de la semilla, VERNALIZATION 2 (VRN2) se encuentra presente únicamente durante el crecimiento vegetativo y transición a planta reproductiva, finalmente EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2) está involucrado en únicamente etapa reproductiva, esto indica que estas proteínas participan de manera fundamental en estos procesos. Figura 4 (Butenko & Ohad, 2011).

Como se mencionó anteriormente la regulación de PCR2 depende de las proteínas que lo componen, el complejo VRN2-PCR2 el cual está compuesto por VRN2, FIE, MSI1 y CFL, participan en el inicio de la floración después de la vernalización (proceso de floración acelerada por el frío), por medio del silenciamiento del gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, este gen es un represor por lo que su silenciamiento concluye en la floración (De Lucia *et al.*, 2008).

El complejo EMF2-PCR2, está compuesto por EMF2, CFL/SWN, FIE, MSI1 regula la transición de fase vegetativa a fase reproductiva, esto al regular la expresión de los genes *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)* y *FLOWERING TIME (FT)* genes involucrados en la floración, se ha encontrado que las mutantes *cfl* y *emf2* tienen como resultado una floración precoz y expresión ectópica de genes *AG APETALA 1 (AP1)*, *AP3* Y *PISTILATA (PI)* (Goodrich, Justin *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2001). Por otra parte el complejo EMF2-PCR también puede regular FLC independientemente de la vernalización (Y. Wang *et al.*, 2014). PCR2 no solo está involucrado en los procesos anteriormente mencionados, también se encuentra regulando la expresión de factores de transcripción los cuales promueven la reproducción de células madre del meristemo apical (SAM) como WUS (WUSCHEL), (Barton, 2010), la familia de genes *KNOTTED 1-LIKE HOMEODOMAIN (KNOX)* como *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, *BREVIPEDICELLUS (BP)*, *KNOTTED 1-LIKE1 (KNAT1)*, *KNAT2*, *KNAT6 ASYMMETRIC LEAVES 1 (AS1)* y *AS2* se han descrito como genes de alta importancia para el mantenimiento de las actividades de SAM, se encuentran igualmente regulados por PCR2 al interactuar con CFL, FIE y EMF2 (Yan *et al.*, 2020). Además de participar en la regulación de genes involucrados con SAM, también se encuentra presente en la regulación del meristemo apical de la raíz

(RAM), durante el desarrollo embrionario y en la maduración del embrión (Yan *et al.*, 2020). Se sabe que para realizar la regulación de PCR2 sobre algunos de los procesos anteriormente descritos se necesita la participación de diferentes proteínas; sin embargo, se han encontrado diferentes moléculas implicadas en la regulación por medio de PCR, una de estas moléculas son los RNAs no codificantes.

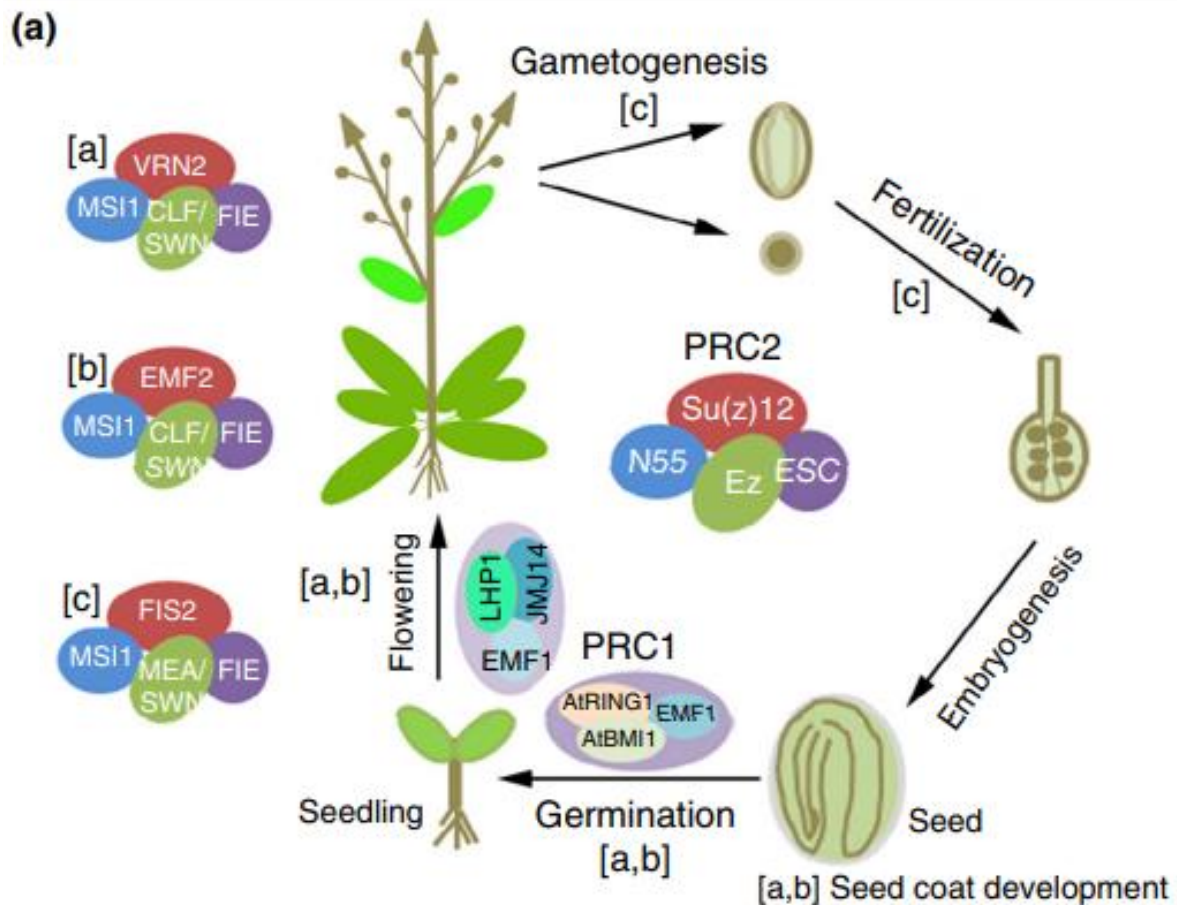


Figura 4. Regulación de PCR2 en las diferentes etapas del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*.

En esta figura se observa como una de las proteínas centrales de PCR2 como CLF, presenta intercambios con otras proteínas homólogas como SWN y MEA a lo largo del desarrollo. Figura tomada (Xiao-Wagner, 2015).

RNAs no codificantes

Los RNAs no codificantes son (ncRNAs) RNAs que son transcritos pero no sufren el proceso de traducción. Anteriormente se creía que estos RNAs no tenían función; sin

embargo, se ha encontrado que son moléculas de gran importancia dentro de la regulación de la expresión de genes, participan en la regulación transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. Estudios en el transcriptoma, han revelado que el genoma de plantas, hongos y animales contiene aproximadamente un 90% de RNAs no codificantes (ncRNAs) (Chekanova, n.d.,2015). Los ncRNAs se clasifican principalmente en dos tipos, los llamados “housekeeping”, los cuales se caracterizan por su alta tasa de transcripción y su conservación en la mayoría de los organismos, los RNAs ribosomales (rRNAs), RNAs de transferencia (tRNAs), RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) pertenecen a este grupo (Sun *et al.*, 2018). Por otro lado, diversos ncRNAs tienen la capacidad de regular la expresión de genes, a estos se les nombra como ncRNAs “Reguladores” y se clasifican principalmente por su longitud como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los RNAs no codificantes

	Largos no codificantes (<i>lncRNA</i>)	Intermedios no codificantes (<i>inmcRNAs</i>)	Pequeños no codificantes (<i>SmallRNAs</i>)
Tamaño	>200 nt	31-200nt	18-30 nt
Polimerasa	Pol II, IV y V en plantas	Pol II	Pol II y III
Poli A	Si	No	Si

En este proyecto nos enfocaremos principalmente en los smallRNAs y en los lncRNAs.

