



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regulación del factor de transcripción MADS-box
AGL19 y sus transcritos alternativos en
Arabidopsis thaliana

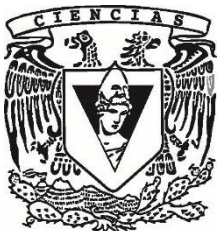
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JUAN CARLOS JUNIOR YUSTIS
RUBIO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2018



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.

Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título
Subtítulo
Número de páginas
Año

1. Datos del alumno

Yustis
Rubio
Juan Carlos Junior
56 84 54 47
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311699898

2. Datos del tutor

Dra.
Berenice
García
Ponce de León

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María de la Paz
Sánchez
Jiménez

3. Datos del sinodal 2

Dr.
José Luis
Reyes
Taboada

3. Datos del sinodal 3

Dr.
Luis David
Alcaraz
Peraza

3. Datos del sinodal 4

Q.
Viviana
Escobar
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Regulación del factor de transcripción MADS-box AGL19 y sus transcritos alternativos en Arabidopsis thaliana
97 p.
2018

Índice

Agradecimientos académicos	I
Agradecimientos personales	II
Abreviaturas	III
Resumen	V
1. Introducción	1
1.1. Splicing Alternativo	1
<i>1.1.1. Mecanismos básicos de regulación del splicing alternativo</i>	3
<i>1.1.1.1. Degradación de mRNA mediada por mutaciones sin sentido (NMD)</i>	5
<i>1.1.1.1.1. Splicing alternativo y NMD</i>	9
<i>1.1.1.2. Regulación por siPEPs/miPs</i>	9
<i>1.1.1.3. Regulación por lncRNAs</i>	11
<i>1.1.1.4. Regulación epigenética del splicing alternativo</i>	12
<i>1.1.2. Impacto del splicing alternativo en la regulación del ciclo circadiano de las plantas</i>	15
<i>1.1.3. Impacto del splicing alternativo en el desarrollo de Arabidopsis</i> ..	18
1.2. Transición a la floración	19
<i>1.2.1. Genética molecular de la transición a la floración</i>	20
<i>1.2.2. Vías de transición a la floración</i>	21
<i>1.2.2.1. Vernalización</i>	26
2. Antecedentes	31
3. Hipótesis	35
4. Objetivo general	35
4.1. Objetivos particulares	35
5. Materiales y Métodos	36
<i>5.1. Plantas y condiciones de crecimiento</i>	36
<i>5.2. Extracción y cuantificación del RNA</i>	37
<i>5.3. Síntesis de cDNA y RT-PCR semicuantitativa</i>	38

5.4. Ensayo de β -glucoronidasa	39
5.5. Análisis bioinformático de la secuencia de <i>AGL19</i>	40
6. Resultados	42
6.1. Regulación de <i>AGL19</i> y sus transcritos alternativos por CLF	42
6.2. La activación transcripcional de <i>AGL19</i> no depende únicamente de ATX1	44
6.3. Proteínas involucradas en la vía de NMD regulan la expresión de <i>AGL19</i>	46
6.4. Análisis bioinformático de los transcritos alternativos de <i>AGL19</i>	49
6.5. <i>AGL19::GUS</i> se expresa solamente en la punta de la raíz principal y de las raíces laterales pero no en la parte aérea.....	51
7. Discusión	57
8. Conclusiones y Perspectivas	72
9. Referencias	74

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN211516, IN208517, IN205517 e IN204217 y de CONACyT: 240180, 2015-01-687, a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Alvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez Jiménez y Adriana Garay Arroyo, a quienes les agradecemos su apoyo.

A la Dra. Berenice García por su asesoría y dirección durante la realización de este trabajo.

A los sinodales: Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, Dr. José Luis Reyes Taboada, Dr. Luis David Alcaraz Peraza y Q. Viviana Escobar Sánchez, cuyos comentarios y correcciones contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Estévez que generó la construcción *AGL19_{prom+int}::GUS* utilizada en este trabajo

Agradezco también a Diana Romo Ríos por el apoyo logístico y administrativo, así como también a la Dra. Teresa Romero y Laura Rodríguez por la preparación de las soluciones y materiales utilizados para la realización de este trabajo.

Agradecimientos personales

A mi mamá, por su incansable dedicación en el trabajo más difícil de este mundo: ser madre. Me has enseñado lo que significa el amor puro e incondicional y me has demostrado lo que es la verdadera fortaleza. A ti te debo todo lo que soy y seré. Te amo.

A mi tío Juan Carlos, que durante toda mi vida ha sido un verdadero padre para mí, por inculcarme el amor por la ciencia.

A mi familia, por todo su apoyo y por siempre impulsarme a ser un mejor ser humano. Especialmente a mi abuela, cuya infinita sabiduría y cariño incondicional han estado presentes durante todas las etapas de mi vida.

A la Dra. Berenice, por su inconmensurable paciencia y por todas sus enseñanzas (además de las académicas) que han contribuido no solo a mi formación científica, sino también personal.

A mis entrañables y verdaderos amigos que han estado conmigo en los momentos más felices y difíciles de mi vida, por soportar mis excentricidades y mi carácter (lo cual no es tarea fácil), así como mis momentos de neurosis pasajera, gracias por estar siempre conmigo. No hace falta mencionarlos, ya que ustedes saben quiénes son.

A Gaby, por apoyarme incondicionalmente (en más de una forma) durante toda la carrera. Gracias por impulsarme a siempre ser mejor (y mantenerme despierto en las clases).

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio por su apoyo y amistad, así como por todas las discusiones y risas durante la hora de la comida. Especialmente a Tere y Stella, gracias por todos esos momentos de simpleza extrema y procrastinación (casi) eterna, han hecho de mi estancia en el laboratorio una de las mejores experiencias de mi vida.

Abreviaturas

AGAMOUS-LIKE 19	AGL19
ARABIDOPSIS TRITHORAX HOMOLOGUE 1	ATX1
Circadian Clock Associated 1	CCA1
Codón de termino prematuro	CTP
Complejo de unión exón-exón	EJC
CURLY LEAF	CLF
Desacetilasa de histonas	HDAC
Día corto	SD
Día largo	LD
Días post-siembra	DPS
EARLY FLOWERING 9	ELF9
FLOWERING LOCUS C	FLC
FLOWERING LOCUS T	FT
FRIGIDA	FRI
LEAFY	LFY
Marco de lectura abierto río arriba	uORF
Meristemos apical aéreo (<i>Shoot apical meristem</i>)	SAM
Metilación de la lisina 36 de la histona 3	H3K36me
Micro proteínas	miPs
Nonsense-Mediated mRNA Decay	NMD
Nuclear speckle RNA-binding proteins	NSR
Péptidos interferentes pequeños	siPEPs
Polycomb Group	PcG
Polycomb Repressive Complex 2	PRC2
Proteínas de unión al poli(A)	PABP
Proteínas ricas en residuos de serina/arginina	SR
Retención de intrones	RI
Ribonucleoproteína	RNP
RNA mensajero precursor	pre-mRNA
RNA no codificante largo	lncRNA

RNA polimerasa II	RNAP II
RNA's nucleares pequeños	snRNA
RNP's heterogéneas nucleares	hnRNP
RNP's nucleares pequeñas	snRNP
Sitios de <i>splice</i> (corte y empalme)	SS
Splicing alternativo	SA
SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE	SPL
SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1	SOC1
Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3	H3K27me3
Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3	H3K4me3
Trithorax Group	TrxG
Up-Frame Shift Protein 1	UPF1

Resumen

El *splicing* alternativo es un fenómeno presente en todos los grupos eucariontes, mediante el cual se generan múltiples isoformas de un transcrito primario a partir de un solo gen. Aunque el papel de estas isoformas alternativas ha sido ampliamente estudiado en modelos animales, en plantas este tipo de estudios se encuentran en etapas tempranas. AGL19 (AGAMOUS-LIKE 19) es un factor de transcripción tipo MADS-box que está involucrado en la transición a la floración en condiciones de vernalización seguido de un fotoperiodo de día corto y que se encuentra regulado por proteínas del grupo Polycomb (PcG) y por desacetilasas de histonas (HDAC).

En este trabajo se analizaron los patrones de expresión de los transcritos alternativos de *AGL19* y se encontró que los niveles de expresión de dichos transcritos estaban directamente relacionados con la expresión del transcrito canónico. Igualmente se propone que los eventos de *splicing* observados son de retención de intrones, con base en los tamaños de banda observados mediante RT-PCR y el análisis bioinformático indica que se podrían formar algunas proteínas truncadas. Aunado al estudio de los transcritos alternativos también se analizó el patrón de expresión de *AGL19* mediante construcciones transcripcionales utilizando el gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS). La expresión de *AGL19::GUS* utilizando toda la zona intergénica 5' o la de un minipromotor y el primer intrón del gen sólo recuperaron la expresión en la raíz, pero no en la parte aérea de la planta. También se realizaron análisis bioinformáticos para conocer si existían regiones reguladoras en la zona

intergénica y el primer intrón de *AGL19* y se encontró que en efecto existen un gran número de sitios de unión putativos a una gran variedad de factores de transcripción y que muchos de estos podrían estar relacionados con elementos represores en *cis* conocidos como *Polycomb Response Elements* (PREs).

Los datos obtenidos en este trabajo en conjunto nos indican que en efecto existen transcritos alternativos generados por *AGL19* y que estos transcritos podrían tener un papel en el fenotipo de floración tardía de los mutantes por inserción de T-DNA de *AGL19*, así como también en la regulación de *AGL19*. Igualmente se encontró que el primer intrón funciona como una zona reguladora y que la expresión en la parte aérea está regulada por otras zonas dentro o inclusive fuera del locus de *AGL19*.

1. Introducción

1.1. *Splicing* Alternativo

Una de las características de los genomas eucariontes es la presencia de secuencias no codificantes o intrones, que se localizan entre las secuencias codificantes conocidas como exones. En un proceso de *splicing*, los intrones de un gen son removidos y los exones son ligados uno con el otro, para producir el RNA mensajero (mRNA) que es traduccionalmente competente (Lee y Rio, 2015).

El *splicing* alternativo (SA) es un fenómeno presente de manera frecuente en todos los grupos de organismos eucariontes, mediante el cual se pueden generar varias isoformas de un transcrito primario, RNA mensajero precursor (pre-mRNA), a partir de un solo gen (Severing et al., 2012; Syed, Kalyna, Marquez, Barta, & Brown, 2012). El proceso del SA ha evolucionado de forma tal que ha permitido a los organismos eucariontes superar la relativamente limitada capacidad codificante de su genoma al producir múltiples proteínas a partir de un solo gen, lo cual ha llevado al aumento de la diversidad del transcriptoma y la plasticidad del proteoma funcional eucarionte (Lorković et al., 2000; Filichkin et al., 2010; Luco et al., 2011; Seo et al., 2013; Zhou et al., 2014).

Estudios actuales con base en la tecnología de secuenciación de RNA (RNA-seq), estiman que alrededor de un 95% de los transcritos de los genes humanos con múltiples exones sufren un proceso de SA (Lee y Rio, 2015). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) un estudio reciente concluyó que más del 61% de genes con intrones presentaban SA (Marquez et al., 2012). Este

estimado fue realizado en plantas en condiciones de crecimiento estándar y es factible pensar que este porcentaje aumente al realizar análisis transcriptómicos a nivel de un tejido específico en diferentes etapas de desarrollo, o en diversas condiciones de crecimiento (Syed et al., 2012).

El mecanismo básico de remoción de intrones es muy similar en todos los eucariontes. Las reacciones de corte y ligación del RNA necesarias para la remoción de intrones de un mRNA, así como en RNAs no codificantes largos (lncRNAs), requiere de una gran maquinaria molecular compuesta de ribonucleoproteínas (RNPs) y muchos otros cofactores, conocida como el spliceosoma. El spliceosoma funciona en un complejo ciclo de ensamblaje, reacción y desmontaje en el que cinco complejos de RNPs pequeñas nucleares (snRNPs) (U1, U2, U4/U6, y U5) reconocen y se ensamblan en los intrones para finalmente formar un spliceosoma catalíticamente activo (Lorković et al., 2000; Matera y Wang, 2014).

Aunque en plantas la caracterización bioquímica de los diferentes componentes del spliceosoma se ha visto afectada por la falta de sistemas que puedan llevar a cabo la reacción de *splicing in vitro*, la clonación de los RNAs nucleares pequeños (snRNAs) de la clase principal (U1, U2, U4, U5 y U6) y algunos de la clase U12, indica que en cuanto a su estructura primaria y secundaria son muy similares respecto a sus homólogos en animales (Shukla y Padgett, 1999; Solymosy y Pollák, 1993). Por lo tanto, el procesamiento de pre-mRNAs en plantas debe compartir varios componentes y procesos con los mecanismos descritos en animales (Lorković et al., 2000; Staiger y Brown, 2013).

1.1.1. Mecanismos básicos de regulación del SA

Diferentes estudios enfocados al estudio del SA tanto en genes específicos como a un nivel genómico han generado descubrimientos de cómo los patrones de SA son generados y mantenidos en células y tejidos específicos (Lee y Rio, 2015).

La selección de sitios de corte y empalme (*splice sites*: SS) está determinada por una gran variedad de elementos, los cuales pueden actuar tanto en *cis* como en *trans*. Dentro de los elementos en *cis* se encuentran secuencias reguladoras que pueden ser tanto intrónicas como exónicas y que pueden actuar como activadores (*enhancers* del *splicing*) o como represores (silenciadores del *splicing*), dependiendo de su posición y de cómo afecten el uso de un SS (Naftelberg et al., 2015). Los factores de *splicing* en *trans* actúan mediante la unión a *enhancers* o silenciadores del *splicing* y entre ellos pueden encontrarse proteínas ricas en residuos de serina/arginina (SR) y las RNPs heterogéneas nucleares (hnRNPs). Las proteínas SR y las hnRNPs funcionan como factores de *splicing* y SA al controlar la selección del SS de una forma concentración-dependiente y mediante interacciones multicomponente con otros factores de *splicing*. Estos factores que actúan de forma célula- y tejido-específicos, determinan la selección del SS y cómo se debe ensamblar el spliceosoma (Figura 1; Syed et al., 2012). En general, las proteínas SR promueven el *splicing*, mientras que las hnRNPs actúan como inhibidores; sin embargo, se ha observado que también pueden tener funciones opuestas a las anteriormente descritas (Syed et al., 2012).

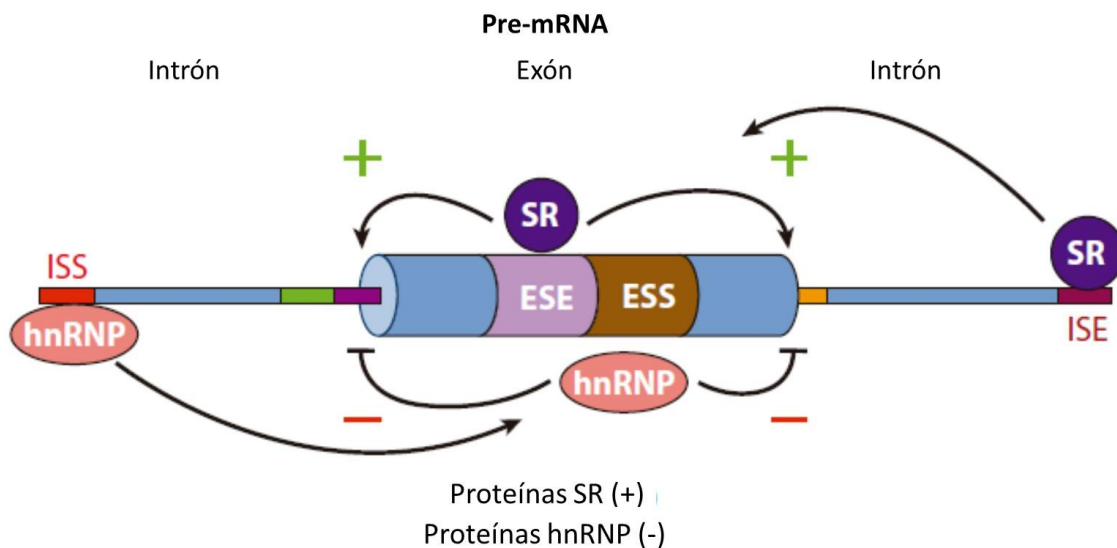


Figura 1. Reguladores *cis* y *trans* del pre-mRNA. Se indican los silenciadores del *splicing* intrónicos (ISS) y exónicos (ESS), y los *enhancers* del *splicing* intrónicos (ISE) y exónicos (ESE). Las proteínas SR generalmente actúan para promover el *splicing* en SS cercanos al interactuar con *enhancers*. Las proteínas hnRNP generalmente actúan como inhibidores del *splicing* en SS cercanos al interactuar con silenciadores (Modificado de Lee y Rio, 2015).

La variación en la abundancia y actividad de los factores de *splicing* determina el patrón de SA de los genes blanco y, por lo tanto, su expresión diferencial en diferentes etapas de su desarrollo y bajo diferentes condiciones de crecimiento. Sin embargo, en plantas existe poca evidencia de la relevancia biológica que tiene el SA sobre diferentes factores de *splicing*. Un claro ejemplo de esto es el impacto que tienen dos isoformas de SR45 (una proteína SR de *Arabidopsis* que parece tener un papel en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo). La variante SR45.2 complementa específicamente el fenotipo de raíz del mutante *sr45*, mientras que la variante SR45.1 complementa el fenotipo de desarrollo de pétalos del mismo mutante (Zhang y Mount, 2009).

Además de la interacción RNA-proteínas, la interacción RNA-RNA y las estructuras secundarias que pueden formar también puede especificar el uso de

un SS y este proceso puede ocurrir también en *trans*. De igual forma se han descubierto relaciones entre modificaciones de la cromatina, componentes de la ruta de RNAs pequeños, velocidad de la RNA polimerasa II y los patrones de SA que afectan el procesamiento de los mRNAs (Naftelberg et al., 2015).

1.1.1.1. Degradación de mRNA mediada por mutaciones sin sentido (NMD)

Los procesos de SA pueden dar lugar a transcritos que poseen codones de término prematuros (CTP) que pueden generar proteínas truncadas, las cuales pueden ser dañinas en algunos casos y representan un costo energético para las células. Los controles de calidad de los transcritos han evolucionado en todos los niveles de regulación genética para identificar y remover estos transcritos aberrantes. Uno de los mecanismos de control de calidad del mRNA mejor estudiado es la degradación mediada por mutaciones sin sentido, mejor conocida como NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) (Broghna y Wen, 2009; Kalyna et al., 2012; Hug et al., 2015). Este mecanismo se encarga de degradar mRNAs que poseen un CTP, así como otros mRNAs que por ejemplo, presentan un UTR-3' largo (Hug et al., 2015). De igual forma se ha demostrado que la vía de NMD no es exclusiva del procesamiento de mRNAs, sino que también una gran variedad de lncRNAs son procesados por la NMD en *Arabidopsis*, *S. cerevisiae* y células troncales de ratón (Hug et al., 2015). Aunque ha habido grandes avances en el entendimiento de los mecanismos del NMD, se sabe que no todos los transcritos que presentan un CTP activan la vía de NMD y que a su vez la vía de NMD controla la abundancia de una variedad de transcritos que no poseen características canónicas para ser procesados por la vía de NMD. Esto sugiere

que no se han identificado todos los factores que pueden activar esta vía (Kalyna et al., 2012).

Varias de las características de los transcritos que poseen CTP y que son sensibles a NMD han sido estudiadas y esto ha llevado al desarrollo de modelos que explican cómo la NMD reconoce y degrada estos transcritos. En modelos experimentales animales la NMD inicia la degradación del transcrito si la terminación de la traducción es alterada (Kalyna et al., 2012). Se ha propuesto que una terminación eficiente de la traducción involucra la interacción del factor de liberación, eRF3, y proteínas de unión al poli(A) (*poly(A) binding proteins*: PABP). Si esta interacción no se da de manera correcta, debido a la presencia de un UTR-3' inusualmente largo o que contiene un intrón, el eRF3 en el ribosoma se unirá a UPF1 (Up-Frame Shift Protein 1), que a su vez reclutará a UPF2 y 3, todas proteínas clave en la NMD. Este complejo de NMD funcional, que también incluye otras proteínas, facilita la fosforilación de UPF1 y la degradación del transcrito (Kerényi et al., 2013). Este mecanismo de UTR-3' largos es característico para transcritos de invertebrados y levaduras. En mamíferos, el proceso de NMD iniciado por un ribosoma que termina en un CTP es inducido por la asociación de UPF3 con un complejo de unión exón-exón (*exon-junction complex*: EJC) río abajo del ribosoma, que se sitúa en el mRNA 20-25 nt río arriba de una unión exón-exón que ha sufrido *splicing*. Durante el proceso de *splicing* el EJC se une con UPF2/3, los cuales se pueden asociar con un ribosoma que termina en un CTP río arriba del EJC que ha reclutado a UPF1 en el complejo SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3). En un mRNA que no contiene un CTP, el EJC es removido durante la

primera etapa de traducción, excepto cuando el CTP se encuentra en el UTR-3'. Esto es consistente con la observación de que los intrones que se encuentran en el UTR-3' pueden aumentar significativamente la NMD (Figura 2; Kalyna et al., 2012a).

