

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**“REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE
LA PROTEÍNA HYL1 Y SU IMPACTO EN LA
BIOGÉNESIS DE MICRO ARNs”**

Lic. Natalia P. Achkar

Director de Tesis: Dr. Pablo Manavella

Co-director de Tesis: Prof. Seong Wook Yang

Laboratorio de Biología del ARN

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado, de manera gratuita, en una carrera con la máxima acreditación otorgada por la CONEAU.

Al CONICET, por financiar este posgrado durante 5 años de forma integral, habiéndome otorgado una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado. Además, por la flexibilidad y comprensión durante esta pandemia, al otorgarnos un año adicional de financiamiento para terminar nuestro trabajo.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y sus directivos, por cederme un espacio de trabajo y permitirme ser partícipe de esta comunidad científica.

Al Dr. Pablo A. Manavella, por permitirme formar parte del hermoso grupo del *Small RNA Biology lab*. Por su dirección en todos estos años, por transmitirme sus conocimientos para aprender a trabajar de forma independiente y grupal, y por estar siempre presente ante cualquier necesidad. Y, sobre todo, por su calidez como persona y excelencia como científico.

A mis compañeros, Delfi, Luci, Axel, Regi, Agus e Ile, y los que ya no están, Ariel, Delfi Ré y Damián, por tantos días de trabajo compartidos en el laboratorio, intercambiando conocimientos y aprendizajes. Por las charlas de ciencia y de cosas sin sentido, y hacer que mis días de baja energía sean más llevaderos. En especial a Damián, por esos almuerzos a las 12 en punto, las infinitas conversaciones, y por la contención brindada en momentos muy importantes para mí. Gracias por tu amistad incondicional.

A mi co-director, Prof. Seong Wook Yang, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo, por el apoyo y acompañamiento durante mi estadía en Seúl, Corea del Sur, un país tan lejano geográficamente como culturalmente de Argentina. A todos mis compañeros, por la buena predisposición para ayudarme tanto dentro del laboratorio como con problemas cotidianos, y por tantos almuerzos e intercambios culturales compartidos.

A *The Company of Biologists* y *Development*, por financiar mi viaje a Seúl. Sin su ayuda económica no habría sido posible.

A mi familia, lo más importante de mi mundo. Mis papás, Alfredo y Patricia, y mis hermanos Alfre, Diego, Ani y Nahuel, por siempre creer en mí, por apoyarme en todas mis decisiones y siempre tirar para adelante conmigo. A mis viejos, por la educación que me dieron no solo académicamente, sino como persona. Gracias por enseñarme lo valioso de la vida, por alentarme cuando pensaba que no podía, por abrirme los ojos o

hacerme ver las cosas desde otra perspectiva. A mis hermanos, por esa complicidad y sinceridad, por ese amor incondicional. No los elegí, pero son lo mejor que me hubiese podido tocar. A mis cuñadas Delfi y Flor, también parte de mi familia, gracias por estar siempre, por creer en mí, y compartir y celebrar mis logros conmigo. A los más peques de la familia, mis sobrinos Sofi y Lauti, que con su inocencia y autenticidad llenan mis días de amor.

A los tantos amigos que la vida me dio. De la escuela primaria, secundaria y patín, que después de tantos años seguimos codo a codo compartiendo experiencias, y les toca bancarme en mi segunda defensa de tesis. A los amigos que la comunidad Valhalla me dio. Los conocí arrancando el doctorado, y se convirtieron en mi segunda familia. Gracias al *Outlet* por tanto amor, tanta contención, y por estar siempre para unos mates, comer, entrenar, salir a bailar e incluso escucharme hablar de mis estudios, aunque no entiendan nada. Gracias al *After mdq*, por ser parte de la escritura de esta tesis, haciendo el aguante con mates en largas noches de estudio.

PUBLICACIONES

NP Achkar, DA Cambiagno, PA Manavella (2016) miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway, *Trends in Plant Science*, 21 (12). Elsevier Ltd:1034–1044, 01-Dec-2016.

NP Achkar, SK Cho, C Poulsen, AL Arce, DA Re, AJ Giudicatti, E Karayekov, MY Ryu, SW Choi, J Harholt, JJ Casal, SW Yang, PA Manavella (2018) A Quick HYL1-Dependent Reactivation of MicroRNA Production Is Required for a Proper Developmental Response after Extended Periods of Light Deprivation. *Developmental Cell* 46 (2):236-247.e6.

SW Choi, MY Ryu, A Viczián, HJ Jung, GM Kim, A Arce, **NP Achkar**, P Manavella, U Dolde, S Wenkel, A Molnár, F Nagy, SK Cho, SW Yang (2020) Light Triggers the miRNA-Biogenetic Inconsistency for De-etiolated Seedling Survivability in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 13 (3):431–445.

1 ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
PUBLICACIONES.....	3
1 ÍNDICE	4
2 ABREVIATURAS y SÍMBOLOS.....	7
3 RESUMEN.....	12
4 ABSTRACT	14
5 INTRODUCCIÓN.....	17
5.1 El descubrimiento de los ARNs pequeños	17
5.2 ARNs pequeños de plantas	20
5.2.1 ARNs pequeños de interferencia	22
5.2.2 micro ARNs	23
5.3 Biogénesis de miARNs en plantas.....	25
5.3.1 Eventos transcripcionales tempranos y ensamblado del complejo de procesamiento	25
5.3.2 Procesamiento de miARNs.....	27
5.3.3 Etapas post-procesamiento	29
5.5 Acciones jerárquicas en la vía	32
5.6 HYPONASTIC LEAVES1: Características y regulación post-traducciona l ...	33
6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
6.1 Objetivos específicos.....	37
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
7.1 Análisis de ADN.....	40
7.1.1 Plásmidos.....	40
7.1.2 Construcciones genéticas.....	42
7.1.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	43
7.1.4 Overlapping PCR.....	44
7.1.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	44
7.1.6 Purificación de fragmentos de ADN	44
7.1.7 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway	45
7.1.8 Recombinación Gateway en vectores de destino	45
7.1.9 Transformación de bacterias de E. coli con ADN plasmídico	45
7.1.10 Transformación de bacterias de A. tumefaciens con ADN plasmídico ...	46
7.1.11 Minipreparación de ADN plasmídico.....	46
7.1.12 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	47

7.1.13	Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
7.2	Material vegetal y condiciones de crecimiento	47
7.2.1	Condiciones de luz	48
7.2.2	Temperatura y tratamientos farmacológicos	49
7.3	Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7.4	Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	50
7.5	Análisis de ARN.....	51
7.5.1	Extracción de ARN total de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
7.5.2	Northern blot no radioactivo para la detección de ARNs pequeños (small RNA blot).....	52
7.5.3	Marcación de Sondas	53
7.5.4	Transcripción reversa (RT)	54
7.5.5	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	54
7.5.6	Ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP).....	54
7.5.7	Secuenciación de ARNs y ARNs pequeños.....	55
7.5.8	Análisis bioinformáticos	55
7.6	Análisis de proteínas	56
7.6.1	Extracción de proteínas totales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
7.6.2	Separación de proteínas y análisis por western blot	56
7.6.3	Geles de retardo para proteínas fosforiladas	57
7.6.4	Fraccionamiento núcleo/citoplasma.....	58
7.6.5	Cycloheximide (CHX)-chase assay.....	59
7.6.6	Cromatografía de exclusión por tamaño	59
7.6.7	Expresión y purificación de proteínas recombinantes	59
7.6.8	Ensayos de pull-down.....	60
7.7	Análisis de fluorescencia	61
7.7.1	Microscopía de escaneo láser confocal (CISM)	61
7.7.2	Análisis de FRAP y FLIP	61
7.8	Ensayos en levaduras	62
7.8.1	Co-transformación de levaduras.....	62
7.8.2	Ensayos de Doble Híbrido en levaduras.....	63
7.9	Cepas bacterianas y de levaduras.....	63
7.10	Cuantificación y análisis estadístico.....	63
8	RESULTADOS	66
8.1	Periodos prolongados de deficiencia de luz aumentan la relación entre HYL1 fosforilada y no fosforilada.....	66

8.2	La versión inactiva fosforilada de HYL1 es menos susceptible a la degradación inducida por oscuridad/sombra, y conforma un pool de reserva de la proteína.....	70
8.3	La versión monomérica fosforilada de HYL1 localiza exclusivamente en núcleo quedando protegida de la degradación	75
8.4	La distorsión del balance entre las isoformas de HYL1 altera las respuestas de crecimiento de las plantas a condiciones de luz, sombra u oscuridad	82
8.5	La regulación de HYL1 mediada por la calidad de luz impacta en la producción de miARNs, afectando la expresión de genes importantes para el desarrollo	87
8.6	HYL1 se comporta como una <i>shuttling protein</i> nuclear-citoplasmática en respuesta a la transición de luz y oscuridad	92
8.7	La fosforilación del dominio C-terminal de HYL1 podría tener funciones reguladoras de la actividad de la proteína	97
9	DISCUSIÓN y CONCLUSIONES.....	108
10	BIBLIOGRAFÍA	114
	ANEXO 1. Construcciones y cebadores utilizados en este trabajo.....	135
	ANEXO 2. Niveles de expresión de miARNs. Relativo a la Figura 18	141
	ANEXO 3. Niveles de expresión de genes. Relativo a la Figura 19.....	149

2 ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol

ABA: Ácido Abscísico

ABRC: Centro de Recursos Biológicos de *Arabidopsis* (*Arabidopsis Biological Resource Center*)

AD: Dominio de Activación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ADNss: Ácido desoxirribonucleico simple cadena

ADN-T: ADN de transferencia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

BD: Dominio de unión

BSA: Albúmina de suero bovino

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

Co-IP: Co-inmunoprecipitación

Col-0: Ecotipo Columbia

cm: Centímetros

D-Bodies: Corpúsculos nucleares de procesamiento de pri-miARNs (*Dicing bodies*)

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

ds: Doble cadena (*double stranded*)

dsRBD: Dominio de unión a ARN doble cadena

DL: día largo (16 horas luz/8 horas oscuridad)

DTT: Ditioneitol

DO: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético

FT: Factor de Transcripción

g: Gravedad o gramos

g/l: Gramos de soluto en un litro de solución

eGFP: Proteína verde fluorescente mejorada

HRP: *Horseradish peroxidase*

IgG: Inmunoglobulina G

l: Litro

LB: Luria-Bertani

DL: Día largo (*long day*)

M: Molar

m²: Metros cuadrados

mg: Miligramo

mg/l: Miligramo de soluto en un litro de solución

miARN: Micro ARN

miliQ: Agua calidad miliQ

ml: Mililitro

mM: Milimolar (milimoles/litro)

mm: Milímetros

MS: Medio de cultivo Murashige-Skoog

NLS: Señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*)

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

nt: Nucleótido

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo

pri-miARN: Transcripto primario de micro ARN

PTGS: Silenciamiento génico post-transcripcional (*Post-Transcriptional Gene Silencing*)

PVDF: Polifluoruro de polivinilideno

p/v: Gramos de soluto en 100 ml de solución

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RIP: Inmunoprecipitación de ARN (*RNA immunoprecipitation*)

RIP/RT-PCR: Inmunoprecipitación de ARN seguido de transcripción reversa y PCR

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RNA-induced silencing complex*)

RT: Retrotranscripción

RT-qPCR: RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real.

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

sARNs: ARNs pequeños

siARNs: ARNs pequeños de interferencia (*small interfering RNAs*)

TAE: Tris Acético EDTA

TBE: Tris Boro EDTA

tasiARNs: *Trans-acting siRNAs*

TEMED: N,N,N',N',-tetrametilendiamina

Tm: Temperatura de disolución (*temperature of melting*)

Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano

U: Unidad/es

UV: Ultravioleta

v/v: Mililitros de soluto en 100 ml de solución

μM: Micromolar

μl: Microlitros

V: Volts

WT: Ecotipo salvaje (*Wild Type*)

Nomenclatura

Nomenclatura de genes: *HYL1*, gen *HYL1*.

Nomenclatura de proteínas: HYL1, proteína HYL1.

Nomenclatura de mutantes: *hyl1-2*, mutante en el gen *HYL1*, alelo 2.

Nomenclatura de promotores: Prom_{HYL1}, promotor del gen HYL1.

Nomenclatura de construcciones: Prom_{35S}::eGFP-HYL1, promotor del virus del mosaico de la coliflor fusionado a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (eGFP) y a la secuencia codificante de la proteína HYL1.

3 RESUMEN

Las plantas son organismos foto-autótrofos, por lo que dependen de la luz para vivir. Su condición sésil hace que las mismas estén continuamente expuestas a variaciones en la cantidad y calidad de luz, entre otros factores ambientales, que desafían su supervivencia. Para superar estas fluctuaciones ambientales, las plantas son capaces de reprogramar su desarrollo para ajustar su crecimiento en busca de una fuente de luz adecuada. Tal plasticidad está orquestada a nivel transcripcional por la expresión armoniosa, tanto temporal como espacial, de factores de transcripción específicos. A su vez, y debido a una preferencia evolutiva, estos factores de transcripción son frecuentemente blancos de silenciamiento mediado por micro ARNs (miARNs), proceso necesario para adaptar el desarrollo de la planta, en particular su crecimiento, dependiendo del medio ambiente. La regulación de la biogénesis de miARNs es un proceso que las plantas usan comúnmente para modificar los niveles de miARNs maduros en un tejido o condición ambiental específica. En plantas, como en todos los organismos eucariotas, las modificaciones postraduccionales de las proteínas juegan un papel crucial como mecanismos reguladores en la mayoría de los procesos celulares. En particular, la fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales reversibles centrales que regulan el metabolismo celular, las interacciones proteína-proteína y su degradación, así como las actividades enzimáticas.

En este trabajo de tesis mostramos que las plantas disparan la inhibición de la biogénesis de miARNs durante largos períodos de luz limitada, seguido de una recuperación rápida después de la restauración de luz, para orquestar el desarrollo de la planta en respuesta a la transición oscuridad/luz. En cuanto al mecanismo subyacente a esta regulación, la forma activa del factor de biogénesis de miARNs HIPONASTIC LEAVES1 (HYL1) es degradada durante la privación de luz, mientras que una reserva inactiva de proteína fosforilada permanece protegida dentro del núcleo. La degradación del componente activo de HYL1 conduce a la liberación de silenciamiento génico que desencadena las características de desarrollo características de la respuesta de la planta a oscuridad. Tras la restauración de la luz, una desfosforilación rápida de las reservas de HYL1 conduce a la reactivación de la biogénesis de miARNs, un cambio en el programa de desarrollo y la activación de la respuesta fotomorfogénica. Por lo tanto, nuestros hallazgos definen un mecanismo regulador único y rápido que controla la maquinaria de silenciamiento de la planta durante la respuesta a la luz. La naturaleza rápida del mecanismo de reactivación de HYL1 proporciona uno de los pocos ejemplos en los que la regulación postraducciona de un componente central en la biogénesis de miARNs media un cambio rápido entre respuestas de desarrollo opuestas.

Además, encontramos que la fosforilación de HYL1 en su dominio C-terminal podría tener funciones reguladoras en la proteína, probablemente modificando su afinidad para interactuar con componentes de la vía de biogénesis de miARNs o de las vías de señalización de luz azul. También encontramos que la variación en la longitud de este dominio afecta la interacción con un componente central de la vía de señalización de luz azul. Hasta la fecha, se pensaba que el dominio C-terminal de HYL1 era inútil para la actividad de la proteína. Aquí mostramos que por más que pueda ser prescindible para la actividad de HYL1 en la biogénesis de miARNs, podría ser responsable de la participación de esta proteína en otras vías celulares.

4 ABSTRACT

As photo-autotrophic and sessile organisms, plants depend on light, a resource that may become scarce in nature. To overcome such environmental fluctuations, plants reprogram their development to adjust their growth in search for a proper light source. The developmental plasticity of plants is orchestrated at the transcriptional level by the harmonious temporal and spatial expression of specific transcription factors, which in turn are common targets of miRNA-mediated silencing. The regulation of the miRNA biogenesis is not an unusual phenomenon. Thus, plants can alter the steady levels of mature miRNAs in a given tissue/condition to balance many developmental processes, including growth, depending on the environment. In plants, as in any Eukaryotic organism, protein post-translational modifications play a crucial role as regulatory mechanisms in most cellular processes. Particularly, protein phosphorylation is one of the central reversible post-translational modifications that regulate cellular metabolism, protein–protein interactions, enzyme activities, and protein degradation. In this thesis, we show that plants rely on a microRNA (miRNA) biogenesis shutdown during long periods of limited light, followed by a quick recovery after light restoration, to orchestrate the plant development in response to the dark/light transition. Mechanistically, an active form of the miRNA biogenesis factor HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) is degraded during light deprivation while an inactive pool of phosphorylated protein remains protected inside the nucleus. Degradation of the active HYL1 component leads to the release of gene silencing, triggering the developmental features characteristic of the plant response to dark. Upon light restoration, a quick dephosphorylation of the HYL1 reserve pool leads to the reactivation of miRNA biogenesis, a switch in the developmental program and the activation of the photomorphogenic response. Our findings thus define a unique and fast regulatory mechanism controlling the plant silencing machinery during plant light response. Remarkably, the quick nature of the HYL1 reactivation mechanism provides one of the few examples where post-translational regulation of a central player in miRNA biogenesis mediates a fast switch between opposite developmental responses.

Additionally, we found that the phosphorylation of the C-terminal region of HYL1 also appears to have regulatory roles on the protein activity. Such protein modification impacts the affinity of HYL1 with other interacting partners of either the miRNA or the blue light signaling pathways. We also found that the variation in length of this domain also affects the interaction with a component of the blue light signaling pathway. To date, the HYL1 C-terminal domain was thought to be dispensable for the protein activity, premise that we challenged in this thesis. Here, we show that it may be dispensable for

HYL1 activity in the miRNA biogenesis, but it might be responsible for the participation of this protein in other cellular pathways.

INTRODUCCIÓN

5 INTRODUCCIÓN

Al ser organismos foto-autotróficos, las plantas dependen de la luz para su crecimiento, un recurso que, dada su naturaleza sésil, puede volverse limitante en algunas condiciones. En este sentido no solo los ciclos estacionales modifican la cantidad y calidad de luz disponibles. Por ejemplo, las semillas pueden germinar debajo de la superficie del suelo y quedar en completa oscuridad por días; sus órganos aéreos pueden quedar enterrados por alteraciones en el suelo, por objetos inanimados o por material senescente de otras plantas; así mismo, la llegada de luz solar puede estar limitada por la presencia de plantas vecinas. Para compensar la falta de movilidad, las plantas poseen programas de desarrollo increíblemente adaptables [1]–[3]. Así, ante la ausencia de luz reprimen el programa de crecimiento fotomorfogénico, cambiándolo por el de escotomorfogénesis, y ante la sombra de plantas vecinas activan el programa conocido como síndrome de evasión a la sombra. Tanto la escotomorfogénesis como el síndrome de evasión a la sombra tienen como objetivo superar la limitación de luz mediante cambios en el desarrollo destinados a alcanzar fuentes lumínicas adecuadas. Esta plasticidad y capacidad de las plantas de flexibilizar su programa de desarrollo según el medio que las rodea es orquestada a nivel molecular mediante un armonioso balance entre la expresión y represión de factores de transcripción (FTs) implicados en la regulación de genes importantes para el desarrollo [4]. En este sentido, los mecanismos de silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS, del inglés *post-transcriptional gene silencing*) son esenciales para lograr modificar los niveles de FTs rápidamente, tanto espacial como temporalmente, para permitir los cambios necesarios para adaptarse al entorno cambiante [5]. El PTGS, que forma parte del conjunto de procesos conocido como silenciamiento génico, usa ARNs pequeños (sARNs, del inglés *small RNAs*) para guiar a el complejo efector RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) hacia ARNs mensajeros (ARNm) blanco disparando su degradación, bloqueando su traducción o alterando su estabilidad [6].

5.1 El descubrimiento de los ARNs pequeños

No fue hasta hace unas tres décadas atrás que comenzó a vislumbrarse la existencia, diversidad e importancia de la regulación mediada por sARNs en organismos eucariotas. Llamativamente los primeros indicios del fenómeno de silenciamiento génico comenzaron a apreciarse en la década del 90, en trabajos realizados en plantas [7]. En un estudio realizado por Matzke y col. en 1989 [8], se introdujeron dos ADN-T (ADN de transferencia) en el genoma de *Nicotiana tabacum* que codificaban dos marcadores de

selección diferentes. Los autores reportaron que el marcador de selección codificado por el primer ADN-T transformado se volvió inactivo en un subconjunto de su población luego de introducir el segundo vector. La inactivación observada del transgén fue correlacionada con la metilación de la secuencia promotora que controlaba la expresión del gen de selección. Los autores sugirieron que la homología compartida por los dos vectores, incluyendo dos copias del mismo promotor, pudo ser la causa de la metilación del primer vector.

El año siguiente, trabajos realizados con plantas de petunia (*Petunia hybrida*) proporcionaron indicios adicionales de la existencia de mecanismos de silenciamiento génico dependiente de la homología. Las mismas se modificaron para llevar copias adicionales del gen de pigmentación en flores, chalcona sintasa (*CHS*), con el objetivo de obtener plantas con flores de color violeta intenso. Sin embargo, el resultado fue casi el opuesto, obteniendo plantas con flores color violeta intenso, flores con patrones de violeta y blanco, y otras completamente blancas. Análisis moleculares de las poblaciones transformadas revelaron que en algunas líneas de plantas tanto el gen introducido como el endógeno de *CHS* se encontraban silenciados en diferentes grados, en un fenómeno que los autores denominaron “co-supresión” [9], [10].

Los mecanismos inherentes a estas enigmáticas observaciones, los primeros indicios del silenciamiento génico, permanecieron sin descifrarse por varios años. En el año 1993 una serie de descubrimientos fueron fundamentales para el posterior descubrimiento del PTGS. Por un lado, los laboratorios de Victor Ambros y Gary Ruvkun identificaron en simultáneo los primeros ARNs pequeños derivados del gen *lin-4* de *Caenorhabditis elegans*, los cuales eran complementarios y podían regular al gen *lin-14* del mismo organismo [11], [12]. Por otro lado, el laboratorio del Dr. William Dougherty observó que el fenómeno de “co-supresión” también ocurría en plantas modificadas para expresar secuencias codificadas por genomas virales. Las plantas que expresaban proteínas virales generalmente eran resistentes al virus del cual derivaban las secuencias o a cepas relacionadas [13]. Los análisis moleculares de tejidos infectados mostraban que los genes virales eran transcritos activamente, pero el ARNm correspondiente no se acumulaba. Estas observaciones llevaron a los autores a especular que la co-supresión iniciada por el transgén, la cual llamaron silenciamiento del gen, y el desencadenante viral estaba localizada en el citoplasma y ocurría a nivel post-transcripcional. Además, los autores propusieron que este proceso era iniciado por altos niveles de ARN en el citoplasma, y que una la hebra de ARN complementaria iniciaba el proceso de degradación del ARN viral [13].

Hasta 1995 se aceptaba que ARNs antisentidos, complementarios a un ARNm, bloqueaban la traducción del mismo produciendo el fenómeno de co-supresión. Sin embargo, en ese año Guo y Kemphues [14] observaron que tanto la introducción de ARN sentido como antisentido al ARNm de *par-1* en *C. elegans* resultaba en la degradación del mismo. Este descubrimiento accidental, en el que la transformación con la hebra sentido estaba pensada como un control negativo, llevó a los científicos a replantear el modelo vigente en ese momento. En los siguientes tres años numerosos descubrimientos fueron hechos en relación al proceso de PTGS. En particular, el laboratorio del Dr. Baulcombe en Cambridge fue pionero en estos trabajos. Mediante estudios de defensa de plantas contra virus confirmaron que el ARN no solo era el blanco del silenciamiento, pero también el origen. Postularon que en particular el ARN doble cadena era la causa del silenciamiento e incluso que el silenciamiento podría ser una señal móvil en la planta [15]–[19].

En 1998 un estudio realizado por Fire y col. [20] en *Caenorhabditis elegans* reveló que los dsARNs largos, y no los simple cadena sentido o antisentido, son los que confieren un silenciamiento efectivo y específico de secuencia de genes endógenos en un proceso que se denominó silenciamiento de ARNs [20]. Con otro estudio realizado con transgenes en plantas, Hamilton y Baulcombe descubrieron que este silenciamiento de ARNs era causado por moléculas de ARN pequeñas [21]. Este descubrimiento se originó de la observación que, aun cuando era aceptado que un intermediario dsARN del ARNm era necesario para iniciar el silenciamiento, esta molécula completa no podía ser detectada. Esto llevó a los autores a buscar formas más cortas del ARN antisentido derivadas del dsARN, detectando ARN antisentido de una longitud aproximada de 25 nucleótidos (nt). Sugirieron que esta era la longitud necesaria para disparar el silenciamiento específico de ARNs [21]. El año siguiente, dos grupos independientes de bioquímicos utilizaron extractos de células de *Drosophila* para identificar el intermediario del silenciamiento. Ambos grupos encontraron ARNs de 21-23 nt, sugiriendo que el dsARN era convertido a intermediarios más cortos, ARNs pequeños de interferencia (siARNs, del inglés *small interfering RNA*), capaces de unirse a ARNm homólogo blanco, llevando al clivaje del transcripto [22], [23]. En 2001 se encontraron decenas de miARNs en varias especies animales mediante clonación directa [24]–[26]. En el año 2006 el premio Nobel de Medicina fue otorgado a Andrew Fire y Craig Mello por el descubrimiento del ARN de interferencia, galardón que para muchos ignoró la inmensa contribución y descubrimientos hechos previamente en plantas [27].

Desde entonces, los ARNs pequeños han sido identificados en la mayoría de los organismos eucariotas y se los ha vinculados a diversos mecanismos de regulación génica y controlando diversos procesos biológicos.