Pequeños RNAs (smallRNAs)

Se han descrito diversos smallRNAs que se encuentran regulando etapas importantes del desarrollo en diversos organismos, en plantas se ha encontrado que los smallRNAs participan en diverso procesos como el desarrollo, reproducción y

reprogramación genómica así como otros procesos importantes. Se clasifican en diferentes clases según el nivel de regulación que realicen, los microRNAs (miRNAs) que derivan de un harpin siRNAs (hp-siRNAs) y los smallRNAs interferente (siRNAs) antisentidos naturales (natsiRNAs) llevan a cabo su regulación a nivel postranscripcional, principalmente; los siRNAs-secundarios participan a nivel transcripcional y postranscripcional, finalmente los siRNAs-heterocromaticos (hetsiRNAs) participan en la metilación del DNA por lo que solo regulan a nivel transcripcional. Los smallRNAs se diferencian principalmente por su biogénesis y procesamiento, esto se debe a las diferentes proteínas que participan durante estos procesos como se muestra en la figura 5 (Borges & Martienssen, 2015).

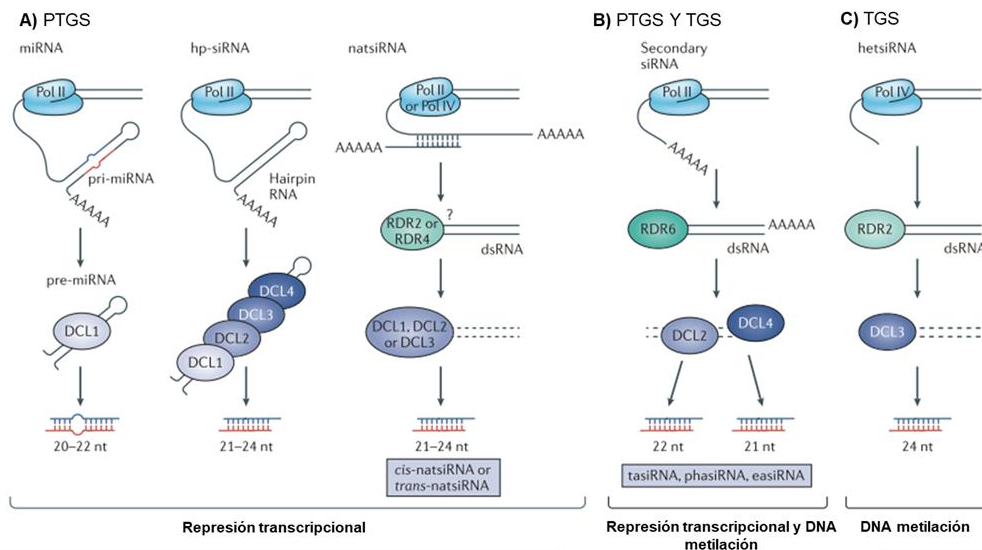


Figura 5 Clasificación de smallRNAs en plantas, biogénesis y función. En A) se encuentran los smallRNAs involucrados en la regulación postranscripcional (PTGS), en B) los involucrados en la regulación postranscripcional y transcripcional (PTGS y TGS), en C) los involucrados solo en regulación transcripcional (TGS), por medio de la metilación del DNA. (Borges & Martienssen, 2015).

microRNAs en plantas (miRNAs)

Los miRNAs es el grupo más amplio de *smallRNAs* en plantas, una gran parte de los genes *MIR* son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA-POL II), su biogénesis es

iniciada por la unión de TBP (TATA-Binding protein) a la caja TATA ubicada en la región promotora del *MIR*, esta interacción promueve la unión de algunos factores de transcripción (TF), así como proteínas que promueven la transcripción (Figura 6A). (Yu et al., 2017) El transcrito es nombrado como pri-miRNA, el cual presenta modificaciones en la región 5' como la adición del 7-metilguanosina "Cap", una poliadenilación en la región del 3' y pueden estar sujeto a *splicing*, como es lo habitual para RNAs mensajeros (Figura 6B). El pri-miRNA es procesado por una RNasa tipo III conocida como DICER-like (DCL), en una estructura tallo-asa de menor tamaño nombrada como pre-miRNA, (Figura 6C), posteriormente por la misma DCL el pre-miRNA es procesado a un RNA de doble cadena (dsRNA) conformado por 17-25 nt, el dsRNA es estabilizado en la región 3' por una 2'-O-metil por medio de una metil-transferasa HUA ENHANCER1 (HEN1), todos estos procesos ocurren en el núcleo (Figura 6D). La estructura de dsRNA, es transportado al citoplasma por medio de un homólogo a Exportina 5, HASTY (HST) (Rogers & Chen, 2013).

Fuera del núcleo, la proteína AGO, miembro principal del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), separa el dsRNA en dos cadenas sencillas de RNA, las cuales se nombran como cadena guía (con función biológica) y la cadena pasajera. La cadena guía se une por complementariedad a su mensajero blanco donde lleva a cabo su función mediante el secuestro o escisión de este (Figura 6) (Rogers & Chen, 2013).

