



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Función del gen *ATX1* en el desarrollo de la raíz de  
*Arabidopsis thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

EMILIO PETRONE MENDOZA



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ma De La Paz Sánchez Jiménez

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos de Jurado

### 1.- Datos del Amuno

Petrone  
Mendoza  
Emilio  
55861463  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
410066119

### 2.- Datos del Tutor

Dra.  
Sánchez  
Jiménez  
Ma. De la Paz

### 3.- Datos del Sinodal 1

Dra.  
Álvarez-Buylla  
Roces  
María Elena

### 4.- Datos del Sinodal 2

Dra.  
Dimitrova  
Dinkova  
Tzvetanka

### 5.- Datos del Sinodal 3

Dra.  
Benítez  
Keinrad  
Mariana

### 6.- Datos del Sinodal 4

Biol.  
González Barrios  
De la Parra  
Rodrigo

### 7.- Datos del Trabajo Escrito

Función del gen *ATX1* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.  
pp 102  
2015

## **Agradecimientos**

### **Agradecimientos Académicos**

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes para realizar la investigación de esta tesis.

El financiamiento para insumos, secuenciación y otras actividades relevantes a esta investigación provino de los proyectos de investigación CONACYT: 152649, 180098, 180380, 167705 y UNAM-DGAPA-PAPIIT: IB201212, IN203814, IN203113, IN 203214.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de beca para estudiantes de licenciatura de los proyectos CONACYT 152649 "Regulación epigenética de genes MADS-box y sus implicaciones en la diversidad ecotípica de *Arabidopsis thaliana*" y UNAM-DGAPA-PAPIIT IB201212 "Función de las modificaciones postraduccionales de las histonas en la variación natural de *Arabidopsis thaliana*".

Agradezco al Dr. Joseph Dubrovsky del Instituto de Biología de la UNAM y a la PhD. Jennifer Fletcher de la Universidad de Berkeley, por el préstamo de las semillas mutantes de *atx1-1* y *ult1-3*, respectivamente.

## **Agradecimientos personales**

Agradezco a mi tutora Mary Paz, por la dedicación y paciencia dedicada durante el proyecto.

A todos los miembros que tuve la oportunidad de conocer en el labo y de los que pude aprender muchas cosas, en especial al equipo de trabajo formado por Stefan, Pamela y Rosario, ya que me ayudaron a cuidar mis plantas, me compartieron buenas ideas e hicieron una experiencia de laboratorio muy llevadera. También agradezco a Juan y Emmanuel por sus buenas charlas y consejos de vida.

A mis buenos profesores de la carrera, que además de transmitirme la pasión del quehacer científico, me dejaron muy claro el papel de la ciencia honesta, y al servicio de la gente, que se necesita en nuestros días y sobretodo en nuestro país, en especial al profe Zenón y a la Dra. Elena.

A mis padres, por su incuestionable apoyo y lucha, que me brindan día con día. Por enseñarme los mejores valores y que a pesar de que las cosas no funcionan bien en nuestra sociedad, algo podemos hacer por mejorarla. Son el mejor ejemplo que he tenido y tendré. Gracias.

A mis hermanas biólogas, por la ayuda durante la Carrera y con las que compartí buenos chistes de la fac de ciencias.

A mis buenos amigos: los mollendos, Einar, Alejandro y Pablo. A Mariano y el dúo ternura (Alexis y Fabián). A mis amigos y amigas de la fac, Vane, Mariana, Ces, a las abejas del Lecce, Alonso, Toñito, Esteban, Chucky, Jero, Pérez-Steps, Alex y Morita, por las buenas fiestas. Y a An por su buena compañía en esta etapa de mi vida.

El año 2014 quedará grabado en la memoria de México, por la extrema violencia e impunidad que sufre el pueblo mexicano, resultado de un sistema que en sus últimos intentos, trata de seguir manteniendo una terrible desigualdad, en muchos sentidos. Los tiempos futuros parecen venir más duros y difíciles. Es necesario seguir organizándonos, entender de manera integral a lo que nos enfrentamos, y seguir luchando.

*“No podemos seguir así, sentados sobre huesos, sobre fosas. Tenemos una causa común, la causa del amor que le tenemos al país y a nosotros mismos y el cuidado de los que vienen después, no sólo de los hijos propios, sino de todos los niños del mundo: ¿Qué les estamos dejando, qué les vamos a decir cuando nos pregunten y tú qué estabas haciendo?”.*

*Elena Poniatowska*

## Índice

Agradecimientos.....	3
1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
2.1 Organización de la cromatina en eucariontes.....	9
2.2 Tipos de cromatina.....	11
2.3 Definición de Epigenética.....	11
2.4 Mecanismos epigenéticos.....	12
2.3.1 Metilación del DNA.....	13
2.3.3 Modificaciones postraduccionales de las histonas.....	15
2.4 Regulación epigenética mediada por PcG y TrxG.....	18
2.4.1 Descripción del grupo Polycomb.....	19
2.4.2 Descripción del grupo Trithorax.....	20
2.5 Regulación epigenética en <i>Arabidopsis thaliana</i> a través de PcG y TrxG.....	26
2.5.1 Descripción de PcG en <i>Arabidopsis</i> .....	27
2.5.2 Descripción de TrxG en <i>Arabidopsis</i> .....	28
2.6 Regulación epigenética en el desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	31
2.7 Antecedentes Inmediatos.....	36
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivos.....	39
4.1 Objetivo general.....	39
4.2 Objetivos particulares.....	39
5. Materiales y Método.....	40
5.1 Material Biológico.....	40
5.2 Condiciones de crecimiento.....	40
5.3 Caracterización de las plantas mutantes.....	41
5.4 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.....	42
5.5 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal.....	42

5.6 Extracción de RNA y RT-PCR .....	42
5.7 Clonación del gen completo de <i>ULT1</i> (pULT1:ULT1:GFP).....	43
5.7.1 Amplificación del gen <i>ULT1</i> .....	43
5.7.3 Recombinación .....	45
5.7.4 Transformación y obtención de plantas que expresan pULT1:pULT1:GFP .....	46
6. Resultados .....	47
6.1 Expresión <i>in silico</i> de los genes miembros de TrxG en la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	47
6.2 Caracterización de una mutante de pérdida de función para <i>ATX1</i> ( <i>atx1-3</i> ).....	48
6.3 Las plantas <i>atx1-3</i> son de floración temprana. ....	51
6.4 <i>ATX1</i> participa en el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	54
6.5 La función de <i>ATX1</i> es importante para el desarrollo de las células meristemáticas del RAM .....	56
6.6 <i>ATX1</i> es necesario como regulador positivo de la expresión de los genes tipo MADS-box que regulan el crecimiento radicular. ....	58
6.7 La función de <i>ULT1</i> se requiere para una adecuada morfología de las células de QC.....	64
6.8 Expresión de <i>ULT1</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	65
7. Discusión .....	67
7.1 Análisis de expresión de miembros TrxG en la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	67
7.2 Características de la línea mutante <i>atx1-3</i> .....	69
7.3 Función de los miembros TrxG: <i>ATX1</i> y <i>ULT1</i> en el desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	71
9. Referencias .....	77
11. Anexo.....	91



## 1. Resumen

En los organismos eucariontes la información genética contenida en el DNA se encuentra compactada en una estructura dinámica denominada cromatina. Los cambios en la estructura de la cromatina que no se deben a cambios en la secuencia del DNA, que tienen un impacto en la regulación de la expresión génica y que son heredables son estudiados por la epigenética. Algunos mecanismos epigenéticos son la metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, remodeladores de cromatina y regulación por RNAs no codificantes. Las proteínas del grupo Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) forman complejos epigenéticos que regulan la expresión de genes homeóticos de manera antagónica por su capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de histonas. El complejo Trithorax está asociado con el mantenimiento de un estado transcripcional activo (eucromatina) y el complejo Polycomb es el responsable de mantener un estado transcripcional silenciado (hetercromatina). Estudios realizados con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han elucidado la forma en la que los complejos PcG y TrxG regulan a genes homeóticos importantes en el desarrollo de la flor, sin embargo la función de estas proteínas en otros órganos no es clara. ATX1 es un miembro de TrxG que tri-metila la lisina K4 de la histona H3 (H3Kme3). Diversos estudios indican que ATX1 regula positivamente la expresión de genes MADS-box importantes en el desarrollo de la flor utilizando cofactores como ULT1. En este trabajo se genotipificó y caracterizó un alelo mutante para ATX1 (*atx1-3*). Utilizando este alelo y el alelo *atx1-1* se determinó que el gen participa en la proliferación del meristemo apical de la raíz (RAM) y que regula la expresión de XAL2/AGL14 y AGL19 y posiblemente a XAL1/AGL12 y AGL17, genes MADS-box importantes en el desarrollo de la raíz. También se analizó el fenotipo radicular de una mutante del gen ULT1 y se determinó que también participa en la proliferación del RAM y en el mantenimiento del nicho de células troncales del mismo meristemo. Además se determinó que el gen ULT1 se expresa en la zona de proliferación del RAM por medio de una construcción con

GFP. En conclusión, *ATX1* y *ULT1* participan en la proliferación del RAM y *ATX1* regula la expresión de algunos genes MADS-box.

## **2. Introducción**

### **2.1 Organización de la cromatina en eucariontes**

La complejidad estructural y funcional del núcleo de las células eucariontes es sorprendente. Este organelo no solo contiene la información genética, sino que está organizado en compartimentos específicos que incluyen cuerpos nucleares proteínicos, dominios de eucromatina y heterocromatina, complejos multiproteínicos compartimentalizados y poros nucleares que permiten el transporte nucleocitoplásmico (Schneider & Grosschedl, 2007). Organizar el ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) dentro del núcleo representa un reto para la célula y lo logra a partir de la formación de un complejo dinámico denominado cromatina que se define como, un polímero formado por proteínas, ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) y DNA que constituye los cromosomas de las células eucariontes (Meissner & Walter, 2015), el cual presenta distintos niveles de organización. El nucleosoma, es la unidad básica de la cromatina, la cual está conformada por aproximadamente 147pb de DNA dando 1.7 vueltas alrededor de un octámero de proteínas denominadas histonas (conformado por un tetrámero H3-H4 y dos dímeros de H2A, H2B) (Strahl & Allis, 2000; Jenuweiun & Allis, 2001; Macalpine & Almouzni, 2013). Entre los nucleosomas hay aproximadamente 50pb de DNA en donde pueden estar unidas subunidades de histona H1 (Over & Michaels, 2014).

Las histonas que conforman el nucleosoma son proteínas básicas con un alto contenido de lisinas y argininas (más del 20% de los aminoácidos) de tamaño relativamente pequeño (102-135 aminoácidos) que están altamente conservadas en tamaño y secuencia (Alberts *et al.*, 2008). Posiblemente el ancestro de estas proteínas sea arqueal (Henikoff & Smith, 2014). Las cuatro histonas contienen un motivo estructural conocido como “plegamiento de histonas” ó “histone fold” en inglés, que se encuentra en la parte carboxilo terminal, formado por tres hélices

alfa unidas por dos asas, siendo este muy importante en el plegamiento del octámero y en la determinación de las interacciones histona-histona e histona-DNA (Wolffe, 1998). Durante el ensamblaje del octámero primero se forman los heterodímeros H3-H4 y H2A-H2B por medio de interacciones intermoleculares, posteriormente se forman tetrámeros H3-H4 y H2A-H2B y finalmente estos se unen para formar el octámero (Alberts *et al.*, 2008). La forma global del octámero de histonas es de una cuña en la que un tetrámero central con forma de V  $(H3-H4)_2$  está rodeado por dos cilindros de los dímeros H2A-H2B (Arents & Moudrianakis, 1993). El contacto del DNA con la superficie del octámero se da principalmente por la formación de puentes de hidrógeno entre los enlaces fosfodiéster del DNA y los residuos de arginina presentes en los dominios de plegamiento del octámero (Luger *et al.*, 1997; Wolfee, 1998).

Además del dominio de plegamiento las histonas cuentan con una región amino terminal en donde se encuentran un alto contenido de residuos de lisinas (Luger *et al.*, 1997; Wolfee, 1998). De manera interesante el dominio amino terminal no interviene en el plegamiento de las histonas, ni en las interacciones histona-histona e histona-DNA; sin embargo, se encuentra altamente conservado. Esto se debe a que son el blanco de modificaciones postraduccionales y a su interacción con otros componentes estructurales de la cromatina, teniendo importantes efectos en diversos procesos nucleares como la transcripción, replicación y reparación del DNA, así como la compactación y localización de los cromosomas (Wolfee, 1998; Di Croce & Helin, 2013).

Un conjunto de nucleosomas forma un arreglo nucleosomal, el cual presenta distintos niveles de compactación jerárquica. En orden de menor a mayor compactación los arreglos nucleosomales pasan de la estructura con forma de collar de perlas (11nm), fibra de 30nm, dominios de cromatina (300-700nm), a los cromosomas observados durante la metafase. Sin embargo, fuera del nucleosoma no se conoce a detalle la estructura de los distintos niveles de organización de la cromatina (McBryant *et al.*, 2010).

## **2.2 Tipos de cromatina**

A partir de tinciones nucleares utilizando colorantes, los citólogos dividieron a la cromatina en dos tipos por su aspecto. La eucromatina, que es menos compacta y generalmente transcripcionalmente activa, y la heterocromatina que es más compacta y generalmente transcripcionalmente inactiva, a su vez esta cromatina puede ser heterocromatina constitutiva que raramente se expresa y heterocromatina facultativa cuya represión es específica en ciertas etapas del desarrollo (Bassett *et al.*, 2009).

El mantenimiento y la transición de un estado de cromatina a otro depende de un conjunto de procesos que involucran la introducción de variantes de histonas, modificaciones postraduccionales de histonas, complejos remodeladores de cromatina, metilación de DNA y regulación mediada por RNAs no codificantes (Allis *et al.*, 2007). En conjunto estos procesos conforman algunos de los mecanismos epigenéticos que actúan en respuesta a señales externas e internas para regular la expresión génica durante los procesos de desarrollo o como respuesta a diferentes condiciones ambientales. La epigenética se encarga de estudiar estos procesos.

## **2.3 Definición de Epigenética**

El término epigenética se definió por primera vez en 1940 por el biólogo del desarrollo Conrad Waddington, como el estudio de los genes, sus productos, y las interacciones causales de estos, que conducen a la formación de un fenotipo (Waddington, 1942). Waddington trató de enfatizar como los resultados experimentales de la genética del desarrollo a partir de mutaciones genéticas en genes específicos, no siempre generaban fenotipos distintos de los silvestres, por lo que resultaba complicado hacer un mapeo lineal entre el genotipo con el fenotipo. Esta observación le permitió ver el desarrollo de un organismo como la interacción compleja de un conjunto de genes (Jablonka & Lamb, 2002). Con el avance en el entendimiento de los mecanismos que regulan la transcripción genética la definición de epigenética se volvió más operativa y se alejó de la visión integral de Waddington. Por ejemplo Allis y colaboradores la definen como el

estudio de los cambios en la transcripción génica por modulación de la cromatina que no están ligados a cambios o modificaciones en la secuencia de DNA y que son heredables (Allis *et al.*, 2007). A pesar de que esta definición es útil es importante mencionar que la epigenética como parte de la biología del desarrollo tiene una definición más amplia que involucra otros procesos aparte de la regulación transcripcional, como procesos espontáneos de auto-organización dependientes de las propiedades del ambiente y como parte del mismo desarrollo del organismo (Jablonka & Lamb, 2002). Tomando en cuenta estos procesos ligados al desarrollo, la epigenética se puede definir como el estudio de los procesos que subyacen la plasticidad y canalización durante el desarrollo de un organismo y que dan como resultado efectos persistentes a través de las generaciones (Raz & Jablonka; 2009). Cuando estos procesos actúan a nivel celular ocurre la diferenciación y determinación celular producto de mecanismos de control epigenético.

#### **2.4 Mecanismos epigenéticos**

La modulación de la cromatina por mecanismos epigenéticos que ocurre durante el desarrollo de los organismos eucariontes, genera estados de cromatina específicos para cada tipo celular, destacando la función de estos procesos en la generación de variación epigenética, que también se puede originar mediante otros mecanismos, como los que dependen de las redes de regulación genética (Davila-Velderrain & Alvarez-Buylla, 2014). Ambos tipos de mecanismos son fundamentales para la diferenciación celular, a pesar de que todas las células en un organismo multicelular comparten el mismo genoma (Figura 1; Jenuwein & Allis, 2001; Allis *et al.*, 2007).

Los principales mecanismos epigenéticos implicados en la modificación de la cromatina descritos hasta ahora son: 1) Modificaciones del DNA por metilación e hidroximetilación en los residuos de citosina, 2) Modificaciones en la síntesis de RNA no codificantes y 3) Modificaciones postraduccionales de las histonas (Chen & Dent, 2014).

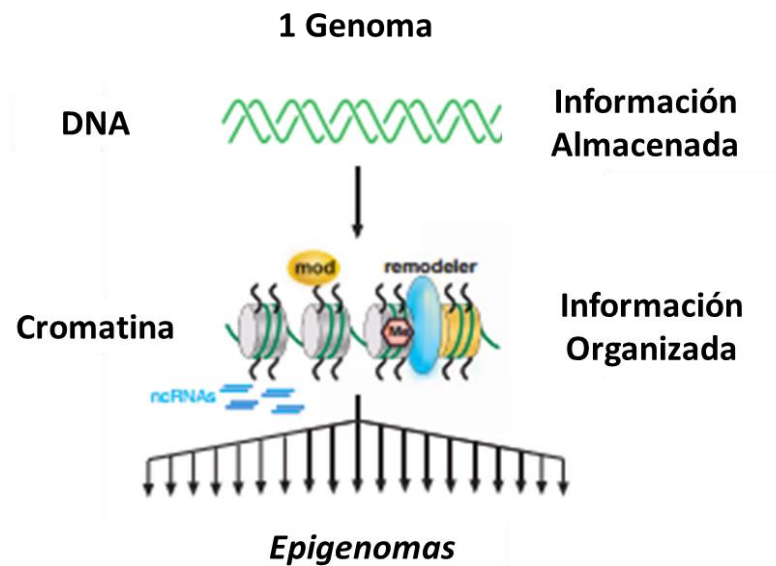


Figura 1. Generación de múltiples epigenomas durante el desarrollo de un organismo multicelular. Modificado de Allis *et al.*, 2007.

### 2.3.1 Metilación del DNA

En los organismos eucariontes, la metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en la posición C-5 de las citosinas (Klose & Bird, 2006; Espada & Esteller, 2010). En mamíferos la metilación ocurre casi exclusivamente de manera simétrica en un contexto CpG, mientras que en plantas la metilación del DNA puede ocurrir en todos los contextos: simétrica CG, CHG (H=A, T o C) y asimétricamente CHH (Vanyushin, 2006).

Se ha visto que la metilación del DNA tiene una función específica dependiendo del contexto genómico en el que se localice; es un sistema de defensa genómico contra elementos endógenos de DNA (elementos transponibles) y de contaminaciones virales exógenas. De hecho la pérdida de metilación en transposones puede dar lugar a la activación transcripcional protegiendo la integridad genómica (Gehring & Henikoff, 2008). Además la metilación del DNA está implicada en la regulación de la expresión génica que se da durante el desarrollo y bajo condiciones de estrés (Gehring & Henikoff, 2008).

Cuando la metilación ocurre en regiones de promotores génicos se asocia con un estado de cromatina compactada y con inhibición de la expresión génica (Espada & Esteller, 2010), mientras que la metilación en el cuerpo del gen puede estimular la elongación transcripcional e incluso modular el splicing alternativo de ciertos genes (Maunakea *et al.*, 2013). Las enzimas responsables de la metilación del DNA en los nucleótidos CpG pertenecen a la familia de proteínas llamada DNA metiltransferasas (DNMT por sus siglas en inglés) y utilizan a la S-adenosil-L-metionina (SAM por sus siglas en inglés) como donador de grupos metilo. Pueden ser metiltransferasas *de novo* cuando metilan sitios nuevos sin previa metilación o de mantenimiento cuando metilan una hebra de DNA hemi-metilada durante la replicación (Li & Bird, 2007; Espada & Esteller, 2010).

Existen dos principales mecanismos de inhibición de la expresión génica por metilación de DNA. En el primero las citosinas modificadas inhiben la unión de factores de transcripción al DNA y en el segundo un grupo de proteínas reconoce el sitio CpG metilado impidiendo la unión de factores transcripcionales (Bird, 2002; Klose & Bird, 2006). Las proteínas que reconocen y se unen al sitio CpG metilado pertenecen a tres familias distintas: 1) las que tienen un dominio MBP (methyl CpG binding proteins por sus siglas en inglés), 2) proteínas Kaiso y Kaiso/like y 3) las que tienen dominio SRA (SET and RING finger associated por sus siglas en inglés) (Menafrá & Stunnenberg, 2014). Al unirse a los sitios CpG metilados, pueden reclutar a desacetilasas de histonas y metiltransferasas para silenciar la transcripción y modificar el estado de la cromatina circundante, o reclutar a factores remodeladores de cromatina (Klose & Bird, 2006; Menafrá & Stunnenberg, 2014).

### **2.3.2 Regulación epigenética por RNAs no codificantes**

En años recientes han surgido evidencias que demuestran la importancia del RNA dirigiendo procesos de regulación de cromatina y memoria epigenética; de hecho esta molécula es un componente integral de la cromatina y muchas proteínas que modifican su estructura se pueden unir al RNA (Rodríguez-Campos & Azorin 2007; Mattick *et al.*, 2009). Es relevante que los RNAs no codificantes (ncRNAs por sus

siglas en inglés) funcionan como guías de las enzimas modificadoras de cromatina (Morris & Mattick, 2014). De manera general las clases de ncRNAs que tienen funciones epigenéticas se pueden dividir en RNAs no codificantes pequeños y RNAs no codificantes largos (snRNAs y lncRNAs por sus siglas en inglés, respectivamente). Dentro de los snRNAs se encuentran los RNAs pequeños de interferencia, los RNAs que interactúan con PIWI y los microRNAs (siRNAs, piRNAs y miRNAs, por sus siglas en inglés, respectivamente). Los siRNAs participan en el silenciamiento génico por la vía de RNA de interferencia en un proceso conocido como metilación del DNA dirigida por RNAs (RdMP), los piRNAs interactúan con el complejo PIWI en el proceso de formación de heterocromatina y los miRNAs participan en la degradación de RNAs mensajeros (mRNAs) por apareamiento de bases (Mattick *et al.*, 2009; Morris & Mattick, 2014).

Los lncRNAs son RNAs no codificantes que miden cerca de 200 o más pares de bases y pueden ser intrónicos, anti-sentido o intergénicos (Perkel, 2013). Se ha visto que los lncRNAs participan en diversos procesos como impronta genómica, silenciamiento del cromosoma X en mamíferos y en la vernalización en plantas (Morris & Mattick, 2014). También se ha visto que los lncRNAs pueden interactuar con marcas de cromatina y con complejos que se encargan de establecer dichas marcas. Por ejemplo *HOXB5/6AS* puede unirse a la H3K4me3 e interactuar con Mixed Lineage Leukemia 1 (*MLL1*) proteína que regula de manera positiva a genes homeóticos (Mercerr *et al.*, 2009).

### **2.3.3 Modificaciones postraduccionales de las histonas.**

La acetilación y la metilación fueron las primeras modificaciones postraduccionales de las histonas en describirse; actualmente se han identificado y caracterizado muchas modificaciones covalentes de las histonas, incluyendo las fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, ADP-ribosilaciones, desaminaciones e isomerizaciones de prolinas (Kouzarides, 2007; Murr, 2010). La mayoría de las modificaciones que se han descubierto son dinámicas, es decir que pueden ser reversibles gracias a la acción de enzimas que inducen o remueven los enlaces



covalentes (Kourazides, 2007). Estas modificaciones provocan cambios en las interacciones entre nucleosoma-nucleosoma y nucleosoma-DNA o en el reclutamiento de proteínas no histonas (Kouzarides, 2007; Murr, 2011).

La acetilación consiste en la adición de grupos acetilo (COCH<sub>3</sub>) en residuos específicos de lisinas que incorporan las histonas acetilasas (HATs, por sus siglas en inglés). Esta modificación ocurre principalmente en la histona H3 y H4 reduciendo la carga positiva de la histona. La hiperacetilación de las histonas tiene un papel importante en la apertura de la cromatina de genes activos o potencialmente activos y su función es contrarrestada por la acción de las histonas desacetilasas (HDACs por sus siglas en inglés) (Bannister & Kouzarides, 2011).

La sumoilación consiste en la adición del péptido “Small Ubiquitin-related Modifier Protein”; en algunos procesos de represión transcripcional las cuatro histonas pueden ser sumoiladas contrarrestando los efectos de la acetilación y ubiquitinación (Shiio & Eisenman, 2003). La ubiquitinación es similar a la sumoilación pero en este caso se adiciona una o más unidades de ubiquitina (péptido de 76 aminoácidos) en residuos de lisinas; esta marca puede estar asociada a represión o activación transcripcional dependiendo del contexto (Gill, 2004).

La fosforilación consiste en la adición de un grupo fosfato (PO<sub>4</sub>) proveniente de adenosin trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) en residuos específicos de serinas, treoninas y tirosinas adicionando una carga negativa a la histona. La familia de cinasas de histonas lleva a cabo la fosforilación y las fosfatasas (PPTasas) remueven las fosforilaciones. Se ha visto que esta marca está involucrada en diversos procesos de regulación de la cromatina como la reparación del DNA, condensación de la cromatina durante la mitosis y la meiosis, así como en la activación transcripcional (Bannister & Kouzarides, 2011; Rossetto *et al.*, 2012).