5.2 ARNs pequeños de plantas

“ARN pequeño” es un término quizás un poco arbitrario, ya que previamente fue utilizado para otros ARNs no codificantes, tal como los ARNs pequeños nucleares (snARNs) y ARNs de transferencia (tARNs) [28]. ARNs cortos regulatorios de bacterias también han sido referidos como ARN pequeños, aunque no están relacionados a los ARNs pequeños eucarióticos. Lo que distingue y define a los sARNs eucarióticos en la vía de silenciamiento génico es su rango de tamaño limitado (~20–30 nt) y su asociación con proteínas de la familia Argonauta [28]. Esta familia puede ser agrupada además en dos clados: las subfamilias Ago y Piwi. En animales se pueden encontrar al menos tres clases de sARNs, basados en el mecanismo de biogénesis y el tipo de proteína Argonauta con la que se asocian: miARNs, ARNs pequeños de interferencia endógenos (endo-siARNs) y los ARNs que interactúan con Piwi (piARNs) [28]. Los sARNs endógenos de plantas están constituidos por dos clases principales, los miARNs y los siARNs. Aunque no poseen la tercera clase de sARNs encontrados en animales, los piARNs, las plantas han expandido su repertorio de siARNs, algunos de los cuales cumplen funciones moleculares y de desarrollo similares a las de los piARNs en animales [29].

En plantas los sARNs están involucrados en modular su desarrollo y reproducción, en reprogramar y mantener la estabilidad del genoma, en la defensa contra organismos patógenos, en particular virus, y en proveer a las plantas de su enorme capacidad adaptativa. En general, se acepta que las vías de regulación mediadas por sARNs evolucionaron como un mecanismo de defensa celular contra virus de ARN y para controlar elementos transponibles, y luego se adaptaron para regular la expresión de genes endógenos [30]. Esto es consistente con el hecho de que la mayoría de las clases de sARNs tienen un rol reconocido tanto en las respuestas de defensa como en la regulación epigenética, pero su importancia relativa y superposición entre las vías varía entre las distintas especies de plantas [31].

A diferencia de los sARNs animales, que son producidos por la acción combinada de Dicer y Drosha (miARNs), de Dicer (endo-siARNs) o de forma independiente a éstas (piRNAs) [28], la mayoría de los sARNs de plantas se producen como moléculas de ARN de 20 a 24 nt como resultado de la actividad exclusiva de proteínas DICER-LIKE (DCL) [32], [33]. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* tiene

cuatro proteínas DCL (DCL1-4) con funciones específicas, jerárquicas y superpuestas en la biogénesis de sARNs. Estas endonucleasas reconocen ARNs de doble cadena que se forman por el plegamiento sobre sí misma de una hebra con secuencia complementaria, por el apareamiento de ARNm transcritos en ambos sentidos, o por la síntesis de una segunda hebra sobre un ARN simple cadena mediada por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDR, del inglés *RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE*). Usando estos moldes, las enzimas DCL producen dúplex de sARNs doble cadena de distinto largo según la enzima actuante. A diferencia de los miARNs y endo-siARNs de animales, pero de forma similar a los piARNs [28] y los sARNs cargados en dAGO2 en *Drosophila* [34], el dúplex generado por DCL es metilado por la ARN metiltransferasa HUA ENHANCER1 (HEN1), protegiéndolos de la uridilación y subsecuente degradación [35], [36]. Al igual que en animales, una de las hebras del dúplex, denominada hebra guía, se carga en una proteína ARGONAUTA (AGO), mientras la otra hebra (pasajera) es normalmente degradada, aunque ocasionalmente puede ser funcional [37]. Las proteínas ARGONAUTA recibieron este nombre por Bohmert y col. (1998) [38] dada la semejanza de la planta mutante en el gen que codifica AGO1 en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con los tentáculos del molusco *Argonauta*. En animales, las proteínas Argonauta se separan en los dos clados en base a la homología a con AGO1 de *Arabidopsis* o con la proteína PIWI de *Drosophila* [39]. Las proteínas Argonauta se encuentran conservadas entre especies, y muchos organismos expresan familias con muchos miembros, que van desde 1 en *Schizosaccharomyces pombe*, 5 en *Drosophila*, 8 en humans, 10 en *Arabidopsis* hasta 27 en *C. elegans* [39].

En plantas, el complejo dado por la asociación de un sARN, AGO y proteínas accesorias se denomina comúnmente RISC (*RNA-induced silencing complex*), independientemente de qué tipo de sARN involucrado, y es el responsable de llevar a cabo los diversos procesos de silenciamiento génico [30]. El mecanismo inherente al silenciamiento de un gen depende de la naturaleza del transcripto blanco, de la proteína AGO involucrada y del origen del sARN. Entre las 10 proteínas AGO de *Arabidopsis*, AGO8 presenta niveles de expresión indetectables en todos los estadios y tejidos de *Arabidopsis* estudiados, por lo que es considerado un pseudogen sin función alguna. El resto ha sido asociado funcionalmente con varias clases de sARNs [40], [41].

En función de las características de los precursores, los sARNs de plantas pueden ser divididos en dos grandes grupos. Por un lado, encontramos a los derivados de precursores formados por la hibridación intermolecular de dos hebras complementarias de ARN, o la síntesis de una hebra complementaria sobre un ARN

simple cadena, conocidos como siARNs. Por el otro, aquellos sARNs derivados de precursores de ARN simple hebra que adopta una estructura de horquilla, o tallo y bucle, debido a la propia complementariedad de secuencia (hpARNs, del inglés *hairpin RNAs*). Estos dos grandes grupos pueden ser divididos en subclases en base a los mecanismos de biogénesis y/o función (Figura 1) [31].

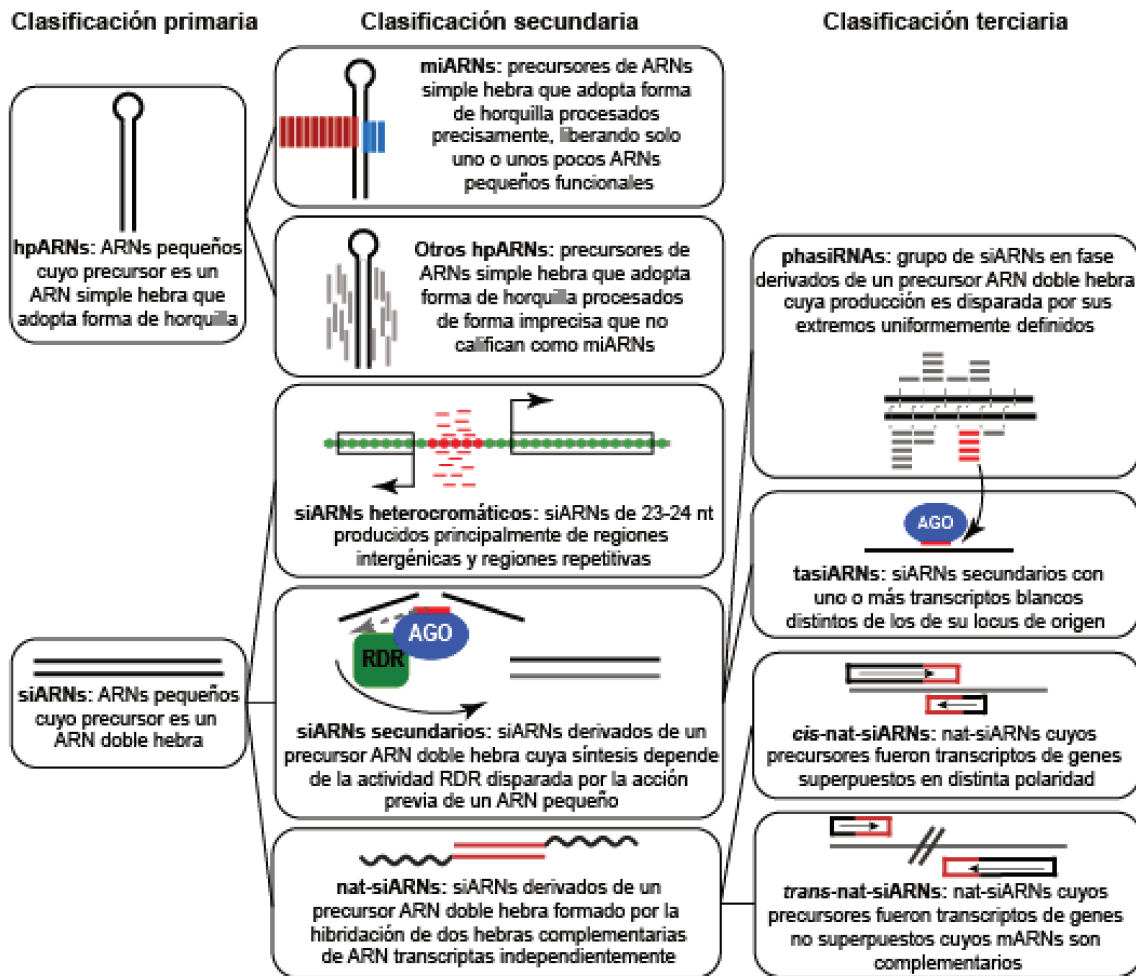


Figura 1. Clasificación de ARNs pequeños en plantas (figura modificada de Axtell y col., 2013 [31]).

5.2.1 ARNs pequeños de interferencia

Los sARNs derivados de ARN bicatenario pueden dividirse a su vez en tres grupos: los siARNs heterocromáticos, los siARNs secundarios y los siARNs derivados de transcritos antisentido naturales (Figura 1).

Los siARNs heterocromáticos derivan de regiones intergénicas ricas en transposones y/o regiones génicas repetitivas, y están asociados con la metilación *de novo* de citosinas (5-metil citosina), principalmente en contextos asimétricos CHH, la posterior metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9), la compactación de la cromatina

y por ende con la represión de los *loci* de ADN blanco [42], [43]. La mayoría de los siARNs heterocromáticos son de 23-24 nt de longitud, dependen de RDR2 y DCL3 para su biogénesis y tienen afinidad específica por AGO4 y AGO6. Estas características los distinguen fácilmente de las otras clases de sARNs endógenos, que en su mayoría tienen 20-22 nt y se unen a otras proteínas AGO, principalmente AGO1 [31].

Los siARNs secundarios, por su parte, derivan de precursores doble cadena cuya síntesis es iniciada luego del reconocimiento de un ARN blanco por uno o más sARNs. El reconocimiento por parte de sARNs, generalmente de 22 nt de longitud, de algunos transcritos permite el reclutamiento de la proteína RDR6, la síntesis de la hebra complementaria de ARN, y el posterior procesamiento del ARN doble cadena resultante en siARNs secundarios por acción de las enzimas DCL2 o DCL4 [44], [45]. Los siARNs resultantes pueden a su vez asociarse con AGO1 y silenciar genes blancos en *trans* (trans acting siARN o tasiARNs) o actuar sobre su propio *locus* y mensajero de origen (siARN secundarios o siARN en fase, phasiARN). Las dos clasificaciones terciarias, phasiARNs y tasiARNs, generalmente aplican al mismo locus: muchos de los tasiARNs conocidos también actúan como phasiARNs [31]. Esta clase de sARNs está implicada en diferentes aspectos del desarrollo y defensa de la planta [31]

Al contrario de los otros tipos de siARNs, que dependen de una RDR para sintetizar el precursor doble hebra, los precursores de los nat-siARNs surgen de la hibridación de ARNs endógenos que comparten complementariedad de secuencia con otros transcritos (Figura 1). Este tipo de siARN ha sido identificado en múltiples eucariotas, incluyendo humanos, ratones, levaduras, arroz y *Arabidopsis* [46]. Los ARNs que forman el precursor pueden o no codificar para proteínas, aunque lo más común es que sean no codificantes [47]. Además, cuando éstos provienen del mismo *locus* pero de hebras opuestas, se forman regiones complementarias perfectas que dan lugar a la generación de cis-nat-ARNs (Figura 1). Alternativamente, los trans-nat-siARNs se originan de hibridaciones entre ARNs transcritos de diferentes localizaciones genómicas, formando ARNs doble hebra imperfectos (Figura 1) [31], [46].

5.2.2 *micro ARNs*

En plantas, la enorme mayoría de los siARNs clasificados como hpARNs pertenecen a la subclasificación de miARNs (Figura 1). Los miARNs difieren del resto de los hpARNs en que su estructura de tallo y bucle con apareamiento imperfecto generalmente solo produce un dúplex de miARN bien definido y conservado entre especies [48], [49].

Aunque en general los miARNs de plantas son similares a los de animales, la vía de silenciamiento mediada por estos sARNs muestra varias diferencias sustanciales. En primer lugar, en animales los miARNs están codificados mayoritariamente dentro de otros genes codificantes, mientras que en plantas los *loci* que producen miARNs son generalmente unidades transcripcionales independientes. Mientras que en animales la biogénesis es bi-compartimentalizada, con etapas en el núcleo y en el citoplasma, y requiere de dos tipos de endonucleasas de tipo III (Drosha y Dicer), en plantas, la biogénesis es llevada a cabo enteramente en el núcleo y solo requiere un tipo de endonucleasa de tipo III. También se destaca que, a diferencia de animales, los precursores de miARNs de plantas tienen estructuras y tamaños variables. Además, los miARNs maduros de plantas tienen complementariedad casi perfecta con los sitios blanco de sus blancos, a diferencia de animales, donde la complementariedad está dada principalmente en la región raíz del miARN. Otra particularidad es que, en animales, los miARNs generalmente reconocen varias secuencias blanco en las regiones no traducidas de los ARNm (UTR del inglés *untranslated region*) y causan su inhibición traduccional y desestabilización, mientras que en plantas los miARNs generalmente reconocen un solo sitio en sus blancos, en la región codificante, y guían el clivaje del ARNm. Adicionalmente, mientras en animales es común que un miARN regule la expresión de numerosos ARNm blanco, y a su vez un mismo ARNm sea regulado por varios miARNs [50], los miARNs de plantas tienen generalmente un conjunto definido de ARNm blanco [51].

Las secuencias de miARNs no están conservadas entre animales y plantas, aunque sí están altamente conservada dentro de cada reino, y esta conservación evolucionaria es una de las características que los definen [52]. Se han identificado muchos miARNs animales involucrados en una gran variedad de roles tales como el tiempo de desarrollo, proliferación y muerte celular, hematopoyesis, definición del patrón del sistema nervioso e incluso en la respuesta a estímulos ambientales [53]. Los miARNs de plantas conocidos tienen una notable preferencia por silenciar familias de genes que codifican factores de transcripción, particularmente aquellos con roles asociados al patrón de desarrollo o la diferenciación celular [54]. Esta preferencia es la causa principal de que mutaciones en la maquinaria de biogénesis lleven a importantes defectos morfológicos en las plantas, e incluso a causar la letalidad de embriones [55]. Así, los miARNs de plantas cumplen funciones importantes en el desarrollo de órganos, tal como morfogénesis de hojas, identidad de órgano floral y desarrollo de raíces, así como en regulaciones retroactivas en la vía de ARNs pequeños y la biogénesis de

algunos siARNs. Además, están involucrados en la respuesta a varios tipos de estrés tanto bióticos como abióticos [56].

5.3 Biogénesis de miARNs en plantas

Los miARNs son componentes esenciales de la maquinaria de silenciamiento de genes en la mayoría de los organismos eucariotas y por lo tanto su biogénesis está altamente regulada.

Los componentes centrales de la vía de biogénesis de miARNs de plantas, como DCL1, HYPOPLASTIC LEAVES1 (HYL1) y SERRATE (SE), fueron los primeros en ser identificados y sirvieron como base para la confección de los primeros modelos de biogénesis de miARNs [57]. Lejos de los modelos simplificados, la complejidad de esta vía hoy resulta evidente, especialmente su plasticidad, regulación e interrelación con otros procesos biológicos [58]. La producción de miARNs es un proceso específico de tejido, está estrechamente asociado con la transcripción y el *splicing* de ARNm, e incluso varía entre los precursores de miARNs [58]. A fin de facilitar la comprensión de la biogénesis de miARNs resulta útil dividir el proceso, las proteínas participantes y los eventos particulares en distintas etapas.

5.3.1 *Eventos transcripcionales tempranos y ensamblado del complejo de procesamiento*

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los miARNs de plantas están codificados en unidades transcripcionales independientes. Por lo tanto, cada gen *MIR* en el genoma contiene su propio promotor, regiones regulatorias, terminador e incluso algunos contienen intrones [59]. Como para cualquier ARNm codificante, los genes *MIR* son transcritos por la ARN polimerasa II (RNAPII, del inglés *RNA polymerase II*) en un proceso regulado por el complejo MEDIATOR y por la fosforilación, dependientes de ciclinas (CDKF1 y CDKDs), del dominio C-terminal de la subunidad más grande de RNAPII (RNAPII-CTD) [60], [61]. Al igual que cualquier ARN codificante, los transcritos primarios de los precursores de miARNs (pri-miARNs) son protegidos de la degradación por la adición de la caperuza (*CAP*) en su extremo 5', poliadenilados en su extremo 3', y en aquellos casos que contengan intrones, los mismos son eliminados mediante *splicing* [62].

De manera similar a la regulación transcripcional de genes codificantes, la expresión de cada gen individual de miARN es controlada por FTs específicos. La mayoría de estos casos no ameritan una introducción ampliada ya que actúan de forma general tanto para miARNs como para otros genes. Sin embargo, un conjunto de

proteínas que regulan o forman parte de la maquinaria de transcripción ha sido estrechamente ligado a la transcripción de miARNs. Estos factores incluyen a ELP2 y ELP5 del complejo Elongator [63], el factor de transcripción NEGATIVE ON TATA LESS 2 (NOT2) [64], la proteína de unión a ADN CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5) [65], la proteína ribosomal SHORT VALVE 1 (STV1) [66], PROTEIN PHOSPHATASE 4 (PP4) [67], el factor de *splicing* SMALL1 (SMA1) [68], la ATPasa CHROMATIN REMODELLING FACTOR 2 (CHR2) [69], el homólogo a la Exportina 5 HASTY (HST) [70], las proteínas asociadas al poro nuclear THO/HRP1 PHENOTYPE 1 (THP1) y SUPPRESSOR OF ACTIN 3A (SAC3A) del complejo TREX-2 [71]. En mutantes con pérdida de función de estas proteínas, los niveles de pri-miARNs, la actividad de los promotores *MIR* y/o la ocupancia de RNAPII se encuentran reducidos, sugiriendo que estas proteínas modulan la transcripción de los genes *MIR* promoviendo el reclutamiento de RNAPII a sus secuencias promotoras, ya sea de manera directa o indirecta [72]. Adicionalmente, algunas proteínas regulan negativamente la transcripción de genes *MIR*. Por ejemplo, La disrupción de la proteína F-Box CONSTITUTIVE EXPRESSER OF PR GENE 1 (CPR1) aumenta los niveles de transcritos de SUPPRESSOR OF npr1-1, CONSTITUTIVE 1 (SNC1), resultando en una transcripción reducida de pri-miARNs [73]. A su vez, algunos factores pueden actuar en ambos sentidos, activando y reprimiendo la transcripción. Tal es el caso de CYCLING DOF TRANSCRIPTION FACTORS 2 (CDF2), cuya mutación en *Arabidopsis* aumenta la transcripción de algunos genes *MIR*, mientras reprime la de otros [74].

Por mucho tiempo se pensó que la transcripción y procesamiento de pri-miARNs en plantas eran dos procesos separados, producidos de manera secuencial uno a continuación del otro. Sin embargo, se ha encontrado que muchas de las proteínas que regulan específicamente la transcripción de genes *MIR* son capaces de interactuar con algunas de las proteínas centrales del procesamiento de pri-miARNs [58]. Esto sugiere que los dos procesos, transcripción y procesamiento de pri-miARNs, están estrechamente asociados, produciéndose el ensamblado del complejo de procesamiento durante la transcripción. Una de las líneas de evidencia más sólidas fue el descubrimiento de la asociación de DCL1 y SE con *loci* de miARNs de forma dependiente del complejo *Elongator*, el cual a su vez también es necesario para la ocupación de la RNAPII en estos *loci* [63]. Esto sugiere que DCL1, y probablemente SE, son reclutadas al pri-miARN naciente co-transcripcionalmente, probablemente durante la elongación del transcritos. En línea con esta idea, las fosfatasa C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 y 2 (CPL1 y CPL2) interactúan tanto con RNAPII como con SE [75]. Posteriormente se han encontrado otras proteínas que se asocian

tanto con la maquinaria basal de transcripción como con componentes del complejo de procesamiento de miARNs [58]. Entre ellas, CDC5 [65] y varios componentes del complejo asociado a MOS4 (MAC), incluyendo a PRL1 (PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1) [76], MAC3 [77], MAC5 [78] y MAC7 [79], cumplen roles en la estabilización del pri-miARN naciente, e interactúan con DCL1 para promover su actividad [72]. Entre otras proteínas, varios factores de procesamiento de pre-ARNm, como CAP-BINDING PROTEIN 20 (CBP20) y CBP80 [80], SMA1 [68], STABILIZED1 (STA1) [81], HIGH OSMOTIC STRESS GENE EXPRESSION 5 (HOS5) [82], ARGININE/SERINE- RICH SPLICING FACTOR 40 (RS40) y RS41 [82], la subunidad U1 snRNP LETHAL UNLESS CBC 7 RL (LUC7rl) [83], THO2 en el complejo THO/TREX [84], GLYCINE- RICH RBP 7 (GPR7) [85], SICKLE (SIC) [86], PRE-MRNA-PROCESSING PROTEIN (PRP)39b, PRP40a, PRP40b [83], que también interactúan con DCL1 y regulan positivamente el procesamiento de pri-miARNs.

5.3.2 *Procesamiento de miARNs*

Incluso cuando la maquinaria de biogénesis es reclutada temprano durante la transcripción, esto no implica que el procesamiento de pri-miARNs tome lugar co-transcripcionalmente [58]. Desde su descubrimiento se sugirió que la maduración de los pri-miARNs ocurre en cuerpos nucleares denominados *dicing bodies* (D-Bodies) [87], [88]. Esta hipótesis se fundamenta en que la mayoría de los componentes de procesamiento de miARNs localiza en dichos cuerpos nucleares [58]. Al menos dos proteínas, MODIFIER OF SNC1 2 (MOS2) y el complejo THO/ TREX, parecen estar involucradas en el transporte/ensamblado de los componentes de los D-Bodies. Tanto MOS2 como THO2 (componente del complejo THO/TREX) están a su vez involucradas en la producción de miARNs [84], [89]. A diferencia de la mayoría de los cofactores de biogénesis de miARNs, ninguna de estas proteínas interactúa con la maquinaria de procesamiento de miARNs ni co-localiza dentro de los D-Bodies. En cambio, MOS2 y THO2 se unen a los pri-miARNs, facilitando su reclutamiento por HYL1. A pesar que todo sugiere que los D-Bodies son el lugar del procesamiento de miARNs, no se descarta que tengan funciones alternativas como, por ejemplo, que sean un sitio de reserva de proteínas inactivas, o que estén marcando los sitios de ensamblado de la maquinaria de biogénesis, y no necesariamente donde los pri-miARNs son procesados. Esto es apoyado por el hecho de que las plantas deficientes en componentes del complejo *Elongator* muestran una reducción drástica del número de D-Bodies que contienen a DCL1 [63]. Recientemente se demostró que tres regiones intrínsecamente desordenadas en SE median la separación de fase de este factor causando la formación

de los D-Bodies, proceso asociado directamente a la eficiencia de procesamiento de miARNs [90].

Sea dentro de los D-Bodies o libre en el nucleoplasma de la célula, el procesamiento de los miARNs comienza con el reconocimiento de la estructura de horquilla del transcripto primario de los genes *MIR* por parte de DCL1. La liberación precisa del miARN maduro desde el precursor es un aspecto clave de la biogénesis de miARNs, y altamente relevante para la regulación específica de sus ARNs blanco. Los precursores de miARNs son muy variables en forma y tamaño, y aun así son precisamente procesados para liberar secuencias específicas [91]–[93]. Se han identificado determinantes estructurales presentes en los precursores que guían a la maquinaria de procesamiento para producir cortes específicos a lo largo de las secuencias [91]–[98]. Se ha establecido que coexisten cuatro mecanismos diferentes de procesamiento, dependiendo de la naturaleza del pri-miARN, su tamaño y estructura. DCL1 es capaz de reconocer regiones desapareadas en el precursor e iniciar el procesamiento desde el bucle o desde la base del pri-miARN (procesamiento del bucle a la base, o de la base al bucle, respectivamente). A su vez, estos dos tipos de procesamiento pueden ser simples, en los casos en los que el dúplex miARN/miARN* es liberado con dos cortes de DCL1, o secuenciales, cuando la enzima debe realizar tres o más cortes sucesivos hasta liberar el dúplex de miARN funcional [93]. Adicionalmente, se ha encontrado que la identidad de los nucleótidos localizados en las posiciones no apareadas del precursor puede tener un gran impacto en la eficiencia de procesamiento. Ciertos pares de nucleótidos enfrentados en el tallo de los pri-miARNs, tales como C-C y G-G, están en gran parte excluidos de las estructuras de los precursores, especialmente de los sitios de clivaje por DCL1, y su presencia en los pri-miARNs resulta perjudicial para su procesamiento [99].

Debido a la enorme diversidad de secuencias y estructuras entre todos los pri-miARNs [100], DCL1 requiere de los cofactores SE y HYL1 para encontrar el sitio preciso de corte y liberar así un miARN funcional [101], [102]. Estudios realizados en plantas crecidas a diferentes temperaturas sugieren que, a bajas temperaturas, estos cofactores son necesarios para el procesamiento pri-miARNs de mayor complejidad, mientras el corte correcto de pri-miARNs por DCL1 podría ser independiente de HYL1 y SE para precursores cortos procesados desde la base hacia el bucle [103]. En el año 2010 se hipotetizó que HYL1 posee afinidad sólo por estructuras específicas, y no por secuencias [104]. Sin embargo, en un trabajo reciente se encontró que los pri-miARNs de plantas dicotiledóneas tienen un mayor contenido de GC en la región del miARN/miARN* [105]. Este enriquecimiento se da en posiciones específicas dentro del

miARN, y los precursores de miARNs con estas características son unidos con mayor especificidad por HYL1 [105]. Por lo tanto, HYL1 podría contribuir al corte preciso de los precursores por DCL1 no solo reconociendo patrones estructurales, sino también ciertas “etiquetas” en la secuencia correspondiente al miARN/miARN*. Esta hipótesis además se sustenta en la capacidad de HYL1 de unir específicamente la región miARN/miARN*, y permanecer unida al dúplex maduro luego de ser procesado.