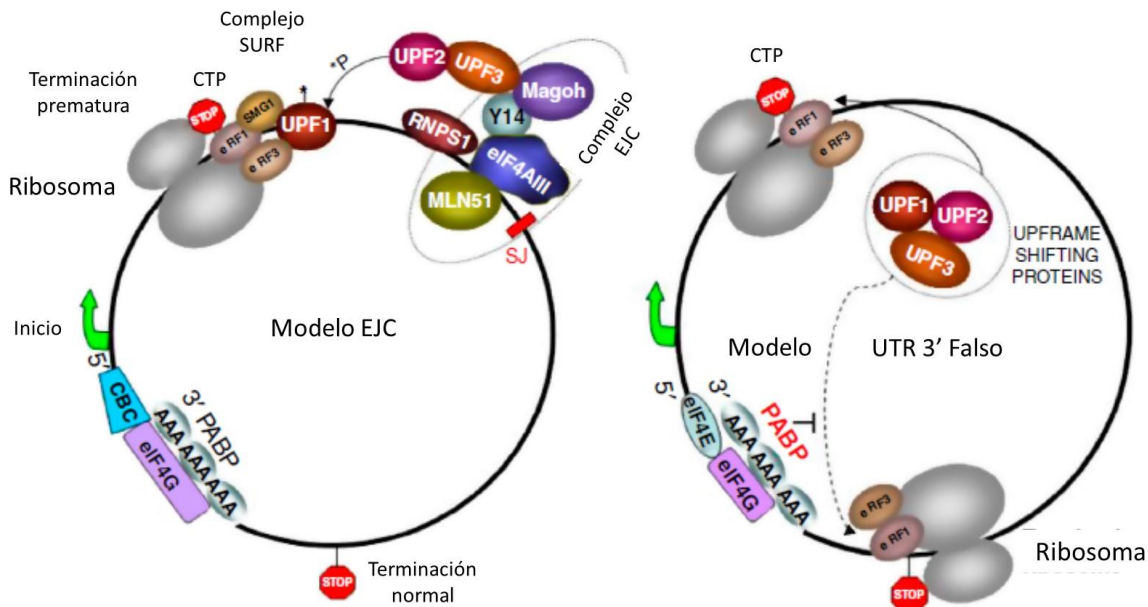


Figura 2. Modelos actuales propuestos para la vía de NMD. La vía de NMD en plantas incorpora elementos de ambos modelos. Sin embargo, en contraste con células animales donde los transcritos de genes sin intrones pueden escapar a NMD, transcritos de genes de un solo exón en plantas que poseen un CTP pueden ser detectados y degradados por NMD (Modificado de Filichkin et al., 2015).

En plantas, las rutas de acción de la NMD no se han podido caracterizar completamente. Las plantas poseen ortólogos de las proteínas NMD clave, UPF1, UPF2, UPF3 y SMG-7 (pero no de SMG-1, SMG-5 o SMG-6) y se ha demostrado que están involucradas en la degradación de mRNAs que presentan CTPs (Arciga-Reyes et al., 2006; Kerényi et al., 2008). La determinación de las características de los transcritos sensibles a NMD indica que al igual que en los mamíferos, las plantas son capaces de reconocer diferentes tipos de transcritos que poseen CTPs (Kalyna et al., 2012). También se demostró que tanto los UTR-

3' largos, así como los intrones localizados en los UTR-3' son señales que activan a la NMD. Esto indica que como en invertebrados y levaduras, la distancia entre un codón de término y las PABP en la secuencia de poli(A) es importante y que la terminación de la traducción probablemente requiera de la interacción del ribosoma con el factor de liberación y las PABP. Igualmente, se ha demostrado la importancia en plantas de los componentes del EJC, que son requeridos para el mecanismo de NMD de intrones propuesto para la NMD de mamíferos (Kalyna et al., 2012). Además, se ha observado que un 20% de los transcritos en plantas poseen marcos de lectura abiertos río arriba (uORFs) en su región UTR 5' (Tran et al., 2008). En teoría si dicho uORF se tradujera, la región UTR 3' río abajo del uORF sería larga y podría presentar intrones y, por lo tanto, estos transcritos podrían ser degradados por NMD. Nyikó et al. (2009) demostraron que los uORF en plantas relativamente largos (mayores a 105 nucleótidos) pueden inducir NMD, sin embargo, observaron que apenas un ~2% de los genes en Arabidopsis poseen un uORF con dichas características.

Debido a que la determinación de las reglas para la NMD en plantas se ha hecho con base principalmente en mutantes de un número reducido de transcritos modelo, es necesario examinar si las características encontradas en estos sistemas modelo corresponden a aquellas que se encuentra en transcritos endógenos sensibles a NMD (Kalyna et al., 2012). Filichkin et al. (2010) predijeron que alrededor de un 78% de los transcritos alternativos en Arabidopsis eran probables blancos de NMD, pero dicha afirmación no fue probada experimentalmente. Un estudio posterior (Kalyna et al., 2012) demostró que

alrededor de un 13% de los genes con intrones en Arabidopsis pueden ser regulados por SA/NMD. De igual forma otro estudio (Drechsel et al., 2013) demostró que al menos un 17.4% de los genes multi-exónicos codificantes producen transcritos alternativos que son blancos de NMD.

1.1.1.1.1. SA y NMD

El SA puede regular los niveles de mRNA al generar mensajeros que contienen CTPs, los cuales, en algunos casos, pueden ser blancos de degradación de la NMD. Recientemente se analizó una gran población de transcritos de Arabidopsis y se demostró que el SA acoplado a la NMD es un mecanismo ampliamente utilizado para regular la expresión genética (Kalyna et al., 2012). De hecho, se demostró que un 11-18% de los transcritos que sufren SA son procesados por la NMD. Sin embargo, este estudio también demostró que, aunque algunos transcritos que habían retenido intrones poseían características de NMD, estos no eran degradados. Se ha sugerido que el SA acoplado a NMD regula la abundancia de transcritos de muchos genes importantes para el desarrollo y adaptación de las plantas, como factores de transcripción, factores de procesamiento de RNA y genes de respuesta a estrés (Syed et al., 2012).

1.1.1.2. Regulación por siPEPs/miPs

Como se ha mencionado anteriormente, algunos transcritos que son resultado de un proceso de SA pueden generar CTPs y ser degradados por la vía de NMD, aunque se ha observado que algunos transcritos que contienen CTPs son estables y al parecer escapan a dicha degradación (Kalyna et al., 2012). Los

transcritos con CTPs poseen el potencial de ser traducidos y generar proteínas truncadas.

Tanto en plantas como animales se han descrito péptidos interferentes pequeños (siPEPs) o micro-proteínas (miPs), llamados así por su analogía con los siRNAs y los miRNAs (Seo et al., 2013; Syed et al., 2012). Estos péptidos pueden presentar una función alterna a la de la proteína completa y pueden actuar como reguladores positivos y negativos y afectar además las asas de retro-regulación transcripcional (Staudt & Wenkel, 2011).

Se ha propuesto que los siPEPs se originaron a partir de un proceso de duplicación parcial de los genes de factores de transcripción y que el punto de duplicación es anterior a la diversificación de las angiospermas (Seo et al., 2013). En el caso del SA de los factores de transcripción, se ha observado que algunas de estas isoformas poseen estructuras similares a los siPEPs genómicos, ya que al igual que estos últimos, poseen dominios de dimerización, pero carecen de un dominio de unión al DNA o de dominios de regulación transcripcional. Las proteínas truncadas resultado de un proceso de SA podrían competir con los factores de transcripción funcionales para inhibir sus actividades (Seo et al., 2013), tal como lo hace un dominante negativo. Cabe resaltar que la descripción de estos mecanismos sugieren la existencia de un mecanismo de auto-regulación, en el que un mismo gen produce dos transcritos: un factor de transcripción funcional y un siPEP que regula de manera negativa a la forma funcional o a otros factores (Seo et al., 2011).

1.1.1.3. Regulación por lncRNAs

Los lncRNAs están involucrados principalmente en actividades de regulación epigenética y remodelación de la cromatina. También pueden funcionar como andamios que interfieren con o modulan la actividad de diferentes complejos enzimáticos relacionados al RNA (Rinn y Chang, 2012). Recientemente se ha demostrado una relación funcional entre los mecanismos de regulación del SA y la actividad de los lncRNAs en *Arabidopsis*. Bardou et al. (2014) identificaron a AtNSRa y b, los cuales forman parte de una familia de reguladores del SA conocidos como *nuclear speckle RNA-binding proteins* (NSR), previamente identificados en *Medicago truncatula* (Campalans et al., 2004). Los miembros de las proteínas NSR se localizan dentro de compartimentos nucleares conocidos como *speckles*. En un estudio anterior en *M. truncatula* (Amor et al., 2009) se describió un lncRNA denominado *ENOD40*, el cual les permitió aislar la primera proteína NSR (MtNSR), debido a su habilidad para unirse a *ENOD40*. La sobreexpresión de *ENOD40* causaba la relocalización de las proteínas MtNSR de los *speckles* al citoplasma. Bardou et al. (2014) no solo confirman la existencia de ortólogos de NSR en *Arabidopsis*, sino que también demuestran que la relocalización de ambas proteínas AtNSR de los *speckles* al citoplasma por su interacción con *ENOD40*, afecta los patrones de *splicing* de los transcritos alternativos dependientes de NSR, debido a la ausencia de NSR en el núcleo. De igual forma, identificaron un lncRNA en *Arabidopsis* capaz de unirse a las proteínas NSR, al cual nombraron *Alternative Splicing Competitor RNA* (ASCO-RNA). La expresión de ASCO-RNA está inducida en el doble mutante *nsra/nsrb*, lo

cual sugiere que las NSRs no solo regulan transcritos alternativos, sino que también regulan, directa o indirectamente, la expresión de algunos lncRNAs. ASCO-RNA no afecta la localización de NSR, sino que altera su actividad a través de su unión directa con NSRs e impide su unión con sus mRNA blancos (Bardou et al., 2014). Igualmente, los autores de este estudio demuestran que la sobreexpresión de ASCO-RNA en plantas fenocopia el fenotipo observado en el doble mutante *nsra/nsrb*.

1.1.1.4. Regulación epigenética del SA

Una gran cantidad de evidencia ha demostrado que el proceso de *splicing* ocurre, generalmente, de manera co-transcripcional (Luco et al., 2011; Lee y Rio, 2015; Naftelberg et al., 2015), aunque estudios recientes han demostrado que la remoción de intrones, especialmente de aquellos que presentan SA (Reddy et al., 2013), sucede de manera post-transcripcional (Braunschweig et al., 2013; Zhou et al., 2014). Sin embargo, aún en estos casos los transcritos parcialmente procesados continúan unidos a la cromatina hasta que el proceso de *splicing* se completa. El hecho de que el proceso de *splicing* se lleve a cabo de manera co-transcripcional es la base para inferir que tanto la tasa de elongación de la transcripción, las modificaciones de la cromatina y los procesos de *splicing*, están ligados.

El dominio C-terminal (DCT) de la RNAP II sirve como una plataforma de anclaje para el reclutamiento de proteínas involucradas en procesos de *capping*, *splicing*, poliadenilación y exportación (de Almeida y Carmo-Fonseca, 2008; Schwartz y Ast, 2010). La tasa de elongación de la transcripción de la RNAPII

puede afectar la selección de los SS y por lo tanto los productos del SA. Una tasa de transcripción menor tiende a favorecer la inclusión de intrones alternativos antes de que el complejo de *splicing* llegue a procesar un exón. Esto es considerado con base en el hecho de que los intrones que pueden ser incluidos dentro del transcrito maduro y poseen la capacidad de actuar como exones codificantes, poseen señales de *splicing* menos eficientes y, por lo tanto, requieren de un mayor tiempo para ser reconocidas por la maquinaria de *splicing*. Es decir, una tasa elevada de elongación de la RNAP II tendrá como resultado que estos intrones que podrían ser adquiridos no sean incluidos en el transcrito maduro (Luco et al., 2011; Luco y Misteli, 2011).

La tasa de elongación transcripcional está regulada mediante un ciclo dinámico de acetilación y desacetilación de histonas, el cual es muy importante para la dinámica de los nucleosomas durante el proceso de transcripción y es coordinado por el dominio C-terminal de la RNAP II (Zhou et al., 2014). Durante la transcripción de pre-mRNA por la RNAP II, es necesario que los nucleosomas que se encuentran frente al complejo de elongación estén acetilados para desestabilizar las interacciones entre el DNA y las histonas (Zhou et al., 2014). El paso de la RNAP II causa un desplazamiento de las histonas, las cuales son colocadas nuevamente en el DNA detrás de la RNAP II. Estos nucleosomas se encuentran hiperacetilados, pero solo momentáneamente. Complejos de desacetilasas de histonas (HDACs) remueven las marcas de acetilación de las histonas para mantener la configuración de la cromatina (Zhou et al., 2014). Esta dinámica de acetilación/desacetilación también puede influenciar la selección de

SS específicos en muchos transcritos. Por ejemplo, se encontró que la inhibición o silenciamiento de la HDAC1 causa un aumento en la acetilación de la histona H4 que rodeaba específicamente un “exón alternativo”, lo cual a su vez aumentó la tasa de elongación de la RNAP II y, por lo tanto, disminuyó la inclusión de dicho intrón (Hnilicová et al., 2011).

La tasa de la elongación de la transcripción también puede depender del estado de la cromatina. Así, la ocupación de nucleosomas varía a lo largo de un gen: en exones con una alta cantidad de GC se observa una mayor ocupación de nucleosomas, comparado con exones con poca cantidad de GC (Schwartz y Ast, 2010). La transcripción en regiones con una alta ocupación de nucleosomas y cromatina compacta tiende a ser más lenta (Howe, 2002), además la ocupación de nucleosomas es más baja en “exones alternativos” comparado con exones constitutivos (Schwartz et al., 2009).

Recientemente un estudio en animales, demostró una relación directa entre las modificaciones de histonas y el SA (Luco et al., 2010). El *splicing* de dos exones mutuamente excluyentes dependientes de PTB (*Pyrimidine tract-binding protein*; una proteína hnRNP reguladora del SA) en el gen del receptor del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGFR2) dependía de las modificaciones de histonas H3K36me3 y H3K4me1 para reducir la inclusión de uno de los exones, mientras que las modificaciones H3K27me3, H3K4me3 y H3K9me1 actuaban de forma opuesta. Los cambios en el estado de la cromatina eran leídos por la proteína MRG15 la cual a su vez reclutaba a PTB y afectaba los productos del *splicing* (Luco et al., 2010).

En plantas, la relación directa entre el SA y las modificaciones de la cromatina o la tasa de elongación de la RNAP II no ha sido demostrada (Syed et al., 2012), pero es factible pensar que la variación del epigenoma de las plantas ante diferentes condiciones de crecimiento y de estrés ambiental pueda afectar la diversidad de las variantes transcripcionales resultantes de un proceso de SA, y este a su vez pueda modificar el epigenoma de las plantas. Recientemente se demostró que la metilación de la H3K36 se encuentra enriquecida en genes cuyo *splicing* se encuentra relacionado a la temperatura y que la disminución de esta marca causa alteraciones en el patrón de SA-inducido por temperatura (Pajoro et al., 2017).

1.1.2. Impacto del SA en la regulación del ciclo circadiano de las plantas

La rotación del planeta en un periodo aproximado de 24 horas provoca cambios ambientales diarios, los cuales han llevado a los diferentes organismos del planeta a desarrollar mecanismos para adaptarse a las oscilaciones de estos ritmos diarios. Actualmente se sabe que la mayoría de estas oscilaciones persisten inclusive en un ambiente constante y se extienden prácticamente a todos los aspectos de la fisiología de los organismos (Brown et al., 2012). Dichas oscilaciones han llevado al desarrollo de un sistema endógeno que ayuda a predecir los cambios ambientales y permite a los organismos modificar sus actividades y procesos metabólicos y fisiológicos de acuerdo con estos cambios. Este sistema es conocido como el reloj circadiano (Romanowski y Yanovsky, 2015). El mecanismo del reloj circadiano consiste en asas de retroalimentación transcripcional-traduccionales (*transcriptional-translation feedback loop*: TTFL),

compuesto de elementos represores y activadores. La estructura general de este sistema está conservada en todos los grupos de organismos, aunque los elementos particulares de cada uno de estos sistemas varía de acuerdo al organismo (Romanowski y Yanovsky, 2015).

Las plantas son incapaces de evadir condiciones ambientales adversas y en respuesta a esto han desarrollado una gran variedad de mecanismos que les permiten adaptarse a las condiciones cambiantes de su ambiente durante su desarrollo (Adams y Carré, 2011). Esto se observa fácilmente al tomar en cuenta la gran variabilidad fenotípica que presentan en los diferentes ambientes en donde se desarrollan.

Los procesos del reloj circadiano están sujetos a varios niveles de regulación: transcripcional, epigenético, post-transcripcional y post-traducciona. Dentro del nivel post-transcripcional los procesos de SA y NMD juegan un papel muy importante en la regulación de los ciclos circadianos en las plantas (Romanowski y Yanovsky, 2015).

La primera evidencia de interacción entre los ritmos circadiano y el SA en plantas se describió mediante una mutación en PRMT5, una proteína metiltransferasa de arginina regulada por el reloj. Se demostró que la mutación alteraba significativamente la duración del periodo al modular el SA de PRR9 (Pseudo Response Regulator 9), un componente importante del ciclo circadiano (Sanchez et al., 2010). El SA parece ser un mecanismo que permite acoplar cambios en la temperatura ambiental con la información del periodo circadiano. Este tipo de SA termosensible se ha observado sobre Circadian Clock Associated

1 (*CCA1*), uno de los principales factores del ciclo circadiano en plantas. El SA genera una versión alternativa de *CCA1*, denominada *CCA1 β* , la cual se acumula durante condiciones de mucha luz, pero disminuye en condiciones de frío. Esta isoforma de *CCA1* presenta un dominio de dimerización, pero carece del dominio MYB de unión al DNA (Wang y Ma, 2013).

El papel de factores de *splicing* como SKI-INTERACTING PROTEIN (SKIP) y SPLICEOSOMAL TIME-KEEPER LOCUS1 (STIPL1) en la regulación del ciclo circadiano en *Arabidopsis* se ha demostrado recientemente (Jones et al., 2012; Wang et al., 2012). Mutaciones en *AtSKIP* y *STIPL1* alargan la duración del periodo del reloj circadiano. *AtSKIP* es un componente del spliceosoma que se asocia con el factor de *splicing* SR45. Se sabe que *AtSKIP* también tiene un papel fundamental en el *splicing* de varios genes circadianos, incluyendo *PRR7* y *PRR9*, a través de la unión directa al pre-mRNA (Wang et al., 2012). Los defectos en el SA de *PRR7* y *PRR9* contribuyen parcialmente al alargamiento del periodo circadiano en el mutante *skip-1*. *STIPL1* es un homólogo de las proteínas del spliceosoma TUFTELIN- INTERACTING PROTEIN11 (TFIP11) en humanos y Ntr1p en levadura, las cuales están involucradas en el desmontaje del complejo. La mutación de *STIPL1* ocasiona un *splicing* menos eficiente de la mayoría de los intrones analizados (Jones et al., 2012). Es posible que la acumulación alterada de los transcritos asociados al reloj, incluyendo *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *GI* y *TOC1*, contribuya a la demora del periodo del mutante *stip1*. Estos hallazgos demuestran el papel que tienen estos factores de *splicing* en la regulación del SA y de la duración del periodo en el ciclo circadiano (Wang y Ma, 2013).

Uno de los ejemplos mejor caracterizados de regulación genética por SA/NMD en plantas son dos componentes de un oscilador acoplado al ciclo circadiano, GRP8 y GRP7. Estas proteínas de unión a RNA ricas en glicina autorregulan sus propios SA, para generar mensajeros que son procesados por NMD. Esto produce un asa de retroalimentación negativa entre ambos componentes (Schöning et al., 2008). Igualmente un estudio realizado por Kwon et al. (2014) demostró que varios componentes del ciclo circadiano presentan diferentes eventos de SA. Se analizaron las isoformas de varios componentes incluyendo a *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* y *ZEITLUPE (ZTL)* y se observó que presentaban una amplia variedad de eventos de *splicing*, como retención de intrones, omisión de exones y selección de un SS 5' alternativo. Sus patrones de SA eran influenciados diferencialmente por cambios en el fotoperiodo, temperatura y estrés salino. Notablemente, las isoformas de *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* y *ELF3* eran degradadas a través de NMD, mientras que aquellas isoformas de otros componentes del reloj eran insensibles a esta vía (Kwon et al., 2014).

1.1.3. Impacto del SA en el desarrollo de Arabidopsis

En general, en los organismos eucariontes el SA se ha relacionado con una mayor diversidad del transcriptoma, así como de la funcionalidad del proteoma, y en animales, se han relacionado varias enfermedades con afectaciones en el mecanismo de procesamiento de pre-mRNAs (Bardou et al., 2014). Por otra parte en plantas, los eventos de SA están involucrados en la regulación de una gran variedad de procesos de desarrollo que incluyen: la regulación de la expresión

genética mediante transcritos no codificantes, fotosíntesis, respuestas de defensa, fotoperiodo, floración, el ciclo circadiano y respuestas al ambiente (Bardou et al., 2014; Chamala et al., 2015; James et al., 2012; Kalyna et al., 2012; Kornblihtt, 2014; Seo et al., 2013). De igual forma los diferentes eventos de SA dependen y están regulados por la etapa del desarrollo, tipo celular, señales de estrés ambiental y el ciclo circadiano (Filichkin et al., 2015a; Filichkin et al., 2015b).