Las metilaciones de las histonas ocurren en residuos de lisinas y argininas por la actividad de las metil transferasas de histonas (HMT por sus siglas en inglés). El efecto que provoca la metilación depende de la histona modificada, del

residuo modificado y del grado de metilación, es decir si es mono, di o tri metilación; esto se debe a que cada modificación puede ser reconocida por diferentes proteínas llamadas efectores, que contienen dominios chromo, tudor, MBT y dominios PHD que reconocen específicamente cada tipo de modificación (Kouzarides, 2007).

Las arginin-metiltransferasas (PRMTS) son las proteínas que metilan a las argininas; estas pueden ser monometiladas o dimetiladas de manera simétrica y asimétrica (Wysocka *et al.*, 2006). El efecto de la marca depende del residuo modificado y de su simetría. Por ejemplo, en el promotor Ps2 regulado por estrógenos en mamíferos, la monometilación de la arginina 17 de la histona H3 (H3R17me) tiene una aparición cíclica y se asocia con activación transcripcional, mientras que la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3me2) mediada por PRMT5 en la planta *Arabidopsis thaliana* reprime la expresión de *CORYNE (CRN)* (Metivier *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2013). Esta marca puede ser revertida por la conversión de la arginina en citrulina por la reacción de desaminación o desmetilación directa (Bannister & Kouzarides, 2011).

Por otro lado, los residuos de lisinas también pueden ser mono (me1), di (me2) o tri (me3) metilados. Los principales residuos metilados se encuentran en la histona H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79) y en la histona H4 (H4K20) (Dambacher *et al.*, 2010). Las lisin-metiltransferasas de histonas (HKMT por sus siglas en inglés) catalizan la transferencia del grupo metilo en el grupo  $\alpha$ -amino de las lisinas por medio del dominio SET (acrónimo de las proteínas Su(var)3-9, Enhancer of Zeste y Trithorax); sin embargo existen otras HKMT sin dicho dominio que también tienen la capacidad de metilar como la enzima DOT1 que puede metilar a la lisina H3K79 (Feng *et al.*, 2002). Las metilaciones son revertidas por dos tipos de enzimas: 1) las que contienen un dominio JmjC (jumonji) utilizan como cofactores al  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\alpha$ -ketoglutarato ó por 2) las relacionadas con la familia de enzimas amin-oxidasa que utilizan a flavin adenin dinucleótido (FAD) como cofactor (Hou & You, 2010; Bannister & Kouzarides, 2011).

La abundancia de las modificaciones en las colas de las histonas hace que existan influencias positivas y negativas entre modificaciones, tal que se pueda afectar la función de las proteínas o interrumpir la unión de una proteína por una modificación adyacente; por ejemplo, la fosforilación de H3S10 afecta la unión de Heterochromatin Protein 1 (HP1) en la H3K9 y favorece la acetilación de H3K14, K18 y K23, marcas que a su vez inducen la metilación de la H3K4 (Fischle *et al.*, 2003; Kouzarides, 2007). Por su parte la metilación de H3K9 inhibe la acetilación de H3K14, K18 y K23, ejemplificando el efecto sinérgico y antagónico que existe entre marcas (Fischle *et al.*, 2003). De esta forma el conjunto de modificaciones actúan en combinación o en un esquema secuencial, en una o múltiples histonas especificando un resultado transcripcional estable.

El mantenimiento de un estado de expresión génica estable como resultado de la integración de las distintas modificaciones en las histonas durante las divisiones celulares se conoce como memoria epigenética. Existen dos complejos proteínicos llamados grupo Polycomb (PcG) y grupo Trithorax (TrxG), los cuales tienen la capacidad de modificar el estado de la cromatina y cuyas mutantes muestran pérdida de la identidad celular, siendo claves en el mantenimiento de la memoria epigenética (Ringrose & Paro, 2004; Steffen & Ringrose, 2014).

#### **2.4 Regulación epigenética mediada por PcG y TrxG**

Durante los años cuarenta se identificaron a las mutantes *Polycomb (Pc)* y *extra sex comb (esc)* en la mosca modelo *Drosophila melanogaster*, cuyos fenotipos causaban la aparición de peines sexuales extras en segmentos donde normalmente no se desarrollan (Lewis, 1978). Estudios genéticos y moleculares demostraron que la mutación afectaba la expresión espacial de los genes HOX, que son los factores transcripcionales que especifican la identidad celular de cada segmento y cuyas mutaciones afectan la posición en que se desarrollan distintos órganos o segmentos, y por ello se conocen como genes homeóticos (Pendleton *et al.*, 1993; Theissen *et al.*, 2000). Con el paso de los años se fueron identificando más genes con fenotipos similares que se clasificaron como “Polycomb Group” (PcG). Por otra parte, hasta mediados de los años ochenta se identificaron un

grupo de genes que tenían la capacidad de contrarrestar la actividad de PcG en la regulación de genes homeóticos, a los que se denominó Trithorax Group (TrxG) (Grimaud *et al.*, 2006; Shuettengruber *et al.*, 2007).

Los complejos PcG y TrxG están muy conservados en los organismos multicelulares. Ambos grupos participan en el mantenimiento de la expresión estable de los genes homeóticos a través de las generaciones, formando complejos multiméricos y modificando el estado de la cromatina (Steffen & Ringrose, 2014). Dichos complejos contienen proteínas con dominio SET, el cual les permite metilar lisinas específicas de las histonas canónicas (Tschiersch *et al.*, 1994). De manera general, el complejo PcG se encarga de mantener un estado de cromatina más compacto y reprime la expresión génica por medio de la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3), mientras que TrxG mantiene un estado de cromatina más laxo y promueve la expresión mediante la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3) (Simon & Tamkun, 2002). Además de participar en los mecanismos de regulación epigenética fundamentales en los procesos implicados en diferenciación y establecimiento de los destinos o identidades celulares en general, y tal vez por ello mismo, se ha descrito que estos factores epigenéticos participan antagónicamente en procesos de proliferación y control de ciclo celular, identidad de células troncales, inactivación del cromosoma X, cáncer e impronta genómica (Figura 2; Schuettengruber *et al.*, 2007; Revisado en Schuettengruber *et al.*, 2011).

#### **2.4.1 Descripción del grupo Polycomb**

Las proteínas que conforman a PcG presentan una alta conservación entre especies, particularmente en los dominios funcionales: SANT, SET, WD40, y los motivos de dedos de zinc (Di Croce & Helin, 2013). Se han caracterizado bioquímicamente en dos complejos: Complejo Represor Polycomb1 y 2 (PRC1 y PRC2, por sus siglas en inglés). El complejo PRC2 contiene la actividad catalítica, por lo que actúa principalmente tri-metilando a H3K27; mientras que PRC1 reconoce dicha marca, se une a ella e induce la ubiquitinación de la H2A, estabilizando la represión y compactando la cromatina (Shuettengruber *et al.*,

2007). El modelo dominante para la regulación transcripcional por medio de PcG, es que una vez que las células comienzan el proceso de diferenciación, en donde genes específicos para cada tipo celular son reprimidos, las proteínas PcG se unen a dichos genes, por señales transitorias pero manteniendo un silenciamiento génico estable (Di Croce & Helin, 2013). PcG se une al DNA a través de elementos reguladores en *cis* conocidos como elementos de respuesta a Polycomb (PREs por sus siglas en inglés) y más recientemente se ha visto que algunos ncRNAs también pueden reclutar al complejo PRC2 y dirigirlo a sus genes blanco (Bemer & Grossniklaus, 2012).

En animales el complejo PRC1 consiste de cuatro proteínas canónicas: Polycomb (PC), Chromobox (CBX), Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (PSC) y Sex combs extra (RING); mientras que el complejo PRC2 se compone de cuatro proteínas canónicas: Extra Sex Comb (Esc), Enhancer of zeste (E(z)), Supresor of zeste 12 (Suz12) y RbAp48/Nurf-55) (Para ver homologías, Anexo Tabla S1) (Grossniklaus & Paro, 2014).

#### **2.4.2 Descripción del grupo Trithorax**

Al igual que PcG, TrxG está formado por un grupo heterogéneo de proteínas. Muchas de estas, están involucradas en procesos generales de transcripción y por ello se ha asociado a otros mecanismos de regulación transcripcional, además de los que tienen que ver con la regulación de la cromatina (Ringrose & Paro, 2004). Con base en la función molecular Schuettengruber y colaboradores en 2011 clasificaron a las proteínas del grupo TrxG en tres grupos: 1) Proteínas que contienen un dominio SET con actividad de HMT, 2) Proteínas que conforman el Complejo de Proteínas Asociadas con SET1 (COMPASS por sus siglas en inglés) que ayudan a la unión de TrxG con el DNA y 3) Factores remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Dentro de los genes que codifican a las proteínas que contienen un dominio SET, el gen *TRITHORAX* (*TRX*) de *Drosophila* fue el primero con función antagónica a Polycomb en describirse (Ingham, 1985). Está implicado en la correcta diferenciación de la cabeza, tórax y estructuras abdominales de las

moscas; los mutantes de pérdida de función dan lugar a mutaciones homeóticas en donde los segmentos abdominales posteriores tienen características de segmentos anteriores y sin actividad del complejo bithorax (BX-C) (Ingham, 1983). Estudios moleculares y bioquímicos posteriores apuntaron a una función de TRX en el mantenimiento de la expresión génica por medio de la metilación de H3K4 (Eissenberg & Shilatifard, 2010). El primer homólogo de TRX descrito en mamíferos fue *mixed lineage leukemia 1 (MLL1)*, que inicialmente se identificó por polimorfismos del gen, cuyos fenotipos mostraban translocaciones cromosómicas asociadas a leucemias agudas (Gu *et al.*, 1992; Tkachuk *et al.*, 1992). Al igual que TRX, regula a genes *HOX* y mantiene su expresión durante la morfogénesis de mamíferos, por medio de la trimetilación de H3K4 (Yu *et al.* 1995; Yu *et al.*, 1998; Milne *et al.* 2002; Milne *et al.* 2005). La proteína MLL1 actúa formando un complejo denominado COMPASS-like con los elementos canónicos WD-40 repeat 5 (WDR5), Retinoblastoma binding Protein 5 (RbBP5), Absent small or homeotic 2 Loke (Ash2L) y otras proteínas (Cao *et al.*, 2010). Actualmente se sabe que hay cinco proteínas homólogas a MLL1: SET1A, SET1B, MLL2, MLL3 y MLL4. Todas estas proteínas son muy similares en su estructura y metilan a H3K4, sin embargo actúan formando complejos específicos con las proteínas COMPASS-like durante el desarrollo y regulan a distintos genes; por ejemplo el complejo MLL2 tiene una interacción específica con el receptor de estrógenos  $\alpha$ , (ER) $\alpha$  regulando la expresión génica de la vía de señalización Era; por otra parte los complejos formados por MLL3 y MLL4 contienen a la desmetilasa UTX la cual puede remover la metilación de H3K27 para ayudar en la activación transcripcional (Mo *et al.*, 2006; Eissenberg & Shilatifard, 2010; Schuettengruber *et al.*, 2011).

A diferencia de otras metil-transferasas la actividad óptima de las proteínas MLL/SET1 requiere de la presencia de los tres elementos canónicos del complejo COMPASS, destacando la importancia de la proteína WDR5 como miembro integrador del complejo (Steward *et al.*, 2006; Dou *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008). Además WDR5, tiene la capacidad de reconocer la mono y dimetilación de H3K4 funcionando como un miembro que une al complejo con sus blancos, mientras que

la formación del heterodímero RbBP5 y Ash2L al interactuar con el dominio SET de MLL1 optimizan la actividad catalítica del complejo (Wysocka *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2010).

Otro gen que codifica para una proteína con dominio SET es *Absent small or homeotic discs1 (ash1)*, que inicialmente se identificó en *Drosophila*, por medio de mapeos genéticos en mutantes letales que no mostraban discos imagales. Esta proteína tiene la capacidad de dimetilar la H3K4, por lo que ASH1 provee una plataforma a TRX para llevar a cabo la trimetilación de H3K4 (Eissenberg & Shilatifard, 2010). El gen homólogo en humanos es huASH1 y también metila la H3K4 *in vitro* además de mono y dimetilar a H3K36, sin embargo no se sabe cómo es el complejo en humanos (Gregory *et al.* 2007; Tanaka *et al.*, 2007).

A diferencia de las proteínas con dominio SET cuya actividad catalítica es la metilación, los remodeladores de cromatina usan la energía de la hidrólisis del ATP para cambiar, desestabilizar, sustituir o reestructurar los nucleosomas de manera no covalente, dando lugar a cambios en la accesibilidad del DNA y en la actividad transcripcional (Köhler & Aichinger, 2010; Gentry & Hennig, 2013). Estas proteínas remodeladoras se han dividido en cuatro familias distintas dependiendo de la subunidad de ATPasa que contengan las cuales son SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80 (Badenhorst *et al.*, 2002). La primer subfamilia de remodeladores *Switch/Sucrose Non Fermentable* (SWI/SNF por sus siglas en inglés) fue descubierta en levadura; este complejo regula la estructura de la cromatina de un gran número de genes implicados en ciclo celular, señalización celular, proliferación y segregación cromosómica (Schuettengruber *et al.*, 2007). En mamíferos el complejo está presente en diversas formas bioquímicas pero está conformado por una unidad de ATPasa que puede ser Brahma (BRM) o Brahma related gene 1 (BRG1) y una composición variable de factores asociados a BFG (BAF's por sus siglas en inglés) (Kadam & Emerson, 2003). Tanto BRM como BRG1 tienen la capacidad de aumentar la transactivación mediada por diversos receptores; sin embargo regulan la expresión de distintos genes (Brockmann *et al.*, 2001). Estas proteínas contienen un bromodominio que es capaz de unirse a

histonas acetiladas. Otra familia importante de remodeladores de histonas es Imitador de Switch (ISWI por sus siglas en inglés), de la cual se pueden formar tres sub-complejos en humanos: Ensamblador de Cromatina que utiliza ATP, Complejo Ensamblador de Cromatina y Factor Remodelador de Nucleosomas (ACF, CHRAC y NURF, respectivamente, por sus siglas en inglés); este último es el miembro fundador de la familia y se compone de cuatro subunidades, la ATPasa Imitation Swinger (ISWI), Bromodomain PHD-finger transcription factor (BPTF), Retinoblastoma protein associated protein (RbAp46/48) (Landry *et al.*, 2008; Clapier & Cairns, 2009). De la familia de remodeladores CHD (Chromodomain, helicase, DNA binding) hay dos complejos en humanos: CHD, el cual está implicado en el mantenimiento de células embrionarias y el complejo remodelador de nucleosomas y desacetilasas (Mi2/NuRD) que tiene la capacidad de desacetilar histonas para mediar funciones represoras (Clapier & Cairns, 2009).

Existe una comunicación entre los complejos TrxG que llevan a cabo modificaciones postraduccionales de histonas y complejos remodeladores de cromatina (Schuettengruber *et al.*, 20011). Por ejemplo, la H3K4me3 en los promotores de *Drosophila* es leída por el complejo NURF facilitando el reclutamiento de la maquinaria transcripcional por medio de la remodelación de cromatina dependiente de ATP. De manera similar el dominio PHD de BPTF interacciona con H3K4me3 estabilizando a BPTF/NURF con la cromatina activa (Clapier & Cairns, 2009). Además el complejo PAF1 en levaduras promueve la transcripción en parte, gracias al reclutamiento de SET1 y SET2 homólogas de las HKMTs de la H3K36 de mamíferos y hongos. (Schuettengruber *et al.*, 2007; Alvarez-Venegas, 2010).

Se han propuesto distintos modelos de reclutamiento de los complejos TrxG a sus sitios blanco (Schuettengruber *et al.*, 2011). Pudiendo ser: 1) Por el reconocimiento de secuencias ricas en CpG por el dominio CXXC de MLL, o por el reconocimiento de motivos ricos en CG de DNA por ASH2L aumentando la unión del complejo COMPASS en sus sitios blanco o por la unión a secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta a trithorax (TREs), como sucede en



*Drosophila*. 2) Por el reclutamiento de factores de transcripción específicos o por el complejo de elongación PAF1. 3) Por el reclutamiento a través de ncRNAs e interacción con proteínas adaptadoras como WDR5, y 4) Por el reconocimiento de la H3K4me3 por el dominio PHD de MLL.

Las marcas establecidas por TrxG se han mapeado por análisis genómicos globales. Así, se han encontrado niveles elevados de H3K4me1-2-3 rodeando el sitio de inicio de transcripción (TSS), mientras que la H3K36me3 se encuentra cerca de las regiones 3' de los genes. Además, niveles elevados de acetilación de histonas y de H3K4me se detectan en regiones promotoras de genes activos; en contraste con los elevados niveles de H3K27me3 que se relacionan con genes reprimidos (Roh *et al.*, 2006; Barski *et al.*, 2007). De manera interesante se ha observado que genes silenciados por PcG en células troncales embrionarias (ESC por sus siglas en inglés) tienen dominios con marcas de activación y de represión a los que se han llamado dominios bivalentes; cuando comienza la diferenciación se pierden las marcas de activación. Estos datos resaltan la importancia de los factores TrxG en el mantenimiento de las células ES (Fisher & Fisher, 2011).

El efecto de las metilaciones en H3K4 y H3K36, catalizadas por MLL y ASH1, respectivamente tienen un efecto inhibitor en la metilación de la H3K27me3 llevada a cabo por el complejo PcG denotando el efecto antagónico entre marcas (Poux *et al.*, 2002); de hecho la proteína CBP/p300 de TrxG tiene la capacidad de acetilar a H3K27 promoviendo una configuración de cromatina abierta e interrumpiendo la interacción con el DNA (Tie *et al.*, 2009).

En resumen los grupos PcG y TrxG, están formados por una gran variedad de proteínas, que gracias a su capacidad de modificar la estructura de la cromatina regulan dinámicamente y de manera antagónica la expresión de genes homeóticos. Su participación es crucial para permitir procesos biológicos claves durante el desarrollo y también en las respuestas celulares a distintas condiciones ambientales o entender su herencia epigenética a través de las generaciones (Figura 2).

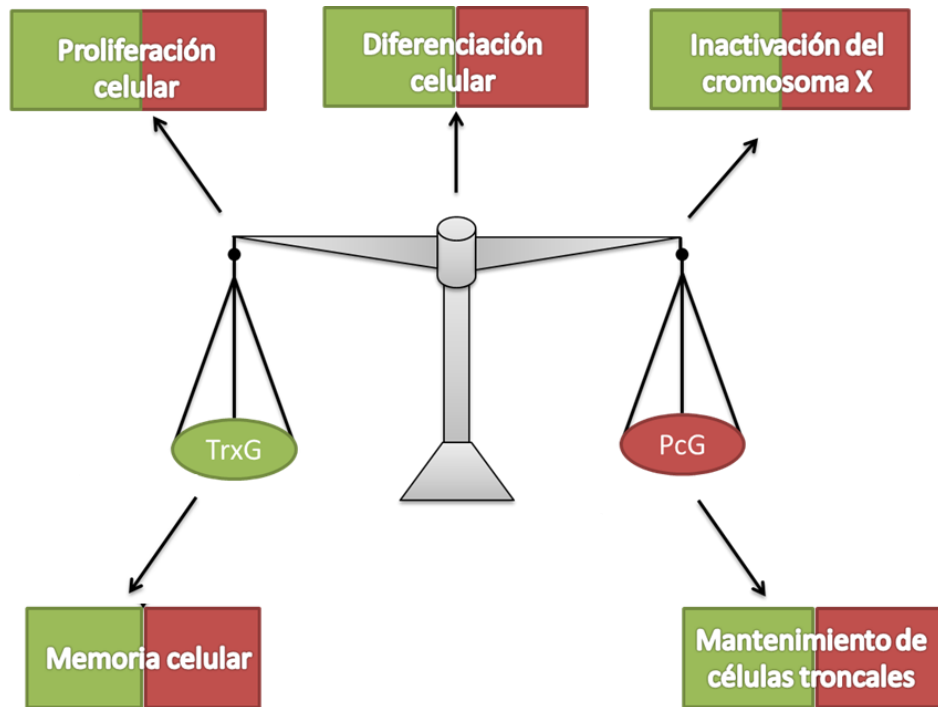


Figura 2. Acción antagonista de PcG y TrxG en diversos procesos celulares. La balanza denota la participación antagonista de ambos complejos en diversos procesos celulares. El color verde es de TrxG y el rojo de PcG. En todos los recuadros señalados los complejos actúan de manera antagonista. Modificada de Schuettengruber *et al.*, 2011.

A diferencia de los animales, en las plantas la diferenciación celular y morfogénesis no se restringen a la fase de desarrollo durante la embriogénesis, sino que ocurre durante todo el ciclo de vida. Estos procesos de desarrollo ocurren a partir de grupos de células que se mantienen en un estado indiferenciado y de proliferación activa durante toda la vida de las plantas, y que se llaman meristemos. En una planta hay dos meristemos principales, uno en el ápice del vástago aéreo y otro en el ápice de la raíz; además existen meristemos adicionales o laterales en las axilas de las hojas y ramas, y en el periciclo de la raíz que da lugar a las raíces laterales (Weigel & Jürgens, 2002; Stahl & Simon

2010). El desarrollo a partir de estos meristemos de las plantas está moldeado por el ambiente, dando como resultado una gran plasticidad fenotípica en función de las condiciones de crecimiento de las plantas. De hecho, las plantas están sujetas a cambios ambientales constantes y justamente los mecanismos epigenéticos pueden facilitar respuestas rápidas y cambios meta-estables en la actividad de los genes en función de estas condiciones (Pikaard & Mittelsten, 2014). Los mecanismos de regulación de la cromatina muy similares a los descritos en animales se han descubierto en las plantas; y ahora se sabe que tienen una función fundamental en las respuestas de estos organismos al ambiente. Los avances en el entendimiento de la regulación epigenética en las plantas se deben, en gran medida, a los estudios realizados en la especie vegetal modelo, *Arabidopsis thaliana*.

### **2.5 Regulación epigenética en *Arabidopsis thaliana* a través de PcG y TrxG**

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn ( $2n = 10$ ) es una planta perteneciente a la familia Brassicaceae, que se distribuye naturalmente en Europa, Asia y parte de África (Koorneef *et al.*, 2004). Su ciclo de vida es anual y mide entre 20-25cm (Figura 3). *Arabidopsis* tiene uno de los genomas más pequeños en las plantas y está totalmente secuenciado, puede crecer de manera fácil en condiciones controladas, su tiempo generacional es corto y puede ser polinizada de manera manual (Serino & Gusmaroli, 2011). Además, *Arabidopsis* se caracteriza por auto polinizarse por lo que las poblaciones que se colectan en el campo son prácticamente homocigotas. A estas poblaciones se les denomina ecotipos y se estima una colección de 142 de ellos, que se pueden distinguir entre sí por poseer variación en distintos caracteres morfológicos y fisiológicos (Koorneef *et al.*, 2004). Estas características la han convertido en el sistema experimental más importante en plantas y en particular han permitido avanzar en el entendimiento de los mecanismos de regulación epigenética, sobre todo en aquellos en los cuales están implicados los complejos PcG y TrxG en las plantas.

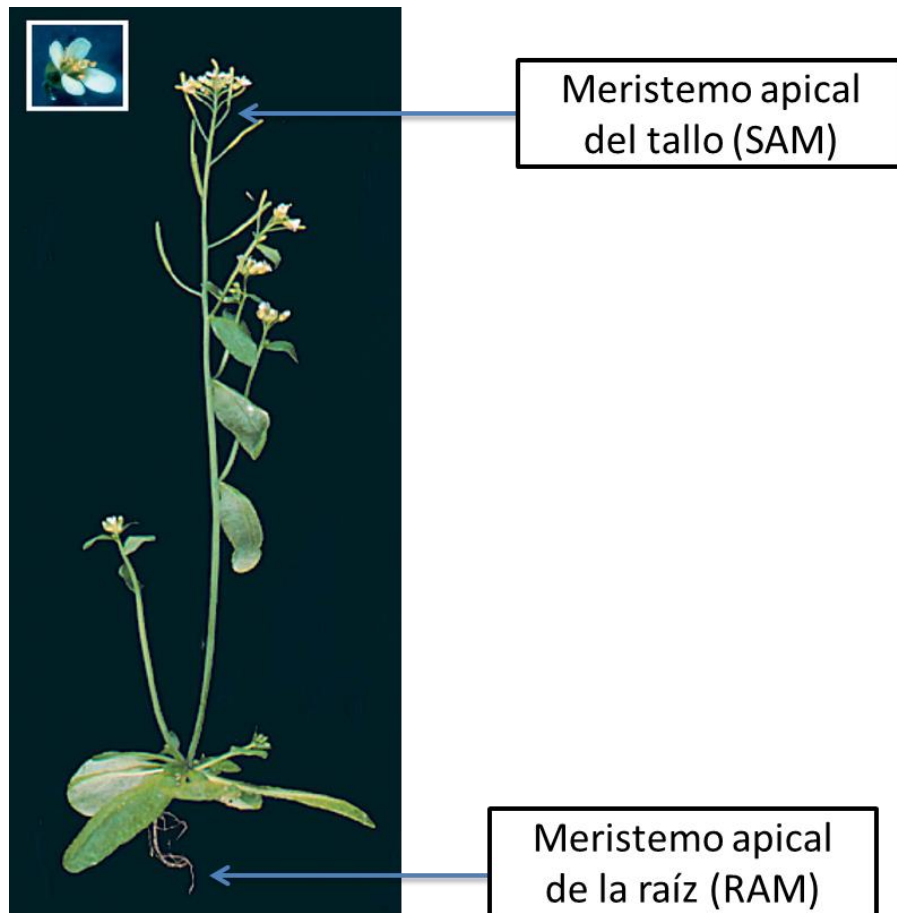


Figura 3. Morfología de *Arabidopsis thaliana* a las cuatro semanas de crecimiento (ecotipo Landsberg erecta (Ler)). En el recuadro blanco se puede ver la morfología de la flor. Las flechas indican los sitios donde se encuentran los meristemos primarios de la planta. Modificada de Serino & Gusmaroli, 2011.