Alternativamente, se ha propuesto que DCL1 podría no ser la única endonucleasa encargada de cortar los precursores de miARNs. Cho y col. [106] identificaron una endonucleasa que denominaron *HYL1-interacting GIY-YIG-like endonuclease* (HIGLE). La misma es capaz de procesar precursores de miARNs en fragmentos cortos *in vitro*, aunque su actividad es suprimida por la asociación con HYL1 y SE. Así, HIGLE podría estar encargada del corte de precursores que adoptan forma de horquilla, pero escapan a los determinantes estructurales de los sustratos de DCL1. Algo similar ha sido descrito para DCL3, quien es capaz de procesar pri-miARNs en siRNAs de 24 nt no funcionales, pero solo en aquellos casos o tejidos donde DCL1 no está activa.

La vía de biogénesis de miARNs es representada esquemáticamente en la Figura 2.

5.3.3 Etapas post-procesamiento

Una vez liberado el dúplex de miARN, sus extremos 3' son metilados por la metiltransferasa HEN1 [35], [36] y posteriormente una de sus hebras es cargada en AGO1 para formar el complejo efector RISC. HEN1 localiza tanto en núcleo, donde metila miARNs e interacciona con DCL1 y HYL1 [107], como en citoplasma, donde podría metilar otros tipos de sARNs [87]. Además, se ha demostrado que HEN1 y SE interaccionan en la misma región de la proteína DCL1 [107], implicando que SE debe disociarse del complejo de procesamiento para permitir la unión de HEN1. Por otro lado, la evidencia sugiere que HYL1, como un dímero, se une a la región miARN/miARN* del pri-miARN, y se mantiene unida al dúplex de miARN maduro luego de su procesamiento [104], [108]. Esto sugiere que HYL1 podría estabilizar al miARN hasta ser transferido a la proteína efectora AGO1, en un proceso que implica a la recientemente identificada proteína CARP9 [109].

Por mucho tiempo se asumió que una vez procesados los miARNs eran exportados fuera del núcleo por la proteína HASTY (HST) y luego cargados en AGO1 en el citosol. Esta asunción se basó en la homología de HST con a Exportina 5 de humanos, quien se encarga de exportar pre-miARNs de núcleo a citoplasma. Este

paralelismo fue recientemente refutado al demostrarse que HST, a pesar de ser una proteína tipo *carrier*, no participa en la redistribución subcelular de los miARNs maduros [70]. Por el contrario, se descubrió que HST actúa mucho más temprano en la vía funcionando como andamio entre el complejo MEDIATOR y DCL1 para el ensamblado de la maquinaria de procesamiento [70].

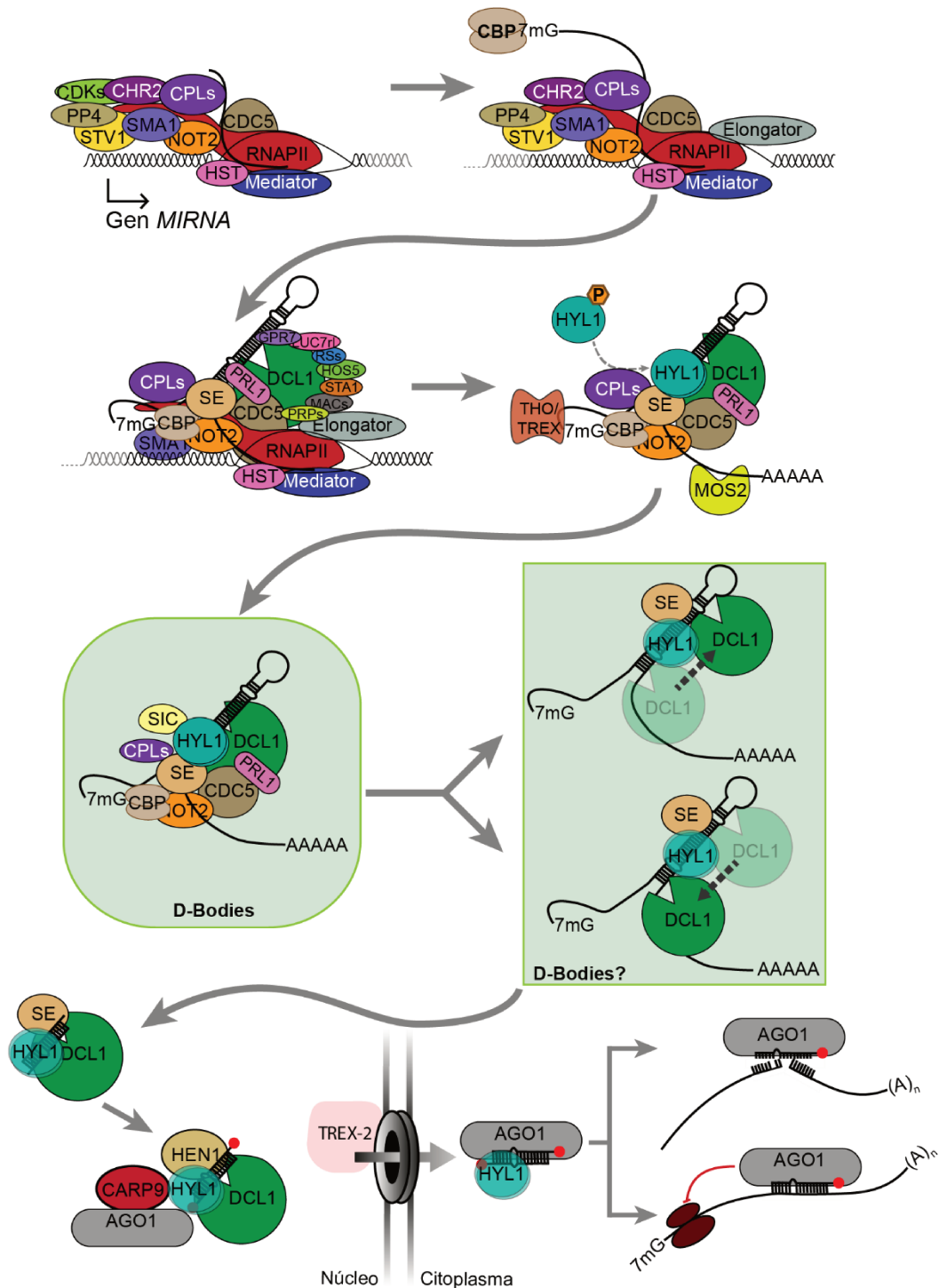


Figura 2. Representación esquemática de la vía de biogénesis de miARNs en plantas (figura modificada de Achkar y col., 2016 [58]).

Por otro lado, se descubrió que la misma proteína AGO1 es capaz de ingresar al núcleo, asociarse a los miARNs y regresar a citoplasma donde cumplen su función regulatoria [110]. En línea con estos resultados, se identificó al complejo TREX-2 como un componente de la maquinaria que exporta al citoplasma los complejos AGO1:miARN formados en el núcleo [111]. Sin embargo, experimentos de exclusión molecular han demostrado que también existe una considerable cantidad de miARNs no asociados a AGO1 en el citoplasma [112] lo que sugiere que estas moléculas pueden salir del núcleo por otro mecanismo aún desconocido. Se ha demostrado que los miARNs, así como los siARNs, pueden actuar como señales móviles [113]–[118]. Esta movilidad parece estar regulada, ya que es direccional en algunas interfaces entre células [119]. Un trabajo reciente muestra que los microtúbulos participan en la movilización de miARNs citoplasmáticos no cargados hacia otras células [120]. En los tejidos de origen, los mismos inhiben la carga de miARNs en AGO1 para permitir su movilización, y por lo tanto acción en tejidos diferentes del cual fueron producidos [120].

A fin de cumplir su función, la proteína AGO1 asociada con un miARN forma un complejo con las proteínas HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) [121] y SQUINT (SQN) [122] para dar lugar al complejo RISC maduro. Durante este proceso de formación del complejo RISC, AGO1 remueve una de las dos hebras del dúplex de miARN:miARN*, permitiendo a la hebra restante hibridar con el ARNm blanco. El mecanismo preciso por el cual AGO1 selecciona específicamente una de las hebras es un aspecto de la vía pobremente comprendido, aunque se han identificado algunas características que podrían explicar el fenómeno [123], [124]. Sí se ha establecido que HYL1 es un elemento importante para la selección de la hebra guía por AGO1 [125]. Esto sugiere que la selección de hebras podría ocurrir dentro del núcleo, donde se ha detectado interacción HYL1-AGO1 [58], [87] o en citoplasma, donde HYL1 es abundante y su función mayoritariamente desconocida. En un trabajo reciente se encontró que el pool citoplasmático de HYL1 interacciona con AGO1, y esta interacción resulta importante para la localización de AGO1 en polisomas, así como para llevar a cabo el mecanismo de inhibición traduccional [126].

En plantas, el PTGS puede llevarse a cabo mediante la inhibición de la traducción, o por corte y degradación del ARNm blanco, siendo este último el más frecuente. La tendencia de los miARNs de plantas a clivar a sus ARNm blancos es consecuencia de la alta complementariedad de secuencia entre las moléculas, sobre todo entre los nt 10 y 11, un requerimiento para un corte catalizado por las proteínas AGO [127], [128]. Uno de los dominios de las proteínas AGO, denominado PIWI, forma un pliegue similar a una RNasa-H con actividad endonucleasa, capaz de escindir los

ARNs blanco que son complementarios con la hebra guía cargada. Esta actividad de corte fue demostrada en *Arabidopsis* para AGO1, AGO2, AGO4, AGO7, y en menor medida para AGO10 [57].

Si bien es ampliamente aceptado que en plantas el silenciamiento mediado por miARNs ocurre mayoritariamente por el mecanismo de corte, hay evidencia suficiente para asegurar que la inhibición traduccional mediada por miARNs es considerable y tiene un impacto importante sobre el transcriptoma de plantas [129]–[134]. Asimismo, se ha demostrado que algunos transcritos pueden ser silenciados tanto por inhibición de la traducción como por degradación [129], [132], [134]. Este es un hecho importante, ya que mientras el corte y degradación por miARNs es un efecto permanente, la inhibición traduccional representa un proceso potencialmente reversible.

5.5 Acciones jerárquicas en la vía

Se han descrito varios casos de acciones jerárquicas e incluso redundancia entre los componentes de la vía de miARNs. Algunos de los casos más prominentes son las fosfatasas CPL1 y 2, muchos miembros de la familia de proteínas AGO, las enzimas DCLs y las proteínas de unión a ARN doble cadena (DRBs, del inglés *double-stranded (ds) RNA-binding proteins*) que incluyen a la proteína HYL1 [58].

En *Arabidopsis* hay 5 miembros en la familia de proteínas DRB [135], [136]. Mientras que HYL1, también conocida como DRB1, es un factor ampliamente estudiado de la biogénesis de miARNs, las otras DRBs tienen funciones menos conocidas [137]. Estudios en mutantes simples y múltiples de los genes que codifican las proteínas DRBs sugirieron que solo HYL1 actúa en la vía de miARNs dado que solo mutantes en este gen presentaban alteraciones en los niveles de miARNs y un fenotipo asociado. Sin embargo, un análisis de acumulación de miARNs en mutantes de DRB centrado solo en los tejidos donde se expresan estas proteínas, reveló que DRB2 actúa, en algunos tejidos de manera antagonista y sinérgica con HYL1 para un subconjunto específico de miARNs [138]. En estos tejidos DRB2 reprime la expresión de HYL1 e induce la inhibición de la traducción mediada por miARNs de genes blanco [139]. A pesar de no afectar la producción de miARNs, DRB3 y DRB5 cooperan con DRB2 en el silenciamiento de genes [140]. DRB3 y DRB5 podrían también modular la inhibición de la traducción mediada por DRB2, debido a que ambas proteínas localizan en el citoplasma, donde se espera que tenga lugar la inhibición de la traducción mediada por DRB2.

5.6 HYPONASTIC LEAVES1: Características y regulación post-traducciona

Considerando el importante rol de los miARNs en la regulación de genes, no es sorprendente que plantas mutantes en los genes que codifican proteínas involucradas en esta vía, como DCL1 y AGO1, sean inviábiles y aborten a nivel embrionario. En este sentido, plantas mutantes en el gen que codifica para HYL1 presenta marcados defectos en el desarrollo, una reducida fertilidad y una fuerte caída en los niveles de miARNs, pero son viables. Estas características hacen de HYL1 un interesante candidato para estudiar los mecanismos de regulación de la biogénesis y función de miARNs, y en particular su regulación post-traducciona. La modificación post-traducciona de proteínas es un mecanismo de regulación común encontrado en la mayoría de los procesos celulares. La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales centrales y reversibles que regulan el metabolismo celular, interacciones entre proteínas y su degradación, así como la actividad de enzimas [141]. La vía de biogénesis de miARNs también está sujeta a este tipo de regulación, siendo HYL1 una de las proteínas más reguladas.

HYL1 está compuesta por dos dominios de unión a ARN doble hebra (DRBMs, *double stranded-RNA binding motifs*), el DRBM1, responsable de la interacción con pri-miARNs y el DRBM2, que permite la interacción con tras proteínas [104]. Hacia la región C-terminal se encuentra una señal de localización nuclear (NLS) seguida de un dominio compuesto por 6 repeticiones de 28 aminoácidos con una alta conservación de secuencia, incluso a nivel nucleotídico (Figura 3A) [142]. Se ha demostrado que la región de HYL1 que contiene los dominios DRBM1 y 2 es suficiente para rescatar el fenotipo morfológico y molecular de la mutante *hyl1-2*, sugiriendo que la región C-terminal no es necesaria para la función de esta proteína [143]. Sin embargo, un estudio de fosfoproteómica descubrió que las repeticiones localizadas en el extremo C-terminal de HYL1 se encuentran fosforiladas, sugiriendo que esta región podría tener importantes funciones regulatorias [144]. En el mismo estudio se demostró que la fosforilación de dos serinas, de entre 7 serinas potencialmente fosforilables fuera de la región C-terminal, regulan la actividad de HYL1 [144]. En este sentido, la fosforilación de las serinas S42 y S159, localizadas en los DRBM1 y DRBM2 respectivamente, inhibe la actividad de HYL1 impactando negativamente la producción de miARNs [144], [145] (Figura 3A). La desfosforilación y, por lo tanto, activación, de HYL1 es mediada principalmente por CPL1 y en menor medida por CPL2. Se encontró que CPL1 no interactúa de forma directa con HYL1, sino formando un complejo en el que ambas proteínas interaccionan con SE [144]. Contrarrestando la actividad de CPL1/2, se ha

reportado que la quinasa MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 3 (MPK3) fosforila a HYL1 *in vitro* [135]. Adicionalmente, se encontró que miembros funcionalmente redundantes de la familia de quinasas SnRK2 (*SNF1-related protein kinase*) son capaces de fosforilar a HYL1 y SE *in vitro*, y que los niveles de proteína de HYL1 disminuyen en mutantes de esta familia de quinasas bajo estrés [146]. En ambos casos, es incierto si MPK3 y/o los miembros de SnRK2 son necesarias y suficientes para catalizar la fosforilación de HYL1 *in vivo*.

CPL1 también desfosforila a RCF3, una proteína involucrada en la biogénesis de miARNs y en el *splicing*. Se ha encontrado que, en algunos tejidos, específicamente en el meristema vegetativo apical del vástago, primordios de hojas jóvenes y hojas nuevas emergentes, la desfosforilación de HYL1 depende de RCF3 [145]. Adicionalmente, el estado de fosforilación de ambas proteínas afecta su localización sub-nuclear, observando que solo las versiones no fosforiladas de ambas se ubican en D-Bodies [144], [145].

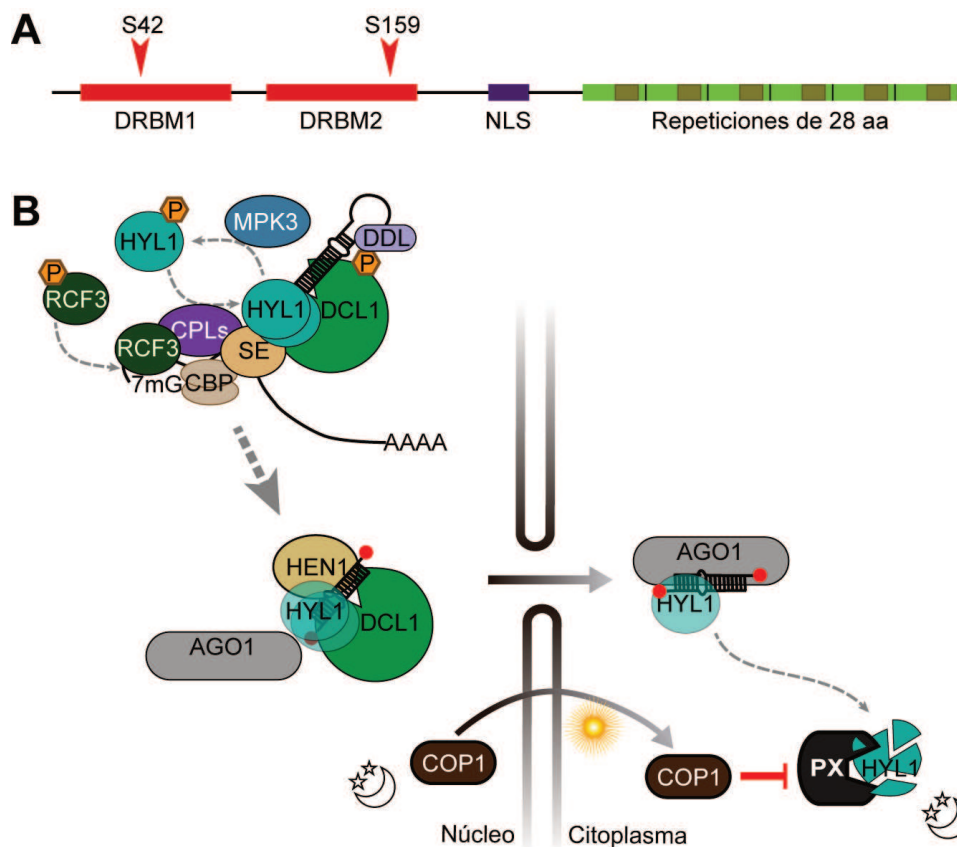


Figura 3. (A) Representación de los dominios de HYL1 y las serinas fosforilables importantes para su regulación. En las repeticiones C-terminales, los rectángulos verdes más oscuros representan el péptido fosforilable que se repite en cada una de ellas [71]. (B) Representación gráfica de la regulación post-traduccional de HYL1 (figura modificada de Achkar y col., 2016 [33]).

HYL1 localiza tanto en núcleo como en citoplasma, siendo KETCH1 la proteína responsable del transporte activo de HYL1 al núcleo [147]. En este compartimento HYL1 cumple su función en la biogénesis de miARNs, mientras que se ha sugerido que en el citoplasma participa en la inhibición de la traducción de ARNm unidos a miARNs [126]. Por otro lado, se encontró que la fracción citoplasmática de HYL1 es degradada activamente por una proteasa aún desconocida cuando la planta se encuentra en total oscuridad por periodos prolongados [148]. Esta degradación es regulada por la proteína CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1). La misma cambia su localización subcelular con los cambios en la luz que percibe la planta. Durante el día COP1 se encuentra en el citoplasma, en donde protege a HYL1 de la degradación. Durante las horas de oscuridad, COP1 ingresa al núcleo, y así la proteasa es capaz de degradar la fracción citoplasmática de HYL1 [148] (Figura 3B).

Adicionalmente, el complejo SMEK1/PP4 también es necesario para la desfosforilación y activación de HYL1 [149]. Además, en la planta mutante *smek1* los niveles proteicos de HYL1 se encuentran disminuidos, y en lisados celulares de la misma mutante la degradación de HYL1 parece producirse más rápido que en el control, sugiriendo que la ausencia de SMEK1 aumenta la velocidad de degradación HYL1 y que la fosforilación de HYL1 impacta en su estabilidad [149].

El estudio de la regulación post-traducciona l de HYL1, y en particular cómo la fosforilación de esta proteína impacta su actividad y degradación son los ejes centrales de esta tesis doctoral. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar cómo la fosforilación de HYL1 afecta su función, si este proceso está involucrado en el control de la degradación de la proteína y su concomitante efecto fisiológico, así como estudiar la función del dominio C-terminal de HYL1 y en particular el rol de su fosforilación.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La regulación génica post-transcripcional es un proceso fundamental para lograr la expresión precisa, tanto espacial como temporal, de un gen. El silenciamiento de genes mediado por micro ARNs (miARNs) se ha convertido en uno de los principales mecanismos de regulación post-transcripcional en estudio. Para poder lograr un correcto balance entre la expresión de un gen y su silenciamiento, es crítico modular la abundancia de los miARNs. Los mecanismos de regulación de la biogénesis y la acción de estas moléculas son, en gran parte, desconocidos, y su estudio se perfiló recientemente como un tema de suma importancia.

Nuestra **hipótesis** es que la fosforilación de HYL1, en sus serinas 42 y 159, afecta su capacidad de interaccionar con el ARN y proteínas, respectivamente. Además, hipotetizamos que el estado de fosforilación de HYL1 y, por ende, su actividad, cambia naturalmente en plantas de *Arabidopsis*. Este cambio podría darse en tejidos específicos, durante distintos estadios del desarrollo o bajo ciertos estímulos, a fin de modular su actividad. De esta manera, se obtendría una mayor o menor producción de miARNs según la necesidad. Creemos que existe en la célula un reservorio latente de HYL1 en su estado fosforilado. En casos de ser requerida una mayor producción de miARNs, por ejemplo, durante la germinación, CPL1 desfosforila esta reserva de HYL1, haciéndola activa.

Nuestro **objetivo general** es identificar los mecanismos involucrados en la regulación de la actividad de miARNs. Para esto usamos plantas de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo para estudiarla regulación de las etapas de síntesis y de acción de los miARNs. En esta propuesta centramos nuestros esfuerzos en comprender cómo modificaciones post-traduccionales afectan la actividad del cofactor de la biogénesis de miARNs HYL1, y el impacto que esto tiene sobre la producción de estos pequeños ARNs.

6.1 Objetivos específicos

- Establecer el impacto del cambio de estado de fosforilación de HYL1 en su capacidad de formar dímeros e interaccionar con SERRATE, su proteína asociada más conocida.
- Establecer el impacto del cambio de estado de fosforilación de HYL1 en su capacidad de interaccionar con los precursores de miARNs.
- Determinar los tejidos, etapas del desarrollo y estímulos externos que modifican el estado de fosforilación de HYL1.

- Explorar la estabilidad proteica, y la degradación específica de HYL1, según su estado de fosforilación.
- Determinar los patrones de localización subcelular de HYL1 en sus distintos estados de fosforilación.

MATERIALES y MÉTODOS

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis de ADN

7.1.1 Plásmidos

pENTR™/D-TOPO®: vector de entrada (life Technologies) que permite el clonado direccional de productos provenientes de reacciones de amplificación en cadena (PCR) con extremos romos. Para tal fin, es necesario agregar la secuencia de 4 nucleótidos CACC, en el extremo 5' del cebador sentido, complementario al extremo sobresaliente GTGG del vector, permitiendo una única orientación de clonado. El vector lineal contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I del virus Vaccinia unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. El sitio de clonado direccional TOPO® está flanqueado por las regiones de homología *attI1* y *attI2* para permite la recombinación IR en vectores *Gateway* de destino. Este vector posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *E. coli*.

pFK247: vector de destino *Gateway* de la serie *pFK* derivado del plásmido *pGREEN-IIS* [150] en el cual se reemplazó el gen de resistencia a kanamicina por el de espectinomomicina. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Parte de las secuencias necesarias para la replicación, como el gen de la replicasa RepA, se encuentran en el plásmido *pSoup*, que provee la funcionalidad necesaria para la replicación del vector *pGREEN-II* en *A. tumefaciens*, por lo que se debe co-transformar con ambos vectores. Este vector posee el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV, seguido de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP, del inglés *enhanced Green Fluorescent Protein*), y se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente las diferentes versiones de HY11 con una fusión amino-terminal a eGFP en plantas de *Arabidopsis* transformadas de manera estable, y para evaluar la localización subcelular en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente. Confiere resistencia a glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas eficientemente.

pPM415: vector de destino *Gateway* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, un gen de resistencia a espectinomomicina para la selección de bacterias y a glufosinato de amonio para la selección de plantas y la región reguladora de HY11. Se lo utilizó para expresar las diferentes versiones de HY11 bajo el control del promotor nativo en plantas mutantes *hyl1-2*.

pAS017: vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, un gen de resistencia a espectinomicina para la selección de bacterias y a glufosinato de amonio para la selección de plantas, el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV y la secuencia codificante del receptor de glucocorticoides (GR) para una fusión C-terminal. Se utilizó para transformar plantas mutantes *hyl1-2* de manera estable.

pProExHta-IR-phi: vector de destino *Gateway* (Invitrogen) utilizado para la expresión de proteínas en *E. coli*. Posee un origen de replicación para *E. coli*, un gen de resistencia a ampicilina, un promotor inducible *lacIq*, la secuencia codificante de un tag 6xHis amino-terminal, seguido del sitio de corte para la enzima TEV. Se utilizó para expresar diferentes versiones de HYI1 de manera recombinante.

pSoup: Este vector aporta la secuencia del locus *pSa* que actúa en *trans* en la replicación de los plásmidos de la serie *pGREEN-IIS* [209] y sus derivados en *A. tumefaciens*.

pDEST™ 22: Es un vector de destino *Gateway* (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de activación de la proteína GAI4 (GAI4AD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores *pUC*, y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia *ARS4/CEN6* de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen *TRP1* como marcador de selección en medios carentes de triptofano para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAI4AD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (*ADH1*). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

pDEST™ 32: Es un vector de destino *Gateway* (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de unión a ADN de la proteína GAI4 (GAI4BD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores *pUC*, y el gen de resistencia a gentamicina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia *ARS4/CEN6* de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen *IEU2* como marcador de selección en medios carentes de leucina para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAI4BD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (*ADH1*). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

7.1.2 Construcciones genéticas

Para crear las construcciones Pro_{35S}::eGFP-HYI1, Pro_{HYI1}::HYI1 y Pro_{ADH1}::GAI4AD-HYI1 fosfo-miméticas/nativa, se recombinaron los vectores de entrada que contienen las fosfo-mímicas de HYI1 previamente utilizados en el trabajo de Manavella y col. (2012)[144] con los vectores de destino pFK247, pPM415 y pDEST22 (Thermo Fisher), respectivamente. Para crear las construcciones Pro_{HYI1}::eGFP-HYI1 fosfo-miméticas y nativa, las fusiones de eGFP-HYI1 se amplificaron mediante PCR con la ADN polimerasa *Pfu* (Thermo Fisher Scientific), se clonaron en p-ENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific) y luego se recombinaron con pPM415. Para crear Pro_{HYI1}::HYI1-GR, primero se obtuvo la fusión HYI1-GR mediante la recombinación de los vectores pPM060 (vector de entrada que contiene la secuencia codificante de HYI1 sin el codón de terminación) y pAS017. La fusión HYI1-GR fue clonada en un vector pENTR-D-TOPO y luego recombinada con pPM415.