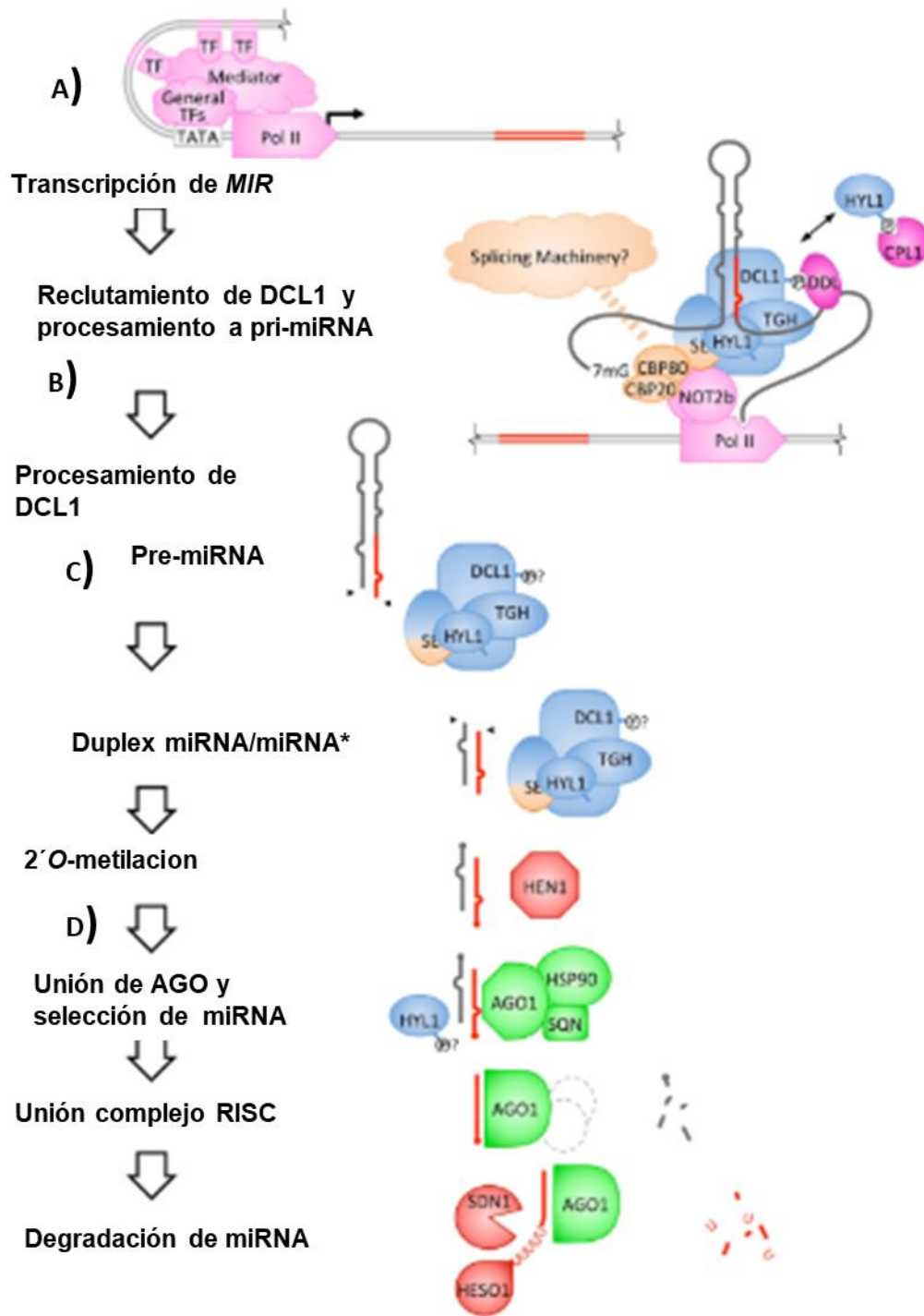


Figura 6 Biogénesis y procesamiento de miRNAs en plantas. En la ilustración se muestra la biogénesis y procesamiento de los miRNAs, en A), muestra la transcripción de los genes *MIR* por medio de la polimerasa II, B), se muestra el transcrito primario Pri-miRNA, las modificaciones que

presenta, y las proteínas involucradas en su procesamiento como; DICER LIKE1 (DCL), SERRATA (SE), HYPONASTICLEAVES1 (HYL1) y TOUGH, C), se ilustra el procesamiento de pri-miRNA a pre-miRNA por medio de DCL1, D), se muestra la metilación del dsRNA por medio de la metil transferasa HEN1, así como su transporte a citoplasma y la unión de ARGONAUTA1 (AGO1) al miRNA maduro. Figura tomada y editada de (Rogers & Chen, 2013).

Se han descrito diversas familias de miRNAs involucradas en la regulación del desarrollo de hojas en *Arabidopsis thaliana*, algunas de ellas son: la familia miR164 el cual es un regulador negativo de la proteína CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON 2), a su vez este factor regula procesos importantes como el desarrollo y formación de aserraciones en el margen de la hoja (Byrne, 2012; Nikovics *et al.*, 2006), por otra parte en maíz se ha descrito que se encuentra involucrado en el desarrollo floral y en la filotaxia de las hojas (Zheng *et al.*, 2019).

La familia de los miR165/166 tiene como genes blancos factores de transcripción de la familia *HD-ZIP III* (PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV), REVOLUTA (REV), ATHB-8 y ATHB-15) se han descrito que participan en la organización, polaridad y desarrollo del meristemo apical (SAM), así como en el desarrollo embrionario, además regulan la señalización dependiente de auxina y ABA (T. Yang *et al.*, 2019).

Por otra parte, la familia de los miR396, tienen como mensajeros blanco a la familia de factores de transcripción GFRs (GROWTH REGULATING FACTORS), en dado caso los miR396 funcionan como reguladores negativos de la proliferación celular, controlando el tamaño de órganos como hojas y raíz (Rodriguez *et al.*, 2010). Contrariamente la familia del miR319, el cual es un regulador positivo de la proliferación celular, al tener como gen blanco a la familia de factores de transcripción TCPs. Los TCPs activan reguladores negativos de la proliferación celular como el miR396 descrito anteriormente (Schommer *et al.*, 2014).

Finalmente, el miR156 regula el cambio de fase vegetativa por medio de la regulación de los factores de transcripción SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE), sus niveles de expresión disminuyen conforme la planta madura a una planta adulta. Por otro lado, su expresión también se ve modificada por agentes

exógenos como la temperatura, inanición de fósforo, concentración de CO₂ y azúcares. Por otro lado, el miR159 regula negativamente la expresión del miR156, al inhibir la expresión del factor de transcripción MYB33 (Guo *et al.*, 2017; L. Yang *et al.*, 2011) Figura 7.

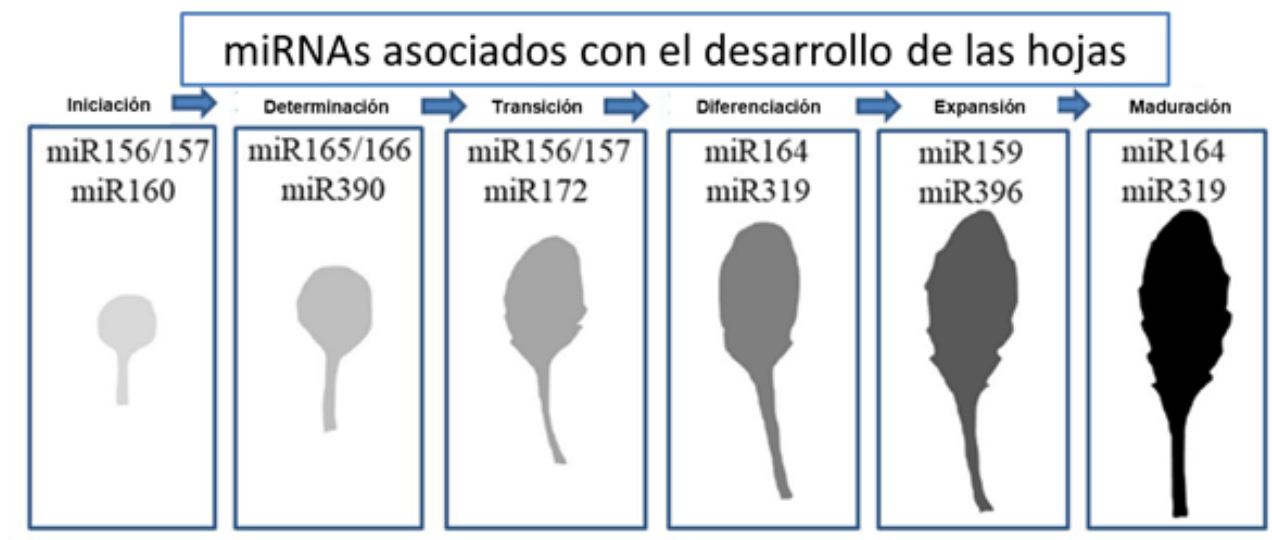


Figura 7. miRNAs involucrados en el desarrollo y morfogénesis de hojas en *Arabidopsis thaliana* En esta ilustración se muestra el desarrollo diferencial entre el crecimiento de diferentes hojas de roseta de *Arabidopsis*. Imagen tomada y modificada de (T. Yang *et al.*, 2019).

