



Universiteit Utrecht

Faculteit Natuurwetenschappen
Departement der Biologie, Moleculaire Plantenfysiologie
H.R. Kruytgebouw, 4e verdieping
Padualaan 8
3584 CH Utrecht
+31 30 253 3172 / 3584

De rol van microRNA's en lange niet-coderende RNA's in de bloei-inductie van *Arabidopsis*

Bachelorscriptie
Dennis Kerckhoffs, 3213099
Scriptiebegeleider: Dr. Marcel Proveniers

Utrecht, april 2011

INHOUDSOPGAVE

HOOFDSTUK 1. INLEIDING	3
HOOFDSTUK 2. DE ROL VAN MIRNA'S IN DE JUVENIELE-ADULTE FASEOVERGANG	6
miR156 in de juveniele fase van <i>Arabidopsis</i>	6
<i>Box 1. RNAi synthese en werkingsmechanisme</i>	7
miR156 inhibeert de SPL-familie	8
De regulatie van miR172	11
Omgevingstemperatuur heeft invloed op miR172	12
GIGANTEA stabiliseert miR172	13
miR156 en miR172 in samenspel	15
HOOFDSTUK 3. NIEUWE SPELERS IN HET VELD: LANGE NIET-CODERENDE RNA'S	17
De vernalisatie van <i>FLC</i>	18
<i>Box 2. Chromatinemodificatie</i>	19
Lange ncRNA's leiden de weg	21
HOOFDSTUK 4. CONCLUSIE	24
BIBLIOGRAFIE	25

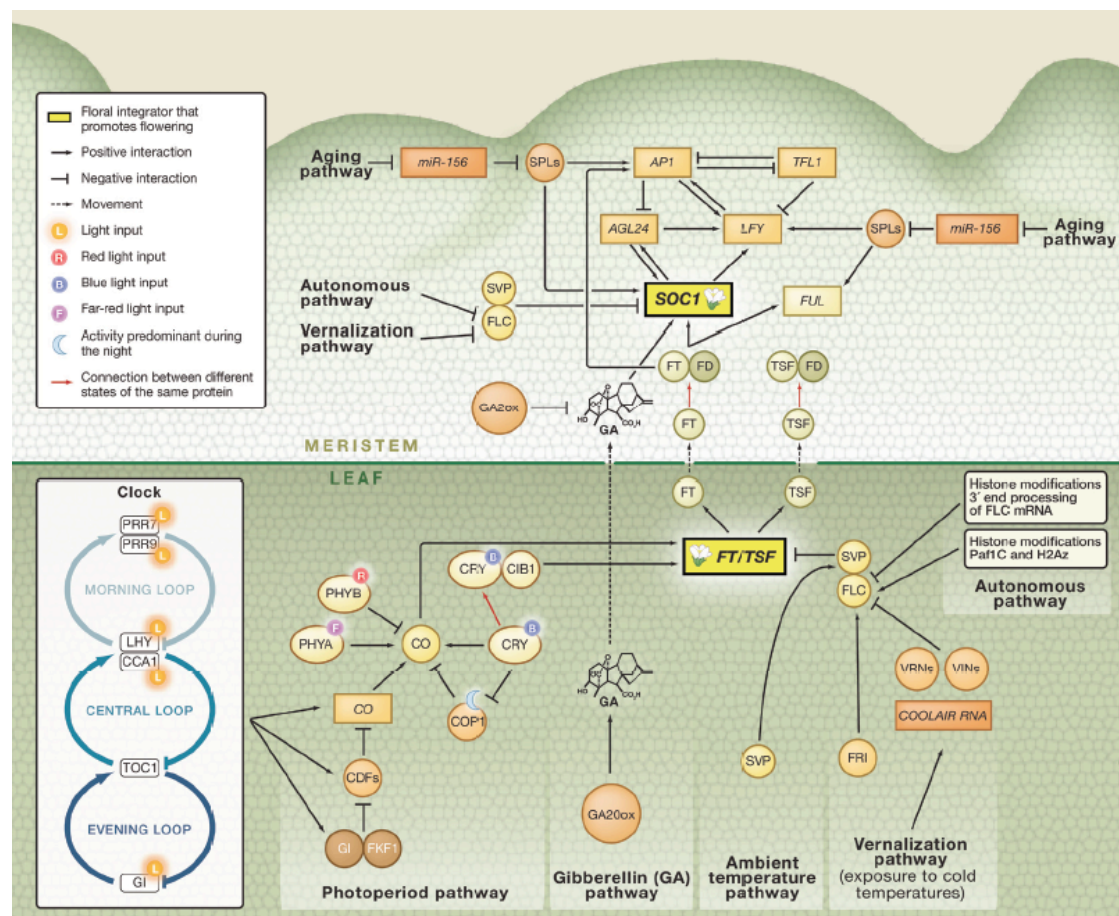
HOOFDSTUK 1. INLEIDING

Het is belangrijk voor iedere individuele plant, alsmede voor de gehele soort, dat het tijdstip van bloei nauwkeurig wordt gereguleerd (Devlin 2007), want bloei is essentieel voor de reproductie en het voortbestaan van de plant(soort). Tevens is inzicht in bloeiregulatie interessant vanuit een agrarisch-economisch perspectief. Dankzij evolutionaire overlevingsmechanismen is het succes van voortplanting, rekening houdend met de breedtegraad, veranderende seizoenen en de beschikbaarheid van bestuivers (Devlin 2007), onder een grote verscheidenheid van omgevingscondities geoptimaliseerd (Amasino 2010). Er zijn drie verschillende groepen waarin bloeiende planten op basis van hun bloeiregulatie kunnen worden opgedeeld: autonome, obligate en facultatieve responders (Devlin 2007). Planten met een autonome regulatie zijn enkel afhankelijk van interne stimuli. In tegenstelling daarvan gaan obligate planten alleen op externe stimuli af. De derde categorie bestaat uit facultatieve planten die op zowel interne als externe stimuli reageren, maar wanneer de externe stimuli te lang uitblijven zal de plant na een lange groeiperiode toch overgaan tot bloei. *Arabidopsis thaliana* is een voorbeeld van een facultatieve responder.

Voordat een plant bloeien kan, zal hij daarvoor competent moeten zijn. De signaleringsroutes betrokken bij bloeiregulatie zorgen ervoor dat de plant dit stadium van bloeicompetentie bereikt via een aantal strak gereguleerde faseovergangen. De laatste fase, waarin bloeicompetentie bereikt wordt, heet de reproductieve fase. Na ontkieming bevindt de plant zich eerst in een vegetatieve fase waarin groei centraal staat. Binnen deze vegetatieve fase zal de plant eerst de transitie van juveniele naar adulte fase moeten maken, voordat de overgang van vegetatieve naar reproductieve fase kan plaatsvinden (Bäurle and Dean 2006).

Iedere faseovergang heeft zijn specifieke regulerende moleculen (eiwitten en niet-coderende RNA's (ncRNA)) die gekoppeld zijn aan de verschillende soorten stimuli en signaleringsroutes. Er zijn vijf verschillende signaleringsroutes bekend die betrokken zijn bij de bloeiregulatie (Fornara, de Montaigu and Coupland 2010) : de vernalisatieroute, de fotoperioderoute, een gibberelline-gemedieerde route (GA),

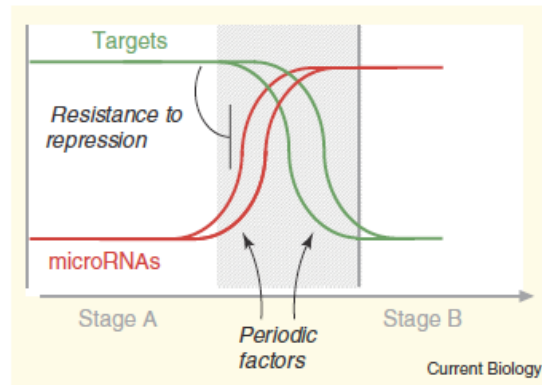
een thermosensorische route en een leeftijdsafhankelijke route (fig. 1). In totaal zijn ongeveer 180 genen verschillende genen actief binnen deze vijf routes (Zhu and Helliwell 2011). Zoals in Figuur 1 duidelijk te zien is werkt geen enkele pathway in isolatie (Devlin 2007) ; bloei wordt strak gereguleerd door een complex netwerk waarbij de endogene en exogene factoren interacteren, de signaleringsroutes voorzien zijn van feedback loops en veel moleculen (gedeeltelijk) overlappende functies hebben.



Figuur 1 Overzicht van de vijf bekende signaleringsroutes en de belangrijkste bijbehorende moleculen (eiwitten en ncRNA's) die betrokken zijn bij de bloeiregulatie van *Arabidopsis thaliana*. In deze scriptie zullen o.a. de thermosensorische route met SVP en miR172, de leeftijdsafhankelijke route met miR156 en de SPLs en de vernalisatieroute met FLC en COOLAIR aan bod komen (Fornara, de Montaigu and Coupland 2010).

miRNA's staan er om bekend dat ze een regulerende functie vervullen in de ontwikkeling van zowel dieren als planten. Dit geeft aanleiding aan te nemen dat miRNA's een rol zouden kunnen spelen binnen de bloeiregulatie, een zeer belangrijk en genuanceerd onderdeel van de plantontwikkeling. Moss (2007) heeft een algemeen geconserveerd ontwikkelingsmodel opgesteld waarbij micro-RNA's (miRNA's) een prominente rol spelen in de regulatie en timing van faseovergangen.