### 2.5.1 Descripción de PcG en *Arabidopsis*

Los complejos PcG están involucrados en diversos procesos de desarrollo de *Arabidopsis*. Se han identificado varios genes para cada uno de los miembros canónicos de PRC2: *MEDEA (MEA)*, *CURLY LEAF (CLF)* y *SWINGER (SWN)* son homólogos de *E(z)*; *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2)*, *VERNALIZATION2 (VRN2)* y *EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2)* son homólogos de *Su(z)12*; mientras que *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* es homólogo de *ESC* (Bemer & Grossniklaus, 2012; Anexo, Tabla S1). La

combinación de estas subunidades forma distintos complejos involucrados en distintos procesos, por ejemplo los complejos PRC2-EMF y PRC2-VRN regulan aspectos del desarrollo del esporofito pero PRC2-EMF además reprime a genes de floración importantes como *FT*, *AG* y *AP3*; mientras que PRC2-VRN promueve la floración reprimiendo a *FLC* durante la vernalización (Bemer & Grossniklaus, 2012). Con respecto al complejo PRC1 se piensa que es similar al de sistemas animales, se postula que puede estar compuesto por la proteína LIKE-HETROCHROMATIN PROTEIN (LHP1) que es la que reconoce la marca de H3K27me3 y por algunas de las proteínas ARABIDOPSIS THALIANA RING1A o 1B (atRING1a y atRING1b) y/o por las proteínas ARABIDOPSIS THALIANA B CELL-SPECIFIC MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS INTEGRATION SITE1 (AtBMI1A, 1B o 1C) (Xu & Shen, 2008; Bemer & Grossniklaus, 2012).

### **2.5.2 Descripción de TrxG en *Arabidopsis***

Al igual que en animales el grupo Trithorax en *Arabidopsis* está constituido por un grupo diverso de proteínas definidas por su capacidad de contrarrestar el efecto de PcG. De manera general se pueden dividir en 1) proteínas que cuentan con un dominio SET y que tienen la actividad de metiltransferasas, 2) proteínas tipo COMPASS, 3) factores remodeladores de cromatina y 4) Coactivadores (Tabla1).

La familia de proteínas con dominio SET pertenecientes al grupo TrxG se ha diversificado en *Arabidopsis* (Tabla 1). La duplicación de un gen-*TRX* ancestral ha producido cinco copias de este gen agrupados en dos subgrupos: *ARABIDOPSIS TRITHORAX HOMOLOG 1 y 2* (*ATX1*, *ATX2*) en un grupo y *ATX3-5* en otro. La separación de estos dos subgrupos se debe a la presencia de un dominio DAST (Domain associated with SET in Trithorax) en el primer subgrupo y la ausencia del mismo en el segundo (Baumbush *et al.*, 2001). Adicionalmente se han clasificado otras siete proteínas relacionadas a Trithorax llamadas *Arabidopsis* Trithorax-related ATXR (*ATXR1-7*) de las cuales sólo *ATXR7* está relacionada filogenéticamente con la familia TRX al ser ortólogo de SET1 (Avramova, 2009). También existen cuatro proteínas homólogas de ASH1: *ABSENT*, *SMALL*, *OR HOMEOTIC HOMOLOG* (*ASHH1-4*) y tres de ASH related: *ABSENT*, *SMALL*, *OR*

HOMEOTIC RELATED (ASHR1-3) (Baumbush *et al.*, 2001; Avramova, 2009). De todos estos miembros de TRX, el más estudiado es ATX1 y fue el primero en caracterizarse en *Arabidopsis* (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003). ATX1 regula a genes homeóticos que determinan el desarrollo de órganos florales, participa en la respuesta a estrés, señalización celular, transición a la floración y participa en el desarrollo de otros órganos como raíz, hoja y tallo (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003). ATX1 tiene actividad de tri-metiltransferasa de H3K4; sin embargo, no es el único responsable de metilar esta lisina, de hecho la pérdida de *ATX1* (mutante *atx1-1*) deja cerca del 85% de la distribución genómica de H3K4me3 en el genoma de *Arabidopsis* (Alvarez-Venegas & Avramova, 2005) y se sabe que ATX2, ATXR3, ATXR7, ASHH1 y ASHH2 son capaces de metilar a H3K4 (Zhao *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008; Tamada *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010).

El mecanismo por el cual actúa ATX1 en la activación transcripcional implica su participación en el reclutamiento de la TATA binding protein (TBP) y la RNA Polymerase II (POLII) afectando la estabilidad y formación del complejo de pre-iniciación (PIC) en la región promotora de ciertos genes. Posterior a la unión del PIC, la serina 5 de la POL II es fosforilada, la cual ayuda a reclutar a ATX1 y esta, establece un pico de H3K4me3, a 300pb río abajo del sitio de inicio de transcripción promoviendo la elongación (Ding *et al.*, 2011).

ATX1 y ATX2 son 75% idénticos a nivel de aminoácidos; sin embargo su actividad bioquímica es distinta. ATX1 se encarga de la H3K4me3 y ATX2 de la H3K4me2 (Saleh *et al.* 2008). La mutante de pérdida de función en ATX2 (*atx2-1*) no muestra un fenotipo distinto de las silvestres pero la doble mutante *atx1-1 atx2-1* genera plantas que tienen una floración más temprana que la mutante simple *atx1-1*, esto se debe a la pérdida de expresión del gen represor de la floración tipo MADS-box *Flowering Locus C (FLC)*, ya que ATX1 tiene la capacidad de unirse al locus de *FLC* e inducir su expresión por medio de la deposición de la H3K4me3 y en este proceso se requiere también de la función de ATX2 (Pien *et al.*, 2008). Se ha reportado que otros miembros de TrxG como ATXR7, ASHH2, ASH2R y ASHH1, también participan en la regulación de *FLC* mediante el establecimiento

de marcas de metilación H3K4me2/3 y H3K36me2/3 en el locus de *FLC* (Zhao *et al.*, 2005; Pien *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Tamada *et al.*, 2009; Berr *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos acerca de la regulación de *FLC* por miembros del grupo TrxG han dado pie al análisis de la función del complejo COMPASS. El complejo At-COMPASS-like en *Arabidopsis* está compuesto por las proteínas *Arabidopsis* ASH2 Relative (ASH2R), RbBP5 like (RBL) y WDR5a/b. Se postula que al igual que en humanos este complejo tiene funciones importantes en la activación de la transcripción, tal y como se ha demostrado en las plantas mutantes de pérdida de función de cada uno de los miembros del complejo COMPASS-like, las cuales tienen un fenotipo de floración temprana debido a una desregulación en la activación de *FLC* (Jiang *et al.*, 2011; Ding *et al.* 2012).

Además, se ha reportado que otros genes TrxG están implicados en el desarrollo del esporofito y gametofito, como es el caso de ATXR3 que regula a genes esenciales de gametofito como SPOROCTELESS (*SPL*) y MALE STERILITY1 (*MS1*) mediante la H3K4me3, mientras que SDG4/ASHR3 está involucrado en las últimas fases de desarrollo de polen (Cartagena *et al.*, 2008; Thorstensen *et al.*, 2008; Berr, 2009).

En 2009 se reportó un novedoso miembro TrxG llamado *ULTRAPETALA1* (*ULT1*) que tiene la capacidad de contrarrestar los efectos del miembro del grupo PcG, CLF, impidiendo la deposición de la H3K27me3 en el locus de *AGAMOUS* (*AG*). Además *ULT1* puede interactuar con *ATX1* y actuar como un cofactor de éste, regulando la deposición de H3K4me3 en *AG* (Fletcher *et al.*, 2009). *ULT1* codifica para una proteína rica en cisteína con un dominio tipo B-box like y se expresa en todo el meristemo de inflorescencia y de la flor. La pérdida de función causa que los meristemas de inflorescencia produzcan más meristemas florales de lo normal y que los meristemas florales produzcan órganos extras (Carles *et al.*, 2004). El gen homólogo a *ULT1*, *ULT2* tiene una función redundante en la regulación de genes MADS-box como *AG*, *AP1* y *AP3*. *ULT1* y *ULT2* pueden interactuar sin embargo aún no se determina si existe una interacción entre *ATX1* y *ULT2* (Monfared *et al.*, 2013).

**Tabla 1.** HKMT, coactivadores y miembro del complejo COMPASS que conforman el grupo TrxG en *Arabidopsis* (Tomado de Sánchez *et al.*, en proceso)

Gen	GI	Función	Referencia
ATX1/SDG27	AT2G31650	HKMTasa	(Alvarez-Venegas <i>et al.</i> , 2003)
ATX2/SDG30	AT1G05830	HKMTasa	(Saleh <i>et al.</i> , 2008)
ATXR3/SDG2	AT4G15180	HKMTasa	(Guo <i>et al.</i> , 2010)
ATXR7/SDG25	AT5G42400	HKMTasa	(Berr <i>et al.</i> , 2009)
ASHH1/SDG26	AT1G76710	HKMTasa	(Xu L., <i>et al.</i> , 2007)
ASHH2/SDG8	AT1G77300	HKMTasa	(Xu <i>et al.</i> , 2007)
ASHR3/SDG4	AT4G30860	HKMTasa	(Cartagena <i>et al.</i> , 2008)
ULT1	AT4G28190	Co-activador de ATX1	(Carles & Fletcher, 2009)
ULT2	AT2G20825	Co-activador de HKMTs	(Monfared <i>et al.</i> , 2013)
WDR5a	AT3G49660	Miembro del COMPASS-like complex	(Jiang <i>et al.</i> , 2011)
WDR5b	AT4G02730	Miembro del COMPASS-like complex	(Jiang <i>et al.</i> , 2011)
ASH2R	AT1G51450	Miembro del COMPASS-like complex	(Jiang <i>et al.</i> , 2011)
RBL	AT3G21060	Miembro del COMPASS-like complex	(Jiang <i>et al.</i> , 2011)

## 2.6 Regulación epigenética en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*

La estructura de la raíz de *Arabidopsis* es relativamente simple; siguiendo su eje ápico-basal se puede dividir en tres zonas que representan los estadios de



desarrollo de la raíz en función de los comportamientos de las células que las conforman (Figura 4 A): 1) La zona meristemática que se encuentra en la región más distal y contiene al nicho de células troncales y células en estado proliferativo activo. 2) La zona de elongación, en la cual las células provenientes del meristemo dejan de dividirse e inician un rápido proceso de crecimiento y 3) La zona de diferenciación donde las células cesan su crecimiento y adquieren su estado final de diferenciación que se define por la aparición de pelos radiculares o extensiones celulares en algunas de las hileras del tejido de la epidermis, y células con características de células de tejidos de floema y xilema maduras en los tejidos internos, entre otros marcadores de diferenciación (Verbelen *et al.*, 2014). En la parte distal de la zona meristemática (Figura 4 B y C) se encuentra el nicho de células troncales, el cual está formado por un grupo de cuatro células con muy baja actividad de proliferación, denominadas Centro Quiescente (CQ). Estas células están rodeadas de las células iniciales que son las células troncales propiamente dichas (Bennett & Scheres, 2010). Por arriba están las iniciales del haz vascular (estele), a los lados las iniciales que darán lugar a las células del periciclo, la endodermis, así como las que darán lugar a las células de la epidermis y de la cofia lateral que cubre la parte más apical de la raíz. Por debajo o en la parte más distal (apical) del CQ se encuentran las iniciales de la columela (Figura 4 C). Las células iniciales se dividen continuamente sin comprometer su estado “prediferenciado” dando origen a una célula que se incorpora a cada uno de los tejidos de la raíz, y otra que queda indiferenciada. En el eje radial los tipos de tejidos de la raíz son de adentro hacia afuera, el haz vascular, la endodermis, el córtex y la epidermis. El nicho de células troncales del meristemo apical de la raíz (RAM; por sus siglas en inglés) se mantiene en parte por la actividad combinatoria de factores transcripcionales, mecanismo que también se observa en células troncales de animales, y denota la importancia que tienen estos circuitos de factores transcripcionales en el mantenimiento de estas células (Azpeitia *et al.*, 2013). Estudios de cromatina en células troncales de mamíferos indican que cuando la cromatina se encuentra compactada reprime a genes de diferenciación

y mantiene activos a reguladores de células troncales y factores de proliferación (Scheres, 2007). Sin embargo, estudiar los mecanismos epigenéticos que mantienen la pluripotencia en animales *in vivo* ha sido complicado ya que las células pluripotenciales solo están de manera transitoria y en pequeños números en localizaciones de difícil acceso en tejidos internos (Li *et al.*, 2012). En este sentido el RAM de *Arabidopsis* es un sistema ideal para estudiar los mecanismos epigenéticos que gobiernan la pluripotencia y la diferenciación celular, y el papel de distintos moduladores moleculares a nivel transcripcional y epigenético del balance entre proliferación y diferenciación. En plantas las células troncales están bastante accesibles en los meristemas que persisten durante todo el ciclo de vida de las plantas. Además al estar definido el CQ como centro organizador del nicho de células troncales se puede estudiar su función como organizador en los meristemas, de manera cuantitativa y en vivo (Dinneny & Benfey, 2008; Heidstra & Sabatini, 2014). Hasta ahora poco se sabe sobre la regulación epigenética de los genes que se han descrito como importantes en la formación de los patrones celulares del NCT de la raíz y acerca de la función de las proteínas de los complejos PcG y TrxG en la regulación del RAM.

La remodelación dinámica de la cromatina juega un papel importante en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. Por ejemplo, la organización de la cromatina de genes que son importantes en las redes que subyacen tras la diferenciación celular en la epidermis de la raíz en células con pelos radiculares (tricoblastos) y sin pelos radiculares (atricoblastos) en la epidermis de la raíz depende del mantenimiento del estado de metilación de la H3K9 mediado por GL2-expression modulator (GEM) (Caro *et al.*, 2007) y existe una correlación entre la expresión de los genes específicos de tricoblastos y atricoblastos con marcas de H3K4me y H3K27me denotando una reorganización epigenómica sobre todo en locus específicos (Deal & Henikoff, 2010). Marcas de acetilación en la cromatina establecidas por complejos GCN5 son importantes para el mantenimiento del NCT en el RAM (Kornet & Scheres, 2009). Además niveles elevados de la H3K27me3 mediada por PcG inhibe la actividad meristemática y el factor remodelador de

cromatina PICKLE regula el mantenimiento de RAM de manera antagónica a CLF en raíz definiéndose como miembro TrxG (Aichinger *et al.*, 2011).

A pesar de que se han realizado algunos estudios de regulación epigenética por remodelación de cromatina en la raíz de *Arabidopsis*, aún no se entiende bien el papel de la H3K4me3 y del resto de los miembros de TrxG en el desarrollo del RAM. Solo se ha determinado que la proteína ATXR3 provoca una disminución de la H3K4me3 en la raíz y en especial en el nicho de células troncales asociado a una desorganización de este y una reducida actividad meristmática (Yao *et al.*, 2013). Dado que se ha observado que los complejos PcG y al parecer TrxG en *Arabidopsis* son específicos para ciertas etapas de desarrollo, será importante determinar cuáles elementos de TrxG, participan en la proliferación/diferenciación y en el mantenimiento de los nichos de células troncales.

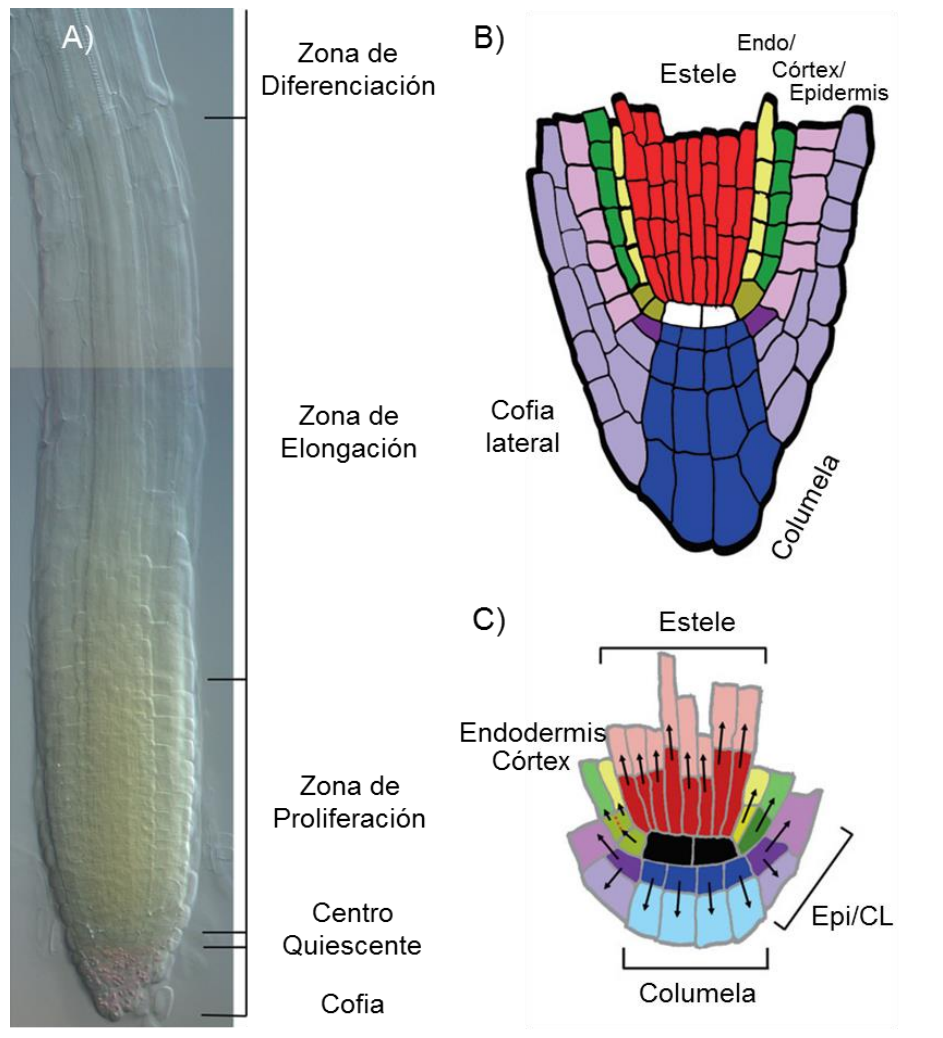


Figura 4. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Esquema de meristemo apical de la raíz (RAM) donde se pueden apreciar las capas celulares (tejidos) que la componen. B) Nicho de células troncales de la raíz. Las flechas indican el plano de división celular, en negro se aprecia el Centro Quiescente (CQ), en morado a las células iniciales de Epidermis/Cofia lateral (Epi/CL), en verde a las iniciales de Endodermis/Córtex, en rojo a las iniciales del estele (periciclo y tejidos vasculares) y en azul marino a las iniciales de la Columela. C) Representación de las distintas regiones de comportamiento celular a lo largo del eje apico basal de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Zona de Proliferación (ZP), Zona de Elongación (ZE), Zona de Diferenciación (ZD). Modificada de Bennett y Scheres (2010).

## 2.7 Antecedentes Inmediatos

Se han caracterizado algunos componentes necesarios para mantener el nicho de células troncales en el RAM. Estos estudios sugieren tres principales vías. Una depende de la función de los genes PLETHORA involucrados en el transporte de auxinas. Otra vía depende de los genes *SHORTROOT/SCARECROW (SHR/SCR)* cuya interacción a nivel de proteína tiene varios blancos transcripcionales como *MAGPIE (MGP)* y cuya función está implicada en el patrón radial de la raíz (Welch *et al.*, 2007). Sin embargo, los modelos de redes de regulación genética han demostrado que hay componentes adicionales sin descubrirse para llegar a tener un módulo regulatorio suficiente para el establecimiento y mantenimiento del NCT de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Azpeitia *et al.*, 2010). Los factores transcripcionales de la familia MADS-box juegan un papel esencial en casi todos los procesos de desarrollo de los animales y las plantas (Theissen *et al.*, 200; Smaczniak *et al.*, 2012) y en años recientes se han caracterizado varios de ellos, en términos de su papel como reguladores del desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*. *XAANTAL1/AGL12* es un promotor de la proliferación celular y está implicado en la regulación del ciclo celular en las células meristemáticas del RAM (Tapia-Lopez *et al.*, 2008; García en proceso). *XAANTAL2/AGL14* se requiere para la circunscripción del nicho de células troncales y es un regulador transcripcional de transportadores de eflujo de auxina; en particular *PIN1* y *PIN4* (Garay-Arroyo *et al.*, 2013).

La regulación del desarrollo de la raíz por diversos factores de transcripción sugiere que la regulación epigenética tiene funciones importantes en el desarrollo de este tejido. En nuestro laboratorio, estamos interesados en estudiar la función que tienen los complejos PcG y TrxG en el desarrollo de la raíz usando a *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo, y mediante el estudio de algunas mutantes de pérdida de función de dos miembros del complejo PcG (CLF y LHP1). Otros miembros del laboratorio han encontrado que CLF y LHP1 se requieren para reprimir la expresión de los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17*

y *AGL19* implicados en el desarrollo de la raíz, indicando la importancia del complejo PcG en el desarrollo radicular (Flores y Sánchez, datos no publicados).

Por otra parte, recientemente se ha reportado que el alelo mutante *atx1-1* afecta la duración del ciclo celular, producción celular y la transición de células de la proliferación a la elongación en el RAM, además las células del centro quiescente tienen una forma irregular y están más expandidas que en las silvestres (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Estos análisis sugieren que ATX1 es importante en el desarrollo de la raíz. Sin embargo, no se ha explorado cuáles son los genes blanco de ATX1, en este tejido y si su función requiere de otras proteínas del complejo TrxG como el cofactor ULT1. Por lo anterior, en esta tesis nos enfocamos en determinar los genes de raíz que son regulados por ATX1 y si esta proteína requiere del cofactor ULT1 para realizar su función en raíz. Dado que ATX1 y ULT1 actúan de manera antagónica con PcG en la regulación de genes de floración, nos enfocaremos en determinar si los genes MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* que son reprimidos por CLF y LHP1 también son regulados por ATX1 pero para inducir su expresión. Además se trata de inferir si la función de ATX1 y ULT1 va en el mismo sentido, por características fenotípicas similares.

### **3. Hipótesis**

Dado que los miembros de PcG: CLF y LHP1, regulan negativamente la expresión de los factores transcripcionales MADS-box *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* implicados en el desarrollo de la raíz, entonces los miembros de TrxG: *ATX1* y *ULT1* regularán positivamente su expresión.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la función de *ATX1* en la regulación de genes MADS-box importantes en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Genotipificar y caracterizar la línea de inserción del alelo *atx1-3*.
- Determinar la función de *ATX1* y *ULT1* en el desarrollo de la raíz, con énfasis en la zona de proliferación y nicho de células troncales del meristemo apical, a través del estudio de las mutantes *atx1-3* y *ult1-3*.
- Determinar la expresión de los factores transcripcionales tipo MADS-box: *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* en la mutante *atx1-3*.
- Determinar la localización de *ULT1* en la raíz de *A. thaliana*.



## 5. Materiales y Método

### 5.1 Material Biológico

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipos Columbia 0 (Col 0), Wassilewskija (Ws), Lansberg erecta (Ler) y plantas mutantes por inserción de T-DNA *atx1-1* (Alvarez-Venegas R., 2003) ecotipo Ws, donadas por el Dr. Dubrovsky, *atx1-3* (SALK\_105214) ecotipo Col y *ult1-3* (SALK\_074642; Carles & Fletcher, 2009) ecotipo Ler (Figura 5.)

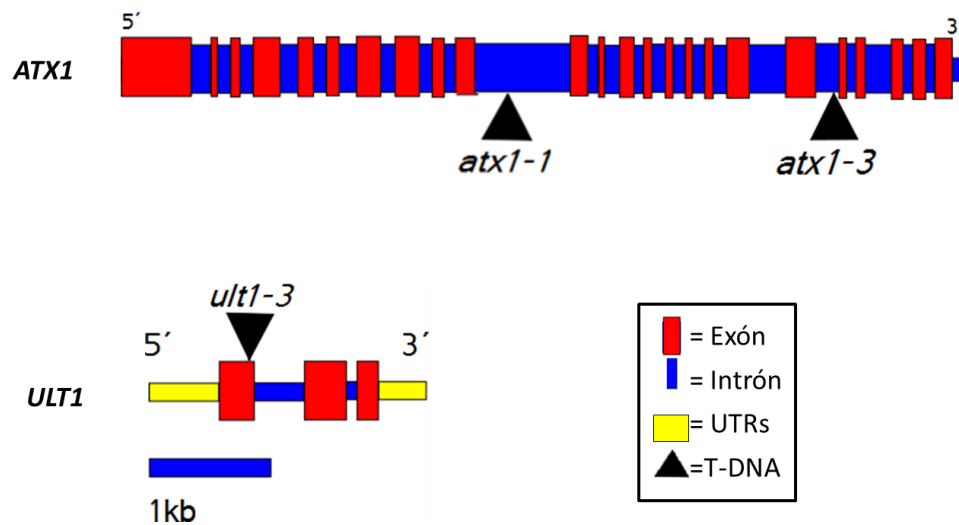


Figura 5. Esquema de los genes *ATX1* y *ULT1* con las inserciones de las mutantes *atx1-1*, *atx1-3* y *ult1-3*.

Para los ensayos de clonación se utilizaron células de *Escherichia coli* TOP10.

Para la generación de plantas mutantes se utilizaron células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58.

### 5.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas se desinfectaron en una solución de Hipoclorito de sodio comercial (NaClO) (Cloralex) al 20% y 0.01% de polisorbato-20 (Tween-20, Sigma-Aldrich) manteniéndolas en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente, después

se lavaron las semillas cuatro veces con agua estéril. Con el fin de sincronizar el metabolismo y la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 72 horas a 4°C en oscuridad.