RNAs largos no codificantes

Los lncRNAs tienen una longitud mayor de 200nt, son transcritos principalmente por RNA-Pol II, aunque en plantas puede ser que RNA-Pol IV y V los transcriban (Yu *et al.*, 2019) (Tabla 2). Estos pueden ser clasificados según su localización en el genoma, los Transcritos Antisentido Naturales (lncNATs), inician en la región 3' de un gen codificador, se transcriben en antisentido 3'-5' y se empalman mínimamente con un exón de un gen codificador. Por otra parte, existen lncRNAs que se encuentran codificados en la región 5' y se transcriben en sentido 5'-3'. Los lncRNAs intrónicos, se encuentran codificados dentro de intrones en cualquier dirección no sobrepone a exones, los lncRNAs promotores se encuentran en una región promotora de un gen codificante, pueden ser en sentido o antisentido, los lncRNAs Intergénicos (lincRNAs) están codificados entre dos genes codificantes con

1kb de distancia entre los genes además su transcripción es independiente (Figura 8) (Shafiq *et al.*, 2016).

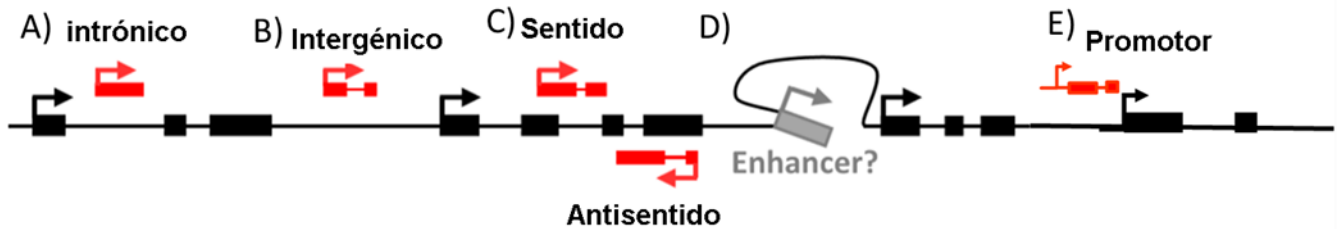


Figura 8. Clasificación de lncRNAs. En la figura se muestra los diferentes tipos de lncRNAs, en A) se muestran los RNAs intrónicos los cuales se encuentran codificados en una región intrónica, en B) se muestran lncRNAs que se encuentran codificados entre dos genes, en C) lncRNAs que se encuentran codificados en sentido o antisentido de un gen en D) lncRNA “enhancers” los cuales favorecen la transcripción de otro gen, E) lncRNA promotor, se localiza en la región promotora de un gen. Figura tomada y modificada de (Shafiq, Li, & Sun, 2016).

Los lncRNAs pueden tener una función regulatoria en diferentes etapas a lo largo del dogma central de la biología molecular como se había mencionado anteriormente. En animales, se han descrito algunos lncRNAs como el HOTAIR (transcrito en el *locus HOX C*) el cual interactúa físicamente con proteínas asociadas a complejos remodeladores de la cromatina como: PRC2, agregando marcas negativas de la transcripción como H3K27me3, inhibiendo así, la transcripción de los genes del cluster *HOXD* (Tsai *et al.*, 2010). Por otro lado, no solo se han descrito lncRNAs que interactúan con complejos remodeladores de la cromatina (Figura 9A), también se han descrito algunos lncRNAs que llevan a cabo su función regulatoria mediante la interacción con la POL II, inhibiendo la transcripción de otros genes (Figura 9B) (Mariner *et al.*, 2008). A nivel traduccional pueden participar mediante la unión del lncRNA con un mensajero blanco, interrumpiendo este proceso, como se muestra en la Figura 9E (Carrieri *et al.*, 2012).

Post-traduccionalmente se ha descrito que algunos lncRNAs tienen la capacidad de secuestrar miRNAs, inhibiendo la regulación del mensajero blanco (Figura 9F) (J. Wang *et al.*, 2010).