Dit model is ontworpen naar aanleiding van onderzoek naar ontwikkelingsregulatie in de rondworm *Caenorhabditis elegans*, maar is volgens Moss aldus geconserveerd in alle dieren. Hij stelt een heterochronische pathway voor met een miRNA-target cascade: sleuteleiwitten reguleren specifieke processen, wat leidt tot de expressie van bepaalde miRNA's die de sleuteleiwitten uitschakelen met een faseovergang als gevolg. Daarnaast blijken feedback loops, drempelwaarden en periodieke factoren de regulatie van transitie te nuanceren (Moss 2007) (fig. 2).



Figuur 2 Schematisch (vereenvoudigd) overzicht van een ontwikkelingsmodel voor de timing van faseovergang. (Moss 2007)

Studies uit de afgelopen jaren hebben aangetoond dat miRNA's en andere kleine endogene RNA's ook betrokken zijn bij faseovergangen gedurende de ontwikkeling van planten (Wu and Poethig 2006). In *Arabidopsis thaliana* zijn de miRNA's – miR156 en miR172 – gevonden (Wu et al. 2009). Daarnaast heeft zeer recent onderzoek lange niet-coderende RNA's (ncRNA's) – COOLAIR (De Lucia and Dean 2010) en COLDAIR (Heo and Sung 2011) – ontdekt die betrokken zijn bij de regulatie van bloei-inductie in *Arabidopsis*.

Deze scriptie is opgezet met als doel de functie van deze miRNA's en lange ncRNA's in kaart te brengen en te kijken of ze onderdeel zijn van een soortgelijk ontwikkelingsmodel als dat van Moss. Met andere woorden om een antwoord te geven op de probleemstelling: welke rol spelen miRNA's – miR152 en miR172 – en lange niet-coderende RNA's – COOLAIR en COLDAIR – in de faseovergangen van bloei-inductie in *Arabidopsis thaliana*?

De miRNA's en lange ncRNA's zullen los van elkaar aan bod komen; ieder in hun eigen hoofdstuk.

HOOFDSTUK 2. DE ROL VAN MIRNA'S IN DE JUVENIELE-ADULTE FASEOVERGANG

De ontdekking van miRNA's in planten – in 2002 – heeft veel teweeg gebracht in het discours van de plantenbiologie met name binnen dat van de plantontwikkeling (Nag and Jack 2010). Sindsdien zijn er veel nieuwe functies voor deze kleine niet-coderende RNA's ontdekt. miRNA's zijn rond de 21-nucleotiden lang en reguleren genen posttranscriptioneel door middel van complementaire binding met het target mRNA. Het gevolg is mRNA degradatie of translationele onderdrukking (Nag and Jack 2010). (Zie *Box 1. RNAi synthese en werkingsmechanisme* voor meer achtergrondinformatie over de synthese, functie en werking van miRNA's.)

miRNA's blijken ook een belangrijke rol te spelen tijdens de ontwikkeling van planten. Dit is in overeenstemming met het eerder genoemde ontwikkelingsmodel van Moss. Van twee miRNA's is bekend dat zij een specifieke functie vervullen gedurende bloei regulatie van *Arabidopsis* (en mais) en wel bij de vegetatieve faseovergang (Nag and Jack 2010). Deze twee miRNA's zijn: miR156 en miR172.

miR156 in de juveniele fase van *Arabidopsis*

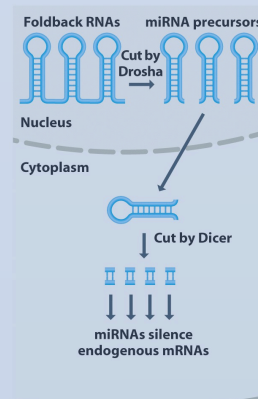
miR156 wordt in *Arabidopsis* en mais in hoge concentraties aangetoond tijdens de scheutontwikkeling. Tijdens de juveniele-adulte faseovergang daalt de expressie van miR156 echter drastisch (Yang, Conway and Poethig 2011). Uit verschillende onderzoeken die met miR156 zijn uitgevoerd blijkt dat wanneer *MIR156* constitutief tot expressie komt de juveniele fase verlengd wordt. Indien *MIR156* activiteit echter gereduceerd wordt, volgt een versnelde transitie naar de adulte fase (Wu and Poethig 2006; Wu et al. 2009). Hieruit is af te leiden dat miR156 een sleutelrol vervult tijdens de juveniele-adulte faseovergang in *Arabidopsis*.

Het ontbrak voor de ontdekking van miR156 als sleutelregulator in de vegetatieve faseovergang aan eenduidige kenmerken om de verschillende fases van elkaar te onderscheiden. Morfologische kenmerken als bladvorm en klierhaarproductie aan de abaxiale zijde van het blad werden gebruikt, maar deze zijn, of niet altijd even duidelijk te determineren, zoals bladvorm, die misleidend kan

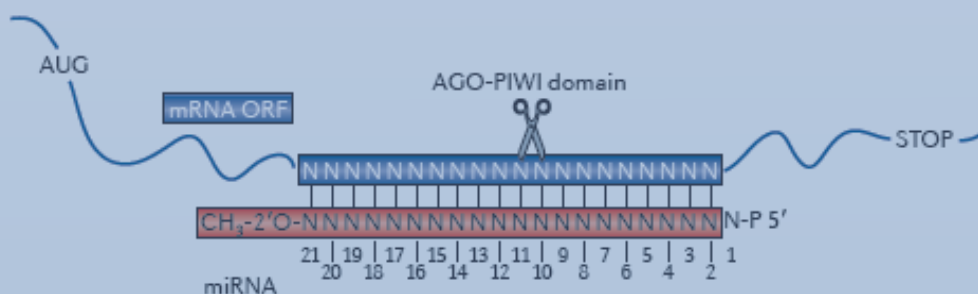
Box 1. RNAi synthese en werkingsmechanisme

RNAi is voor het eerst ontdekt in *C. Elegans* in de jaren '90 en waren betrokken bij de regulatie van ontwikkelingsfasen (Nag and Jack 2010). Daarbij werd afgeweken van het centrale dogma waarbij informatie overdracht plaats vindt van DNA naar RNA naar eiwit (Aberts et al. 2008). Sindsdien is gebleken dat RNAi in bijna alle eukaryoten voorkomt en verschillende werkingsmechanismen kent, zoals short interference RNA's (siRNA's) en microRNA's (miRNA's) (Brown 2007). RNA polymerase II is naast mRNA synthese verantwoordelijk voor de transcriptie van foldback RNA's die net als mRNA worden verwerkt met een 5'-cap en een 3'-poly(A)-staart (Nag and Jack 2010, Aberts et al. 2008). Foldback RNA's zijn in staat intrastrengige base paren aan te gaan met als gevolg de vorming van een of meer interne hairpin structuren (fig. 3). In de celkern knipt het enzym Drosha het foldback RNA in individuele hairpins (Brown 2007), de zogeheten pri-miRNA's. Deze pri-miRNA hairpins transporteren naar het cytoplasma. Het dubbelstrengige RNA molecuul wordt herkend door één van de vier soorten Dicer enzymen van *Arabidopsis*: DCL1 (Nag and Jack 2010). Vervolgens knipt DCL1 het pri-miRNA molecuul in circa 21-nucleotide lange fragmenten (Brown 2007), waarbij een van de twee strengen degradeert. Het overgebleven fragment is in staat tot complementaire binding met een mRNA molecuul resulterend in diens degradatie door klieving of in translationele onderdrukking (Campbell and Reece 2005). Klieving is irreversibel en waarschijnlijk belangrijk bij differentiatie, terwijl translationele onderdrukking reversibel is en eerder betrokken is in fine-tuning (Nag and Jack 2010).

Voordat het miRNA kan binden aan een complementaire sequentie wordt het eerst opgenomen in het *RNA-induced silencing complex* (RISC). Het RISC bestaat uit een aantal verschillende eiwitten waaronder een RNA-bindingseiwit uit de Argonaut familie en een nuclease (mogelijk Argonaut zelf) dat het target mRNA knipt en daarmee inactieveert (Nag and Jack 2010, Brown 2007). De target bindingsplaatsen van miRNA bevinden zich in planten over het algemeen in de coderende regio (ORF) van het mRNA transcript (Zhu and Helliwell 2011) en de interactie tussen mRNA:miRNA is (bijna altijd) volledig complementair. Het centrale dogma van het werkingsmechanisme van RNAi in planten is klieving, waarbij de door AGO gemedeerde klieving tussen nucleotiden 10 en 11 plaats vindt (fig. 4) (Huntzinger and Izaurralde 2011). Recent zijn ook voorbeelden van translationele onderdrukking in planten gevonden (Huntzinger and Izaurralde 2011; Zhu and Helliwell 2011).



