



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ARNs no codificantes con interacción a
fosfoinositidos**

Tesis que presenta

Irma Angélica Jiménez Ramírez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

AÑO 2021

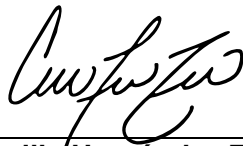
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Irma Angélica Jiménez Ramírez** titulado “**ARNs no codificantes con interacción a fosfoinosítidos**” fue realizado en el laboratorio de 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Enrique Castaño de la Serna**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 de enero de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Irma Angelica Jiménez Ramírez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y biología molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Estudio funcional de la Fibrilarina en la progresión viral en plantas 1572 en el que participaste bajo la dirección del Enrique Castaño de la Serna.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo, confianza, amor y comprensión dada durante los últimos 26 años. Agradezco a ustedes por alentarme a seguir lo que me gusta, sin ustedes esto no hubiese sido posible.

A mi hermana por la confianza, el cariño y la comprensión durante todo este tiempo.

A mis amigas Yedani y Sandra que a pesar de la distancia y el tiempo no hemos dejado de ser buenas amigas.

Al CICY por la oportunidad de cursar la maestría en sus instalaciones, en especial a mi asesor, el Dr. Enrique Castaño de Serna, por sus sabios consejos, la paciencia y hospitalidad dada durante estos años; a la Dra Ileana Echeverria Machado por los consejos y el apoyo dado durante la realización de la tesis; al Dr Alejandro Pereira Santana por sus consejos y su experiencia dados durante estos dos años.

Agradezco a el Dr Víctor Manuel Aguilar Hernández por las observaciones dadas en esta tesis.

Al Dr Luis Joel Figueroa Yáñez, que formo parte del comité revisor y dedico tiempo a la revisión de esta tesis.

A Wilma por el apoyo técnico y la amistad brindada durante los últimos dos años como estudiante de posgrado.

A mis compañeros del Laboratorio 23, Andrea, Stefano y Francisco, por el apoyo y los consejos dados durante este tiempo.

A Miguel Ángel Uc Chuc por los consejos académicos, el apoyo, la confianza y más que nada la paciencia.

Al CONACYT por la beca otorgada número 948285

DEDICATORIAS

Dedico la tesis y el trabajo realizado durante estos dos años a mi familia por el apoyo incondicional.

A mi mamá María Alejandra y a mi papá Candelario que siempre están conmigo en las buenas y en las malas que me han apoyado, creído y confiado en mí.

A mi única hermana Elizabeth Jiménez por el apoyo y la confianza puesta en mí.

A Miguel Uc por ser un gran amigo y cómplice durante este tiempo. Gracias por creer en mí.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE CUADROS	VIII
ABREVIATURAS	XI
Resumen	1
Abstract	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 NUCLÉOLO.....	5
1.1.1 ORGANIZACIÓN NUCLEOLAR.....	5
1.2 MOTAS NUCLEARES.....	6
1.3 ARN NO CODIFICANTE	8
1.4. ARN LARGO NO CODIFICANTE	9
1.4.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS ARN LARGOS NO CODIFICANTES	9
1.4.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS ARNs LARGOS NO CODIFICANTES.....	11
1.4.3 PREDICCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE ARN <i>IN SILICO</i>	11
1.4.4 BASE DE DATOS DE LOS ARNs LARGOS NO CODIFICANTES.....	11
1.4.5 CLASIFICACIÓN DE LOS ARNs LARGOS NO CODIFICANTES	14
1.5 ARN NUCLEOLAR PEQUEÑO.....	15

1.5.1 ARN NUCLEOLAR PEQUEÑO 11	17
1.5.2 ARN NUCLEOLAR PEQUEÑO 63	17
1.6 FOSFATIDILINOSITOL.....	18
1.6.1 FUNCIÓN DEL FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO (PTDLNS(4,5)P ₂) EN MEMBRANAS CELULARES.....	21
1.6.2 FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO EN EL NÚCLEO CELULAR	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
CAPÍTULO II	25
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	25
2.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	25
2.3 OBTENCIÓN DE ADNC	25
2.4 AMPLIFICACIÓN DE LAS SNR11 Y SNR63 DE LEVADURA.....	25
2.5 CLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS SNR11 Y SNR63	26
2.6 ENSAYO DE INTERACCIÓN ARN-PIP2 MEDIANTE PULL-DOWN DE LAS SECUENCIAS SNR11 Y SNR63.....	27
CAPÍTULO III	28
3 RESULTADOS	28

3.1 ANÁLISIS DE LA LIBRERÍA DEL RNA-SEQ DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	28
3.2 SIMILITUD DE SECUENCIAS SNR11 Y SNR63 EN DIVERSAS ESPECIES.	29
3.3 POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE LAS SECUENCIAS SNR11, SNR63 CON PTDINS(4,5)P2	32
3.4 AMPLIFICACIÓN DE SNR11 Y SNR63	34
3.5 CLONACIÓN DE LAS SECUENCIAS SNR11 Y SNR63 EN EL VECTOR PGEM-T EASY	34
3.6 INTERACCIÓN DE LOS ARNS CON EL FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO MEDIANTE ENSAYOS DE PULL-DOWN	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	41
PERPECTIVAS	42
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXOS	48
LISTADO DE FIGURAS	
Figura 1.1.1 Organización estructural de los nucleolos en células animales y vegetales. .	6
Figura 1.3. Esquema general de la diferencia ente ARNs no codificantes largos y cortos.	8
Figura 1.4.1.. Procesos biológicos de los LncRNAs.	11
Tabla 1.4.4. <i>Principales bases de Datos de lncRNA</i>	13
Figura 1.4.5. Esquema general de la biogénesis de los lncRNAs.....	14
Figura 1.5. Modificaciones de pre-ARNr.....	16
Figura 1.5.1 Esquema de la pseudouridilación guiada por snR11 de caja H / ACA.....	17
Figura 1.5.2. Esquema de la metilación guiada por snR63 de caja C / D.	18

Figura 1.6. Estructura del fosfatidilinositol.....	19
Figura 1.6a. Ruta de fosforilaciones y desfosforilaciones del fosfatidilinositol.	19
Figura 1.6b. Distribución celular de los fosfoinositidos presentes en varios organelos....	20
Figura 1.6.1. Estructura química de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns-4,5-P ₂).	21
Figura 1.6.2. Islotes lipídicos nucleares (NLIs).....	22
Figura 3.2. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de snoRNA.	31
Figura 3.2a. Árbol filogenético de snoRNA. I turquesa señala a <i>C. elegans</i>	32
Figura 3.3. Posible sitio de unión de snR11 y snR63 con fosfatidilinositol.....	33
Figura 3.3a. Posibles sitios de unión de snoRNAs de diferentes especies con el fosfatidilinositol.	34
Figura 3.4. Extracción de ARN de levadura y amplificación de las secuencias snoR11 y snR63.....	35
Figura 3.5a. Clonación de la secuencia snR63 en el vector pGEM-T easy.	36
Figura 3.5b. Clonación de la secuencia snR11 en el vector pGEM-T easy.	37
Figura 3.6. Interacción entre Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato con snR11 y snR63 mediante ensayos de pull-down <i>in vitro</i>	38

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.4. Condiciones de temperatura para la reacción en cadena de polimerasa.. ...	26
Cuadro 3.1. ARNs largos (>200) expresados diferencialmente.	28
Cuadro3.1a. Descripción de los ARNs largos (>200) expresados diferencialmente.	29

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
ARN pol	ARN polimerasa
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
FC	Centro fibrilar
GC	Componente granular
lncRNA	ARN largo no codificante
miRNA	Micro ARN
ncRNA	ARN no codificante
NOR	Región organizadora nucleolar
NoV	Vacuola nucleolar
nt	Nucleótidos
piRNA	ARN asociados a piwi
PtdIns	Fosfatidilinositol
PtdIns (1,3,4)	Fosfatidilinositol 1,3,4-trisfosfato
PtdIns (3)	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PtdIns (3,4)	Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato
PtdIns (4)	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PtdIns (4,5)	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
siRNA	ARN pequeño de interferencia
snRNA	ARN nuclear pequeño

Resumen

El nucléolo es una estructura compleja, donde se lleva a cabo la síntesis del ADNr. Dentro de estas estructuras, se encuentran los ARN pequeños nucleolares (snoRNA) que tienen la función de metilar el grupo 2' hidroxilo de la ribosa del ADNr o de realizar la conversión de uridina en pseudouridina (pseudouridilación). Los snoRNA son moléculas de ARN que varían su longitud, que pueden ir desde 60 a 300 nt, inclusive existen mayores a los 500 nucleótidos de longitud, estas moléculas forman parte de los ARN no codificantes, es decir, que son transcritos que no serán traducidos a proteínas. Los ARN largos no codificantes son moléculas de ARN mayor a 200 nt de longitud y que no tiene como producto proteína, sin embargo, a pesar de que no son proteínas cumplen un rol importante en la regulación de la expresión génica.

En este trabajo nos enfocamos en aquellos ARNs largos no codificantes (lncRNA) que interactúan con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂ o PIP₂). Estos lncRNA pueden ser snoRNAs mayor de 200 nucleótidos de longitud, esto de acuerdo con la clasificación de Amin y colaboradores.

En este proyecto se identificaron ARNs no codificantes que interactúan con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Así mismo, también se logró identificar por análisis de secuencias, que los ARNs snR11 y snR63 tienen un posible motivo de unión a fosfoinositidos.

Abstract

The nucleolus is a complex structure, where the synthesis of rDNA takes place. Into these structures, there are small nucleolar RNAs (snoRNA) that have the function of methylating the 2' hydroxyl group of ribose of rRNA or of carrying out the conversion of uridine to pseudouridine (pseudouridylation). SnoRNAs are RNA molecules that vary in length, which can range from 60 to 300 nt, there are even more than 500 nucleotides in length, these molecules are part of the non-coding RNAs, that is, they are transcripts that will not be translated to proteins. Long non-coding RNAs are RNA molecules greater than 200 nt in length and which do not have a protein product, however, although they are not proteins, they play an important role in the regulation of gene expression.

In this work, we focus on those long non-coding RNAs (lncRNA) that interact with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI (4,5) P2 or PIP2). These lncRNAs can be snoRNAs greater than 200 nucleotides in length. In the present study, non-coding RNAs that interact with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate were identified. Likewise, it was also possible to identify by sequence analysis that snR11 and snR63 RNAs have a possible phosphoinositide binding motif.

INTRODUCCIÓN

El nucléolo es una estructura prominente dentro del núcleo de las células eucariotas. El nucléolo está formado por diversas proteínas, lípidos y ARNs. En este lugar se lleva a cabo la síntesis de ADNr, el procesamiento y el ensamblaje de las subunidades ribosomales. El pre-ARNr transcrito por la ARN polimerasa I sufre modificaciones en sus nucleótidos, tales como la metilación de la 2-O-ribose del pre-ARNr o la conversión de la uridina a pseudouridina, esto llevado a cabo por ARNs pequeños nucleolares que es un tipo de ARN no codificante que contiene secuencias conservadas como la caja C/D y la caja H/ACA que juntos a proteínas específicas forman las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs).

Los ARN no codificantes se dividen en dos clases: los ARN pequeños o cortos (<200 nt) y los ARN largos (>200 nt). Los ARN largos no codificantes son moléculas diversas ya que se transcriben de diversas partes de ADN, el mecanismo de acción, función y estructura son diferentes para cada una de ellas, inclusive existe algunos lncRNA que surgen de los snoRNAs (Zimta *et al.*, 2020). Los ARN largos no codificantes (lncRNA) son moléculas de ARN que no son traducidos a proteínas, sin embargo, a pesar de no ser proteínas se tiene evidencia que participan en la regulación de la expresión de diversos genes. Hasta hoy en día se conoce que aproximadamente el 80% del genoma en mamíferos es transcrito en regiones no codificantes (Run-Wen Y., *et al* 2019). El uso de las nuevas plataformas bioinformáticas y de la secuenciación de nueva generación ha permitido un análisis preciso de estructuras secundarias que forman dichos ARNs, esto proporcionando aún más evidencia de como los lncRNAs pueden interactuar con otras moléculas. Los lncRNA desempeñan un papel importante en la interacción con diversas moléculas por ejemplo lncRNA-Proteína, lncRNA-ARN, lncRNA-ADN inclusive poco se sabe sobre la interacción lncRNA-Lípido. En el 2017 Lin *et al* encontraron un ARN largo no codificante de nombre LINK-A que interactuaba con el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PI(3,4,5)P3) que facilitaba el reclutamiento de AKT a PI(3,4,5)P3.

El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2 o PIP2) es una clase de lípido que regula diversos procesos biológicos dentro la célula. Se localiza principalmente en la membrana

plasmática al igual que dentro de las motas nucleares, núcleo y nucléolo. PtdIns(4,5)P2 es una molécula clave en la vía de señalización celular que funciona como regulador de diversos procesos biológicos. En el 2013 Yildirim et al demostraron que al agotarse PtdIns(4,5)P2 en extracto nuclear de células HeLa hay una disminución de la transcripción de la ARN polimera I. De igual manera se conoce la unión de PtdIns(4,5)P2 a fibrilarina, la cual coordina la unión fibrilarina al preARNr en el centro fibrilar y el componente fibrilar denso más no en el componente granular, debido que este compartimiento es donde se ensamblan las subunidades ribosomales, sin embargo, se desconoce si dentro de este complejo PtdIns(4,5)P2-fibrilarina-preARNr se estén uniendo de manera directa los snoRNAs. En este trabajo se identificaron aquellos ARNs largos no codificantes que se encuentran interaccionando con PtdIns(4,5)P2, lo cual proporcionaría información valiosa sobre los procesos de la transcripción del ARNr.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Nucléolo

El nucléolo es una estructura carente de membrana, se localiza dentro del núcleo y su principal función es la síntesis de ARNr y la biogénesis ribosomal (Spector,1993), sin embargo, existe evidencia de que el nucléolo también cumple con otros papeles importantes tales como respuesta al estrés biótico y abiótico, el desarrollo y el envejecimiento, la senescencia, la regulación del ciclo celular, el crecimiento, el ensamblaje de partículas ribonucleoproteínas, silenciamiento génico. El nucléolo al ser una estructura dinámica se encuentra formada por un conjunto de secuencias en tándem de genes de ARNr al cual se le denomina regiones organizadoras nucleolares (NOR) (Boisvert *et al.*, 2007).

1.1.1 Organización nucleolar

Dentro del nucléolo de células mamíferas y de levadura se encuentran al menos tres estructuras funcionales definidas como:centro fibrilar (FC), componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Trumptel *et al.*, 2000). En los nucléolos de plantas se pueden observar adicionalmente vacuolas nucleolares (NoV) (Figura 1.1.1). En FC se realiza la transcripción del ADNr, en el DFC se lleva a cabo el procesamiento del nuevo transcrito (escisión de pre-ARNr, modificación de ciertas bases), la incorporación del ARNr maduro continua en el DFC y GC. En el GC se lleva a cabo la maduración de las subunidades ribosomales.