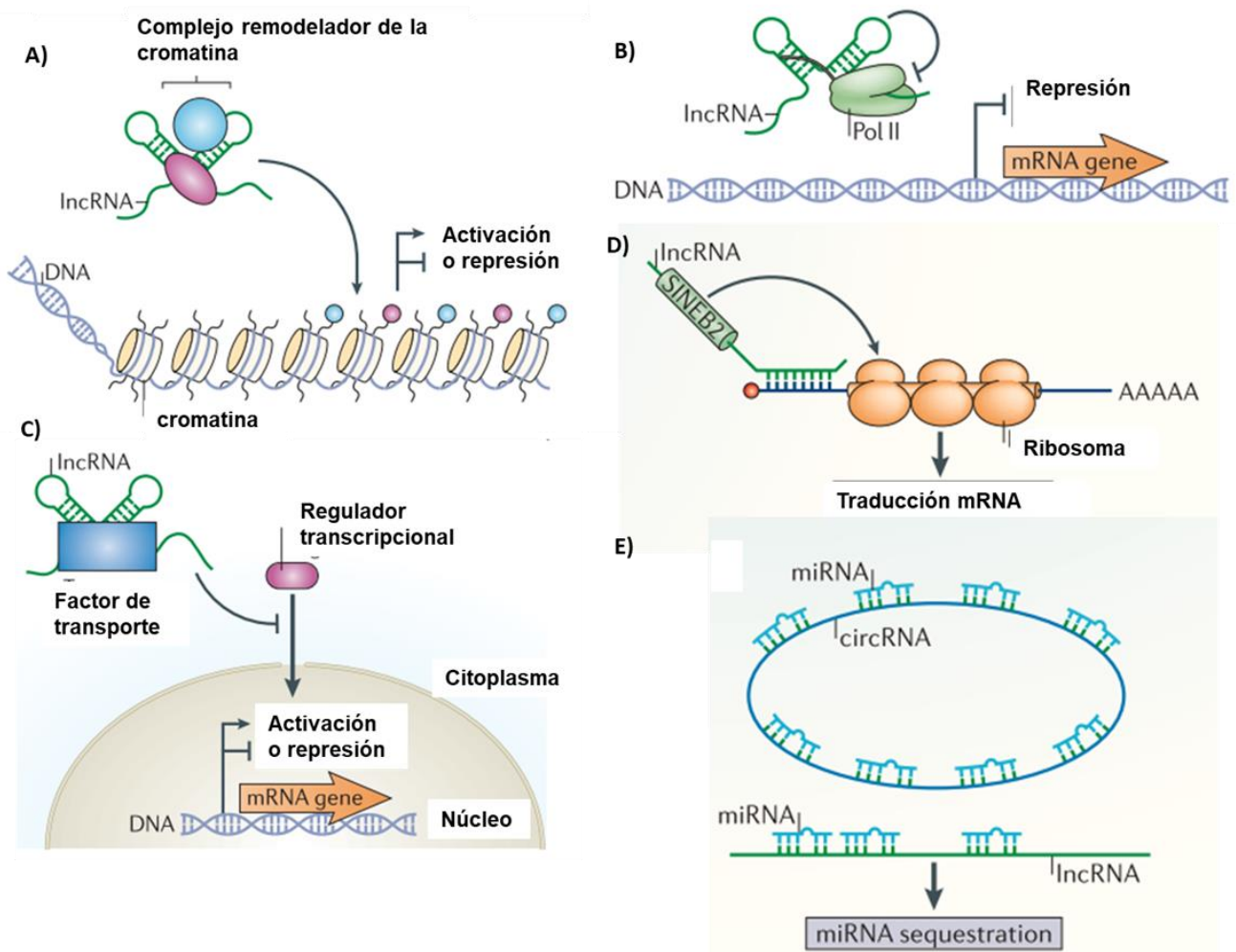


Figura 9. Mecanismos de regulación a diferentes niveles de algunos lncRNAs. Se muestran algunos mecanismos descritos de lncRNAs a diferentes niveles., A), se muestra la unión de algunos lncRNAs que interactúan físicamente con complejos modificadores de la cromatina activando o reprimiendo la transcripción de uno o más genes, B) se muestra la unión del lncRNA con la polimerasa II inhibiendo la función de la polimerasa, C) se muestra la interacción de lncRNAs con factores de transporte, inhibiendo el transporte al núcleo de factores de transcripción, D) se muestra la unión de un lncRNA a un RNA mensajero durante el proceso de traducción a proteína, deteniendo la traducción, E) se muestra un lncRNA el cual se puede unir a miRNAs, inhibiendo su unión con su gen blanco. Imagen tomada y modificada de (Geisler & Collier, 2013)

En plantas se han descrito diversos lncRNAs que participan en la regulación de genes involucrados en procesos importantes como el desarrollo, tiempo de floración y genes de respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos (Shafiq *et al.*, 2016), uno de los ejemplos más conocidos de lncRNAs en plantas son los lncRNAs *COOLDAIR* el cual es un lncRNA intrónico en antisentido y *COLDAIR* (*COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA*) lncRNA intrónico en sentido, ambos se encuentran codificados en el *locus* del gen FLOWERING LOCUS C (FLC), un potente represor de la floración. En época de frío los lncRNAs *COOLDAIR* y *COLDAIR* se transcriben, *COOLDAIR* se une a la desacetilasa FLD (FLOWERING locus D-like protein). Por otra parte, el lncRNA *COLDAIR* se transcribe y se une a CFL (CURLY LEAF) una metiltransferasa miembro de Polycomb Group (PcG), estas interacciones causan una condensación de la cromatina inhibiendo la actividad de FLC, causando la floración en primavera (Figura 10) (Y. He *et al.*, 2003; Heo & Sung, 2011; P. Li *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2019). Por otro lado, en *Arabidopsis* se han encontrado lncRNAs que tienen expresión diferencial bajo diferentes estreses (Di *et al.*, 2014); esto abre un gran panorama acerca de la caracterización de función de los lncRNAs en la regulación de genes involucrados en estrés y desarrollo.

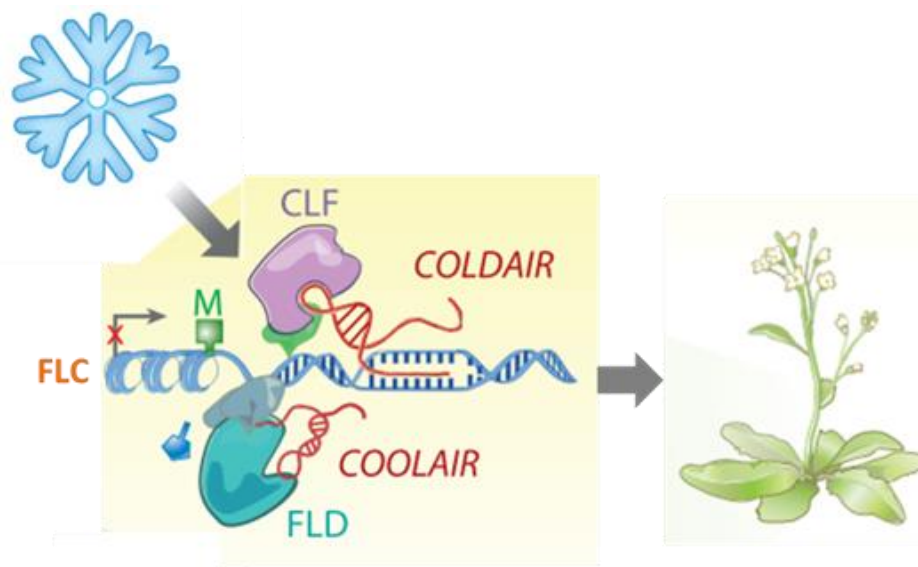


Figura 10. Mecanismo de silenciamiento de los lncRNAs COOLAIR y COLDAIR. *Flc* (flowering locus c) es un gen inhibidor de la floración, en condiciones de frío se transcriben dos RNAs largos no codificantes que se encuentran localizados en el intrón del gen *flc*, COOLAIR se une a la proteína desacetilasa FLD (FLOWERING locus D-like protein), por otra parte COLDAIR se une a la proteína CFL (CURLY LEAF) miembro de Polycomb, estas interacciones provocan modificaciones químicas y conformacionales, evitando la transcripción de *flc*, permitiendo que en primavera se lleve a cabo la floración. Figura tomada y modificada de (Yu *et al.*, 2019).

Capítulo II. Justificación

Las evidencias que se saben hasta el momento sobre la función biológica de los *lncRNAs* es escasa; sin embargo, han proporcionado y establecido otro nivel de regulación de la expresión de genes. La caracterización de los *lncRNAs* en cuanto a su compartimentalización subcelular, tamaño, modificaciones y orígenes genómicos puede proporcionar pistas sobre sus funciones (Kapranov., *et al*, 2007). Es por eso que por medio de estudios bioinformáticos se encontró en el cromosoma 1 de *Arabidopsis thaliana*, un posible *lncRNA* intergénico, el cual se sobreexpresa en condiciones de estrés al igual que los genes que se encuentran alrededor, lo que abre la posibilidad de que exista un grupo de *lncRNAs* que regulen la expresión de genes circunvecinos, es por eso que recobra gran importancia la caracterización de su función y es el fundamental interés en el presente trabajo.

Capítulo III. Hipótesis

“El RNA largo no codificante *LNCTATA*, participa en el óptimo desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”.

Capítulo IV Objetivo General.

Caracterizar la función regulatoria del RNA largo no codificante *LNCTATA* sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Capítulo V Objetivos específicos

- Generar y caracterizar líneas silenciadas de *LNCTATA* por medio de un microRNA artificial (amiR).
- Analizar la expresión de miRNAs y sus genes blanco en la quinta hoja (hoja 5) a diferentes días de crecimiento, en las líneas silenciadas y sobreexpresora de *LNCTATA*.
- Realizar y caracterizar la complementación de la línea de inserción (T-DNA).

Capítulo VII. Metodología

En el presente trabajo se utilizaron plantas que contienen diversas modificaciones genéticas (líneas) como: línea insercional de T-DNA, las líneas Ri, amiR y las líneas sobreexpresoras 35S: *LNCTATA*. Todas ellas fueron generadas en el fondo genético de Ecotipo Colombia 0 de *Arabidopsis thaliana*, de la misma manera las plantas silvestres (Wt) utilizadas en este trabajo fue de Ecotipo Colombia 0. El cultivo de las diferentes líneas comenzó con la germinación de las semillas en medio MS 0.5X con un pH de 5.7 durante dos semanas, se crecieron en sustrato “sunshine 3” con vermiculita y perlita en una proporción (3:1:1), en un fotoperiodo de día largo (16 horas luz, 8 oscuridad) a una temperatura de 22°C.

Las líneas de inserción *cfl-28* y *pol.v (nrpd1e-11)* se crecieron en medio MS 0.5X durante 3 semanas con un fotoperiodo de día corto (8 horas luz, 16 oscuridad) a 22°C.