Figuur 3. De synthese van miRNA (Brown 2007, p.374)



Figuur 4. De bindingsplaatsen van miRNA bevinden zich in planten in het ORF van het doelwit mRNA. De interactie is (bijna altijd) volledig complementair. Klieving door AGO gebeurt tussen nucleotiden 10 en 11. (Huntzinger and Izaurralde 2011)

zijn omdat de lichtintensiteit invloed kan hebben op de vorm van het blad, onafhankelijk van de fase (Yang, Conway and Poethig 2011), of, zoals in het geval van bladbehaving, omdat de kenmerken soortspecifiek zijn (Wu and Poethig 2006). Naar nu blijkt is miR156 in het hele plantenrijk een geconserveerde regulator van de vegetatieve faseovergang (Yang, Conway and Poethig 2011) en kan het het expressiepatroon van *MIR156*, samen met dat van *MIR172*, gebruikt worden als de markers voor de juveniele en adulte fase (Yang, Conway and Poethig 2011; Wang et al. 2011).

Het een en ander is bekend over de onderliggende genetische mechanismen die *MIR156* aansturen en die zorgen voor de vegetatieve faseovergang. Alleen bestaat er nog enige onduidelijkheid over de verantwoordelijke stimuli die de expressie van *MIR156* controleren. Er is aanleiding aan te nemen dat de afname van miR156 met het vorderen van de tijd (de leeftijdsafhankelijke route) het gevolg is van een signaal dat uit de bladprimordia afkomstig is (Wang et al. 2011). De timing van transitie is dan niet afhankelijk van het meristeem, maar van de groeisnelheid van de plant en het aantal bladeren dat deze produceert. Deze laatste zullen gezamenlijk een drempelwaarde moeten overstijgen eer de transitie in gang gezet kan worden. Verder onderzoek zal echter uitsluitsel moeten geven of deze hypothese klopt.

Structureel gezien heeft *MIR156* zes verschillende loci – a t/m f – die allemaal in staat zijn om het 20-nucleotiden lange miR156 te transcriberen, of dit echter *in vivo* gebeurd is onbekend (Wu and Poethig 2006).

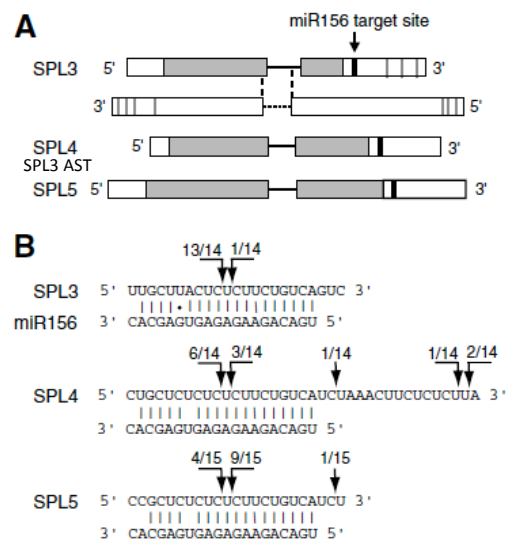
miR156 inhibeert de SPL-familie

Ondanks dat er niet veel, noch met enige zekerheid, bekend is over de regulatie van *MIR156* is wel veel bekend over de gevolgen die miR156 heeft voor de verdere ontwikkeling van *Arabidopsis*, met name voor de bloei-inductie. De belangrijkste doelwitten die miR156 heeft, zijn: de genen van de SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE (SPL)-familie (Yang, Conway and Poethig 2011) en, indirect, via leden van deze familie een ander miRNA, miR172. Als gevolg vertoont *MIR156* een complementair tijdelijk expressiepatroon met de SPL-familie en *MIR172* (Nag and

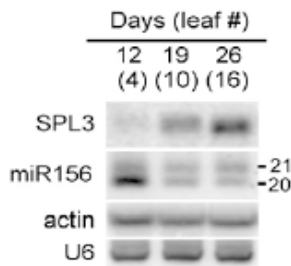
Jack 2010); met andere woorden, wanneer *MIR156* expressie daalt, stijgt *SPL* en *MIR172* expressie. Een patroon dat duidelijk in het model van Moss (2007) past (fig. 6).

De *SPL* familie bestaat uit transcriptiefactoren die allemaal een DNA-bindingsdomein hebben, het zogenaamde SPB-domein (Wu and Poethig 2006). 10 (van de 16) leden van de *SPL*-familie van transcriptiefactoren hebben een bindingsplaats voor *miR156* (*SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13*, *SPL15*) (Wu et al. 2009) en zijn dan ook de directe doelwitten van dit *miRNA*. Als gevolg van binding met *miR156* worden deze tien genen transcriptioneel onderdrukt en zijn zo direct betrokken bij de vertraging van de juveniele naar adulte faseovergang (Fornara and Coupland 2009). Binnen de *SPL*-familie bestaat veel overlap tussen de verschillende transcriptiefactoren en hun functie. Daarom zijn ze ingedeeld in vier hoofdgroepen: *SPL3/4/5*, *SPL2/10/11*, *SPL9/15* en *SPL6/13* (Wu et al. 2009). Als vertegenwoordigers van hun groep zijn *SPL3*, *SPL9* en *SPL10* het meest onderzocht. De functionele overlap in combinatie met hun regulatie door *miRNA*'s maakt het ingewikkeld om hun precieze werking te bepalen. Sinds de ontdekking dat *miR156* deze genen onderdrukt, is meer bekend geworden over hun functie en connectie met de juveniele-adulte faseovergang (Fornara and Coupland 2009). De in de literatuur besproken *SPL*-genen met bekende werking zijn *SPL3*, *SPL4/5*, *SPL9* en *SPL10*.

Zoals in *Box 1*. uiteengezet bevinden de meeste complementaire sequenties van *miRNA*:*mRNA* interacties zich in het ORF van het *mRNA* transcript. *SPL3/4/5* hebben echter een bindingsplaats voor *miR156* in de 3' UTR (fig. 5); daarnaast zijn deze drie *SPL*-transcriptiefactoren sterk verwant aan elkaar (Wu and Poethig 2006). Het *SPL3*



Figuur 5. A) *SPL3*, *SPL4* en *SPL5* zijn structureel gelijk (*SPL3* kent ook ASTs) en (B) bevatten klievingsplaatsen voor *miR156*. De witte delen zijn niet-getransleerde sequenties; de grijze delen zijn coderende sequenties; de grijze verticale lijntjes geven start of polyadenylatie plaats aan (Wu, Poethig 2006)



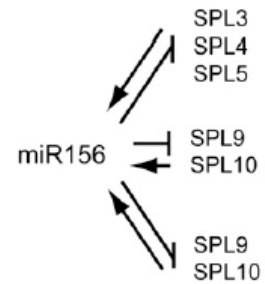
Figuur 6. Tijdelijk complementair expressiepatroon van SPL3 en miR156. De dagen staan gelijk aan de faseovergangen. Tot dag 12 is de juveniele fase, dag 19 is tijdens de overgang en dag 26 markeert de adulte fase. miR156 is sterk aanwezig in de juveniele fase. Daarna echter neemt het transcript drastisch af. Tegelijkertijd is SPL3 afwezig in de juveniele fase, maar neemt toe tijdens de transitie. (Actine is de controle voor SPL3 en U6 voor miR156.) (Wu and Poethig 2006).

eiwit bestaat uit 131 aminozuren, SPL4 en SPL5 zijn iets groter, 174 en 181 aminozuren, respectievelijk (Wu and Poethig 2006). Het *SPL3* locus transcribeert een sense-transcript (ST) met één 5' end-cap en meerdere poly(A)-staarten in de 3' UTR (fig. 5). In alle mogelijke gevallen blijft de miR156 target site binnen het transcript ongeveer 50 nucleotiden na het stopcodon. Voor SPL4 en SPL5 geldt dat ze maar één mogelijke poly(A) site hebben. Alle drie SPL3/4/5 worden gekliefd in het midden van hun miR156 target site (fig. 5) en daarmee zorgt miR156 voor hun degradatie. Ook zijn er voor *SPL3* een aantal antisensetranscripten (AST) van ~950 nucleotiden gevonden (Wu, Poethig 2006) (fig. 5).

Onderzoek heeft aangetoond dat de SPL3 concentratie toeneemt als het SPL3-transcript ongevoelig wordt gemaakt voor miR156 middels 7 mutaties in de bindingsplaats (Wu and Poethig 2006). Hiermee is aangetoond dat *SPL3* onder directe regulatie staat van miR156. Tevens bleek dat de planten in kwestie eerder de adulte fase bereikten. Dit betekent dat SPL3 een belangrijke regulator van deze transitie is. In hetzelfde onderzoek werd gedemonstreerd dat SPL4 en SPL5 een overlappende functie hebben in de versnelling van de juveniele-adulte fase overgang.