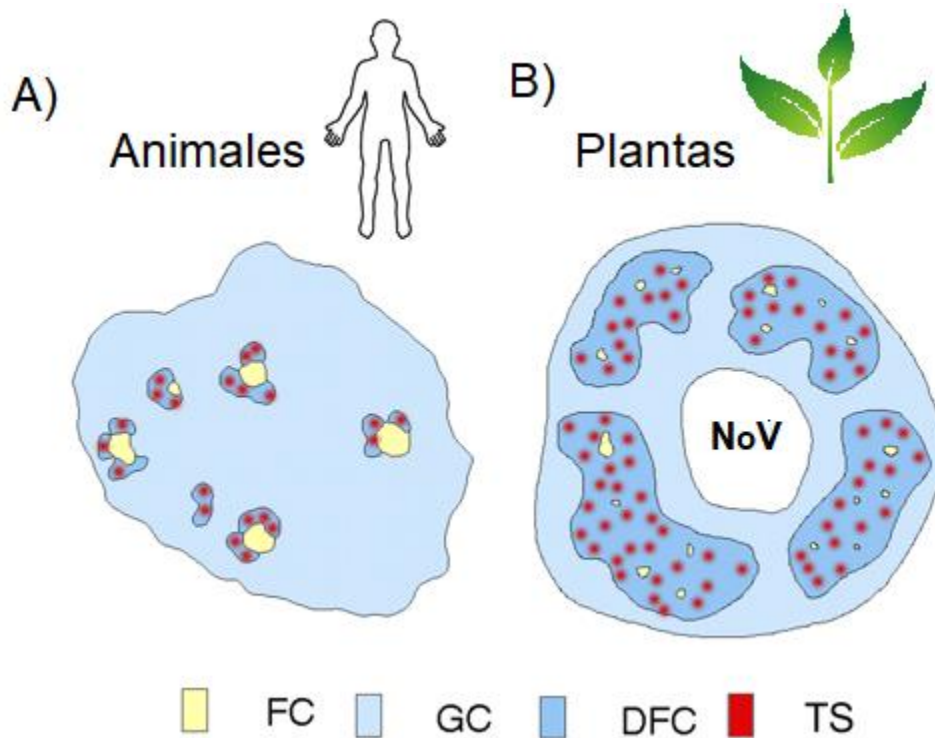


Figura 1.1.1 Organización estructural de los nucleolos en células animales y vegetales. En los nucléolos de células vegetales se pueden observar vacuolas nucleolares (NoV) FC: centro fibrilar, GC: Componente granular, DFC: Componente fibrilar denso, TS: sitios de transcripción. Modificado de Shaw y Brown (2012)

1.2 Motas nucleares

Las Motas nucleares son un grupo de pequeños cuerpos de intercromatina de aproximadamente 20 – 25 nm de diámetro y se encuentran enriquecidos de factores de corte y empalme del pre-ARNm, snRNP, proteínas SR, factores de transcripción, factores del procesamiento del extremo 3' inclusive quinasas y fosfatasas (Spector y Lamond 2011; Lamond y Spector 2003). Estos grupos se encuentran ubicados principalmente en el nucleoplasma en células de mamíferos.

Las motas nucleares durante el ciclo celular se separan al inicio de la mitosis y se ensamblan a lo largo de la fase G1. Durante la mitosis las proteínas localizadas en dentro de las motas se tienden a disgregar hacia el citoplasma, donde se ensamblan en gránulos de intercromatina mitótica durante la metafase hasta la telofase. Antes de que se lleve a

cabo la formación de motas nucleares, los factores de empalme que son ricos en serinas y argininas colocalizan cerca de los parches asociados a NOR (NAP).

Las enzimas quinasas y fosfatasas encontradas en las motas nucleares indican la presencia de fosfatidilinositol, lo que es importante para la función de los gránulos de intercromatina, ya que el fosfatidilinositol participa en la regulación de la expresión génica. La polimerasa poli (A) que es regulada por fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa tipo 1 alfa fue localizada en las motas nucleares donde procesamiento el extremo 3' del pre-ARNm fue incitado por PI(4,5)P2.

Existen diversas quinasas y fosfatasas que ayudan a fosforilar / desfosforilar diversos componentes de la maquinaria de corte y empalme que se han localizado cerca de la periferia de las motas nucleares. Las proteínas quinasa Clk / STY y hPRP4 son una familia de quinasas que se encuentran involucradas en la fosforilación y se han identificado por su papel en el corte y empalme del pre-ARNm. La proteína Clk / STY cuenta con una región N-Terminal no catalítica rica en serina / arginina que le es de importancia ya que le sirve para asociarse con factores de corte y empalme. Ko y colaboradores en el 2001 identificaron una quinasa que se ubicaba en las motas nucleares llamada CrkRS que fosforila el dominio C-terminal de la ARNpolIII in vitro lo que hace pensar que la fosforilación y desfosforilación es necesario para el intercambio de factores de corte y empalme. Mientras que la proteína quinasa hPRP4 puede interactuar directamente con Clk mediante su extremo C-terminal. La sobreexpresión de Clk provoco que Hprp4 que se encontraba en las motas nucleares se distribuyera en el nucleoplasma.

El fosfatidilinositol fosfato quinasa (PIPK) son proteínas que participan fosforilando los fosfoinositidos y estas quinasas se han localizado en las motas nucleares. Se detecto mediante anticuerpo la presencia de fosfatidilinositol bisfosfato nuclear. La localización de estos fosfatidilinositidos es cambiante ya que PIPK y PIP2 se reorganizan con otros componentes de las motas nucleares esto tras la inhibición de la transcripción del ARNm.

Diversos estudios han identificado ARNs no codificantes en las motas nucleares entre ellos se encuentra los ARN nucleares pequeños (snRNA) y ARN largo no codificante (lncRNA). La transcripción 1 de carcinoma pulmonar asociado a metástasis de ARN largo no codificante (MALAT1) de aproximadamente 7.5 kb de longitud, la cual se une con

múltiples factores de empalme ricos en serinas/ argininas en el extremo 5' del lncRNA. La localización de MALAT1 en las motas nucleares va a depender las proteínas que se unan a este ARN (Miyagawa *et al* 2012).

1.3 ARN no codificante

El ARN no codificante (ncRNA por sus siglas en inglés), se le conoce como aquella molécula de ARN que no codifica para proteína. Estas moléculas de ARN son demasiado abundantes y juegan un papel importante en los procesos celulares. Los ARN no codificantes tienen la función de regular la expresión de genes a nivel transcripcional o postranscripcional.

Hoy en día existen diversos tipos de ARN no codificante que en su mayoría se encuentran estrechamente ligados a procesos epigenéticos. Los ARNs no codificantes se dividen en dos grandes grupos (Figura 1.3); los ARNs no codificantes cortos de longitud menor de 200 nt y los ARNs largos no codificantes (LncRNAs) con longitud mayor de los 200 nt. Entre estos diferentes tipos de ARN no codificantes cortos se encuentran los Micro ARNs (miRNA), ARNs asociados a Piwi (piRNA), ARN pequeños de interferencia (siRNAs), ARN pequeño nuclear (snRNAs), ARNs pequeños nucleolares (snoRNAs) y ARN largos no codificantes (lncRNAs) (Amin *et al.*, 2019).

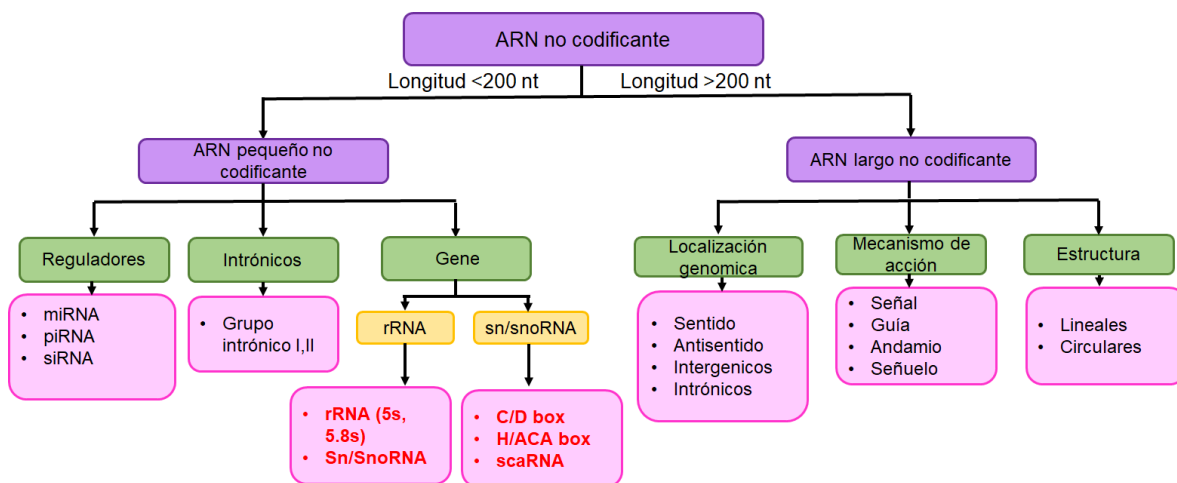


Figura 1.3. Esquema general de la diferencia entre ARNs no codificantes largos y cortos. Existen algunos ARNs ribosomales y ARNs nucleares / nucleolares pequeños que son mayores a 200 nucleótidos (marcado en rojo). Modificado

de Amin *et al.*, 2019

1.4. ARN largo no codificante

Los ARN largos no codificantes (lncRNA por sus siglas en inglés) son moléculas de ARN transcritas que comprenden una longitud mayor a los 200 nucleótidos que no codifican proteína. La transcripción de los lncRNA es dada por la ARN polimerasa II (ARN pol II) (Du Mee *et al* 2018), la mayoría de los transcritos de lncRNA tienen una capucha de metilguanosa que se encuentra en el extremo 5' y una cola poliadenilada en el extremo 3'.

Los ARN largos no codificantes son muy diversos y bastante numerosos, inclusive el número de estos transcritos en humanos supera el número de genes que codifican para proteínas y se estima que abarcan cerca de 30,000 transcritos en humanos (Grixti y Ayers, 2020). El descubrimiento de un gran número de transcritos largos no codificantes continúa aumentando esto gracias a los avances de secuenciación de ARN y a las técnicas de predicción computacional (Guttman *et al* 2009).

El análisis bioinformático y transcriptómico han demostrado que entre el 75 y 80% del genoma en los mamíferos se transcribe de manera específica en una región no codificante por lo cual solo una pequeña parte se transcribe y se traduce en una proteína (Djebali *et al* 2012; Run-vey *et al* 2019).

La mayoría de las funciones de los lncRNA es desconocida pero los mecanismos de acción de algunos lncRNA si se conocen (Quinn *et al.*, 2016). Hoy existen estudios que indican que los lncRNA contribuyen a la regulación de la expresión génica, tales como la modificación de la cromatina, la transcripción y el procesamiento postranscripcional.

1.4.1. Función biológica de los ARN largos no codificantes

A pesar de que los lncRNAs son similares a los ARN mensajeros (ARNm) estos son menos conservados evolutivamente y contienen menos exones en comparación con los ARNm (Run-Wey, 2019). Estas moléculas tienen un papel importante en diversos procesos biológicos por ejemplo apoptosis, autofagia, ciclo celular, proliferación, etc

(figura 1.4.1.) inclusive en la remodelación de la arquitectura de la cromatina, las cuales le permites regular la organización del genoma a diferentes niveles. En los mamíferos hembras la inactivación del cromosoma X ocurre un silenciamiento en uno de los dos cromosomas X durante el desarrollo embrionario. Algunos lncRNA han tenido sus funciones definidas y se ha demostrado que se encuentran involucrados en procesos de regulación de genes, por ejemplo:

- Modificación y estructura de la cromatina
- Regulación de eventos de procesamiento de ARN como empalme, edición, localización, traducción y rotación/degradación
- Modulación de la regulación de microARN
- Silenciamiento de genes a través de la producción de ARNip endógeno (endo-siRNA)
- Facilitación de la formación del complejo de ribonucleoproteínas

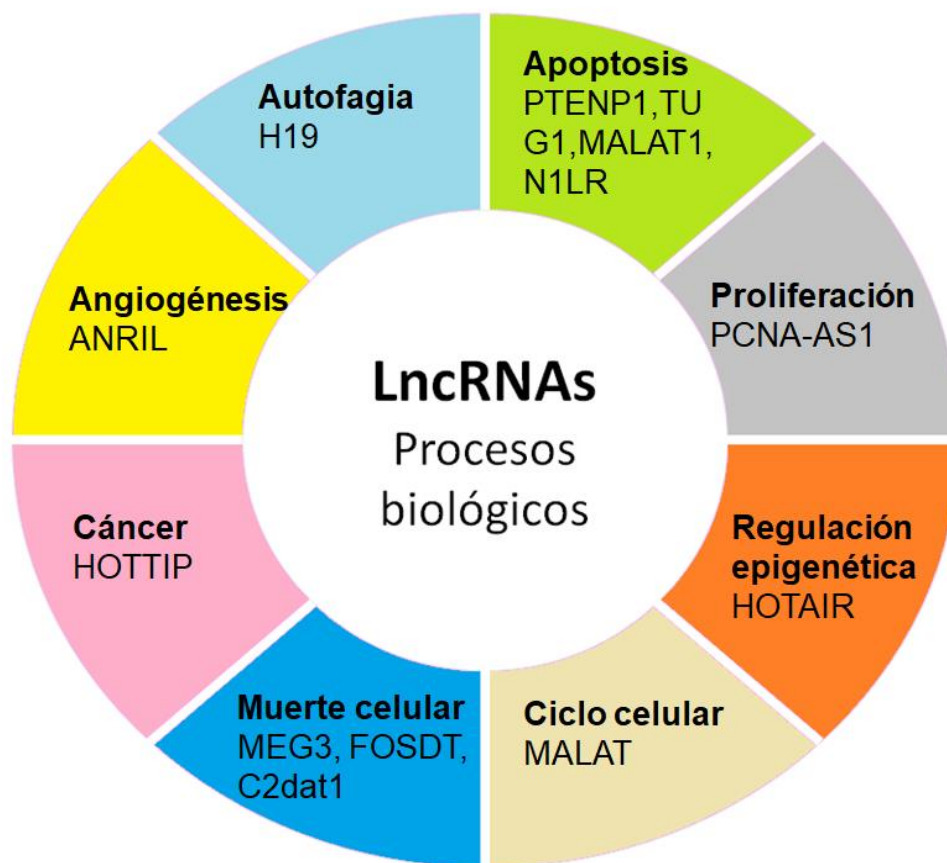


Figura 1.4.1. Procesos biológicos de los LncRNAs. Modificado de Dahariya, S *et al.*, 2019

1.4.2 Estructura secundaria de los ARNs largos no codificantes

Los ARN son moléculas flexibles que adoptan una estructura secundaria compleja. La estructura de los lncRNAs puede desempeñar un papel importante en el funcionamiento en la interacción lncRNAs y otras moléculas. Los análisis estructurales han proporcionado una comprensión de la maquinaria de acción de los lncRNAs.

1.4.3 Predicción de las estructuras de ARN *in silico*

La mayoría de los lncRNA han sido identificados gracias a los resultados de RNA-seq. Las herramientas utilizadas para predecir estructuras secundarias se basan en la energía libre de cada estructura. Algunas de las herramientas bioinformáticas para predecir estructuras más utilizadas es RNAfold, Mfold y CentroidFold y RNAstructure.