Dentro de los eventos más frecuentes en el SA de plantas se encuentra la retención de intrones (RI), que comprende el 40% de los eventos de SA observados (Barbazuk et al., 2008). Sin embargo mediante RNA-seq se sabe que la RI solo ocurre en los transcritos ensamblados de 23% de los genes, lo cual ponen en duda el impacto real de la RI en el SA de las plantas (Marquez et al., 2012).

1.2. Transición a la floración

El proceso de la transición a la floración, es decir, la transición de un estado vegetativo a uno reproductivo, es una de las etapas más importantes dentro del ciclo de vida de las plantas, con consecuencias significativas para su éxito reproductivo (Amasino y Michaels, 2010; Henderson y Dean, 2004). Inicialmente, las plantas pasan por un periodo de desarrollo vegetativo, caracterizado por la producción de hojas a partir del meristemo apical aéreo (*shoot apical meristem*: SAM). Durante el proceso de transición a la floración, el escapo o inflorescencia emerge y el SAM se transforma en el meristemo de inflorescencia (MI), que a su vez dará lugar a los meristemas de flor (MF) (Alvarez-Buylla et al., 2010).

El momento en el que las plantas llevan a cabo la floración estacionalmente hablando, es específico y robusto para cada especie y variedad de planta, debido a que las plantas han evolucionado para florecer en un tiempo del año que asegure las mejores condiciones ambientales en una región determinada y de esta forma maximizar su éxito reproductivo. Sin embargo, existe una gran plasticidad en respuesta tanto a señales endógenas de la planta, así como a señales ambientales (Henderson y Dean, 2004).

1.2.1. Genética molecular de la transición a la floración

El proceso de transición a la floración está regulado por una gran red de regulación genética que censa una variedad de señales endógenas del desarrollo de la planta, así como también señales ambientales, que le aseguran que el proceso de floración ocurra bajo condiciones ambientales que le permitan maximizar su éxito reproductivo. En *Arabidopsis* se han implicado alrededor de 180 genes en el control del tiempo de floración (Fornara et al., 2010). Sorprendentemente, muchos de los genes que forman parte de esta red, no son específicos de este proceso y pueden participar en otros procesos de desarrollo. El descubrimiento de estos genes se ha llevado a cabo mediante el estudio de mutantes de pérdida de función y plantas de sobreexpresión crecidas bajo diferentes regímenes ambientales, de tal forma que se establecieron una serie de “rutas” de señalización a las que se les han llamado vías de transición a la floración, que a continuación se mencionan (Fornara et al., 2010).

1.2.2. Vías de transición a la floración

Hasta la fecha se han descrito 7 vías de transición a la floración. Aunque comúnmente y para fines experimentales se considera que cada una de estas vías de transición a la floración actúan de manera independiente, este enfoque no refleja el verdadero papel biológico que juegan estos mecanismos en el ciclo de vida de las plantas (Pérez-Ruiz et al., 2015). Las 7 “vías” se integran en una gran red de regulación genética, en la cual pueden existir módulos que ayuden a integrar las señales ambientales y endógenas de la planta para que de esta forma pueda florecer en el momento más propicio o bien como un escape al estrés ambiental.

Dentro de las vías descritas de transición a la floración se encuentran: la vía autónoma, la vernalización, vía de las giberelinas, el fotoperiodo, vía sensible a la temperatura, la vía del desarrollo y la vía de la trehalosa (Fornara et al., 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Wahl et al., 2013). Las vías de vernalización, fotoperiodo y la vía sensible a la temperatura responden a señales ambientales para controlar la transición a la floración, mientras que la vía autónoma, de las giberelinas, del desarrollo y de la trehalosa actúan mayormente de manera independiente a los estímulos ambientales.

La vía del fotoperiodo requiere de la activación de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y de *TWIN SISTER OF FT* (*TSF*), mediante una cascada de señalización que involucra a *GIGANTEA* (*GI*) y a *CONSTANS* (*CO*). Durante condiciones de día largo (LD; 16h luz / 8h oscuridad), la luz promueve la interacción de *GI* con un grupo de ubiquitín-ligasas que promueven la degradación de los represores

transcripcionales de CO. En la oscuridad CO es degradado por una ubiquitin-ligasa, COP1, y en la mañana por una vía activada por el fitocromo B. La regulación tanto transcripcional como post-transcripcional aseguran que CO solo active a *FT* y *TSF* durante LD (Fornara et al., 2009).

Arabidopsis presenta un fenotipo de floración temprana en temperaturas óptimas (~23°C), respecto a temperaturas más bajas (~16°C). La vía sensible a la temperatura está regulada por una retroalimentación negativa entre *FT* y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* un factor de transcripción MADS-box. Las mutantes *svp* son insensibles a los cambios de temperatura y florecen tempranamente en ambas temperaturas. SVP reprime la transcripción de *FT* y por lo tanto la floración a bajas temperaturas, pero los niveles de mRNA de *FT* aumentan a temperatura óptima para Arabidopsis (Jeong et al., 2007).

Las giberelinas (GA), son un grupo de fitohormonas que promueven la floración en muchas plantas incluida Arabidopsis. Mutaciones en la biosíntesis de GA o que aumentan su degradación, producen un fenotipo de floración tardía, especialmente en condiciones de día corto (SD; 8h luz / 16 h oscuridad) (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009).

Las plantas transitan al estado reproductivo una vez que han alcanzado cierta madurez en su desarrollo, como muchos organismos. Los factores de transcripción tipo SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE (SPL) tienen un papel importante durante las transiciones del SAM en el desarrollo de las plantas. De forma interesante, los *SPL* son regulados negativamente por el microRNA *miR-156*, cuyos niveles son elevados mientras la planta es joven y disminuyen

progresivamente al envejecer, permitiendo que los SPL se expresen en ciertos momentos. Al madurar la planta, los niveles de *SPL* aumentan, lo cual promueve la activación de *LEAFY (LFY)*, *SOC1* y *FRUITFUL (FUL)*, lo cual a su vez promueve la transición a la floración (Wang et al., 2009).

Por su parte, el estado fisiológico y de reservas de la planta es otro factor relevante para que la planta transite al estado reproductivo. Se ha demostrado que los carbohidratos juegan un papel muy importante en la regulación de la transición a la floración, ya que la pérdida de *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1)* causa que *Arabidopsis* florezca de manera tardía, inclusive bajo otras condiciones ambientales inductivas. Esto sugiere que *TPS1* es necesaria para la iniciación oportuna de la transición a la floración (Wahl et al., 2013).

La vía autónoma, como su nombre lo indica, funciona de manera independiente a las señales ambientales y fisiológicas de la planta. Las proteínas que participan en este tipo de regulación actúan principalmente como represores de la expresión de un represor de la floración: *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Este factor de transcripción tipo MADS-box reprime la expresión de *FT* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* durante el estado embrionario y vegetativo de la planta, evitando así que las estas florezcan antes de tiempo (Amasino y Michaels, 2010; Baulcombe y Dean, 2014; Chamala et al., 2015; Song et al., 2013; Srikanth y Schmid, 2011). Sin embargo, una vez llegado el momento de florecer, se requiere de la inactivación de *FLC*, para lo cual las proteínas de la vía autónoma actúan, de manera general, como remodeladores de la cromatina y en el procesamiento del mRNA de *FLC* (Cheng et al., 2017).

Dentro de los elementos involucrados en el procesamiento del mRNA de *FLC* se encuentran: FLOWERING LOCUS CA (FCA) y FLOWERING LOCUS PA (FPA), dos proteínas con un dominio de unión a RNA, las cuales regulan la poliadenilación alternativa de transcritos en antisentido y la formación de extremos 3' en *FLC*. FCA está genética y físicamente relacionado con FLOWERING LOCUS Y (FY), una proteína involucrada en el procesamiento de RNA. Además, FCA y FPA interactúan con FLOWERING LOCUS D (FLD), el cual codifica para una desmetilasa de histonas, ligando el procesamiento de RNA con la remodelación de cromatina (Liu et al., 2007). Los datos indican que la acción de FCA y FPA sobre *FLC* es al menos parcialmente dependiente de FLD (Liu et al., 2007; Bäurle y Dean, 2008).

PCF11P-SIMILAR PROTEIN 4 (PCFS4) fue identificado como un componente de la vía autónoma que regula la poliadenilación alternativa de *FCA* para promover la floración (Xing et al., 2008). A su vez, PCFS4 participa en un complejo junto con FCA, FPA y FY que regula la expresión de *FLC* (Cheng et al., 2017). FLOWERING LOCUS KH DOMAIN (FLK) es una proteína que posee 3 dominios KH (*K-homology*) de unión a RNA y que solo se ha encontrado en plantas. Otras proteínas con dominio KH en *Arabidopsis* forman parte de un complejo de proteínas que regulan el procesamiento del pre-mRNA de *AGAMOUS* (AG) (Mockler et al., 2004). Aunque no se conoce el mecanismo exacto de regulación de FLK sobre *FLC*, se piensa que FLK puede reprimir parcialmente a *FLC* a un nivel transcripcional o mediante remodelación de la cromatina mediada por RNA (Cheng et al., 2017). PEPPER (PEP) es un parálogo de FLK que

funciona como un activador de *FLC* en *Arabidopsis* (Ripoll et al., 2009). Es posible que PEP regule los niveles de RNA de *FLC* tanto a un nivel transcripcional como post-transcripcional. Se ha encontrado que las funciones de FLK y PEP en la vía autónoma son independientes de FCA (Liu et al., 2007; Bäurle y Dean, 2008).

Mediante modificaciones de la cromatina FLD, FLOWERING LOCUS VE (FVE), HISTONE DEACETYLASE 5 (HDA5), HISTONE DEACETYLASE 6 (HDA6), LUMINIDEPENDENS (LD), PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5 (PRMT5), PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 10 (PRMT10) y RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6) también pueden regular la expresión de *FLC*. FVE interactúa con FLD y este último a su vez interactúa con HDA5 y 6. Es posible que este complejo reprima la expresión de *FLC* mediante modificaciones de las histonas, las cuales incluyen desmetilación y desacetilación (Cheng et al., 2017). LD es una proteína que posee un dominio *homeodomain-like* e inicialmente fue considerada como un regulador transcripcional, pero se descubrió que reprimía a *FLC* mediante su interacción con SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4 (SUF4), un activador transcripcional de *FLC* (Kim et al., 2006). Además, se ha demostrado que LD reprime a *FLC* mediante desacetilación de la H3 y desmetilación de H3K4. Igualmente, REF6 reprime la expresión de *FLC* mediante su actividad como desmetilasa de histonas y actúa principalmente sobre transcritos en antisentido de *FLC* (Hornyik et al., 2010). Dos metiltransferasas de argininas PRMT10 y PRMT5 también regulan negativamente a *FLC*, aunque independientemente una de la otra

y esto es posiblemente mediante la activación indirecta de otros represores de *FLC* (Niu et al., 2007).

1.2.2.1. Vernalización

Para fines de este trabajo, nos interesa ahondar sobre el papel de la vernalización en la transición a la floración y su regulación. La vernalización puede ser definida como la promoción de la competencia para florecer por la exposición a largos periodos de bajas temperaturas (Alexandre y Hennig, 2008). En *Arabidopsis* se han descrito una serie de mecanismos de regulación tanto genéticos como epigenéticos que le permiten a la planta “recordar” que pasó por un largo periodo de frío, lo cual le permite sincronizar su transición a la fase reproductiva (floración) con las condiciones ambientales más favorables (Amasino y Michaels, 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Song et al., 2013; Baulcombe y Dean, 2014).

Existen algunas plantas que requieren necesariamente de un periodo de vernalización para poder florecer, debido a los niveles elevados de *FLC*. En algunos ecotipos de *Arabidopsis*, se expresa la proteína FRIGIDA (FRI) que activa a *FLC* al reclutar a varios modificadores de la cromatina que establecen marcas de activación transcripcional en las histonas, como la H3K4me3 y H3K36me2 (Choi et al., 2011). Durante la vernalización, *FLC* se reprime mediante el reclutamiento de proteínas PcG del complejo PRC2 por dos proteínas que contienen dominios PHD (Plant Homeodomain) *VRN5* y *VIN3* (Song et al., 2013). El complejo PRC2 que reprime la expresión de *FLC* durante el proceso de vernalización está compuesto por diferentes subunidades: *VERNALIZATION2* (*VRN2*, un homólogo de Su(z)12, una desacetilasa de histonas), *SWINGER* o *CURLY LEAF* (*SWN*, *CLF*,

metiltransferasas de histonas homólogas a E(z)), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (un homólogo de *ESC*), and MSI1 (un homólogo de *p55*). *VIN3* se heterodimeriza con *VRN5* y se asocian con *PRC2* en un sitio dentro del primer intrón de *FLC*, lo cual causa la acumulación de la marca de histonas H3K27me3, una señal de inactivación transcripcional típica de PcG. Una vez que la condición de temperatura baja termina, el complejo de *VRN5/VIN3* y *PRC2* se propaga a lo largo de *FLC*, estableciendo grandes cantidades de H3K27me3 en todo el locus de *FLC*. Estos niveles de H3K27me3 son necesarios para el silenciamiento epigenético de *FLC*. Finalmente, LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1) se une a la marca de H3K27me3 y mantiene silenciado a *FLC* durante subsecuentes divisiones celulares cuando la planta regresa a una temperatura óptima de 22 °C durante la primavera (Figura 3) (Baulcombe y Dean, 2014).

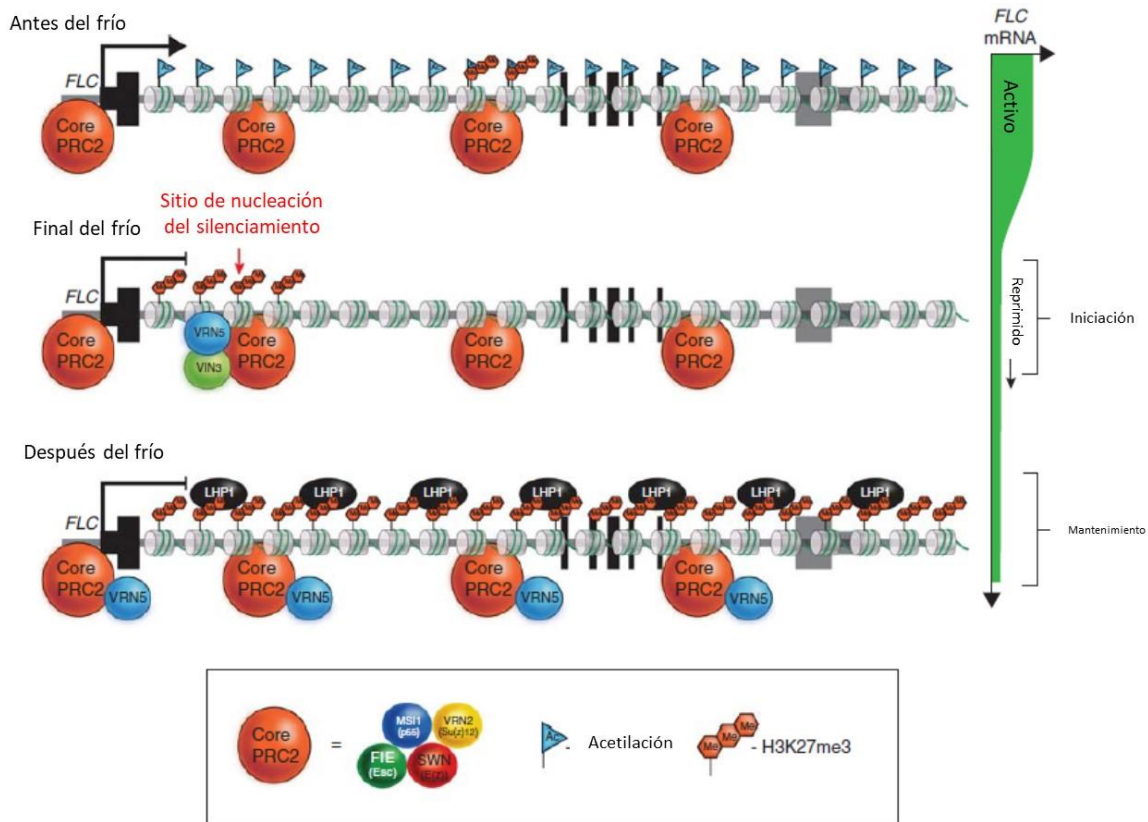


Figura 3. Esquema del proceso de silenciamiento epigenético de *FLC* durante el proceso de vernalización. La composición del complejo Polycomb y su localización cambia de forma dinámica sobre el locus de *FLC* durante las diferentes fases de la vernalización (Modificado de Baulcombe y Dean, 2014).

Aunque las proteínas PHD son importantes para el silenciamiento de *FLC*, se ha observado que plantas que no poseen PHD son capaces de silenciar a *FLC* (Swiezewski et al., 2009). Por lo tanto, deben existir mecanismos independientes que reprimen su expresión y mantienen la memoria epigenética durante la vernalización. Evidencia reciente, señala la presencia de una serie de transcritos en antisentido generados en el locus de *FLC*, denominados COOLAIR. Estos transcritos abarcan todo el largo del transcrito en antisentido y sufren de poliadenilación y *splicing* alternativos. En algunos casos existe un sitio de poliadenilación proximal en el transcrito antisentido, el cual está relacionado con

una reducción en la transcripción de *FLC* en condiciones tanto cálidas como frías y este mecanismo es independiente de las proteínas PHD (Csorba et al., 2014; Marquardt et al., 2014). Existe también la inducción por frío de un transcrito no codificante en sentido, denominado COLDAIR (COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA), a partir de un promotor críptico dentro del primer intrón de *FLC*, el cual se asocia con PRC2 para establecer el silenciamiento de *FLC* (Heo y Sung, 2010; Ietswaart et al., 2012). Recientemente un segundo transcrito no codificante en sentido fue descrito: COLDWRAP se genera a partir del promotor de *FLC* y junto con COLDAIR mantiene la represión de *FLC* al generar asas represoras de cromatina (Kim y Sung, 2017) (Figura 4).

Para aquellos ecotipos que tienen activo a FRI su regulación post-traducciona también puede impactar los niveles de expresión de *FLC*. La degradación mediada por proteosoma de FRI regula la floración durante la vernalización (Hu et al., 2014) y esta va acompañada por un incremento en los niveles de expresión de COLDAIR, lo cual reduce los niveles de H3K4me3 en la cromatina de *FLC*, promoviendo así la floración.

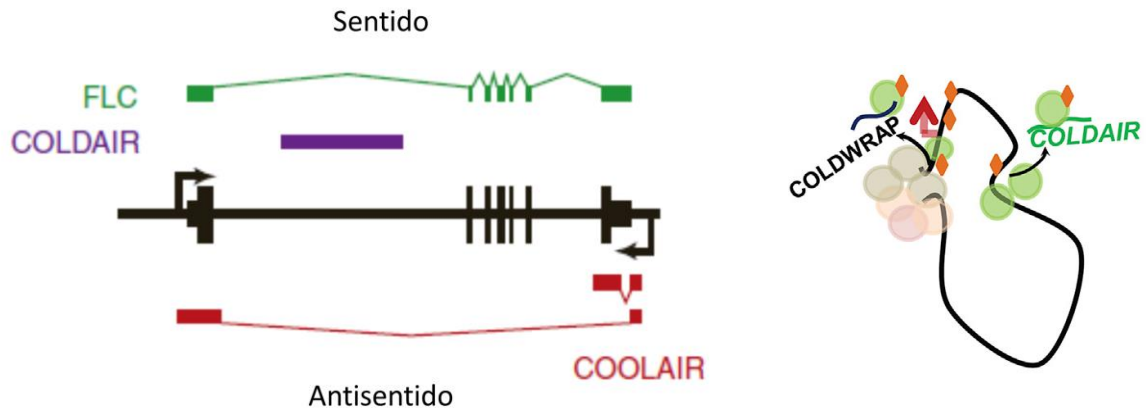


Figura 4. Esquema de los diferentes transcritos producidos a partir del locus de *FLC*. COOLAIR es un transcrito no codificante en antisentido con sitios de poliadenilación alternativa y es diferencialmente expresado dependiendo de las condiciones ambientales. COLDAIR es un lncRNA en sentido. COLDWRAP ayuda a PRC2 a expandirse hacia la región promotora de *FLC*, lo cual ocasiona un aumento en la marca de H3K27me3. Todos estos transcritos están involucrados en la represión de *FLC* durante la vernalización (Modificado de Ietswaart et al., 2012; Kim y Sung 2017).

Las proteínas del grupo Trithorax (TrxG) fueron descritas por primera vez en *Drosophila* y funcionan de manera antagónica a PcG, aunque en *Arabidopsis* el mecanismo exacto de este antagonismo aún no se ha descrito completamente (He et al., 2013). Un estudio reciente señala que el promotor 35S disminuye los niveles de H3K27me3 y aumenta los de H3K4me3, una marca de activación transcripcional típica de TrxG, en el locus donde se inserta, lo cual parece sugerir que secuencias *enhancer* en *cis* pueden tener un papel al reclutar proteínas TrxG para restringir la adición de la H3K27me3 de PcG (Chen et al., 2013). La primera proteína TrxG descrita en *Arabidopsis* fue HOMOLOGUE OF TRITHORAX (ATX1), la cual es una proteína con un dominio SET que cataliza la trimetilación de la H3K4 (Alvarez-Venegas et al., 2003) y cuyo papel en la activación transcripcional de *FLC* ha sido ampliamente estudiado (Pien et al., 2008; Baulcombe y Dean, 2014; Yang et al., 2014). ATX1 contribuye al mantenimiento de la expresión de *FLC* mediante la trimetilación de la H3K4 en la cromatina de

FLC y los alelos mutantes *atx1* presentan un fenotipo de floración temprana, debido a una reducción en la expresión de *FLC* (Pien et al., 2008).