Para crear las versiones de HYI1 que contienen de 0 a 5 repeticiones en el dominio C-terminal (HYI1D6 a HYI1D1, respectivamente), se utilizó un oligonucleótido que hibrida al final de cada repetición con el agregado de un codón de terminación, y uno que hibrida desde el codón de inicio de la secuencia codificante de HYL1. Así, mediante una PCR se obtuvieron todas las versiones, que fueron separadas en un gel de agarosa al 2% y clonadas en un vector p-ENTR-D-TOPO. Luego de su secuenciación fueron recombinadas en los vectores pFK247, pPM415 y pProExHta-IR-phi, para obtener las construcciones Pro_{35S}::eGFP-HYI1D, Pro_{HYI1}::HYI1D y 6xHis-HYI1D, respectivamente.

Las versiones fosfo-miméticas en cada repetición del dominio C-terminal, se sintetizaron comercialmente (Bio Basic Inc) cambiando los codones de serina potencialmente fosforilables por codones de alanina o ácido aspártico. Debido a la alta repetición de secuencia, para poder sintetizar este fragmento se tuvo que modificar el uso de codones, resultando en una secuencia de nucleótidos diferente a la nativa, pero conservando la secuencia de aminoácidos de la proteína salvaje excepto en las serinas mutadas. Para evaluar si este cambio tendría consecuencias en la expresión de HYL1, también hicimos sintetizar la versión S>S, esto es, la versión nativa en secuencia de aminoácidos, pero modificada a nivel nucleotídico. Los fragmentos de HYL1 sintetizados y correspondientes a la región C-Terminal fueron unidos a la región N-terminal de la proteína salvaje mediante *overlapping PCR* utilizando *Pfu* (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente clonados en pENTR-D-TOPO. Nuevamente, fueron recombinadas en los vectores pFK247, pPM415 y pProExHta-IR-phi, para obtener las construcciones

Pro_{35S}::eGFP-HY11^{C-termS>A/D/S}, Pro_{HY11}::HY11^{C-termS>A/D/S} y 6xHis-HY11^{C-termS>A/D/S}, respectivamente.

Todas las reacciones de recombinación se realizaron utilizando Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (TermoFisher Scientific).

En la Tabla 1 del Anexo 1 se detallan las construcciones utilizadas en este trabajo, y en la Tabla 2 del mismo anexo, los cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

7.1.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La amplificación de fragmentos de ADN para clonados, análisis de líneas transgénicas, y chequeo de construcciones obtenidas ya sea directamente sobre colonias de bacterias transformadas o sobre ADN plasmídico, se llevó a cabo mediante PCR. En cada reacción se utilizó solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, dNTP 0,2 mM y 0,4 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y luego se le agregó 0,3 U de enzima *Taq* ADN polimerasa (AP Biotech) para reacciones de chequeo, o *Pfu* ADN polimerasa (Thermo Scientific) para amplificaciones de fragmentos a ser clonados, por cada 10 μl de volumen de reacción. Los volúmenes finales de reacción fueron de 20 μl para chequeos, o 50 μl para amplificaciones de fragmentos a clonar. Finalmente se procedió con la reacción de amplificación según los objetivos del experimento. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: [30 segundos 94° C, 30 segundos (T_m - 5) ° C, *t* a 72° C] x 35 ciclos + 7 minutos a 72° C, donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados [T_m=2(A+T)+4(G+C)], y el tiempo (*t*) de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. Para las reacciones con *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar, mientras que para *Pfu* ADN polimerasa el tiempo estimado fue de 2 minutos por cada 1000 pb. Los productos de amplificación fueron resueltos y visualizados en geles de agarosa de concentración variable según el tamaño del fragmento de ADN y usando el marcador de peso molecular Trans2k Plus II (AP Biotech) como referencia como se detalla en el punto 7.1.5.

7.1.4 *Overlapping PCR*

Para unir dos fragmentos de ADN se utilizó una variante de la PCR tradicional [151]. Se diseñaron oligonucleótidos quiméricos de tal manera que los últimos 10-18 nt del fragmento 5' hibriden con los primeros 10-18 nt del fragmento 3'. Para esto cada cebador quimérico tiene 20 nt complementarios al fragmento a amplificar y 10-18 nt complementarios al inicio/fin del otro fragmento. Se realizaron PCRs con el protocolo detallado previamente amplificando cada fragmento por separado. Posteriormente se purificaron los fragmentos, se mezclaron en cantidades equimolares y sirvieron como molde para una nueva ronda de PCR usando cebadores estándar diseñados al principio y fin de la quimera a obtener.

7.1.5 *Electroforesis de ADN en geles de agarosa*

Los productos de amplificación de ADN obtenidos por PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa [152]. Para esto, se preparó agarosa en solución amortiguadora TAE 1X en una concentración de 1 al 2 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. Los productos de amplificación se suplementaron con 1/10 de volumen de solución de siembra de ADN conteniendo una dilución 1/1000 del agente intercalante Gel Red (Biotium®). Se sembraron en el gel de agarosa y se realizó la corrida electroforética en una solución TAE 1X a un voltaje constante entre 1 y 5 V/cm de gel durante 20-40 min. Para corroborar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se sembró el marcador de peso molecular de ADN Trans2K® Plus II (Transgen Biotech). Una vez finalizada la separación electroforética, la visualización de los fragmentos de ADN se realizó en un transiluminador de luz UV ENDURO GDS (Labnet, CA, USA).

TAE 1X: Tris 5,5 g/l, EDTA 0.75 g/l, ácido acético glacial 0,1% (v/v).

Solución de siembra: Glicerol 30% (v/v), Xileno cianol 0,25% (p/v), Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y Gel Red 1/1.000 (Biotium®).

7.1.6 *Purificación de fragmentos de ADN*

Cuando el objetivo de la electroforesis fue la purificación del fragmento de ADN, se cortó la banda de interés del gel de agarosa y se realizó la extracción del producto de PCR utilizando el kit comercial GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

7.1.7 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway

En los casos en los que se utilizó como vector de clonado el plásmido de entrada pENTR™/D-TOPO® (Life Technologies), se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, se mezclan 2,3 µl del producto de PCR purificado, 0,2 µl del vector de entrada pENTR™/D-TOPO®, y 0,5 µl de solución salina provista con el vector. Se incubó a temperatura ambiente de 30 minutos a 2 h, y se transforman células de *E. coli* electrocompetentes inmediatamente.

7.1.8 Recombinación Gateway en vectores de destino

Los clonados por recombinación Gateway en los vectores de la serie pGREEN IIS, pDEST™ (Invitrogen), pAS017 y pProExHta-IR-phi (Invitrogen) utilizando la enzima IR Clonase™ (Invitrogen) se realizaron según las indicaciones del fabricante de la enzima. Brevemente, se mezclaron 150 ng del vector de entrada con el fragmento a recombinar, 100 ng del vector destino, 0,5 µl de IR Clonase™, y se llevaron a volumen final 3 µl con solución amortiguadora TE 1X. Se incubaron a temperatura ambiente de 2 a 4 h, y se procedió a la transformación de bacterias.

TE 1X: Tris 5,5 g/l, EDTA 0.75 g/l.

7.1.9 Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por el método de electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad laboratories Inc., USA). El pulso eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) ajustando las variables de electroporación según las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente luego del choque eléctrico, las células de *E. coli* se recuperaron en 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación, el cultivo de células se centrifugó a 1500 g durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron durante toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37 °C. Finalmente, se realizó PCR en colonia como se describió anteriormente, con el fin de identificar colonias transformadas con la construcción de interés. Las colonias que fueron positivas (la PCR amplificó un amplicón del tamaño correcto), fueron repicadas en medio LB líquido para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

Medio LB: Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l.

Medio LB sólido: Medio LB, agar 15 g/l.

7.1.10 Transformación de bacterias de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación descrito para *E. coli* (Micro Pulser™, Bio-Rad laboratories Inc., USA). A las células competentes se les adicionó 1 µl del plásmido de interés y 0,3 µl del plásmido pSoup. Inmediatamente luego del pulso eléctrico en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad), las bacterias se recuperaron en 1 ml de LB y se incubaron durante 2 horas a 28 °C. A continuación, se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 100 µl de medio LB. Se sembró en placas de Petri con IB-agar suplementado con gentamicina (5 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml), por la resistencia cromosómica de las bacterias, tetraciclina (50 µg/ml) para el plásmido pSoup, y el antibiótico correspondiente al plásmido de interés con el que se transformó. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (48-72 h). Para la identificación de las colonias transformadas se realizó PCR en colonia siguiendo la misma metodología explicada para *E. coli*.

7.1.11 Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina [153]. Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio IB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 min, y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución 1 de minipreparación. Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución 2 de minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de solución 3 y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos antes de ser centrifugada a 13000 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le realizó una extracción con 1 volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 g y a temperatura ambiente, y el ADN plasmídico presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol frío. La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 70% (v/v) para eliminar

las sales, y se centrifugó por a 13000 g por 5 minutos a 4 °C. Luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril. Para los casos en que fue necesario eliminar el ARN, las minipreparaciones se trataron con ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 µg/µl a 37 °C por 1 h.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad para reacciones de determinación de secuencia o para la purificación de vectores con fines de clonado y transformación, se realizaron minipreparaciones con el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.12 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de las distintas construcciones realizadas, se utilizó el servicio provisto por MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Se enviaron 20 µl de plásmido a una concentración de 100 ng/µl junto con 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM). Las muestras fueron procesadas por un secuenciador automático ABI3730XI. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron provistos en forma electrónica y analizados usando el software Snapgene.

7.1.13 Extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis thaliana*

La extracción de ADN genómico se realizó sobre una hoja de roseta la cual fue disgregada dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 300 µl de solución de extracción, se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 16000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se trató el sobrenadante con 1 volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 g y temperatura ambiente, y el ADN genómico presente en la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de isopropanol. Luego se centrifugó a 16000 g durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ estéril.

Solución de extracción: Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5% (p/v).

7.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron compradas a lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). La línea mutante insercional *hyl1-2* (SALK_064863) fue adquirida del *Arabidopsis Biological Resource Centre* (ABRC), Ohio State University, OH, USA. Los ecotipos Ey1.5-

2/ICE228, Shahdara (Sha), Lövvik-5 (Lov-5), TüWa, Burren (Bur-0), Pedriza (Ped-0), Leo-1 y Niederreutin (Nie1-2) fueron donados por el laboratorio del Dr. Weigel (Tübingen, Alemania)

Las plantas fueron crecidas en tierra, en macetas de 8 cm de diámetro y 7 cm de altura, en condiciones de día largo (16 hs de luz / 8 hs de oscuridad) a 22-24 °C y una intensidad lumínica aproximada de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Luego de estratificar las semillas 3 días en oscuridad y frío (4°C), se sembraron en superficie entre 5 y 10 semillas por maceta, según el ensayo y el genotipo utilizado, cubriendo las macetas con film autoadherente hasta la germinación de modo de mantener la humedad en la tierra.

Para el crecimiento de *Arabidopsis* en placas de Petri, se utilizó medio Murashige y Skoog (MS) 0,5X (pH 5,7) y agar al 0,8% (p/v) esterilizado en autoclave Ficoinox, con un programa de 121° C durante 20 min. En los casos de selección con kanamicina y glufosinato de amonio, al medio MS-Agar se le adicionó 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los agentes de selección, respectivamente. Se desinfectaron las semillas superficialmente con etanol 70% (v/v) por 10 min, luego por 20 minutos con una mezcla de hipoclorito de sodio 10% (v/v) y SDS 0,1% (p/v), y se las lavó 4 veces con agua destilada estéril en una cabina de flujo laminar. Finalmente, las semillas fueron estratificadas en oscuridad a 4°C por 3 días y a continuación, sembradas. Luego se trasladaron a la cámara de cultivo en las condiciones de día largo descriptas.

7.2.1 Condiciones de luz

Usamos tres protocolos básicos para simular tres condiciones en las que la fuente de luz captada por las plantas es limitada: (i) plántulas jóvenes etioladas enterradas en el suelo (plántulas etioladas), (ii) plantas adultas crecidas en condiciones normales que quedan luego enterradas en el suelo (entierro) y (iii) plantas adultas crecidas en condiciones normales que quedan luego en sombra por la presencia de plantas vecinas (sombra). Para los experimentos con plántulas etioladas, las semillas se estratificaron a 4°C durante 3 días, se expusieron a luz blanca durante 1 hora para sincronizar la germinación y se colocaron en oscuridad a 23°C. En una variante de estos experimentos, expusimos plántulas a luz azul unilateral porque estas condiciones de luz son suficientes para iniciar respuestas fototrópicas pero no para lograr la eliminación total de la etiolación. Para el entierro y la sombra, las plantas se cultivaron durante 10 días bajo 16 horas de luz blanca/8 horas de oscuridad a 23°C. Las lámparas fluorescentes proporcionaron una radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Luego, las plantas se transfirieron a oscuridad (entierro) o sombra simulada. Para simular la sombra, se aplicaron filtros verdes para alcanzar una tasa de

fluencia de $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una relación rojo/rojo lejano=0,1, que emula la luz percibida por una planta en la naturaleza cuando se encuentra debajo del dosel de plantas vecinas [154]. Para investigar las transiciones que conducen a la eliminación de la etiolación o la terminación de las condiciones de entierro o sombra, repetimos estos protocolos que limitan la luz percibida por las plantas, seguidos por la transferencia de mismas a las condiciones de luz blanca descritas anteriormente.

7.2.2 *Temperatura y tratamientos farmacológicos*

Para los tratamientos de estrés abiótico, plántulas de 10 días se sometieron a 24 horas de oscuridad o frío (4°C). En cualquier análisis cuantitativo que usara muestras tomadas de plantas transgénicas, y a menos que se indique lo contrario en la figura, se agruparon plantas T2 de al menos 10 líneas independientes con niveles de expresión similares para evitar sesgos inherentes a las líneas individuales. En todos los experimentos se utilizaron plántulas enteras, incluidos los tejidos aéreos y las raíces, a menos que se indique lo contrario.

Para los tratamientos hormonales, plántulas de 10 días se colocaron durante 12 horas en medio MS con ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) $30 \mu\text{M}$; Ácido jasmónico $200 \mu\text{M}$ (JA); o ácido abscísico (ABA) $100 \mu\text{M}$, ácido indol-3-acético (IAA), giberelina (GA3) o 6-bencilaminopurina (BAP).

Para los tratamientos con cicloheximida (CHX) y 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), plántulas de 10 días se transfirieron a oscuridad durante los períodos de tiempo indicados y luego a medio MS con CHX $100 \mu\text{M}$ o DCMU $50 \mu\text{M}$, dos o una hora antes de que las plántulas volvieran a la luz, respectivamente.

Para los ensayos de escotomorfogénesis con plantas transgénicas que expresan fusiones HY1-GR, las semillas se germinaron en placas MS con dexametasona $10 \mu\text{M}$ o solución control.

Cuando se evaluó la respuesta de evasión de la sombra en plantas transgénicas HY1-GR, plantas de 15 días crecidas en fotoperiodo de día largo se rociaron con dexametasona $30 \mu\text{M}$ o solución control, 2 días y nuevamente 2 horas antes de transferirlas a sombra simulada.

7.3 **Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Para la transformación estable de plantas de *Arabidopsis*, se utilizó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* previamente transformada con las construcciones de interés, utilizando el método de inmersión floral (*floral dip*) [155]. Las plantas se crecieron hasta floración en las condiciones descritas anteriormente.

Cuando el número de inflorescencias y la calidad de las flores fue el adecuado, se procedió a la transformación. Para preparar la suspensión de transformación, las células de *A. tumefaciens* se cultivaron durante 16 horas en agitación a 28 °C en un tubo de ensayo que contenía 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se utilizó para inocular un Erlenmeyer que contenía 200 ml del mismo medio suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas en agitación a 28 °C). Luego se precipitaron por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 200 ml de una solución de sacarosa 5% (p/v) que contenía 40 µl del detergente Silwet L77 (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron de 30 a 60 segundos, evitando que la solución de transformación entre en contacto con la roseta de las plantas y la tierra. Luego, las macetas fueron ubicadas en posición horizontal en una bandeja, se taparon con film autoadherente y se llevaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el film adherente, se colocaron en posición vertical y se crecieron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra). Cuando las vainas alcanzaron la maduración y se secaron, se cosecharon las semillas y se guardaron en cámara fría (4°C) para su posterior selección. Las semillas transgénicas fueron seleccionadas en placas de Petri con 50 mg/l de kanamicina y posteriormente transplantadas a tierra, o directamente seleccionadas en tierra con una dilución 1/1000 (v/v) del herbicida Basta® (Bayer) cuando el agente de selección era glufosinato de amonio. Se utilizaron 10 líneas transgénicas con eventos de inserción independientes para continuar con los ensayos que fueron necesarios.

7.4 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito por de Felipe y Weigel [156]. Para ello, se crecieron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés por 16 horas en agitación a 28 °C. En todas las transformaciones transitorias que se realizaron, se incluyó una construcción que expresa la proteína viral p19, la cual actúa suprimiendo el silenciamiento mediado por ARNs pequeños mediante la captura de sARNs de 21-25 nucleótidos [157], [158]. Los cultivos fueron centrifugados a 2000 g por 5 minutos a 4 °C, los pellets celulares fueron resuspendidos en solución amortiguadora de infiltración e incubados por 3-4 horas en agitación suave. Pasado ese tiempo, se llevaron todos los cultivos a una $DO_{600}=0,5$ y se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 4:1 (Construcción de interés : p19) para los ensayos de localización celular. Finalmente,

se infiltró con cada combinación la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 días de *Nicotiana benthamiana* con jeringas de 1 ml sin aguja.

Solución amortiguadora de infiltración: MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,7, acetosiringona 150 μM.

7.5 Análisis de ARN

7.5.1 Extracción de ARN total de plantas de *Arabidopsis thaliana*

El ARN total se extrajo de plantas enteras utilizando el reactivo TRIzol según las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Alternativamente, se utilizó una versión casera del mismo reactivo. Las extracciones se realizaron con 100 μg de tejido vegetal fresco previamente pulverizado con nitrógeno líquido, al cual se le agregó 1 ml del reactivo TRIzol. Se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló y resuspendió completamente en el reactivo usando vortex, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos en la mesada. Luego se adicionó 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos de forma manual y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 minutos. La mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g y 4° C, tomando luego la fase acuosa que se mezcló con 1 volumen de isopropanol y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, para precipitar el ARN total de la muestra, se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g y 4° C y el pellet obtenido se lavó con etanol 70 % v/v el cual fue retirado luego de una centrifugación corta a máxima velocidad. Una vez seco, el precipitado se disolvió en 30 μl de agua miliQ estéril. Por último, la calidad y concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

TRIZOI casero:

Preparación de fenol ácido: Se fundió el fenol (guardado en *freezer* a -20 °C) en un baño a 68 °C, se adicionó 0,1 % de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas) y agua bidestilada para saturar. Luego de un día de equilibrado, se cambió el agua de la fase superior por agua nueva, se repitió este paso una vez más. Se fraccionó en frascos y se almacenó en heladera. De esta manera el fenol se mantuvo estable hasta 1 año.

Preparación de 100 ml Trizol: 38 ml fenol ácido, 0,8 M tiocianato de guanidina (9,453 g), 0,4 M tiocianato de amonio (3,045 g), 0,1 M NaAc (3,34 ml del stock 3 M, pH 5,0), 5% glicerol (5,75 ml del stock 87%), H₂O hasta 100 ml.

7.5.2 Northern blot no radioactivo para la detección de ARNs pequeños (small RNA blot)

Para la preparación de dos geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) (PAA) al 17% (m/v) se siguió la siguiente receta: en un tubo falcon de 50 ml agregar 6,375 ml de acrilamida/bis-acrilamida 40% (37,5:1), 6,3 g de urea, 3 ml de 5X TBE, y llevar a 15 ml volumen final con agua miliQ estéril. Se calentó la mezcla a 50° C hasta que la urea se disolvió y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 20 µl de APS 25% y 7,5 µl de TEMED. Armados los geles en sus respectivos soportes, se los dejó polimerizar por 60 minutos y luego se los pre-corió a 180V en 1X TBE durante 60 min. Durante la pre-corrída, se realizó la preparación de las muestras de ARN mezclando 1 volumen de solución de siembra de ARN 2X con 1 volumen de muestra conteniendo 2 µg de ARN total, se calentaron por 5 minutos a 95 °C, se enfriaron rápidamente en hielo, se las mezcló en vortex durante 5 segundos y finalmente se les realizó una centrifugación rápida a 4 °C. Terminada la pre-corrída, se sembraron las muestras en el gel, previa limpieza de los pocillos del gel con una jeringa con aguja para eliminar restos de PAA no polimerizada y de urea no disuelta. Se corrió el gel a 180V en 1X TBE hasta que el marcador del frente de corrída azul de bromofenol salió del gel, aproximadamente unos 90 min. Finalizada la corrída electroforética, se realizó la transferencia del ARN a una membrana de nylon cargada negativamente (Amersham Hybond-N+), utilizando el sistema de transferencia semi-seco *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), durante 1 hora a 10 V y 400 mA. Luego, se secaron las membranas y se fijó covalentemente el ARN con luz UV a 12.000 µJ/cm³ en un *UV Crosslinker* (Stratagen).

Una vez fijado el ARN, se realizó la pre-hibridación de las membranas con buffer Church por 1 hora a 38° C en rotación continua. Posteriormente, se adicionaron 5 pmoles de sonda específica marcadas con DIG (ver Anexo 2) a 100 µl de buffer Church, y se calentó durante 10 minutos a 65°C. Inmediatamente, se enfrió en hielo y luego se agregó la sonda a las membranas en buffer Church, dejándolas hibridando durante toda la noche a 38°C en rotación constante. Posteriormente, las membranas fueron lavadas dos veces con SSC 4X a 38° C durante 20 min.

Para la detección de los ARNs pequeños con las sondas marcadas con digoxigenina, primero se incubaron las membranas con solución de bloqueo por 30 minutos en agitación lenta para bloquear las membranas. Luego, se incubaron por 1 hora con la solución de anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo. Previo a la detección, se lavaron las membranas 4 veces con solución de lavado en agitación fuerte por 10 minutos y posteriormente se equilibraron las membranas por 5 minutos en solución de detección. Las membranas ya equilibradas

se colocaron en un folio, se aplicó solución *CSPD ready-to-use* (Roche) en la superficie de cada membrana, y se incubó 10 minutos a 37°C en oscuridad para activar el reactivo. Se eliminaron los excesos de líquido, se selló el folio y se expuso a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas *ECL Hyperfilm* (Amersham) según la intensidad de la señal esperada. Finalmente, las películas radiográficas fueron reveladas con soluciones reveladora y fijadora (AGFA).

Solución de corrida: 95% Formamida, 18 mM EDTA y 0,025% SDS, Xileno Cianol, y Azul de Bromofenol.

Solución de ácido maleico: 0.1 M ácido maleico; 0.15 M NaCl; pH 7.5 con NaOH.

Solución de bloqueo: 1% p/p Blocking Reagent (Roche) en solución de ácido maleico

Solución de anticuerpo: 1:20.000 anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo.

Solución de lavado: solución de ácido maleico; 0.3 % v/v Tween-20.

Solución Church: 0,25 M solución amortiguadora fosfato de sodio pH: 7,2; 1 mM EDTA pH: 8; 1 % p/v albúmina de suero bovino (BSA) fracción V; 7% p/v SDS.

Solución de detección: 0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; llevar a pH 9,5 con HCl.

Solución CSPD: sustrato quimioluminiscente CSPD ready to use (Roche).

Solución TBE 5X (1 l): 0,45 M TRIS-Base; 0,45 M Ácido Bórico; 10 mM EDTA pH 8.

Solución SSC 4X: 0,6 M NaCl, 0,06 M Citrato de Sodio.

7.5.3 Marcación de Sondas

Cada oligonucleótido a utilizar como sonda fue diseñado complementario a cada ARN pequeño a detectar. Para su marcación, primero se resuspendieron 100 pmoles de cada oligonucleótido en 10 µl de agua miliQ estéril tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC, inactivador de enzimas RNasas). Luego, siguiendo las indicaciones del fabricante, se utilizó el kit DIG Oligonucleotide 3'-End labeling de segunda generación (Roche) para marcar los oligonucleótidos de la siguiente manera: a los 10 µl de oligonucleótido resuspendido se le adicionaron 4 µl de solución de reacción 5X (Roche), 4 µl de solución de cloruro de cobalto (CoCl₂), 1 µl de DIG-ddUTP, y 1 µl enzima transferasa terminal, manteniendo todo el tiempo los reactivos y el tubo de reacción en hielo. Se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se incubó durante 15 minutos a 37° C, e inmediatamente después de transcurrido ese tiempo, se enfrió en hielo. La reacción de marcación se detuvo mediante la adición de 2 µl de 0,2 M EDTA pH 8,0. A continuación, las sondas marcadas con DIG fueron purificadas utilizando una columna cromatográfica Bio-Gel P-6 Micro Bio-Spin™ (Bio Rad) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Finalmente, cada oligonucleótido marcado con DIG fue diluído hasta una concentración de 2,5 pmol/ μ l adicionando 18 μ l de agua miliQ estéril tratada con DEPC.