De targetgenen van SPL4/5 zijn niet bekend, maar er zijn wel een aantal doelwitten van SPL3 bekend. SPL3 is aangetoond drie genen te activeren: *LEAFY* (*LFY*), *FRUITFULL* (*FUL*) en *APETALA1* (*AP1*). Deze geconserveerde transcriptiefactoren spelen een rol bij de meristeem identiteitstransitie. Dit is een fase die zich later in de ontwikkeling voltrekt en waarin de bloemorganen worden gevormd (fig. 9). *FUL* en *AP1* hebben in hun promotor bindingsplaatsen voor SPL3. *LFY* daarentegen bevat bindingsplaatsen in het eerste exon/intron. Als eerste stijgt de expressie van *LFY* en *FUL*. *AP1* expressie neemt later toe, waardoor gedacht wordt dat SPL3 alleen niet voldoende is voor een volledige activatie van *AP1* (Yamaguchi et al. 2009).

Ander onderzoek heeft zich meer gericht op de werking van *SPL9* en *SPL10* (Wu et al. 2009). Het feit dat SPL-eiwitten transcriptiefactoren zijn, wil zeggen dat ze de transcriptie van bepaalde target genen activeren. *SPL9/10* zijn verantwoordelijk voor de inductie van het andere miRNA dat een cruciale rol in bloei-inductie vervult: miR172. In het onderzoek van Wu et al. (2009) kwam ook een duidelijke



Figuur 7. Feedback loop van miR156 en zijn SPL targets. (Wu et al. 2009)

distinctie in expressie tussen *SPL3* en *SPL9/10* naar voren. *SPL3* is in toenemende concentraties detecteerbaar in het scheutmeristeem en de bladprimordia tussen dag 15 en 22 na ontkieming (cf. fig. 6). Terwijl *SPL9* in lagere mate waar te nemen is, en *SPL10* zelfs afwezig is in de bladprimordia. Uit het onderzoek is geconcludeerd dat de functies van *SPL3* en *SPL9/10* verschillen. Ze vervullen alle drie deels overlappende en deels verschillende rollen in de vegetatieve faseovergang. *SPL3* en zijn verwanten *SPL4/5* hebben vooral invloed op de adulte differentiatie van epidermale cellen in bladeren en zijn in die zin betrokken bij de vegetatieve-adulte faseovergang. Van *SPL9* en *SPL10* is bewezen dat zij naast de differentiatie van adulte bladeigenschappen, ook miR172b transcriptie induceren. *SPL9* bindt direct aan de promotor van het precursorgen van miR172b (Fornara and Coupland 2009). Deze promotor bevat zelfs meerdere kopieën van de SPL-bindingsplaats (Zhu and Helliwell 2011). Ten slotte hebben Wu et al. (2009) een negatieve feedback loop (fig. 7) beschreven die aanwezig zou zijn als buffer en regulatie van miR156 en *SPL*-genen, zodat de transitie met een geleidelijke gradiënt verloopt en niet in een keer geheel omklapt.

De regulatie van miR172

In *Arabidopsis* zijn 5 verschillende loci – at/m e – voor *MIR172* gevonden (Jung et al. 2007). Via transcriptie door RNA polymerase II zijn ze allemaal in staat eerst een pri-miRNA en daarna een 21-nucleotiden lang miR172 te produceren. Deze miR172 transcripten reguleren de aanwezigheid en translatie van een subgroep van mRNA's uit een tweede familie transcriptiefactoren: *AP2*-like genen. Deze bestaan uit *APETELA2* (*AP2*), *TARGET OF EAT1* (*TOE1*), *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMÜTZE* (*SMZ*) en *SCHNARCHZAPFEN* (*SNZ*) (Zhu and Helliwell 2011)

Welke *MIR172*-genen tot expressie komen is afhankelijk van weefseltype, groeistadium, daglengte en temperatuur (Zhu and Helliwell 2011); hiermee is miR172 een van de integratieplaatsen van verschillende signaleringsroutes binnen de bloeiregulatie. miR156 en SPL9 zijn dus niet de enige regulatoren van *MIR172*. Zo heeft onderzoek van Zhu en Helliwell (2011) een negatieve feedback loop voor *MIR172* beschreven, net als bij *MIR156*. *TOE1* en *TOE2* zijn directe doelwitten van miR172b. In hun complete afwezigheid, waren de concentraties van zowel pri-miR172 als miR172b ca. 50% lager dan doorgaans. De overexpressie van *TOE1* leidt tot toename in pri-miR172b concentraties (Wu et al. 2009). *MIR172* expressie staat daarnaast onder controle van kleine schommelingen in de omgevingstemperatuur (Lee et al. 2010) en de aan fotoperiode gekoppelde *GIGANTEA* (GI)-gemedieerde signaleringsroute (Jung et al. 2007). Ten slotte bestaat er aanleiding om aan te nemen dat de gestage tijdelijke toename van miR172 op transcriptieel niveau wordt gereguleerd, aangezien er geen (tijdelijke) verandering in de expressie van *DCL1* (een Dicer gen) waar te nemen. Deze vertoont een constante concentratie (Jung et al. 2007).

Omgevingstemperatuur heeft invloed op miR172

Kleine schommelingen in hun omgevingstemperatuur kunnen grote gevolgen hebben voor de bloei van veel planten. Er bestaan mutanten die resistent zijn tegen deze temperatuurwisselingen en daarom wordt gedacht dat er een genetische signaleringsroute ten grondslag ligt om het sein door te geven. Een aantal genen van de thermosensorische signaleringsroute zijn bekend: *FCA*, *FVE*, *FLM* en *SVP* (Short Vegetative Phase) (Lee et al. 2010). Dit zijn bloei onderdrukkers. *SVP* is direct verantwoordelijk voor de repressie van het floraal integratiegen *FT*.

Lee et al. (2010) hebben onderzoek verricht naar de thermosensorische signaleringsroute en hebben ontdekt dat miRNA's ook hierin een rol vervullen; wederom miR156 en mi172. Ze hebben gekeken naar de expressie patronen bij twee verschillende milde temperaturen, 16°C en 23°C. miR156 en mi172 blijven ook in deze pathway een tijdelijk complementair expressiepatroon vertonen. miR156 is in hoge concentraties aanwezig bij de lagere temperatuur en daalt bij een temperatuur van 23°C. miR172 transcripten laten het tegenovergestelde zien. miR156 blijkt echter

niet downstream gereguleerd te worden door de thermosensorische signaleringsroute genen. miR172 daarentegen is gevoelig voor mutaties in *SVP*. In normale toestand onderdrukt *SVP* de expressie van *MIR172*. *SVP* zelf is gevoelig voor milde temperatuurschommelingen en komt bij lagere temperatuur tot hogere expressie, resulterend in een downregulatie van *MIR172*. Bij hogere temperaturen, gunstiger voor bloei, nemen de *SVP*-transcripten af en is miR172 waar te nemen en zal bloei gestimuleerd worden.

GIGANTEA stabiliseert miR172

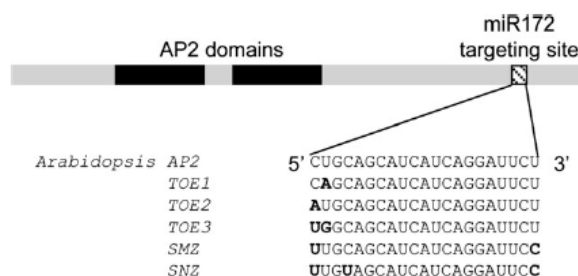
Naast een milde temperatuur zijn lange dagen gunstig voor veel bloeiende planten. *MIR172* wordt naast de thermosensorische en leeftijdsafhankelijke route ook door de fotoperiode route gereguleerd. De fotoperiode signalering verloopt via een *GI*-afhankelijk signaleringsroute welke twee wegen kent, namelijk: de *CONSTANS* (*CO*) route en via miR172. Beide blijken onafhankelijk van elkaar te verlopen, maar ze komen samen bij de florale integrator *FT* (Jung et al. 2007). *CO* stimuleert *FT* expressie direct, terwijl miR172 dit indirect via zijn *TOE1* doelwit doet (Jung et al. 2007). *TOE1* is een onderdrukker van *FT* en zijn transcripten worden door miR172 gesilenced.

GI staat centraal in de fotoperiode signalering door onder andere *CO* expressie te induceren. Het *GI* expressiepatroon volgt een circadiaans ritme. Opvallend is dat miR172 geen dagelijks oscillatiepatroon volgt, maar wel hogere concentraties heeft onder lange dag (LD) condities dan korte dagen (KD) (Nag and Jack 2010; Jung et al. 2007). miR172 levels staan dus onder invloed van licht zonder afhankelijk te zijn van *CO* met zijn circadiaanse ritme. Jung et al. (2007) hebben gevonden dat de concentratie van miR172 onder controle van *GI* (dus daglengte) staat. De invloed van *GI* vindt plaats op posttranscriptioneel niveau, met andere woorden op niveau van miRNA-processing. *GI* verzorgt de maturatie en stabilisatie van de *MIR172* transcripten.