2. Antecedentes

Los genes MADS-box son una familia de factores transcripcionales altamente conservados en eucariontes. En plantas, estas proteínas están involucrados en prácticamente todos los aspectos de su desarrollo y crecimiento (Smaczniak et al., 2012). En floración participan un número importante de proteínas con dominio MADS, pero sólo tres de ellas se han implicado directamente con el proceso de vernalización: AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19) y 24 (AGL24) participan como activadores y son inducidos por la vernalización, mientras que *FLC* actúa como represor y es necesario silenciarlo, como se mencionó anteriormente (Alvarez-Buylla et al., 2011). El mecanismo de acción de AGL19 aún se desconoce, pero existe evidencia de que la sobreexpresión de *AGL19* regula positivamente la expresión de *FT* cuando las plantas son crecidas en día corto y su expresión está regulada por desacetilasas de histonas para prevenir una floración precoz en día corto (Kang et al., 2015).

AGL19 es un MADS-box tipo II o MIKC^C, que como todos los de este grupo incluye los dominios: MADS de unión al DNA, el dominio I y el dominio K los cuales son esenciales para la dimerización y formación de complejos y el carboxilo-terminal que parece tener un papel en la formación de complejos y regulación transcripcional (Smaczniak et al., 2012). *AGL19* se expresa abundantemente en la raíz (Alvarez-Buylla et al., 2000), pero su función ha sido

descrita como un activador de la floración independientemente de la represión de *FLC* en condiciones de vernalización y día corto (Schönrock et al., 2006).

En condiciones de vernalización *agl19-1*, un mutante por inserción de T-DNA, florece más tardíamente que plantas WT y este fenotipo de floración tardía es más evidente en SD, por lo cual *AGL19* participa en la transición a la floración en condiciones de vernalización y SD (Figura 5A). De forma similar a *FLC*, *AGL19* es reprimido por un grupo de proteínas PcG. Sin embargo, a diferencia del primero, *AGL19* es reprimido durante el desarrollo vegetativo y es inducido por la vernalización (Figura 5B) (Schönrock et al., 2006). El complejo PRC2 que reprime a *AGL19* está compuesto por CLF, una metiltransferasa de histonas que trimetila la H3K27, MSI1 un homólogo de p55 y EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2) un homólogo de Su(Z)12, una desacetilasa de histonas. Este complejo PRC2 reprime a *AGL19* de forma similar a *FLC*, de hecho, la zona de nucleación parece estar localizada también en el primer intrón. Cuando se realiza un ChIP con el anticuerpo para la H3K27me3 en plantas WT de 10 días post-siembra (dps) crecidas en SD con o sin un tratamiento de 6 semanas de vernalización se observa que la exposición de las plantas a un periodo de vernalización, la H3K27me3 disminuye en todos los fragmentos analizados de *AGL19* (Figura 5C, D). Estudios más recientes demostraron adicionalmente, que *AGL19* también se expresa en condiciones de fotoperiodo de SD por lo que su regulación por proteínas HDACs evita una floración precoz (Kang et al., 2015; Kim et al., 2013).

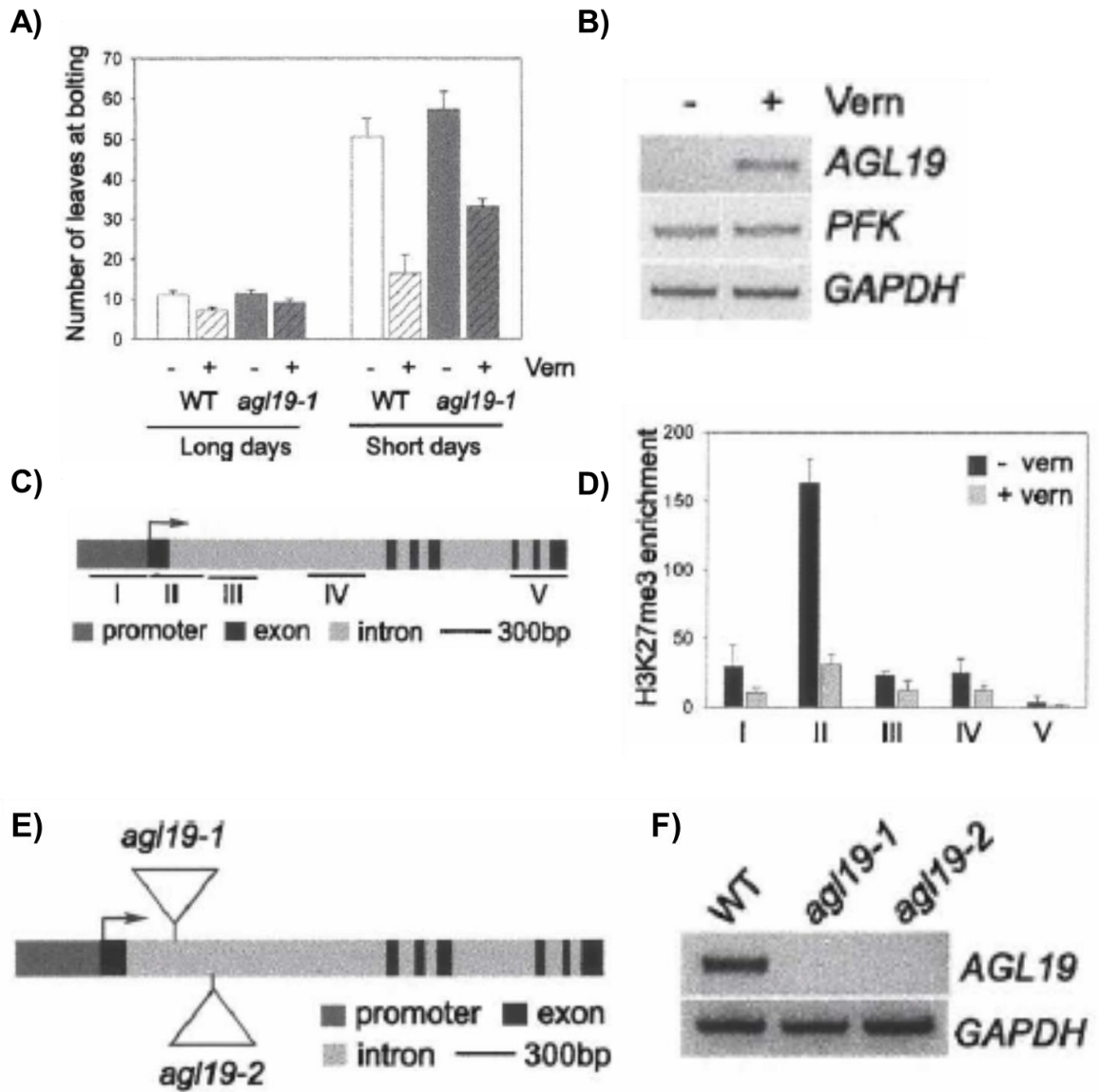


Figura 5. *AGL19* participa en la transición a la floración en condiciones de vernalización y día corto y está regulado por PcG. **(A)** En condiciones de vernalización y SD, *AGL19* actúa como un activador de la floración ya que el alelo *agl19-1* produce más hojas que el WT al momento en que crece el escape y esto indica un desarrollo vegetativo por más tiempo. **(B)** La vernalización induce la expresión de *AGL19*. RT-PCRs realizadas con plantas de 10 dps crecidas en SD con o sin un tratamiento de vernalización. *PFK* no cambia su expresión en plantas *msi1-cs* y *clf*, por lo que se se utilizó como un control interno para la RT-PCR. La expresión de *GADPH* se usó como control de carga. **(C)** Esquema del gen de *AGL19* donde se muestran los fragmentos amplificados después de hacer la inmuno-precipitación de cromatina (ChIP) utilizando el anticuerpo que detecta la marca de H3K27me3 **(D)** El fragmento II amplificado disminuye drásticamente cuando las plantas son vernalizadas por 6 semanas y luego crecidas en SD a 22°C por 10 dps. **(E)** Estructura intrón-exón de *AGL19* donde se muestran las posiciones de las inserciones de T-DNA de los mutantes. **(F)** Los alelos *agl19-1*, *agl19-2* aparentemente son nulos. El RNA fue extraído de hojas de roseta de plantas de 40 días crecidas en LD (Modificado de Schönrock et al., 2006).

Schönrock et al. (2006) analizaron la floración de dos alelos mutantes de *AGL19* (*agl19-1* y *agl19-2*) que consideraron de expresión nula debido a inserciones de T-DNA en el primer intrón de este gen (Figura 5E, F). Sin embargo, en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas (Instituto de Ecología, UNAM), se observó acumulación del transcrito entero de *AGL19* en dichas líneas mutantes y expresión nula en un tercer alelo denominado *agl19-3* (SALK_000234, aislado en nuestro laboratorio), el cual tiene una inserción de T-DNA en el cuarto intrón. Aun así, los tres alelos presentan un fenotipo de floración tardía similar con respecto a las plantas silvestres, al vernalizar las plantas durante 8 semanas y crecerlas en tierra y un fotoperiodo de SD hasta su floración. Así mismo, demostramos previamente que la acumulación de los transcritos alternativos de *AGL19* era mayor en los alelos mutantes publicados con respecto a las plantas silvestres, lo que nos llevó a pensar que dichos transcritos pudieran estar implicados en la regulación de *AGL19* u otros genes que participan en la floración y que estos eran responsables del fenotipo de floración tardía y no así la falta de expresión de *AGL19* (Cruz-Sánchez et al., sin publicar).

En este trabajo nos centramos en analizar la regulación transcripcional de *AGL19* y la expresión de sus transcritos alternativos por dos complejos remodeladores de la cromatina, PcG y TrxG, así como el papel que tienen UPF1 y EARLY FLOWERING 9 (ELF9), involucradas en la vía de NMD, en la regulación post-transcripcional de *AGL19* y sus transcritos alternativos.

3. Hipótesis

Si las proteínas PcG reprimen la expresión de *AGL19*, CLF y ATX1, podrían regular de forma antagónica la acumulación de sus mensajeros alternativos, siendo estos sujetos de degradación por la vía de NMD.

4. Objetivo general

- Análisis de la expresión de *AGL19* y sus transcritos alternativos en mutantes *clf-29*, *atx1-3*, *upf1-5* y *elf9-2*.

4.1. Objetivos particulares

- Análisis de la acumulación de los diferentes transcritos de *AGL19* resultado del *splicing* alternativo en los mutantes *clf-29* y *atx1-3*.
- Efecto de ELF9 y UPF en la acumulación de los diferentes transcritos de *AGL19*.
- Análisis bioinformático de los mensajeros con *splicing* alternativo de *AGL19*.
- Descripción de la expresión espaciotemporal de *AGL19* utilizando dos construcciones que contienen el primer intrón y el promotor completo, o un minipromotor fusionado al gen reportero β -glucuronidasa, bajo diferentes condiciones de desarrollo.

5. Materiales y Métodos

5.1. Plantas y condiciones de crecimiento

Las plantas silvestres (WT), mutantes (*clf-29*, *upf1-5*, *elf9-2*, *atx1-3*) y líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo se encuentran en el ecotipo Columbia (Col-0). Para las plantas crecidas en caja Petri, las semillas se esterilizaron utilizando 0.5 mL de una solución de cloro al 60% y tween al 0.005%, agitándolas durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se realizaron de 4 - 5 lavados con 0.5 mL de H₂O estéril durante aproximadamente 2 minutos y finalmente se les agregó 0.5 mL de agarosa al 0.3%. Las semillas se estratificaron a una temperatura de 4°C durante 3 días antes de la siembra, esto para sincronizar su germinación y desarrollo. Las semillas se sembraron en cajas Petri cuadradas con 80 mL de medio de crecimiento Murashige-Skoog (MS) 0.2X, sacarosa 1.0% y agar 1.0%, y se colocaron en cámaras de crecimiento a 23 °C en día largo (LD; con una intensidad luminosa de 7000 luxes), durante 10 (*clf-29* y *atx1-3*) y 14 (*upf1-5* y *elf9-2*) días post-siembra (dps). Para las líneas de las construcciones con el gen reportero de GUS, se siguió el procedimiento anterior, solo que las semillas se crecieron durante un periodo de 3 a 14 días en LD.

Las líneas de *AGL19:GUS* también se sembraron directamente en tierra sin esterilizar y se colocaron en cámaras de crecimiento a 23°C en SD durante 5 y 7 semanas, con una intensidad luminosa de 13000 luxes.

Para los ensayos de vernalización se siguió el mismo procedimiento de las plantas crecidas en cajas Petri, solo que en lugar de estratificarlas se colocaron a TA durante 24 h y posteriormente se colocaron en oscuridad durante un periodo

de 8 semanas a 4°C. Posteriormente se pasaron a una cámara de crecimiento a 23 °C con un programa de SD durante 15 días.

5.2. Extracción y cuantificación del RNA

El material vegetal utilizado para extraer RNA se obtuvo a partir de la parte aérea de plántulas de 10 y 14 dps, así como de hojas de roseta y SAM de las plantas crecidas en tierra durante 5 semanas. El material congelado con nitrógeno líquido se molió en mortero hasta convertirlo en un polvo fino y se le agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Después se le agregó 0.2 mL de cloroformo, se agitó por inversión y se dejó incubar a TA durante 3 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se precipitó con 0.5 mL de isopropanol y se incubó aproximadamente por 2 horas a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µL de agua estéril libre de RNAsas y se cuantificó utilizando 1 µl de cada muestra de RNA en un Nanodrop y se realizaron las diluciones necesarias para obtener 1 µg/ µl de RNA de cada muestra.

5.3 Análisis del RNA en gel desnaturalizante

Se realizó la electroforesis del RNA total en un gel de agarosa al 1.2% que contiene formaldehído al 3% de esta forma se calibraron los RNAs para

asegurarnos de que hubiera la misma cantidad de cada muestra antes de hacer la síntesis de cDNA.

5.3. Síntesis de cDNA y RT-PCR semicuantitativa

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg RNA, utilizando la enzima reverso-transcriptasa SuperScript™ II (Invitrogen), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la realización de las RT-PCRs semicuantitativas se utilizaron los oligonucleótidos y condiciones de amplificación que se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR se realizaron electroforesis de geles de agarosa al 1% y como agente intercalante se utilizó bromuro de etidio (Invitrogen) a una concentración de 10 µg/µl, el cual se agregó directamente al gel de agarosa.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCRs.

Oligo	Secuencia (5'-3')
<i>AGL 19-F1</i>	GTGAGGGGCAAAAACGGAGATG
<i>AGL 19-F2</i>	TTATTTTCATTTGATTCATTTTCAG
<i>AGL 19-F3</i>	GAGACGAAACATCTGGATTG
<i>AGL 19-F4</i>	CTCAAATTTCTTATGAGAAACG
<i>AGL 19-R2</i>	CGAGAGACGAAACATCTGGA
<i>AGL 19-R3</i>	CTCAAATTTCTTATGAGAAACG
<i>AGL 19-R4</i>	GAGTCATCCTGTATCTCGTTA
<i>AGL 19-R5</i>	TAATATGTTGCTGAGTAGAAGAG
<i>AGL 19-R7</i>	CTTACAACCTTCTTCAAAAAGAAT
<i>TUB2-Fw</i>	AGGACTCTCAAACCTCACTACC
<i>TUB2-Rv</i>	AACTGCGGATGAAGAAGGTGA

Tabla 2. Condiciones de amplificación utilizadas en las RT-PCRs

Fragmento Esperado	Tm (°C)	No. De Ciclos
F1-R7 - 684 pb	58	40
F2-R7 - 526 pb	58	40
F4-R7 - 439 pb	58	40
F1-R3 - 355 pb	60	40
F3-R5 - 307 pb	59	40
F4-R5 - 330 pb	60	40
F2-R3 - 197 pb	58	40
F1-R2 - 278 pb	54	40
F3-R7 - 416 pb	58	40
TUB2 - 668 pb	62	25

5.4. Ensayo de β -glucoronidasa

Para analizar la expresión transcripcional de *AGL19*, se utilizaron dos construcciones con el gen reportero de la β -glucoronidasa (*GUS*). La primera, denominada como *AGL19_{prom+int}::GUS*, contiene toda la zona intergénica (2699 pb) 5' arriba del codón de inicio, el primer exón, primer intrón y una parte del segundo exón de *AGL19* (2002 pb). La segunda construcción, denominada *AGL19_{int}::GUS*, contiene sólo una pequeña parte de la zona intergénica que contiene una caja TATA (175 pb arriba del ATG), el primer exón, primer intrón y una parte del segundo exón de *AGL19* (2002 pb), de igual forma que la construcción anterior (Ochoa-Espinosa, 2002; tesis de licenciatura). Se colectó por separado la raíz y la parte aérea de ambas líneas y se procedió a realizar el ensayo de GUS. El material se colocó en vasos de precipitado, se les agregó acetona fría y se dejaron 30 min a -20°C. Después se les quitó la acetona y se les agregó 3 ml de la solución de prelavado I (Buffer fosfatos-Na 50 mM pH 7.2, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM, K₄Fe(CN)₆ 0.5 mM). Se dejaron a 4°C durante 15 min. Posteriormente se les quitó la solución de prelavado I y se les agregó la solución de prelavado II (Buffer

fosfatos-Na 50 mM pH 7.2, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 mM, $K_4Fe(Cn)_6$ 0.5 mM, EDTA 2 mM) a TA que se infiltró al vacío durante 20 min. Al terminar se les quitó la solución II, se les agregó la solución de X-Gluc 1 mM que contiene además fosfato-Na 50 mM pH 7.2, $K_3Fe(CN)_6$ 0.5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 0.5 mM, EDTA 2 mM y tritón X-100 0.5%. Nuevamente se infiltró al vacío durante 10 minutos. La reacción se mantuvo 1 hora a 37°C y hasta el siguiente día a TA en oscuridad y finalmente se montaron en portaobjetos con una solución de NaI (Na 4.2 M, $Na_2S_2O_3$ 8 mM, glicerol 65% y DMSO 2%) para ser observadas y fotografiadas en el microscopio (Olympus BX60, con un aumento de 40x).

5.5. Análisis bioinformático de la secuencia de AGL19

Se realizó un análisis de las secuencias de los transcritos alternativos de *AGL19* para conocer qué dominios podrían estar presentes en las proteínas teóricas que pudieran ser traducidas a partir de dichos transcritos. En base a la secuencia conocida de *AGL19* y los tamaños de bandas observados en las RT-PCRs se insertaron las secuencias de DNA de los transcritos alternativos y se tradujeron utilizando el software Translate Tool del portal ExpASy del SIB (<https://web.expasy.org/translate/>). Se realizó la traducción en los tres marcos de lectura, pero solo se utilizaron las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir del primer marco de lectura para subsecuentes análisis. Después las secuencias de aminoácidos se analizaron utilizando el software Conserved Domain Search del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para conocer los dominios que podrían tener las proteínas teóricas.

Para el análisis de las posibles secuencias reguladoras en *cis* en la zona intergénica y el primer intrón de *AGL19* se utilizó la herramienta de *Gene Analysis* del portal AthaMap (http://www.athamap.de/search_gene.php). Para el análisis se restringió la búsqueda de secuencias reguladoras a 2000 pb en dirección 5', así como también en dirección 3' del ATG de *AGL19*. A partir de los datos obtenidos se analizaron las secuencias que se encontraran dentro del rango de la zona intergénica, así como dentro del primer intrón de *AGL19*.

6. Resultados

6.1. Regulación de *AGL19* y sus transcritos alternativos por CLF

Previamente, habíamos encontrado que en los alelos mutantes *agl19-1* y *agl19-2* (Schönrock et al., 2006) y un tercero (*agl19-3*) con el que contamos en nuestro laboratorio, se acumulaban diferentes transcritos alternativos de *AGL19* (Cruz-Sánchez et al., sin publicar). Puesto que Schönrock et al. (2006) demostraron que *AGL19* es regulado negativamente por el complejo PRC2 conformado por las proteínas MSI1, EMF2 y CLF, decidimos analizar la expresión de estos transcritos en el mutante *clf-29* en comparación con las plantas silvestres para ver si existía una expresión diferencial con respecto al mensajero codificante.

Mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando oligonucleótidos anclados tanto en exones como intrones del gen, se amplificó el mensajero codificante, así como específicamente los transcritos producto del SA (Figura 6A). Como se puede ver en la Figura 6B, todas las amplificaciones dan más de una banda, por lo cual consideramos que pueden existir varias ediciones alternativas del transcrito de *AGL19* que pudieran incluir diferentes intrones. En el caso de la amplificación F1-R7, la cual comprende toda la región codificante del gen más una pequeña sección del UTR 3', se puede observar que la banda más abundante corresponde a la secuencia codificante entera de *AGL19* (660 pb) y como era de esperarse, la acumulación del mensajero de *AGL19* es mayor en el mutante *clf-29* que en las plantas silvestres. Igualmente se observa la presencia de otras dos bandas de mayor tamaño (~770 pb y 868 pb) que el cDNA codificante. Con base en los tamaños de banda observados, se determinó que la segunda banda de ~770 pb

podría estar incluyendo el intrón 3 (87 pb) o el 6 (97 pb), y en el caso de la banda superior (868 pb) podría ser un transcrito que incluye ambos intrones.