Complementación de la línea de inserción de T-DNA

Se amplificó el lncRNA y su región promotora por medio de un PCR el plásmido binario pBA002a como el producto de PCR se sometieron a un tratamiento de digestión enzimática, utilizando la enzima de restricción XbaI (Thermo scientific), se precipitaron con acetato de amonio 10µM. El plásmido PBA002a/XbaI fue tratado con fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)) para evitar que se ligara nuevamente. Se realizó la reacción de ligación con el producto de PCR/XbaI - PBA002a/XbaI utilizando el kit T4 DNA ligase, posteriormente el producto de ligación

fue transformado en *E. coli* DH5 α y crecido en medio LB con espectinomicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se obtuvo una colonia positiva para el inserto, posteriormente el plásmido PBA002a-promIncTATA fue purificado mediante una Quick-DNA Miniprep Plus Kit (ZYMO RESEARCH). Se secuenció el plásmido para confirmar la clonación y direccionalidad, posteriormente el plásmido pBA002a-promIncTATA fue transformado en *Agrobacterium* C58, por medio del método floral dip (Xiuren Zhang., *et al*, 2006) se transformó en *A. thaliana* Col.0. Para la selección de plantas transformadas y la obtención de las homocigas se utilizó el análogo del herbicida BASTA L-Methionine sulfoximine (Sigma®) a 2.5 μM . Hasta el momento se seleccionaron 3 plantas independientes resistentes de las cuales sólo la línea 3 presentó segregación mendeliana, por lo que quedó pendiente la selección de más líneas independientes.

Transformación de las plantas pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS con la construcción pMDC32-amiRLNCTATA.

Las líneas reporteras pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS fueron donadas por el Laboratorio de Biología del ARN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) en Rosario, Santa Fe, Argentina.

El plásmido pMDC32-amiRLNCTATA fue utilizado para transformar las líneas reporteras pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS, por medio del método floral dip (Xiuren Zhang., *et al*, 2006). Para la selección de plantas transformadas con este vector y su fondo mutantes se utilizaron tanto higromicina y kanamicina para obtener las plantas transformadas tanto con pmiR396b-GUS-amiRLNCTATA, como con pwGRF2-GRF2-GUS-amiRLNCTATA.

Transformación de plantas pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS con la construcción 35s: LNCTATA

El plásmido pBA-DC-lincTATA-MYC, fue utilizado para transformar las líneas reporteras pmiR396b-GUS y pwGRF2-GRF2-GUS por medio del método de floral dip (Xiuren Zhang., *et al*, 2006). Para la selección de plantas transformadas se utilizó el herbicida L-Methionine sulfoximine (Sigma®) a 2.5 μM y el antibiótico kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Extracción de RNA

El tejido vegetal se homogenizó en nitrógeno líquido con TRIzol™ Reagent, se siguió el protocolo descrito por el fabricante y el RNA se resuspendió en formamida al 50%, se cuantificó la concentración del RNA por medio de un Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c Thermo Scientific™, finalmente se almacenó a -80°C, hasta su uso.

Síntesis de cDNA para mRNAs

El RNA analizado por gel para corroborar su integridad, fue utilizado a una concentración de 1µg/mL, se trató con DNAasa Thermo Scientific™ DNase I, RNase-free, posteriormente se sintetizó el cDNA con la enzima Promega M-MLV Reverse Transcriptase y oligo (dT) siguiendo las indicaciones del fabricante, el cDNA resultante se diluyó en agua MQ a 1:5. Para la validación del cDNA se realizó un PCR punto final con oligos para la amplificación de α -tubulina, para verificar la integridad de la muestra.

Síntesis de cDNA para miRNAs.

Para el análisis de miRNAs se sintetizó cDNA mediante el siguiente protocolo. Se utilizó RNA con una concentración de 0.8 µg/mL, la reacción se llevó a cabo por medio de la enzima mRQ (Mir-X miRNA First-Strand, Clontech Laboratories), para finalizar el cDNA se diluyó en agua MQ a 1:10. Para la validación de los cDNAs, se realizó un PCR con los oligos de U6 snRNA incluidos en el kit.

Cuantificación de la expresión relativa de genes por medio de RT-qPCR. Para la cuantificación de RNAs (\approx 200pb), se utilizó el SYBR Radiant™ Green 2X qPCR Mix Lo-ROX, Se utilizó la amplificación de α -tubulina como gen de referencia.

Para la cuantificación relativa de miRNAs se usó el mRQ 3' primer específico del kit y el oligo específico para cada miRNA, el oligo del gen *snU6* fue utilizado como gen de referencia y se encuentra incluido en el kit.

Para los análisis de amplificación en tiempo real, se utilizó el termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR (BIO-RAD).

El análisis tanto para los mensajeros y los miRNAs se realizaron por triplicado técnico por cada determinación. El programa de amplificación utilizado para ambas reacciones se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 . Programas de amplificación para los diferentes cDNAs utilizados

cDNAs ≈ 200pb	miRNAs 20-21 nt	
95°C 3 min	95°C 10 s	Desnaturalización
95°C 10 s	95°C 5 s	
60°C* 10 s	60°C* 20 s	X 40 ciclos
60°C 0.5 s	95°C 60 s	
95°C 5 s	95°C 55 s	Curva de disociación
	95°C 30 s	

Análisis estadístico

Para la analizar la expresión de miRNAs o RNAs largos se utilizó el gen de referencia *snU6n* o *α-tubulina* respectivamente. El análisis que se siguió fue el siguiente: el nivel de expresión fue calculado en relación a la expresión de *snU6* o *α-tubulina*, utilizando el comparativo del número de ciclo cuantificado (quantification cycle, Cq), método de $\Delta\Delta Cq = (Cq_{muestra} - Cq_{snU6 \text{ o } \alpha-tubulina})_{ZT X} - (Cq_{muestra} - Cq_{snU6 \text{ o } \alpha-tubulina})_{ZT Y}$, donde ZT x es cualquier ZT X y ZT Y representa 1X valor de expresión del gen a medir normalizado con el valor de Wt correspondiente. Se utilizó el software Prism-Graphpad para realizar los análisis estadísticos los cuales fueron ANOVA one-way y two-way con pruebas post-ANOVA Dunnett con un intervalo de confianza del 95%, así como pruebas T-test no paramétrica o múltiple t-test con un intervalo de confianza de 95% usando el método Holm-Sidak.

Expresión transitoria de GUS en líneas pmiR396b-GUS-35s:LNCTATA

Las líneas pmiR396b-GUS-35s:LNCTATA 1.1, 1.2 Y 1.7 de la T2 se sembraron en medio MS al 0.5%, con el herbicida L-Methionine sulfoximine (Sigma ®) y el antibiótico kanamicina a 50 µg/mL, así como semillas pmiR396b-GUS, se dejaron

crecer por dos semanas bajo condiciones control, a las dos semanas se tomaron las plántulas completas y se colocaron en solución X-Gluc (Buffer de fosfato de sodio pH7 1M, EDTA 100mM, ferrocianuro de potasio 5mM, ferricianuro de potasio 5mM, Triton X-100 al 1% y X-Gluc en DMSO 100mg/mL), se incubaron a 37°C por 16 hrs, las plántulas se lavaron dos veces durante 5 minutos con el buffer Z pH 4 (fosfato de sodio monobásico 40mM, fosfato de sodio dibásico 60mM, cloruro de potasio 10mM y sulfato de magnesio 1mM). Posteriormente, las plántulas se lavaron con etanol al 70% durante 15 minutos, 4 veces, la clorofila fue eliminada por medio de la solución acetona:metanol (1:3). Finalmente, con el buffer Z pH 4.0 las plántulas se lavaron 4 veces durante 5 min y se dejaron en glicerol al 50%, las plántulas se montaron en un portaobjetos con 50µl de glicerol al 50%.