Uiteindelijk komen de twee *GI*-route weer bij elkaar in *FT*, waarbij beide signalen vereist zijn voor een goede werking van *FT* (Jung et al. 2007). Dit is te verklaren doordat *FT* transcriptie direct gestimuleerd wordt door *CO*, maar tegelijkertijd onderdrukt wordt door *TOE1* (een van de miR172 targets).

De miR172 doelwitten: AP2-like familie

MIR172 wordt dus gereguleerd door de leeftijdsafhankelijke route, via miR156 en de SPL-genen, door de thermosensorische route en de GI-route. Er is zelfs aanleiding te geloven dat miR172 zichzelf reguleert door zelfkleving (Zhu and Helliwell 2011). Maar wat



Figuur 8 De targets van miR172. De grijze balk geeft de coderende regio van het gen aan waarin de miR172 bindingsplaats zich bevindt. Deze is in alle targets, op een enkele puntmutatie na, gelijk (Zhu and Helliwell 2011).

staat onder de directe controle van dit transcript? Dat zijn *AP2* en de *AP2-like* genen; zo genoemd omdat deze allemaal twee AP2-domeinen bevatten. Dit zijn: *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, *SMZ* en *SNZ* (fig. 8). Dit zijn allemaal bloeionderdrukkers. *AP2* is naast bloeionderdrukker ook een bloemidentiteitsgen (Zhu and Helliwell 2011). Dat wil zeggen dat *AP2* betrokken is bij de bloemvorming volgens het ABC-model.

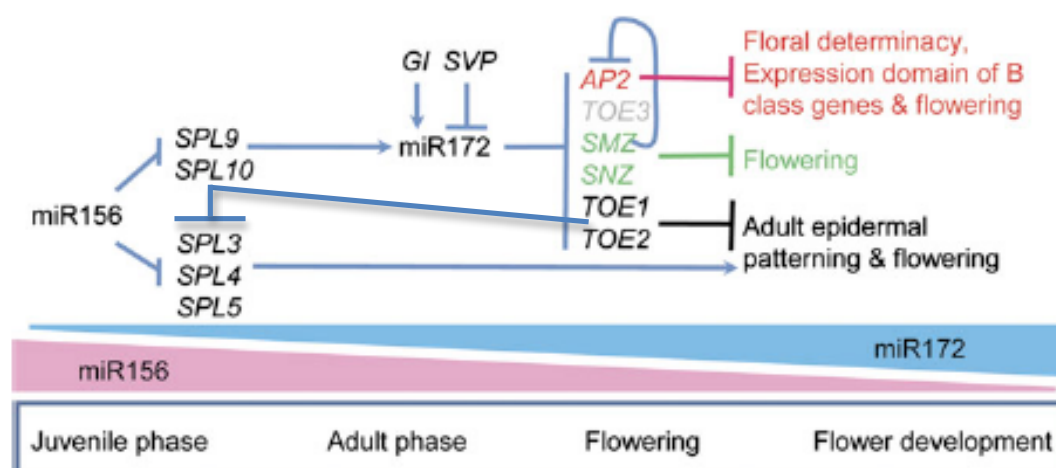
De toename van miR172 over de loop van de tijd leidt tot de repressie van deze genen. Volgens het centrale dogma oefenen miRNA's in planten hun werking uit door middel van kleving. Maar voor miR172 is aangetoond dat deze zijn doelwitten voornamelijk via translationele onderdrukking reguleert (Zhu and Helliwell 2011; Nag and Jack 2010; Jung et al. 2007) en dit maakt het dogma betwistbaar. In tegenstelling tot de doelwitten van miR156 bevindt de miR172-bindingsplaats zich niet in het 3' UTR, maar in het coderende deel van het transcript richting het 3' einde (fig. 8) (Zhu and Helliwell 2011). Het idee van translationele onderdrukking komt voort uit experimenten (Zhu and Helliwell 2011) van *MIR172* overexpressie waarbij er een accumulatie van de target mRNA's wordt waargenomen, maar een afname van de AP2-like eiwitten.

TOE1 en *TOE2* zijn betrokken bij juveniele-adulte faseovergang in het feit dat hun repressie (deels) verantwoordelijk is voor de morfologische eigenschappen die bij de adulte fase horen. Daarnaast zijn ze ook betrokken bij de vegetatieve-reproductieve faseovergang. Hiervoor zijn ze echter niet alleen verantwoordelijk, gezien hun afwezigheid wel leidt tot eerdere bloei, maar niet zo vroeg als bij *MIR172* overexpressie (Zhu and Helliwell 2011). *MIR172* wordt positief gereguleerd in de aanwezigheid van *TOE1* en *TOE2* (Wu et al. 2009), ook hier bestaat dus een

genuanceerde feedback regulatie. Ander onderzoek (Mathieu et al. 2009) heeft aangetoond dat naast *TOE1* en *TOE2*, ook *AP2* en *SNZ* en *SMZ* bloeirepressors zijn en dat ze allemaal nodig zijn voor de juiste timing. *FT*, *SOC1* en *AP1* zijn de targets van de *AP2*-like familie. Van *AP2* en *SMZ* is bekend dat ze direct upstream van de transcriptiestartplaats van deze genen binden en daarmee transcriptie inhiberen (Zhu and Helliwell 2011). De rol van *TOE3* is niet duidelijk, maar er is bewijs dat *AP2* en *SMZ* 2kb upstream van dit gen binden (Zhu and Helliwell 2011). Onder de *miR172* bestaat, net als bij *miR156* en de *SPLs*, een netwerk van feedback loops. *SNZ* en *AP2* worden geremd door *SMZ*. *SMZ*, *TOE1* en *SNZ* zijn het doel van repressie van *AP2*. Ten slotte zijn *AP2* en *SMZ* ook zelfregulerend (Zhu and Helliwell 2011). Dit strakke extensieve regulatienetwerk is vereist voor een adequate timing van bloei.

miR156 en miR172 in samenspel

Figuur 9 geeft een schematisch overzicht van de bloeiregulatie op niveau van *miR156* en *miR172*. Samen passen ze goed in het ontwikkelingsmodel van Moss (2007) waarin van tijdelijke complementaire expressiepatronen wordt uitgegaan. *miR156* staat aan het begin van de faseovergangen van bloei-inductie. De regulatie van dit miRNA is nog niet duidelijk, maar is waarschijnlijk enkel via een leeftijdsafhankelijke route. *miR172* daarentegen staat onder een complex regulatienetwerk waarin verschillende routes integreren: *miR156* mediatie, de fotoperiode route en de



Figuur 9 Schematisch overzicht van de tijdelijke complementaire expressie van *miR156* en *miR172* en hun targets. *miR156* reguleert de *SPL*-genen door middel van onderdrukking. *SPL9/10* stimuleren *miR172* expressie samen met de *GI*-route en de thermosensorische route. *SPL3/4/5* zijn betrokken bij de differentiatie van epidermale cellen in de adulte fase. *miR172* inhibeert de genen van de *AP2*-like familie die de bloei onderdrukken (Zhu and Helliwell 2011).

thermosensorische route. Daarbij komen tevens feedback loops kijken die het geheel nuanceren en zorgen voor een strakke bloeiregulatie.

Zeer recent onderzoek (Jung et al. 2011) heeft nog meer samenwerking tussen miR156 en miR172 gevonden. *SPL3/4/5* zijn een belangrijkere rol gaan innemen dan eerst gedacht. Zo is aangetoond dat niet alleen miR156 deze genen reguleert maar dat ook miR172 invloed heeft op de expressie van deze drie genen. miR156 inhibeert *SPL3/4/5* mRNA direct via posttranscriptionele onderdrukking. miR172 werkt indirect via zijn doelwitten TOE1, TOE2 en SMZ op transcriptioneel niveau (fig. 9). miR156 zorgt voor het behoud van de juveniele fase en weet de SPLs posttranscriptioneel te onderdrukken. Maar via miR172 kan de juveniele fase doorbroken worden, aangezien miR172 expressie niet alleen afhankelijk is van een afname in miR156. Met een toename van miR172 zullen *SPL3/4/5* meer worden getranscribeerd, zoveel dat miR156 de transcripten niet meer kan onderdrukken. Maar miR172 expressie heeft geen remmende werking op miR156 expressie.

HOOFDSTUK 3. NIEUWE SPELERS IN HET VELD: LANGE NIET-CODERENDE RNA'S

In het vorige hoofdstuk zijn de verschillende signaleringsroutes van bloei-inductie waarbij miR156 en miR172 betrokken zijn naar voren gekomen, zoals: de leeftijdsafhankelijke, de fotoperiode en de thermosensorische route. In dit hoofdstuk zal een andere route die ook afhankelijk is van de temperatuur worden uitgelicht: de vernalisatieroute. De aansluiting met het vorige hoofdstuk is de rol die niet-coderende RNA's in deze route vervullen. Maar in plaats van de korte (ca. 20-23-nucleotiden) miRNA's gaat het hier om lange (>100-nucleotiden) niet-coderende RNA's (ncRNA's) (Heo and Sung 2011). Deze lange ncRNA's hebben een functie in de vernalisatieroute. Veel planten hebben een lange aaneengesloten periode van kou (vernalisation van een aantal weken) nodig voordat ze kunnen bloeien (Turck and Coupland 2011). Maar hoe onthouden ze dat er een langere periode van kou geweest is? Een belangrijk aspect van de vernalisatieroute blijkt de epigenetische silencing van het *FLOWERING LOCUS C (FLC)* gen, gemedieerd door lange ncRNA's (Heo and Sung 2011).