Las semillas estratificadas fueron sembradas en cajas Petri con medio MSS que contiene: MS al 0.2X (Murashige y Skoog 1962, MP Biomédicals), MES monohidratado al 0.05% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich), agar al 1% (Becton, Dickinson and Company) a un pH de 5.6 ajustado con KOH 1M. Si el experimento lo requiriera, las plántulas se transferían a tierra (Tierra Metro Mix 200) esterilizada por autoclave a los 8 o 10 días. Todas las plantas se germinaron y crecieron a una temperatura de 22°C, con luz blanca y fría a una intensidad aproximada de 110  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  en condiciones de día largo (16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad).

### **5.3 Caracterización de las plantas mutantes**

Para genotipificar las plantas mutantes *atx1-3* y *ult1-3*, se realizaron extracciones de DNA de una hoja por planta a analizar. Para la extracción, el tejido fue congelado a -70°C y triturado sin descongelar hasta formar un polvo fino, posteriormente se adicionó a cada muestra 500 $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (100mM de TrisHCL pH=8, 50mM de EDTA, 500 $\mu\text{M}$  de NaCl, 1% de SDS y 0.07% de  $\beta$ -mercaptoetanol). Las muestras se incubaron a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 130 $\mu\text{l}$  de KAc 5M y se incubaron a 4°C por 5 minutos. Se adicionaron 150 $\mu\text{l}$  de cloroformo y se centrifugaron a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. Para precipitar el DNA, a cada sobrenadante obtenido se le adicionaron 665 $\mu\text{l}$  de isopropanol y 65 $\mu\text{l}$  de AcNa 3M y se mantuvieron a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13000rpm y el DNA precipitado se lavó con etanol al 70% tres veces. El DNA obtenido se resuspendió en H<sub>2</sub>O miliQ y se cuantificaron las muestras en un equipo nanodrop (Nanodrop 2000 Thermo scientific).

Con el DNA obtenido se realizaron los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés; Polymerase Chain Reaction). Las reacciones se hicieron usando el kit de PCR de Invitrogen en un volumen final de

15µl. Cada reacción contenía 1X PCR Rnx Buffer, 1.5mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2mM dNTPs, 0.4 mM de oligonucleótidos (Anexo, Tabla S2), ~150ng de DNA y 1U Taq DNA Polimerasa.

#### **5.4 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz**

Para observar los meristemas, las raíces se sometieron a dos tratamientos. El primero consistió en teñir las células con una solución de lugol al 1% por unos segundos, después se aclararon con una solución de aclaramiento (80% de hidrato de cloral y 10% de glicerol) para su posterior observación (Blancaflor *et al.*, 1998). Esta tinción permite ver los gránulos de almidón de la cofia de la raíz. El otro tratamiento se basó en Dubrovsky y colaboradores, (2009) y consistió en dejar las raíces durante cuatro horas en solución de fijación (4% de formaldehído en 0.025M pH7.2), hidratarlas en una solución de DMSO 2% con glicerol al 30% durante 30 minutos. Posteriormente se montaron en una solución de aclaramiento (4.2M NaI, 8mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> preparados en glicerol al 65 % con DMSO al 2 %). Las raíces se visualizaron en un microscopio óptico Olympus BX60 a un aumento 40X.

Para determinar el tamaño del meristemo se contó sólo una fila de células del córtex a partir del centro quiescente hasta la primera célula que se encontraba ya en la zona de elongación.

#### **5.5 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal**

Para observar las plantas por microscopia confocal se utilizó el método de Fulcher y Sablowski (2009), el cual consiste en montar las raíces en medio MSS con 5µg/ml de Ioduro de propidio (IPr). Se usó el microscopio confocal (Olympus FV 1000) a una longitud de onda de 535 nm con láser de diodo. Para analizar las plantas con actividad de GFP se utilizó una longitud de onda de 488nm.

#### **5.6 Extracción de RNA y RT-PCR**

La extracción de RNA se realizó a partir de ~100 mg de tejido de raíz. El tejido fue triturado sin descongelar hasta formar un polvo fino; cada muestra fue resuspendida en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos; después se realizaron dos extracciones con 0.2ml de

cloroformo centrifugando a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El RNA en solución fue precipitado con 1ml de isopropanol frío incubándose durante 20 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10000rpm durante 15 minutos a 4°C. Una vez precipitado el RNA se lavó 3 veces con etanol 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O miliQ.

Las muestras se cuantificaron en nanodrop y para corroborar su integridad y concentración se corrieron en un gel de agarosa-TBE al 1.2%; para ello las muestras de RNA (entre 150 a 500ng) se diluyeron en 12µl de buffer de carga, el cual contiene 20% de formamida y 0.45% de SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa. La integridad de las muestras se determinó por la visualización de los RNAs ribosomales y para calibrar las muestras se ajustó la concentración por densitometría. Las muestras calibradas se utilizaron para realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA), utilizando el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT” (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen final de 20µl, para ello se agregó en un tubo para PCR, 0.5µM de oligonucleótido dT y 0.5mM de dNTPs con 500 ó 700ng de RNA. Esta reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10 mM de DTT, 40U de RNAsaout y 200U de la enzima SuperScript II RT; la síntesis de cDNA se realizó a 42-°C por 50 minutos. La enzima se inactivó a 70°C por 15 minutos.

El cDNA obtenido se utilizó para realizar ensayos de PCR semicuantitativos, los cuales se realizaron bajo condiciones específicas para cada par de oligonucleótidos de un gen específico (Anexo, Tabla S3).

## **5.7 Clonación del gen completo de *ULT1* (pULT1:ULT1:GFP)**

### **5.7.1 Amplificación del gen *ULT1***

Para esta clonación, se realizó una extracción de DNA a partir de hojas. El tejido congelado se trituró hasta obtener un polvo fino y se le adicionaron 500µL de buffer de extracción (0.05M de TrisHCL pH=8, 0.01M de EDTA, 2% de SDS, 0.1M

de LiCl y 1  $\mu$ L de Proteinasa K), se mezcló por inversión durante 15 minutos y se centrifugó a 3500rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Al sobrenadante obtenido se le agregó 20  $\mu$ g/ml de RNasaA y se dejó incubando a 37°C por 30 minutos para después realizar dos extracciones con 25/24/1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. A este sobrenadante se le agregó acetato de amonio 10M y dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA a -20°C durante una hora. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H<sub>2</sub>O miliQ para después ser cuantificado por nanodrop.

El gen de *ULT1* fue amplificado utilizando la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad AccuPrime de Invitrogen. Para esto se diseñaron dos oligonucleótidos que amplifican desde 2000pb arriba del ATG hasta un codón antes del codón de término del gen (Anexo, Tabla S4).

Para la reacción de amplificación, se requirieron 250ng de DNA genómico a los que se les adicionó 1X del Buffer II (600mM Tris-SO<sub>4</sub> pH=8.9, 180 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM dGTP, 2mM dATP, 2mM dTTP, 2mM dCTP, proteína termoestable y 10% glicerol), 0.4mM de Oligonucleótidos y 1U de Accuprime Taq High Fidelity en un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción se mezcló suavemente y se colocó en un termociclador con un programa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C y 2 minutos de extensión a 68°C. Una vez concluida la amplificación se corrieron 5  $\mu$ l del producto en un gel de agarosa para verificar el tamaño y la especificidad de la amplificación. Dado que el producto de PCR fue totalmente específico, solo se realizó una extracción fenólica del producto total de PCR y se precipito el DNA con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 volúmenes de NaAc 3M.

Al producto de DNA obtenido se le adicionó 5U de Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen) junto con 0.2mM de dATPS y se colocó a 72°C durante 10 minutos para adicionar bordes de adenina en los extremos del fragmento de DNA que servirán para su clonación.

### **5.7.2 Clonación**

El producto purificado se clonó en el vector pCR®8/GW/TOPO del sistema gateway, utilizando el kit (pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit) de Invitrogen. La reacción consistió en añadir 145ng de la secuencia amplificada, 10ng de plásmido y una solución salina de 0.2 M de NaCl y 0.01M de MgCl<sub>2</sub> para después dejar incubando a 22°C 12 horas. El producto de esa reacción fue introducido en células termocompetentes de *E. coli* TOP10, las bacterias que contenían el plásmido fueron seleccionadas con 50µg/ml de espectinomicina. Para analizar los productos plasmídicos se realizaron extracciones de DNA de las bacterias mediante la técnica de lisis alcalina, la cual consistió en crecer 5ml de cultivo de bacterias transformadas y centrifugarlas a 500rpm durante 10 minutos, el paquete celular obtenido se resuspendió en 250µl de un buffer I (50mM glucosa, 25mM TrisHCl pH=8 y 10mM EDTA), después se le añadió 250µl de buffer II (0.2N NaOH y 1% SDS) y se mezcló suavemente para añadir 350 µl de buffer III (3M AcK y 11.5% de ácido acético). Las muestras se mezclaron suavemente y después se realizó una extracción con 150µl de cloroformo, se precipitó el DNA con 2.5 volúmenes de etanol 100% y se lavó con etanol al 70% para finalmente resuspender en H<sub>2</sub>O miliQ. Los plásmidos fueron analizados con enzimas de restricción y PCRs para determinar la presencia y dirección de inserto en el vector. Los plásmidos seleccionados se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **5.7.3 Recombinación**

Una vez que se verificó que los plásmidos seleccionados tenían la secuencia correcta y en la orientación adecuada, se realizó una reacción de recombinación LR utilizando la LR Clonasa del sistema Gateway de Invitrogen, utilizando como vector donador a pCR®8/GW/TOPO+pULT1:ULT1 y a pGWB4 como vector receptor (Nakagawa *et al.* 2007). El vector pGWB4 del sistema GATEWAY contiene las secuencias necesarias para integrarse en el genoma de las plantas, además contiene resistencia a kanamicina e higromicina y una construcción sin promotor del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y que al hacer la

recombinación la GFP quedaría hacia la región 3' del gen pULT1:ULT, haciendo posible el uso de GFP como reportero de expresión. La reacción recombinante consistió en adicionar 150ng del vector donador (pCR®8/GW/TOPO+pULT1:ULT1) y 150ng del vector receptor (pGWB4), 1.5X del buffer LR Clonase Reaction y 2µl de la enzima LR clonasa. La reacción se incubó a 22°C toda la noche, posteriormente se detuvo la reacción con 1µl de Proteinasa K a 37°C por otros 10 minutos. El producto resultante fue empleado para transformar células de *E. coli* TOP10, las cuales fueron crecidas en medio con kanamicina a 50 µg/ml. Las colonias resistentes se analizaron por medio de ensayos de restricción, PCR y secuenciación para verificar la presencia de pULT1:ULT1 y su orientación.

#### **5.7.4 Transformación y obtención de plantas que expresan pULT1:pULT1:GFP**

El plásmido pULT1:ULT1:GFP obtenido fue empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, las cuales a su vez se usaron para transformar plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0, Ler y plantas mutantes *atx1-3* y *ult1-3* para probar su complementariedad. La transformación de *Arabidopsis* por infiltración consistió en crecer la cepa *Agrobacterium tumefaciens* con el gen de pULT1:ULT1:GFP en medio LB líquido con kanamicina a 50µg/ml y rifampicina a 100 µg/ml. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para obtener un botón que fue resuspendido en una solución con 5% sacarosa y 0.05% Silwet L-77. Esta solución con *Agrobacterium* fue empleada para sumergir las inflorescencias inmaduras de las plantas a transformar durante 90 segundos. Posteriormente se dejaron creciendo hasta obtener semillas. Las semillas se pusieron a crecer en kanamicina a 50 µg/ml para seleccionar las plantas con los insertos de T-DNA, y seguir la segregación de los mismos. Finalmente se corroboró la presencia de la construcción observando a GFP mediante microscopía confocal.

## 6. Resultados

### 6.1 Expresión *in silico* de los genes miembros de TrxG en la raíz de *Arabidopsis*

Los mapas de expresión ayudan a entender cómo es la expresión de un grupo de genes en distintos tejidos de un órgano y son una buena guía en estudios de genética reversa (Birnbaum *et al.*, 2003). Por ello se realizó un análisis de expresión génica *in silico* de los miembros del grupo TrxG utilizando como herramienta el portal *Arabidopsis* eFP Browser en donde se encuentran las bases de datos de la expresión génica en diferentes tipos celulares de la raíz de *Arabidopsis* (Birnbaum *et al.*, 2003; Nawy *et al.*, 2005). Al analizar la expresión de los genes TrxG en las células del centro quiescente se encontró que todos los genes se expresan en estas células, teniendo mayor expresión los genes *ATX1*, *WDR5b* y *ULT1*, éste último con niveles incluso similares a las de un factor transcripcional típico de raíz como es *SCARECROW (SCR)* (Figura 6B). Por otra parte 14 de 19 genes analizados, se expresan más en las células de la zona de proliferación que en las de diferenciación sugiriendo un papel importante de TrxG en la organización del nicho de células troncales y en la proliferación celular del meristemo. Los genes con una mayor diferencia de expresión en la zona de proliferación con respecto a la de diferenciación son los genes *ATXR6*, *ATXR5* y *ULT1*, por lo que será interesante analizar la función de estos genes a través de mutantes de pérdida de función (Figura 6C). Los resultados de expresión de *ATX1* y *ULT1* son relevantes para el análisis ya que denotan su presencia en la zona de proliferación y en el centro quiescente.



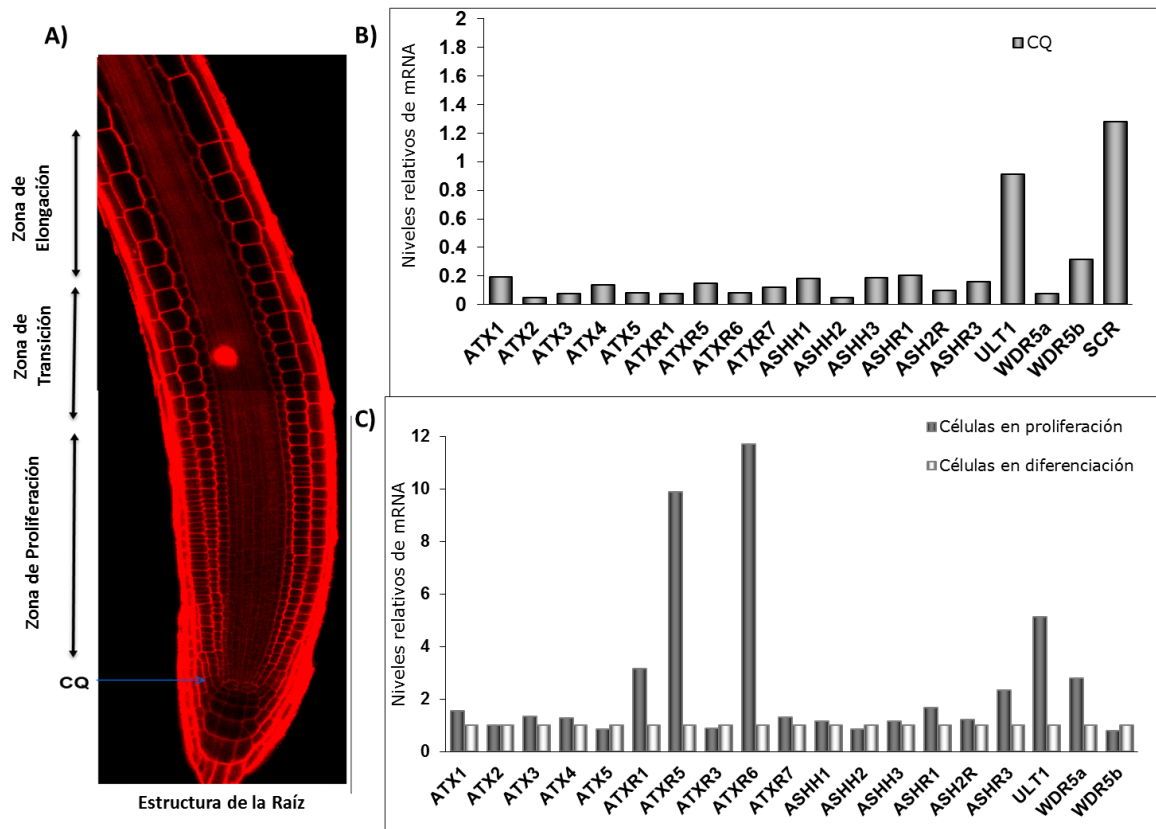


Figura 6. Expresión de los genes del grupo TrxG en la raíz de *Arabidopsis*. A) Estructura de la raíz de *Arabidopsis*. CQ= centro quiescente. Expresión de los genes miembros de TrxG en: B) Células del CQ, y C) en las células en proliferación y en diferenciación de la raíz. SCR se utilizó como un gen control que se expresa en el CQ. Los valores de proliferación y diferenciación corresponden a los valores de expresión en células de córtex. Datos tomados de Brinbaum *et al.*, 2003 y de la base de datos *Arabidopsis* eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

## 6.2 Caracterización de una mutante de pérdida de función para ATX1 (*atx1-3*)

Las mutantes por inserción de T-DNA son una herramienta importante para llevar a cabo estudios funcionales de genética reversa. Por lo que para estudiar la función de la histona metiltransferasa ATX1 en el desarrollo de la raíz, obtuvimos

unas semillas de T-DNA del instituto SALK (Salk\_105214) (Alonso *et al.*, 2003) y las nombramos *atx1-3*. Estas semillas tienen la inserción de T-DNA en el intrón 19 entre el exón 19 y 20 antes del dominio SET (Figura 7A y B). Para verificar que las plantas a analizar tuvieran la inserción de T-DNA en ambos alelos, se diseñaron los oligonucleótidos ATX1-F1 y ATX1-R1 (flechas naranjas) que flanquean el sitio de inserción de T-DNA y que amplifican una banda de 900pb que corresponde al alelo silvestre, mientras que los oligonucleótidos LBC1 (flecha gris) y ATX1-R1 amplifican una banda de 355pb y que corresponde al alelo mutante que contiene la inserción de T-DNA (Figura 7A y C). Debido a que las semillas provenientes del instituto SALK eran heterocigotas, hasta la tercera generación se obtuvieron plantas homocigotas mutantes (*atx1-3 (-/-)*) como se puede observar en la figura 7C.

Las líneas mutantes por T-DNA pueden provocar distintos efectos a nivel transcripcional. Por ello es importante analizar el efecto específico de cada línea mutante. Mediante RT-PCR semicuantitativo se determinó la expresión de *ATX1* en las mutantes *atx1-3*, al mismo tiempo se utilizó como control la mutante *atx1-1* previamente reportada y que está en el fondo Wassilewskija (Ws) (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003). Como se puede observar en la Figura 8B, la mutante *atx1-3* tiene una ligera expresión por lo que la consideramos como de baja expresión a diferencia del alelo *atx1-1* que provoca una pérdida de función total.

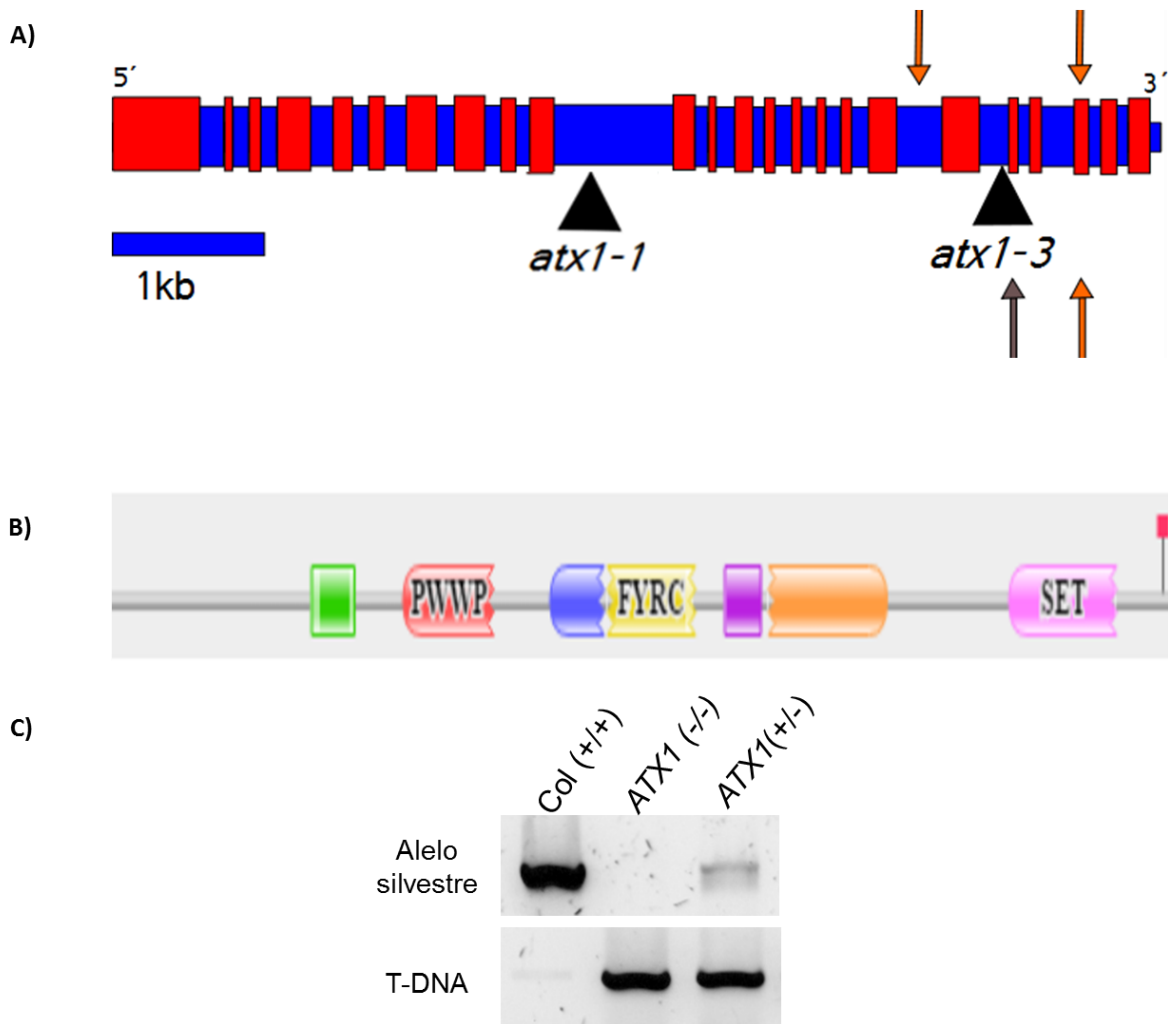


Figura 7. Genotipificación del alelo *atx1-3* en fondo Columbia. A) Esquema del gen *ATX1* con los sitios de inserción de T-DNA para los alelos *atx1-1* y *atx1-3* (triángulos negros). Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos ATX1-F1 y ATX1-R1 (flechas naranjas) y LBC1 (flecha gris). B) Esquema de los dominios de la proteína ATX1. Cuadro verde: dominio TUDOR, cuadro rojo: dominio PWWP, cuadro azul: dominio F/Y amino terminal, cuadro amarillo: F/Y carboxilo terminal, cuadro morado: dominio PHD, cuadro naranja: ePHD, cuadro rosa: dominio SET. C) Bandas amplificadas de DNA de plantas silvestres (Col) y mutantes *atx1-3* homocigotas ( $ATX1^{(-/-)}$ ) y heterocigotas ( $ATX1^{(+/-)}$ ).

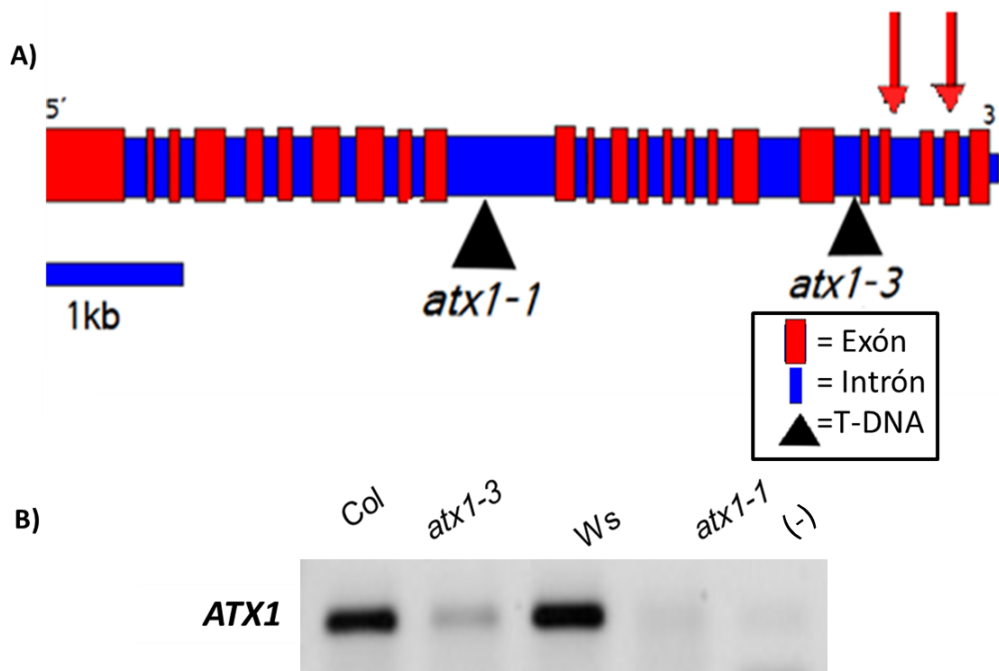


Figura 8. Expresión de *ATX1* en la mutante *atx1-3*. A) Mapa del gen *ATX1* mostrando los alelos *atx1-1* y *atx1-3* (triángulos negros) y los oligonucleótidos MP-ATX1pcr-F y MP-ATX1pcr-R usados para analizar la expresión de *ATX1* (flechas rojas). B) Expresión de *ATX1* en plantas silvestres (Col y Ws) y plantas mutantes (*atx1-3* y *atx1-1*) de 5 días post-siembra.