1.4.4 Base de datos de los ARNs largos no codificantes

Los lncRNA han sido identificados y se han descrito en diversas bases de datos, las cuales proporcionan anotaciones muy complejas como información de la ubicación y la especificidad del tejido hasta la secuencia de esta. A continuación, se adjunta una lista de las principales bases de datos de los lncRNA (Tabla 1.4.4).

Tabla 1.4.4. Principales bases de Datos de lncRNA

Nombre del proyecto	Especie	Propósito
Mapa del cuerpo humano	Humano	Un conjunto de referencia lincRNAs
ChIPbase	Varios (incluido humano y ratón)	Un recurso para la regulación transcripcional de lncRNA y los perfiles de expresión de ncRNA (lncRNA, microRNAs, etc.)
NONCODE	Varios (incluido humano y ratón)	Una gran base de datos lncRNA que integra varias bases de datos y referencias
lncRNADB	Varios (incluido Humano y ratón)	Una base de datos de lncRNA con función biológica o reguladora
Base de datos de expresión de lncRNA (NRED)	Humano y ratón	Base de datos de expresión para lncRNA de humanos y ratones
LNCipedia	Varios (incluido humano y ratón)	Una gran base de datos de transcripciones y anotaciones de lncRNA
Enfermedad de lncRNA	Humano	Una gran cantidad de lncRNA asociados con enfermedades humanas
DIANA-lncRNABase	Humano y ratón	Una base de datos de microARN objetivo verificado y predicho experimentalmente en lncRNA
lncRNA2Target	Humano y ratón	Una colección de experimentos de eliminación de lncRNA y regulación aguas abajo
starBase 2.0	Humano, ratón y <i>C. elegans</i>	Una colección de lncRNA y objetivos de microRNA predichos; perfiles de expresión de lncRNA de datos TCGA
lncRNAMap	Humano	Un recurso para explorar los perfiles de expresión de lncRNA y la interacción con ARN pequeños (siRNA, microARN, etc.)
lncRNAWiki	Humano	Una base de datos lncRNA de estilo wiki abierta
MONOCLdb	Ratón	Una base de datos no codificante de ratón que detalla el enriquecimiento funcional de lncRNA en respuesta a la enfermedad respiratoria causada por la influenza y el SARS-Cov

IncrNome	Humano	Una base de datos en la que se pueden realizar búsquedas de ARN largos no codificantes en humanos y diversas propiedades, como estructura predicha, SNP y modificaciones epigenéticas.
PLncDB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Una base de datos dedicada al transcriptoma lncRNA de la planta <i>A. thaliana</i> , que incluye información sobre modificaciones epigenéticas

Fuente: Non-coding yet non-trivial: a review on the computational genomics of lincRNAs (Ching *et al* 2015)

1.4.5 Clasificación de los ARNs largos no codificantes

Los ARN largos no codificantes se encuentran clasificados en base a su localización genómica, se clasifican en seis categorías los antisentidos, Intergénico, bidireccionales, intrónico, los asociados a enhancer y los asociados a promotores (Dahariya *et al.*, 2019) (figura 1.4.5.), los cuales son en su mayoría transcritos por la ARN polimerasa II. La clasificación de los lncRNA aún se encuentra en sus inicios, lo cual la clasificación se da de acuerdo con la longitud, los elementos regulatorios, la transcripción y al tipo de función.

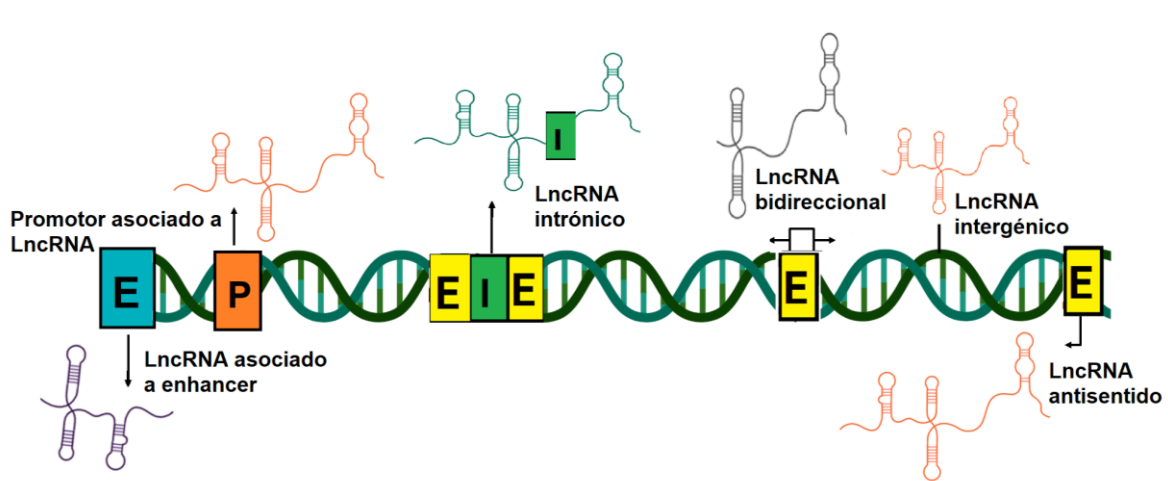


Figura 1.4.5. Esquema general de la biogénesis de los lncRNAs. Los lncRNAs se transcriben de diversas maneras en diferentes ubicaciones en el genoma. Aquí se resume el origen de los lncRNAs basado en la ubicación transcripcional

(Modificado de Dahariya *et al.*, 2019).

1.5 ARN nucleolar pequeño

Los ARNs nucleolares pequeños (snoRNAs por sus siglas en inglés) es una clase de ARNs cortos no codificantes cuya función más importante es la modificación del pre-ARNr. La biogénesis ribosomal de las células eucariotas implica un procesamiento del pre-ARNr (pre-ARNr 45S) en secuencias 18S, 5.8S y 28S que incluyen la eliminación de regiones espaciadoras de transcripción internas y externas (ITS, ETS) por enzimas endo- y exonucleasas. Antes de que se lleve a cabo la eliminación de las secuencias espaciadoras, el pre-ARNr sufre modificaciones tales como la metilación y pseudouridilación en sus nucleósidos. Estas modificaciones involucran a los ARNs nucleolares pequeños que forman parte de las ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP).

Entre los ARNs nucleolares pequeños existen dos clases, los que se encuentran asociados con la metilación y los que se asocian con la pseudouridilación. Los snoRNA que contienen la caja C / D están asociados a la metilación del pre-ARNr y los snoRNAs que contienen la caja H / ACA son aquellos que dirige la pseudouridilación.

Los snoRNA de caja C/D dirigen la metilación de la 2'-O-ribosa del pre-ARNr, esta molécula de ARN no codificante contiene la caja C (5'RUGAUGA3') muy cerca del extremo 5', mientras la caja D (5'CUGA3') se encuentra en el extremo 3' (Kiss, 2002). El ARNr de humanos contiene aproximadamente 115 modificaciones del grupo metilo en la 2-o-ribosa. Muchos de los snoRNAs de caja C/D contienen copias conservados de sus motivos C y D (llamados caja C' y D'). Aguas arriba de la caja D / D' se encuentra un elemento antisentido de aproximadamente 10 a 21 nt que es complementario al ARNr (Kiss, 2002; Dragon *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2019).

Los snoRNAs de caja H/ACA posee una estructura de dos horquillas en la mitad de sus extremos 5' y 3', la secuencia conservada de la caja H (ANANNA) se localiza en entre las dos horquillas, mientras que el motivo ACA (ACANNN) se encuentra ubicado en el extremo 3' de la secuencia (Liang *et al.*, 2019). Las horquillas internas contienen una secuencia complementaria de aproximadamente 3 a 10 nt de unión al pre-ARNr (Dragon *et al.*, 2006).

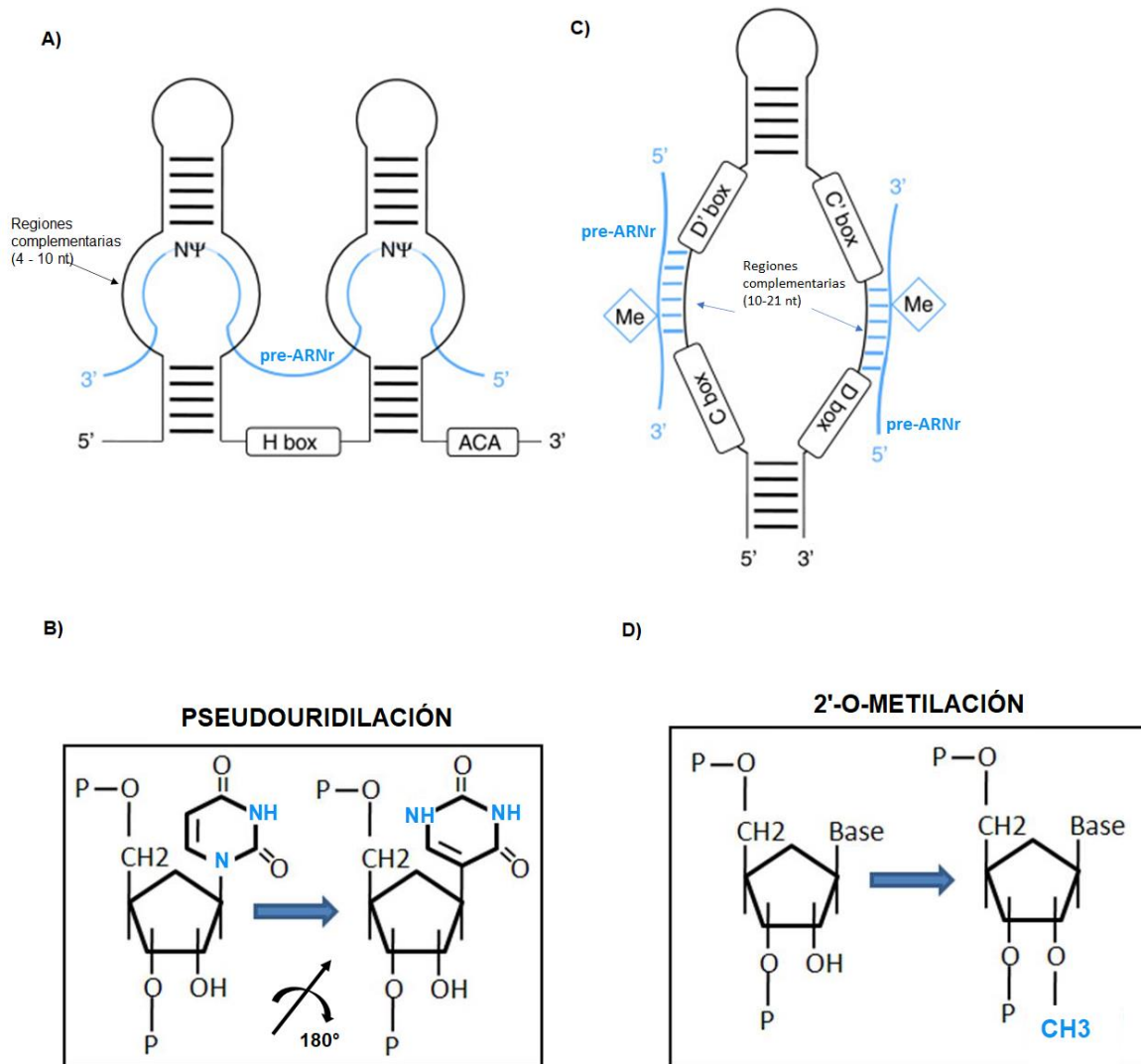


Figura 1.5. Modificaciones de pre-ARNr. A) Estructura secundaria del snoRNA de caja H / ACA. B) Representación de la estructura química de la conservación de una uridina en una pseudouridina. C) Estructura secundaria del snoRNA de caja C / D. Las cajas D y D' del snoRNA de caja C / D son complementarias con el ARNr diana. La enzima metiltransferasa (Fibrilarina en humanos, Nop1 en levaduras) agregan un grupo metilo en la posición 2'-O de la ribosa. D) Adición del grupo metilo a la 2-O ribosa del ARN diana. Las líneas negras representan la secuencia snoRNA y en líneas azul se el ARN diana (Modificado de Gardner *et al* 2010)

1.5.1 ARN nucleolar pequeño 11

El ARN nucleolar pequeño 11 (snoR11 o snR11) se encuentra clasificado entre la familia de los ARNs nucleolares pequeños (snoRNAs) de caja H / ACA, este ARN tiene una longitud 258 nt y se localiza en el cromosoma XIII de *Saccharomyces cerevisiae*. Su principal función es guiar la conversión de uridinas en pseudouridinas (Ψ s) de la subunidad larga del pre-ARNr en la posición U2416, Schattner P *et al* reportan en el 2004 que snR11 guía la modificación en subunidad larga de la posición U2415.

En el año de 1996 Balakin, Andrey G *et al* describe muy poco sobre la secuencia de la caja ACA de snR11 argumentando que la presencia de esta secuencia es importante y que podría estar funcionalmente relacionada con la familia de las cajas C / D.

La función más importante descrita hoy en día de la caja ACA es la estabilidad de los snoRNA, para sustentar lo dicho Balakin A., *et al* en 1996 realizaron mutaciones en la caja ACA de snR11 de levadura cual demostró que el motivo ACA es sumamente importante para el mantenimiento de la estructura secundaria de este snoRNA.

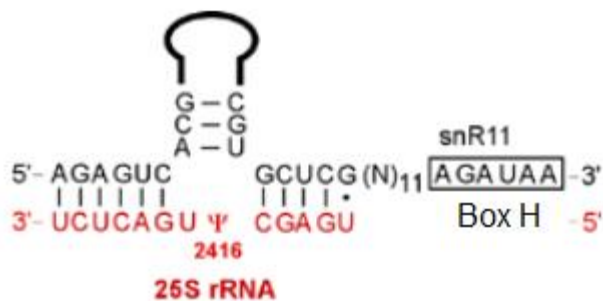


Figura 1.5.1 Esquema de la pseudouridilación guiada por snR11 de caja H / ACA. Emparejamiento de la secuencia del pre-ARNr 25S con la secuencia bolsillo de pseudouridilación de snR11 (rojo). Modificado de LBME-db

1.5.2 ARN nucleolar pequeño 63

El ARN nucleolar pequeño 63 (snoR63 o snR63) pertenece a la familia de los snoRNA de cajas C / D, este transcrito cuenta con una longitud de aproximadamente 255 nt y localización

genómica es en el cromosoma IV de *Saccharomyces cerevisiae*. snoR63 se encuentra involucrado en la metilación de la 2'-O-ribose de la subunidad grande del ARNr en la posición A2256 (Lowe y Sean R., 1999) por lo cual su localización celular es en el nucleolo.



Figura 1.5.2. Esquema de la metilación guiada por snR63 de caja C / D. Emparejamiento de la secuencia del pre-ARNr 25S con la secuencia snR63 (rojo), la metilación está dada en la posición A2256. Modificado de LBME-db.