Lange ncRNA's zijn al een hele tijd bekend. Aanvankelijk werd gedacht dat ze geen functie hadden. Er worden echter steeds meer regulerende werkingen aan hen toegeschreven: directe effecten op de transcriptie/translatie (zoals ook miRNA's), de werving van chromatinemodificeerders en de formatie van inactieve nucleaire compartimenten (De Lucia and Dean 2010). Een voorbeeld van lange ncRNA's is al heel even genoemd in hoofdstuk twee: antisense transcripten (AST). In *Arabidopsis* zijn veel genen bekend die ASTs hebben (Wu and Poethig 2006); 30% van de geannoteerde genen vertoont ASTs (De Lucia and Dean 2010). ASTs vallen onder de paraplu-term van (lange) ncRNA's, waaronder ook miRNA en siRNA precursors vallen. De ASTs worden echter niet door Dicer-enzymen in kleine fragmenten geknipt zoals hun kortere soortgenoten. Hun antisense richting van het gen waarvan ze worden afgeschreven suggereert een *cis*-regulerende functie (Ben Amor et al. 2009). Het eerder besproken *SPL3* is een voorbeeld van een gen met ASTs. Maar ook *FLC*, een belangrijk gen in de vernalisatieroute, kent ASTs. Het is voor dit gen en zijn ASTs dat

nieuwe interessante ontwikkelingen hebben plaatsgevonden (De Lucia and Dean 2010). Een belangrijk verschil overigens tussen miRNA's en deze lange ncRNA's is de locatie in de cel waar ze actief zijn: in het cytoplasma en de nucleus, respectievelijk.

De vernalisatie van *FLC*

FLC is het sleutelgen in de vernalisatie. Het *FLC* eiwit onderdrukt bloei door via een directe interactie de expressie van de bloeiactivatoren *SOC1*, *FT* en *FD* te onderdrukken (Amasino 2010). Eer de plant over kan gaan tot bloei zal *FLC* gesilenced moeten worden. *FLC* werkt niet alleen. Het gaat een interactie aan met het eerder beschreven *SVP*, welke behoort tot de thermosensorische route. De eerste is gevoelig voor kou en de tweede voor veranderingen in de normale omgevingstemperatuur. De interactie is noodzakelijk voor een goede inhibitie van bloei (Amasino 2010). In *Arabidopsis* is vernalisatie, wanneer eenmaal plaatsgevonden, een mitotisch stabiele gebeurtenis. Dit geeft aanleiding aan te nemen dat er sprake is van een epigenetische uitschakelaar. Deze wordt in werking gezet na een koude periode van bepaalde duur. Vervolgens in afwezigheid van de kou en gedurende mitose zal *FLC* onderdrukt blijven (Amasino 2010). Naast de vernalisatieroute kan *FLC* ook onderdrukt worden via de autonome route (Adrian, Torti and Turck 2009).

De vraag is hoe *FLC* door vernalisatie epigenetisch gemodificeerd wordt? De repressie van *FLC* is het gevolg van chromatinemodificatie (zie Box 2. *Chromatinemodificatie* voor meer achtergrondinformatie over histonmodificaties). Na vernalisatie neemt de hoeveelheid gemethyleerd H3K9 en H3K29 van het *FLC* chromatine toe en is H3 gedacetyleerd (Amasino 2010). Deze chemische veranderingen in de histonstructuur van het *FLC*-gen worden in *Arabidopsis* mede uitgevoerd door het POLYCOMB REPRESSIE COMPLEX 2 (PRC2) en uiteindelijk zorgt dit complex voor het behoud van de onderdrukking (Amasino 2010; De Lucia et al. 2008). De bekende (en belangrijkste) onderdelen van PRC2 zijn de kerncomponenten: E(z) (een histonmethyltransferase), Extra Sex Combs (ESC), p55 en Su(z)12. Deze eiwitten zijn geconserveerd tussen planten en dieren (De Lucia et al. 2008). In *Arabidopsis* zijn er drie homologen voor Su(z)12 (De Lucia et al. 2008), die allemaal vereist zijn voor een geslaagde, stabiele epigenetische repressie van *FLC*

(Amasino 2010): VERNALIZATION 2 (VRN2), VERNALIZATION-INSENSITIVE (VIN3) en VERNALIZATION 5 (VRN5)/ VIN3-like 1 (VIL1) (Amasino 2010; Adrian, Torti and Turck 2009; De Lucia et al. 2008).



STRUCTURE A
Nucleosomes regularly spaced

STRUCTURE B
Nucleosomes repositioned

Box 2. Chromatinemodificatie

De chromatinestructuur is van invloed op de mate van expressie van de tussenliggende genen. De pakking van het chromatine bepaalt of de genen in de regio toegankelijk zijn of niet. De plaats en de aard van het nucleosoom hebben invloed op de transcriptie start (fig.) (Brown 2007).

De histonen in nucleosomen zijn vatbaar voor chemische modificatie welke de graad van pakking bepaalt (Brown 2007). Histonen kunnen geacetyleerd of gemethyleerd worden. Histon acetylering, de toevoeging van een acetylgroep aan een lysine zorgt voor een open, actieve chromatinestructuur (De Lucia and Dean 2010; Brown 2007). Deze activatie middels acetylering kan op meerdere plekken in de N-terminus voorkomen (fig. 2). Verantwoordelijk voor acetylering en deacetylering zijn histon acetyltransferases (HATs) en histondeacetylases (HDACs), respectievelijk (Brown 2007). Het effect van methylering hangt af van de specifieke lysine. H3K9me3 en H3K27me3 zijn verbonden met inactief chromatine, terwijl H3K4 methylering wordt geassocieerd met actieve genexpressie (De Lucia and Dean 2010). In planten wordt daarnaast nog een onderscheid gemaakt tussen H3K9me3, welke staat voor stabiele heterochromatine onderdrukking, en H3K27me3, welke duidt op meer tijdelijke euchromatine repressie (Alexandre and Hennig 2008).

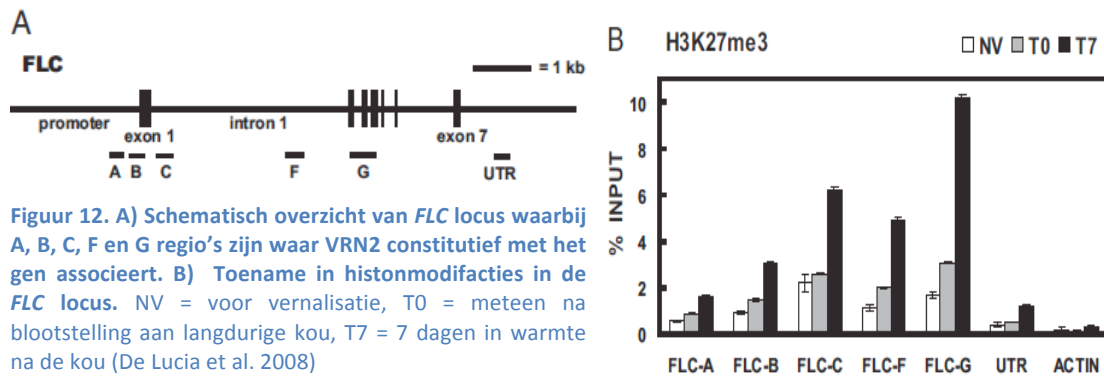
Een belangrijk eiwitcomplex dat betrokken is bij de specifieke epigenetische modificatie van *FLC* is het Polycomb complex: PRC2 (De Lucia et al. 2008). PRC2 verzorgt de methylering van H3K27 (Amasino 2010).

	Me		Me	Ac P		Ac		MeAc		Ac		MeMeP																		
H3																														
	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	
	4			9	10			14		17	18		23				26	27	28											

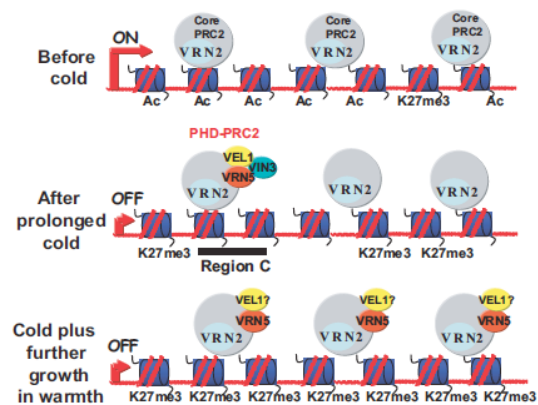
Figuur 11 Modificaties in de N-terminus van histon H3. Dit zijn alle histonmodificatie die bekend zijn van deze regio. Me = methylering; Ac = Acetylering (en P = fosforylering)
(via <http://www.imt.uni-marburg.de/bauer/research.html>, geraadpleegd op 30 maart 2011)

De expressiepatronen van deze drie genen verschillen ten opzicht van elkaar. *VRN2* komt constitutief tot expressie en is zodanig continu geassocieerd met *FLC* over de gehele locus (fig. 12) (De Lucia et al. 2008). Dit betekent dat over het gehele *FLC*-gen al (een weinig) H3k27me3 aanwezig is. *VIN3* vertoont een 'vernalisation-specifiek'

expressiepatroon (Amasino 2010; Adrian, Torti and Turck 2009), ofwel alleen tijdelijk aanwezig tijdens een periode van langdurige kou, en moet een drempelwaarde overstijgen voordat het zijn werking kan uitoefenen (Alexandre and Hennig 2008). Terwijl *VRN5/VIL1* ook constitutief tot expressie komt.