Alternativamente, se han adquirido oligonucleótidos sintetizados y marcados con DIG por la empresa Alpha ADN, Montral, Canadá.

7.5.4 *Transcripción reversa (RT)*

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando 1 μ g de ARN total tratado con DNaseI (Thermo Fisher Scientific) utilizando el kit de transcripción inversa RevertAid RT (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos poli-dTv (un nucleótido variable en el extremo 5' seguido de 18 nucleótidos de timina) para aquellos casos en los que se midieron niveles de ARNm por RT-qPCR o se amplificó por PCR la región codificante de genes a clonar, y oligonucleótidos dN6 (mezcla de oligonucleótidos de 6 pb con secuencias aleatorias) para medir por RT-qPCR los niveles de pri-miARNs.

7.5.5 *PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)*

Las RT-qPCR cuantitativas se realizaron en un termociclador Mx300SP (Stratagene, la Jolla, CA, USA), en un volumen final de reacción de 20 μ l conteniendo 1X solución amortiguadora para *Taq* ADN polimerasa (Transgen Biotech), 0,2 μ M de cada oligonucleótido específico (ver Tabla 2 del Anexo 1), dNTPs 0,2 mM, 1/40 EvaGreen® (Biotium), 1/40 de la reacción de retrotranscripción, y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Transgen Biotech). La fluorescencia fue medida a 72 °C durante 40 ciclos de PCR. Para todas las medidas se utilizaron tres réplicas biológicas independientes de *pools* de plántulas. Como genes de referencia fueron utilizados *ACTINA2* (At3g18780) y *ACTINA8* (At1g49240) [159] para la normalización de los niveles de expresión de los transcritos analizados. Los niveles relativos de cada ARN fueron calculados usando el método de $\Delta\Delta$ Ct y los resultados sujetos a análisis estadístico correspondiente, en general usando test-T no apareado con dos colas o test ANOVA con corrección.

7.5.6 *Ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP)*

Los ensayos de RIP para detectar pri-miARN unidos a HYI1 se realizaron siguiendo un protocolo descrito por Carbonell (2017) [160] con algunas modificaciones y la reducción al 50% de los volúmenes utilizados. La inmunoprecipitación se realizó con 4 g de tejido utilizando anti-HYI1 (Agrisera, AS06136, dilución 1:500). Se usaron *beads* magnéticas Sure Beads™ Protein-A (Bio Rad) para la inmunoprecipitación. Finalmente,

se extrajo el ARN de la fracción de IP mediante una extracción estándar con TRIzol. Las cuantificaciones de ARN asociadas se realizaron por RT-qPCR como se describió previamente.

7.5.7 Secuenciación de ARNs y ARNs pequeños

Las bibliotecas de ARNs pequeños se prepararon según lo indicado por el kit de preparación de bibliotecas TruSeq small RNA library prep kit (Illumina). Como input se utilizaron 50 ng de sARNs purificados con el kit ZR small-RNA PAGE Recovery Kit (Zymo Research). Las bibliotecas de ARNm se prepararon con 1 µg de ARN total como input, tal como es indicado en la segunda versión de la guía de preparación de muestras de TruSeq (TruSeq RNA sample prep V2 guide, Illumina). La selección de los tamaños de las bibliotecas de sARNs y ARNm se realizó con el sistema BluePippin (SAGE Science). Se llevó a cabo una secuenciación con un equipo HiSeq3000.

7.5.8 Análisis bioinformáticos

Primero se procesaron las lecturas de sARNs para remover los adaptadores del extremo 3' usando Trim_galore! con la opción small_rna (version 0.4.2, https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore). El mapeo se realizó con STAR (version 2.5.2b) con los siguientes parámetros: outFilterScoreMinOverLread 0; outFilterMatchNmin 16; outFilterMatchNminOverLread 0; outFilterMismatchNoverLmax 0.05; seedSearchStartLmax 30; alignIntronMax 1 alignEndsType Local. Se usó como referencia de precursores y miARNs maduros de *A. thaliana* la base de datos de miRBase (release 21). Los miARNs producidos por distintos miembros de una familia y con secuencias idénticas fueron colapsados bajo en un único identificador de miARN. Adicionalmente, las lecturas fueron mapeadas al genoma de *A. thaliana* y a los precursores de miARNs de miRBase, también con el programa STAR. Para el análisis de expresión diferencial de miARNs, solo se consideraron las lecturas que mapeaban a los miARNs maduros con una longitud de 24 nt o menos, y se contaron los alineamientos primarios de lecturas que mapeaban a la hebra sentido (filtrado con "samtools view-F 272"). Los recuentos por miARN se usaron como input para DESeq. Se descartaron los miARNs con niveles bajos de expresión (menos de 10 recuentos en todas las muestras) y se establecieron los factores de tamaño de acuerdo con el número total de lecturas mapeadas al genoma para cada muestra.

Las lecturas de ARNm primero se filtraron mapeándolas al ARN ribosomal 18s con Bowtie2 (versión 2.2.6). Las lecturas no mapeadas luego se alinearon al genoma de *A. thaliana* (versión TAIR9) usando Tophat2 (versión 2.1.0) con la anotación de

genoma TAIR10 y los siguientes parámetros: no-novel-juncs, read-edit-dist 1, read-gap-length 0, max-multihits 1. Finalmente, los genes diferencialmente expresados fueron encontrados con cuffdiff (versión 2.2.1) usando los parámetros predeterminados por el programa.

7.6 Análisis de proteínas

7.6.1 Extracción de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*

Para el análisis de muestras por *western blot*, se extrajeron proteínas de *pools* de plantas que variaron según el experimento. Se agregó 100 µl de solución de extracción de proteínas por cada 100 mg de tejido molido. Luego se centrifugó durante 20 minutos a 16000 g y 4 °C, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, teniendo así los extractos proteicos listos para continuar con el *western blot*. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford [161], utilizando como patrón una solución de BSA (Invitrogen). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

Solución de extracción de proteínas: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, y una tableta del Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche).

7.6.2 Separación de proteínas y análisis por *western blot*

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales según lo descrito por Laemmli (1970) [162]. Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida del 8 o 14% (p/v), con geles superiores de concentración del 6% (p/v). Los extractos proteicos a sembrar fueron mezclados con solución de siembra laemmli 5X en una relación 4:1, respectivamente, y luego incubados por 10 minutos a 105 °C con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética en solución de corrida 1X. A continuación, se equilibraron los geles incubándolos 10 minutos en solución de transferencia 1X y se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Amersham) pre-activada con metanol 100%, por el método estándar de transferencia húmeda en tanque, con solución de transferencia 1X. Para determinar el peso molecular de las bandas y para confirmar la eficiencia de transferencia se utilizó el marcador de peso molecular pre-teñido PageRuler Pretined Protein ladder (Thermo Scientific). Terminada la transferencia, se dejó incubando toda la noche la membrana en solución de bloqueo a 4 °C y agitación

suave. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a visualizar en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave constante. Después de 3 lavados por 10 minutos con solución TBS-T 1X, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario IgG policlonal conjugada con HBR (Agrisera AS09602; dilución 1: 20.000) para detectar anticuerpos primarios, por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con solución TBS-T 1X, se transfirió la membrana a un folio de plástico transparente, se le agregó por arriba 1 ml del sustrato ECI™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare), se eliminaron los excesos de líquido, y finalmente se realizó la exposición a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas ECL Hyperfilm (Amersham) según la intensidad de la señal deseada. HYL1 y SE se detectaron usando un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína endógena de *Arabidopsis* (Agrisera AS06136 y AS09532; dilución 1:10000 en ambos casos). Como controles de carga en diferentes experimentos se utilizaron ACTINA 8 (Agrisera AS132640; dilución 1:10.000), HISTONA 3 (Agrisera AS10710; dilución 1:10.000), o tinción con azul de Coomassie.

Solución de siembra laemmli 5X: 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol 50% (v/v), SDS 10% (p/v); azul de bromofenol 0,05% (p/v); β -mercaptoetanol 25% (v/v).

Solución de corrida 1X: Tris-Base 25 mM; glicina 19,2 mM; SDS 0,1% (p/v).

Solución de transferencia 1X: Tris-Base 2,5 mM; glicina 19,2 mM; metanol 5% (v/v).

Solución TBS-T 1X: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1% (v/v).

Solución de bloqueo: leche en polvo 5% (p/v) en TBS-T 1X.

7.6.3 Geles de retardo para proteínas fosforiladas

Dado que actúa como agente quelante del compuesto utilizado para separar fosfo-proteínas se evitó añadir EDTA a la solución de extracción de proteínas; en su lugar, se añadió una tableta de PhosStop (ROCHE) por 10 ml de solución. Las fosfo-isoformas se separaron en geles de poli(acrilamida) (PAA) al 8% conteniendo 50 mM Phos-Tag (Wako Chemicals, Neuss, Alemania) y 100 mM MnCl₂. Previo al agregado de los agentes catalizantes de polimerización la solución de PAA, fue desgasificada por vacío. Previo a la transferencia, los geles con las muestras ya corridas se incubaron 10 minutos en la solución de transferencia 1X con EDTA 1 mM y luego 10 minutos en la solución de transferencia 1X a fin de reducir la concentración de MnCl₂ que interfiere en la transferencia. Para la transferencia solo se agregó metanol al 5% a la solución de transferencia para mejorar el proceso. El resto del protocolo se siguió de igual manera

al descripto para *western blot*. La identidad de la isoforma HY11 se confirmó al incluir una muestra extraída de mutantes *hyl1-2* que carecen de la proteína [144].

7.6.4 Fraccionamiento núcleo/citoplasma

El fraccionamiento núcleo/citoplasma se realizó siguiendo el protocolo descripto previamente por Wang y col. (2017) [163]. Brevemente, se pulverizaron en mortero muestras de plantas (2,5 g) en hielo con 2 ml/g de solución de lisis suplementado con PMSF 200 μ M (solo para los fraccionamientos de proteínas). El homogenato se filtró a través de una capa de Miracloth, y la fase acuosa se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante (fracción citoplasmática) se centrifugó a 10000 g y 4 °C durante 10 minutos para eliminar restos de sedimentos, y el sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo Eppendorf y congelado inmediatamente. El sedimento se lavó de 3 a 5 veces con 5 ml de solución NRBT y luego se resuspendió en 500 μ l de solución NRB2 suplementado con el inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, solo para los fraccionamientos de proteínas). La resuspensión se pipeteó cuidadosamente sobre 700 μ l de solución NRB3 complementado con el inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, solo para los fraccionamientos de proteínas). El gradiente de sacarosa obtenido se centrifugó a 16000g y 4 °C durante 1 a 3 minutos, dependiendo de la cantidad de núcleos purificados. Para la extracción de proteínas, el sedimento se resuspendió en 100 μ l de solución de lisis y se sonicó en un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (10 ciclos de 30 segundos de pulsos a alta intensidad/30 segundos sin pulsos). A continuación, se centrifugó a 16000 g durante 10 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se recolectó como la fracción proteica nuclear. Como controles de calidad y carga del fraccionamiento, se utilizaron un anticuerpo anti-ACTINA8 como marcador citoplasmático e Histona H3 como marcador nuclear.

Solución de lisis: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 20 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 25% glicerol, sacarosa 250 mM, DTT 5 mM.

Solución NRBT: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, glicerol al 25%, MgCl₂ 2,5 mM, Triton X-100 0,2% (v/v).

Solución NRB2: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, sacarosa 0.25 M, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.5% (v/v), β -mercaptoetanol 5 mM.

Solución NRB3: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, sacarosa 1,7 M, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 0,5% (v/v), β -mercaptoetanol 5 mM.

7.6.5 Cycloheximide (CHX)-chase assay

Para el ensayo *CHX-chase*, plántulas de 10 días salvajes y transgénicas HYL1-6xMyc y HYL1^{mNES}-6xMyc se trataron con cicloheximida (0,5 mM) por el tiempo indicado en las figuras (0, 40, 80 y 120 minutos) y luego las muestras se mezclaron con 5 x solución de muestra SDS durante 10 min, y los extractos se resolvieron en SDS-PAGE del 8 al 12% después de hervir a 100 °C.

7.6.6 Cromatografía de exclusión por tamaño

Las muestras fueron sometidas a un fraccionamiento celular como se explicó en la sección 7.6.4. La fracción nuclear y los extractos citosólicos (1 mg) se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm antes de cargarlos en una columna de filtración en gel Sephadex de 200 µg (Hiprep, 16/600; GE Healthcare). El análisis de cromatografía de exclusión por tamaño fue realizado por AKTA prime plus (GE healthcare). Se aplicaron muestras de proteína a la columna, pre-equilibradas con solución de columna a 0,5 ml / minuto. Las fracciones (1,0 ml) se recogieron y se concentraron mediante Strataclean Resin (Agilent). Luego se mezclaron con solución de muestra 5x y se separaron mediante SDS-PAGE.

Solución de columna: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 100 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM

7.6.7 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

7.6.7.1 Test de inducción

Para identificar la mejor condición de expresión de las versiones de HYL1 Δ y HYL1^{C-termS>A/D/S} fusionadas al tag de histidina, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se inoculó una colonia de bacterias *E. coli* BL21 transformada con cada construcción en 5 ml de medio LB con ampicilina (marcador de selección del vector *pPro-ExHta-LR-phi*) y cloranfenicol (marcador de selección de la cepa BL21) y se lo dejó a 37 °C en agitación toda la noche. Al otro día se inocularon 10 µl del cultivo saturado en 1 ml de medio LB con dichos antibióticos, por duplicado para cada construcción. Se dejaron 1 hora a 37 °C bajo agitación y en uno de los tubos se agregó IPTG (concentración final 1 mM). A continuación, se testearon tres condiciones: (i) una hora a 37 °C, (ii) cinco horas a 28 °C y (iii) 16 horas a 17 °C. pasados esos tiempos se centrifugaron los tubos 1 minuto a 13000 g y a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet en 100 µl de agua y se agregó el mismo volumen de buffer de siembra de proteínas. Las muestras se corrieron

en un SDS-PAGE (45 minutos a 180 V) y luego se tiñeron los geles con azul de Coomassie para visualizar la inducción de la expresión de HYL1 recombinante.

7.6.7.2 Expresión de proteínas recombinantes

Para las diferentes versiones de HYL1 se realizaron inducciones a 28 °C. Se incubaron células transformadas en 5 ml de medio LB con ampicilina y cloranfenicol, y se dejó crecer toda la noche en agitación a 37 °C. Al otro día se inocularon 2 ml del cultivo saturado en 500 ml de medio LB modificado con carbenicilina y cloranfenicol y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600}=1$ (aproximadamente 5 horas). Se agregó IPTG (concentración final 1 mM) y se incubó por 14 horas a 28 °C.

Medio LB modificado: tripteína bacteriológica 15 g/l, extracto de levadura 15 g/l, NaCl 10 g/l.

7.6.7.3 Purificación de proteínas recombinantes

Luego de la incubación post-inducción, se recolectaron las células por centrifugación a 3500 r.p.m. y 4 °C por 20 min. Se realizó un lavado con la solución de unión/lavado y se volvieron a resuspender en 50 ml de la misma solución suplementada con inhibidor de proteasa (1 pastilla en 50 ml). La suspensión de bacterias se sonicó a una amplitud del 40% con pulsos y pausas de 5 segundos durante 1 hora. A continuación, se centrifugó a 15000 r.p.m. y 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a una columna de agarosa Ni-NTA previamente lavada con la solución de unión/lavado y se lo incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave. Al otro día se dejó eluir la solución y se realizó un lavado nuevamente con la solución de unión/lavado. Cuando finalizó la elución, se agregaron 2 ml (en forma secuencial) de la solución de elución, y en cámara fría se juntaron fracciones de 100 a 200 μ l en tubos Eppendorf con 10 μ l de glicerol 100%, manteniendo los mismos sobre hielo. Luego de homogeneizarlas, las distintas fracciones se guardaron a -80 °C.

Solución de unión/lavado para His-tag: 2X PBS, NaCl 226 mM, imidazol 20 mM.

Solución de elución para His-tag: 2X PBS, NaCl 226 mM, imidazol 500 mM.

7.6.8 Ensayos de pull-down

En orden de equiparar las muestras, se hace un *western blot* (sección 7.6.2) y se determinan las cantidades a usar de cada proteína en relación a la de menor concentración. Las diluciones se realizan con la solución de lavado.

Para cada versión de HYL1, se mezclaron en un tubo cantidades iguales de 6xHis-HYL1 y MBP-CRY1 y se llevó a volumen final de 100 μ l con solución de lavado. Se separaron 10 μ l y se mezclaron con 10 μ l de la solución de siembra de proteínas

(input) para evaluar la presencia inicial de las proteínas en el *western blot* final. Se agregaron 60 μ l de resina de amilosa lavada 5 veces con la solución de lavado y se incubaron 2-3 horas a 4 °C y agitación suave. Luego se realizaron 5 lavados con 1 ml de la solución de lavado, centrifugando a 13000 r.p.m por 1 min. Después del último lavado, se resuspendió la resina con 100 μ l buffer de siembra de proteínas y se llevó a 95 °C durante 10 min. Cuando las muestras tomaron temperatura ambiente se sembró por duplicado 15 μ l de estas y 5 μ l del input en geles de poliacrilamida al 12% para evaluar la presencia de HYL1 y CRY1.

Solución de lavado: 1X PBS, NaCl 50 mM, Triton X-100 0,2%

7.7 Análisis de fluorescencia

7.7.1 Microscopía de escaneo láser confocal (CISM)

Para los ensayos de localización subcelular, se transformaron de manera transitoria hojas de *N. benthamiana*. Pasadas 72 horas de la infiltración, se llevó a cabo la visualización y captura de imágenes con un microscopio confocal leica TCS SP8 (leica, Solms, Alemania). Para tal fin, las capturas se realizaron con un lente 40x o 60x, excitando las muestras con los láseres de 488 nm y 552 nm, y recolectando la emisión a 500-530 nm y 600-630 nm para eGFP y mCherry respectivamente, agregando una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. Se utilizó una apertura del *pinole* de 1, una ganancia con valores de 700-850, y una potencia de láser que varió en un rango entre 0,5% y 20% según la proteína a visualizar. El procesamiento de las imágenes se realizó en el software Fiji [164].

7.7.2 Análisis de FRAP y FLIP

Para el análisis de FRAP, se analizaron protoplastos de *Arabidopsis* que expresan transitoriamente HYL1-YFP o NLS-YFP. Se registraron 10 imágenes previas al blanqueamiento y se utilizó la intensidad media de las 5 últimas como medida previa al blanqueo. Luego, los núcleos se blanquearon a la máxima potencia del láser durante 5 ciclos, seguido de la captación de 50 imágenes con intervalos de 5 segundos. El blanqueo redujo la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) al 40%. Para determinar el RFI, se les restó el *background* a todos los datos y el RFI se calculó como $(T_0 / I_0) \times (I_t / T_t)$, donde T_0 es la intensidad celular total promedio antes del blanqueamiento, I_0 es la intensidad nuclear promedio antes del blanqueamiento, I_t es la intensidad nuclear promedio a tiempo t , y T_t es la intensidad celular total promedio en el tiempo t . Se utilizó

el RFI de cada núcleo analizado para el ajuste de curvas utilizando GraphPadtm. Se usó la aplicación incorporada GraphPadtm "comparación de ajustes". Se descartaron los datos en los que la comparación se informó como "no se puede calcular" o ajuste "ambiguo". El ajuste de un componente produce una constante de velocidad única K y el ajuste de dos componentes produce dos constantes de velocidad K1 y K2 (s^{-1}).

Para el análisis de FLIP, se analizaron protoplastos de *Arabidopsis* que expresan de forma transitoria HYL1-YFP, HYL1^{mNES}-YFP o NLS-YFP. Una gran área citoplasmática que encierra el núcleo se blanqueó continuamente y se registró la intensidad media en el núcleo con intervalos de 2,6 segundos durante 390 segundos. El análisis comenzó después de un mínimo de 15 ciclos de blanqueo para evitar que las moléculas fluorescentes volvieran a entrar en el núcleo desde el citoplasma. La intensidad media en el núcleo se le restó el *background* y los datos se analizaron utilizando GraphPadtm. Los datos de cada núcleo se evaluaron para uno o dos componentes de la misma manera que para los experimentos FRAP descritos anteriormente.

7.8 Ensayos en levaduras

7.8.1 Co-transformación de levaduras

La co-transformación de células de las cepas *S. cerevisiae* MaV203 se llevó a cabo mediante una modificación del método de acetato de litio descrito por Gietz y colaboradores [165]. Partiendo de un cultivo saturado de levaduras en medio YPDA, incubado por 20- 24 horas a 30 °C y en agitación, se tomó un volumen de 1,5 ml del mismo el cual fue centrifugado a 5000 g durante 1 min, y lavado con 1 ml de agua bidestilada estéril. Luego se adicionaron 240 μ l de PEG 3350 50% (p/v), 30 μ l de acetato de litio 1 M, 10 μ l de ADNss de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml), y 200-400 ng de las construcciones de interés (ver Tabla 1 del Anexo 1) en un volumen final de 355 μ l. Posteriormente, la mezcla fue incubada en un baño a 42 °C durante 40 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron, se resuspendieron en 200 μ l de agua bidestilada estéril y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se sembraron 100 μ l de esta suspensión en placas de Petri con el medio selectivo correspondiente, y se las incubó a 30 °C durante 3-5 días hasta la aparición de colonias.

Medio YPDA: Peptona de carne 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l, adenina hemisulfato dihidrato 43,9 mg/l.

Medio selectivo SD -leu -trp: Yeast Nitrogen Base (YNB) 7,6 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO -leu -trp (Clontech) 0,64 g/l, agar 15 g/l.

7.8.2 Ensayos de Doble Híbrido en levaduras

Los ensayos de Doble Híbrido en levaduras [166] se realizaron siguiendo las instrucciones descritas en el manual Yeast Protocols Handbook (Clontech laboratories). Se tomaron 2-3 colonias de levaduras co-transformadas con las construcciones a analizar crecidas en medio selectivo SD -trp -leu, y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. La suspensión se llevó a una DO600 = 0,5 y se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10. Se sembraron en placas con medio selectivo SD -trp -leu como control de crecimiento y SD -trp -leu -his para el ensayo de interacción entre las proteínas en estudio, y se incubaron a 30 °C durante 3-5 días hasta la observación de crecimiento de colonias. El medio de selección SD -trp -leu -his se suplementó con 5 mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) para reducir la autoactivación propia de algunas construcciones.

Medio selectivo SD -trp -leu -his: Yeast Nitrogen Base (YNB) 7,6 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO -trp -leu -his 0,62 g/l, Agar 15 g/l.

7.9 Cepas bacterianas y de levaduras

Escherichia coli, DH5 α [F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1] [167].

Escherichia coli, BL21 [F⁻, amp^T, hsdS_B (r_B-, m_B+), dcm, gal] [168].

Agrobacterium tumefaciens, GV3101 [C58 (rif r) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentr) Nopaline]. Esta cepa contiene el plásmido Ti tipo nopalina pMP90 (pTiC58DT-DNA) sin la función propia de transporte, pero el ADN-T del vector binario puede transferirse correctamente. El plásmido pTiC58DT-DNA contiene los genes *VIR* y resistencia a gentamicina. La cepa presenta resistencia cromosomal a rifampicina [169].

Saccharomyces cerevisiae, MAV203 [MAT α , leu2-3,112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPA10::URA3, GAI1::lacZ, HIS3UAS GAI1::HIS3@IYS2, can1R, cyh2R] [170].

7.10 Cuantificación y análisis estadístico

La RT-PCR cuantitativa se realizó utilizando al menos triplicados biológicos. Todas las réplicas se trataron como muestras independientes con fines estadísticos. Los promedios y SEM se calcularon a partir de valores de 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. Los valores de p menores a 0,05 en una prueba t con corrección de Bonferroni se consideraron significativos. Para analizar la longitud de los hipocotilos de las plántulas, la intensidad de las bandas de *western* y *small RNA blots* y la fluorescencia nuclear de las células que expresan

fusiones eGFP-HYL1, se utilizó el software Fiji. Tanto la intensidad de las bandas como la fluorescencia nuclear se analizaron como densidad de píxeles integrada. Para medir la longitud de los hipocótilos, se colocaron plántulas de 4 días de edad crecidas en agar MS al 0,8% encima de un fondo negro con una escala de referencia, y se escanearon a 600 dpi. A continuación, se cuantificaron las longitudes de los hipocótilos usando el software Fiji. Para las mediciones del ángulo de los cotiledones y los pecíolos, se fotografiaron y analizaron plántulas de 4 o 15 días respectivamente con Fiji.