1.6 Fosfatidilinositol

El fosfatidilinositol son una clase de lípidos que constituyen la membrana plasmática y juega un papel importante en vía de señalización. Estos lípidos están compuestos por una molécula de glicerol unidos a dos ácidos grasos en la posición *sn1* y *sn2* y un anillo de inositol unido a un grupo fosfato en la posición *sn-3* (figura 1.6), esta clase de lípidos constituyen solo el 5-10% la membrana plasmática en células de mamíferos (Blunsom y Cockcroft 2019).

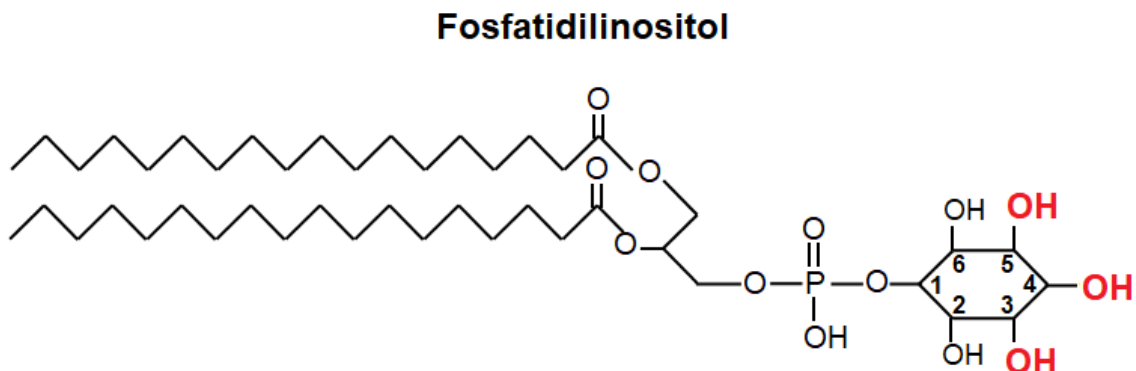


Figura 1.6. Estructura del fosfatidilinositol. El anillo de inositol con sus tres grupos hidroxilo (-OH) libres para ser fosforilados por enzimas cinasas.

El inositol es un carbohidrato cíclico compuesto de seis grupos hidroxilo. El fosfatidilinositol (PtdIns) cuenta con tres grupos -OH libres que pueden ser fosforilados en diferentes posiciones, se pueden lograr obtener tres fosfoinosítidos monofosfato el fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns(3)), el fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns(4)) y el fosfatidilinositol 5-fosfato (PtdIns(5)). Así como puede dar lugar a tres fosfoinosítidos bisfosfato como lo son el fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P₂), el fosfatidilinositol 3,5 bisfosfato (PtdIns(3,5)P₂) y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂); y un fosfoinosítido trisfosfato el cual es el fosfatidilinositol 1 ,3,4-trisfosfato (PtdIns(1 ,3,4)P₃) (figura 1.6a).

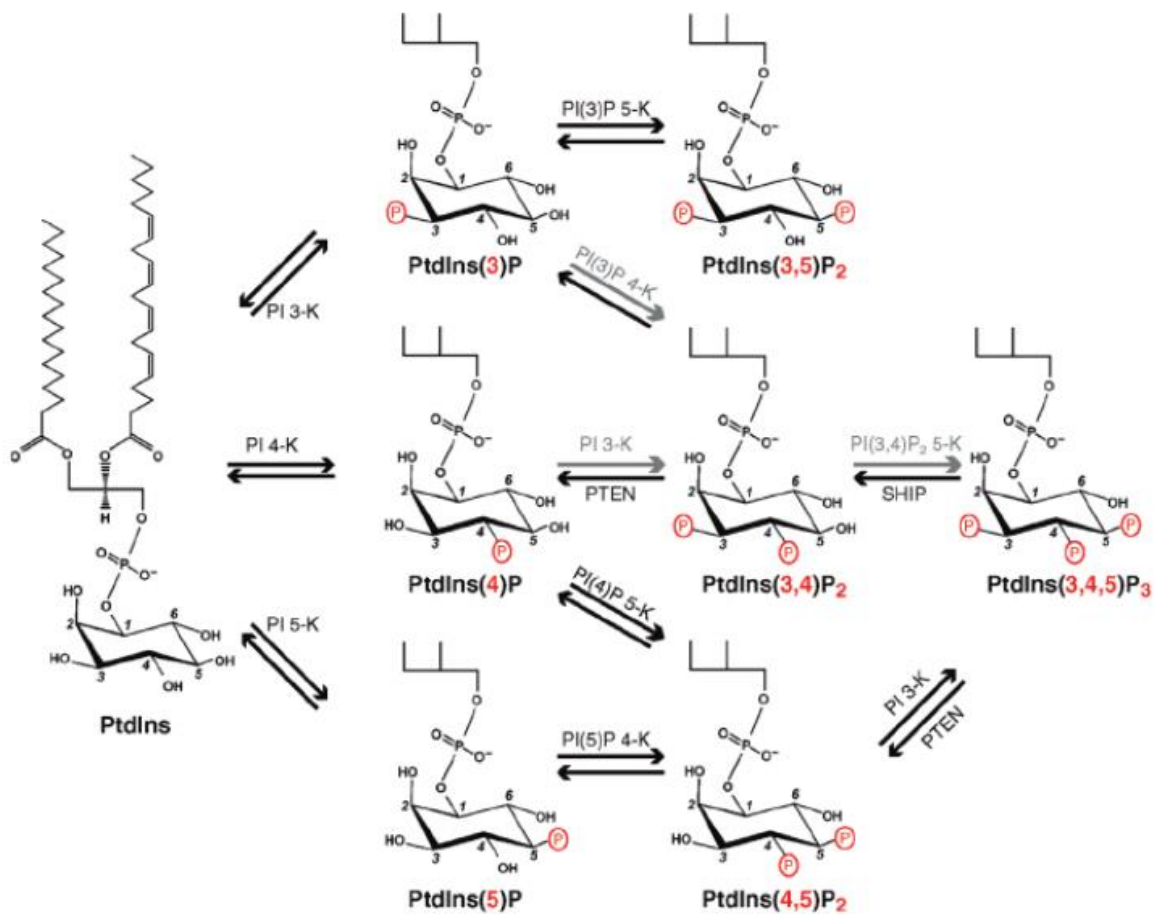


Figura 1.6a. Ruta de fosforilaciones y desfosforilaciones del fosfatidilinositol. En

rojo se muestran los grupos fosfatos, las flechas en color negro indican las fosforilaciones, las flechas grises indican las fosforilaciones desconocidas.

Al fosforilar las diversas posiciones del anillo de inositol del fosfatidilinositol dan como resultados diferentes tipos de fosfoinosítidos, que se encuentran presentes en varias partes de la membrana plasmática y de membrana de orgánulos diferentes donde cada una de ellas participara en varios procesos celulares (Phan *et al.*, 2019) (Figura 1.5b).

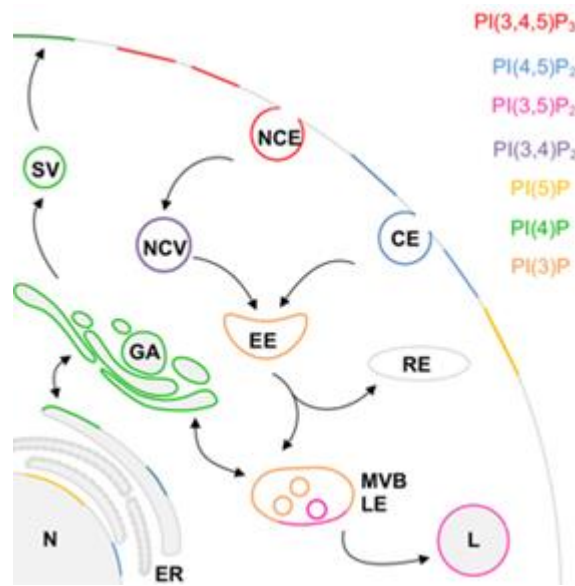


Figura 1.6b. Distribución celular de los fosfoinosítidos presentes en varios organelos. N: nucleolo, ER: Retículo endoplasmático, CE: Endocitosis dependiente de clatrina, GA: Aparato de Golgi, MVB: Cuerpos multivesiculares, LE: Endosomas tardíos, L: Lisosomas, EE: Endosomas tempranos, SV: Vesículas secretoras NCV: vesículas endocíticas no clatrina NCE: endocitosis independiente de la clatrina (Phan *et al.*, 2019).

1.6.1 Función del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) en membranas celulares

El fosfatidilinositol 4,5- bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) es un segundo mensajero lipídico que regula diversos procesos celulares y constituye el 1% de los fosfolípidos totales de la membrana plasmática (Huang *et al.*, 2004; Tay *et al* 2017).

PtdIns(4,5)P₂ al ser un segundo mensajero en la traducción de señales también juega un papel importante en el transporte de iones de membrana plasmática, el tráfico de membrana y en la regulación de citoesqueleto de actina.

El PtdIns(4,5)P₂ es producido por las familia de enzimas lípido cinasas PI4K que fosforila la posición 4 y PI5K fosforila la posición 5 del anillo de inositol donde PI(4)P y PI(5)P sirven como precursores para la síntesis de PI(4,5)P₂.

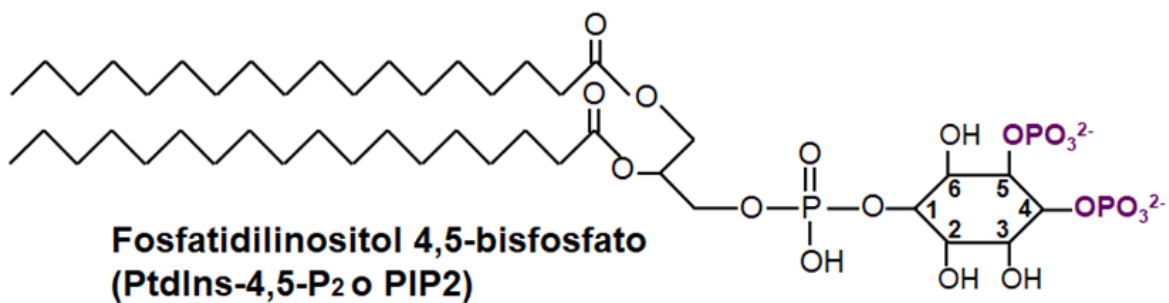


Figura 1.6.1. Estructura química de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns-4,5-P₂). Las letras moradas indican los grupos fosfato en la posición 4 y 5 del anillo de inositol.

1.6.2 Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en el núcleo celular

Con el paso de los años se han identificado ciertas enzimas que sintetizan diversos fosfoinositidos dentro del núcleo celular (Irvine, 2003). Recientemente se identificó la presencia de PtdIns(4,5)P₂ mediante anticuerpos anti-PI(4,5)P₂ dentro de los compartimientos nucleares llamados islotes lipídicos nucleares (NLI) (Sobol *et al* 2018) que son estructuras lipídicas de aproximadamente 40-100nm que se encuentran rodeado de ARN y proteínas (Figura 1.6.2). Se ha demostrado que PIP₂ se encuentran presente en la síntesis del ARN_r, uniéndose al Factor aguas arriba (UBF) de la maquinaria del ARN

polimerasa I, al igual que interactúa con fibrilarina una metiltransferasa que agrega un grupo metilo en la 2'-O ribosa del ARN (Sobol *et al* 2013).

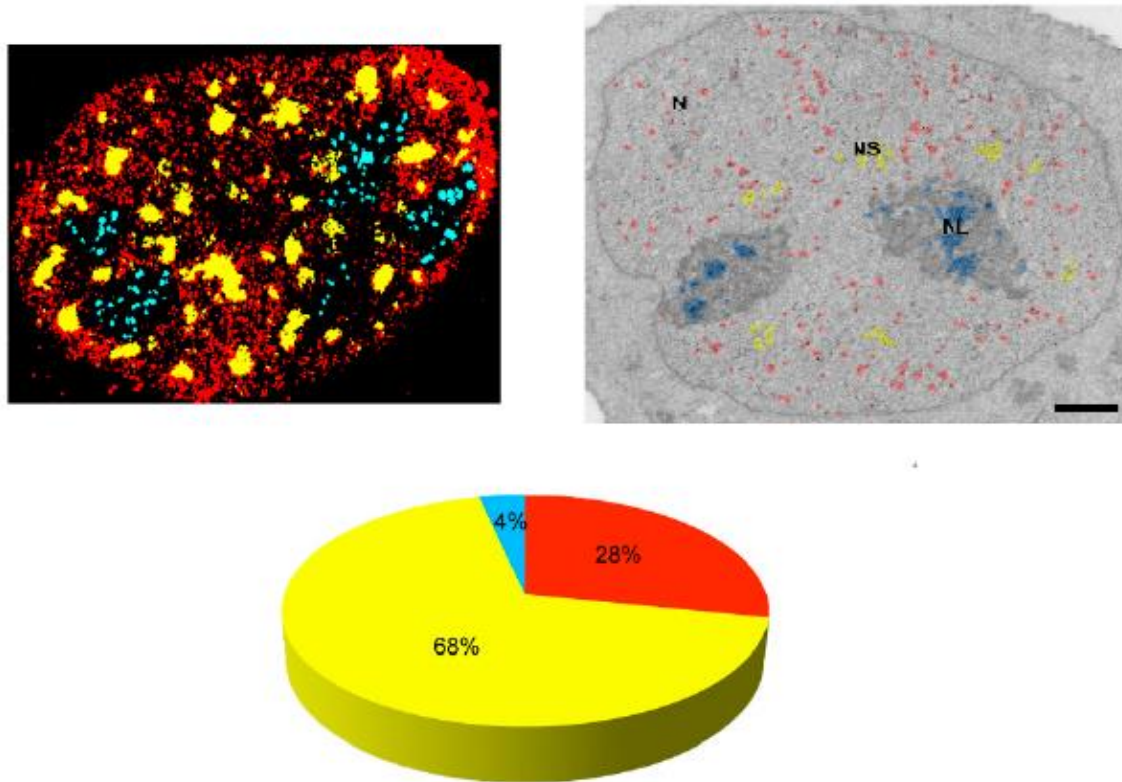


Figura 1.6.2. Islotes lipídicos nucleares (NLDs). Principales compartimientos nucleares asociado con la ARN polimerasa II. N: Núcleo, NL: Nucléolo, NS: Motas nucleares. Los colores presentes en la imagen dependen del compartimiento nuclear; Rojo: Núcleo; Azul: nucléolo y Amarillo: Motas nucleares (Sobol *et al* 2018).