Localización sub-celular del RNA *LNCTATA* en *Nicotiana benthamiana*

Para la localización sub-celular del *LNCTATA* se utilizaron dos construcciones las cuales se muestran en la figura 11 (Kinoshita *et al.*, 2018). Ambas construcciones fueron transformadas por separado en *Agrobacterium tumefaciens* C58, las *Agrobacterium* transformadas con estas construcciones fueron crecidas en placas medio LB con kanamicina a 50 µg/mL a 28 °C por tres días. Posteriormente, las colonias resistentes se analizaron por PCR para confirmar la transformación, las colonias positivas se crecieron en 500 mL de medio LB con kanamicina a 50 µg/mL a 28 °C en agitación, las colonias se centrifugaron a 4,000g por 10 minutos a 4°C, la pastillas fueron resuspendidas en un medio de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, y 100 µM acetosiringona) y se reposaron durante 3 h a temperatura ambiente. Las células resuspendidas se infiltraron en *Nicotiana benthamiana* con ayuda de una jeringa, después de tres días se observó la fluorescencia en un microscopio Confocal en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT), la longitud de emisión utilizada fue de 488-559/30nm por GFP y para mCherry 561-617/30

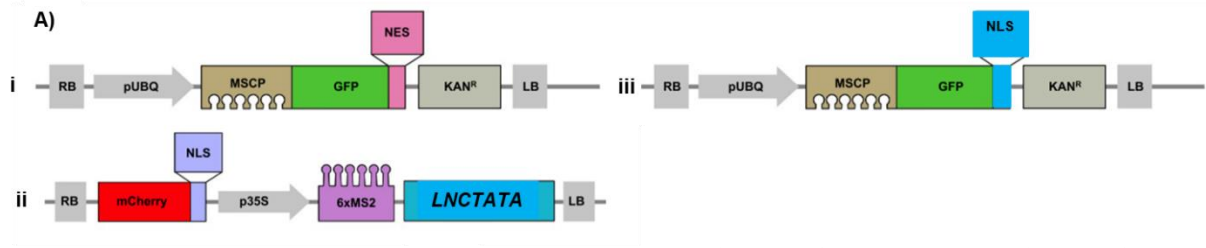


Figura 11. Localización celular de LNCTATA. En A) se muestran los vectores utilizados para este experimento, (i) vector con componente proteico, formado por MSCP (proteína que reconoce y se une a RNAs estructurados), el marcador visual GFP, NES (secuencia de exportación nuclear), pUBQ (promotor de ubiquitinas) RB (borde derecho) LB (borde izquierdo), KAN (gen de resistencia a Kanamicina), (ii) vector con componente RNA, formado por 6xMS2 (RNA estructurado reconocido POR MCSP), mCherry (marcador visual), NLS (secuencia de localización nuclear), p35S (promotor constitutivo) LNCTATA (RNA de interés). (iii) variante de (ii) con NLS. Figura tomada y modificada de (Kinoshita *et al.*, 2018)

Capítulo VIII. Anexos

Índice de figuras

Figura 1 Dogma central de la biología molecular y estructura del DNA.....	11
Figura 2. Niveles de regulación de la expresión de genes.....	13
Figura 3. Marcas de modificación en las histonas.....	20
Figura 4. Regulación de PCR2 en las diferentes etapas del desarrollo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 5 Clasificación de smallRNAs en plantas, biogénesis y función.....	25
Figura 6 Biogénesis y procesamiento de miRNAs en plantas.....	27
Figura 7. miRNAs involucrados en el desarrollo y morfogénesis de hojas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
Figura 8. Clasificación de lncRNAs.....	30
Figura 9. Mecanismos de regulación a diferentes niveles de algunos lncRNAs.....	31
Figura 10. Mecanismo de silenciamiento de los lncRNAs <i>COOLAIR</i> y <i>COLD AIR</i> . .	33
Figura 11. Localización celular de <i>LNCTATA</i>	41

Índice de tablas

Tabla 1 Componentes del complejo POLYCOMB en <i>Arabidopsis</i>	21
Tabla 2. Clasificación de los RNAs no codificantes.....	24
Tabla 3 . Programas de amplificación para los diferentes cDNAs utilizados.....	37

Capítulo IX. Bibliografía

- Barton, M. K. (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental Biology*, 341(1), 95–113. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.029>
- Basehoar, A. D., Zanton, S. J., & Pugh, B. F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116(5), 699–709. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00205-3)
- Buratowski Stephen, Hahn Steven, S. A. P. y G. L. (1988). © 198 8 Nature Publishing Group. *Nature*, 334, 37–42.
- Butenko, Y., & Ohad, N. (2011). Polycomb-group mediated epigenetic mechanisms through plant evolution. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.013>
- Byrne, M. E. (2012). Making leaves. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.009>
- Calderon-Villalobos, L., & Kuhnle, C. (2005). The evolutionarily conserved TOUGH

protein is required for proper development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17(September), 2473–2485. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031302.1>

Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A. M., Taylor, M. S., Engström, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., ... Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics*, 38(6), 626–635. <https://doi.org/10.1038/ng1789>

Chekanova, J. A. (n.d.). ScienceDirect Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.003>

Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Jacobsen, S. E., & Fischer, R. L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*, 110(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00807-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00807-3)

Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2008). The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7–8), 1150–1160. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7473-4>

Davidson, I., Martianov, I., & Viville, S. (2004). TBP, a universal transcription factor? *Medecine Sciences : M/S*, 20, 575–579.

Davison L. Barry, Egly Jean-Marc, M. R. E. & C. P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 301, 680–

686. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A. M. E., Greb, T., & Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 16831–16836. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808687105>

Di, C., Yuan, J., Wu, Y., Li, J., Lin, H., Hu, L., Zhang, T., Qi, Y., Gerstein, M. B., & Guo, Y. (2014). *Characterization of stress-responsive lncRNAs in Arabidopsis thaliana by integrating expression, epigenetic and structural features*. 848–861. <https://doi.org/10.1111/tpj.12679>

Domcke, S., Bardet, A. F., Adrian Ginno, P., Hartl, D., Burger, L., & Schübeler, D. (2015). Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1. *Nature*, 528(7583), 575–579. <https://doi.org/10.1038/nature16462>

Geisler, S. J., & Paro, R. (2015). Trithorax and polycomb group-dependent regulation: A tale of opposing activities. *Development (Cambridge)*, 142(17), 2876–2887. <https://doi.org/10.1242/dev.120030>

Gerald, K. (2013). *KARP 7ma.pdf* (p. 733).