RESULTADOS

8 RESULTADOS

8.1 Periodos prolongados de deficiencia de luz aumentan la relación entre HYL1 fosforilada y no fosforilada

Los niveles de miARNs en las plantas pueden alterarse por distintos factores, ya sean endógenos, como el estadio de crecimiento o el órgano donde se expresan, o exógenos, asociados a las variaciones de las condiciones ambientales [171]–[175]. En casos extremos se ha observado que un desbalance de las proteínas encargadas de su biogénesis también impacta profundamente la abundancia de miARNs y consecuentemente la fisiología de la planta [176]–[179]. Hace ya algunos años Pablo Manavella, director de esta tesis, descubrió que la proteína HYL1 existe en dos estados de fosforilación alternativos donde la isoforma fosforilada es inactiva, mientras que la desfosforilada es la versión funcional [144]. La identificación de estas isoformas abrió las puertas a la posibilidad de que HYL1, y por ende la biogénesis de miARNs, este regulada por señales percibidas por la célula. Para estudiar esta posibilidad decidimos explorar el balance entre las versiones fosforilada/desfosforilada de HYL1 en diferentes órganos de la planta, en respuesta a aplicaciones exógenas de hormonas y exposición de plántulas a diferentes condiciones de luz y temperatura. En este sentido, usamos geles de retardo de proteínas fosforiladas para lograr separar las isoformas de HYL1. Estos ensayos usan geles de poliacrilamida suplementados con *Phos-tag*®, un compuesto que se une a proteínas fosforiladas y causa una disminución de su movilidad electroforética. De esta manera, una misma proteína con distintos estados de fosforilación migra por el gel con distinta velocidad, permitiendo visualizar las isoformas de fosforilación como bandas independientes al revelar con un anticuerpo específico. Posteriormente, y usando el programa ImageJ [164], calculamos las intensidades de las bandas obtenidas en los *western blots* y obtuvimos la relación de abundancia de las isoformas fosforilada/desfosforilada de HYL1 en distintas muestras (Figura 4A). La cuantificación de la relación de isoformas nos permite comparar diferentes muestras de manera independiente a la abundancia total de HYL1 en cada una de ellas. Los resultados obtenidos muestran que esta relación aumenta con la edad de las plántulas (5-7 vs 12 días de edad), en hojas de roseta (emergentes vs completamente expandidas) y en flores (cerradas vs abiertas), sugiriendo que la versión activa de la proteína es particularmente rica en etapas tempranas del desarrollo de los tejidos analizados (Figura 4A). En plántulas de 10 días, la exposición a baja temperatura, ácido jasmónico, auxinas, giberelinas y citoquininas causaron efectos no significativos en el balance de las isoformas (Figura 4B). Sin embargo, el precursor de etileno ACC y la

fitohormona ABA produjeron un cambio en la relación de isoformas de HYL1 hacia la forma fosforilada (inactiva) (Figura 4B). El cambio causado por ABA es particularmente interesante, considerando que las plantas mutantes *hyl1* son hipersensibles a esta hormona [142].

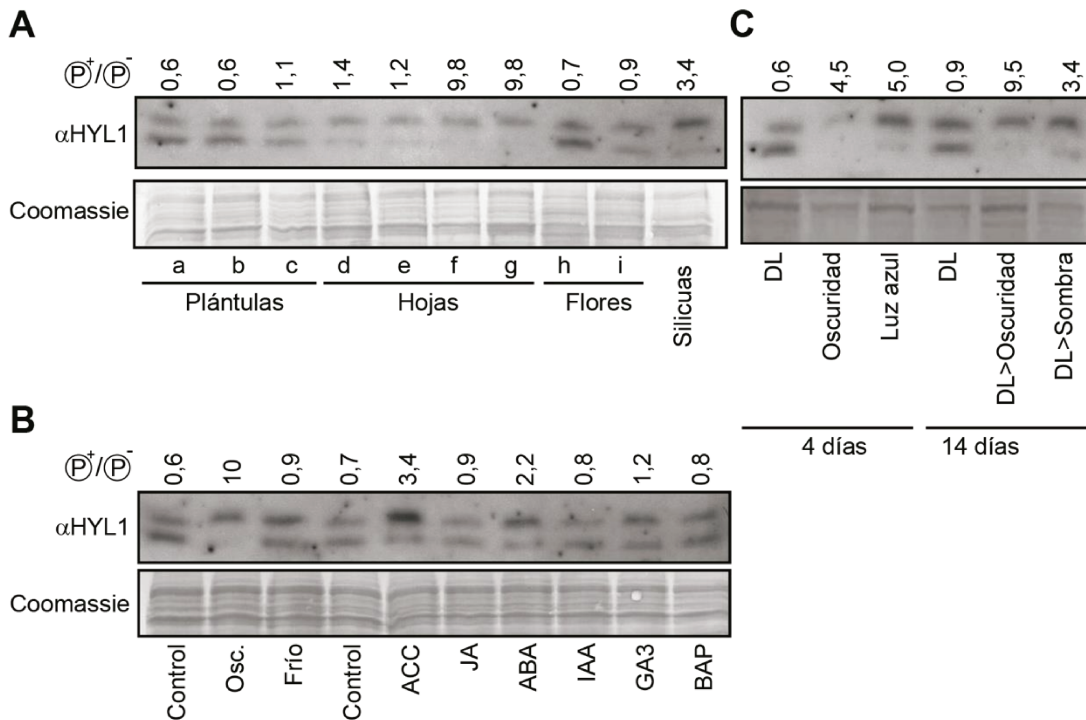


Figura 4. (A-C) Isoformas de fosforilación de HYL1 detectadas con un anticuerpo policlonal específico para la proteína en geles de retardo de proteínas fosforiladas (paneles superiores). Los paneles inferiores muestran la tinción de Coomassie como control de carga. En la parte superior de cada par de bandas están las relaciones entre las formas fosforilada y no fosforilada de HYL1. Las muestras corresponden a (A): plántulas enteras colectadas 5, 7 y 12 días luego de la germinación (a, b, c, respectivamente); hojas emergentes, en desarrollo, completamente expandidas y caulinares (d, e, f y g, respectivamente); flores cerradas (h) y abiertas (i), y silicuas completamente expandidas. (B): plántulas de 10 días transferidas a oscuridad por 10 días (Osc.), o 24 horas a 4°C (Frío); o tratadas con 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (IAA), giberelinas (GA3) o 6-N-Bencilaminopurina (BAP) (C): muestras colectadas 4 días luego de la germinación bajo fotoperiodo de día largo (DL), completa oscuridad (Oscuridad) o con una fuente débil y localizada de luz (Luz azul). Plántulas de 10 días crecidas en DL transferidas a DL (DL), completa oscuridad (DL>Oscuridad) o a luz verde (DL>Sombra) por 4 días.

Sin embargo, el mayor cambio en la abundancia relativa de las isoformas fue observado cuando las plantas fueron expuestas a periodos prolongados de deficiencia de luz. En este sentido, observamos que HYL1 se encuentra completamente fosforilada

(inactiva) cuando plántulas de 10 días son transferidas a oscuridad constante por 4 días para simular la obstrucción del paso de luz en plantas de-etioladas (por ejemplo, cuando la parte aérea de la planta es cubierta por hojas que caen de los árboles en otoño) (Figura 4B). El mismo desplazamiento de la relación hacia la versión fosforilada fue observado en plántulas etioladas crecidas en completa oscuridad luego de la germinación para iniciar la escotomorfogénesis; en plántulas expuestas a luz azul unilateral débil (fuente de luz insuficiente para revertir de forma completa la etiolación); y, en plántulas transferidas desde fotoperiodo de día largo (DL) a sombra simulada en las horas de luz (Figuras 4B, C). Para simular sombra debido a la presencia de plantas vecinas utilizamos un filtro de acetato selectivo que reduce severamente la luz visible, pero transmite la mayoría del rojo lejano.

En concordancia con reportes anteriores [148], las plantas privadas de luz mostraron una reducción en los niveles totales de proteína de HYL1, que se recuperan al retornar las mismas a la luz (Figura 5A).

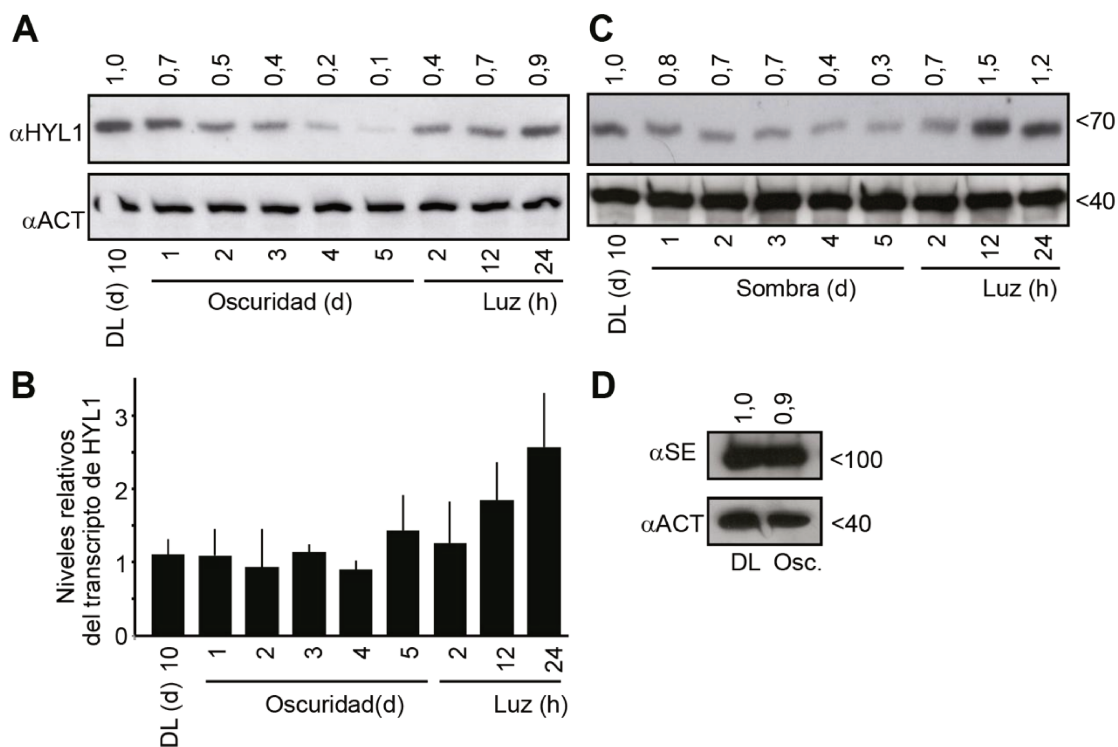


Figura 5. (A-B) Niveles de proteína de HYL1 (paneles superiores) en plantas de 10 días crecidas en DL, expuestas de 1 a 5 días a (A) oscuridad o (B) sombra simulada, y luego retornadas a luz por 2, 12 y 24 horas, medidos por *Western blot* con un anticuerpo específico para HYL1. Los paneles inferiores muestran los niveles de actina como control de carga. (C) Niveles del transcripto de HYL1 medidos por qPCR, en las mismas muestras usadas para el panel (A). (D) Nivel de proteína de SE medido por *Western blot* en plántulas de 10 días crecidas en DL y con 5 días en oscuridad. El panel inferior muestra los niveles de actina como control de carga.

Transcripcionalmente no detectamos cambios en los niveles de ARNm de *HYL1* durante el periodo de oscuridad (Figura 5B) pero sí un aumento de estos transcritos al retornar las plantas a la luz, posiblemente con el fin de restaurar los niveles de normales de proteína (Figura 5B). Además, encontramos que el sombreado simulado también es suficiente para inducir la degradación de HYL1 observada en completa oscuridad (Figura 5C). Como control, observamos que los niveles de SE no se reducen durante la privación de luz (Figura 5D).

Es interesante observar que, como consecuencia de la reducción en los niveles de HYL1 durante la oscuridad o sombra, los niveles de miARNs disminuyen gradualmente y se recuperan rápidamente luego de restablecer la luz blanca (Figuras 6A-B).

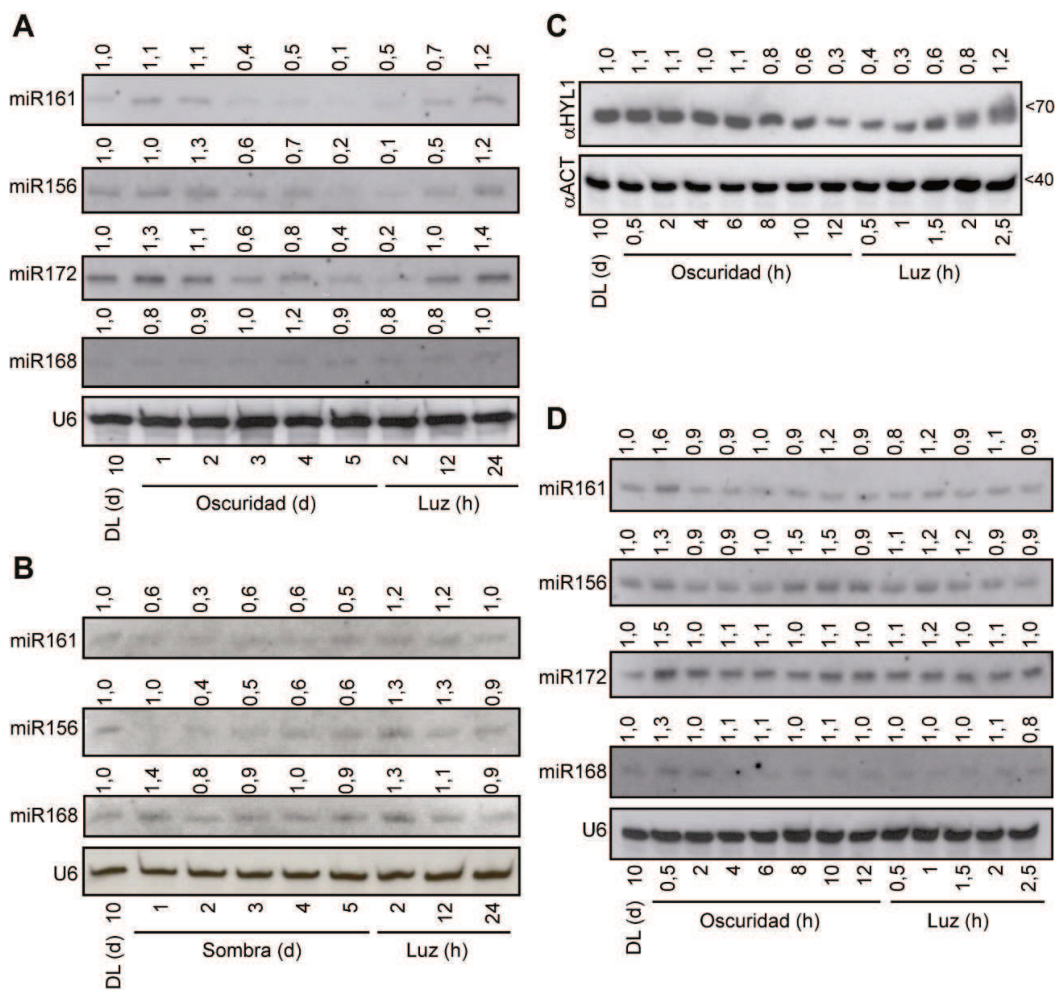


Figura 6. (A, B, D) Niveles de miARNs medidos por *Small RNA blots* con sondas específicas para cada miARN en plantas de 10 días crecidas en DL, expuestas de 1 a 5 días a (A) oscuridad o (B) sombra simulada, y luego retornadas a luz por 2, 12 y 24 horas, o a 12 horas de oscuridad y 2,5 horas de luz (D). Los niveles de del ARN nuclear pequeño U6 (U6) se utilizaron como control de carga (C) *Western blot* con un anticuerpo específico para HYL1 con las mismas plantas usadas en el panel (D).

No observamos diferencias significativas en los niveles de miR168, que comúnmente es procesado de manera independiente a HYL1 [180], y fue utilizado en este estudio como un control de la vía independiente de HYL1. Esta fluctuación en los niveles de miARNs no se observa durante un ciclo neutro de luz/oscuridad, es decir, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. En estas condiciones observamos que HYL1 se mantiene estable durante las primeras 8 horas de la noche y luego comienza a disminuir gradualmente, recuperando su abundancia en las primeras horas de luz (Figura 6C). Sin embargo, en forma contraria a los efectos de períodos prolongados de deficiencia de luz, la disminución transitoria observada de HYL1 al final de la noche no resultó en cambios detectables en los niveles de miARNs (Figura 6D). Este resultado sugiere que la degradación de HYL1, así como posiblemente el cambio del estado de fosforilación, no tendrían un impacto en el desarrollo de la planta en un ciclo de luz normal, pero sí cuando la deficiencia lumínica es prolongada e implica un cambio en el programa de desarrollo de la planta.

8.2 La versión inactiva fosforilada de HYL1 es menos susceptible a la degradación inducida por oscuridad/sombra, y conforma un pool de reserva de la proteína

El aumento observado en la relación fosforilada/desfosforilada de HYL1 en respuesta a oscuridad o sombra podría ser explicado por un aumento en la fosforilación de HYL1 inducido por la deficiencia prolongada de luz, y/o por una degradación selectiva de la forma no fosforilada de la proteína. Para discernir entre estas posibilidades, usamos geles de retardo de proteínas fosforiladas para separar las isoformas de HYL1 en las mismas muestras usadas en las Figuras 5A y C. Cuando evaluamos las isoformas de HYL1 individualmente, observamos que solo la forma no fosforilada de HYL1 es degradada, tanto en sombra como en oscuridad (Figura 7A). La reducción de la cantidad total de HYL1, con niveles relativamente estables de HYL1 fosforilada, sugiere que su degradación proviene principalmente de la forma desfosforilada (casi indetectable luego de dos días de oscuridad/sombra) y que la falta de luz no induce la fosforilación de HYL1. Sorprendentemente, la fracción de HYL fosforilada, predominante al final de períodos prolongados de oscuridad o sombra, desaparece rápidamente luego de que las plántulas fueron expuestas nuevamente a luz blanca (Figura 7A). En este sentido, observamos un rápido cambio entre las isoformas de HYL1 sin un cambio considerable en los niveles de proteína totales, lo que sugiere que al retornar las condiciones lumínicas favorables la fracción de HYL1 no degradada es rápidamente desfosforilada y reactivada (Figura 7A). Un análisis más detallado de la cinética de degradación indicó

que un día de oscuridad fue suficiente para disparar la degradación de la forma activa de HYL1 y que la recuperación del pool activo luego de retornar las plantas a la luz fue observada de manera independiente a la duración de la incubación en oscuridad (Figura 7B). Dicho cambio entre las fosfo-isoformas de HYL1 puede ser fácilmente explicado por una rápida desfosforilación de HYL1, pero no podemos descartar que una rápida degradación de la isoforma fosforilada y la transcripción/traducción *de novo* de la isoforma activa produzcan este efecto.

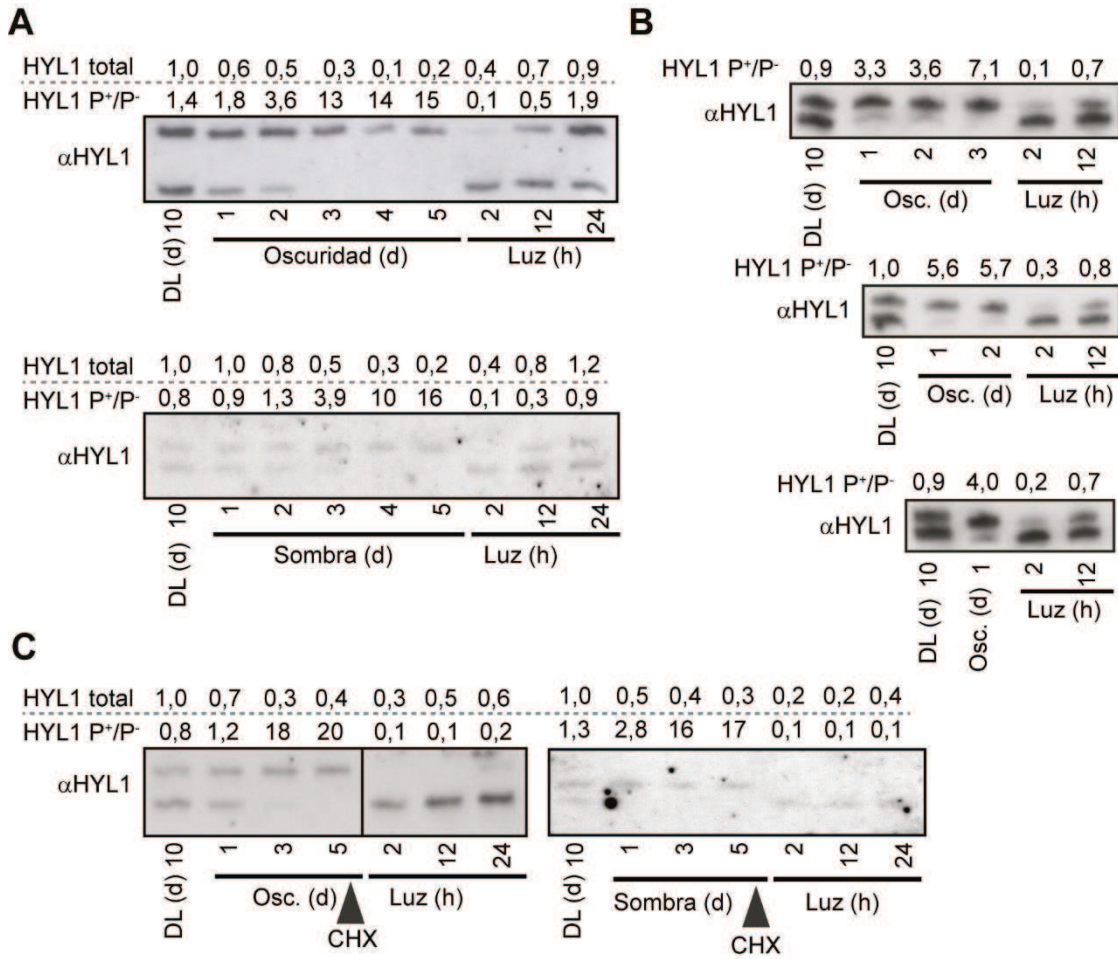


Figura 7. Geles de retardo de proteínas fosforiladas, revelados con un anticuerpo específico para HYL1. (A, B) Plantas de 10 días fueron expuestas por 1 a 5 días de oscuridad o sombra, seguido de 2, 12 y 24 horas de luz. (C) Plantas de 10 días fueron expuestas a 5 días de oscuridad. Dos horas antes de retornarlas a luz blanca, fueron transferidas a medio líquido con 100 μ M cicloheximida (CHX). Los niveles totales y relativos de HYL1 mostrados en la parte superior de cada panel fueron medidos con ImageJ [164].

Para identificar el mecanismo de regulación, repetimos la misma cinética, pero inhibiendo la traducción proteica dos horas antes de la exposición a luz blanca usando cicloheximida. Para esto, transferimos en completa oscuridad las plántulas a medio

Murashige & Skoog líquido complementado con 100 μM de cicloheximida (CHX), un compuesto que interfiere con la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. Luego de dos horas las plantas fueron transferidas a una fuente de luz blanca por 2, 12 y 24 horas antes de colectar muestras. En estas muestras solo pudimos detectar la isoforma no fosforilada de HYL1, indicando que la desfosforilación del pool inactivo de HYL1, más que la traducción *de novo*, es la fuente de la isoforma activa de HYL1 luego de restaurar los niveles de luz (Figura 7C).

Debido a que la degradación de HYL1 es inducida por sombra/oscuridad, y el cambio en las isoformas es observado cuando las plantas perciben una fuente favorable de luz, analizamos la participación de distintos fotorreceptores en la señalización de esta respuesta. Repetimos la cinética de DL/oscuridad con mutantes en los fitocromos A y B (*phyA* y *phyB-9*), responsables de percibir la luz roja, en los criptocromos 1 y 2 (*cry1* y *cry2*), involucrados en la percepción de luz azul, y en ELONGATED HYPOCOTYL 5 (*hy5*), un factor de transcripción clave en la percepción de luz [181]. La ausencia de cada uno de los receptores de luz analizados no inhibió la degradación de HYL1 en oscuridad (Figura 8A), sugiriendo que otras moléculas podrían ser responsables de la señal que lleva a la degradación de HYL1. Sin embargo, no podemos descartar que estos resultados se deban a la redundancia funcional entre muchos de estos receptores [182], [183].

El cloroplasto puede actuar como un sensor ambiental, comunicándose con la célula para cambiar la expresión de miles de genes [184]. Este proceso, denominado señalización retrograda, regula la expresión en respuesta a señales de desarrollo y estrés que afectan la fotosíntesis [184]. En este sentido, decidimos explorar si una señal retrógrada desde los cloroplastos está involucrada en la inducción de la desfosforilación de HYL1 luego de que las plantas son retornadas a la luz. Para esto utilizamos 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), un compuesto químico que bloquea la transferencia de electrones desde el fotosistema II al pool de plastoquinonas, inhibiendo de esta manera cualquier señal disparada por luz proveniente del cloroplasto. Transferimos plántulas de 10 días crecidas en DL a oscuridad o sombra simulada por 2 y 3 días, respectivamente, y una hora antes de retornarlas a luz blanca las tratamos con DCMU 50 μM . Colectamos las muestras una hora después del retorno a luz, y nuevamente separamos las isoformas con geles de retardo de proteínas fosforiladas. Los resultados mostraron que el tratamiento con DCMU bloqueó casi completamente la desfosforilación de HYL1 disparada en condiciones control por la restauración de luz (Figura 8B). Esto sugiere que el cloroplasto podría ser el responsable de modular la reactivación de HYL1 por luz e incluso que esta reactivación podría estar mediada por una señal móvil. De

acuerdo con esta idea, cuando analizamos la degradación/recuperación de HYL1 en raíces y tejido aéreo por separado, vimos que tanto la degradación en oscuridad como la recuperación del pool activo de HYL1 tuvieron lugar en las raíces, tejido comúnmente no expuesto a la luz, pero el efecto parece producirse de forma tardía en comparación con los tejidos aéreos (Figura 8C). Esto podría implicar que una señal móvil debe alcanzar las raíces desde el tejido aéreo para disparar la respuesta observada. Sin embargo, se necesita más evidencia para confirmar tal hipótesis.

Por otro lado, a pesar de que la isoforma inactiva fosforilada de HYL1 es más resistente a la degradación que la forma activa, observamos una lenta pero constante reducción de la primera luego de periodos largos de privación de luz (Figuras 7A y B). Esto puede significar que dicha isoforma es también susceptible a la degradación, a menor velocidad, o que el equilibrio entre las isoformas va paulatinamente desplazando la versión fosforilada a desfosforilada produciendo su degradación. A pesar de que la evidencia parece apoyar esta hipótesis, no podemos excluir que una potencial inducción de la fosforilación de HYL1 por oscuridad/sombra contribuya a la observada reducción de la forma activa de HYL1.