HIPÓTESIS

Existen ARNs largos no codificantes (LncRNA) que interaccionan con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂)

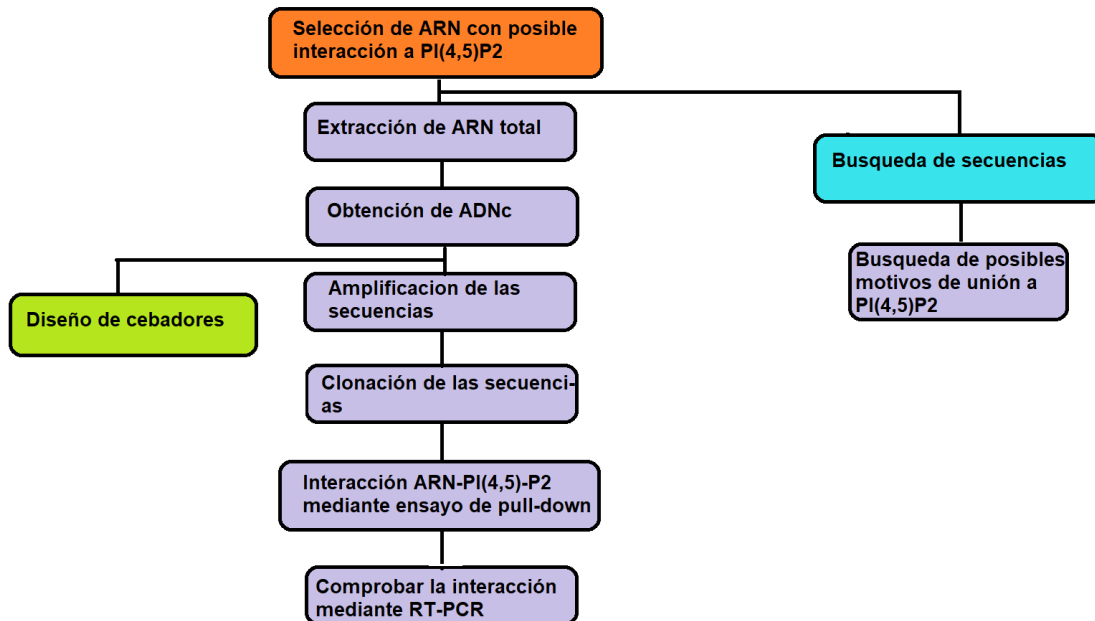
OBJETIVO GENERAL

Identificar ARNs no codificantes que interaccionan con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis de librerías de RNA-seq(*S. cerevisiae*) de aquellos candidatos de ARN con interacción a PtdIns(4,5)P₂
2. Identificación de motivos de unión a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.
3. Demostrar la interacción entre ARNs no codificantes y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño de oligonucleótidos

Los cebadores para las secuencias snR11 y snR63 fueron diseñados en la página web primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) utilizando la secuencia completa del transcrito. Las secuencias completas fueron tomada de la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (<https://www.yeastgenome.org/>) con el número de ID SGD:S000007293 para snR11 e ID SGD:S000006454 para snR63.

Para cada amplificar la secuencia completa de snR11, al cebador forward en dirección 5'-3' se le adicionó cinco nucleótidos más. Para el cebador snR63 se diseñó el cebador forwards en dirección 5'-3', 40 nucleótidos río arriba de la secuencia de inicio (véase en el anexo 1)

2.2 Extracción de ARN total de *Saccharomyces cerevisiae*

La extracción de ARN total se realizó usando el paquete de purificación PureLink® RNA Mini Kit. (Véase el anexo I), esto utilizando levadura silvestre que cuenta con un tamaño de 12 Mb.

2.3 Obtención de ADNc

La obtención de ADNc se realizó con el Kit comercial transcriptasa reversa (RT) SuperScript™ II (Invitrogen Cat. No. 18064-022). El sistema de esta enzima es fácil y rápido para generar ADNc de cadena sencilla. La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando 1 µL de oligo dT(10nM), 2 µL de ARN total, 1 µL de dNTPs MIX y 8 µL de agua, se incubó a 65°C durante 5 minutos, posteriormente se incubo en hielo, luego se agregó 4 µL de Buffer 5X, 2 µL 0.1M DTT, 1 µL de RNAsa OUT, se incubó a 42°C por 2 minutos y por último se agregó 1 µL de enzima RT SuperScript II e incubar a 42°C durante 50 minutos.

2.4 Amplificación de las snR11 y snR63 de levadura

La amplificación de las secuencias snR11 y snR63, se realizó a partir de ADNc utilizando el paquete DreamTaq PCR Máster Mix (Pub. No MAN0012702) de Thermo Scientific el

cual contiene una mezcla de buffer, enzima DreamTaq ADN polimerasa, $MgCl_2$ y dNTPs. Se realizó la amplificación dichas secuencias bajo las siguientes concentraciones a un volumen de reacción de 25 μ L: 12.5 μ L de DreamTaq máster mix (2x), 2.5 μ L de cada uno de los cebadores forward y reverse, 2 μ L de Templado y 5.5 μ L de agua. Se llevo a cabo la PCR utilizando diferentes condiciones de temperatura (Cuadro 2.4). La temperatura de alineamiento que se utilizo fue diferente para cada una de las reacciones.

Cuadro 2.4. Condiciones de temperatura para la reacción en cadena de polimerasa. *Temperatura de alineamiento diferente.

Condiciones	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Inicio de desnaturalización	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	30
Alineamiento	*	30 seg.	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

2.5 Clonación de las secuencias snR11 y snR63

La secuencia previamente amplificada fue ligada en un vector de clonación pGEM-T Easy vector (3015bp) de Promega (véase en Anexo II). Este es un vector linealizado con una timina unida en los extremos 3' terminal, este vector cuenta con diversos sitios de restricción flanqueando el sitio de clonación. Se agregó en un microtubo eppendorf 5 μ L de buffer 2X, 1 μ L de vector pGEM-T Easy (50ng), 1 μ L de producto de PCR, 1 μ L T4 ADN ligasa (3 u/ μ L) y 2 μ L de agua posteriormente se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Luego de realizar la reacción de ligación se procede a transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5 α (véase en Anexo III) las cuales fueron crecidas en un medio LB

suplementado con Ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37°C durante 14 horas. Para corroborar que las células de *E. coli* contienen el vector con la secuencia de interés se procedió a seleccionar las colonias que crecieron en la caja Petri y se crecieron en 3 mL de medio LB con Ampicilina, se incubó a 37°C durante 10 horas con agitación. Posteriormente se realizó la extracción de plásmido usando la metodología de extracción por lisis alcalina de ADN plasmídico (Anexo IV).

2.6 Ensayo de interacción ARN-PIP2 mediante Pull-down de las secuencias snR11 y snR63

Para determinar la unión de PI(4,5)P2. y los ARN, se llevó a cabo el ensayo de pull-down utilizando perlas de agarosa compuesta de PI(4,5)P2. Para realizar este ensayo se preparó el buffer de unión (50 nM de HEPES y 50 nM de NaCl), buffer de bloqueo (50 nM de HEPES, 50 nM de NaCl y 10 ng/µL de ARN total de bacteria), buffer de incubación (50 nM de HEPES, 50 nM de NaCl, 180 ng/µL ARN total de levadura y 0.05 U de inhibidor de RNase OUT) y buffer de lavado (50 nM de HEPES, 50 nM de NaCl y 0.1% de NP-40). Se agregó a un microtubo eppendorf limpio 20 µL de perlas de agarosa y se lavó con 100 µL de buffer de unión, luego se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, se volvió a resuspender en 100 µL de buffer de bloqueo durante 20 min en hielo, transcurrido el tiempo se eliminó sobrenadante y se agregó buffer de incubación y se incubó durante 20 minutos en hielo, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, por último se realizó los lavados 2 veces con buffer de lavado. Se recupera el ARN para el análisis de RT-PCR.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS

3.1 Análisis de la librería del RNA-seq de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la selección y análisis de las secuencias de ARN no codificantes en este estudio, se utilizaron los datos provenientes de ensamblajes transcriptómicos de *S. cerevisiae* donde se seleccionaron todos los ARNs no codificantes que interactuaban con PI(4,5)P₂; estos se dividieron en dos partes, aquellos que fuesen pequeños (<200 nt) y aquellos largos (>200 nt). En total se encontraron 12 lncRNA (cuadro 3.1) del cual se seleccionaron dos lncRNAs de acuerdo a el número de lecturas que tuvieron en base a la interacción con PI(4,5)P₂ vs Control y a la diferencia entre que hay entre control y PI(4,5)P₂. Los dos lncRNAs seleccionados fueron el snR11 que es un snoRNA que tiene la función de guiar a pseudouridilación del ARNr en levaduras; el snR63 es otro snoRNA que junto a fibrilarina llevan a cabo la metilación del ARNr.

Cuadro3.1. ARNs largos (>200) expresados diferencialmente.

ID Gen	Lectura_PIP2	Lectura_RNAI	log2.Fold_change.
snR11	132147.375	99.5080019	10.375
snR19	153241.133	9339.65697	4.0363
snR191	156419.706	156.379735	9.9662
snR34	78915.2104	30.8902571	11.319
snR37	543951.112	5404.60286	6.6531
snR42	298459.942	1373.1964	7.7639
snR44	5424.10933	21.4934479	7.9793
snR5	15964.2922	30.6798808	9.0233
snR63	292017.975	338.355257	9.7533
snR83	180352.751	2727.07324	6.0473
snR84	137517.913	1589.60352	6.4348
snR86	207428.655	8470.31187	4.6141

Cuadro3.1a. Descripción de los ARNs largos (>200) expresados

ID Gen	Descripción	Longitud (nt)
snR11	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición U2416;	258
snR19	U1 ARN spliceosomal (U1 snRNA)	568
snR191	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición u2258 y u2260	274
snR34	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición U2826 y U2880	203
snR37	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; posición U2944	386
snR42	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; posición 2975	351
snR44	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición U1056 y SSU U106	211
snR5	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición U1004 y U1124	204
*snR63	snoRNA de Caja C / D; Metilación 2-O ARNr; LSU 2256	255
snR83	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; SSU posición U1290 y U1415	306
snR84	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición U2266	550
snR86	snoRNA de Caja H / ACA; pseudouridilación; LSU posición 2314	1004

diferencialmente.

3.2 Similitud de secuencias snR11 y snR63 en diversas especies.

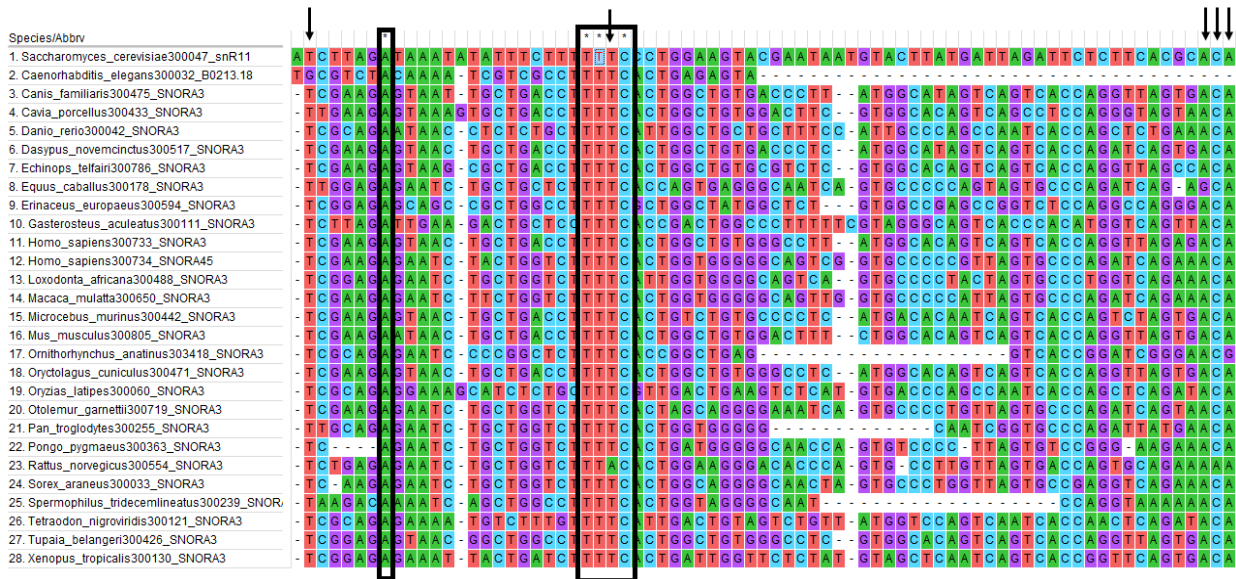
Para determinar las regiones conservadas de snR11 y snR63 entre diversas especies se recurrió a snOPY (<http://snoopy.med.miyazaki-u.ac.jp/>) una base de datos de genes ortólogos de snoRNA, donde se seleccionó snoRNA ortólogos para snR11 y snr63 de *S. cerevisiae*.

Por lo tanto, se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas tanto para snR11 como para snR63 por el algoritmo de Comparación de secuencias múltiples por Log-expectativa (**MU**ltiple **S**equences **C**omparison by **L**og-**E**xpectation o MUSCLE por sus siglas en inglés) (figura 3.2). Durante el alineamiento de la secuencia tanto de snR63 de

S. cerevisiae como de otras especies se logró identificar una región conservada de nucleótidos donde solo se encuentra dos cambios de nucleótidos un de Adenina por Timina en la secuencia snoRNA:Me28S-A2564 de *Drosophila melanogaster* y otro de Timina por Adenina en T02E1.9 de *Caenorhabditis elegans* (Figura 3.2 B), mientras tanto en la secuencia snR11 se observó que una región conservada de tan solo cuatro nucleótidos donde la Timina de la secuencia de snR11 es sustituida por una adenina de la secuencia SNORA3 de *Rattus norvegicus* (figura 3.2 A).

Por otro lado, se realizó los árboles filogenéticos en el programa MEGA7.0 para saber la relación evolutiva de estas especies con secuencias de snR11 y snR63 de *S. cerevisiae*. Por lo cual se demostró que la secuencia snoRNA B0213.18 de *C. elegans* comparte un 60% de similitud con la secuencia snR11 de *S. cerevisiae* (Figura 3.2a (A)), por otra parte, la secuencia T02E1.9 de *C. elegans* comparte apenas un 38% de similitud con snR63 de *S. cerevisiae* (Figura 3.2a B).