Goh, H., Sloan, J., Dorca-fornell, C., & Fleming, A. (2012). *Inducible Repression of Multiple Expansin Genes Leads to Growth Suppression during Leaf Development 1 [C] [W]*. 159(August), 1759–1770. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200881>

Goodrich, Justin, Puangsomlee, Preeya, Martin, Marta, Long, Deborah,

- Meyerowitz, Elliot, & Coupland, George. (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis. In *Nature* (Vol. 386, pp. 44–51).
- Groszmann, M., Greaves, I. K., Albert, N., Fujimoto, R., Helliwell, C. A., Dennis, E. S., & Peacock, W. J. (2011). Epigenetics in plants-vernalisation and hybrid vigour. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.03.006>
- Guo, C., Xu, Y., Shi, M., Lai, Y., Wu, X., Wang, H., Zhu, Z., Scott Poethig, R., & Wu, G. (2017). Repression of miR156 by miR159 regulates the timing of the juvenile-to-adult transition in arabidopsis. *Plant Cell*, 29(6), 1293–1304. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00975>
- He, X. J., Chen, T., & Zhu, J. K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, 21(3), 442–465. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.23>
- He, Y., Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2003). Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis. *Science*, 302(5651), 1751–1754. <https://doi.org/10.1126/science.1091109>
- Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447(7143), 418–424. <https://doi.org/10.1038/nature05917>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*, 331(6013), 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>

- Huisinga, K. L. (2005). *Global Regulation of Gene Expression in Saccharomyces Cerevisiae Via TATA Binding Protein Regulatory Factors*. 13(pol II), 573–585. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00087-5)
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7(3), 106–111. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02223-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02223-3)
- Jiang, D., Wang, Y., Wang, Y., & He, Y. (2008). Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by the Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 2 Components. *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003404>
- Kankel, M. W., Ramsey, D. E., Stokes, T. L., Flowers, S. K., Haag, J. R., Jeddloh, J. A., Riddle, N. C., Verbsky, M. L., & Richards, E. J. (2003). Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163(3), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.3.1109>
- Kinoshita, N., Arenas-Huertero, C., & Chua, N. H. (2018). Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants. *Genes to Cells*, 23(2), 105–111. <https://doi.org/10.1111/gtc.12549>
- Kramm, K., Engel, C., & Grohmann, D. (2019). Transcription initiation factor TBP: Old friend new questions. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 411–423. <https://doi.org/10.1042/BST20180623>
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., & Niebel, A. (2013). Erratum to: “CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?”. [Trends in Plant Science 18 (2013), 157-166]. *Trends in Plant Science*, 18(10), 594–595.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.002>

Lewin Benjamin - Genes lx.PDF. (2008). In *Science of the Total Environment*.

Li, P., Tao, Z., & Dean, C. (2015). Phenotypic evolution through variation in splicing of the noncoding RNA COOLAIR. *Genes and Development*, 29(7), 696–701. <https://doi.org/10.1101/gad.258814.115>

Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., Li, M., An, F., & Guo, H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Cell*, 163(3), 670–683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>

Li, Y. F., Dubois, F., & Zhou, D. X. (2001). Ectopic expression of TATA box-binding protein induces shoot proliferation in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 489(2–3), 187–191. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02101-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02101-9)

Lockton, S., & Gaut, B. S. (2005). Plant conserved non-coding sequences and paralogue evolution. *Trends in Genetics*, 21(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.11.013>

Marlena S. Fejzoa, Aromalyn Magtirab, Frederic Paik Schoenbergb, Kimber MacGibbonc, Patrick Mullind, Roberto Romeroe, f, and K. T. aUniversity. (2008). 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>. Highly

Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A., & Roeder, R. G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11992–11996.

- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Menges, M., Jager, S. M. De, Gruissem, W., Murray, J. A. H., Road, T. C., & Functional, S. (2005). *Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes , reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. 1*, 546–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., & Laufs, P. (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell*, *18*(11), 2929–2945. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045617>
- Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D., & Palatnik, J. F. (2010). Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development*, *137*(1), 103–112. <https://doi.org/10.1242/dev.043067>
- Rodwell, V. W., Kennelly, P. J., Bender, D. A., Weil, P. A., & Botham, K. M. (n.d.). *Bioquímica ilustrada*.
- Russell, J., & Zomerdijk, J. C. B. M. (2013). *Europe PMC Funders Group The RNA polymerase I transcription machinery. 73*, 1–12.
- Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E., & Palatnik, J. F. (2014). Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Molecular Plant*, *7*(10), 1533–1544. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu084>

- Shafiq, S., Li, J., & Sun, Q. (2016). Functions of plants long non-coding RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.06.009>
- Shu, K., & Yang, W. (2017). E3 Ubiquitin Ligases: Ubiquitous Actors in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1461–1476. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx071>
- Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2014). The roles of non-CG methylation in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol*, 21(1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2735>
- Sun, X., Zheng, H., & Sui, N. (2018). Regulation mechanism of long non-coding RNA in plant response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.072>
- Thomas, B. (2016). Leaf Development. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1(13), 191–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00111-8>
- Tolley, B. J., Woodfield, H., Wanchana, S., Bruskiwich, R., & Hibberd, J. M. (2012). Light-regulated and cell-specific methylation of the maize PEPC promoter. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1381–1390. <https://doi.org/10.1093/jxb/err367>
- Wang, H., & Wang, H. (2015). The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. *Molecular Plant*, 8(5), 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.008>
- Wang, Y., Gu, X., Yuan, W., Schmitz, R. J., & He, Y. (2014). Photoperiodic control of

the floral transition through a distinct polycomb repressive complex. *Developmental Cell*, 28(6), 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.029>

Williams, B. P., Pignatta, D., Henikoff, S., & Gehring, M. (2015). Methylation-Sensitive Expression of a DNA Demethylase Gene Serves As an Epigenetic Rheostat. *PLoS Genetics*, 11(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005142>

Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in bloom: A primer on the arabidopsis thaliana model system. *Genetics*, 208(4), 1337–1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>

Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miRr156 and its target SPL3. *Development*, 133(18), 3539–3547. <https://doi.org/10.1242/dev.02521>

Xu, M., Hu, T., Smith, M. R., & Poethig, R. S. (2016). Epigenetic regulation of vegetative phase change in arabidopsis. *Plant Cell*, 28(1), 28–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00854>

Yan, B., Lv, Y., Zhao, C., & Wang, X. (2020). Knowing when to silence: roles of polycomb-group proteins in sam maintenance, root development, and developmental phase transition. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21165871>

Yang, L., Conway, S. R., & Poethig, R. S. (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, 138(2), 245–249. <https://doi.org/10.1242/dev.058578>

- Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Wang, Z., Shi, C., Sun, H., Gu, Y., Zhang, Z., & Tang, G. (2019). The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39397-7>
- Yankulov, K. (2015). Book review: Epigenetics (second edition, eds. Allis, Caparros, Jenuwein, Reinberg). *Frontiers in Genetics*, 6(October), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00315>
- Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, Z. R., & Takahashi, S. (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(11), 2471–2481. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.11.2471>
- Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytologist*, 216(4), 1002–1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>
- Yu, Y., Zhang, Y., Chen, X., & Chen, Y. (2019). Plant Noncoding RNAs: Hidden Players in Development and Stress Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), 407–431. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125218>
- Zemach, A., Kim, M. Y., Hsieh, P. H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S. L., & Zilberman, D. (2013). The arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*, 153(1), 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.033>
- Zhang, H., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation

in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8), 489–506.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>

Zheng, L., Zhang, X., Zhang, H., Gu, Y., Huang, X., Huang, H., Liu, H., Zhang, J., Hu, Y., Li, Y., Yu, G., Liu, Y., Lawson, S. S., & Huang, Y. (2019). The miR164-dependent regulatory pathway in developing maize seed. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(2), 501–517. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1524-4>

Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., McQuinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao, Y., & Giovannoni, J. J. (2013). Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology*, 31(2), 154–159. <https://doi.org/10.1038/nbt.2462>