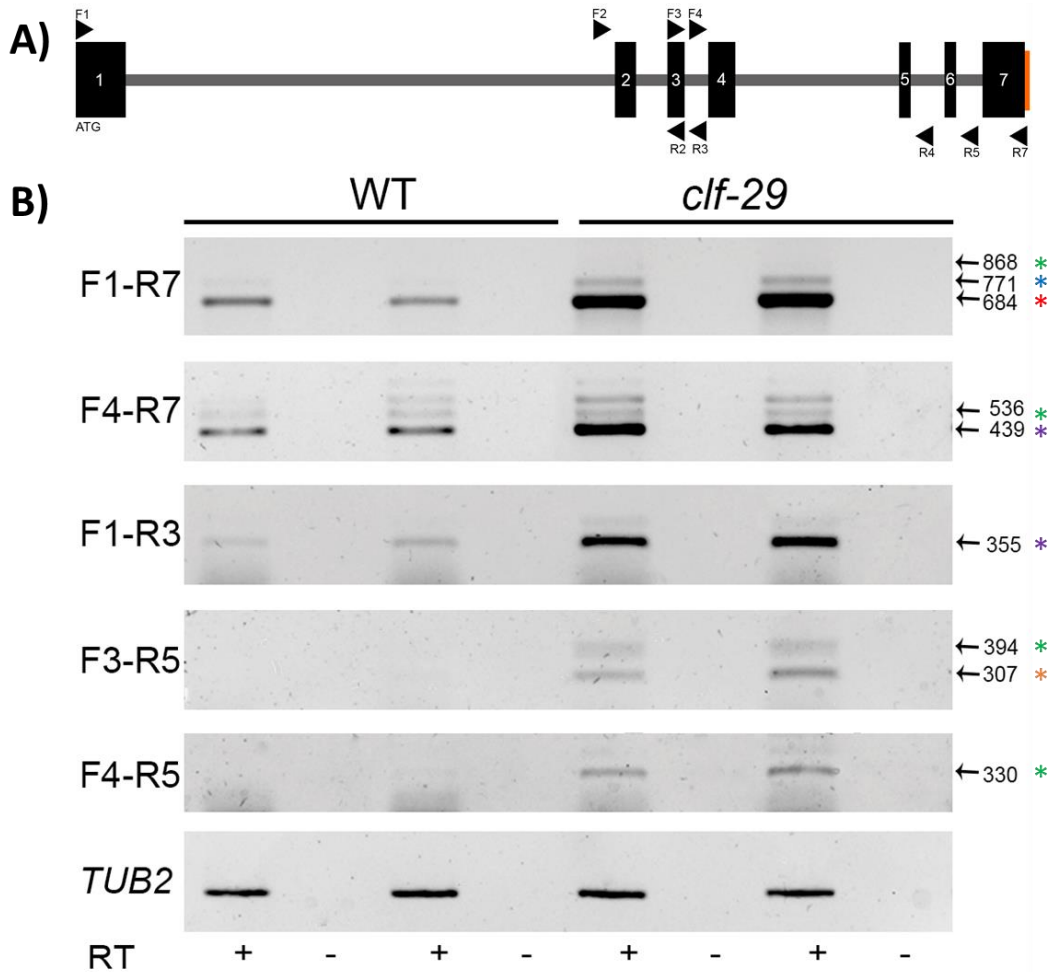


Figura 6. CLF regula la expresión tanto del mensajero codificante de *AGL19* como sus transcritos alternativos. **(A)** Esquema de *AGL19* con los oligonucleótidos utilizados para las diferentes amplificaciones mediante RT-PCR. Los exones están marcados como cajas negras y los intrones con barras grises. El UTR 3' se encuentra marcado en color naranja. **(B)** RT-PCRs de plantas silvestres (*Wt*) y *clf-29* de 10 días post-siembra (dps) por duplicado. A la izquierda se observan los pares de oligonucleótidos utilizados para amplificar cada fragmento de *AGL19*. Los números a la derecha muestran los tamaños de bandas (pb) obtenidos con base a un marcador de peso molecular (no mostrado) y la secuencia conocida del gen, para cada una de las amplificaciones. Los asteriscos indican qué secuencias se encuentran incluidas en los diferentes fragmentos amplificados: rojo: indica que la banda pertenece a un transcrito que incluye solamente exones; azul: transcrito que puede incluir la secuencia codificante y el intrón 3 o 6; morado: secuencia codificante más intrón 3; naranja: secuencia codificante más intrón 6; verde: secuencia codificante y ambos intrones. La acumulación del mensajero de la *TUB2* se utilizó como control de carga. En todas las amplificaciones se utilizaron controles negativos sin reverso-transcriptasa (RT -) para asegurar que los fragmentos amplificados provenían solamente del RNA (RT +) y no de contaminación de DNA genómico.

Para poder determinar cuáles intrones pudieran estar incluidos dentro de estos transcritos alternativos se realizaron distintas amplificaciones con oligonucleótidos anclados en los intrones y encontramos que efectivamente los intrones que se encuentran incluidos dentro de estos transcritos son el tercer y sexto intrón. Además, se encontró que puede haber transcritos que contengan uno de los dos intrones o ambos.

Estos datos indican que CLF regula tanto al transcrito canónico de *AGL19*, así como también a sus transcritos alternativos. Aunque en plantas silvestres también es posible observar los transcritos alternativos de *AGL19*, su acumulación es muy baja, en comparación con las bandas que se observan en el mutante *clf-29*. Este resultado confirma que los eventos de SA que se observan en los mutantes de T-DNA de *AGL19* (Cruz-Sánchez et al., sin publicar) no son artefactos debido a las inserciones, sino que en efecto estos transcritos alternativos existen de forma natural en *AGL19*.

6.2. La activación transcripcional de *AGL19* no depende únicamente de ATX1

Se sabe que los complejos PcG y TrxG actúan de manera antagónica para regular la expresión de distintos genes en *Arabidopsis* (Baulcombe y Dean, 2014; Shafiq et al., 2014). Un ejemplo relevante en nuestro caso es la activación de *FLC* por TrxG durante el desarrollo vegetativo de la planta y su posterior represión por PcG durante la vernalización (Baulcombe y Dean, 2014). Por lo tanto, quisimos ver si ATX1 regula la expresión de *AGL19* y sus transcritos alternativos (Figura 7).

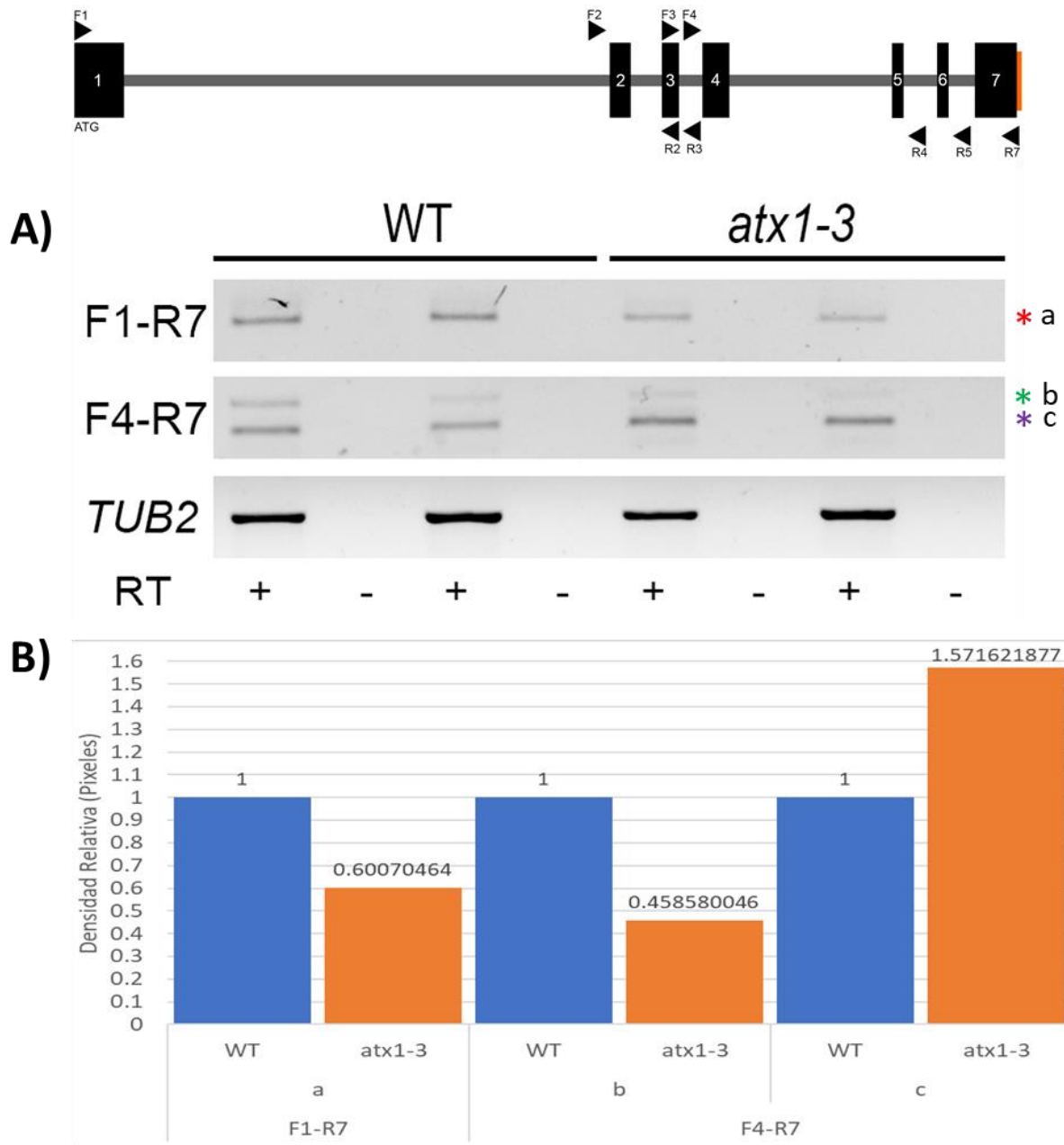


Figura 7. ATX1 regula diferencialmente los mensajeros de *AGL19*. **A)** RT-PCR por duplicado en plantas de 10 dps del mensajero codificante de *AGL19* amplificado con los oligonucleótidos F1-R7, y la amplificación de un fragmento de *AGL19* que comprende del tercer intrón a la región UTR 3' (F4-R7), donde se pueden observar transcritos que incluyen el 3er intrón (banda c) y a ambos intrones (3 y 6) (banda b). **B)** Cuantificación relativa de la acumulación de los transcritos de *AGL19*, donde se aprecia que mientras las bandas a y b que incluyen la secuencia codificante de *AGL19* y un fragmento con el 3er y 6to intrón, respectivamente, disminuyen en *atx1-3* con respecto a la planta silvestre (WT), mientras que el mensajero alternativo que incluye el intrón 3 (banda c, asterisco morado), aumenta. Las cuantificaciones se realizaron con el programa ImageJ (NIH; v. 1.51p), se obtuvieron los promedios de los duplicados y se normalizaron respecto a *TUB*.

Se observa una disminución relativa en la expresión de *AGL19* cuando se amplifica el cDNA codificante, pero el efecto de la regulación de ATX1 sobre *AGL19* no es tan evidente como en el caso de la regulación por CLF (Figura 6B). Cabe recalcar que *atx1-3* no es una mutante nula (Petrone, 2015) y que ATX1 no es la única metiltransferasa encargada de metilar la H3K4 (Alvarez-Venegas et al., 2003), por lo que es posible que ATX1 actúe de forma redundante con otras proteínas TrxG en la activación transcripcional de *AGL19*.

Sin embargo, en la amplificación de F4-R7 se observa que el transcrito que incluye al intrón 3 presenta una mayor acumulación con respecto a la planta silvestre, pero la acumulación del transcrito que incluye ambos intrones si disminuye respecto a la planta silvestre. Este resultado podría indicar que existe una regulación diferencial dependiendo del transcrito generado, pero será necesario repetir la amplificación de F4-R7 y realizar las otras amplificaciones para confirmarlo.

6.3. Proteínas involucradas en la vía de NMD regulan la expresión de *AGL19*

Uno de los mecanismos más estudiados de regulación genética a un nivel post-transcripcional es la vía de NMD. Song et al. (2009) demostraron que *SOC1* y sus transcritos alternativos están regulados por ELF9, una proteína de unión a RNA que se cree ayuda en la formación de complejos de snRNPs U2 y por UPF1, un componente clave de la vía NMD (Arciga-Reyes et al., 2006). *AGL19* se encuentra

dentro del clado filogenético de *SOC1*, por lo que hace factible que sus transcritos también sean procesados por ELF9 y UPF1.

En todas las amplificaciones se observa que en *upf1-5* y *elf9-2* hay una mayor acumulación de los transcritos de *AGL19*, tanto los alternativos como el canónico, respecto a las plantas silvestres (Figura 8A). Sin embargo, la acumulación de los transcritos alternativos respecto al canónico no es igual, ya que se observa que los transcritos alternativos se acumulan en mayor medida en los mutantes de la vía NMD que el transcrito canónico (Figura 8B). Esto sugiere que los transcritos alternativos de *AGL19* están siendo degradados en mayor medida por UPF1 y ELF9, que el canónico. Igualmente, los resultados indican que podría existir una regulación diferencial entre los diferentes transcritos alternativos, ya que el fragmento que incluye ambos intrones (F4-R5) es el que más se acumula en ambos mutantes y los fragmentos que incluyen solamente al intrón 3 también se acumulan en mayor medida en comparación con aquellos que presentan el intrón 6 (Figura 8B).

De manera general se puede afirmar que tanto ELF9 como UPF1 regulan la acumulación de los transcritos de *AGL19* (codificante y alternativo), ya que se observa una mayor acumulación en los mutantes con respecto a las plantas silvestres (Figura 8B), sin embargo, parece que ELF9 y UPF1 regulan de manera preferencial a los transcritos alternativos que al transcrito canónico de *AGL19*.

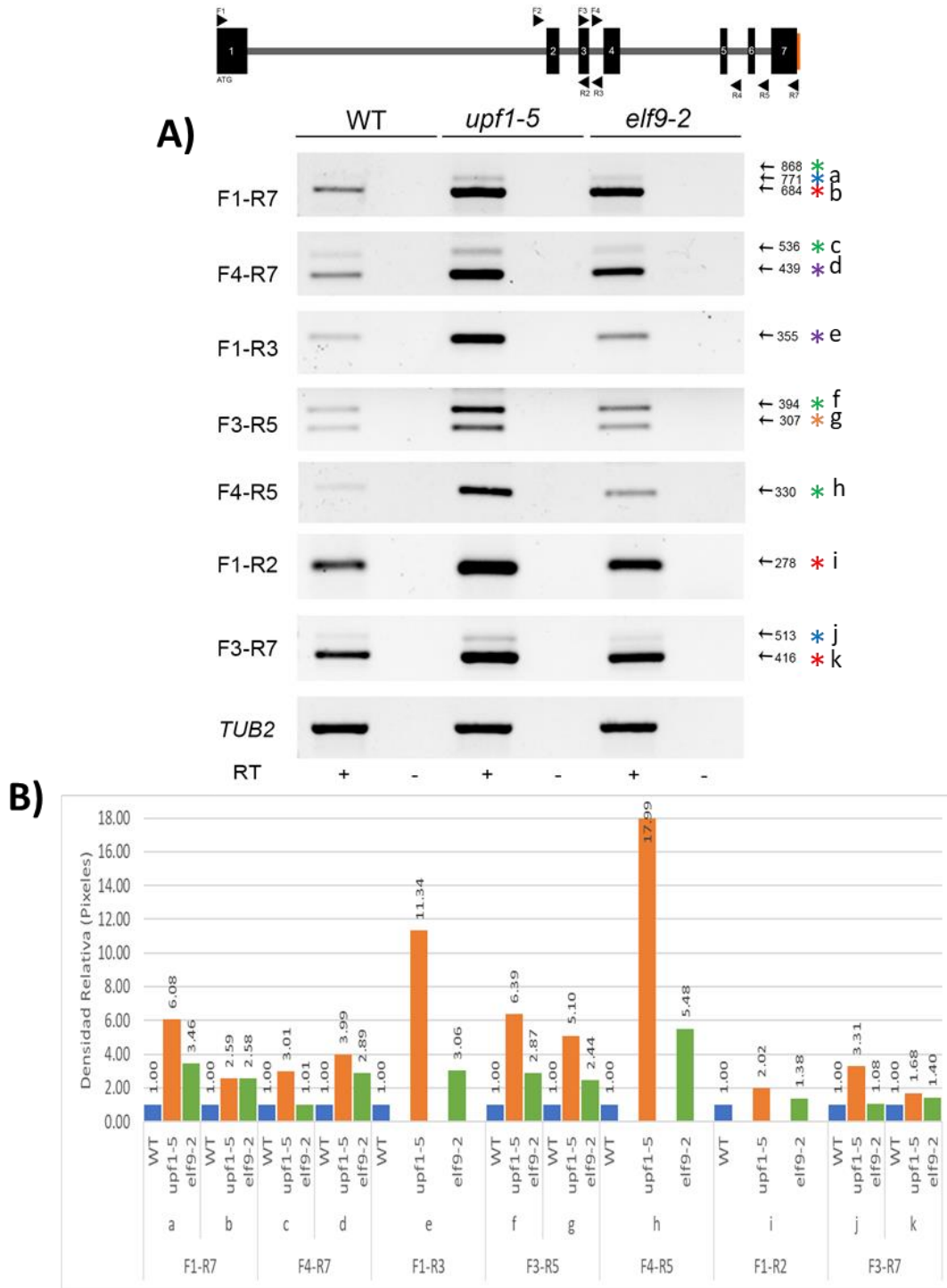


Figura 8. Regulación de *AGL19* por *UPF1* y *ELF9*. RT-PCRs de plantas de 14 dps. **(A)** RT-PCRs en plantas de 14 dps. **(B)** Cuantificación relativa de la acumulación de los transcritos de *AGL19*. Las cuantificaciones se normalizaron respecto a *TUB2*. Los asteriscos indican qué secuencias se encuentran incluidas en los diferentes fragmentos amplificados: rojo: indica que la banda pertenece a un transcrito que incluye solamente exones; azul: transcrito que puede incluir la secuencia codificante y el intrón 3 o 6; morado: secuencia codificante más intrón 3; naranja: secuencia codificante más intrón 6; verde: secuencia codificante y ambos intrones.

Todos los fragmentos se acumulan en mayor medida en *upf1-5* en comparación con *elf-9* y las plantas silvestres. También llama la atención que el fragmento F4-R5 que incluye el intrón 3 y 6 sea el que se acumule más en *upf1-5* y *elf9-2*, en comparación con las plantas silvestres y en relación con los otros mensajeros (Figura 8B). Los tamaños de bandas observados en las amplificaciones de *upf1-5* y *elf9-2* coinciden con aquellos observados en *clf-29*, así como también el nivel de expresión relativo de los transcritos alternativos con respecto al nivel de expresión de *AGL19*, lo cual sugiere que los eventos de *splicing* observados están regulados de la misma forma y que los niveles de expresión de los transcritos alternativos están asociados a los niveles de expresión del transcrito codificante de *AGL19*. Igualmente, mediante las RT-PCRs realizadas en este experimento se confirma que los intrones que se encuentran incluidos en los transcritos alternativos de *AGL19* son solamente el intrón 3 y el 6. El intrón 2 se excluye de esta posibilidad al observar la amplificación F1-R2, ya que el tamaño de banda de esa amplificación corresponde solamente a la región codificante incluida en ese fragmento, así como también el intrón 5, ya que se realizó la amplificación F4-R4 y en esta amplificación uno de los oligonucleótidos se encuentra anclado en el 5to intrón y no se detectó banda (datos no mostrados). El 4to intrón también se descarta debido a los tamaños de banda observados en todas las amplificaciones.

6.4. Análisis bioinformático de los transcritos alternativos de *AGL19*

De acuerdo con los tamaños de banda obtenidos en cada una de las amplificaciones de los diferentes fragmentos de *AGL19* se encontró que los

transcritos alternativos observados corresponden a eventos de retención de intrones. Específicamente se observó que existen transcritos que incluyen el intrón 3 (87 pb), o el 6 (97 pb), o ambos intrones, pero no encontramos la existencia de transcritos que incluyeran los otros intrones.

Los mensajeros alternativos pueden llegar a tener un papel en la regulación transcripcional de los genes actuando como mensajeros no codificantes, o bien podrían traducirse y producir proteínas truncadas. Un análisis bioinformático en el que se tradujeron los transcritos alternativos utilizando el software Translate Tool del portal ExPASy del SIB (<https://web.expasy.org/translate/>), muestra que para el caso de *AGL19*+intrón 3 existe un primer CTP a 327 pb abajo del ATG, mientras que para *AGL19*+intrón 6, existe un CTP a 516 pb abajo del ATG (Figura 9A). Se puede suponer que el mensajero que incluye ambos intrones si se tradujera, se comportaría como la proteína truncada en el intrón 3.