A)



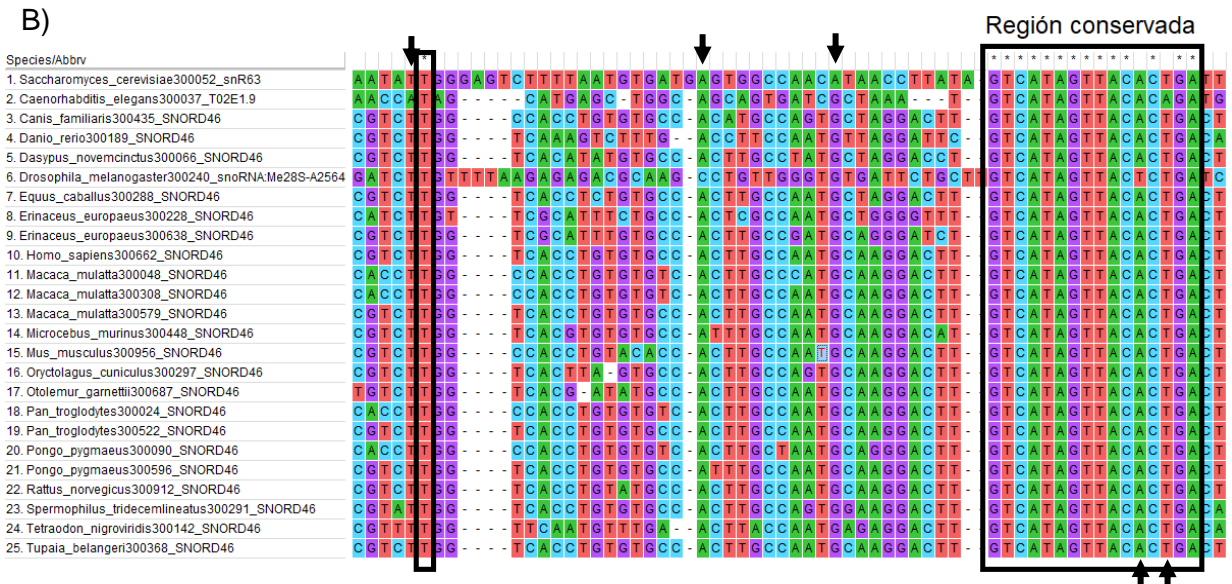


Figura 3.2. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de snoRNA. A) Alineamiento de la secuencia snR11 de *S. cerevisiae* con secuencias ortólogas diversas especies. B) Alineamiento de snR63 de *S. cerevisiae* con secuencias snoRNA de diferentes especies. Las fechas en negritas (↑) significan un cambio de solo nucleótido en la secuencia. Azul: Citosina; Morado: Guanina; Rojo: Timina; Verde: Adenina

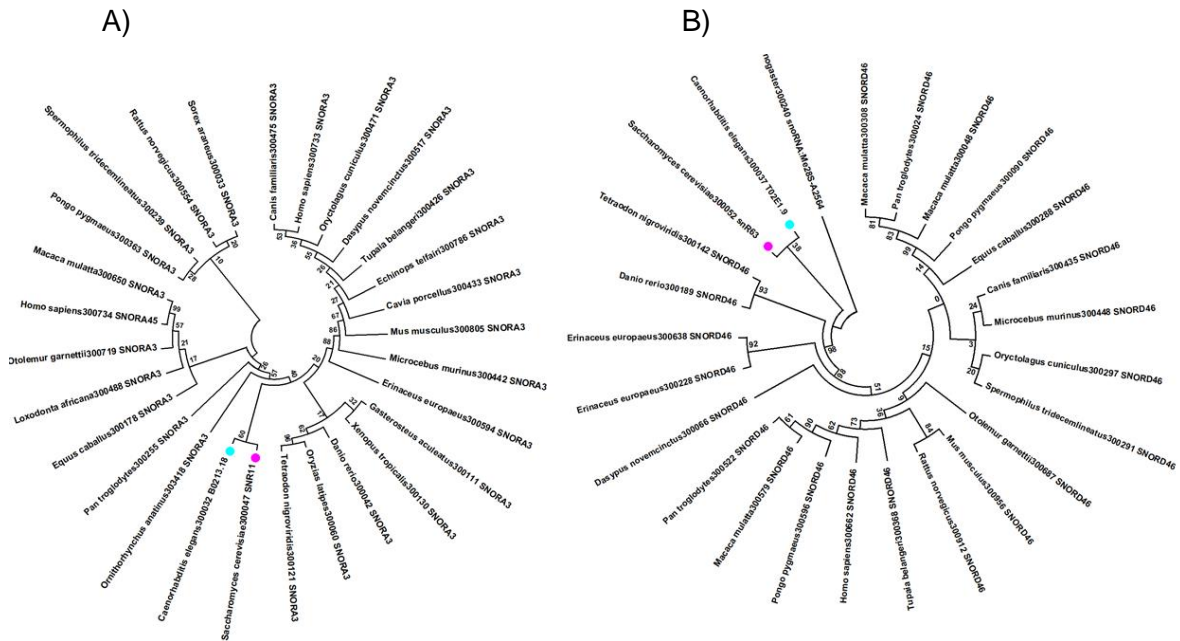


Figura 3.2a. Reconstrucción filogenética de los dos snoRNA estudiados. A) Árbol filogenético de secuencias snoRNAs de 28 especies incluyendo el snoR11 de *S. cerevisiae*. El snoR11 de *S. cerevisiae* comparte 60% de similitud con *C. elegans*. B) Árbol filogenético de secuencias snoRNAs de 25 especies incluyendo el snoR63 de *S. cerevisiae*. snoR63 de *S. cerevisiae* comparte 38% de similitud con *C. elegans*. La etiqueta rosada señala a *S. cerevisiae* y la etiqueta azul turquesa señala a *C. elegans*.

3.3 Posibles sitios de unión de las secuencias snR11, snR63 con PtdIns(4,5)P2

Para determinar los posibles sitios de unión de las secuencias snR11 y snR63 con fosfatidilinositol, se realizó alineamientos de secuencias nucleotídicas. Se realizó el alineamiento de la secuencia snR11 y snR63 comparado con el motivo de unión a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato de la secuencia LINK-A-PIP3 de *Homo sapiens* reportado por Lin et al., 2017.

Se encontró un sitio de unión a fosfatidilinositol, donde diversos nucleótidos son conservados en ambas secuencias con excepción de algunos de ellos (figura 3.3).

Para determinar si las secuencias que son similares a snR11 y snR63 compartían este mismo sitio de unión se realizó el alineamiento múltiple de secuencias snoRNAs de 25 especies incluyendo el snoR63 de *S. cerevisiae* esto comparándolo con el motivo de

unión a fosfatidilinositol de la secuencia LINK-A-PIP3 de *Homo sapiens* de igual manera se realizó el alineamiento múltiple de secuencias snoRNAs de 28 especies incluyendo el snR11 de *S. cerevisiae* (figura 3.2a).

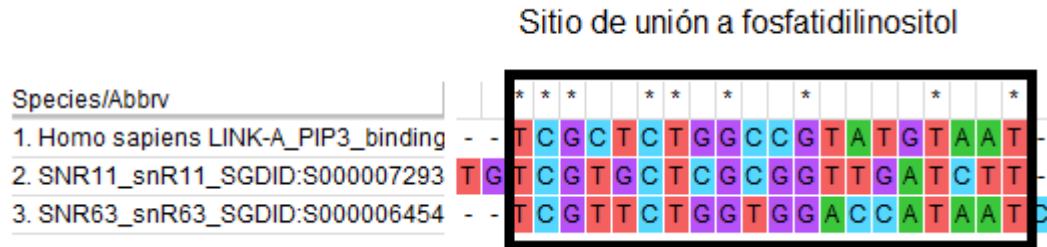
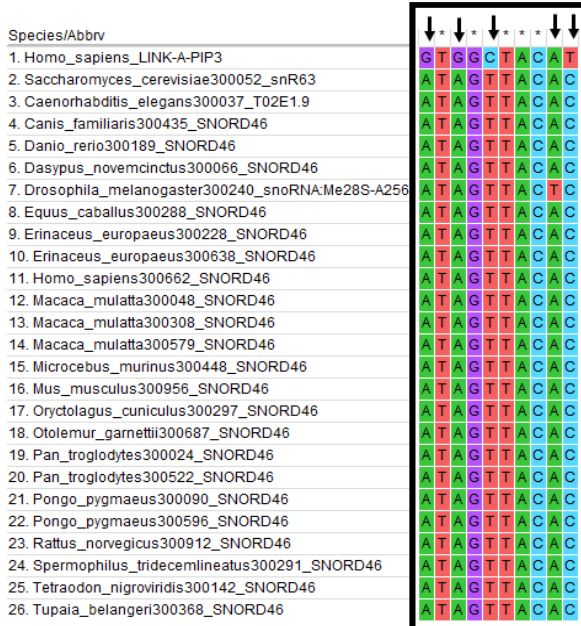


Figura 3.3. Alineamiento de los posibles sitios de unión de snR11 y snR63 con fosfatidilinositol. En el cuadro negro se muestra el posible sitio de unión a fosfoinositidos en especial a fosfatidilinositol 4-5,-bisfosfato. Los asteriscos (*) indican los nucleótidos conservados entre las secuencias. Azul: Citosina; Morado: Guanina; Rojo: Timina; Verde: Adenina

A)



B)

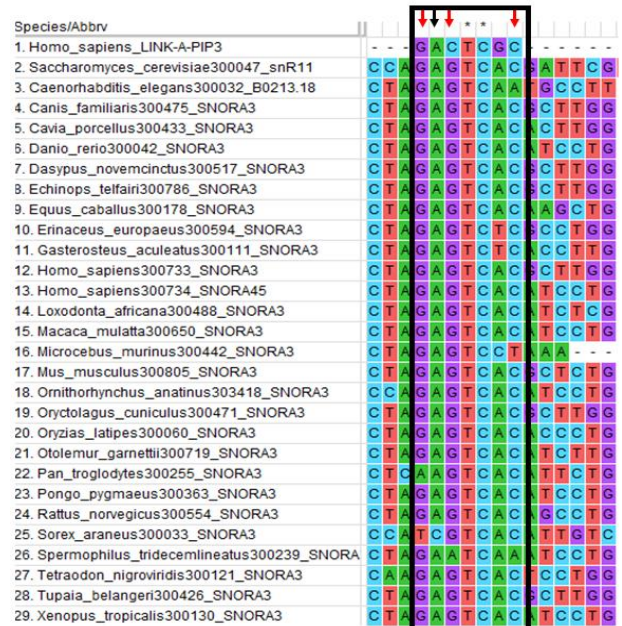


Figura 3.3a. Alineamientos de los posibles sitios de unión de snoRNAs de diferentes especies con el fosfatidilinositol. A) Alineamiento múltiple de secuencias snoRNAs de 25 especies incluyendo el snoR63 de *S. cerevisiae* comparado con el sitio de unión a fosfatidilinositol de la secuencia LINK-A-PIP3 de *Homo sapiens*. B) Alineamiento múltiple de secuencias snoRNAs de 28 especies incluyendo el snoR11 de *S. cerevisiae* comparado con el sitio de unión a fosfatidilinositol de la secuencia LINK-A-PIP3 de *Homo sapiens*. En el cuadro negro se muestra el posible sitio de unión a fosfoinositidos esto basado en lo reportado por Lin A *et al.*, 2017, Donia T *et al.*, 2019. Los asteriscos (*) indican los nucleótidos conservados entre las secuencias. Azul: Citosina; Morado: Guanina; Rojo: Timina; Verde: Adenina

3.4 Amplificación de snR11 y snR63

Para lograr la obtención de las secuencias snR11 y snR62 se realizó la extracción de ARN total de *S. cerevisiae* (figura 3.4 A). A partir del ARN total se procedió a realizar la síntesis de ADNc para posteriormente obtener la amplificación de las secuencias usando los oligonucleótidos específicos para cada una de ellas (figura 3.4). La secuencia snR11 se amplificó del tamaño esperado de 263 pb (figura 3.4 C) y la secuencia snR63 amplificó un tamaño de 324 pb (figura 3.4 B). Se utilizó un gradiente de temperatura para obtener la mejor temperatura óptima para amplificar.

3.5 Clonación de las secuencias snR11 y snR63 en el vector pGEM-T Easy

Una vez amplificadas las secuencias se procedió a realizar una reacción de ligación usando el vector pGEM-T Easy que fue posteriormente usada para la transformación de células *E. coli* de la cepa DH5 α . Se realizó una extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Para corroborar la inserción de la secuencia de interés se picaron 10 colonias, tanto de las colonias snR11 y snR63, donde posteriormente se realizó una PCR de colonia, a pesar de que existía la posibilidad de que la secuencia de interés se hubiese ligado al vector, se realizó una reacción de digestión con la enzima EcoR1 para el snR63 (figura 3.5a) y para el snoR11 (figura 3.5b) para descartar cualquier contaminación que se pudiese amplificar. En la figura 3.5a se logra apreciar que solo dos colonias la 3 y 4 libera la secuencia snR63 de 324 pb que se encontraba unida al vector pGEM-t easy, mientras que las colonias que tenían el vector pGEM-T::snR11 solo una colonia logra liberar el fragmento del snR11.

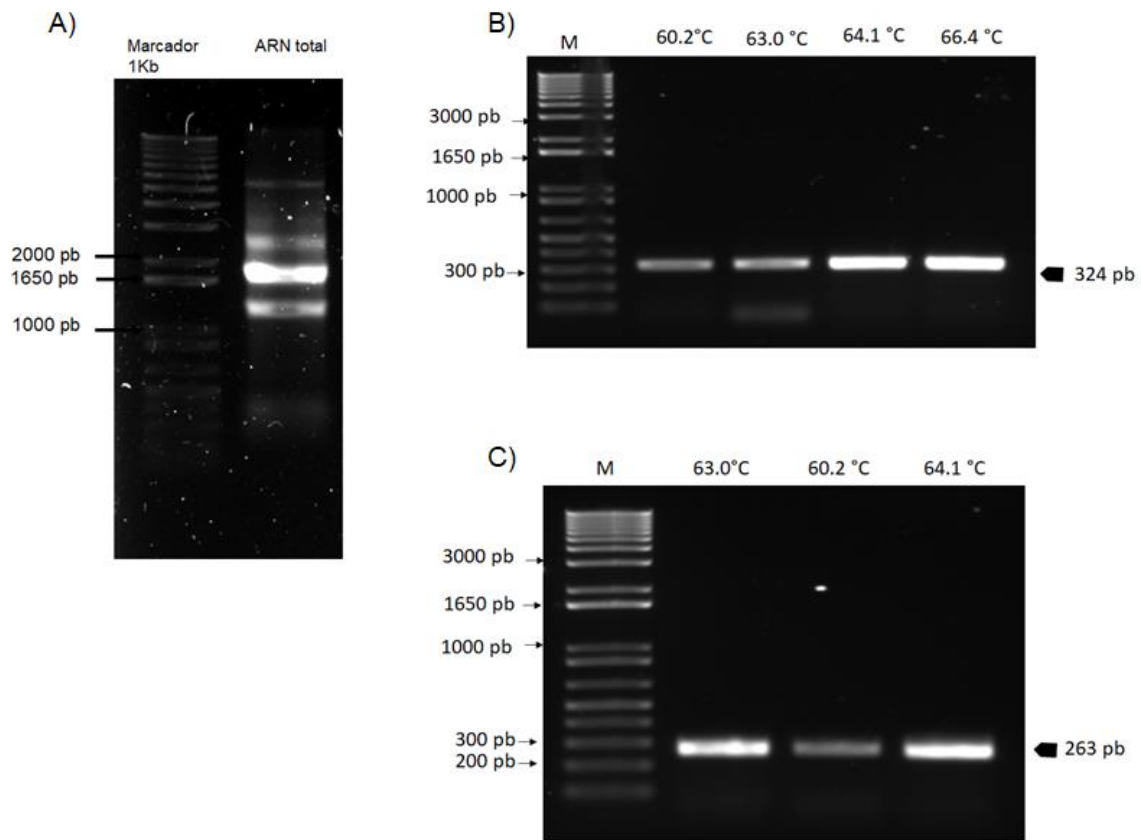


Figura 3.4. Extracción de ARN de levadura y amplificación de las secuencias snR11 y snR63. A) Extracción de ARN total de levadura. B) Amplificación de la Secuencia snR63 a partir de ADNc. C) Amplificación de la Secuencia snR11. Todas fueron amplificadas bajo un gradiente de temperatura.