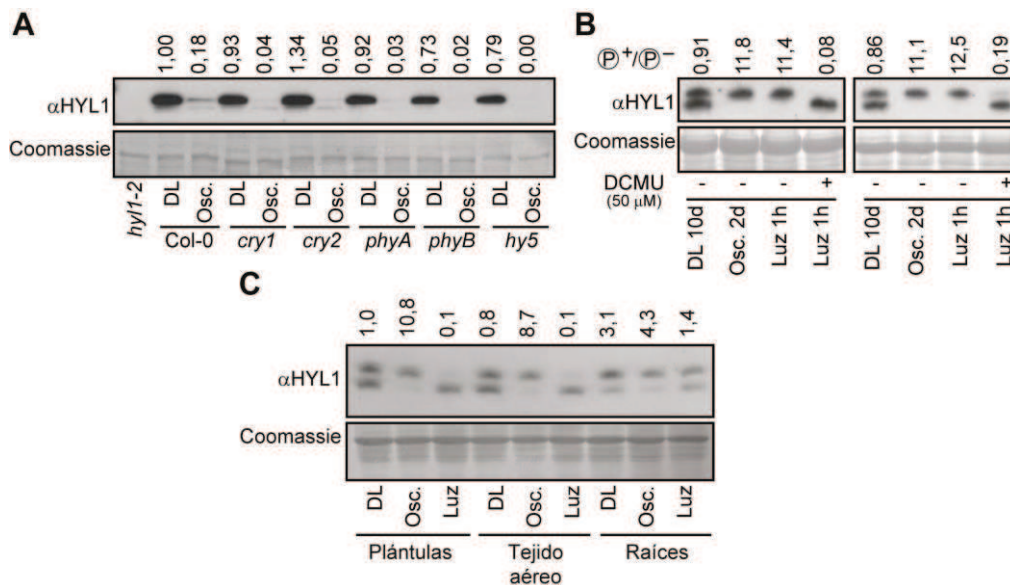


Figura 8. (A) Niveles de proteína de HYL1 (panel superior) en plantas de 10 días crecidas en DL y expuestas 5 días a oscuridad, medidos por *Western blot* con un anticuerpo específico para HYL1. (B) Geles de retardo para proteínas fosforiladas, revelados con un anticuerpo específico para HYL1. (B) Plántulas de 10 días fueron expuestas a 2 días de oscuridad o sombra, seguido de 1 hora de luz en medio líquido con (+) y sin (-) DCMU 50 μ M. (C) La misma cinética fue analizada en plántulas, y tejido aéreo y subterráneo (raíces) por separado. En todos los casos se muestra la tinción de Coomassie como control de carga. Los niveles de HYL1 en la parte superior de cada panel fueron medidos con ImageJ [164].

Debido a que HYL1 es desfosforilada principalmente por CPL1 [144], en las plantas mutantes *cp1* HYL1 existe principalmente en forma fosforilada. Si nuestra hipótesis es correcta, podría esperarse, que HYL1, en su versión fosforilada, sea particularmente estable en estas plantas, al carecer de la isoforma degradable. En efecto, el análisis de degradación inducida por oscuridad en la mutante *cp1* mostró que la proteína es más estable en estas plantas, favoreciendo la idea de una “fosfo-protección” de HYL1 (Figura 9A, panel superior). Además, cuando evaluamos las fosfo-isoformas en las mutantes *cp1* encontramos que en oscuridad la forma fosforilada se encontraba estabilizada (Figura 9A, panel inferior). Sin embargo, se detecta una degradación parcial de HYL1 en estas mutantes, como puede ser esperado debido a la redundancia funcional de CPL1 con CPL2 [144]. De acuerdo con esto, la resistencia a la degradación es aún más notoria en las doble mutantes *cp1/cp2* (Figura 9A). Esta doble mutante, homocigota para el alelo *cp2-2* y heterocigota para el alelo dominante negativo *cp1-7* [144], confirmó la redundancia de ambas proteínas en el control de la fosforilación de HYL1 y la resistencia de esta isoforma a la degradación.

Para confirmar que la fosforilación hace que HYL1 sea resistente a la degradación, hicimos uso de mutantes fosfo-miméticas de HYL1. En las mismas se reemplazan las serinas importantes para su regulación (S42 y S159) por ácido aspártico para simular un estado fosforilado (S42D y S159D), o por alanina para simular un estado desfosforilado y no fosforilable (S42A y S159A) [144]. Mutantes *hyl1-2* transformadas con construcciones imitando los estados fosforilado/desfosforilado de cada serina (individualmente), fueron crecidas por 10 días y luego transferidas a sombra simulada por 1 día. Esta incubación corta tuvo como objetivo evitar la completa degradación proteica, permitiendo visualizar diferencias entre las construcciones. Al analizar las muestras por *western blot* vimos que la fosforilación de la S159, pero no de la S42, hace a HYL1 insensible a la degradación, apoyando la estabilización de esta proteína por la fosforilación durante periodos de deficiencia de luz (Figura 9B). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las diferentes construcciones entre las muestras analizadas en condiciones control (Figura 9C). Este resultado no solo confirma la fosfo-protección de HYL1, sino que también apunta a la S159, y potencialmente al dominio DRBM2 donde se encuentra, como un dominio importante para dicha protección. Sin embargo, no podemos excluir un rol, incluso en la estabilidad proteica, de otros amino ácidos fosforilables identificados previamente [144].

En conjunto, nuestros resultados sugieren que aún cuando la forma activa de HYL1 es degradada en ausencia de luz, limitando la producción de miARNs, la isoforma inactiva fosforilada de HYL1 forma un pool de reserva de la proteína insensible a la

degradación. Cuando se alcanza una fuente lumínica apropiada, este pool de reserva es desfosforilado, restaurando rápidamente el pool activo de la proteína y reactivando la producción de miARNs.

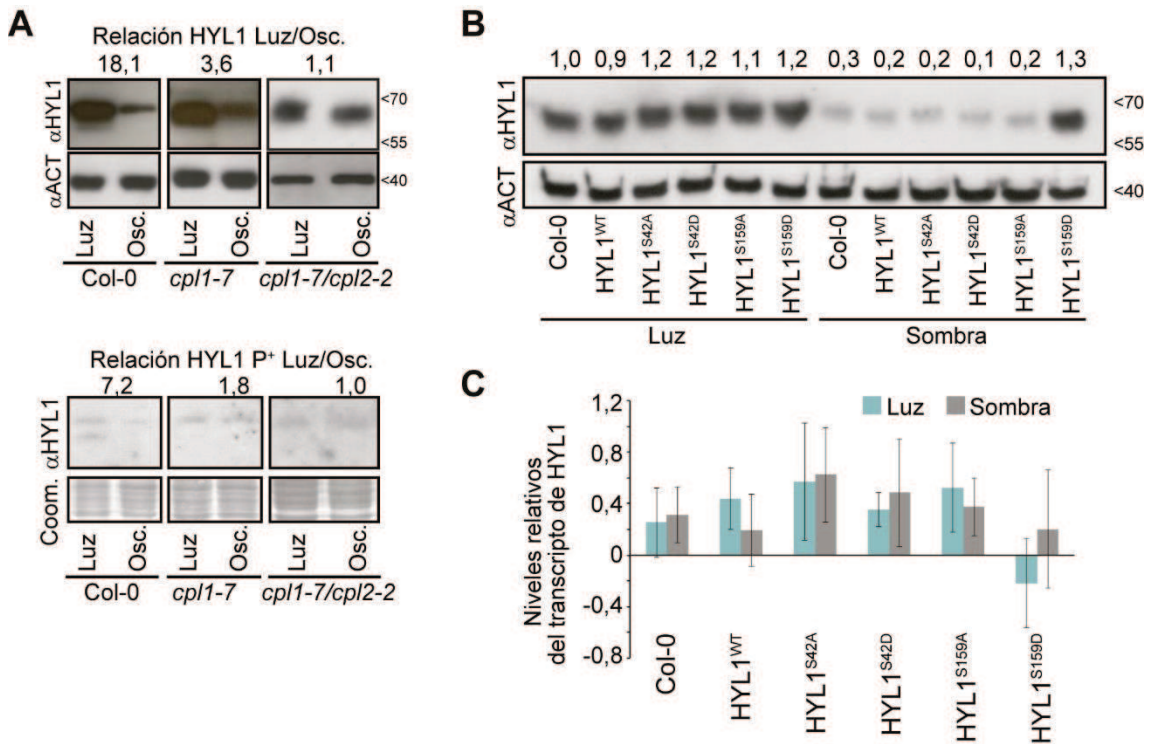


Figura 9. (A) Niveles de proteína de HYL1 en plántulas salvajes (Col-0) y mutantes (*cpl1-7* y *cpl1-7/cpl2-2*) de 10 días crecidas en DL (luz) y expuestas a 3 días de oscuridad. En el panel inferior se analizó la abundancia relativa de HYL1 fosforilada (HYL1 P⁺) en luz y oscuridad en las mismas muestras, usando geles de retardo para proteínas fosforiladas. (B) Niveles proteicos de HYL1 en plántulas mutantes *hyl1-2* transformadas con las distintas fosfo-mímicas de HYL1, crecidas 10 días crecidas en DL (luz) y expuestas a 1 día de sombra. (C) Niveles del transcripto de HYL1 en las mismas muestras analizadas en (B), medidos por qPCR.

8.3 La versión monomérica fosforilada de HYL1 localiza exclusivamente en núcleo quedando protegida de la degradación

Para evaluar si la fosforilación de HYL1 afecta su distribución subcelular, y por lo tanto su degradación, fusionamos las versiones salvaje y fosfo-miméticas de HYL1 a la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), clonamos las construcciones bajo la región reguladora de HYL1 y transformamos plantas mutantes *hyl1-2*. También clonamos las construcciones bajo el promotor 35S para forzar la sobreacumulación de estas proteínas. Usando estas líneas, analizamos la localización de HYL1 en plantas de 10 días mantenidas en luz y transferidas a oscuridad por 24 horas.

Como se había observado previamente, la versión de HYL1 sobre-expresada en *Arabidopsis* se encontró tanto en núcleo como en citoplasma [147], [148] (Figura 10). En las condiciones evaluadas, la sobre-expresión de HYL1-GFP permitió compensar la degradación de HYL1 en oscuridad y detectarla en ambos compartimentos cuando las plantas son expuestas a dicha condición (Figura 10). Este no fue el caso para las líneas con el promotor de HYL1 donde, como se ha reportado, la porción citoplasmática fue degradada en oscuridad (Figura 10).

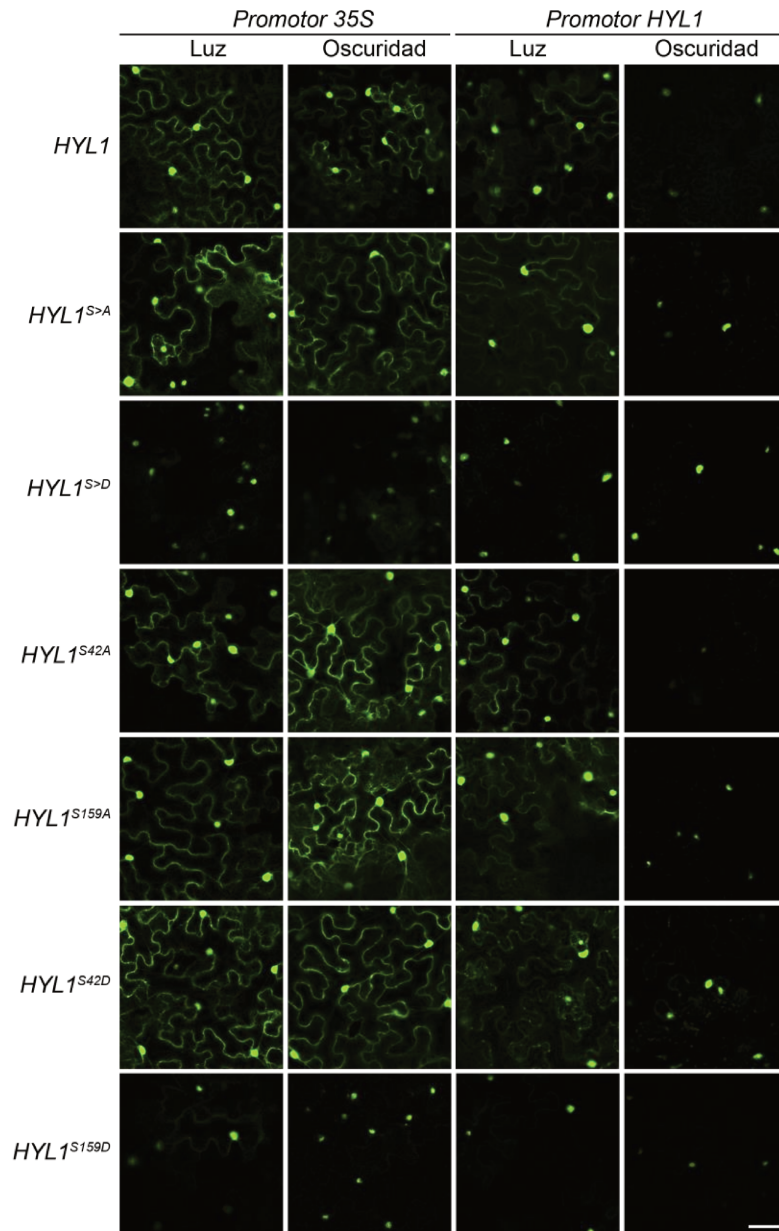


Figura 10. Localización nuclear/citoplasmática en luz y oscuridad de HYL1 salvaje y sus fosfo-mímicas fusionadas a GFP, bajo el control del promotor constitutivo 35S o la región reguladora de HYL1. S>D o S>A indica la mutación de siete codones de serina en HYL1 por ácido aspártico o alanina. S42D/A y S159D/A indica la mutación de serinas individuales. Todas las imágenes fueron tomadas con el mismo aumento. La barra en el panel derecho inferior representa 50 mm.

Todas las construcciones en las que las serinas fueron mutadas por alanina, mimetizando a HYL1 no fosforilada, compartieron el mismo patrón de localización que la versión salvaje (Figura 10). Sin embargo, y a pesar de la utilización del promotor 35S, las fosfo-mímicas de HYL1 completamente fosforilada (S>D) y la S159D, pero no la S42D, se encontraron restringidas principalmente al núcleo de la célula, tanto en luz como en oscuridad (Figura 10). Se cuantificaron los niveles de las proteínas de fusión, así como los niveles de intensidad de fluorescencia de los núcleos, para excluir variaciones en los niveles de expresión y confirmar la estabilidad de la proteína nuclear (Figuras 11A y 11B). Estos resultados sugieren que la fosforilación de HYL1 en la S159 restringe su localización subcelular al núcleo, donde puede escapar a la degradación citoplasmática. Para probar esta hipótesis, purificamos proteínas desde las fracciones citoplasmática y nuclear, y usamos geles con *Phos-tag*® para cuantificar las isoformas. Los resultados revelan un enriquecimiento de HYL1 fosforilada en el núcleo respecto al citoplasma (Figura 11C). Como era de esperar, la isoforma activa no fosforilada de HYL1 está presente tanto en núcleo, donde cumple su función en el procesamiento de miARNs, como en el citoplasma, donde es degradada durante privaciones de luz y donde cumple una función en la inhibición traduccional [126]. Esto sugiere que la resistencia a la degradación observada de HYL1 fosforilada podría ser un resultado de su localización preferentemente nuclear, que a su vez la protege de la indefinida proteasa citoplasmática descrita por Cho y colaboradores [185]. La localización nuclear exclusiva de la mutante S159D, pero no de S42D, concuerda con la observación de que solo la fosforilación de este residuo protege a HYL1 de la degradación (Figura 9B).

Seguimos una aproximación adicional para confirmar que la localización nuclear exclusiva de HYL1^{S159D}, y no la fosforilación *per se*, es la responsable de su resistencia a la degradación. Transformamos plantas mutantes *hyl1-2* con una fusión de la secuencia codificante de *HYL1* con la S159 mutada por ácido aspártico o alanina, al receptor de glucocorticoide (GR) bajo el control del promotor nativo de HYL1. Como muchos otros receptores de esteroides, el GR se mantiene en el citoplasma hasta que un ligando se le une y desencadena su translocación al núcleo, donde desempeña su función [186]. De esta manera, el GR fusionado a HYL1^{S159AD} mantiene a esta proteína en el citoplasma, donde puede ser activamente degradada durante los periodos de oscuridad/sombra. Así, cuando forzamos a la fosfo-mímica S159D a permanecer en el citoplasma, al fusionarla al receptor GR, fue degradada tan eficientemente como la forma no fosforilada (Figura 11D). Esta observación implica que la fosforilación de HYL1 por sí misma no es responsable de la estabilidad de la proteína, pero sí de controlar su localización subcelular, evitando de forma indirecta su degradación.

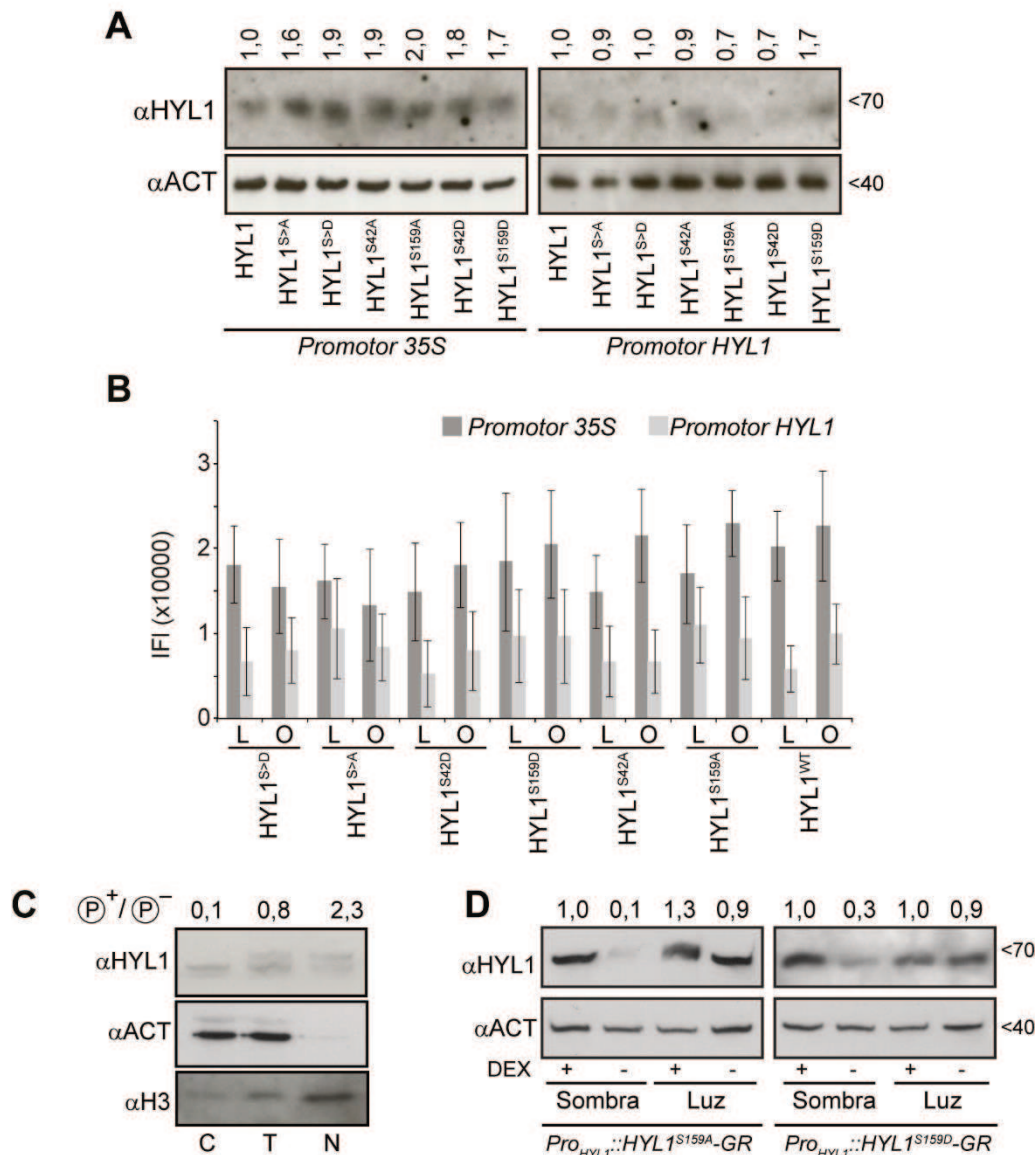


Figura 11. (A) Cuantificación por *western blot* de HYL1-eGFP en plantas transformadas con las fosfo-mímicas de la Figura 10, crecidas en fotoperiodo de DL. En la parte superior del panel se muestran las intensidades de señales relativas, calculadas con ImageJ [164]. A la derecha se indica el peso molecular. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de HYL1-eGFP medida en núcleos de células mostradas en la Figura 10. Las barras de error representan 2xSEM. (C) Geles de cambio de movilidad para proteínas fosforiladas de muestras extraídas de fracciones subcelulares (citoplasma [C] y núcleo [N]) o total (T). En la parte superior de cada par de bandas se muestra la relación entre la forma fosforilada y no fosforilada. La detección de ACTINA (ACT) e HISTONA3 (H3) en cada muestra fue usada como control de la pureza del fraccionamiento (ACT citoplasmático y H3 nuclear). (D) cuantificación por *western blot* de la fusión HYL1-GR en plantas tratadas con dexametasona (DEX +) o solución control (-) y transferidas a sombra simulada o mantenidas en fotoperiodo de DL por 2 días. En la parte superior se muestra la intensidad de señal relativa, calculada con ImageJ [164].

Con el objetivo de entender de qué manera la fosforilación afecta la actividad de HYL1, realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación de pri-miRNAs asociados a HYL1 y de interacción entre proteínas. Utilizando un anticuerpo específico para HYL1, inmunoprecipitamos las diferentes fosfo-mímicas expresadas en la mutante *hyl1-2*. Luego de purificar los ARNs asociados a las versiones de HYL1, se detectaron los pri-miRNAs unidos a HYL1 por RT-PCR. Todas las fosfo-mímicas analizadas, con excepción de la S42D, fueron capaces de interaccionar con los pri-miRNAs analizados (Figura 12A). Considerando el rol del dominio DRBM1, donde se localiza la S42, en la interacción de HYL1 con los pri-miRNAs [104], la falla de S42D para interactuar de manera apropiada con los pri-miRNAs es razonable y podría explicar la reducida actividad de HYL1 cuando este aminoácido es fosforilado. Sin embargo, la capacidad de unión a pri-miRNAs detectada en la versión S159D sugiere que la fosforilación de este aminoácido dirige la localización nuclear de HYL1, y por ende su estabilidad, de manera independiente a la capacidad de HYL1 de asociar pri-miRNAs.

El dominio DRBM2, y en particular dos hojas β donde se localiza la S159, son necesarias para la formación del dímero de HYL1 y participan en la interacción de HYL1 con SE [104], [108], [144]. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de HYL1 y las fosfo-mímicas para interactuar con su proteína asociada SE y para formar dímeros. Con ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H) pudimos ver que la fosforilación de la S159 disminuye tanto la capacidad de interacción con SE como la capacidad de homodimerizar (Figura 12B).

La localización nuclear preferencial de HYL1^{S159D} y su falla para interaccionar con SE y consigo misma, sugieren que HYL1 requiere de la asociación con proteínas chaperonas para su movimiento hacia el citoplasma, como es el caso de su importación al núcleo [147]. Si esta hipótesis es correcta, deberíamos observar una distribución diferencial de monómeros y dímeros de HYL1 en el núcleo y en el citoplasma. Para investigar más a fondo la distribución subcelular de los complejos en los que HYL1 está contenida, combinamos ensayos de fraccionamiento celular y filtración por geles. La pureza del fraccionamiento nuclear/citoplasmático fue confirmada midiendo proteínas marcadoras subcelulares (Figura 13B). En el núcleo, HYL1 fue detectada en *high-order complexes* (complejos proteicos por encima de los 200 kDa), que podrían representar a HYL1 asociada a sus múltiples proteínas interactuantes en el complejo de procesamiento de miRNAs [58], o formas de multi-complejos auto-ensamblados tal como tetrámeros, como se ha demostrado previamente [104]. También se detectó una señal fuerte en las fracciones de elución que representan los dímeros de HYL1 (~150 kDa) y monómeros (~66 kDa) (Figura 13A, panel superior). HYL1 fosforilada, que fue

detectada preferencialmente en el núcleo y no es capaz de dimerizar, podría conformar esta fracción monomérica nuclear.