Una búsqueda de los dominios que podrían mantenerse en la proteína de *AGL19* utilizando el software Conserved Domain Search del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) muestra que la traducción del transcrito que lleva el intrón 3 podría formar una proteína de 109 aa que incluye el dominio MADS (correspondiente a los aa 3-70) y el I (correspondiente a la última parte de la proteína), mientras que el que incluye al intrón 6 formaría una proteína de 172 aa y tendría todos los dominios con excepción del carboxilo terminal (Figura 9B).

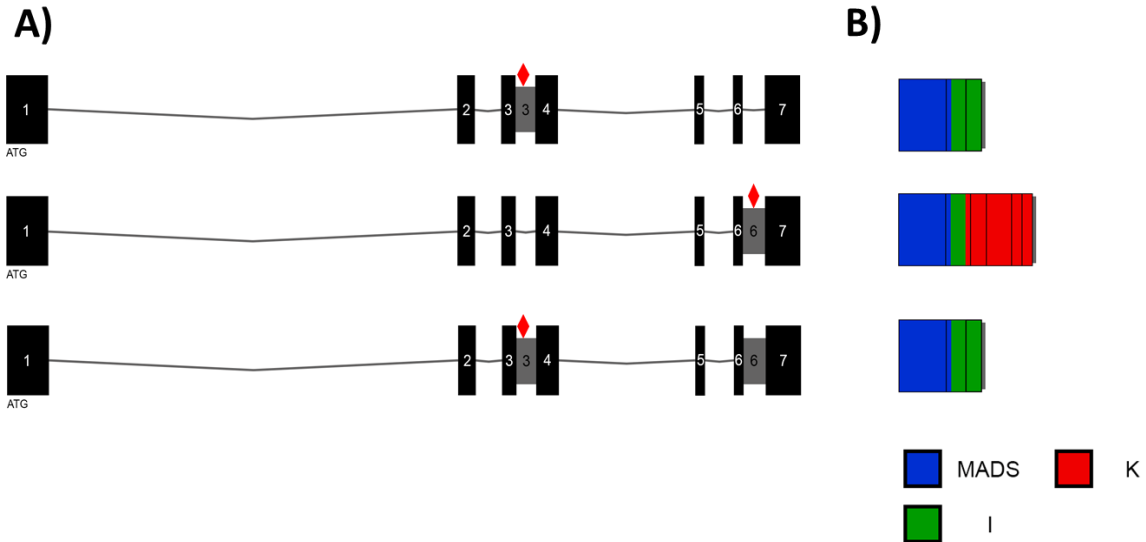


Figura 9. Esquema de los transcritos alternativos teóricos de *AGL19*. **A)** Los transcritos alternativos de *AGL19* presentan CTPs (rombos rojos). Los rectángulos negros representan exones, mientras que las líneas grises representan intrones. **B)** Modelos de las proteínas teóricas traducidas a partir de los transcritos alternativos de *AGL19* y sus dominios correspondientes.

6.5. *AGL19::GUS* se expresa solamente en la punta de la raíz principal y de las raíces laterales pero no en la parte aérea

Los datos de Schönrock et al. (2006) y los obtenidos por Cruz-Sánchez et al. (sin publicar) en donde se observaron diferencias en la expresión de los SA en presencia de las inserciones de T-DNA, indican que el intrón 1 de *AGL19* tiene zonas reguladoras importantes para la expresión de este gen. Por lo tanto, decidimos comparar la expresión espacio-temporal de *AGL19* utilizando dos construcciones transcripcionales unidas al gen reportero *GUS*: la primera denominada *AGL19_{int}::GUS*, contiene un minipromotor de (175 pb) por arriba del inicio de la transcripción, el primer exón, primer intrón y un fragmento del segundo exón (2002 pb) (Ochoa-Espinosa, 2002) y la segunda construcción, denominada *AGL19_{prom+int}::GUS* contiene lo mismo que la primera y adicionalmente toda la

zona intergénica 5' de 2699 pb en donde pensamos debería estar incluido el promotor del gen.

Primero se analizó la expresión de ambas construcciones en plantas vernalizadas durante 8 semanas seguido de un periodo de 14 días en SD. En estas plantas que están a punto de florecer *AGL19* se encuentra inducido (Figura 5B; Schönrock et al., 2006). Sorprendentemente, no se detectó expresión de GUS con ninguna de las construcciones. También se crecieron plantas en tierra durante 5 y 7 semanas en SD, ya que se había reportado que la expresión de *AGL19* aumenta con la edad de la planta (Kang et al., 2015). Se realizaron ensayos de GUS en hojas de roseta y en tejido enriquecido en el SAM por separado y tampoco se logró la detección de GUS con ninguna de las dos construcciones. Entonces, se realizaron RT-PCRs para confirmar si el mensajero de *AGL19* se estaba expresando en estas plantas, y encontramos que en efecto el mensajero está presente en ambos tejidos y en las dos construcciones (Figura 10). Incluso se observó una mayor expresión de *AGL19* en el SAM de plantas de 5 semanas (Figura 10B), en comparación con las hojas de roseta (Figura 10A).

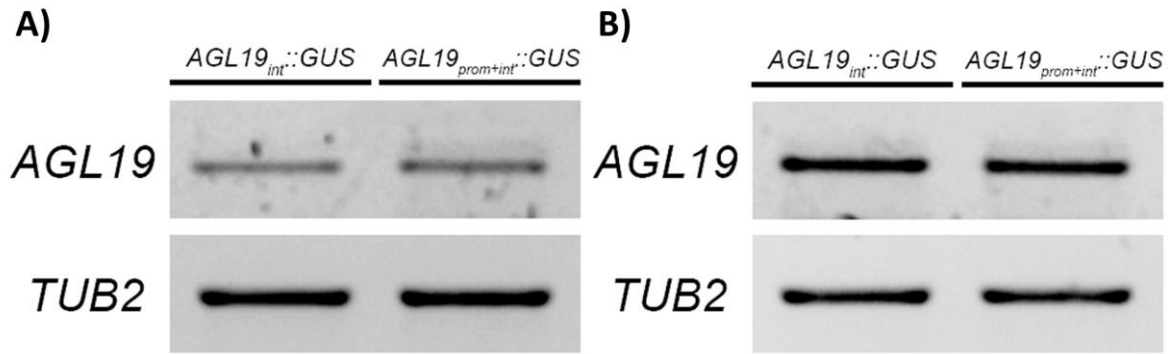


Figura 10. *AGL19* se expresa en la parte aérea, a pesar de que las plantas no dieron señal del reportero GUS. RT-PCRs de plantas de 5 semanas crecidas en SD. **A)** Hojas de roseta. **B)** Región central enriquecida en el SAM. Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR de *AGL19* son F1 y R7, los cuales amplifican el cDNA completo de *AGL19*.

Para este resultado caben dos explicaciones, una es que la zona intergénica 5' junto con el intrón no son suficientes para promover la expresión de *AGL19* en la parte aérea. La otra, es que las construcciones no hayan sido generadas correctamente.

Se decidió realizar una cinética de crecimiento a tiempos tempranos de desarrollo (8, 10 y 14 dps; Figura 11) donde se pudiera observar la expresión en la raíz, que es el órgano donde más se expresa *AGL19* (Alvarez-Buylla et al., 2000). Se encontró expresión de GUS en la punta de la raíz principal (RP) y las raíces laterales (RL) y que esta disminuía con la edad, pero no se detectó expresión de GUS en la parte aérea de las plantas a ningún tiempo (dato no mostrado).

En detalle: con la construcción *AGL19_{int}::GUS* se observó expresión de GUS tanto en las puntas de RP como en las RL a los 8 y a los 10 dps. Sin embargo a los 14 dps no se detectó expresión de *AGL19::GUS* en RP y se observó una leve disminución de expresión en las RLs (Figura 11). En el caso de la línea que incluye toda la región intergénica 5' (*AGL19_{prom+int}::GUS*) sólo se

detectó expresión de *GUS* en la RP a los 8 dps, mientras que en RLs, la expresión de *GUS* presentó una cinética similar a la otra construcción, aunque la intensidad del *GUS* para los mismos tiempos de reacción, es menor.

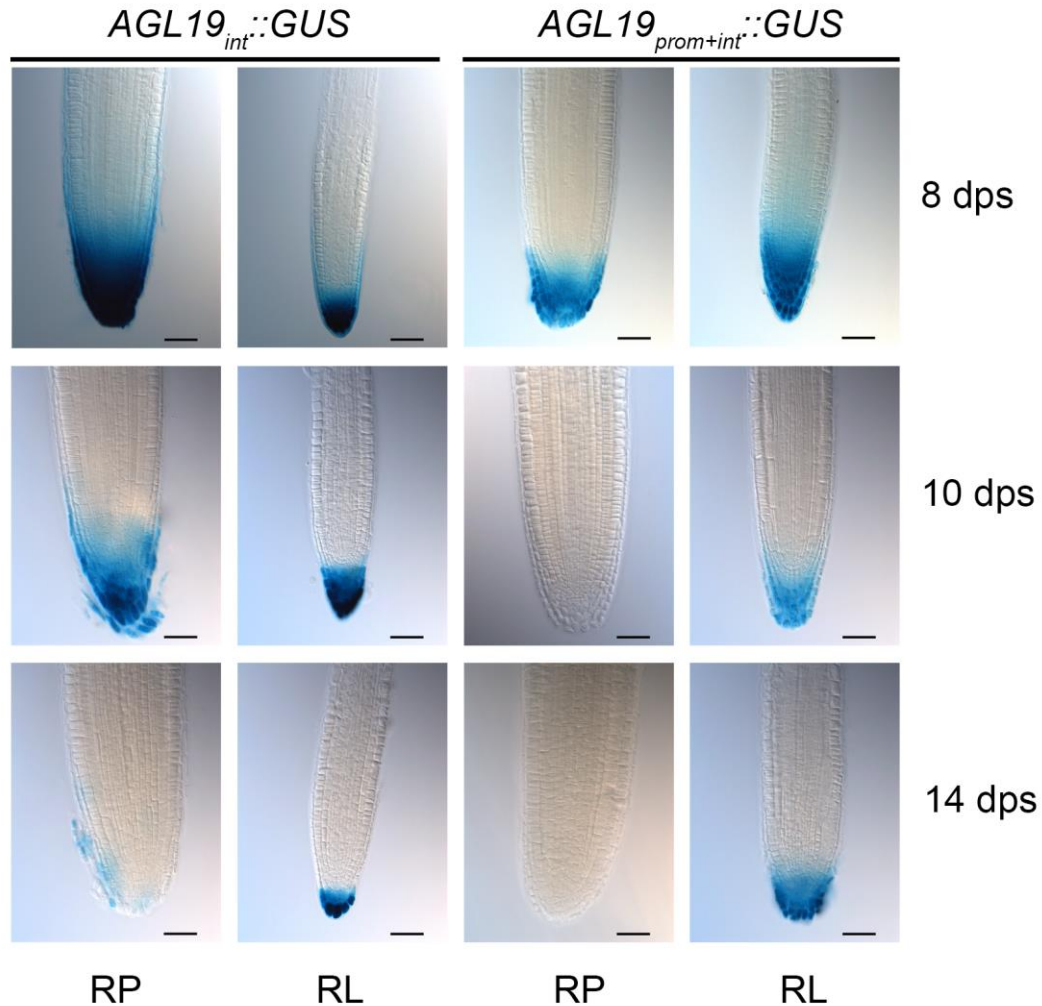


Figura 11. Patrón de expresión espacio-temporal de *AGL19:GUS* en plantas de 8, 10 y 14 dps, donde se observa un decaimiento en la expresión de ambas construcciones en la raíz principal (RP) más rápido que en las raíces laterales (RL), siendo más drástico en los paneles de la derecha en los que se utilizó la construcción con toda la zona intergénica 5'. Plantas crecidas en condiciones de LD. Imágenes representativas de una n = 12. Barra = 50 μ m.

Aunque las raíces principales y las laterales pertenecen a plantas de la misma edad, estas no se encuentran en el mismo estadio de desarrollo, siendo las RL más jóvenes en comparación con las RPs. Se decidió realizar una segunda

cinética a tiempos aún más cortos del desarrollo de la RP (Figura 12). La raíz de *Arabidopsis* emerge a los 2 días después de la germinación y algunas RL se desarrollan a partir de los 5 dps. Con la construcción de *AGL19_{int}::GUS* se puede observar, que la señal se incrementa tanto en RPs como en RLs conforme avanza el desarrollo hasta los 7 dps, pero su expresión se limita a la punta de la raíz. Interesantemente en *AGL19_{prom+int}::GUS* no se detectó expresión de *AGL19::GUS* en ninguna de la etapas observadas en RP, pero si se detectó en RLs con un patrón similar al observado en *AGL19_{int}::GUS*. Este resultado confirma, que en la zona intergénica por arriba del inicio de la transcripción de *AGL19*, existen elementos reguladores que modulan negativamente la expresión del gen y que la región del primer intrón es importante para su expresión, aunque no es suficiente para que el gen se exprese en la parte aérea de la planta.

El análisis de *AGL19_{int}::GUS* también nos indica que la expresión de *AGL19* tiene una temporalidad en las raíces, en la que aumenta diariamente hasta los 8 dps en la RP y luego disminuye hasta apagarse a los 14 dps, lo que puede implicar que la función de esta proteína es relevante en momentos y tejidos específicos del desarrollo de la raíz.

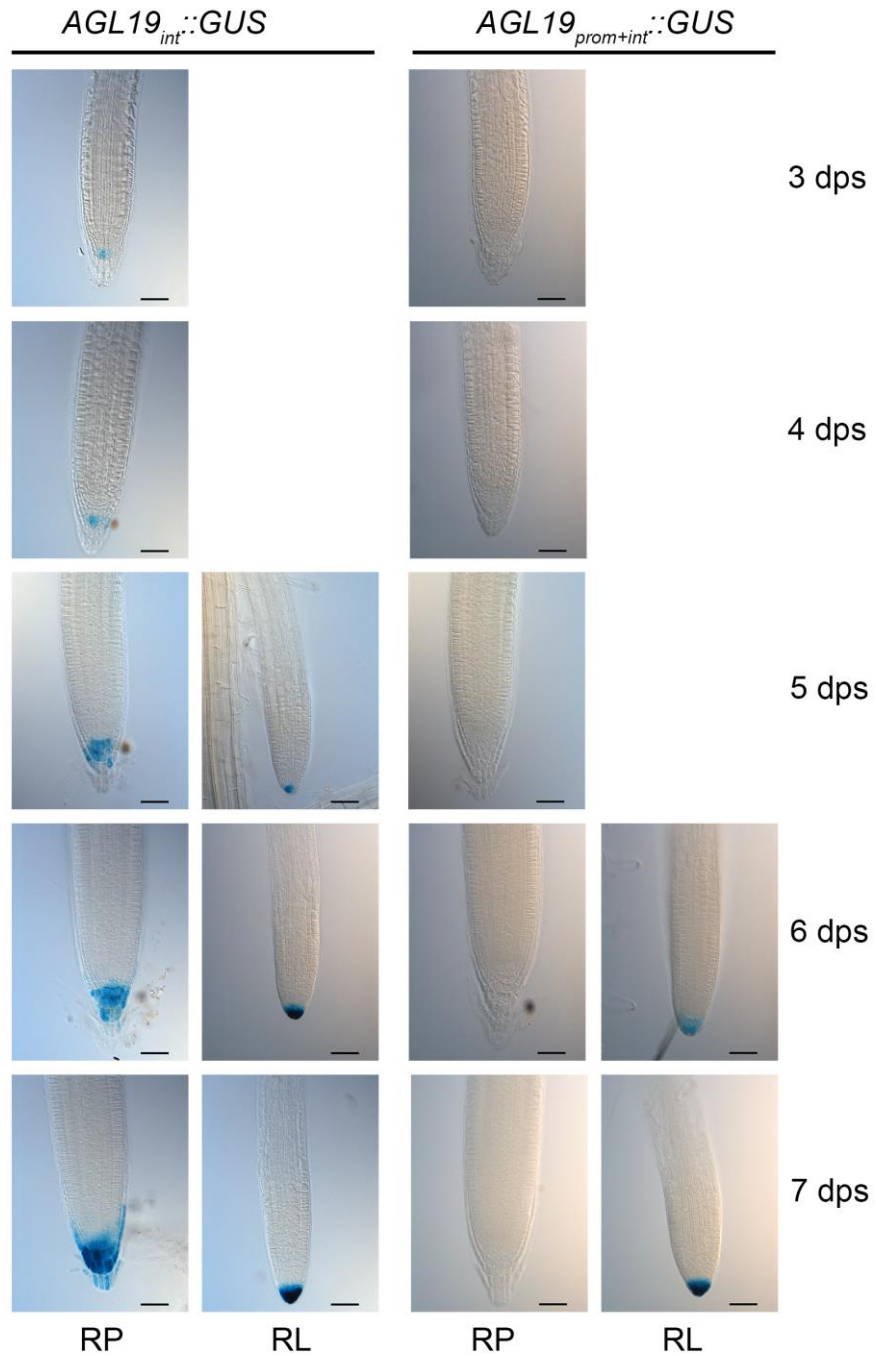


Figura 12. La expresión de *AGL19* se incrementa en plantas de 3 a 7 dps en la punta de las raíces, visualizada con la construcción *AGL19_{int}::GUS*, mientras que no detectamos la señal de *AGL19_{prom+int}::GUS* en la raíz principal (RP) pero sí en la raíces laterales (RL) a las mismas edades. Plantas crecidas en condiciones de LD. Imágenes representativas de una n = 6. Barra = 50 μ m.

7. Discusión

AGL19 es un factor de transcripción tipo MICK al que se le ha implicado en la transición a la floración en respuesta a la vernalización (Schönrock et al., 2006). Hasta a la fecha sólo se han encontrado 3 genes que participan en este proceso particular, todos ellos MADS-box. FLC, como represor de la floración tiene que ser reprimido para que esta se realice, y una forma de hacerlo es mediante el complejo PcG cuyas proteínas actúan durante la vernalización (Amasino y Michaels, 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Song et al., 2013; Baulcombe y Dean, 2014). Por otra parte, sabemos que AGL19 y AGL24 son inductores de la floración en respuesta a la vernalización y al menos *AGL19* es reprimido por PcG, de igual forma que *FLC*, pero contrario a este último, sucede durante el desarrollo vegetativo de la planta (Schönrock et al., 2006). Es interesante que la regulación de *FLC* por mensajeros no codificantes en sentido y en antisentido colaboren en su propia represión al conducir a las proteínas PcG al locus de *FLC* (Baulcombe y Dean, 2014; Shafiq et al., 2014). También resulta relevante mencionar que el intrón 1 de estos genes MADS-box y de otros, es importante para la represión de estos genes (Schauer et al., 2009)

Previamente en el laboratorio se había encontrado que los alelos mutantes de *AGL19* (*agl19-1* y *-2*) expresaban varios RNAs alternativos que podrían estar afectando la función de la proteína en caso de que se tradujeran, o bien, podría tener alguna función como mensajeros no codificantes. Con este trabajo nos centramos en investigar la regulación de estos mensajeros a nivel transcripcional y

post-transcripcional para tratar de entender con posterioridad su función y también analizamos el papel del intrón 1 de *AGL19* en la expresión de este gen.

7.1. Regulación epigenética de la expresión de *AGL19* y sus transcritos alternativos

El análisis de la expresión de *AGL19* y sus transcritos alternativos en *clf-29* demostró que ambos presentaban una mayor acumulación respecto a las plantas silvestres en todos los fragmentos amplificados (Figura 6B). Sin embargo, en el análisis de *AGL19* y sus transcritos alternativos en *atx1-3* se observó una acumulación diferencial de los transcritos alternativos de *AGL19*.