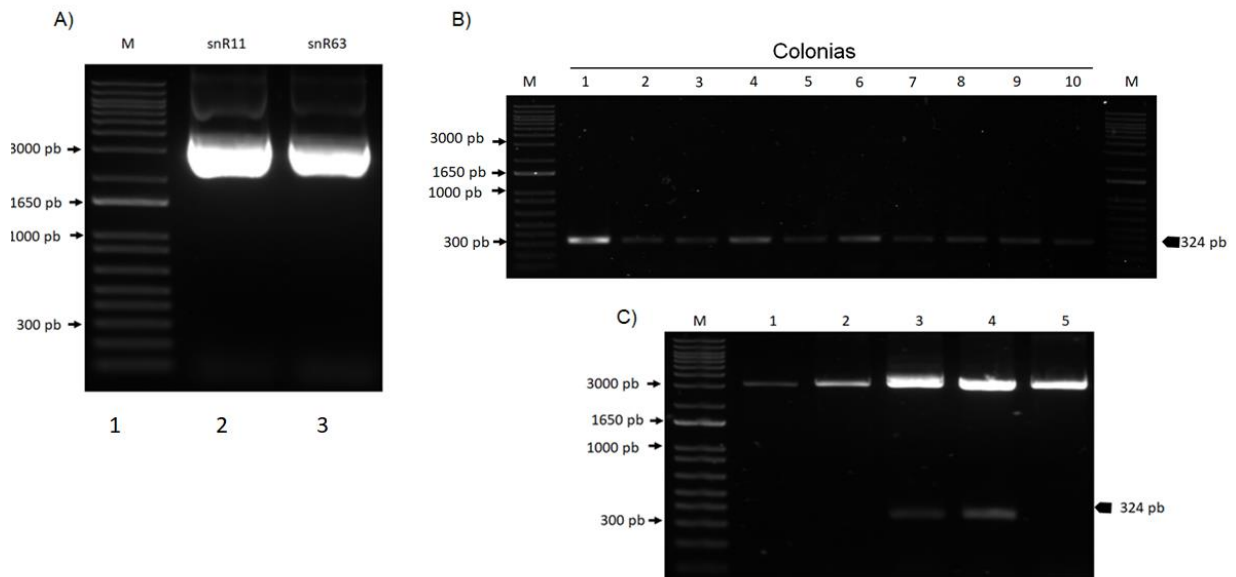


Figura 3.5a. Clonación de la secuencia snR63 en el vector pGEM-T easy. A) Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Carril 1: Marcador de 1Kb; Carril 2: Vector pGEM-T easy + snR11; Carril 3: Vector pGEM-T easy + snR63. B) PCR de colonia de la secuencia snR63. C) Reacción de digestión mediante la enzima EcoR1. Las colonias 3 y 4 liberan la secuencia de intereses del vector pGEM-T easy.

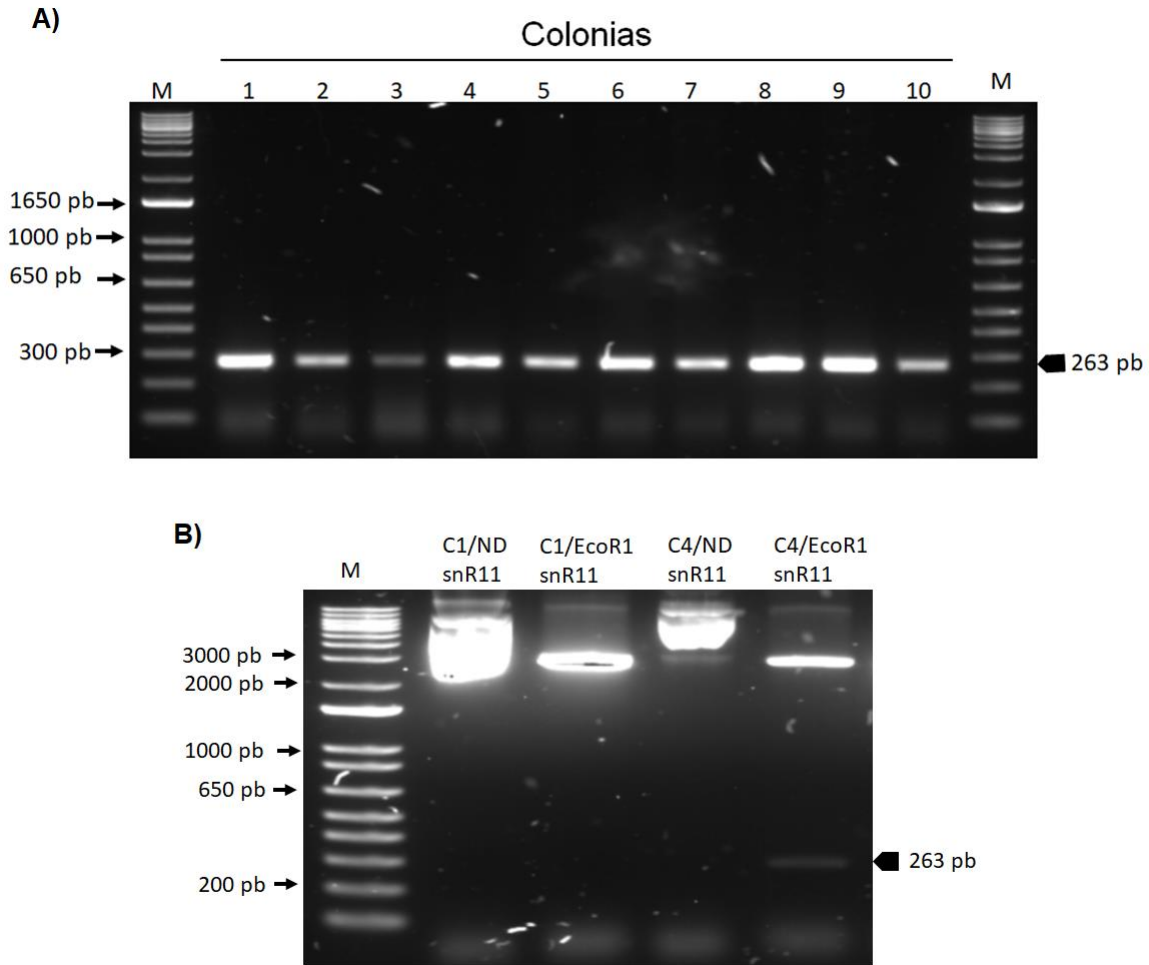


Figura 3.5b. Clonación de la secuencia snR11 en el vector pGEM-T easy. A) PCR de colonia de la secuencia snR11. C) Reacción de digestión mediante la enzima EcoR1. En el carril 5 de la colonia 4 se observa la liberación del fragmento snR11 del vector pGEM-T easy. ND: No digerido; C1: Colonia 1; C4: Colonia 4.

3.6 Interacción de los ARNs con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato mediante ensayos de pull-down.

Para determinar si los ARNs snR11 y snR63 interactúan con el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato se realizó un ensayo de pull-down utilizando perlas de agarosa compuestas por PIP₂, seguido de un ensayo de RT-PCR, donde se confirmó la interacción ARN-Lípido. El resultados mostrado en la figura 3.6 indica la interacción entre el snR11 y snR63 con PI(4,5)P₂. Para realizar el ensayo de pull-down se usaron perlas recubiertas de PI(4,5)P₂ y perlas de agarosa sin PI(4,5)P₂ como Control. Se observó que en los carriles 1, 2, 4 y 5

tanto en perlas control como perlas recubiertas de PI(4,5)P₂, la presencia de snR11 (figura 3.6 A) y snR63 (figura 3.6 B). Además, se observó una mayor intensidad de la banda del carril 6 de la figura 3.6A y 3.6B, el cual indica una interacción con el snR11 y snR63, respectivamente.

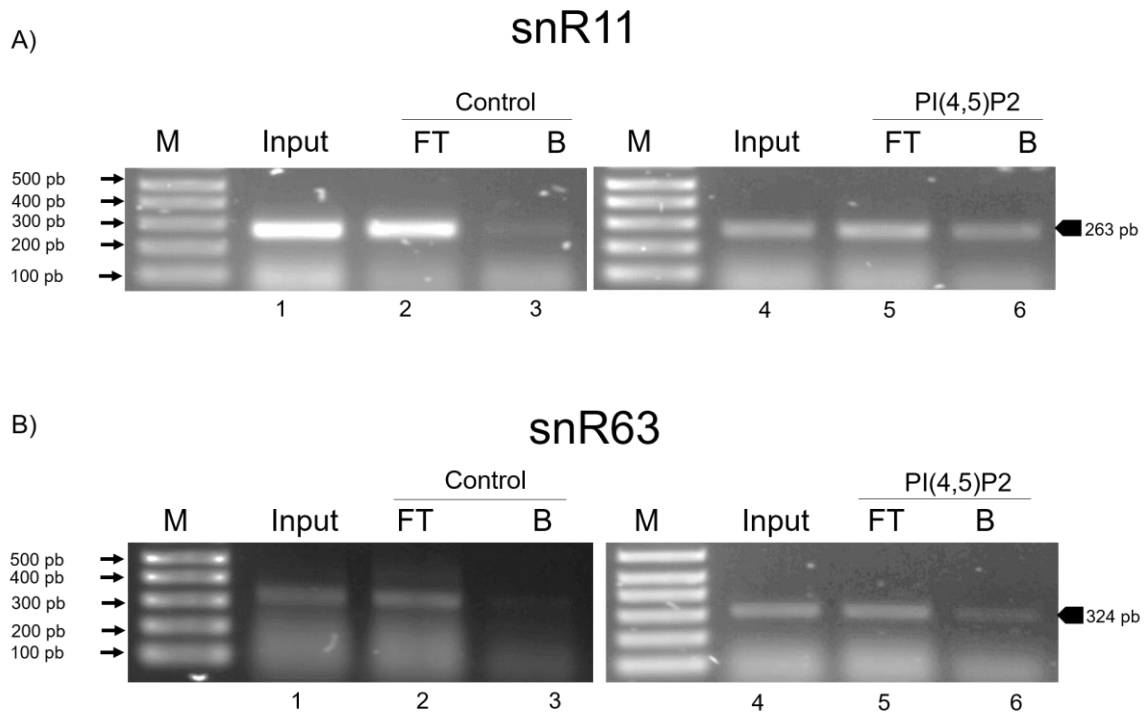


Figura 3.6. Interacción entre Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato con snR11 y snR63 mediante ensayos de pull-down *in vitro*. A) PCR de snR11 con perlas de agarosa sin lípidos (control) y perlas recubiertas con PI(4,5)P₂. B) PCR de snR63 con perlas control y perlas de agarosa recubiertas de PI(4,5)P₂, respectivamente. M; Marcado de 1Kb; Input: Buffer de incubación antes de la incubación; FT: buffer de incubación después de la incubación; B: Perlas; Control: perlas de agarosa sin PI(4,5)P₂; PI(4,5)P₂: perlas de agarosa recubiertas de PI(4,5)P₂

DISCUSIÓN

Durante los últimos 30 años, los ARN largos no codificantes comenzaron a llamar la atención debido a la forma de interaccionar con diversas macromoléculas como el ADN, ARN, Proteínas (Hu et al 2018. Lin et al., 2017 demostró que existen lncRNAs con interacción a lípidos de membrana en especial con PI(3,4,5)P3, sin embargo se carece de información de la interacción entre lncRNA y PI(4,5)P2. La presencia de PI(4,5)P2 nuclear es un componente principal para la biogénesis del ARNr donde se ha demostrado que funciona como un andamio para el complejo de la Pol I, al igual que se ha demostrado la unión entre PI(4,5)P2 junto con fibrilarina en el procesamiento del ARNr, de igual forma se conoce que la presencia de los fosfoinositidos afecta la actividad ribonucleasa de fibrilarina y que la liberación de fibrilarina-snoRNA U3 es provocada por el ácido fosfatídico (Sobol *et al* 2013; Guillen-Chable *et al* 2020), sin embargo muy poco se sabe sobre la interacción de esta molécula con ARNs.

Por eso en este trabajo se identificó dos ARN largos no codificantes pertenecientes a *S. cerevisiae* de nombre snR11 y el snR63 con interacción a PI(4,5)P2. Al realizarse los alineamientos con las secuencias snR11 y snR63 se encontraron posibles motivos de unión fosfatidilinositol al comparar la secuencia de unión a PI(3,4,5)P3 previamente reportada. Adicionalmente se identificaron snoRNAs de diferentes especies que contienen un posible motivo de unión a fosfoinositidos. La presencia de PI(4,5)P2 en los diferentes compartimientos nucleares se encuentra bien descrita (Sobol *et al* 2018), sin embargo, se desconoce si existe algún tipo de lncRNA que interaccione de manera directa con PI(4,5)P2 nuclear. Mediante métodos *in silico* y ensayos de pull-down *in vitro* que snR11 y snR63 muestran que es posible que pueda estar involucrado en la metilación o pseudouridilación del ARNr. Yildirim *et al* 2013, reporta la presencia PI(4,5)P2 nuclear y fibrilarina en el centro fibrilar (FC) y el componente fibrilar denso (DFC), Al igual se sabe que los snoRNAs de caja C/D participan directamente con proteínas nucleares como lo es fibrilarina esto para llevar a cabo la metilación de ARNr.

Osborne *et al* 2001 reporta que el PI(4,5)P2 se une a la ARN polimerasa II solo en forma hiperfosforilada lo que sugiere un papel clave para la transcripción del pre-ARNm. Se ha demostrado que existe un lncRNA llamado ARN 1 NO CODIFICADOR LARGO INDUCIDO POR ELF18 que interactúa con fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* y el complejo MED19a en el nucleoplasma y núcleo (Seo et al 20119). Por lo tanto, en este trabajo se demuestra que existen ARNs no codificantes que interactúan con PI(4,5)P2 que

pueden estar formando complejos junto con las proteínas nucleolares que realizan la metilación y pseudouridilación del ARNr.

Conclusiones

- Mediante los análisis de secuencias, se identificaron snoRNAs que cuentan con un posible motivo de unión a fosfoinositidos
- El análisis filogenético mostro que el snoRNA de *C. elegans* 300032_B0213.18 comparte una similitud con el snR11 de *S. cerevisiae*.
- El ensayo de pull-down mediante perlas de agarosa recubiertas de lípidos demostró que el snR11 y snR63 interactúa con el PI(4,5)P2.

PERPECTIVAS

- El vector pGEM-T:snR11 y pGEM-T:snR63 servirán para ensayos de transcripción *in vitro* y así reforzar los resultados dados en esta tesis de investigación.
- Realizar mutaciones en el motivo de unión a lípidos encontrados mediante el alineamiento de secuencias.
- Determinar si el snR63, Fibrilarina y PI(4,5)P2 se encuentran interactuando juntos en el nucléolo.