### 6.3 Las plantas *atx1-3* son de floración temprana.

Al analizar de manera general el fenotipo aéreo de las plantas *atx1-3* no se observan alteraciones morfológicas claras en hoja, tallo y flor, pero es importante mencionar que el tamaño de la roseta parece ser más pequeña, sin embargo no se cuantifico. Por otra parte en condiciones de día largo se observa un ligero adelanto en el tiempo de floración de *atx1-3*. En promedio, las plantas mutantes florecieron a los 27 días ( $27.23 \pm 0.1802$  N=62) mientras que las silvestres lo hicieron a los 28 días ( $28.00 \pm 0.1872$  N=60), además el número de hojas totales en el tiempo de floración fue significativamente menor ya que las plantas mutantes

tenían solo  $10.24 \pm 0.18$  hojas, mientras que las silvestres  $12.02 \pm 0.25$ , como se puede observar en la Figura 9. A pesar de que la diferencia es muy pequeña es importante mencionar que la variación observada en el experimento fue muy pequeña, dando soporte a los datos. Éste fenotipo concuerda con el reportado para las mutantes *atx1-1* (Pien *et al.*, 2008), lo que nos indica que a pesar de que *atx1-3* no es una mutante nula, tiene una tendencia similar al fenotipo de floración reportado.

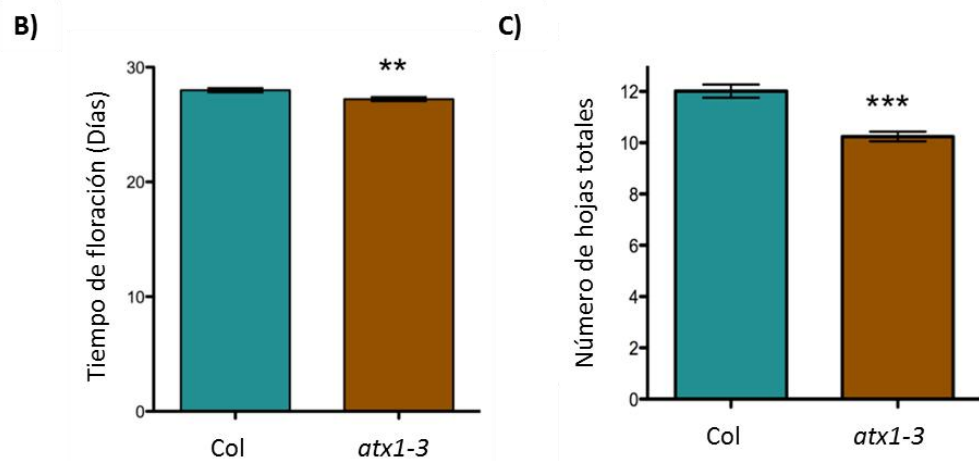


Figura 9. Análisis del tiempo de floración de las plantas *atx1-3*. A) Fenotipo aéreo de las plantas silvestres (Col) y mutantes *atx1-3* a los 29 días post-siembra B) Tiempo de floración (días que se cuentan desde el primer día de siembra, hasta cuando las plantas alcanzan 1cm del escapo) de plantas silvestres (Col) y mutantes *atx1-3*. C) Número de hojas totales al tiempo de floración. Experimentos de una réplica biológica con N= 60 para Col y 62 para *atx1-3*. T test,  $p < 0.0001$  (\*\*\*)  $P < 0.005$  (\*\*).

#### **6.4 ATX1 participa en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*.**

Al analizar el fenotipo en la raíz se encontró que las plantas *atx1-3* tienen raíces más cortas respecto a las plantas silvestres, como se puede ver en la figura 10 A. Al hacer una cinética de crecimiento, se observó que tanto las plantas silvestres como las mutantes germinan igual; sin embargo, a partir del día 5 post-siembra el crecimiento de la raíz de las plantas mutantes *atx1-3* es más lento y se observan diferencias significativas en su crecimiento respecto a las plantas control (*atx1-3*,  $0.3712 \pm 0.01735$  cm; Col,  $0.5245 \pm 0.01663$  cm; T test,  $p < 0.0001$ ), y la tasa de crecimiento menor que la planta silvestre se mantiene así durante los siguientes días. Al hacer la cinética de crecimiento con las plantas *atx1-1*, se observó que tienen el mismo fenotipo de raíz pero más penetrante, ya que las plantas *atx1-3* disminuyen en un 44% al día 11 post-siembra con respecto a las plantas silvestres (Col), mientras que las plantas *atx1-1* disminuyen en un 60% con respecto a su control (Ws) y también se observan diferencias significativas al quinto día post-siembra (*atx1-1*,  $0.2428 \pm 0.01481$  cm; Ws,  $0.5108 \pm 0.02965$  cm; T test,  $p < 0.0001$ ). Las diferencias del tamaño de la raíz entre *atx1-3* y *atx1-1* tienen sentido si se considera que *atx1-1* es una mutante nula, mientras que *atx1-3* no, por lo que es menos penetrante.

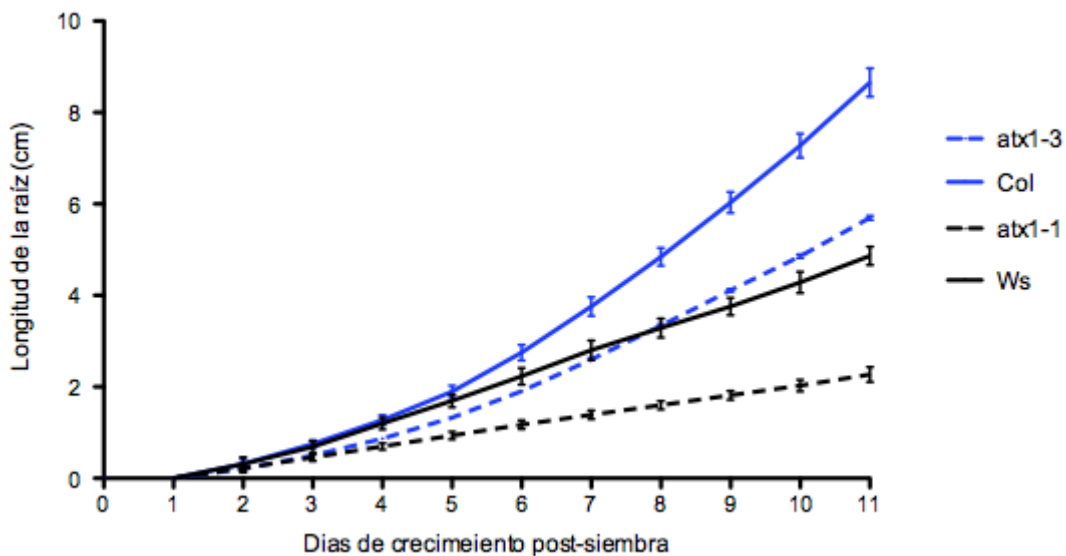
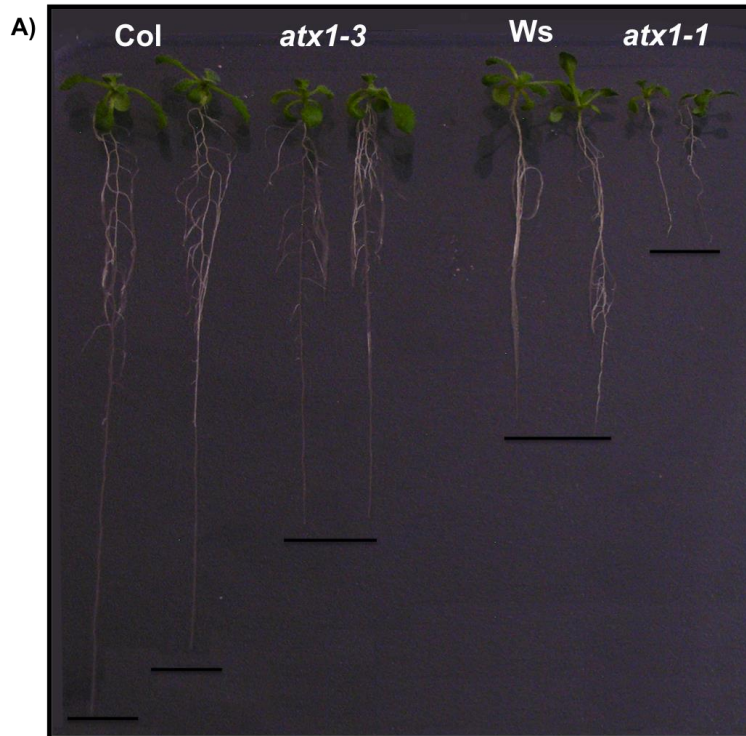


Figura 10. Cinética de crecimiento radicular de las plantas *atx1-3*. A) Fenotipo radicular de plantas silvestres (Col y Ws) y de plantas mutantes *atx1-3* y *atx1-1* a los 11 días de crecimiento post-siembra. B) Cinética de crecimiento de las mismas plantas usadas en A. Gráfica de cuatro réplicas biológicas para Col n=42, *atx1-3* n=42 y dos réplicas biológicas con Ws n=18, *atx1-1* n=21.



### **6.5 La función de ATX1 es importante para el desarrollo de las células meristemáticas del RAM**

El crecimiento de la raíz está dirigido principalmente por dos procesos relacionados: expansión celular y proliferación celular (Beemster & Baskin, 1998). Por lo que para determinar si el retraso del crecimiento de la raíz en *atx1-3* se debe a una menor tasa de proliferación en el RAM se realizaron conteos del número de células meristemáticas del córtex a los 5 días post-siembra, tiempo en el que ya se observan claras diferencias en el crecimiento radicular. El límite de la zona de proliferación se establece contando hasta la célula meristemática del córtex que alcanza el doble del tamaño de las células iniciales de la zona de proliferación y que ya no se está dividiendo. Lo que se encontró fue que *atx1-3* tiene un menor número de células meristemáticas (*atx1-3*,  $30.9 \pm 0.668$ ; Col  $39.9 \pm 0.683$ ) al igual que *atx1-1* (*atx1-1*  $19.4 \pm 0.752$ ; Ws  $38.1 \pm 0.767$ ) (Figura 10). La disminución en el número de células meristemáticas en *atx1-3* y *atx1-1* es del 27% y 50% respectivamente con respecto a las plantas silvestres. Estos datos sugieren que el retraso en el crecimiento de la raíz es debido a un defecto en el desarrollo del RAM.

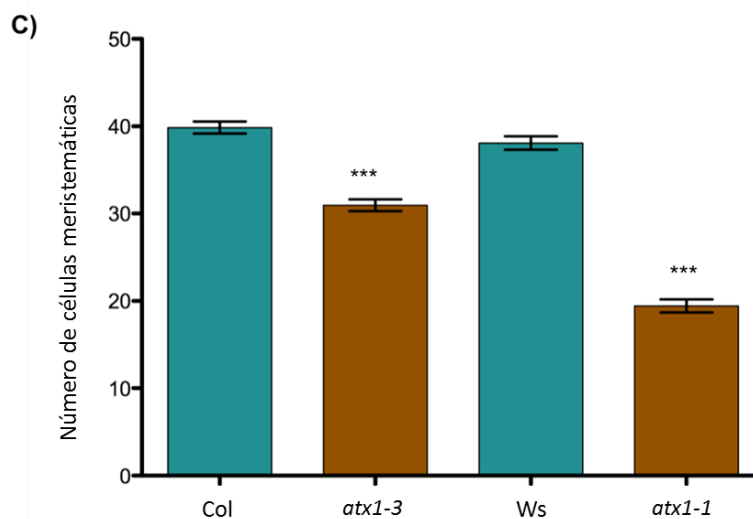
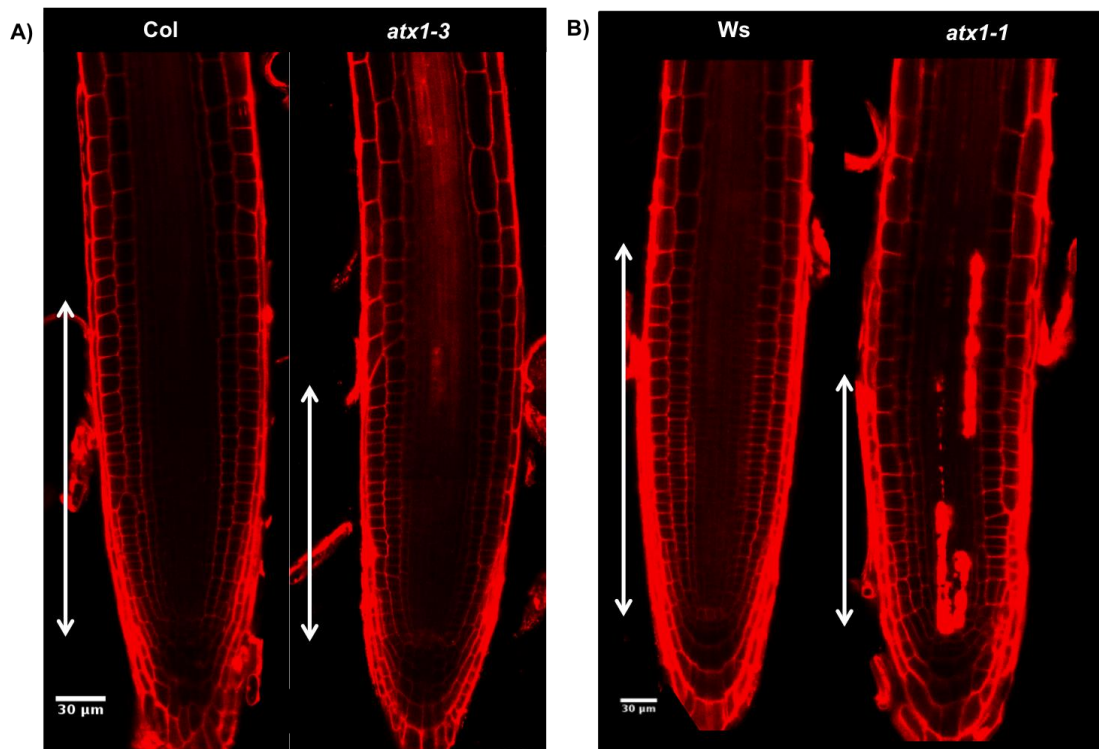


Figura 11. Análisis del RAM en las plantas *atx1-3*. A) Fenotipo del RAM de *atx1-3* y B) de *atx1-1* a los 5 días post-siembra analizados por microscopía confocal. C) Número de células meristemáticas del córtex. Gráficos de tres replicas biológicas, a los 7 días post-siembra. *atx1-3* N=55, Col N=62; T test,  $p < 0.0001$ , *atx1-1* N=41; N=55; T test,  $p < 0.0001$  (\*\*\*)).

## **6.6 ATX1 es necesario como regulador positivo de la expresión de los genes tipo MADS-box que regulan el crecimiento radicular.**

Los genes MADS-box han sido caracterizados ampliamente como reguladores del desarrollo en *Arabidopsis*. Recientemente se ha caracterizado la importancia de *XAANTAL1/AGL12* y *XAANTAL2/AGL14* como reguladores del desarrollo de la raíz. Mutantes de pérdida de función generan plantas con raíces cortas y meristemas de menor tamaño, respecto a las plantas silvestres (Tapia-Lopez *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013). Para determinar si la disminución en la tasa de crecimiento y en el meristemo de la raíz en las plantas mutantes *atx1-3* y *atx1-1* se debe a una desregulación de estos genes MADS-box, se determinó su expresión mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativos (Figura 12). También se determinó la expresión de *AGL17* y *AGL19* ya que se sabe que miembros del PcG regulan a estos genes de manera negativa (Flores y Sánchez, Datos no publicados, y Hernández-Marroquín, 2014). Los experimentos se realizaron en parte aérea a los 5 días post-siembra y en raíz a los 5 y 7 días post-siembra. Como se puede observar en la Figura 12, a los 5 días post-siembra, la parte aérea de la mutante *atx1-3* tiene una disminución en la expresión de *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14* mientras que en *AGL19* no se observan cambios, a diferencia de la mutante *atx1-1* donde la expresión tanto de *AGL19* como de *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14* bajan. Por otra parte en la raíz de la mutante *atx1-3* se observa una disminución de la expresión de *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, mientras que la mutante *atx1-1* tiene una disminución de los cuatro genes analizados y además el efecto de la disminución es más intenso que en *atx1-3*. Esto se puede observar más a detalle cuantificando la densidad integrada de las bandas obtenidas en las RT-PCRs (Figura 12 B). Para este tiempo y tejido se realizaron tres réplicas biológicas y los resultados más consistentes indican que las mutantes de *ATX1* a los 5 días post-siembra tienen una disminución en la expresión de *XAL2/AGL14* y *AGL19* (Anexo, Figura S1, S2), sugiriendo que *ATX1* está implicado en la regulación de los genes *XAL2/AGL14*, y *AGL19*. En el análisis de expresión en raíz a los 7 días post-siembra no se observan diferencias importantes más que en

la línea *atx1-1* con respecto a *XAL2*. Estos datos sugieren que la regulación de los MADS-box por parte de ATX1 puede ser temporal; sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para determinar que es una regulación temporal.

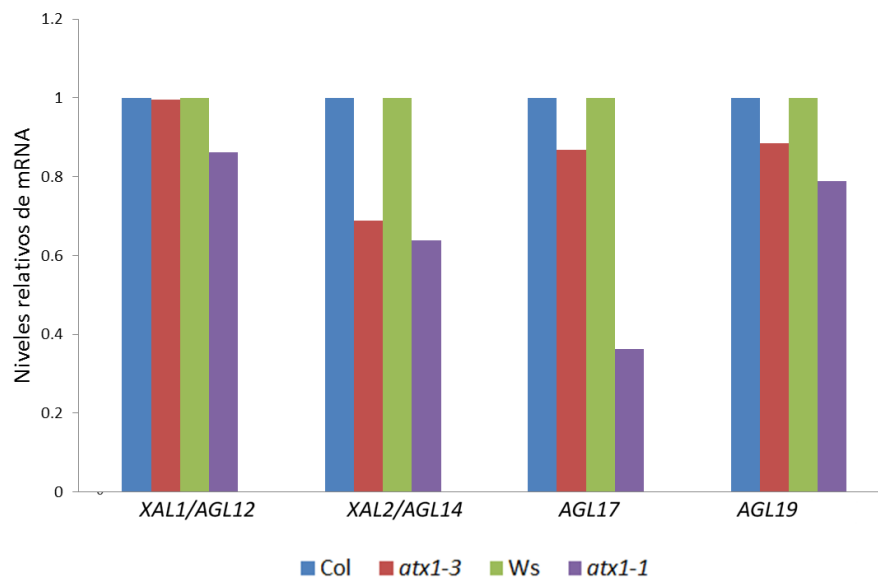
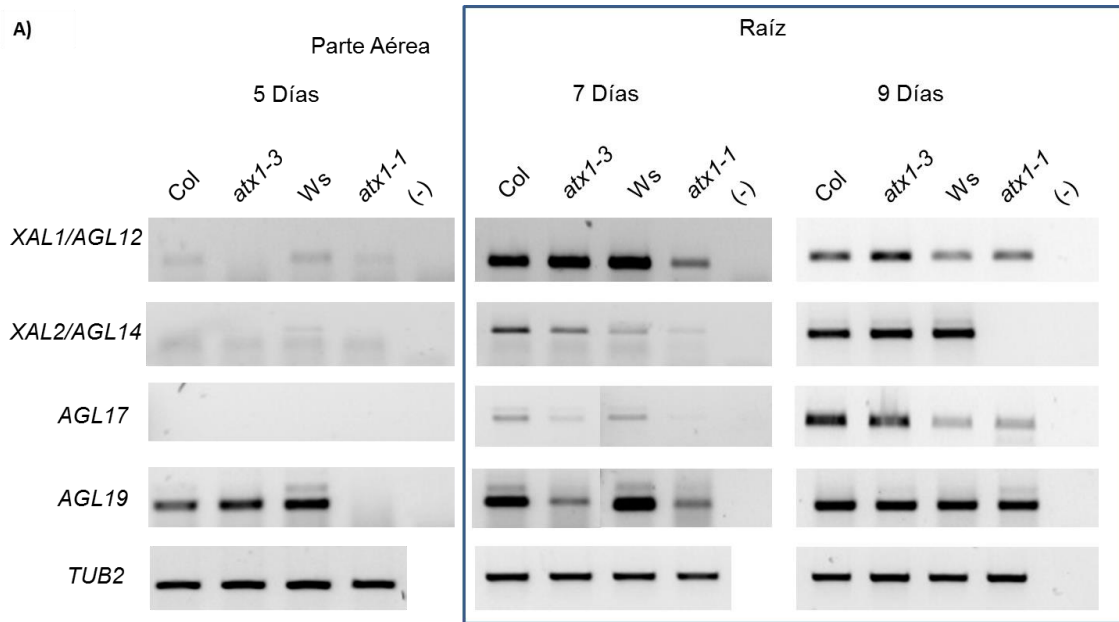


Figura 12. Expresión de los genes MADS-box en plantas mutantes en *ATX1*. A) Geles representativos de expresión de *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* en parte aérea y raíces de plantas *atx1-3* y *atx1-1* de 5 y 7 días post-siembr. Como control de cargado se utilizó al gen de *Tubulina 2* (*TUB2*). B) Densitometría de los geles de expresión de raíces a 5 días post-siembr del gel mostrado en A. Los colores azul, rojo, verde, y morado corresponden a las líneas Col, *atx1-3*, Ws, y *atx1-1*, respectivamente.

## **6.6 ULT1 un cofactor de ATX1 también se requiere para el desarrollo radicular de *Arabidopsis*.**

Recientemente se reportó que la proteína ULT1 puede interactuar con ATX1 y unirse al locus de *AG* para mediar su expresión (Carles & Fletcher, 2009). Sin embargo, no se ha explorado su función como miembro del complejo TrxG en el desarrollo radicular de *Arabidopsis*. Los altos valores de expresión *in silico* observados en *ULT1* tanto en el centro quiescente como en el RAM de *Arabidopsis* (Figura 6), sugieren que tiene una función importante en estos tejidos. Para estudiar su función se analizó la línea mutante *ult1-3* reportada por Carles & Fletcher, 2009. Al realizar la cinética de crecimiento radicular de estas plantas, resultó interesante observar que *ult1-3* tiene raíces ligeramente más grandes con diferencias significativas al sexto día post-siembra, como se puede observar en la Figura 13, en donde el tamaño radicular de *ult1-3* es de  $2.25 \pm 0.0938\text{cm}$ , mientras que el de las plantas silvestres (Ler) es de  $1.89 \pm 0.135\text{cm}$ . Dado que se ha reportado que ULT1 es un cofactor de ATX1, este fenotipo resulta un poco contradictorio; sin embargo, al analizar el número de células meristemáticas del córtex se encontró que el meristemo radicular de las plantas *ult1-3* tiene 27% menos células meristemáticas de cortex respecto a las plantas silvestres, observándose  $35.19 \pm 1.173$  células meristemáticas en *ult1-3*, y las plantas silvestres tienen  $42.71 \pm 0.9693$  (Figura 14), este fenotipo es similar al encontrado en las mutantes en *ATX1*. Estos datos sugieren que el ligero incremento en tamaño radicular se debe a una desregulación en las células de elongación más que a un acelerado crecimiento del RAM, además el fenotipo similar en las células meristemáticas entre las mutantes de *ATX1* y de *ULT1*, sugiere que se podría formar un complejo funcional entre ATX1-ULT1 durante el desarrollo de estas células.