Con anterioridad ya se había reportado que CLF y MSI1 participaban en la regulación epigenética de *AGL19* (Schönrock et al., 2006). Sin embargo, en ese trabajo no se hace mención de lo que sucedía con los transcritos alternativos. En este trabajo observamos que en el mutante *clf-29* no sólo hay un aumento en la expresión del mensajero codificante de *AGL19* (como era de esperarse), sino que también encontramos un aumento en sus transcritos alternativos (Figura 6B). En *atx1-3*, se removió, al menos parcialmente, una marca de activación transcripcional (H3K4me3), lo cual provocó que la acumulación de algunos de los transcritos de *AGL19* disminuyera. Interesantemente en la amplificación del cDNA completo (Figura 7A; amplificación F1-R7) si se observó una disminución en la acumulación del transcrito que solo contiene la secuencia codificante de *AGL19* con respecto al silvestre, pero en la amplificación con los oligonucleótidos anclados en el 3er intrón y en la región UTR 3' (Figura 7A: amplificación F4-R7) se observó un aumento en la acumulación de un transcrito que incluye al 3er intrón y

los exones 4 – 7, pero dentro de esa misma amplificación se observó otro transcrito que incluye ambos intrones (3 y 6) y los exones 4 – 7 y en este si se observó una disminución en la acumulación de este transcrito con respecto al silvestre (Figura 7B). El análisis de la marca de H3K4me3 en plantas se ha enfocado principalmente a su papel como un activador de la transcripción (Pien y Grossniklaus, 2007). Aunque hasta la fecha en plantas no existe evidencia de una relación directa entre las modificaciones de la cromatina y los mecanismos de SA, en animales existe evidencia de que estos dos procesos se encuentran íntimamente relacionados (Luco et al., 2010; Luco et al., 2011; Brown et al., 2012; Zhou et al., 2014). En varios estudios en animales se encontró evidencia de que la H3K4me3 sirve como andamiaje para la unión de Chromodomain Helicase DNA binding protein 1 (CHD1), una proteína con un cromodominio encargada de modificar la estructura de la cromatina, y que esta proteína es capaz de reclutar la subunidad SF3a1 de las snRNP U2 del spliceosoma (Sims et al., 2007; Brown et al., 2012; Zhou et al., 2014). Mutantes *knockdown* de *CHD1* muestran alteraciones en el *splicing* de *IRF3*, un componente esencial de la respuesta inmune ante virus. En estos mutantes se observa que la falta de CHD1 no permite la remoción del 3er intrón de este gen, lo cual demuestra que el reclutamiento de snRNP U2 por la H3K4me3 es necesario para el *splicing in vivo* en animales (Sims et al., 2007). Una posible explicación del aumento del transcrito de *AGL19* que incluye al intrón 3 es que debido a que en *atx1-3* la marca de la trimetilación de H3K4 se encuentra (al menos parcialmente) disminuida, la maquinaria del spliceosoma podría no estar siendo reclutada para poder remover dicho intrón y debido a esto, aumenta la acumulación de este transcrito en específico. En plantas existen dos ortólogos

de CHD1 cuyos papeles antagónicos en la activación de genes necesarios para la maduración de la semilla han sido estudiados: CHROMATIN REMODELING 5 (CHR5) y PICKLE (PKL/CHD3/CHR6) (Shen et al., 2015). Igualmente, CHROMATIN REMODELING 4/ PICKLE RELATED 1 (CHR4/PKR1) es otra proteína tipo CHD3 que también está implicada en la regulación de genes de maduración de la semilla, así como también en la respuesta a estrés abiótico (Sharma et al., 2009). Es posible que alguna de estas proteínas e inclusive otras que presenten un cromodominio puedan estar actuando de forma análoga al proceso en animales que involucra a la marca de H3K4me3 y CHD1 en el proceso de *splicing*.

La regulación de ATX sobre *AGL19* parece no afectar los niveles de acumulación de sus transcritos de forma tan notoria como lo hace la regulación por CLF. Aunque en ambos casos (*clf-29* y *atx1-3*) si se observa una variación en el nivel de expresión de los transcritos de *AGL19*, en *clf-29* (Figura 6B) el efecto es mucho más claro que en *atx1-3* (Figura 7A). Schönrock et al. (2006) demostraron que un complejo de proteínas PcG compuesto por MSI1, EMF2 y CLF regula directamente la expresión de *AGL19* al depositar la marca de represión H3K27me3. Aunque mediante ensayos de ChIP se demostró que en mutantes *clf-29* la marca de H3K27me3 se reduce drásticamente, esta no desaparece completamente del locus de *AGL19*. Existen otras dos metiltransferasas reportadas capaces de metilar la H3K27: SWINGER (SWN) y MEDEA (MEA), aunque existe evidencia de que SWN y CLF actúan de forma redundante (Kim y Sung, 2014). Es posible que estas dos metiltransferasas también puedan modificar

la cromatina de *AGL19*, pero CLF parece ser la principal metiltransferasa encargada de su regulación. En el caso antagónico de la regulación por TrxG, el mutante de ATX1 utilizado (*atx1-3*) no es completamente nulo (Petrone, 2015), se sabe que ATX1 no es la única metiltransferasa encargada de metilar la H3K4 (Alvarez-Venegas et al., 2003) y no existen reportes acerca de la activación transcripcional de *AGL19* por otras proteínas TrxG. En el caso de *FLC* existe evidencia de que su activación está mediada por proteínas TrxG, entre ellas ATX1, así como también SDG8, la cual es una metiltransferasa encargada de dimetilar la H3K36, otra marca de activación transcripcional (Yang et al., 2014).

A diferencia de la metilación de la H3K4 que normalmente se encuentra en la región 5' de los genes, la metilación de la H3K36 se encuentra enriquecida mayoritariamente sobre el cuerpo del gen (Yang et al., 2014; Zhou et al., 2014). El papel de la metilación de la H3K36 en el proceso de SA mediado por la temperatura en plantas fue demostrado por Pajoro et al. (2017) y se sabe que la metilación de la H3K36 sirve como un andamiaje para dos factores de *splicing*, que dependiendo del complejo que se forma, los patrones de *splicing* varían (Kornblihtt et al., 2013; Zhou et al., 2014). Al unirse MRG15, una proteína con un cromodominio, con la H3K36me3, se recluta a una proteína silenciadora del *splicing*, PTB, hacia su RNA blanco, lo cual promueve que un intrón que puede ser incluido en el transcrito sea removido. En un caso antagónico, otra proteína de unión a H3K36me3, Psip1, al unirse promueve la inclusión de intrones al reclutar al factor de *splicing* SRSF1 (Zhou et al., 2014). El proceso anteriormente descrito es un modelo que puede explicar el papel de la metilación de la H3K36 en el

proceso de SA mediante un sistema de adaptadores entre la cromatina y factores de *splicing*.

Otra explicación para el papel de la H3K36 en el SA es el modelo cinético, mediante el cual la H3K36me3 depositada a lo largo del cuerpo del gen puede facilitar el apareamiento de sitios de corte mediante la definición de intrones y exones al modular la tasa de elongación de la RNA Pol II (Zhou et al., 2014). Es posible que los patrones de metilación de la H3K36 puedan tener un mayor peso sobre la regulación de *AGL19*, que los de la H3K4 y los resultados obtenidos por Pajoro et al. (2017) acerca del enriquecimiento de la metilación de la H3K36 sobre genes cuyo SA está influenciado por la temperatura, podría indicar que la regulación de *AGL19*, el cual se induce por vernalización, está más relacionada con el enriquecimiento de la metilación de la H3K36 y no tanto de la H3K4. De forma general, estos resultados sugieren que el enriquecimiento en los niveles de expresión de los transcritos alternativos de *AGL19* se encuentran regulados por procesos similares que el transcrito canónico de este gen, pero pueden existir casos específicos en los cuales los transcritos alternativos presentan una regulación diferencial.

7.2 Regulación post-transcripcional de *AGL19* y sus transcritos alternativos por NMD

En cuanto a las líneas mutantes de UPF1 y ELF9, estas proteínas actúan como reguladores post-transcripcionales del pre-mRNA (Arciga-Reyes et al., 2006; Song et al., 2009). UPF1 es un componente esencial de la vía de NMD que al asociarse al complejo SURF provoca la degradación de transcritos que poseen

CTPs, aunque se ha reportado que esta no es la única característica que podría llevar a un transcrito a ser blanco de esta vía y que algunos transcritos que poseen CTPs escapan la degradación por NMD (Kalyna et al., 2012b, Filichkin et al., 2015). ELF9 es una proteína de unión a RNA que puede participar en la formación de complejos snRNP U2 y que también puede unirse a transcritos que son blanco de degradación por NMD (Song et al., 2009). Por lo tanto, la mayor acumulación de los transcritos de *AGL19* observada en los mutantes es debido a que el pre-mRNA que se genera a partir de la transcripción del gen no está siendo procesado como debería y por lo tanto existe más pre-mRNA que en las líneas silvestres. En todas las amplificaciones se observa una mayor acumulación de los transcritos de *AGL19* en *upf1-5* con respecto a *elf9-2* (Figura 8A, B). Esto puede deberse a las funciones diferenciales entre ambas proteínas: UPF1 es una proteína esencial en la vía de NMD que al asociarse al complejo SURF provoca la degradación de sus transcritos blancos; en cambio ELF9 es una proteína de unión a RNA que se sabe puede estar implicada en el reclutamiento de snRNP U2 del spliceosoma y también puede unirse a transcritos que son degradados por NMD (Song et al., 2009). Mientras que UPF1 es una proteína esencial para el proceso de degradación de transcritos en la vía de NMD *per se*, ELF9 parece ser un componente que provee a la maquinaria de NMD, incluido UPF1, de un cierto grado de especificidad (Song et al., 2009), por lo cual es posible que existan otras proteínas de unión a RNA que cumplan una función similar ELF9 en Arabidopsis.

Cuando se amplifica con los oligonucleótidos F1-R7 (Figura 6B) el cDNA de *AGL19*, se observa que tanto el fragmento que incluye sólo la región codificante

de *AGL19* (684 pb), como aquel fragmento que puede contener el 3er o 6to intrón (~770 pb) presentan una mayor acumulación de sus transcritos en *upf1-5* y *elf9-2* con respecto a la planta silvestre. Comúnmente a la vía de NMD se le asigna un papel como un regulador de transcritos que presentan CTPs, pero se sabe que esta vía también regula la acumulación de transcritos que no presentan CTPs, como sería en este caso el fragmento codificante de *AGL19*. Una característica que puede llevar a un transcrito a ser degradado por NMD es el uso de codones de inicio alternativos abajo del primer AUG, lo cual puede generar una terminación prematura de la traducción (Song et al., 2009). Este fenómeno conocido como *leaky scanning* puede darse utilizando tanto sitios AUG abajo del primer AUG, así como también codones de inicio alternativos diferentes al AUG (Wamboldt et al., 2009). Se realizó un análisis de la secuencia codificante de *AGL19* utilizando el software Translate Tool del portal ExPASy del SIB (<https://web.expasy.org/translate/>) el cual indica que existen al menos tres sitios AUG debajo del primer AUG presente en la secuencia. Teóricamente la utilización de cualquiera de estos codones de inicio alternativos podría causar una terminación prematura de la traducción y es posible que debido a la presencia de estos codones de inicio alternativos el transcrito canónico de *AGL19* también sea un blanco de NMD. Cabe recalcar que el transcrito alternativo de *AGL19* que presenta ambos intrones (3 y 6) es el que presenta una mayor acumulación tanto en *upf1-5* como en *elf9-2* (Figura 8; amplificación F4-R5) y esto igualmente se observa en el caso de la amplificación F3-R5 en la banda de arriba (f) que es la que incluye un fragmento con ambos intrones. También parece que los fragmentos que incluyen solamente al intrón 3 son los que presentan una mayor acumulación

en ambos mutantes, con respecto a aquellos que incluyen solo al intrón 6 (Figura 8B), por lo cual parece existir una regulación diferencial entre los transcritos alternativos de *AGL19*.

Aunque en *upf1-5* y *elf9-2* los transcritos alternativos de *AGL19* se acumulan en mayor medida que en las plantas silvestres, lo mismo que el transcrito canónico, estos no se acumulan al mismo nivel, por lo cual parece existir un procesamiento del pre-mRNA diferencial entre el transcrito canónico y los transcritos alternativos. Interesantemente, algo que se observa en todas las RT-PCRs realizadas, es que en plantas silvestres donde en teoría la transcripción se está llevando a cabo de manera normal y la maquinaria de procesamiento de RNA está funcionando correctamente, también se observa la presencia de transcritos alternativos. Lo que sugiere que estos transcritos alternativos podrían tener un papel en la regulación de la expresión de *AGL19* u otros mensajeros.

7.3. Los transcritos alternativos de *AGL19* y sus posibles funciones

Los transcritos alternativos de *AGL19* encontrados en este trabajo corresponden a tamaños de amplicones que no varían entre las diferentes RT-PCRs, independientemente de si la línea utilizada es un mutante o la planta silvestre, lo que sugiere que los transcritos alternativos observados son resultado de un tipo de SA común a la expresión del gen. Estos eventos de SA corresponden a eventos de retención de intrones y resulta interesante que los intrones adquiridos correspondan únicamente a los intrones 3 y 6, que pueden estar por separado o juntos en un mismo transcrito.

Un transcrito alternativo puede tener diferentes destinos: puede degradarse debido a la presencia de CTPs por la vía de NMD, como se mencionó anteriormente; puede traducirse y producir proteínas truncadas o péptidos, o puede mantenerse como un mensajero no codificante que sirva como andamiaje para unir otras proteínas reguladoras.

Después de realizar un análisis bioinformático traduciendo los transcritos alternativos que incluyen a estos intrones los resultados demostraron que se podrían generar dos tipos de proteínas. La proteína que incluye al intrón 3 o el 3 y el 6 se comportarían de la misma forma ya que el primer CTP que se genera en sus respectivos marcos de lectura se encuentra en la misma posición (327 pb abajo del ATG) y en el caso de la proteína teórica que incluye el intrón 6, el primer CTP se encuentra a 516 pb abajo del ATG (Figura 9A). La proteína truncada en el intrón 3 contendría el dominio MADS de unión al DNA y tentativamente también el dominio I, el cual se sabe participa en procesos de dimerización y formación de complejos de las proteínas MIKC (Smaczniak et al., 2012), por lo que en caso de que se tradujera esta proteína podría actuar como un regulador negativo de la actividad de AGL19 al competir con sus blancos de unión. En el segundo caso de la proteína traducida a partir del transcrito con el intrón 6, esta proteína tendría todos los dominios típicos de un factor de transcripción MADS tipo MIKC^c (MADS, I y K), a excepción del dominio C-terminal. Teóricamente esta proteína podría actuar de manera similar a la proteína con el intrón 3 al competir activamente con los blancos de unión de AGL19, pero también podría actuar como un regulador

negativo al formar complejos multiméricos no funcionales con otras proteínas reguladoras con las que podría estar interactuando AGL19.

También es posible que los transcritos alternativos de *AGL19* si se llegaran a traducir, podrían generar péptidos interferentes pequeños (siPEPs) o microproteínas (miPs). Se sabe que estos siPEPs y miPs pueden actuar como reguladores negativos al competir con sus factores transcripción o con otras proteínas (Staudt y Wenkel, 2011; Seo et al., 2013), aunque también existe la posibilidad de que estos péptidos no tengan un efecto inhibitorio (Eguen et al., 2015). Igualmente se sabe que muchos de estos péptidos generados a partir del locus de un factor de transcripción pueden carecer de sus dominios de dimerización y/o de unión a DNA, lo cual puede dar indicios de las funciones reguladoras de estos péptidos (Seo et al., 2013). Se sabe que estos miPs y siPEPS pueden ser generados a partir de una secuencia genómica, pero también es posible que pueden ser generados por un evento de SA (Graeff y Wenkel, 2012). Un análisis de los parámetros de las proteínas teóricas utilizando el software ProtParam del portal ExPASy del SIB (<https://web.expasy.org/protparam/>) muestra que la proteína traducida a partir del transcrito con el 3er intrón tendría un tamaño de aproximadamente 13 kDa y la proteína traducida a partir del transcrito con el 6to intrón sería de 20 kDa, aproximadamente. Eguen et al. (2015) definen a las miPs y siPEPs como péptidos relativamente pequeños de 7-20 kDa y que deben tener una función regulatoria inhibitoria sobre su blanco, así como también pueden presentar un fenotipo dominante negativo, por lo cual estas proteínas

teóricas entrarían dentro del rango de este tipo de péptidos, si es que en efecto se llegaran a traducir y fueran estables.

Otro posible papel para estos transcritos es que actuaran como RNAs no codificantes (ncRNAs) y que estos auto-regularan la expresión de *AGL19*, tal como sucede con *FLC* (Ariel et al., 2015). En *FLC* se conoce el papel de dos transcritos no codificantes: COLDAIR un lncRNA, COOLAIR un conjunto de transcritos naturales en anti sentido (NATs) y recientemente se describió un tercer transcrito no codificante que también participa en la regulación de *FLC*, denominado COLDWRAP (Kim y Sung, 2017). COLDAIR actúa al reclutar a proteínas PcG para reprimir a *FLC* durante el proceso de vernalización (Rinn y Chang, 2012) y COLDWRAP mantiene esta represión sobre el promotor de *FLC* al promover la formación de asas de cromatina represivas (Kim y Sung, 2017). COOLAIR promueve el intercambio de la marca de activación transcripcional H3K36me por H3K27me3 en los sitios de nucleación de la represión de *FLC*, durante el proceso de vernalización, promoviendo la represión de *FLC* (Csorba et al., 2014).

En este momento no podemos asignarles un papel específico a los transcritos alternativos de *AGL19* en la regulación de este mismo u otros genes. Sin embargo, existe la posibilidad de que la estabilización de estos transcritos observada en dos de los mutantes por inserción de T-DNA de *AGL19* (*agl19-1* y *agl19-2*; Cruz-Sánchez et al., sin publicar) los cuales no son nulos para el mensajero completo, como si lo es el alelo *agl19-3*, sea la razón por la cual en los 3 alelos se observe el mismo fenotipo de floración tardía, ya sea porque los

transcritos están actuando como transcritos no codificantes o como proteínas interferentes.

7.4. El promotor no se restringe a la región intergénica 5' arriba del inicio de la transcripción de *AGL19*

En ninguna de las etapas de desarrollo y condiciones de crecimiento en las cuales se realizaron los ensayos de GUS se logró detectar expresión de *AGL19::GUS* en la parte aérea. Sin embargo, el RT-PCR confirmó la presencia del mensajero de *AGL19* en esta para ambas líneas reporteras (Figura 10). Esto nos indica que la secuencia intergénica 5' más el primer intrón no son suficientes para recuperar la expresión en la parte aérea de la planta. A partir de este dato se puede inferir que la expresión de *AGL19* en la parte aérea depende de otras regiones genómicas presentes en *cis* o en *trans* que no se encuentran dentro de las construcciones utilizadas.

Sin embargo ambas líneas dieron señal en la raíz. En las Figuras 11 y 12 se observa que el patrón de expresión de *AGL19::GUS* varía respecto a la etapa de desarrollo de la planta en ambas construcciones utilizadas. Durante los primeros días de desarrollo (3-8 dps) *AGL19* aumenta su expresión para luego decaer y apagarse en la raíz principal, mientras que en las raíces laterales (que son más jóvenes) no llega a decaer su expresión. De forma interesante, la línea que contiene esencialmente el primer intrón, *AGL19_{int}::GUS*, tiene una expresión más fuerte que la construcción *AGL19_{prom+int}::GUS* (Figura 11), por lo que es posible que la región intergénica contenga secuencias reguladoras que reprimen la

expresión de *AGL19::GUS*. Otro resultado que arrojan estas construcciones es que aún sin la presencia de la región intergénica de *AGL19* (el posible promotor) se logra detectar expresión de *GUS*. A partir de este resultado se puede inferir que el primer intrón puede funcionar como una región reguladora similar a un promotor. Se tienen reportes de que la mayoría de los factores de transcripción MADS-box tipo MICK^C presentan al menos un intrón mayor a 500 pb, a excepción de *APETALA3* y *AGL15*. El papel en la regulación de los primeros intrones de esta familia de factores transcripcionales no se conoce completamente, pero los estudios de *FLC* y *AGL11*, así como de *AG* (en este caso el segundo intrón) indican que son importantes para su activación (Schauer et al., 2009). Por lo tanto, como se sabe que también participan en su represión epigenética, será importante en el futuro conocer mas a profundidad su participación en la regulación de los MADS-box.

7.5. Existen motivos conservados entre el primer intrón y la zona intergénica de *AGL19*

Con base en los resultados de las construcciones de *AGL19::GUS* se realizó un análisis de posibles secuencias reguladoras dentro de la zona intergénica y el primer intrón de *AGL19* utilizando la herramienta de *Gene Analysis* del portal AthaMap (http://www.athamap.de/search_gene.php) para saber si dichas secuencias reguladoras pudieran influir en los patrones de expresión diferenciales de *AGL19::GUS* entre las dos construcciones utilizadas. Se encontró la presencia de posibles sitios de unión para 26 diferentes familias de factores transcripcionales tanto en la zona intergénica 5' como en el 1er intrón. Dentro de los factores de

transcripción que se encontraron que podrían estar involucrados en la regulación de *AGL19*, se encuentran los SPL los cuales están involucrados en la vía de transición a la floración por desarrollo (Wang et al., 2009), así como también WRKY12, un factor transcripcional de la familia WRKY(zn), el cual se ha demostrado que está involucrado en la transición a la floración en condiciones de SD (Li et al., 2016). Cabe mencionar que la transición a la floración no es la única función que puede tener *AGL19* y de hecho hibridaciones *in situ*, muestran que *AGL19* se expresa también en primordios de estambres y carpelos (comunicación personal Berenice García).

Schönrock et al. (2006) demostraron que hay secuencias en la zona intergénica 5' de *AGL19* y particularmente al inicio del intrón 1 sujetas a regulación epigenética por PcG. Interesantemente, 13 de las 26 familias de factores transcripcionales que se encontraron que poseían sitios de unión putativos en la zona intergénica y primer intrón de *AGL19*, coinciden con las familias de factores transcripcionales descritas por Xiao et al. (2017), que interactúan con secuencias reguladoras conocidas como *Polycomb Response Elements* (PREs) en *Arabidopsis* (Tabla 3). Los PREs son secuencias reguladoras a las cuales se unen factores transcripcionales que reclutan componentes de PcG (Xiao et al., 2017). Por lo que un importante número de familias de factores transcripcionales podrían estar participando en la represión de *AGL19*, los cuales se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Factores de transcripción unidos a PREs en *AGL19* que interactúan con las proteínas PcG FIE, MSI1, VRN2, EMF2, CLF y SWN (Modificado de Xiao et al., 2017).