BIBLIOGRAFIA

Amin, N., McGrath, A., & Chen, Y.-P. P. (2019). Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. *Nature Machine Intelligence*, 1(5), 246–256. <https://doi.org/10.1038/s42256-019-0051-2>

Balakin, A. G., Smith, L., & Fournier, M. J. (1996). The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*, 86(5), 823–834. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80156-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80156-7)

Boisvert, FM., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. et al. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574–585. <https://doi.org/10.1038/nrm2184>

Ching, T., Masaki, J., Weirather, J. et al. (2015). Non-coding yet non-trivial: a review on the computational genomics of lincRNAs. *BioData Mining* 8, 44 <https://doi.org/10.1186/s13040-015-0075-z>

Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuvanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology*, 112, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>

Djebali, S., Davis, CA, Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, GK, Khatun, J., Williams, BA, Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, RF, Alioto, T.,... Gingeras, TR (2012). Paisaje de transcripción en células humanas. *Nature*, 489 (7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>

Donia, T., Jyoti, B., Suizu, F., Hirata, N., Tanaka, T., Ishigaki, S., F, P., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Chiorini, J. A., & Noguchi, M. (2019). Identification of RNA aptamer which specifically interacts with PtdIns(3)P. *Biochemical and biophysical research communications*, 517(1), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.034>

Du Mee, D., Ivanov, M., Parker, J. P., Buratowski, S., & Marquardt, S. (2018). Efficient termination of nuclear lincRNA transcription promotes mitochondrial genome maintenance. *eLife*, 7, e31989. <https://doi.org/10.7554/eLife.31989>

Dragon, F., Lemay, V., & Trahan, C. (2006). snoRNAs: Biogenesis, Structure and Function. Encyclopedia of Life Sciences. <https://doi:10.1038/npg.els.0003813>

Hadjiolov, A.A. (1985). The Nucleolus and Ribosome Biogenesis, Vienna: Springer-Verlag.

Huang, S., Lifshitz, L., Patki-Kamath, V., Tuft, R., Fogarty, K., & Czech, M. P. (2004). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Molecular and cellular biology*, 24(20), 9102–9123. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.9102-9123.2004>

Gardner, P. P., Bateman, A., & Poole, A. M. (2010). SnoPatrol: how many snoRNA genes are there?. *Journal of biology*, 9(1), 4. <https://doi.org/10.1186/jbiol211>

Grixti, J. M., & Ayers, D. (2020). Long noncoding RNAs and their link to cancer. *Non-coding RNA research*, 5(2), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2020.04.003>

Guillen-Chable, F., Corona, U. R., Pereira-Santana, A., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., Aquino, C., Šebestová, L., Vitale, N., Hozak, P., & Castano, E. (2020). Fibrillar Ribonuclease Activity is Dependent on the GAR Domain and Modulated by Phospholipids. *Cells*, 9(5), 1143. <https://doi.org/10.3390/cells9051143>

Irvine, R. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 349–361 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrm1100>

Kiss T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, 109(2), 145–148. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00718-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00718-3)

Ko, T. K., Kelly, E., & Pines, J. (2001). CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *Journal of cell science*, 114(Pt 14), 2591–2603.

Lamond, A. I., & Spector, D. L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(8), 605–612. <https://doi.org/10.1038/nrm1172>

Lestrade L, Weber MJ. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue): D158-D162. doi:10.1093/nar/gkj002

Lowe, T. M., & Eddy, S. R. (1999). A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science* (New York, N.Y.), 283(5405), 1168–1171. <https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1168>

Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X. P., Zhang, B. X., & Chu, L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 587. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00587>

Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., Wang, S., Park, P. K., Marks, J. R., Zhou, Y., Zhou, J., Hung, M. C., Liang, H., Hu, Z., Shen, H., Hawke, D. H., ... Yang, L. (2017). The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P₃ to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nature cell biology*, 19(3), 238–251. <https://doi.org/10.1038/ncb3473>

Miyagawa, R., Tano, K., Mizuno, R., Nakamura, Y., Ijiri, K., Rakwal, R., Shibato, J., Masuo, Y., Mayeda, A., Hirose, T., & Akimitsu, N. (2012). Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles. *RNA* (New York, N.Y.), 18(4), 738–751. <https://doi.org/10.1261/rna.028639.111>

Osborne, S. L., Thomas, C. L., Gschmeissner, S., & Schiavo, G. (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *Journal of cell science*, 114(Pt 13), 2501–2511.

Phan, T. K., Williams, S. A., Bindra, G. K., Lay, F. T., Poon, I., & Hulett, M. D. (2019). Phosphoinositides: multipurpose cellular lipids with emerging roles in cell death. *Cell death and differentiation*, 26(5), 781–793. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0269-2>

Yao, R. W., Wang, Y., & Chen, L. L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature cell biology*, 21(5), 542–551. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>

Schattner, P., Decatur, W. A., Davis, C. A., Ares, M., Jr, Fournier, M. J., & Lowe, T. M. (2004). Genome-wide searching for pseudouridylation guide snoRNAs: analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic acids research*, 32(14), 4281–4296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh768>

Seo, J. S., Diloknawarit, P., Park, B. S., & Chua, N. H. (2019). ELF18-INDUCED LONG NONCODING RNA 1 evicts fibrillarin from mediator subunit to enhance PATHOGENESIS-

RELATED GENE 1 (PR1) expression. *The New phytologist*, 221(4), 2067–2079. <https://doi.org/10.1111/nph.15530>

Shaw, P., & Brown, J. (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant physiology*, 158(1), 44–51. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188052>

Sobol, M., Yildirim, S., Philimonenko, V. V., Marášek, P., Castaño, E., & Hozák, P. (2013). UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 4(6), 478–486. <https://doi.org/10.4161/nucl.27154>

Sobol, M., Krausová, A., Yildirim, S., Kalasová, I., Fáberová, V., Vrkoslav, V., Philimonenko, V., Marášek, P., Pastorek, L., Čapek, M., Lubovská, Z., Uličná, L., Tsuji, T., Lísa, M., Cvačka, J., Fujimoto, T., & Hozák, P. (2018). Nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate islets contribute to efficient RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of cell science*, 131(8), jcs211094. <https://doi.org/10.1242/jcs.211094>

Spector, D. L., & Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(2), a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>

Tay, L. W., Wang, Z., & Du, G. (2017). Analysis of Phosphatidic Acid Binding and Regulation of PIPKI In Vitro and in Intact Cells. *Methods in enzymology*, 583, 359–374. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.043>

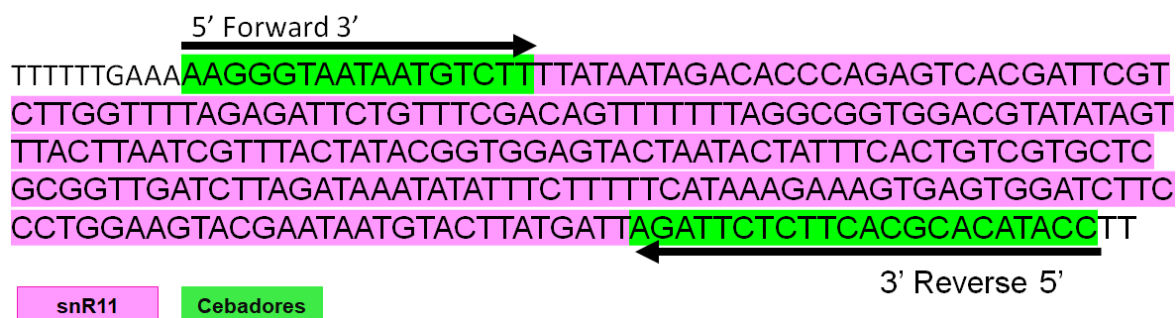
Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P. E., Teulières, F., & Gas, N. (2000). Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Molecular biology of the cell*, 11(6), 2175–2189. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.6.2175>

Yildirim, S., Castano, E., Sobol, M., Philimonenko, V. V., Dzijak, R., Venit, T., & Hozák, P. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of cell science*, 126(Pt 12), 2730–2739. <https://doi.org/10.1242/jcs.123661>

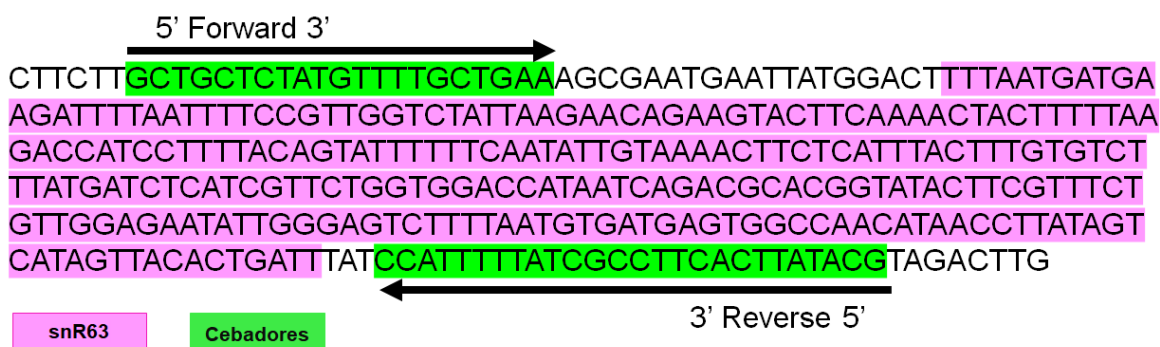
Zimta, A. A., Tigu, A. B., Braicu, C., Stefan, C., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2020). An Emerging Class of Long Non-coding RNA With Oncogenic Role Arises From the snoRNA Host Genes. *Frontiers in oncology*, 10, 389. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00389>

Anexos

Anexo I. Cebadores utilizados

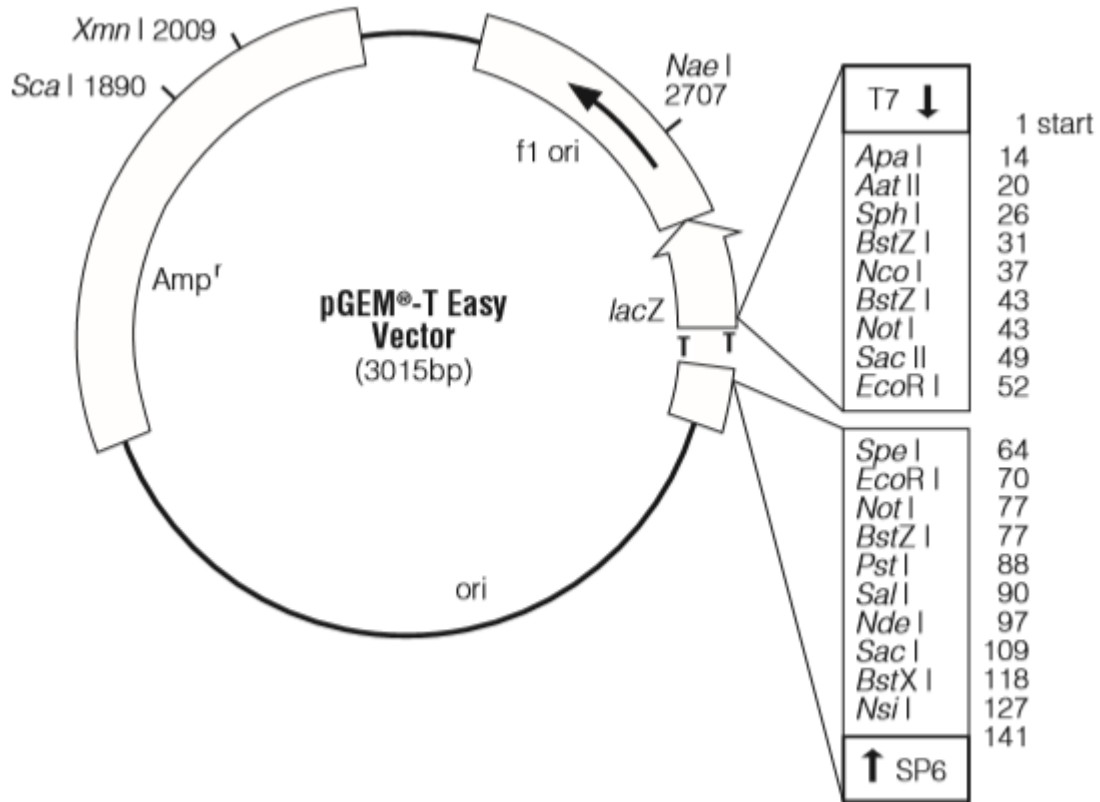


Cebador	Longitud	Contenido de GCs %	Temperatura C°	Secuencia
Forward	22	45%	53°C	GCCGC AAGGGTAATAATGTCTT
Reverse	22	45%	53°C	GGTATGTGCGTGAAGAGAATCT



Cebador	Longitud	Contenido de GCs %	Temperatura C°	Secuencia
Forward	21	43%	50.5°C	GCTGCTCTATGTTTTGCTGAA
Reverse	26	38%	54.8°C	CGTATAAGTGAAGGCGATAAAAAATGG

Anexo II. pGEM-T Easy vector de promega (3015 pb)



Vector linealizado de 3015 pb cuenta una timina en los extremos 3' terminal, de igual forma se cuenta con sitios de restricción que flanquean el sitio de clonación. La reacción de ligación puede llevarse a cabo en 1 hora a temperatura ambiente. Este vector cuenta con el promotor T7 y SP6.

Anexo III. Células competentes *E. coli* DH5 α

1. Incubar células de *E. coli* a una temperatura de 37°C durante 16 horas en placas de cultivo LB.
2. Transferir una colonia a 3 mL de medio LB e incubar a 37°C con agitación constante a 200 rpm toda la noche (10 horas).
3. Transferir 0.5 mL de cultivo a 100 ml de medio LB e incubar a 37°C con agitación hasta que la densidad óptica a 590 nm sea de 0.3 a 0.4, durante 2 horas.
4. Transferir 100 mL de células a un tubo estéril y mantenerlo por 10 min a 4°C.
5. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min.
6. Decantar el sobrenadante y re suspender el paquete celular en 25 mL de CaCl₂ estéril y frío (0.1 M).
7. Incubar el tubo en hielo durante 2 horas sin agitación a 4°C
8. Centrifugar a 4500 rpm por 8 min a 4°C, decantar el sobrenadante.
9. Re suspender en microtubos el paquete celular en 1-2 mL de CaCl₂ estéril y frío (0.1 M).
10. Las células competentes pueden ser usadas inmediatamente o almacenadas a 4°C

Anexo IV. Extracción de ADN plasmídico

1. Partir de 3 mL de cultivo previamente incubado toda la noche con Ampicilina.
2. Centrifugar durante 5 minutos a 4500 g. Remover el sobrenadante
3. Re suspender el precipitado en 100 μ L de solución I.
4. Agregar 100 μ L de solución II (previamente realizada). Mezclar por inversión de tubos aproximadamente 15 veces. Dejar reposar 5 minutos en hielo.
5. Agregar 300 μ L de solución III. Mezclar por inversión de tubos 15 veces.
6. Centrifugar a 12000 g durante 5 minutos.
7. Agregar 2.5 veces de volúmenes de etanol absoluto 100% e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos.
9. Decantar el sobrenadante.
10. Lavar el precipitado con 500 μ L de etanol al 75%, realizar un pequeño vortex y centrifugar a 12000 g durante 4 min.
11. Repetir de nuevo el paso 10.
12. Decantar el sobrenadante cuidadosamente. Dejar secar durante 10 minutos y posteriormente re suspender en 35 μ L de agua libre de nucleasas.
13. Realizar un vortex, centrifugar y agregar 1 μ L de RNAsa A (10 mg/ml).
14. Almacenar a 4°C

SOLUCIÓN		
I	II	III
Glucosa 50 mM	NaOH 0.2 N	Acetato de potasio 3M
Tris/base (pH 8) 25 mM	SDS 1%	Ácido Acético
EDTA (pH) 10 mM		Agua destilada y estéril.