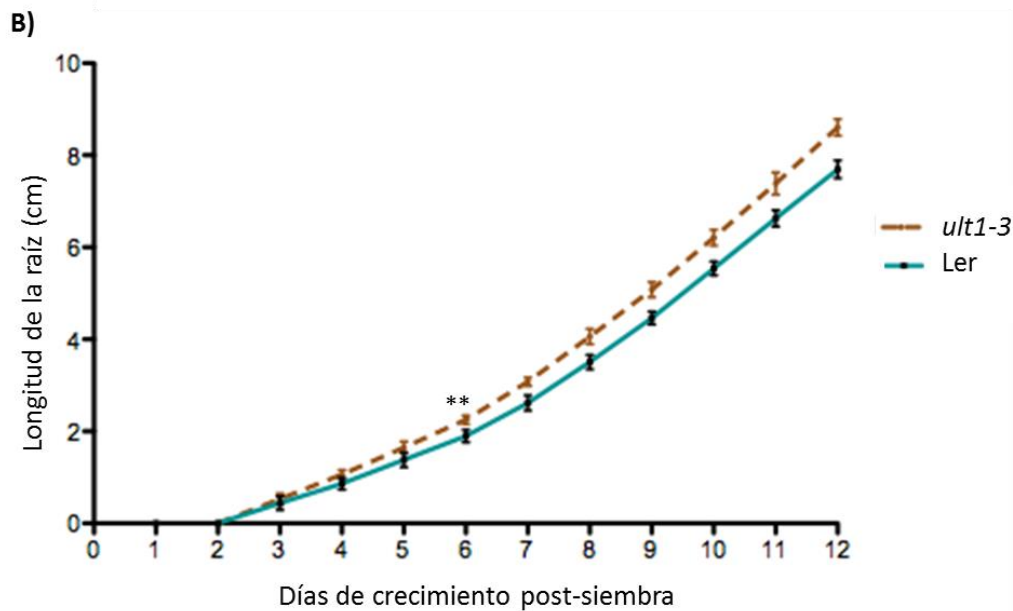
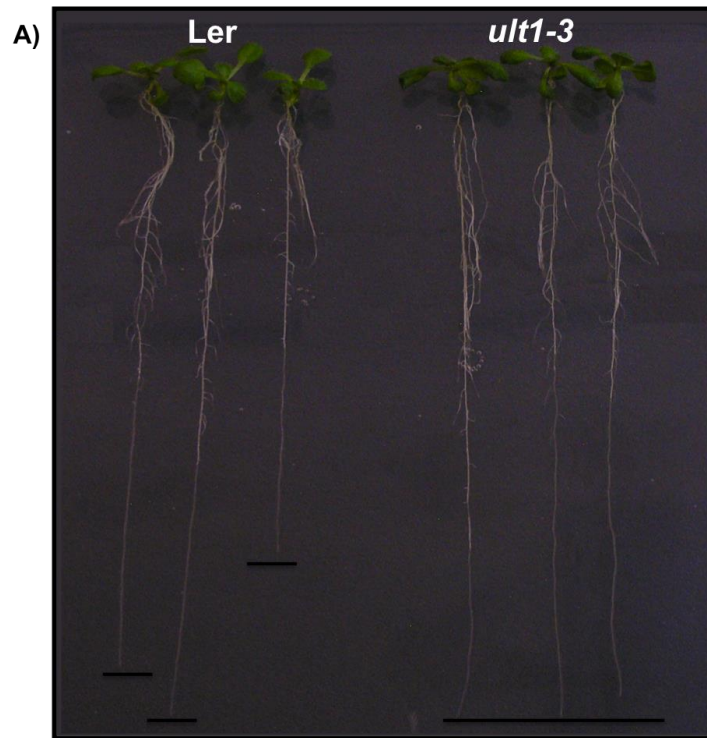


Figura 13. Cinética de crecimiento radicular en plantas mutantes para *ULT1*. A) Fenotipo radicular de plantas silvestres (Ler) y de plantas mutantes *ult1-3* a los 11 días de crecimiento post-siembr. B) Cinética de crecimiento de las mismas plantas usadas en A. *ult1-3* N=28, Ler N=24, una réplica biológica

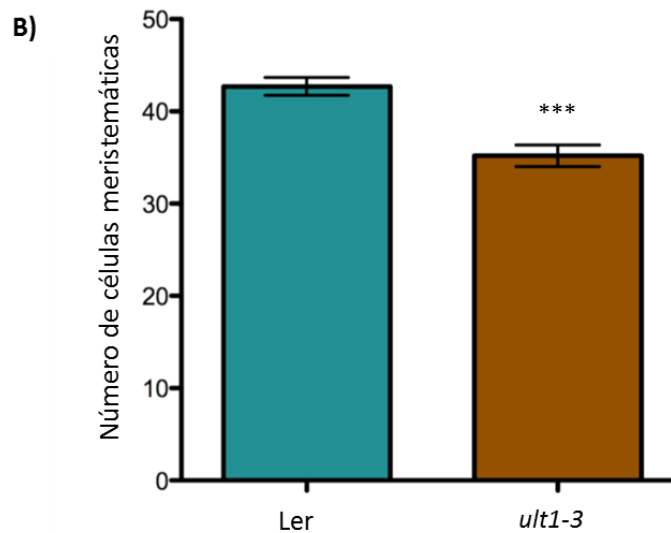


Figura 14. Análisis del RAM en *ult1-3*. A) Fenotipos del RAM de plantas control (Ler) y mutantes *ult1-3* a los 5 días post-siembra analizados por microscopía confocal. B) Número de células meristemáticas del córtex a los 5 días post-siembra en las mismas plantas usadas en A. Resultado promedio de dos réplicas biológicas (*ult1-3* 35.19 ± 1.173, N=16; Ler 42.71 ± 0.9693, N=17;  $p < 0.001$ (\*\*)).



### 6.7 La función de ULT1 se requiere para una adecuada morfología de las células de QC.

Los análisis de expresión *in silico* muestran una elevada expresión de *ULT1* en el CQ. Interesantemente se observa una alteración en la morfología de las células del CQ de la mutante *ult1-3* (Figura 15). Generalmente las células del CQ están alineadas transversalmente en plantas silvestres (Dolan *et al.*, 1993) fenotipo que no fue muy usual en plantas *ult1-3*, además las células fueron un poco irregulares en su forma. El fenotipo observado en las plantas mutantes sugiere una función de *ULT1* en esta región, pudiendo ser por expresión directa en esta región y por lo tanto resulta importante determinar la expresión.

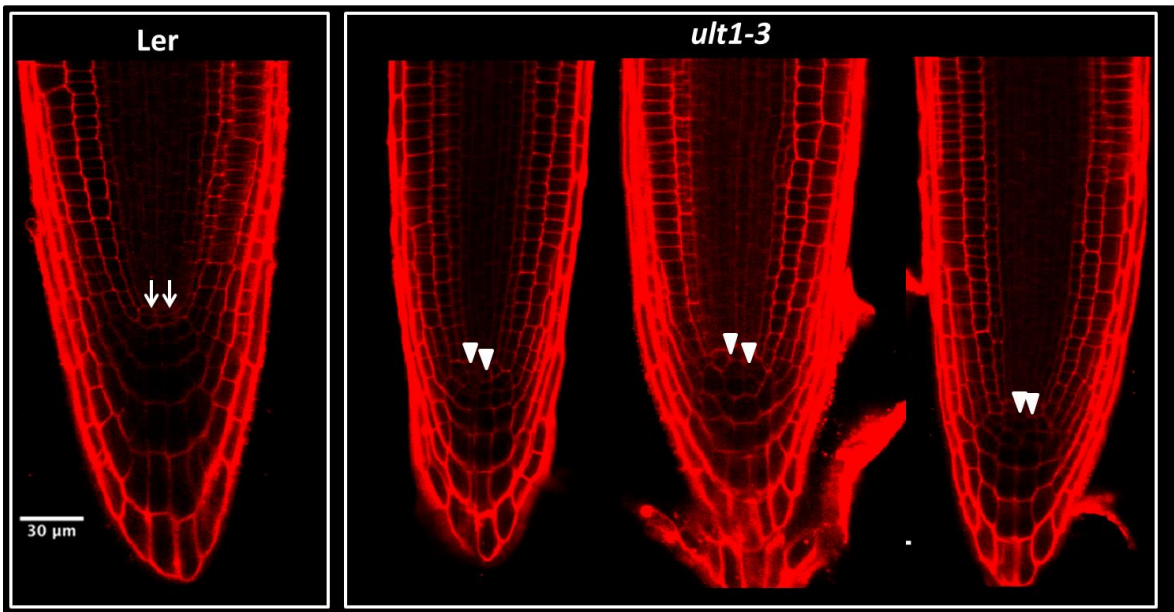


Figura 15. Alteración del CQ en *ult1-3*. Raíces a los 5 días post-siembra analizados por microscopia confocal. Las flechas con línea señalan células con morfología silvestre. Flechas señalan células con una morfología anormal.

### **6.8 Expresión de *ULT1* en la raíz de *Arabidopsis*.**

Para saber si *ULT1* lleva a cabo una función en el RAM por expresión directa en esta región se realizó una construcción para expresar a *ULT1* bajo las mismas condiciones que una planta silvestre, pero con un marcador de GFP para poder rastrear su expresión o su unión a diferentes locus. Para ello se clonó el promotor y el gen completo de *ULT1* en el vector TOPO8 del sistema Gateway (Anexo Figura S3) con este vector se realizó una recombinación con el vector pGWB4 del sistema Gateway para obtener la construcción pULT1:ULT1:GFP. Esta construcción fue secuenciada y se verificó que la secuencia era la correcta y sin ninguna mutación (Anexo Figura S3). Mediante transformación por *Agrobacterium* se obtuvieron plantas transgénicas pULT1:ULT1:GFP en fondo Ler y plantas pULT1:ULT1:GFP en fondo *ult1-3*. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas con 50µg/ml de kanamicina y se eligieron aquellas que a través de la resistencia a este antibiótico tuvieron segregación mendeliana (2/3) sugiriendo una sola inserción. Aún no se obtienen plantas homocigotas pero al analizar la expresión de las plantas heterocigotas pULT1:ULT1:GFP fondo Ler, se observa que *ULT1* se expresa en la zona de proliferación del RAM e interesantemente no se encuentra en el CQ. De manera específica se puede ver expresión de *ULT1* en las células iniciales de epidermis/cofia lateral, iniciales del estele e iniciales de la endodermis/córtex. En la zona de proliferación se puede ver en los tejidos de epidermis, córtex y estele. Con respecto a la localización subcelular de *ULT1* se observa una distribución difusa pero con puntos localizados sugiriendo una localización nuclear y citoplásmica (Figura 16).

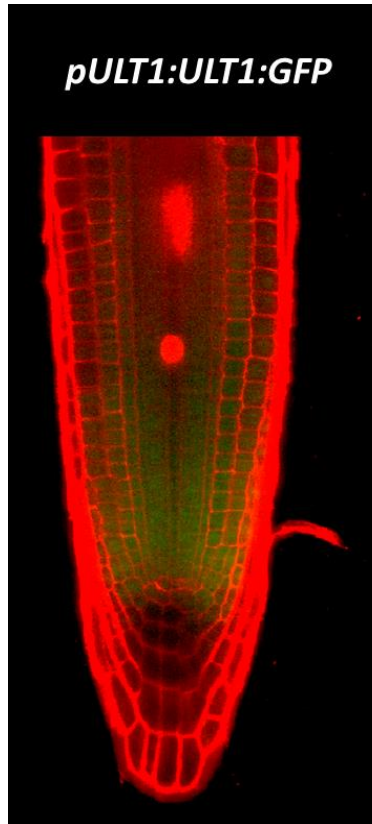


Figura 16. Localización de ULT1 en el meristemo apical de la raíz. Raíz de plantas *pULT1:ULT1:GFP* a los 5 días post-siembra visualizadas a través de la emisión de GFP por microscopía confocal.

## **7. Discusión**

En este trabajo se realizó un análisis de la función de *ATX1* y su cofactor *ULT1*, dos factores asociados al grupo TrxG, durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* con énfasis en la función de estos miembros en el meristemo apical de la raíz (RAM) y su papel en la regulación de genes MADS-box que han sido caracterizado como componentes importantes de las redes que regulan el balance entre proliferación/diferenciación en la raíz de *Arabidopsis*. Previamente Napsucialy-Mendivil y colaboradores en 2014 describieron el fenotipo de raíz en la mutante *atx1-1* concluyendo que este gen está implicado en la organización y actividad del RAM, sin embargo no se exploran los posibles blancos de *ATX1* involucrados en dichas funciones. En nuestro trabajo se analizó si *ATX1* participa en el RAM por medio de la regulación de los factores transcripcionales MADS-box: *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19*, genes importantes para el desarrollo de la raíz y que además son regulados de manera negativa por miembros del grupo PcG (Flores y Sánchez, datos no publicados). También se analizó el fenotipo radicular de *ult1-3*, y se observó una afectación en la proliferación del RAM y en la organización del nicho de células troncales. Esto resulta muy interesante, y por ello, la relevancia del trabajo radica en analizar posibles blancos de *ATX1* y su cofactor *ULT1*, involucrados en el mantenimiento y organización del RAM, que a su vez son regulados de manera negativa por miembros de PcG.

### **7.1 Análisis de expresión de miembros TrxG en la raíz de *Arabidopsis***

El análisis global de expresión llevado a cabo por Birnbaum K. y colaboradores en 2003 mostró que en la zona de proliferación de la raíz había una sobrerrepresentación de transcritos relacionados con organización nuclear, ciclo celular y mitosis, datos que tienen sentido si las células están en constante división celular. Al analizar la expresión de los miembros de TrxG a lo largo del eje ápico-basal de la raíz se observa que estos genes se expresan más en la zona de

proliferación respecto a la zona de elongación. Este resultado tiene sentido, pues los miembros de esta familia de reguladores epigenéticos regulan positivamente a factores promotores de la división celular. Los análisis de los miembros TrxG en el CQ indican que *ULT1* tiene un nivel de expresión similar al del factor transcripcional *SCR* (marcador de células del CQ y las de la endodermis), seguido de *WDR5b*, *ATX1* y *ASH2R*. Un complejo At-COMPASS formado por *ATX1*, *WDR5a*, *ASH2R* y *RbBP5* participa en la regulación de la floración, por lo que sería interesante saber si este complejo At-COMPASS formado por *ATX1*, *WDR5b* y *ASH2R* es importante en la regulación del nicho de células troncales en la raíz de *Arabidopsis*. Los niveles de expresión relativa de *ULT1* en el CQ y la zona de proliferación de la raíz (Birnbaum *et al.*, 2003; Nawy *et al.*, 2005) no concuerdan con la localización de la proteína *ULT1* que observamos con la construcción pULT1:ULT1:GFP, pues en esta última no se observa *ULT1:GFP* en el CQ, aunque si se recupera una intensa señal de GFP en las células iniciales del RAM. Una posible explicación es que lo que nosotros estamos tomando como región promotora para esta construcción transcripcional sea insuficiente para la adecuada regulación espacio-temporal de esta proteína. Otra posibilidad es que existan otras secuencias de regulación transcripcional, tipo enhancers. La otra posibilidad es que el mensajero es transportado fuera del CQ por los plasmodesmos y en las células iniciales es traducido. Para corroborar esta idea se tendría que determinar la localización del mRNA de *ULT1* por medio de una hibridación *in situ* (Ghoshroy *et al.*, 1997) o se podría hacer una transformación con una construcción traduccional. Por otra parte, la señal de *ULT1:GFP* es exclusiva de las células en proliferación que conforman el meristemo y al igual que los datos de expresión de RNA no se observó señal de GFP en las células que están elongadas o que ya están diferenciadas de la raíz. La localización subcelular de *ULT1:GFP* en la zona de meristemo de la raíz parece ser igual a la de *ULT1* y *ULT2*, en células epidérmicas de cebolla, donde se observa señal a nivel citoplásmico, pero con una señal más fuerte en el núcleo (Carles *et al.*, 2005; Monafred *et al.*, 2013).

## 7.2 Características de la línea mutante *atx1-3*

La línea mutante *atx1-3* tiene la inserción de T-DNA cerca de la región 3', en el intrón 19 de un total de 23 intrones del gen *ATX1*; dicha inserción se encuentra antes del dominio SET. Durante el proceso de genotipificación se pudo observar que las plantas heterocigotas no muestran un fenotipo claro, por lo que la mutante *atx1-3* es homocigota recesiva. Una vez llevada a cabo la genotipificación se determinó el nivel de expresión de *ATX1*; la RT-PCR semicuantitativa indica que *atx1-3* es una mutante de baja expresión a diferencia de *atx1-1* que es una mutante nula. Reportes previos habían demostrado que *atx1-1* y *atx1-2*, una mutante en el ecotipo Col, son mutantes de floración temprana. Estos reportes indican que *atx1-1* tiene 8 hojas al tiempo de floración, mientras que las silvestres tienen 10, mientras que el alelo *atx1-2* tiene 9 hojas al tiempo de floración mientras que las silvestres tienen 10 (Pien *et al.*, 2008). Nuestros resultados indican que al tiempo de floración en condiciones de día largo, la mutante *atx1-3* tiene 10 hojas, mientras que la silvestre tiene 12. Por lo que al igual que *atx1-1* y *atx1-2*, la mutante analizada tiene un fenotipo de floración temprana. Será necesario realizar el experimento en condiciones de día corto para observar de manera más evidente el efecto.

Con respecto al crecimiento de la raíz, determinamos que en términos del tiempo de germinación las plantas *atx1-1* y *atx1-3* se comportan igual que las plantas silvestres y conforme avanza la germinación hasta el cuarto día post-siembra no hay diferencias claras en el tamaño de la raíz, pero en el quinto día comienza un retraso en el crecimiento de la raíz, que se mantiene claro durante los siguientes días de crecimiento y a los 11 días post-siembra el tamaño total de la raíz de *atx1-3* fue de aproximadamente 45% menor con respecto a las silvestres. Observamos un comportamiento muy similar en *atx1-1* pero en este caso la disminución en el tamaño de la raíz fue de aproximadamente 60% con respecto a las silvestres. El hecho de que el retraso del crecimiento sea evidente en el quinto día de crecimiento post-siembra y se mantenga constante en los siguientes días sugiere que *ATX1* no es necesario para la regulación de los genes

que son importantes durante la etapa de germinación y primeras días de crecimiento, y el efecto de la mutación se observó solo durante el crecimiento de la raíz a partir del quinto día post-siembra.

El retraso en el crecimiento de la raíz observado en los mutantes tanto de *atx1-3* como *atx1-1* se debe a un decremento de la proliferación celular en el RAM. Ambas mutantes presentaron un menor número de células meristemáticas del córtex (27% y 50% menor a las silvetres respectivamente), siendo más severo el fenotipo en *atx1-1* que en *atx1-3*. En este último no se observaron alteraciones celulares evidentes en el nicho de células troncales, mientras que en *atx1-1* el CQ está claramente desorganizado en el 95% de las raíces observadas (Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014), esta diferencia en los fenotipos de los dos mutantes se puede deber al que *atx1-3* es un alelo más débil que *atx1-1*, que parece de pérdida total de función.

La consistente disminución en la expresión de los genes MADS-box *XAL2/AGL14*, *AGL19* y la disminución de *XAL1/AGL12*, *AGL17* en raíces de plantas deficientes de *ATX1*, sugiere, como se esperaba, que *ATX1* regula positivamente la expresión de estos genes MADS-box y que la alteración en la expresión de ellos probablemente contribuye al fenotipo de raíz corta observado en las mutantes en *ATX1*. Además, los resultados obtenidos en tejido de raíz de 5 y 7 días post-siembra indican que la regulación de los genes MADS-box por *ATX1* es tiempo dependiente, ya que a los 7 días post-siembra no se observa una alteración en la expresión de estos genes en las plantas deficientes en *ATX1*. La regulación temporal y antagónica se ha observado en la regulación de diversos genes implicados en el proceso de vernalización y floración de *Arabidopsis* (Gendall *et al.*, 2001; Pean *et al.*, 2008)

En conclusión el fenotipo de *atx1-3* va en el mismo sentido que la mutante *atx1-1*. Ambos tienen una disminución en el tamaño de la raíz, que se debe en parte a una disminución del RAM. Además se observa una disminución en la expresión de *XAL2/AGL14* y *AGL19* en ambas mutantes, sin embargo los análisis del tamaño de la raíz, número de células meristemáticas y expresión de los

MADS-box indica que la mutante *atx1-3* tiene efectos de menor intensidad con respecto a la mutante *atx1-1*.

### **7.3 Función de los miembros TrxG: *ATX1* y *ULT1* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis***

Se ha reportado que *ULT1* actúa como cofactor de *ATX1* en los procesos de floración (Fletcher *et al.*, 2009). Los datos obtenidos en este trabajo en tejido de raíz muestran que *ATX1* y *ULT1* están involucrados en la proliferación celular del RAM de *Arabidopsis*. Las mutantes de *ATX1* y *ULT1* tienen un menor número de células meristemáticas del córtex que las raíces silvestres crecidas en condiciones similares. Sin embargo, en *atx1-3* también se observa un decremento global del crecimiento primario de la raíz, mientras que en la mutante *ult1-3* el crecimiento primario es ligeramente más acelerado. Esto puede deberse a que en este último mutante también está afectado el tamaño final de las células diferenciadas y éstas sean mayores que en las raíces silvestres. La expresión de un marcador de la transición G<sub>2</sub>/m como es *Cy<sub>CBD</sub>B1;1::GUS* del ciclo celular en *atx1-1* exhibe menos actividad de GUS con respecto a la silvestre indicando que hay un retraso en el ciclo celular (Napsuacaly-Mendivil *et al.*, 2014), por lo que será importante determinar la expresión de este marcador en *ult1-3* esperando observar un comportamiento similar al de *atx1-1*. Con respecto a la organización del centro quiescente, tanto *atx1-1* (el alelo más penetrante) como *ult1-3* tienen una desorganización en el CQ ya que no se pueden ver de manera clara y orientadas en un plano horizontal las dos células del CQ (Napsuacaly-Mendivil *et al.*, 2014; y Figura 15). Las células de *atx1-1* en el CQ están más expandidas y las células iniciales del cilindro vascular y de la endodermis/cortex tienen divisiones anormales. También la expresión de un marcador específico de CQ llamado *WOX5* en *atx1-1* se encuentra expandido, sugiriendo una función del gen en la restricción del dominio de expresión de *WOX5* (Napsuacaly-Mendivil *et al.*, 2014). Será importante determinar cuál es el papel de *ULT1* en la circunscripción del CQ, por lo que ya se están realizando cruces entre plantas *ult1-3* X pWOX5::GFP.



Será interesante analizar en las mutantes de *ATX1* y *ULT1* la expresión de otros genes implicados en el proceso de proliferación del RAM y mantenimiento del nicho de células troncales como *PLETHORA 1 (PLT1)*, *PLT2*, *SHORTROOT (SCR)*, o *HIGHPLOIDY2* (Stahl & Simon; 2010) y realizar una doble mutante entre *ATX1* y *ULT1* para ver si el fenotipo aumenta. Para ello se tendrían que realizar cruza entre líneas mutantes del mismo ecotipo, ya que las analizadas en este estudio no pertenecen al mismo, sin embargo al ser comparadas las mutantes con respecto a sus silvestres, los resultados tienen validez.

Sumados a *ATX1* y *ULT1*, *ATXR3/SDG2* otro miembro de TrxG participa en el mantenimiento de la identidad del nicho de células troncales de la raíz (Yao *et al.*, 2013). Sin embargo la vía en la que participa en dicha función parece ser distinta a la de *ATX1*; la mutante de *ATXR3/SDG2 (sdg2-3)*, tiene diferenciadas las células iniciales de la columela y *atx1-1* no, además *sdg2-3* participa en el establecimiento del pico máximo de auxinas mientras que *atx1-1* no parece tener esa función. (Yao *et al.*, 2013; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). En este sentido será muy interesante ver como *ULT1* afecta la identidad del CQ.

Por medio de tinciones de inmunofluorescencias contra anticuerpos de la H3K4me3 Yao y colaboradores (2013) determinaron que *ATXR3/SDG2* establece dicha marca en el RAM de *Arabidopsis* y sobre todo en el centro quiescente ya que es donde menos señal se observa en la mutante; sin embargo la señal no se pierde por completo sugiriendo que otras proteínas llevan a cabo dicha actividad. Será importante determinar la actividad de metilasa para la H3K4me3 en las raíces de *atx1-1*, *atx1-3* y *ult1-3* pues los fenotipos observados, sugieren que las proteínas codificadas por estos genes pueden formar parte de los complejos que participan en este marcaje. Estos análisis globales aún no permiten ver cuáles genes implicados en crecimiento de la raíz son blancos de los reguladores epigenéticos y nuestros resultados de RT-PCR semicuantitativa para los genes MADS-box *XAL1*, *XAL2*, *AGL17* y *AGL19* son un buen modelo a futuro para entender cómo se lleva a cabo la regulación epigenética en el RAM, y cuál es el papel de la regulación epigenética de estos y otros factores transcripcionales en el

establecimiento, delimitación y mantenimiento del NCT en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Es importante mencionar que ATX1 es un regulador pleiotrópico y por lo tanto es difícil asegurar que la disminución en la expresión observada para *XAL1*, *XAL2*, *AGL17* y *AGL19* en las mutantes se deba a una regulación directa de estos genes por parte de ATX1. La mutante *xa2-2* tiene una menor tasa de crecimiento, un dominio de proliferación más pequeño y menor número de células meristemáticas del córtex al igual que las mutantes de *ATX1*; sin embargo otro determinante en la disminución del tamaño radicular en *xa2-2* es el menor tamaño de las células completamente elongadas y en *atx1-1* el fenotipo de estas células no se ve afectado (Garay-Arroyo *et al.*, 2013; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Por otra parte, a pesar de no observar una drástica disminución en la expresión de *XAL1/AGL12* es importante mencionar que las mutantes de pérdida de función de dicho gen tienen fenotipos en sentido con los observados en los mutantes de *ATX1*, por ejemplo un menor tamaño meristemático, menor tasa de proliferación celular y una mayor duración del ciclo celular (Tapia-Lopez *et al.*, 2008) por lo que se sugiere una regulación positiva de *ATX1* sobre *XAL1/AGL12*.

La función antagónica entre PcG y TrxG ha sido explorada en el proceso de vernalización que se puede definir como una respuesta a la exposición prolongada a temperaturas bajas que da como resultado la floración. La respuesta a la vernalización en *A. thaliana* se debe principalmente a la expresión del gen MADS-box *FLC*, que tiene la capacidad de reprimir a FT y SOC1 dos genes que dirigen el desarrollo floral. La expresión de *FLC* se mantiene gracias a la actividad del grupo Trithorax. Una señal ambiental permite que se exprese el lncRNA COLDAIR, el cual recluta miembros del grupo PRC2, los cuales a su vez se encargan de establecer marcas epigenéticas asociadas a represión transcripcional (H3K27me3), estas marcas son reconocidas por el complejo PRC1 el cual mantiene una represión estable. Los sitios a los que se unen miembros de PRC2 son similares entre miembros del clado de genes de *FLC* llamados *MADS AFFECTING FLOWERING1-5 (MAF1-5)* (Dong-Hwan & Sung, 2013); esto podría

reflejar un mecanismo de regulación epigenética conservado en los genes MADS-box, por lo que sería interesante determinar los sitios en los que actúa TrxG y PcG en la regulación de *XAL1*, *XAL2*, *AGL17* y *AGL19*, y más interesante aún será determinar la regulación espacio-temporal de estos mecanismos epigenéticos que es específica para cada gen.