VIN3 en VIN5/*VIL1* zijn in staat met elkaar te dimeriseren en bevatten een PHD-domein dat in staat is tot herkenning van specifieke chromatinemodificaties (histoncodes) en daaraan te binden (Amasino 2010). VIN3 associeert pas met PRC2 na inductie als gevolg van kou. Daarna kan *VRN5/VIL1* pas deel uit maken van PRC2. Als gevolg van een langdurige periode van kou ontstaat in principe een nieuw PRC2, dat door De Lucia et al. (2008) de nieuwe naam “PHD- PRC2” heeft gekregen. De PHD-domein eiwitten VIN3 en *VRN5/VIL1* zetten namelijk samen de verandering in *FLC* chromatine in gang. Dit PHD- PRC2 bindt voornamelijk aan het 5' einde van intron 1 van *FLC* (fig. 12 regio C) (De Lucia et al. 2008). Na de vernalisatie neemt VIN3 af, maar *VRN5/VIL1* blijft in gelijke concentraties aanwezig. De terugkeer naar een periode van warmte resulteert zelfs in een grotere verspreiding van *VRN5/VIL1* over *FLC* (De Lucia et al. 2008). Deze toename van *VRN5/VIL1* over het target chromatine leidt tot een vermeerdering in H3K27me3 over de gehele lengte van *FLC* (Alexandre and



Figuur 13 Schematisch overzicht van de volgorde waarin vernalisatie leidt tot stabiele epigenetische onderdrukking van *FLC*. Voor de kou is PRC2 middels kerncomponent *VRN2* over de hele locus verspreid. N.a.v. langdurige kou wordt VIN3 geïnduceerd en associeert aan PRC2 in regio C (5' einde van intron 1) met binding van *VRN5/VIL1* als gevolg (PHD-PRC2). Terugkeer naar warmere temperatuur leidt tot de dissociatie van VIN3 en de verdere distributie van *VRN5/VIL1* naar de andere PRC2s voor een stabiele, volledige repressie van *FLC*. (De Lucia et al. 2008)

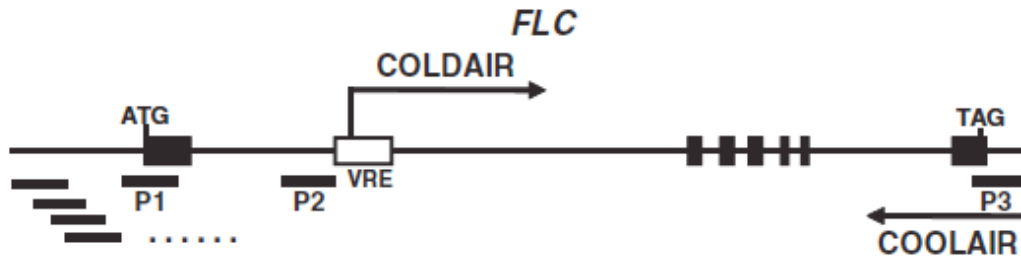
Hennig 2008) en een afname van geacetyleerd H3 (H3Ac) (De Lucia et al. 2008) (fig. 13). Deze eerste fase van vernalisatie blijkt echter niet voldoende voor behoud van mitotisch stabiele onderdrukking (Adrian, Torti and Turck 2009). De tri-methylering van H3K9 is nodig voor het behoud van de repressie. Tijdens een tweede fase van vernalisatie worden VRN1 en LHP1 aangetrokken door H3K27me3 (Alexandre and Hennig 2008) en maken de onderdrukking vervolgens stabiel en irreversibel via de tri-methylering en handhaving van H3K9me3 (Amasino 2010).

Echter, VIN3 bevat geen domein dat specifieke DNA-sequenties kan herkennen (Amasino 2010). Dus hoe komt PRC2 bij *FLC*?

Lange ncRNA's leiden de weg

In de 19^e eeuw sprak Lamarck over de invloed van de omgeving op bepaalde eigenschappen van organismen die volgens hem doorgegeven konden worden. Met de komst van Darwin's theorie viel het zijne in ongenade. Maar onderzoekers Koziol et al. (2010) willen zijn theorie niet geheel verwerpen en hebben aangetoond hoe lange ncRNA's de chromatinemodificatiecomplexen (zoals PRC2) aantrekken en zo epigenetische veranderingen in het genoom waarborgen. De veranderingen in het genoom als reactie van omgevingsfactoren kunnen vervolgens doorgegeven worden aan dochtercellen. Ze stellen dit zelfs voor als een 'RNA air traffic control', waarbij verschillende typen chromatinemodificatiecomplexen en andere eiwitten zonder inherent doel door de nucleus heen bewegen en het de lange ncRNA's zijn die hen naar de juiste locaties in genoom brengen (voor epigenetische verandering) (Koziol and Rinn 2010).

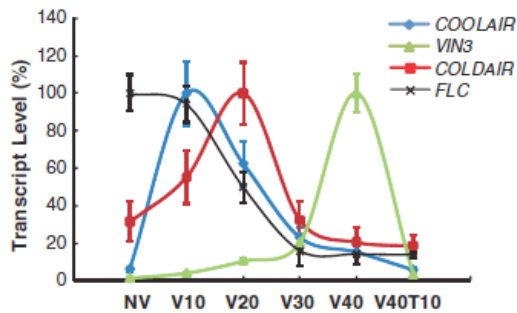
Er zijn een aantal voorbeelden bekend van lange ncRNA's die betrokken zijn bij de werving van histonmodificeerders in verschillende organismen zoals de silencing van *Xist*, *Kcnq1ot1* en *Air* in dieren en een door kou geïnduceerde epigenetische repressie van *PHO84* in gist, en het 2,2 kb lange ncRNA *HOTAIR* (een AST) in mensen dat betrokken is bij het uitschakelen van het *HOXD* gen (De Lucia and Dean 2010). Waarschijnlijk is de geconserveerde secundaire structuur (stem-and-loop) van lange ncRNA's van belang bij het aantrekken van PRC2 (De Lucia and Dean 2010).



Figuur 14 Het *FLC* locus met de mogelijke transcripten in sense en antisense richting. Het VRE in intron 1 bevat de transcriptiestart voor COLDAIR. Deletie van VRE heeft verder geen gevolgen voor de functie van *FLC*. De promotor van COOLAIR (P3) bevindt zich in het 3' UTR van de het gen (Heo and Sung 2011).

Net als in de bovenstaande voorbeelden is er in *Arabidopsis* een lang ncRNA gevonden dat betrokken is bij de chromatinemodificatie van *FLC*. Net als het menselijke HOTAIR gaat het om een AST dat in navolging COOLAIR genoemd is. Zoals eerder genoemd wordt *FLC* irreversibel, epigenetisch onderdrukt na een lange periode van kou. Voordat de repressie van *FLC* zich voltrekt, neemt de transcriptie van COOLAIR in de vroege fase van vernalisatie, dus al na korte blootstelling aan kou, toe. Deze stijging voltrekt zich voordat het PRC2-complex actief wordt en vindt ook onafhankelijk van de betrokkenheid van het PRC2-mechanisme plaats (De Lucia and Dean 2010). COOLAIR transcripten vertonen interactie met PRC2 (De Lucia and Dean 2010), maar veel meer is over hen nog niet bekend. COOLAIR zorgt waarschijnlijk voor een reductie in de transcriptionele activiteit van *FLC* (De Lucia and Dean 2010; Heo and Sung 2011)

Daarentegen heeft een andere onderzoeksgroep vergelijkbare lange ncRNA transcripten gevonden. Deze hebben zij COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA (COLDAIR) genoemd (Heo and Sung 2011). In tegenstelling tot COOLAIR is COLDAIR een lang intronische sensetranscript van *FLC* (fig. 14). COLDAIR wordt getranscribeerd door RNA-polymerase II (RNAPII) (in tegenstelling tot andere lange ncRNA's), heeft een 5' cap, geen poly(A)-staart en is ongeveer 1,1kb lang (Heo and Sung 2011). In intron 1 van *FLC* ligt het VERNALIZATION RESPONSE ELEMENT (VRE) welke verantwoordelijk is voor de repressie van *FLC* en bevat de transcriptiestart van COLDAIR (fig. 14) (Heo and Sung 2011). COOLAIR en COLDAIR laten een vergelijkbaar tijdelijke expressiepatroon zien (fig. 15). COOLAIR komt sneller tot expressie en piekt ook eerder dan COLDAIR – op dag 10 en dag 20, respectievelijk. De daling in COLDAIR transcriptie hangt samen met de chromatineveranderingen in *FLC* die op dag 20 van de vernalisatie beginnen (Heo and Sung 2011). Door de chromatinepakking is het



Figuur 15 Tijdelijke expressiepatronen van COOLAIR, VIN3, COLDAIR en FLC. De X-as geeft het aantal dagen van vernalisatie weer (Heo and Sung 2011).