Familia de FTs que interactúan con PRC2
C2H2 Zinc Finger
ARR
SBP
NAC
bZIP
LOB/AS2
C2C2-DOF
WRKY
MYB

Como se observa en las fig 11 y 12, la construcción que contiene la región intergénica, se expresa en menor medida que la que lleva casi exclusivamente el primer intrón. Con base en los datos obtenidos de la búsqueda de sitios de unión de factores transcripcionales sobre la zona intergénica de *AGL19* y tomando en cuenta lo reportado por Xiao et al. (2017), los factores de transcripción que se unen a la zona intergénica correspondientes a WRKY12, y un factor transcripcional no identificado tipo TCP, pudieran estar reprimiendo la expresión del reportero ya que estas familias no se unen al primer intrón.

8. Conclusiones y Perspectivas

- La acumulación de los transcritos alternativos de *AGL19* está asociada a los mismos mecanismos epigenéticos que regulan la expresión del mensajero canónico.
- Los eventos de SA observados en *AGL19* son de retención de intrones y los intrones incluidos son el 3er y 6to intrón.

- Los transcritos alternativos *AGL19* son blancos preferenciales de la regulación por la vía de NMD con respecto al mensajero codificante y UPF1 los regula más fuertemente que ELF9.
- La expresión de *AGL19* en la raíz es transitoria teniendo un pico de expresión a los 8 dps con base en la expresión de *AGL19int::GUS* .
- Se requieren de secuencias reguladoras adicionales a la región intergénica 5' y el primer intrón para que se pueda expresar *AGL19* en la parte aérea de la planta.
- El primer intrón de *AGL19* funciona como promotor y es suficiente para que el gen se exprese en la punta de las raíces.
- Existen posibles PREs en la región intergénica y el primer intrón de *AGL19* a los que se pueden asociar factores transcripcionales que podrían reclutar al complejo PcG

Un punto importante que destacar de este trabajo es que sólo se analizaron los transcritos generados en el mismo sentido que *AGL19*, por lo cual sería interesante estudiar los mensajeros antisentido que pudieran ser generados a partir del locus de *AGL19*. Igualmente, para identificar cuáles secuencias específicas se encuentran incluidas en los transcritos alternativos observados mediante RT-PCR es necesario secuenciarlos. Para conocer el posible efecto que tienen los transcritos alternativos de *AGL19* en el desarrollo de las plantas, se podrían sobreexpresar estos cDNAs.

9. Referencias

- Adams, S., & Carré, I. A. (2011). Downstream of the plant circadian clock: output pathways for the control of physiology and development. *Essays in Biochemistry*, 49(1), 53–69. <https://doi.org/10.1042/bse0490053>
- Alexandre, C. M., & Hennig, L. (2008). FLC or not FLC: The other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1127–1135. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern070>
- Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, Á., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., ... Sánchez-Corrales, Y. E. (2010). Flower Development. In *The Arabidopsis Book - American Society of Plant Biologists* (Vol. 8, pp. 1–57). <https://doi.org/10.1199/tab.0127>
- Alvarez-buylla, E. R., Corvera-poiré, A., Garay-arroyo, A., García-ponce, B., Jaimes-miranda, F., & Pérez-ruiz, R. V. (2011). 9 . A MADS view of plant development and evolution. In *Cell Differentiation* (Vol. 661, pp. 181–220).
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., ... Yanofsky, M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: Expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant Journal*, 24(4), 457–466. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00891.x>
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., & Avramova, Z. (2003). ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Current Biology*, 13(8), 627–637. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00243-4)
- Amasino, R. M., & Michaels, S. D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*, 154(2), 516–520. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161653>
- Amor, B. Ben, Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., D'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., ... Crespi, M. (2009). Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses. *Genome Research*, 19(1), 57–69. <https://doi.org/10.1101/gr.080275.108>
- Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M., & Davies, B. (2006). UPF1 is required for nonsense-

- mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *Plant Journal*, 47(3), 480–489.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02802.x>
- Ariel, F., Romero-Barrios, N., Jégu, T., Benhamed, M., & Crespi, M. (2015). Battles and hijacks: Noncoding transcription in plants. *Trends in Plant Science*, 20(6), 362–371.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.003>
- Barbazuk, W. B., Fu, Y., & McGinnis, K. M. (2008). Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: Opportunities and challenges. *Genome Research*, 18(9), 1381–1392.
<https://doi.org/10.1101/gr.053678.106>
- Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C. G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., ... Crespi, M. (2014). Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 30(2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017>
- Baulcombe, D. C., & Dean, C. (2014). Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(9), a019471. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019471>
- Bäurle, I., & Dean, C. (2008). Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of arabidopsis targets. *PLoS ONE*, 3(7), e2733.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002733>
- Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A. M., Graveley, B. R., & Blencowe, B. J. (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*, 152(6), 1252–1269.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.034>
- Brogna, S., & Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(2), 107–113. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1550>
- Brown, S. A., Kowalska, E., & Dallmann, R. (2012). (Re)inventing the Circadian Feedback Loop. *Developmental Cell*, 22(3), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.007>
- Brown, S. J., Stoilov, P., & Xing, Y. (2012). Chromatin and epigenetic regulation of pre-mrna processing. *Human Molecular Genetics*, 21(R1), R90–R96.

<https://doi.org/10.1093/hmg/dds353>

- Campalans, A., Kondorosi, A., & Crespi, M. (2004). Enod40, a short open reading frame-containing mRNA, induces cytoplasmic localization of a nuclear RNA binding protein in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, *16*(4), 1047–59. <https://doi.org/10.1105/tpc.019406>
- Chamala, S., Feng, G., Chavarro, C., & Barbazuk, W. B. (2015). Genome-wide identification of evolutionarily conserved alternative splicing events in flowering plants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*, 33. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00033>
- Chen, X., Huang, H., & Xu, L. (2013). The CaMV 35S enhancer has a function to change the histone modification state at insertion loci in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, *126*(6), 841–846. <https://doi.org/10.1007/s10265-013-0580-4>
- Cheng, J. Z., Zhou, Y. P., Lv, T. X., Xie, C. P., & Tian, C. E. (2017). Research progress on the autonomous flowering time pathway in *Arabidopsis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *23*(3), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0458-3>
- Choi, K., Kim, J., Hwang, H. J., Kim, S. Y., Park, C., Kim, S. Y., & Lee, I. (2011). The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. *Plant Cell*, *23*(1), 289–303. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075911>
- Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(45), 16160–16165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>
- de Almeida, S. F., & Carmo-Fonseca, M. (2008). The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. *FEBS Letters*, *582*(14), 1971–1976. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.019>
- Drechsel, G., Kahles, A., Kesarwani, A. K., Stauffer, E., Behr, J., Drewe, P., ... Wachter, A. (2013).

- Nonsense-Mediated Decay of Alternative Precursor mRNA Splicing Variants Is a Major Determinant of the Arabidopsis Steady State Transcriptome. *The Plant Cell*, 25(10), 3726–3742. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115485>
- Eguen, T., Straub, D., Graeff, M., & Wenkel, S. (2015). MicroProteins: Small size - big impact. *Trends in Plant Science*, 20(8), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.05.011>
- Filichkin, S. A., Cumbie, J. S., Dharmawardhana, P., Jaiswal, P., Chang, J. H., Palusa, S. G., ... Mockler, T. C. (2015). Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 8(2), 207–227. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.011>
- Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., ... Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Genome Research*, 20(1), 45–58. <https://doi.org/10.1101/gr.093302.109>
- Filichkin, S., Priest, H. D., Megraw, M., & Mockler, T. C. (2015). Alternative splicing in plants: Directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.02.008>
- Fornara, F., de Montaigu, A., & Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of flowering in arabidopsis. *Cell*, 141(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.024>
- Fornara, F., Panigrahi, K. C. S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J. A., & Coupland, G. (2009). Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. *Developmental Cell*, 17(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.015>
- Graeff, M., & Wenkel, S. (2012). Regulation of protein function by interfering protein species. *Biomolecular Concepts*, 3(1), 71–78. <https://doi.org/10.1515/bmc.2011.053>
- He, C., Huang, H., & Xu, L. (2013). Mechanisms guiding Polycomb activities during gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 4, 454.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00454>

Henderson, I. R., & Dean, C. (2004). Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. *Development (Cambridge, England)*, *131*(16), 3829–38. <https://doi.org/10.1242/dev.01294>

Heo, J. B., & Sung, S. (2010). Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science*, *76*(2011), 10.1126/science.1197349. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>

Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., & Staněk, D. (2011). Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS ONE*, *6*(2), e16727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016727>

Hornyik, C., Duc, C., Rataj, K., Terzi, L. C., & Simpson, G. G. (2010). Alternative polyadenylation of antisense RNAs and flowering time control. *Biochemical Society Transactions*, *38*(4), 1077–1081. <https://doi.org/10.1042/BST0381077>

Howe, K. J. (2002). RNA polymerase II conducts a symphony of pre-mRNA processing activities. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1577*(2), 308–324. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00460-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00460-8)

Hu, X., Kong, X., Wang, C., Ma, L., Zhao, J., Wei, J., ... Yang, Y. (2014). Proteasome-Mediated Degradation of FRIGIDA Modulates Flowering Time in Arabidopsis during Vernalization. *The Plant Cell*, *26*(December), 1–20. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132738>

Hug, N., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2015). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research*, *44*(4), 1483–1495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw010>

Ietswaart, R., Wu, Z., & Dean, C. (2012). Flowering time control: Another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends in Genetics*, *28*(9), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.06.002>

James, A. B., Syed, N. H., Bordage, S., Marshall, J., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., ... Nimmo, H. G.

- (2012). Alternative Splicing Mediates Responses of the Arabidopsis Circadian Clock to Temperature Changes. *The Plant Cell*, 24(3), 961–981. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093948>
- Jeong, H. L., Seong, J. Y., Soo, H. P., Hwang, I., Jong, S. L., & Ji, H. A. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes and Development*, 21(4), 397–402. <https://doi.org/10.1101/gad.1518407>
- Jones, M. A., Williams, B. A., McNicol, J., Simpson, C. G., Brown, J. W. S., & Harmer, S. L. (2012). Mutation of Arabidopsis *SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1* Causes Circadian Clock Defects. *The Plant Cell*, 24(10), 4066–4082. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104828>
- Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., ... Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2454–2469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr932>
- Kang, M. J., Jin, H. S., Noh, Y. S., & Noh, B. (2015). Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the HDA9-AGL19-FT module in Arabidopsis. *New Phytologist*, 206(1), 281–294. <https://doi.org/10.1111/nph.13161>
- Kerényi, F., Wawer, I., Sikorski, P. J., Kufel, J., & Silhavy, D. (2013). Phosphorylation of the N- and C-terminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay. *The Plant Journal*, 76(5), 836–848. <https://doi.org/10.1111/tpj.12346>
- Kerényi, Z., Mérai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., ... Silhavy, D. (2008). Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO Journal*, 27(11), 1585–95. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.88>
- Kim, D. H., & Sung, S. (2014). Polycomb-mediated gene silencing in Arabidopsis thaliana. *Mol Cells*, 37(12), 841–850. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0249>
- Kim, D. H., & Sung, S. (2017). Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by

- Long Noncoding RNAs. *Developmental Cell*, 40(3), 302–312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.021>
- Kim, S., Choi, K., Park, C., Hwang, H.-J., & Lee, I. (2006). SUPPRESSOR OF FRIGIDA4, encoding a C2H2-Type zinc finger protein, represses flowering by transcriptional activation of Arabidopsis FLOWERING LOCUS C. *The Plant Cell*, 18(11), 2985–98. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045179>
- Kim, W., Latrasse, D., Servet, C., & Zhou, D. X. (2013). Arabidopsis histone deacetylase HDA9 regulates flowering time through repression of AGL19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2), 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.102>
- Kornblihtt, A. R. (2014). A Long Noncoding Way to Alternative Splicing in Plant Development. *Developmental Cell*, 30(2), 117–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.07.010>
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(3), 153–65. <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Kwon, Y. J., Park, M. J., Kim, S. G., Baldwin, I. T., & Park, C. M. (2014). Alternative splicing and nonsense-mediated decay of circadian clock genes under environmental stress conditions in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-136>
- Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, (March), 1–33. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Li, W., Wang, H., & Yu, D. (2016). Arabidopsis WRKY Transcription Factors WRKY12 and WRKY13 Oppositely Regulate Flowering under Short-Day Conditions. *Molecular Plant*, 9(11), 1492–1503. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.08.003>
- Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swiezewski, S., & Dean, C. (2007). The Arabidopsis RNA-Binding Protein FCA Requires a Lysine-Specific Demethylase 1 Homolog to

- Downregulate FLC. *Molecular Cell*, 28(3), 398–407.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.018>
- Lorković, Z. J., Wieczorek Kirk, D. A., Lambermon, M. H. L., & Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science*, 5(4), 160–167.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01595-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01595-8)
- Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., & Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.056>
- Luco, R. F., & Misteli, T. (2011). More than a splicing code: Integrating the role of RNA, chromatin and non-coding RNA in alternative splicing regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(4), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.03.004>
- Luco, R., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B., Pereira-Smith, O., & Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 996–1000. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1184208>
- Marquardt, S., Raitskin, O., Wu, Z., Liu, F., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Functional Consequences of Splicing of the Antisense Transcript COOLAIR on FLC Transcription. *Molecular Cell*, 54(1), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.026>
- Marquez, Y., Brown, J. W. S., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, 22(6), 1184–1195. <https://doi.org/10.1101/gr.134106.111>
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Mockler, T. C., Yu, X., Shalitin, D., Parikh, D., Michael, T. P., Liou, J., ... Lin, C. (2004). Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain proteins. *Pnas*, 101(34), 12759–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404552101>
- Mutasa-Göttgens, E., & Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks.

Journal of Experimental Botany, 60(7), 1979–1989. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp040>

- Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G., & Kornblihtt, A. R. (2015). Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 165–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>
- Niu, L., Lu, F., Pei, Y., Liu, C., & Cao, X. (2007). Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. *EMBO Reports*, 8(12), 1190–1195. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401111>
- Nyikó, T., Sonkoly, B., Mérai, Z., Benkovics, A. H., & Silhavy, D. (2009). Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Molecular Biology*, 71(4–5), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9528-4>
- Pajoro, A., Severing, E., Angenent, G. C., & Immink, R. G. H. (2017). Histone H3 lysine 36 methylation affects temperature-induced alternative splicing and flowering in plants. *Genome Biology*, 18(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1235-x>
- Pérez-Ruiz, R. V., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., Ugartechea-Chirino, Y., Villajuana-Bonequi, M., De Folter, S., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2015). XAANTAL2 (AGL14) is an important component of the complex gene regulatory network that underlies arabidopsis shoot apical meristem transitions. *Molecular Plant*, 8(5), 796–813. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.017>
- Pien, S., Fleury, D., Mylne, J. S., Crevillen, P., Inzé, D., Avramova, Z., ... Grossniklaus, U. (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *The Plant Cell*, 20(3), 580–588. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058172>
- Pien, S., & Grossniklaus, U. (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769(5–6), 375–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.01.010>

- Reddy, A. S. N., Marquez, Y., Kalyna, M., & Barta, A. (2013). Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. *Plant Cell*, 25(October), 3657–3683. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117523>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
- Ripoll, J. J., Rodríguez-Cazorla, E., González-Reig, S., Andújar, A., Alonso-Cantabrana, H., Perez-Amador, M. A., ... Vera, A. (2009). Antagonistic interactions between Arabidopsis K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C. *Developmental Biology*, 333(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.035>
- Romanowski, A., & Yanovsky, M. J. (2015). Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 437. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00437>
- Sanchez, S. E., Petrillo, E., Beckwith, E. J., Zhang, X., Rugnone, M. L., Hernando, C. E., ... Yanovsky, M. J. (2010). A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature*, 468(7320), 112–6. <https://doi.org/10.1038/nature09470>
- Schauer, S. E., Schlüter, P. M., Baskar, R., Gheyselinck, J., Bolaños, A., Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2009). Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of agamous-like6 subfamily members in arabidopsis. *Plant Journal*, 59(6), 987–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03928.x>
- Schöning, J. C., Streitner, C., Meyer, I. M., Gao, Y., & Staiger, D. (2008). Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 36(22), 6977–6987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn847>
- Schönrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Köhler, C., Grisse, W., & Hennig, L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes and Development*, 20(12), 1667–1678.

<https://doi.org/10.1101/gad.377206>

- Schwartz, S., & Ast, G. (2010). Chromatin density and splicing destiny: On the cross-talk between chromatin structure and splicing. *EMBO Journal*, 29(10), 1629–1636. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.71>
- Schwartz, S., Meshorer, E., & Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(9), 990–995. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1659>
- Seo, P. J., Hong, S. Y., Kim, S. G., & Park, C. M. (2011). Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends in Plant Science*, 16(10), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.001>
- Seo, P. J., Park, M. J., & Park, C. M. (2013). Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: Mechanisms and functions. *Planta*, 237(6), 1415–1424. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1882-4>
- Severing, E. I., van Dijk, A. D. J., Morabito, G., Busscher-Lange, J., Immink, R. G. H., & van Ham, R. C. H. J. (2012). Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030524>
- Shafiq, S., Berr, A., & Shen, W. H. (2014). Combinatorial functions of diverse histone methylations in *Arabidopsis thaliana* flowering time regulation. *New Phytologist*, 201(1), 312–322. <https://doi.org/10.1111/nph.12493>
- Shen, Y., Devic, M., Lepiniec, L., & Zhou, D. X. (2015). Chromodomain, Helicase and DNA-binding CHD1 protein, CHR5, are involved in establishing active chromatin state of seed maturation genes. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 811–820. <https://doi.org/10.1111/pbi.12315>
- Shukla, G. C., & Padgett, R. a. (1999). Conservation of functional features of U6atac and U12 snRNAs between vertebrates and higher plants. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(4), 525–538. <https://doi.org/10.1017/S1355838299982213>
- Sims, R. J., Millhouse, S., Chen, C. F., Lewis, B. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ...

- Reinberg, D. (2007). Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 28(4), 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.010>
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., & Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139(17), 3081–3098. <https://doi.org/10.1242/dev.074674>
- Solyomosy, F., & Pollák, T. (1993). Uridylate-Rich Small Nuclear RNAs (UsnRNAs), Their Genes and Pseudogenes, and UsnRNPs in Plants: Structure and Function. A Comparative Approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12(4), 275–369. <https://doi.org/10.1080/07352689309701904>
- Song, H.-R., Song, J.-D., Cho, J.-N., Amasino, R. M., Noh, B., & Noh, Y.-S. (2009). The RNA Binding Protein ELF9 Directly Reduces SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 Transcript Levels in Arabidopsis, Possibly via Nonsense-Mediated mRNA Decay. *The Plant Cell*, 21(4), 1195–1211. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064774>
- Song, J., Irwin, J., & Dean, C. (2013). Remembering the prolonged cold of winter. *Current Biology*, 23(17), R807–R811. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.027>
- Srikanth, A., & Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2013–2037. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>
- Staiger, D., & Brown, J. W. S. (2013). Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell*, 25(10), 3640–3656. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113803>
- Staudt, A.-C., & Wenkel, S. (2011). Regulation of protein function by “microProteins.” *EMBO Reports*, 12(1), 35–42. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.196>
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature*, 462(7274), 799–802.

<https://doi.org/10.1038/nature08618>

- Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., & Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends in Plant Science*, 17(10), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.001>
- Tran, M. K., Schultz, C. J., & Baumann, U. (2008). Conserved upstream open reading frames in higher plants. *BMC Genomics*, 9(1), 361. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-361>
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., ... Schmid, M. (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704–707. <https://doi.org/10.1126/science.1230406>
- Wamboldt, Y., Mohammed, S., Elowsky, C., Wittgren, C., de Paula, W. B. M., & Mackenzie, S. A. (2009). Participation of Leaky Ribosome Scanning in Protein Dual Targeting by Alternative Translation Initiation in Higher Plants. *The Plant Cell Online*, 21(1), 157–167. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063644>
- Wang, J. W., Czech, B., & Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>
- Wang, X., & Ma, L. (2013). Unraveling the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(2), e23014. <https://doi.org/10.4161/psb.23014>
- Wang, X., Wu, F., Xie, Q., Wang, H., Wang, Y., Yue, Y., ... Ma, L. (2012). SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(8), 3278–3295. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100081>
- Xiao, J., Jin, R., Yu, X., Shen, M., Wagner, J. D., Pai, A., ... Wagner, D. (2017). Cis and trans determinants of epigenetic silencing by Polycomb repressive complex 2 in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, 49(10), 1546–1552. <https://doi.org/10.1038/ng.3937>
- Xing, D., Zhao, H., Xu, R., & Li, Q. Q. (2008). *Arabidopsis* PCFS4, a homologue of yeast

polyadenylation factor Pcf11p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time. *Plant Journal*, 54(5), 899–910. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03455.x>

Yang, H., Howard, M., & Dean, C. (2014). Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at Arabidopsis FLC. *Current Biology*, 24(15), 1793–1797. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.047>

Zhang, X.-N., & Mount, S. M. (2009). Two Alternatively Spliced Isoforms of the Arabidopsis SR45 Protein Have Distinct Roles during Normal Plant Development. *Plant Physiology*, 150(3), 1450–1458. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138180>

Zhou, H. L., Luo, G., Wise, J. A., & Lou, H. (2014). Regulation of alternative splicing by local histone modifications: Potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 701–713. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt875>