También resultará muy interesante determinar si existen estos sitios de unión como elementos análogos a los PREs. Los elementos reguladores en *cis* llamados PREs en *Drosophila* se encargan de mediar la memoria epigenética de activación o represión transcripcional de los genes homeóticos *HOX* a través de varias generaciones celulares por su capacidad de reclutar a los complejos PcG y TrxG (Steffen & Ringrose, 2014). Recientemente se encontró en *A. thaliana* una secuencia con función PRE en la región promotora del gen *KNUCKLES* (*KNU*). Este gen participa en la determinación del meristemo floral reprimiendo a *WUSCHEL* (*WUS*) y su expresión es inducida de manera temporal por *AGAMOUS* (*AG*). Es interesante que miembros de PcG se unen a una secuencia "PRE" e inducen la marca de represión transcripcional (H3K27me3) evitando su expresión, posteriormente *AG* se une a una región adyacente al PRE y compite con los PcG desalojándolos del locus de *KNU* y activándolo en una ventana temporal dependiente de la división celular (Sun *et al.*, 2014). Este ejemplo de regulación en *cis* plantea una guía para explorar cual es el modo de regulación epigenética mediado por los complejos PcG y TrxG de la expresión de los genes homeóticos MADS-box durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

La participación de *ATX1* y *ULT1* en el RAM se resume en la figura 17. Ambos genes participan en la proliferación del RAM y en el mantenimiento del NCT, y posiblemente lo hagan a través de una regulación positiva y directa de *XAL1* y *XAL2*, que a su vez son regulados negativamente por *CLF* y *LHP1*.

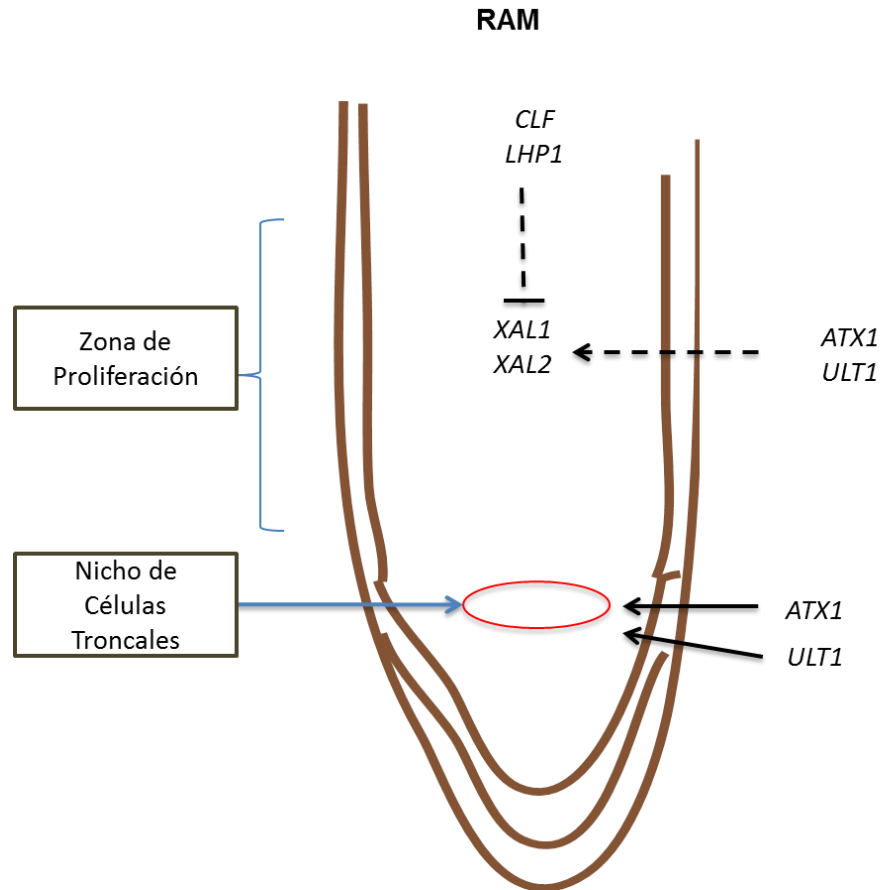


Figura 17. Modelo de la posible acción de PcG (*CLF* y *LHP1*) y TrxG (*ATX1* y *ULT1*) en la regulación antagónica de los factores transcripcionales MADS-box implicados en la proliferación del RAM de *Arabidopsis*. La línea punteada de los genes significa que aún no se determina si la regulación es directa.

## 8. Conclusiones

-Los genes del grupo TrxG de *Arabidopsis thaliana* se expresan preferencialmente en la zona de proliferación del RAM más que en la zona de diferenciación radicular.

-ATX1 y ULT1 dos proteínas que pertenecen a TrxG participan en el mismo sentido en la proliferación y organización del RAM durante el desarrollo radicular, sugiriendo que actúan en conjunto en este tejido.

-La función de ATX1 se requiere para la activación transcripcional de los genes MADS-box: *XAL2/AGL14* y *AGL19* y probablemente de *XAL1/AGL12* y *AGL17*

-La expresión de ULT1 se localiza en la zona de proliferación del RAM y preferencialmente en las células iniciales del nicho de células troncales.

## 9. Referencias

- Aichinger E., Villar C., Di Mambro R., Sabatini S., Köhler C. (2011) The CHD3 Chromatin Remodeler PICKLE and Polycomb Group Proteins Antagonistically Regulate Meristem Activity in the Arabidopsis Root. *The Plant Cell*. **23**: 1047-1060
- Alvarez-Venegas R, Avramova Z. (2001) Two Arabidopsis homologs of the animal trithorax genes: a new structural domains is a signature feature of the trithorax gene family. *Gene*. **271**: 215-221
- Alvarez-Venegas R., Pien S., Sadler M., Xiaohong W., Grossniklaus U., *et al.* (2003) ATX-1, an Arabidopsis Homolog of Trithorax, Activates flower homeotic Genes. *Current Biology*. **13**: 627-637
- Alvarez-Venegas R. (2010) Regulation by Polycomb and Trithorax Group Proteins in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* . e0128. 10.1199/tab.0128
- Arents, G. & Moudrianakis E. (1993) Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10489-10493.
- Avramova Z. (2009) Evolution and pleiotropy of Trithorax function in Arabidopsis. *The International journal of Developmental Biology*. **53**: 371-381.
- Azpeitia E., Benítez M., Vega I., Villarreal C., Alvarez-Buylla E. (2010) Single-cell and coupled GRN models of cell patterning in the Arabidopsis thaliana root stem cell niche. *BMC Systems Biology*. **4**:134
- Badenhorst P., Voas M., Rebay I., Wu C. (2002) Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.* **16**: 3186-3198
- Bannister A., Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**: 381-395
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T., Schones D., *et al.* (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. **129**, 823-837

- Basset A., Cooper S., Wu C., Travers A. (2009) The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*. **19**: 159-165.
- Baumbusch L., Thorstensen T., Krauss V., Fischer A., Naumann K., *et al.* (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionary conserved classes. *Nucleic Acid Res* **29**: 4319–4333.
- Bemer M. & Grossniklaus U. (2012) Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. **15**: 523-529
- Benhamed M, Bertrand C, Servet C, Zhou D. 2006. *Arabidopsis* GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 Interact to Regulate Histone Acetylation Required for Light-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*. **18**: 2893-903
- Berger S. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. **447**: 407-412
- Berr A., Xu L., Gao J., Cognat V., Steinmetz A., *et al.* (2009) SET DOMAIN GROUP25 Encodes a Histone Methyltransferase and Is Involved in FLOWERING LOCUS C Activation and Repression of Flowering. *Plant Physiology*. **151**: 1476-1485
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. **16**: 6-21.
- Bird A. Wolffe A. (1999) Methylation Induced Repression Belts, Braces, and Chromatin. *Cell*. **99**: 451-454
- Birnbaum K. Shasha D. Wang J. Jung J. Lambert G., *et al.* (2003). A Gene Expression Map of the *Arabidopsis* Root. *Science*. 302: 1956-1960.
- Blancaflor E., Fasano J., Gilroy S. (1998). Mapping the Functional Roles of Cap Cells in the Response of *Arabidopsis* Primary Roots to Gravity. *Plant Physiology*. **116**: 213-222
- Brockmann D., Lehmkuhler O., Schmücker U., Esche H. (2001) The histone acetyltransferase activity of PCAF cooperates with the brahma/SWI2-

- related protein BRG-1 in the activation of the enhancer A of the MHC class I promoter. *Gene*. **277**: 111-120
- Cao F., Chen Y., Cierpicki T., Liu Y., Basrur V., *et al.* (2010) An Ash2L/RbBP5 Heterodimer Stimulates the MLL Methyltransferase Activity through Coordinated Substrate Interactions with the MLL SET domain. *Plos One* **5**(11): e14102. doi:10.1371
- Carles C., Lertpiriyapong K., Reville K., Fletcher J. (2004) The ULTRAPETALA1 Gene Functions Early in Arabidopsis Development to Restrict Shoot Apical Meristem Activity and Acts Through WUSCHEL to Regulate Floral Meristem Determinacy. *Genetics*. **167**: 1893-1903
- Carles C. & Fletcher J. (2009) The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev.* **23**: 2723-2728
- Caro E., Castellano M., Gutierrez C. (2007) A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in Arabidopsis. *Nature*. **447**: 213-218
- Cartagena J., Matsunaga S., Seki M., Kurihara D., Yokoyama M., *et al.* (2008) The Arabidopsis SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Dev Biol.* **315**: 355–368
- Chen T. & Dent S. (2014) Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature Reviews*. **15**: 93-106.
- Chen T. & Li E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* **60**: 55-89.
- Clapier C., Cairns B. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**:273–304.
- Dambacher S., Hahn M., Schotta G. (2010) Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity*. **105**: 24-37.
- Davila-Velderrain J. & Alvarez-Buylla E. (2014) Bridging the Genotype and the Phenotype: Towards an Epigenetic Landscape Approach to Evolutionary Systems Biology. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/004218>



- Deal R. & Henikoff S. (2010) A Simple Method for Gene Expression and Chromatin Profiling of Individual Cell Types within a Tissue. *Developmental Cell*. **18**: 1030-1040
- Di Croce L., Helin K. (2013) Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*. **20**: 1147-1155
- Ding Y., Avramova Z., Fromm M. (2011) Two distinct roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at promoters and within transcribed regions of ATX1-regulated genes. *Plant Cell* **23**:350–363
- Ding Y., Ndamukong I., Xu Z, Lapko H., Fromm M., et al. (2012) ATX1-Generated H3K4me3 Is Required for Efficient Elongation of Transcription, Not Initiation, at ATX1-Regulated Genes. *PLoS Genet* **8**(12): e1003111. doi:10.1371/journal.pgen.1003111
- Dinneny J., Benfey P. (2008) Plant Stem Cell Niches: Standing the Test of Time. *Cell*. **132**: 553-557.
- Dong-Hwan K. & Sung S. (2013). Coordination of the Vernalization Response through a VIN3 and FLC Gene Family Regulatory Network in Arabidopsis. *The Plant Cell*. doi/10.1105/tpc.112.104760
- Dong-Hwan K. & Sung S. (2014). Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0171
- Dou Y, Milne T., Ruthenburg A., Lee S., Lee J., et al. (2006) Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 713–719.
- Eissenberg J., Shilatifard A. (2010) Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental Biology*. **339**: 240-249
- Espada J. & Esteller M. (2010) Seminars in Cell & Development Biology. **21**: 238-246
- Felsenfeld, G. 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **6** (1); doi:10.1101/cshperspect.a018200

- Feng Q., Wang H., Ng H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., *et al.* (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol.* **12**: 1052–1058.
- Fischle W., Wang Y., Allis C. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology.* **15**: 172-183
- Fisher C. & Fisher A. (2011) Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Current Opinion in Genetics and Development.* **21**,2: 140-146
- Francis N., Kingston E., Woodcock C. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* **306**, 1574–1577.
- Garay-Arroyo A., Ortiz-Moreno E., de la Paz Sánchez M., Murphy A., *et al.* (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBOJ.* **21**, 2884-2895.
- Gehring M. & Henikoff. (2008) DNA Methylation and Demethylation in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book.* Doi.org/10.1199/tab.0102.
- Gendall A., Levy Y., Wilson A., Dean C. (2001). The VERNALIZATION 2 Gene Mediates the Epigenetic Regulation of Vernalization in Arabidopsis. *Cell.* **107**: 525-535
- Gentry M. & Hennig L. (2014) Remodelling chromatin to shape development of plants. *Experimental Cell Research.* **321**: 40-46.
- Ghoshroy S., Lartey R., Sheng J., Citovsky J. (1997) Transport of proteins and nucleic acids through Plasmodesmata. *Plant Physiology.* **48**:27–50.
- Gill G. (2004) SUMO and Ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes & Development.* **18**: 2046-2059.
- Gregory G., Vakoc C., Rozovskaia T., Zheng X., Patel S., *et al.* (2007). Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Mol Cell Biol* **27**: 8466–8479

- Grimaud C., Nègre N., Cavalli G. (2006) From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Research*. **14**: 363-375
- Grossniklaus U., Paro R. (2014) Transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a019331.
- Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., *et al.* (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila* trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**, 701–708
- Guo L., Yu Y., Law J., Zhang X (2010). SET DOMAIN GROUP2 is the major histone H3 lysine 4 trimethyltransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. **107**: 18557–18562.
- Heidstra R. & Sabatini S. (2014) Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews. Molecular Cell biology*. **15**: 301-312
- Hennikoff S. & Smith M. (2014) Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(9). doi:10.1101/cshperspect.a019364
- Hernández-Marroquin V. (2014) Participación de los genes mads en la red transcripcional que regula la homeostasis celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hou H. & Yu H. (2010) Structural insights into histone lysine methylation. *Current Opinion in Structural Biology*. **20**: 739-748.
- Ingham P. (1983) Differential expression of bithorax complex genes in absence of the extra sex combs and trithorax genes. *Nature*. **306**: 591–593.
- Ingham P. (1985) Genetic control of the spatial pattern of selector gene expression in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **50**, 201-208.
- Jablonka E., Lamb M. (2002). The changing concept of Epigenetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **981**: 82-96.

- Jaenisch R., Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*. **33**: 245-54.
- Jenuwein T. & D. Allis. (2001) Translating the histone code. *Science*. **293**: 1074-1079.
- Jiang D., Kong N., Gu X., Li Z., He Y. (2011) Arabidopsis COMPASS-Like Complexes Mediate Histone H3 Lysine-4 Trimethylation to Control Floral Transition and Plant Development. *PLoS Genet* **7**(3): e1001330. doi:10.1371/journal.pgen.100133
- Kadam S. & Emerson B. (2003) Transcriptional Specificity of Human SWI/SNF BRG1 and BRM Chromatin Remodeling Complexes. *Molecular Cell*. **11**: 377-389
- Kennison J. & Tamkun J. (1988). Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science*. **85**: 8136-8140
- Klose R. & Bird A. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **31**: 89-97
- Köhler C. & Aichinger E. (2010) Antagonizing Polycomb group-mediated gene repression by chromatin remodelers. *Epigenetics* **5**:1, 20-23
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 141–172
- Kornet N. & Scheres B. (2009) Members of the GCN5 Histone Acetyltransferase Complex Regulate PLETHORA-Mediated Root Stem Cell Niche Maintenance and Transit Amplifying Cell Proliferation in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **21**: 1070-1079
- Kouzarides T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. **128**: 693-705.
- Landry J., Sharov A., Piao Y., Sharova L., Xiao H., *et al.* (2008) Essential Role of Chromatin Remodeling Protein Bptf in Early Mouse Embryos and

- Embryonic Stem Cells. *PLoS Genet* **4**(10): e1000241.  
doi:10.1371/journal.pgen.1000241
- Lewis E. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.
- Li E. & Bird A. 2007. DNA methylation in mammals. Epigenetics, edited by C. D. Allis *et al.* Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 341–356
- Li M., Liu G., Izpisua-Belmonte J. (2012). Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nature Molecular Cell* **13**: 524-535
- Lin X., Zhao Z., Dong Z., Soubigou-Taconnat L., Renou J., *et al.* (2008) Di- and Tri- but Not Monomethylation on Histone H3 Lysine 36 Marks Active Transcription of Genes Involved in Flowering Time Regulation and Other Processes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology*. **28**: 1348-1360
- Luger K., A. Mäder, Richmond R., D. Sargent, J. Richmond. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature*. **389**: 251:260
- Martin C. Zhang Y. (2005) The diverse functions of histone methylation. Nature reviews. *Molecular cell biology*. **6**: 838-49.
- Mattick J., Amaral P., Dinger M., Mercer T., Mehler M. (2009) RNA regulation of epigenetic processes. *BioEssays*. **31**:51-59.
- Maunakea A., Chepelev I., Cui K., Zhao K. (2013) Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Research*. **23**:1256-1269.
- Menafrà R., Stunnenberg H. (2014). MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms. *Frontiers in genetics*. **5**, 428: 1-7
- Mercer T., Dinger M., Mattick, J. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Rev. Genet*. **10**: 155–159
- Meissner A., Walter J. (2015). Epigenetic Mechanisms in cellular reprogramming. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Metivier R., Penot G., Hubner M., Reid G., Brand H., *et al.* (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**: 751–763.
- Milne T., Briggs S., Brock H., Martin M., Gibbs D., *et al.* (2002) MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular Cell*. **10**: 1107-1117
- Milne T., Dou Y., Martin M., Brock H., Roeder R., *et al.*(2005) MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *PNAS*.**102**, 41: 14765–14770
- Mo R., Rao S., Zhu Y. (2006) Identification of the MLL2 complex as a coactivator for estrogen receptor. *Journal of Biological Chemistry*. **281**: 15714-15720
- Monfared M., Carles C., Rossignola P., Piresa H., Fletcher J. (2013) The ULT1 and ULT2 trxG Genes Play Overlapping Roles in Arabidopsis Development and Gene Regulation. *Molecular Plant*. **6**: 1564-1579
- Morris k., Mattick J. 2014. The rise of regulatory RNA. *Nature Genetics*. **15**: 423-437
- Murr R. (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv. Genet.* 70, 101–141
- Napsucialy-Mendivil S., Alvarez-Venegas R., Shishkova S., Dubrovsky J. (2014) ARABIDOPSIS HOMOLOG of TRITHORAX1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *Journal of Experimental Biology*. doi:10.1093/jxb/eru355
- Nawy T. Lee J. Colinas J. Wang J. Thongrod S. *et al.* (2005) Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *The Plant Cell*. **17**: 1908-1925
- Over R. & S. Michaels. (2014) Open and closed: the roles of linker histones in plants and animals. *Molecular Plant*. **7**: 481-491.
- Patel A., Vought V., Dharmarajan V., Cosgrove M. (2008) A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the Mixed Lineage Leukemia Protein-1 core complex. *J Biol Chem*. **283**: 32162–32175.

- Pendleton J., Nagai B., Murtha M., Ruddle F. (1993) Expansion of the Hox gene family and the evolution of chordates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 6300-6304.
- Pien S., Fleury D., Mylne J., Crevillen P., Inze D., *et al.* (2008) Unraveling trithorax functions in plants: ATX1 dynamically regulates the activation of FLC via histone H3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell* **20**:580–588
- Pikaard C. & Mittelsten O. (2014) Epigenetic Regulation in Plants. C. Allis, Caparros M, Jenuwein T., Reinberg D. Additional Perspectives on Epigenetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Poux S., Horard B., Sigrist C., Pirrotta V. (2002). The Drosophila Trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of Polycomb silencing. *Development.* **129**: 2483-2493.
- Pruss D. Hayes J. Wolffe. (1995) Nucleosomal anatomy where are the histones? *BioEssays.* **17**: 161-170.
- Raz G., Jablonka E. (2009). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Prevalence, Mechanisms, and Implications for the Study of Heredity and Evolution. *The Quarterly Review of Biology.* **84**: 131-176
- Ringrose L, Paro R. (2004). Epigenetic Regulation of Cellular Memory by the Polycomb and Trithorax Group Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 413-443
- Rodriguez-Campos A. & Azorin F. (2007) RNAis an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS ONE.* **2**: e1182.
- Roh T., Cuddapah S., Cui K., Zhao K. (2006). The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.***103**, 15782-15787.
- Rossetto D., Avvakumov N., Côté J. (2012) Histone phosphorylation. A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* **7**:10, 1098-1108
- Saleh A. Al-Abdallat A. Ndamukong I. Alvarez-Venegas R. Avramova Z. 2007. The Arabidopsis homologs of trithorax (ATX1) and enhancer of zeste (CLF) establish “bivalent chromatin marks” at the silent AGAMOUS locus. *Nucleic Acids Research.* **35**: 6290-6296

- Saleh A., Alvarez-Venegas R., Yilmaz M., Oahn-Le, Hou G., *et al.* (2008) The Highly Similar Arabidopsis Homologs of Trithorax ATX1 and ATX2 Encode Proteins with Divergent Biochemical Functions. *The Plant Cell*. **20**: 568-579
- Scheres B. (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Molecular Cell Biology*. **8**: 345-354.
- Scheres B. & Wolkenfelt H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*. **36**: 21-32
- Schneider R. & R. Grosschedl. (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Development*. **21**: 3027-3043.
- Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M., Leblanc B., Cavalli G. (2007) Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*. **128**: 735-745
- Schuettengruber B., Martinez A., Iovino N., Cavalli. (2011) Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews*. **12**: 799-814.
- Schwanbeck R. Xiao H. Wu C. 2004. Spatial Contacts and Nucleosome Step Movements Induced by the NURF Chromatin Remodeling Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **38**: 39933-39941.
- Serino G., Gusmaroli G. (2011) *Arabidopsis thaliana* as an Experimental Organism. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002031.pub2
- Shiio Y., Eisenman R. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS*. **100**: 13225-13230
- Simon J., Tamkun J. (2002) Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax complexes. *Current Opinion in Genetics & Development*. **12**: 210-218
- Smaczniak C., Immink R., Angenent G., Kaufmann K. (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*. **139**: 3081-3098



- Stahl Y., Simon R. (2010). Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology*. **13**: 53-58.
- Steffen P., Ringrose L. (2014) What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. *Nature Molecular Cell* **15**: 340-356.
- Steward M., Lee J., O'Donovan, Wyatt M., Bernstein B., *et al.* (2006) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*. **13**: 852-854
- Strahl B. & D. Allis. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**: 41-45
- Sun B., Looi L., Guo S., He Z., Gan E., *et al.* (2014) Timing Mechanism Dependent on Cell Division Is Invoked by Polycomb Eviction in Plant Stem Cells. *Science*. 343, 1248559.
- Tamada Y., Yun J., Woo S., Amasino R. (2009) ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 Is Required for Methylation of Lysine 4 of Histone H3 and for Transcriptional Activation of FLOWERING LOCUS C. *The Plant Cell*. **21**: 3257-3269
- Tanaka Y., Katagiri Z., Kawahashi K., Kioussis D., Kitajima S. (2007) Trithorax group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene*. **397**:161–168
- Tapia-López R., García-Ponce B., Dubrovsky J., Garay-Arroyo A., Pérez- Ruíz R., *et al.* (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **146**: 1182-1192.
- Theissen G., Becker A., Di Rosa A., Kanno A., *et al.* (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*. **42**: 115-149
- Thorstensen T., Grini P., Mercy I., Alm V., Erdal S., *et al.* (2008) The Arabidopsis SET-domain protein ASHR3 is involved in stamen development and interacts with the bHLH transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS). *Plant Mol Biol* **66**: 47–59

- Tie F., Banerjee R., Stratton C., Prasad-Sinha J., Stepanik V., *et al.* (2009) CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development*. **136**: 3131-3141
- Tkachuk D., Kohler S., Cleary M. (1992) Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell*. **71**: 691–700
- Tschiersch B., Hofmann A., Krauss V., Dorn R., Korge G., *et al.* (1994) The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J*. **13**: 3822–3831.
- Valencia-Morales M. Camas-Reyes J. Cabrera-Ponce J. Alvarez-Venegas R. (2012) The Arabidopsis thaliana SET-domain-containing protein ASHH1/SDG26 interacts with itself and with distinct histone lysine methyltransferases. *Journal of Plant Research*. **125**:679-692
- Vanyushin R. (2006) DNA Methylation and Epigenetics. *Russian Journal of Genetics*. **42**: 985-997.
- Verbelen J., De Cnodder, Le J., Vissenberg K., *et al.* (2014). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signalling & Behavior*. **1**:6, 296-304
- Waddington C. (1942). The Epigenotype. *Endeavour*. 18-20
- Weigel D. & Jürgens G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature*. 415: 751-754
- Welch D., Hassan H., Blilou I., Immink R., Heidstra R., *et al.* (2007). Arabidopsis JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes Dev*. **21**: 2196–2204.
- Wysocka J., Allis D., Coonrod S. (2006) Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Bioscience*. **11**: 344-355
- Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T., Kwon S., *et al.* (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodeling. *Nature*. **442**: 86-90.

- Xu L., Shen W. (2008) Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis. *Curr Biol.* **18**:1966-1971.
- Yadav R. Girke T. Pasala S. Xie M. Venugopala G. 2009. Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Science.* 106: 1-6
- Yao X., Feng H., Yu Y., Dong A., Shen W. (2013) SDG2-Mediated H3K4 Methylation Is Required for Proper Arabidopsis Root Growth and Development. *PLoS ONE* **8**(2): e56537. doi:10.1371/journal.pone.0056537
- Yu B., Hess J., Horning S., Brown G., Korsmeyer S. (1995) Altered Hox expression and segmental identity in Mll mutant mice. *Nature* **378**: 505–508.
- Yu B., Hanson R., Hess J., Horning S., Korsmeyer S. (1998) MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 10632-10636
- Yue M., Li Q., Zhang Y., Zhao Y., Zhang Z., *et al.* (2013) Histone H4R3 Methylation Catalyzed by SKB1/PRMT5 Is Required for Maintaining Shoot Apical Meristem. *Plos One.* **8**(12): e83258
- Zhang M., Kimatu J., Xu K., Liu B. (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics.* **37**: 1-12
- Zhao Z., Yu Y., Meyer D., Wu C., Shen W. (2005) Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nature cell Biology.* **7**: 1256-1260

## 11. Anexo

**Tabla S1.** Lista de algunos genes del grupo Polycomb y Trithorax en el sistema *Drosophila melanogaster* y sus homólogos en *Arabidopsis thaliana*.