VRE in *FLC* niet langer toegankelijk voor RNAPII en vindt er geen transcriptie van COLDAIR meer plaats.

In experimenten met COLDAIR knockdown via RNAi daalde de expressie van *FLC* tijdens de vernalisatie wel, maar de repressie van *FLC* was niet volledig en hield na afloop van de kou periode geen

stand (Heo and Sung 2011). Dit betekent dat COLDAIR vereist is voor een stabiele, irreversibele epigenetische repressie van *FLC*. Deze tijdelijke expressie van *FLC* in COLDAIR knockdowns is gelijk aan de expressie waargenomen in andere PRC2 mutanten. Dit koppelt COLDAIR aan het PRC2 complex. *In vitro* en *in vivo* zijn tevens associaties van COLDAIR met PRC2 gevonden. COLDAIR blijkt specifiek te binden aan CURLY LEAF (CLF), wat een E(z) homolog in *Arabidopsis* is (Heo and Sung 2011). De PRC2 kerncomponent CLF is een histonmethyltransferase en direct verantwoordelijk voor de tri-methylering van H3K27.

Het onderzoek van Heo en Sung (2011) concludeert dat aan de hand van het tijdelijke expressiepatroon van COLDAIR tijdens vernalisatie en het tijdelijke expressiepatroon van *FLC* in COLDAIR-knockdowns dat dit lange ncRNA verantwoordelijk is voor de rekrutering van PRC2 naar het *FLC*-gen tijdens vernalisatie. De daaropvolgende vorming van het PHD-PRC2 complex zal leiden tot de werkelijke vernalisatie van *FLC* en aan het behoud na de periode van kou.

HOOFDSTUK 4. CONCLUSIE

De regulatie van bloei-inductie is een zeer gecompliceerd netwerk waarin meer dan 180 genen bekend zijn bij te dragen. Het is daarnaast grondig onderzocht, maar het blijft moeilijk, zo niet onmogelijk, een overzichtelijke representatie van het geheel te geven. In deze scriptie is daarom bewust gekozen slechts een deel te belichten dat nauw samenhangt met nieuwe ontwikkelingen in het veld van bloei-inductie (en de biologie *an sich*), namelijk de rol van niet-coderende RNA's. miRNA's en hun functies zijn al langere tijd bekend. De ontdekking van de rol van lange ncRNA's (in dieren en planten) is echter vrij recent en zal in de nabije toekomst verder onderzocht worden.

Om een antwoord te geven op de probleemstelling van deze scriptie: welke rol spelen miRNA's – miR152 en miR172 – en lange niet-coderende RNA's – COOLAIR en COLDAIR – in de faseovergangen van bloei-inductie in *Arabidopsis thaliana*?

De functie van miRNA's en lange ncRNA's is compleet verschillend in de bloei-inductie van *Arabidopsis* in het opzicht dat miRNA's een functie op gebied mRNA-regulatie vervullen waar lange ncRNA's als adaptermoleculen dienen om specifieke chromatinemodificatiecomplexen naar de juiste regio in het genoom te leiden, zodat deze daar vervolgens de histonstructuur kunnen aanpassen en daarmee de activiteit van transcriptie beïnvloeden. Beide hebben wel de capaciteit van complementaire binding in gemeen, wat bepalend is voor de specificiteit van hun werking. De complexen die (RISC en PRC2) de klieving of modificaties uitvoeren zouden zonder deze RNA's nooit bij hun doelwit kunnen komen.

Zowel de miRNA's als de lange ncRNA's zijn gevoelig voor de interne en externe veranderingen en reageren daarop als een soort schakelaars die irreversibel uit of aan gezet worden. De resulteert in faseovergangen waarbij de plant iedere keer een stapje dichterbij bloei komt.

Kort en bondig is te stellen dat de miRNA's en lange ncRNA's onmisbaar zijn in de specificiteit, integratie en nuancering van de verschillende signaleringsroutes die betrokken zijn bij de bloei-inductie in *Arabidopsis*.

BIBLIOGRAFIE

- Adrian, J., S. Torti, and F. Turck. "From Decision to Commitment: The Molecular Memory of Flowering." *Molecular Plant* 2.4 (2009): 628-42. 2009 Jul 01. Web. 2009 Feb 16.
- Alexandre, C. M., and L. Hennig. "FLC Or Not FLC: The Other Side of Vernalization." *Journal of experimental botany* 59.6 (2008): 1127-35. Web.
- Amasino, R. "Seasonal and Developmental Timing of Flowering." *The Plant Journal* 61.6 (2010): 1001-13. Web.
- Bäurle, I., and C. Dean. "The Timing of Developmental Transitions in Plants." *Cell* 125.4 (2006): 655-64. Web.
- Ben Amor, B., et al. "Novel Long Non-Protein Coding RNAs Involved in Arabidopsis Differentiation and Stress Responses." *Genome research* 19.1 (2009): 57-69. Web.
- Brown, T. A. *Genomes 3*. New York: Garland Science Publishing, 2007. Print.
- De Lucia, F., et al. "A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 Triggers the Epigenetic Silencing of FLC during Vernalization." *PNAS* 105.44 (2008): 16831-6. Web.
- De Lucia, F., and C. Dean. "Long Non-Coding RNAs and Chromatin Regulation." *Current opinion in plant biology* 14 (2010): 1-6. Web.
- Devlin, P. "Photocontrol of Flowering." *Light and Plant Development: Annual Plant Reviews*. Eds. G. C. Whitelam and K. J. Halliday. 30 Vol. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. 185-210. Web.
- Fornara, F., and G. Coupland. "Plant Phase Transitions make a SPLash." *Cell* 138.4 (2009): 625-7. Web.
- Fornara, F., A. de Montaigu, and G. Coupland. "SnapShot: Control of Flowering in Arabidopsis." *Cell* 141.3 (2010): 550,550.e2. Web.
- Heo, J. B., and S. Sung. "Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA." *Science* 331.6013 (2011): 76-9. Web.
- Huntzinger, E., and E. Izaurralde. "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." *Nature Reviews Genetics* 12 (2011): 99-110. Web.

- Jung, J. H., et al. "MiR172 Signals are Incorporated into the miR156 Signaling Pathway at the SPL3/4/5 Genes in Arabidopsis Developmental Transitions." *Plant Molecular Biology* (2011) Web.
- Jung, J. H., et al. "The GIGANTEA-Regulated MicroRNA172 Mediates Photoperiodic Flowering Independent of CONSTANS in Arabidopsis." *The Plant Cell* 19.9 (2007): 2736-48. Web.
- Koziol, M. J., and J. L. Rinn. "RNA Traffic Control of Chromatin Complexes." *Current opinion in genetics & development* 20.2 (2010): 142-8. Web.
- Lee, H., et al. "Genetic Framework for Flowering-Time Regulation by Ambient Temperature-Responsive miRNAs in Arabidopsis." *Nucl.Acids Res.* 38.9 (2010): 3081-93. Web.
- Mathieu, J., et al. *Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ*. Public Library of Science, 2009. Web.
- Moss, Eric G. "Heterochronic Genes and the Nature of Developmental Time." *Current Biology* 17.11 (2007): R425-34. Web.
- Nag, A., and T. Jack. "Sculpting the Flower; the Role of microRNAs in Flower Development." *Current topics in developmental biology* 91 (2010): 349-78. Web.
- Turck, F., and G. Coupland. "When Vernalization Makes Sense." *Science* 331.6013 (2011): 36-7. Web.
- Wang, J. W., et al. "MiRNA Control of Vegetative Phase Change in Trees." *PLoS genetics* 7.2 (2011): e1002012. Web.
- Wu, G., et al. "The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis." *Cell* 138.4 (2009): 750-9. Web.
- Wu, G., and R. S. Poethig. "Temporal Regulation of Shoot Development in Arabidopsis Thaliana by miR156 and its Target SPL3." *Development (Cambridge, England)* 133.18 (2006): 3539-47. Web.
- Yamaguchi, A. et al. "The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1." *Developmental Cell* 17.2 (2009): 268-78. Web.
- Yang, L., S. R. Conway, and R. S. Poethig. "Vegetative Phase Change is Mediated by a Leaf-Derived Signal that Represses the Transcription of miR156." *Development (Cambridge, England)* 138.2 (2011): 245-9. Web.
- Zhu, Q. H., and C. A. Helliwell. "Regulation of Flowering Time and Floral Patterning by miR172." *Journal of experimental botany* 62.2 (2011): 487-95. Web.