Polycomb Group								
	PRC1				PRC2			
<i>Drosophila melanogaster</i>	Psc	Pc	dRING	Ph	E(z)	ESC	Su(z)12	N55
	AtBMI1 <sub>a</sub>	LHP1		AtRING1 <sub>a</sub>	Cif	FIE	EMF2	MSI1-5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtBMI1 <sub>b</sub>			AtRING1 <sub>b</sub>	SWN		FIS2	
	AtBMI1 <sub>c</sub>				MEA		VRN2	
	EMF1							
Trithorax Group								
	HKMT		COMPASS		Remodeladores de cromatina dependiente de ATP			
<i>Drosophila melanogaster</i>	TRX		ASH2		BRM			
	ASH1				KIS			
	ATX1, ATX2		WDR5a		BRM			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ASHH1, ASHH2, ASHR3		WDR5b		PKL			
	ATXR3, ATXR7		ASH2R					
			RBL					
			ULT1, ULT2					

**Tabla S2.** Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de plantas mutantes y condiciones de la PCR.

Nombre de la línea mutante	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones usadas por ciclo.
<i>atx1-3</i>	ATX1-F1	CGGACAGGTATGCAGCTACT G	94°C 30" 55°C 30" 72°C 45" 35 Ciclos
	ATX1-R1	CAGCTATTGACGGTCTAACAA G	
	T-DNA/SALK LBC1	GGAACAACACTCAACCCTATC TCGG	94°C 30" 55°C 30" 72°C 30" 35 ciclos
	ATX1-R1	CAGCTATTGACGGTCTAACAA G	
<i>ult1-3</i>	EP-ULT1-F	GCTTAATACTTATACTACCAA CATC	94°C 30" 55°C 30" 72°C 1'45" 35 Ciclos
	PA-ULT1pcrR	AGCTGGTGTCAACTTGTCTAG C	
	T-DNA/SALK LBC1	GGAACAACACTCAACCCTATC TCGG	94°C 30" 55°C 30" 72°C 1'45" 35 Ciclos
	PA-ULT1pcrR	AGCTGGTGTCAACTTGTCTAG C	

\*En todas las PCR's se realizó una desnaturalización inicial de 94°C por 5' y una extensión final de 72°C por 5.

**Tabla S3.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de las mutantes de *ATX1*.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones usadas por ciclo
<i>AGL17</i>	OEAB154	CTACTATTGAACGATTCAATACGGCT	94°C 30" 66°C 30" 72°C 1'30"
	OEAB157	CTTTGGTTTGCTCTCCGACATG	35-37 ciclos
<i>AGL19</i>	Agl19 F 430	GAGACGAAACATCTGGATTG	94°C 30" 52°C 30"
	Agl19 R North	TTGAGAAGTTGAAGGCAGA	72°C 40" 35-37 ciclos
<i>ATX1</i>	MP-ATX1pcr-F	GGCGGGAGATATGATGATTGAA	94°C 30" 58°C 30"
	MP-ATX1pcr-R	TCTTCCCATTTAGGGATATGCC	72°C 30" 30 ciclos
<i>TUB2</i>	TUB FOR NEW	AGGACTCTCAAACACTACTACC	94°C 30" 58°C 30"
	TUB REV	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	72 °C 45" 25 ciclos
<i>XAL1/A GL12</i>	Agl12rt-F	TGGTCGTGGTTCTTCTTCTGCTAC	94°C 30" 58°C 30" 72°C 45"
	Agl12rt-R	TGTCTCCATGACTGCGAAGTTAGC	30-35 ciclos

\*En todas las PCR's se realizó una desnaturalización inicial de 94°C por 5' y una extensión final de 72°C por 5.

Continuación **Tabla S3**. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de las mutantes de *ATX1*.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones usadas por ciclo
<i>XAL2/AG L14</i>	Agl14-F458	GTAGAAAGATATCAAAGCGAA	94°C 30" 58°C 30" 72°C 45" 30-35 ciclos
	Agl14-R458	GGAGGAACTTTTTGAAGTGT	

En todas las PCR's se realizó una desnaturalización inicial de 94°C por 5' y una extensión final de 72°C por 5. El orden de las temperaturas.

**Tabla S4.** Oligonucleótidos utilizados para la clonación de pULT1:ULT1

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Condiciones usadas
<i>ULT1</i>	EP-ULT1-F	GCTTAATACTTATACTACCAACA TC	94°C 2' 94°C 30" 55°C 30"
	EP-ULT1-R	AGCTTTGACATTGCTGGTGAAG	68°C 2' 68°C 3'



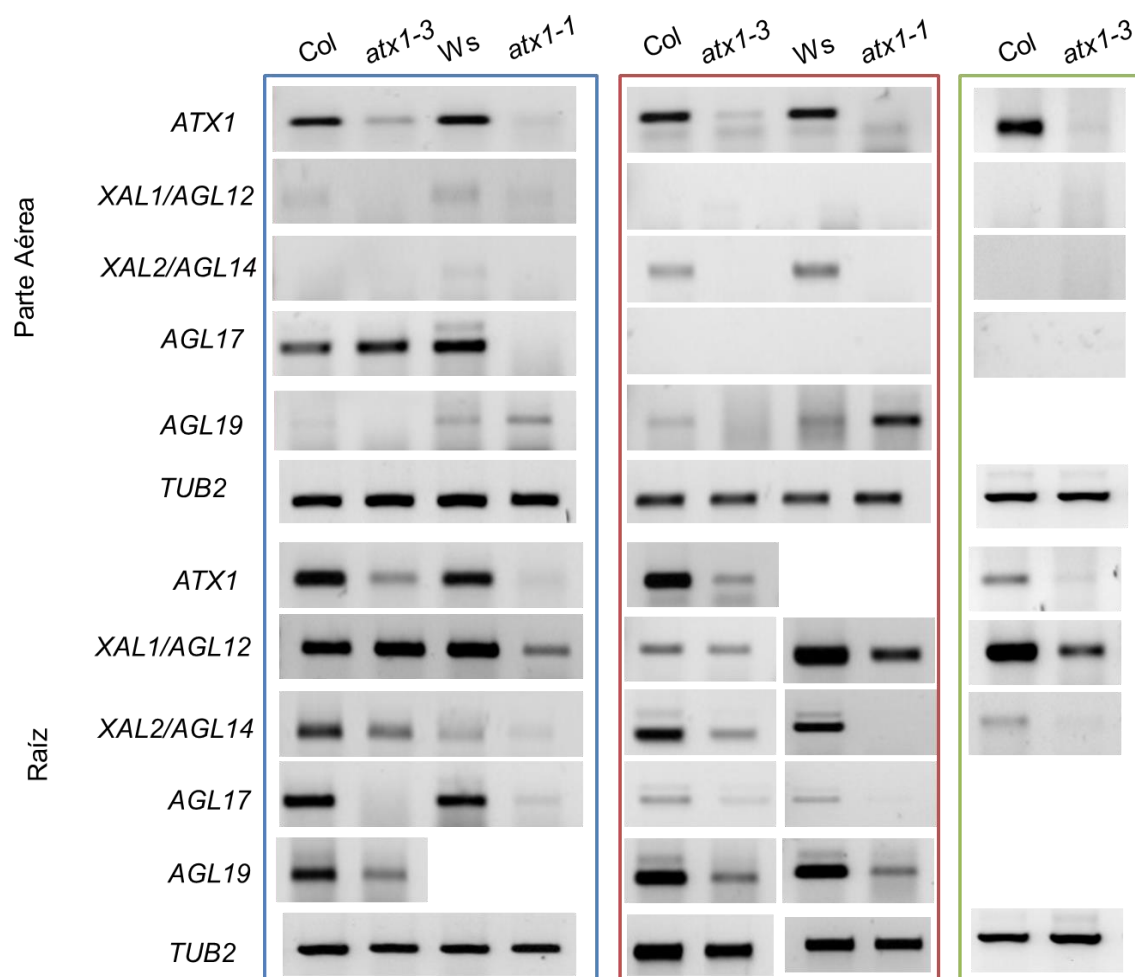


Figura S1. Expresión de los genes MADS-box en plantas mutantes de *ATX1*. Cada recuadro representa una réplica biológica distinta. Geles representativos de expresión de *XAL1/AGL12*, *XAL2/AGL14*, *AGL17* y *AGL19* en parte aérea y raíces de plantas *atx1-3* y *atx1-1* a los 5 y 7 días post-siembra. Como control de cargado se utilizó al gen de *Tubulina 2* (*TUB2*).

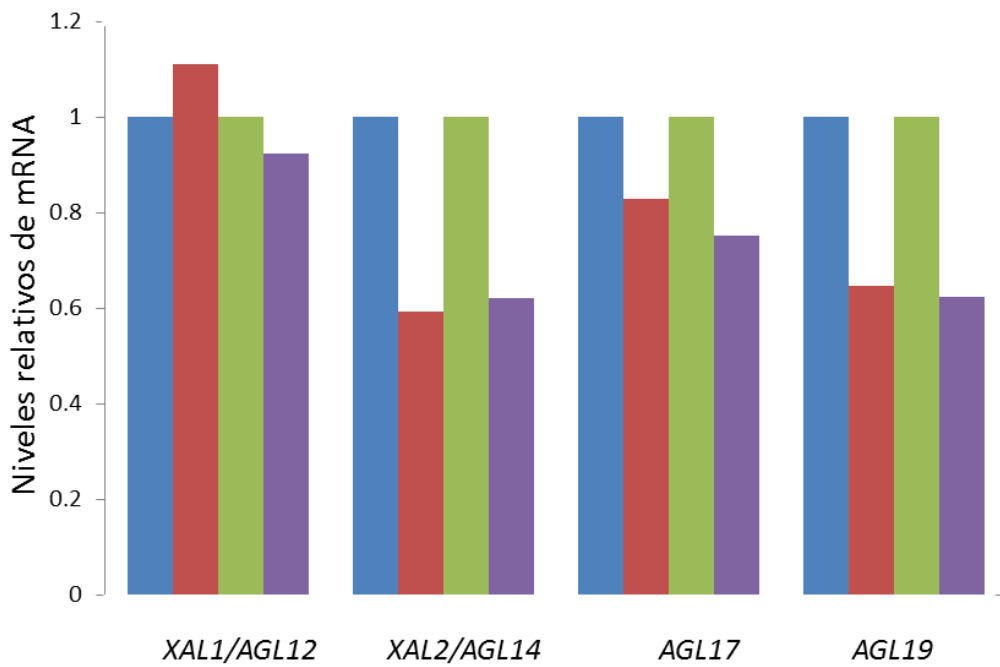
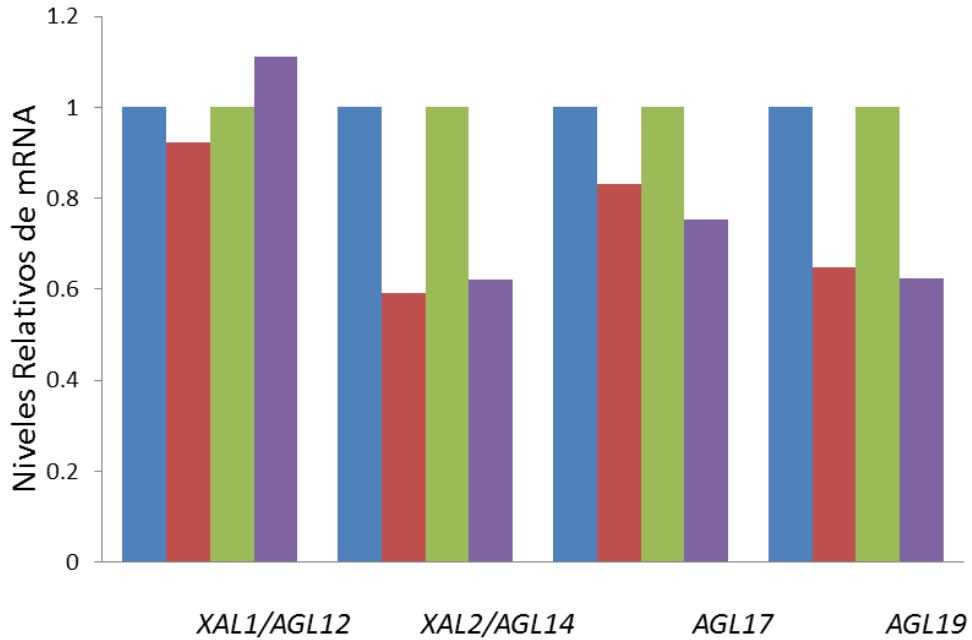


Figura S2. Valores de densitometría de las RT-PCRs realizadas en raíz a los 5 días post-siembra. Cada gráfica representa una réplica biológica. Se ajustó el valor obtenido con respecto a las plantas silvestres y se comparó con respecto a las mutantes.

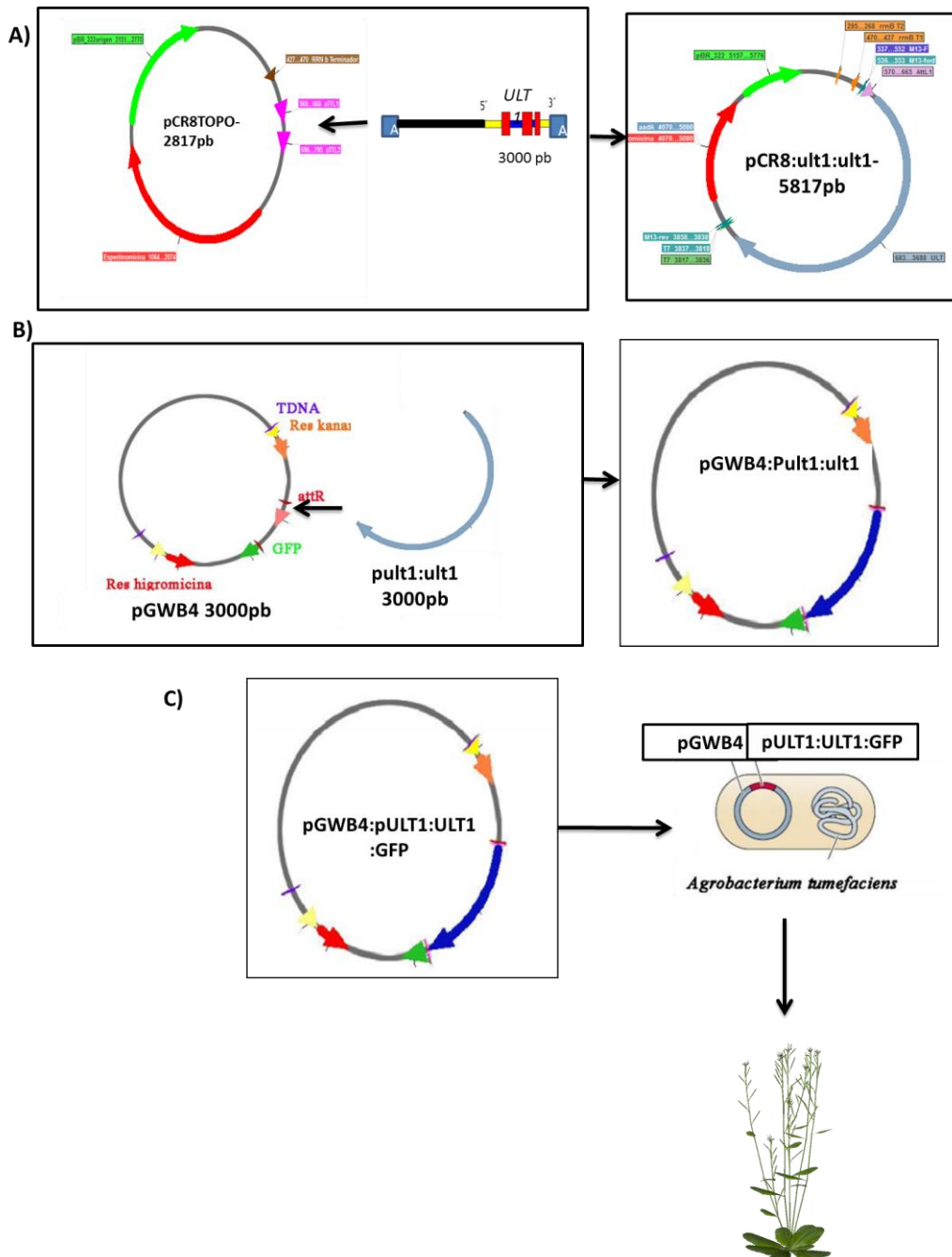


Figura S3. Esquema de la clonación y transformación de la construcción pULT1:ULT1:GFP. A) Clonación y ligación del promotor más el gen( pULT1:ULT1) en el vector pCR8TOPO. B) Ligación de pULT1:ULT1 en el vector pGWB4 para obtener a pULT1:ULT1:GFP. C) Transformación de *A. tumefaciens* con el vector, seguido de la transformación de *Arabidopsis* con *A. tumefaciens*

Seq_1_661	AGCAGGCTCCGAATTCGCCCTT	gcttaatactttatactaccaacatcttcccttttggtcg	720
Seq_2_1	-----GCTTAATACTTATACTACCAACATCTTCCTTTGGTGC		38
Seq_1_721	tcaaaaatgtagttgaagataagaactgacccatcatttttagctcatcatccatccact		780
Seq_2_39	TCAAAAATGTAGTTGAAGATAAGAAGTACCATCATTTTTAGCTCATCATCCATCCACT		98
Seq_1_781	atattgcatcttacctcatctggtgaaataagaacgcatgagcaagctactttttcatcttt		840
Seq_2_99	ATGTTGCATTACCTCATTGTTGAATAAGAACGCGTTGAGCAAGCTACTTTTTCATCTTT		158
Seq_1_841	agttggtttttagtttaataaaacttgaagtggaaagaacctaacatcattgctgcaaac		900
Seq_2_159	AGTTGGTTTTGTGTTAAATAAAACTTGAAGTGGAAAGAACCTAACATCGTTGCTGCAAAC		218
Seq_1_901	ttgatattcgaatattttataaccaccatcttataaaacaaaaacaaaatatgagaagtta		960
Seq_2_219	TTGATATTCGAATATTTATAACCACCATCTTAAAAACAAAAACAAAATATGAGAAGTTTA		278
Seq_1_961	aaaacatgacaaaactttgagtgaatacagaaagggccaagctcgtaaacttctaaa		1020
Seq_2_279	AAAACATGACAAAACCTTGGAGTAGAAATCAGAAAGGGGCCAAGGCTCGTAAACTTCTAAA		338
Seq_1_1021	ccccaaagcccataataaatgttttgaatccataagttcactcccacccgctactcttttt		1080
Seq_2_339	CCCCAAGCCATAATAAATGTTTTGAATCCATAAGTTCACCTCCATCCGCTACTCTTTTT		398
Seq_1_1081	ttcagtttcttgggaaacaactagggagaaagagatttttaaaattcaaaagtaaaagatg		1140
Seq_2_399	TTCAGTTTCTTGGGAACAACCTAGGAGGAAAGAGAGTTTTTAAAGTTCAAAGTAAAGATGT		458
Seq_1_1141	tggtatacaaaaaattgtgtgacaacttattcatattcatgtctctgataaagatgttgag		1200
Seq_2_459	TGTATACAAAAATGTGTGACAACCTATTTCATATTGATGCTCTGTAAGATGTTGAC		518
Seq_1_1201	ataattatctcactttcttcaaaaaaaaaaactgacacattttcttttaattctcattta		1260
Seq_2_519	ATAATTATTTCACTTTCTTCAAAAAAAAAAACTGGCGACATTTCTTTAATCTCATTTA		578
Seq_1_1261	tcatttatgactttttgatttttggtttgcaccccatccattggtatgacttaagata		1320
Seq_2_579	TCCATTATGTACTTTTTGTTTTGTTTGGCAACCCATCCATTGTTGATGTAAGATA		638
Seq_1_1321	acaacaacaacaaa-tataccataataaatcataatggtctacatacaacactagatcc		1379
Seq_2_639	ACAACAACAACAAAATATACCATATATAAATCATATGGTCTACATACAACACTAGTATCC		698
Seq_1_1380	tcattccgtattaaaaaaaaatgagttcctcgaacacatataagctacaaaatatagagatatga		1439
Seq_2_699	TCATCCGTATTAATAAATGAGTTCTCGAACACATATAGCTACAAATATAGAGATATGA		758
Seq_1_1440	ctttgggttttgagcgcattgcagaatacctaaacagccatagatgtcaatgacgtcgtcg		1499
Seq_2_759	CTTTGGGTTTGGCGCATTCAGAAACCTAACAGGCATAGATGTCATGACGTCGTCG		818
Seq_1_1500	tcattgacttggttactagttggtttatagacaactagttgattaaaccttttcttttaa		1559
Seq_2_819	TCATGTACTTGGTTACTAGTTGTTTTATAGACAACCTAGTTGATTAACCTTTCTTTTAA		878

Figura S4. Alineamiento de la secuencia ULT1 (AT4G28190) con respecto a la secuencia clonada.





Seq_1_2400	AACAATGAGGGAGAGATGCAATGTGGTCCATGTTGTTTAAGCAAGAGGAGCTACAAGAG	2459
Seq_2_1714	AACAATGAGGGAGAGATGCAATGTGGTCCATGTTGTTTAAGCAAGAGGAGCTACAAGAG	1773
Seq_1_2460	ATGAGTGGGGTCAATGTTGGTGGCGATTACGTTGAGGTCATGTGTGGTTGTACCAGTCAC	2519
Seq_2_1774	ATGAGTGGGGTCAATGTTGGTGGCGATTACGTTGAGGTCATGTGTGGTTGTACCAGTCAC	1833
Seq_1_2520	CGATACGGCGATGCTGTTGCTAGACTTAGGGTTTTCCACCGGTGACCTTGAAATCACC	2579
Seq_2_1834	CGATACGGCGATGCTGTTGCTAGACTTAGGGTTTTCCACCGGTGACCTTGAAATCACC	1893
Seq_1_2580	TGCCAATGCACACCTGGTTCGCGATGAAGGTCCTCTCTTTTTTGTCTCTACTGTCTCTTTC	2639
Seq_2_1894	TGCCAATGCACACCTGGTTCGCGATGAAGGTCCTCTCTTTTTTGTCTCTACTGTCTCTTTC	1953
Seq_1_2640	TCGCTCTTTCTGATGCTTTGGGAAAATGGGTTTTGATTTGTGTGCATGTACATGGA	2699
Seq_2_1954	TCGCTCTTTCTGATGCTTTGGGAAAATGGGTTTTGATTTGTGTGCATGTACATGGA	2013
Seq_1_2700	atgatgatgagattaaacatttctctctctctagctactatcacattggactggtaaaac	2759
Seq_2_2014	ATGTGTGTGAGATTAACGTTTGTCTGTCTAGCTACTATCACATTGGGCTGGTAAAGC	2073
Seq_1_2760	taggctctttaaagcatgattacatatttatcaatgagctcttagtatatactagctagatcc	2819
Seq_2_2074	TAGGGTCTTTAGCATGATTACATATTATCAATGAGTCTTAGTGTATGCTAGCTAGATCC	2133
Seq_1_2820	gttctttagaaaaatgaaatgacttgatttgcacagtaaatgttttaggctgtctgttta	2879
Seq_2_2134	GTTCTTGTAGAAAATGAAATGACTTGATTTGCCACAGTAATGTTTAGGCTGTCTGTTA	2193
Seq_1_2880	tctgataaatgataatgcatctcttcttactgccaagtgtagctttattgacaaaaga	2939
Seq_2_2194	TCTGTAAATGGTAATGCGTCTCTTTGTTACTGGCCAAGTGGTAGCTTTATTGACAAAATGA	2253
Seq_1_2940	tatgtctgacttagctataagatataatcaaaagttagatgcaacctagttctttagat	2999
Seq_2_2254	TATGTCTCGCTTAGCTGTACGTGTATGTCAAAGTTGATGCAACCTAGTTCCTTGTGGTAT	2313
Seq_1_3000	ctttagctaaacaattccatctctagcttattttagatagatactcatttagagctctct	3059
Seq_2_2314	CTTGTAGCTAACCAATCCATCTCTAGCTTATTTGGTATAGATGCTCATTAGAGCTCTCT	2373
Seq_1_3060	ttgaaagtaaaagtgaactgaactgaacagTTTTGATTCTATGCTAGACAAGTTGACA	3119
Seq_2_2374	TTGAAAGTAAAAGTGAAGTGAACAGTTTTGATTGTATGATGCTAGACAAGTTGACA	2433
Seq_1_3120	CCAGCTGCATTCGAGAAGCATTCTGGAAGAGAAAACGCCAAGCAAGTGGAAAAACAATGTG	3179
Seq_2_2434	CCAGCTGCATTCGAGAAGCATTCTGGAAGAGAAAACGCCAAGCAAGTGGAAAAACAATGTG	2493
Seq_1_3180	TGGCTTATCATTTGGGGCCGAAAAGGTTCCATTGTCAAAGACAGTATTGCTCAAGTACTAC	3239
Seq_2_2494	TGGGTTATCATTTGGGGCCGAAAAGGTTCCATTGTCAAAGACAGTATTGCTCAAGTACTAC	2553

Continuación Figura S4. Alineamiento de la secuencia ULT1 (AT4G28190) con respecto a la secuencia clonada.