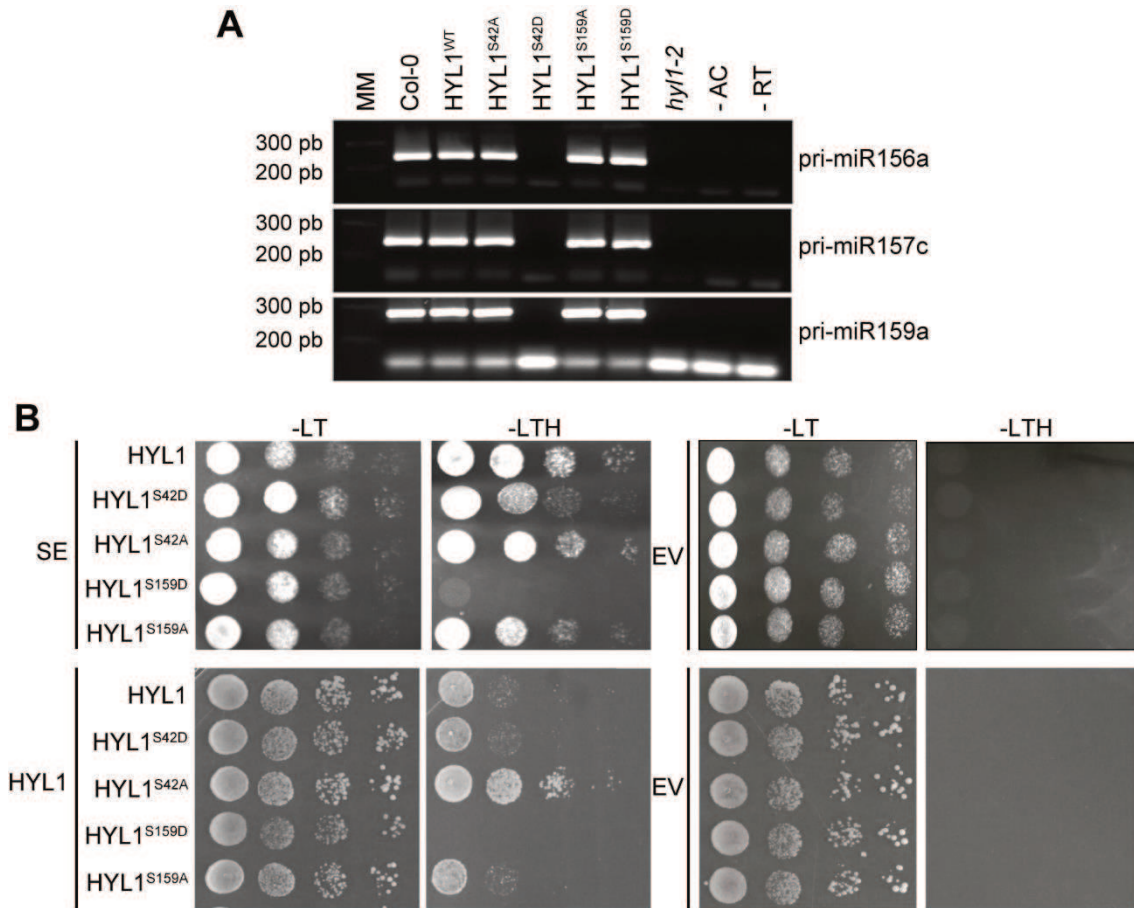


Figura 12. (A) Inmunoprecipitación de ARN realizado con un anticuerpo contra HYL1. Los pri-miARNs asociados a las fosfo-mímicas de HYL1 fueron detectados por RT-PCR. Plantas mutantes de *hy1-2* fueron usadas como control negativo de unión inespecífica. “- AC” muestra RT-PCR realizada en muestras a las cuales no se les agregó anticuerpo durante el protocolo de inmunoprecipitación de ARN. “- RT” muestra PCR realizada directamente en la inmunoprecipitación de ARN como control de contaminación de ADN genómico. (B) ensayo de doble híbrido en levaduras. Se fusionaron SERRATE (SE) y HYL1 al dominio de unión de GAL4; las fosfo-mímicas de HYL1 al dominio de activación de GAL4. Como control se utilizó un vector que expresa sólo el dominio de unión de GAL (EV). -LT, medio sin leucina y triptófano; -LTH, sin leucina, triptófano e histidina. Se muestran diluciones seriales 1:10.

En el citoplasma, HYL1 fue encontrada principalmente en *high-order complexes*. Los dímeros y monómeros citoplasmáticos se detectaron con una señal débil, por lo que podrían representar solamente la proteína recientemente traducida. Esto también podría indicar que el sustrato de degradación preferencial es HYL1 en su forma monomérica

y/o dimérica, o que la dimerización proteica es necesaria para la exportación nuclear (Figura 13A, panel inferior).

Adicionalmente, sólo en la fracción citoplasmática y con exclusión correspondiente al tamaño predicho de un dímero (~150 kDa), se encontraron posibles fragmentos de HYL1 resultantes del clivaje proteico, tanto del segmento N-terminal (flecha verde) como del C-terminal (flecha amarilla) (Figura 13A, panel inferior). Esta observación refuerza la idea de que la degradación de HYL1 podría tomar lugar con el dímero como sustrato. Sin embargo, la degradación inducida por oscuridad de la fosfo-mímica de HYL1^{S159D} cuando se la forzó a permanecer localizada en el citoplasma (Figura 11D) sugiere que los monómeros también pueden ser degradados con la misma eficiencia que los dímeros. Así, la aparente degradación específica de HYL1 dimérica en el experimento mostrado en la Figura 13A puede reflejar el estado dimérico preferencial de la proteína en el citoplasma. Experimentos adicionales, especialmente cuando se identifique la proteasa que degrada a HYL1, serán necesarios para entender los mecanismos involucrados en la degradación citoplasmática de HYL1.

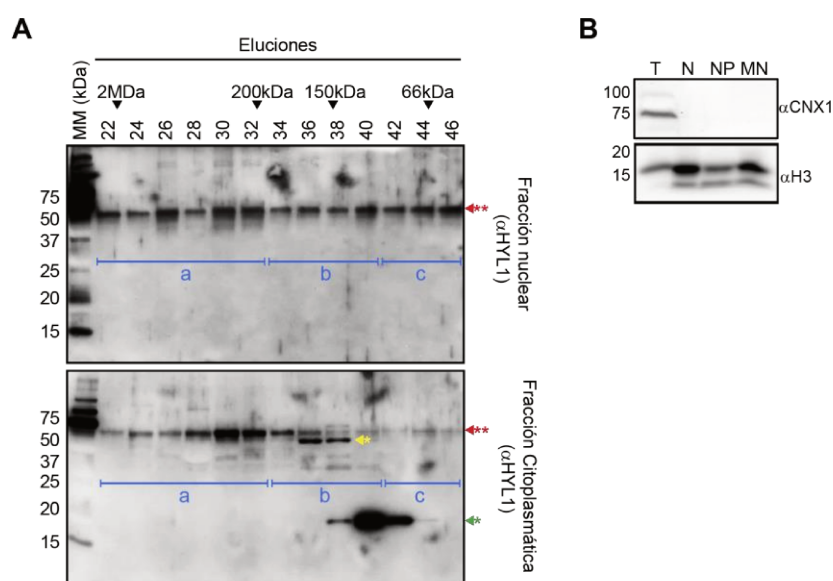


Figura 13. (A) Cromatografía de exclusión molecular de HYL1 en fracciones nuclear (superior) y citoplasmática (inferior). Los súper-complejos de HYL1, HYL1 dimérica y monomérica están señalados como a, b y c, respectivamente. Dos asteriscos rojos indican la versión completa de HYL1. Un asterisco verde indica productos N-terminales del clivaje de HYL1. Un asterisco amarillo indica productos C-terminales del clivaje de HYL1. (B) *Western blots* para analizar la pureza del fraccionamiento celular. El anticuerpo contra la HISTONA3 (H3) se usó para confirmar la fracción nuclear, y para la citoplasmática un anticuerpo contra CO-FACTOR FOR NITRATE REDUCTASE AND XANTHINE DEHYDROGENASE 1 (CNX1). En el gel se cargaron muestras del extracto crudo total (T), nuclear (N), nucleoplasma (NP) y membrana nuclear (MN). Realizado en colaboración con el laboratorio del Prof. Yang.

8.4 La distorsión del balance entre las isoformas de HYL1 altera las respuestas de crecimiento de las plantas a condiciones de luz, sombra u oscuridad

La acumulación del pool fosforilado de HYL1 (isoforma inactiva) en oscuridad y sombra, así como su rápida desfosforilación para restaurar la actividad proteica luego de la exposición a luz blanca, sugiere que la dinámica de las isoformas de HYL1 podría ser importante para el control del crecimiento de la planta durante la de-etiolación y en el síndrome de huida de la sombra. Para evaluar esto utilizamos las mímicas no fosforilables de HYL1 en los siete codones de serina fosforilables (S>A) y en las serinas individuales (S42A y S159A), clonadas bajo el control del promotor constitutivo 35S y la región reguladora de *HYL1*. Como estas isoformas no pueden ser fosforiladas, las plantas transformadas con estas construcciones carecen del pool de reserva de proteína luego de periodos prolongados de oscuridad (Figura 9B). Como control se utilizaron plantas salvajes (Col-0) y plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con la versión nativa de HYL1 (WT).

Usando estas plantas seguimos una respuesta típica del proceso de de-etiolación, la apertura de los cotiledones en plántulas etioladas transferidas desde oscuridad total a luz blanca [187]. Las líneas que expresan las mímicas de HYL1 S>A y S159A abrieron los cotiledones a una menor velocidad que las plantas control, al medirlo tanto como el número de plántulas con cotiledones abiertos (apertura de los cotiledones > 10°), como el ángulo de apertura a lo largo del tiempo (Figura 14). Las mímicas S42A, en las que tanto la fosforilación de la S159 y la formación del pool de reserva son posibles, se comportaron de forma similar a las plantas control (Figuras 14C y D). Estos resultados sugieren que la reserva de HYL1 inactiva en oscuridad, y posiblemente su rápida conversión en HYL1 activa al regresar la luz, son necesarias para una adecuada respuesta del programa de desarrollo en la transición de oscuridad a luz.

Luego investigamos si la degradación selectiva de la versión no fosforilada, activa, de HYL1 durante periodos prolongados de oscuridad/sombra es también fisiológicamente relevante. Para evaluar esta idea, germinamos plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con las diferentes variantes del gen *HYL1* en completa oscuridad y medimos la longitud del hipocotilo. En la naturaleza, cuando las semillas germinan por debajo de la superficie del suelo (y por lo tanto en oscuridad), el hipocotilo se elonga sustancialmente, empujando los cotiledones afuera del suelo para iniciar la fotosíntesis, por lo que resulta un buen parámetro para evaluar la respuesta a oscuridad [187]. La expresión de *HYL1* en su versión original, o las mímicas no fosforiladas, que son sensibles a la degradación, bajo el control del promotor constitutivo 35S o del promotor

nativo de *HYL1*, complementaron satisfactoriamente el fenotipo de *hyl1-2* y mostraron una elongación del hipocotilo normal (Figura 15).

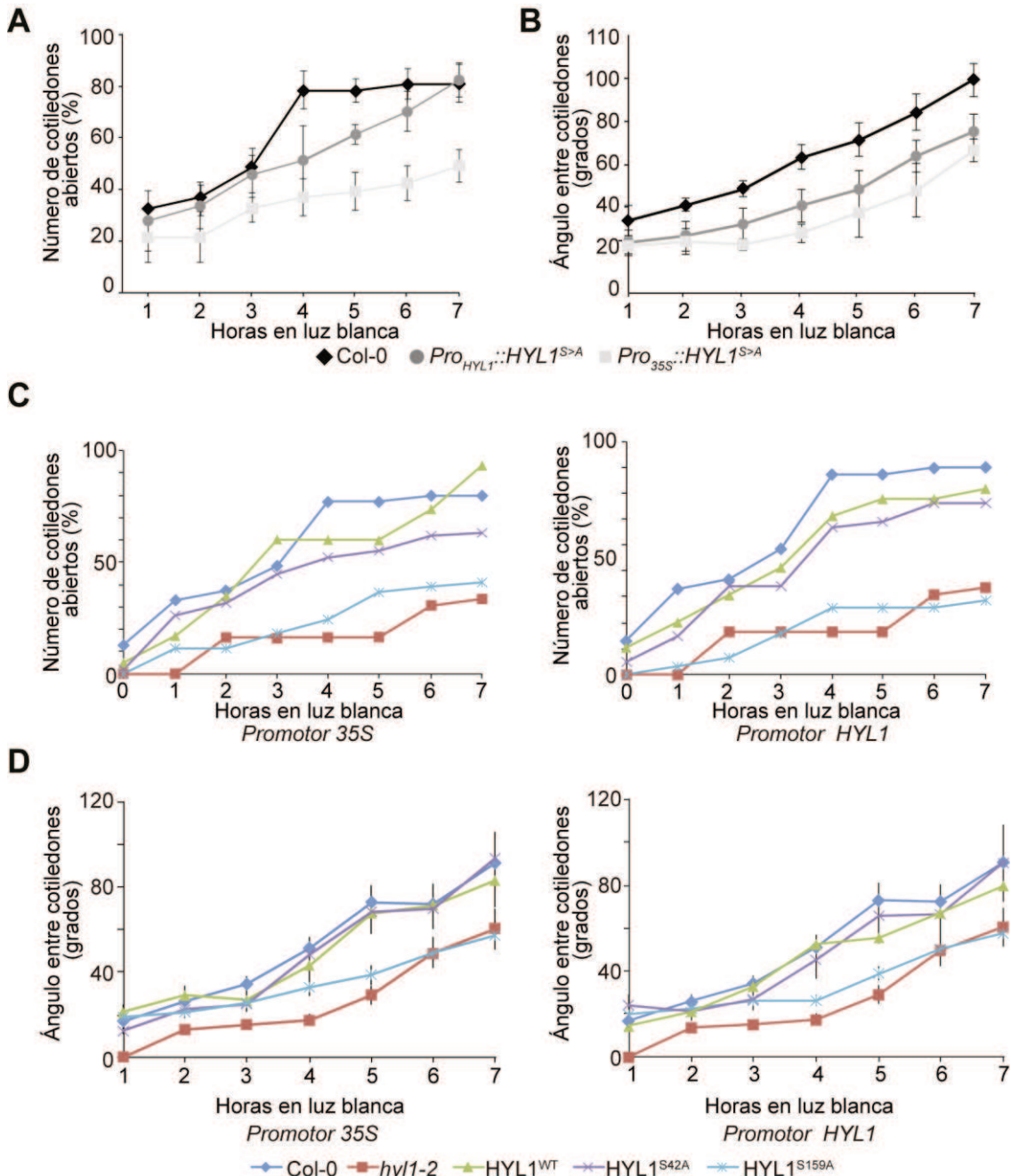


Figura 14. Apertura de cotiledones de plantas salvajes (Col-0) y mutantes *hyl1-2* complementadas con versiones no fosforilables de HYL1 en las serina 42 y 159 (*HYL1^{S>A}*) (A, B), o en las serinas individuales (*HYL1^{S42A}*, *HYL1^{S159A}*), la versión salvaje de HYL1 (*HYL1^{WT}*) (C, D), bajo el promotor nativo (*Pro_{HYL1}*) y el promotor constitutivo 35S (*Pro_{35S}*). Los valores se encuentran representados como ángulo entre los cotiledones y como número de cotiledones abiertos (ángulo de apertura > 10°) por hora de exposición a la luz, luego de 3 días en oscuridad. En todos los casos, las barras de error muestran 2xSEM. Fueron considerados significativos los valores $p < 0,05$ en el test t con la corrección de Bonferroni.

En contraste, las líneas que expresaban las fosfo-mímicas S159D, que es particularmente resistente a la degradación (Figura 9B), pero no puede ser desfosforilada para activar la proteína, mostraron hipocotilos más cortos (Figura 15), sugiriendo que la degradación de HYL1 es requerida para una escotomorfogénesis adecuada. Las fosfo-mímicas S42D y S159D, que son inactivas [144], también fallaron en complementar el fenotipo de *hyl1-2* (Figura 15 y [142]). Por lo tanto, el crecimiento normal del hipocotilo en oscuridad requiere la acumulación de un nivel mínimo de proteína activa.

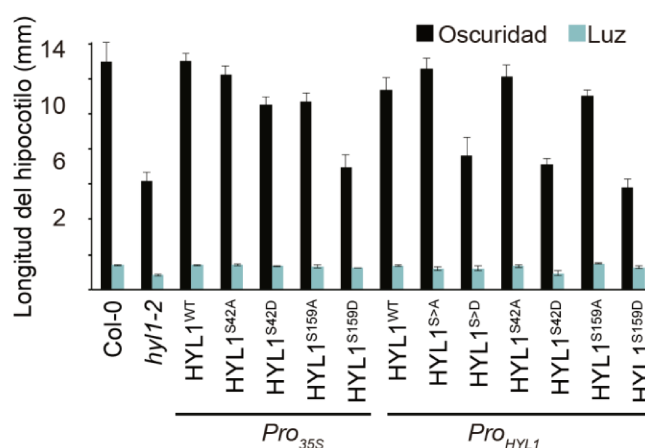


Figura 15. Longitud de hipocotilos de plántulas de 4 días germinadas en oscuridad o luz. S>D/A indica la mutación de 7 codones de serina en *HYL1* por alanina o ácido aspártico, respectivamente [144]. S42A/D o S159A/D indica la mutación individual de las serinas 42 o 159. Las fosfo-mímicas de HYL1 fueron clonadas bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (Pro_{35S}) o la región reguladora de *HYL1* (Pro_{HYL1}). HYL1 fusionada al receptor de glucocorticoide (HYL1-GR). Las barras de error muestran 2xSEM. Los valores $p < 0,05$ en el test-t con la corrección de Bonferroni fueron considerados significativos.

Mientras estos resultados son consistentes con un rol de la degradación de HYL1 en oscuridad, también podrían ser interpretados en términos de un requerimiento de una mínima actividad de HYL1 en oscuridad, y la versión fosfo-mimética S159D de HYL1 es incapaz de proveer esta actividad. Por lo tanto, con el objetivo de evitar la degradación citoplasmática de HYL1, sin afectar la actividad proteica, a fin de conservar un pool activo de la proteína en el núcleo durante la oscuridad, hicimos uso nuevamente de la fusión de HYL1 a GR. Mientras que en las plantas control el GR fusionado a HYL1 mantiene a esta proteína en el citoplasma, en las plantas tratadas con dexametasona (DEX), la fusión proteica transloca al núcleo, confinándola en este compartimento y por lo tanto evitando su degradación en los periodos de privación de luz. Debido a la actividad nuclear de HYL1, es de esperar que las plantas transgénicas HYL1-GR tengan

mayor actividad de HYL1 cuando son tratadas con DEX que las plantas control. En plántulas de 10 días, que fueron transferidas a oscuridad o sombra, encontramos niveles mayores de miR319 bajo dicha condición que en las plantas control (Figura 16A). Los niveles del miR168, normalmente no afectados por la mutación en *HYL1*, no mostraron ninguna fluctuación entre las condiciones evaluadas (Figura 16B). Adicionalmente, la cuantificación de los niveles proteicos de HYL1 en las mismas muestras confirmó la eficiencia del tratamiento con DEX para proteger, al menos parcialmente, a HYL1 de la degradación (Figura 16C).

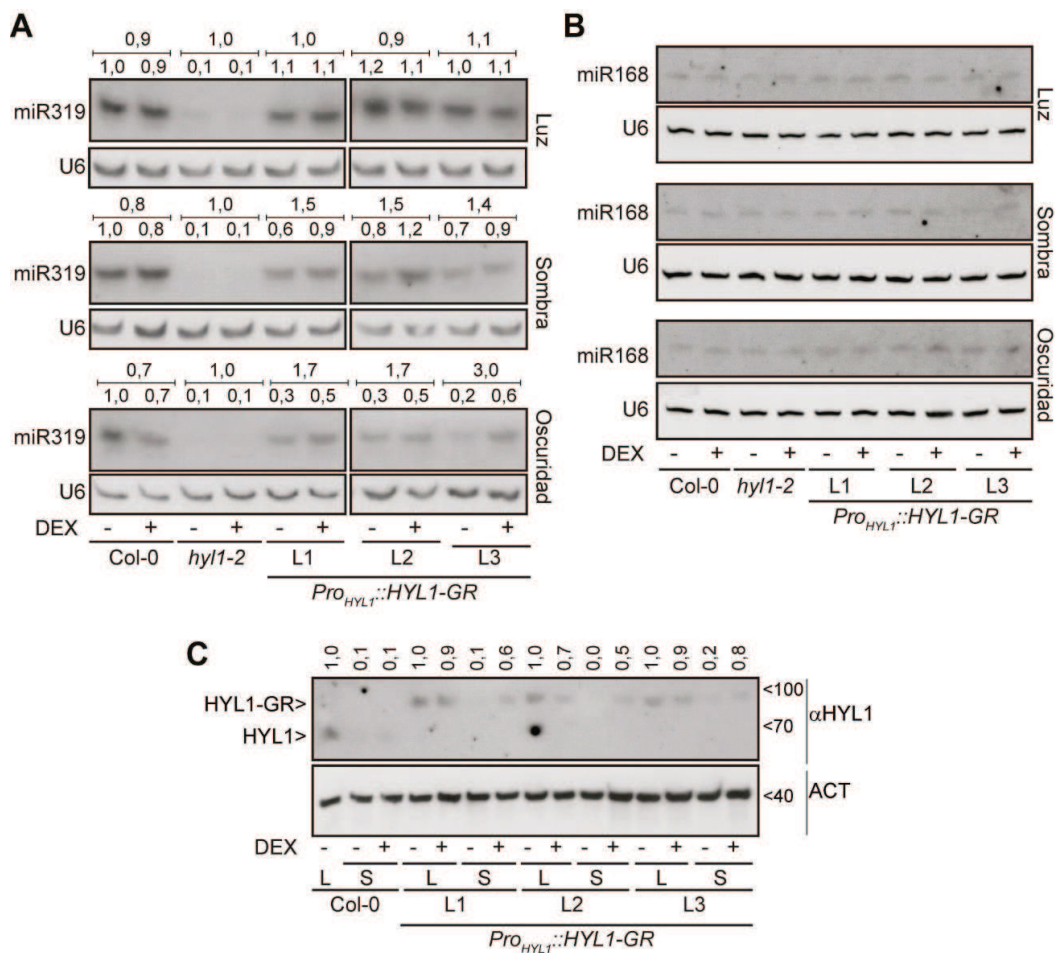


Figura 16. (A, B) *Small RNA blots* para la detección del miR319 (A) y miR168 (B) en plantas crecidas en DL transferidas a luz, sombra u oscuridad, y tratadas con dexametasona o solución control. La hibridación con U6 fue utilizada como control de carga. En la línea superior de cada panel se expresan los valores de la relación de intensidad entre las muestras tratadas y el control. Se muestran tres líneas transgénicas independientes (L1-L3). (C) Cuantificación por *western blot* de HYL1 en las mismas muestras. Se muestran las plantas transferidas a luz (L) o sombra (S). La intensidad de la señal, medida con ImageJ [164], se muestra relativa a cada línea: crecida en luz, tratada, y control. A la derecha se señalan los pesos moleculares.

Las semillas transgénicas, y sus contrapartes salvajes, fueron germinadas en oscuridad en medio de crecimiento con o sin DEX, y una vez más la respuesta de las plantas a la privación de luz fue medida como la longitud del hipocotilo. Las plantas HYL-GR tratadas con el análogo al esteroide presentaron hipocotilos más cortos que las plantas control (Figura 17A), reforzando la idea de que una degradación activa de HYL1 no fosforilada es requerida para una escotomorfogénesis normal.

Adicionalmente, analizamos si la degradación de HYL1 tiene también una participación activa en la respuesta de las plantas a la sombra, conocida como *shade avoidance*. Para escapar al sombreado, la planta dirige su crecimiento en dirección a la luz. Una de las formas de lograrlo es mediante la hiponastía de hojas, es decir, las mismas se elevan cerrando el ángulo entre ellas debido a un crecimiento aumentado de las capas de células abaxiales [188]. Por lo tanto, medimos este parámetro en plantas expuestas a sombra prolongada. En concordancia con los resultados obtenidos en oscuridad, las plantas transgénicas HYL1-GR tratadas con DEX presentaron una hiponastía de hojas retrasada comparada con las plantas no tratadas (Figura 17B).

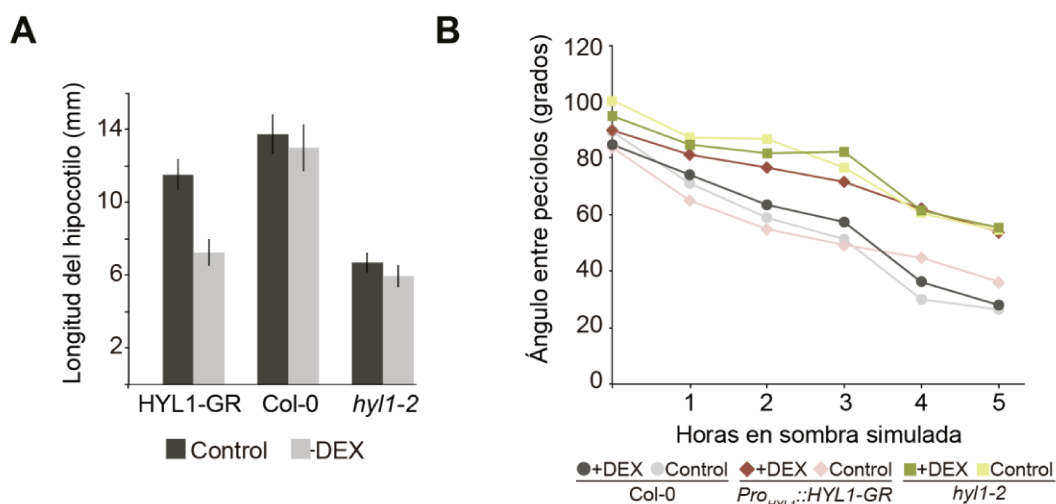


Figura 17. (A) Longitud de hipocotilos de plántulas de 4 días germinadas en oscuridad con (+DEX) o sin (Control) dexametasona. (C) Ángulo de cierre de los pecíolos, entre las hojas 1 y 2, en función del tiempo luego de transferir plántulas de 15 días desde fotoperíodo de DL a sombra simulada en plantas tratadas (+DEX) o sin (Control) dexametasona.

8.5 La regulación de HYL1 mediada por la calidad de luz impacta en la producción de miARNs, afectando la expresión de genes importantes para el desarrollo

Nuestros resultados muestran que un armonioso balance entre la degradación y la reactivación de HYL1, mediado por cambios en su estado de fosforilación, es necesario para que las plantas puedan responder eficientemente a periodos prolongados de oscuridad/sombra, y a la transición entre estas condiciones y la luz. Como HYL1 es un factor central en la biogénesis de miARNs, y un gran número de blancos de miARNs controlan el desarrollo de la planta, decidimos investigar las alteraciones moleculares tanto a nivel de transcritos como de miARNs asociadas con los fenotipos estudiados.

Analizamos la población de miARNs y blancos de los mismos mediante secuenciación masiva de ARNs mensajeros (*RNAseq*) y ARNs pequeños (*smallRNAseq*) durante la transición de oscuridad a luz. A fin de generar las librerías a ser secuenciadas, plantas salvajes Col-0 y mutantes *hyl1-2* fueron crecidas por 10 días en fotoperiodo de DL (16 horas de luz/8 horas de oscuridad), y luego transferidas a oscuridad o dejadas en el mismo fotoperiodo por 72 horas más.

La secuenciación de ARNs pequeños reveló una drástica reducción en la acumulación de miARNs en respuesta a oscuridad, mientras que la población general de otros ARNs pequeños mapeando el genoma de *Arabidopsis* no se vieron afectados (Figuras 18A y 18B). Notablemente, la reducción general en los miARNs observada en plantas expuestas a periodos prolongados de oscuridad es comparable con el impacto de la mutación *hyl1-2*.

Para este análisis colapsamos los miembros de familias de miARNs con secuencia idéntica. Entre las 145 familias de miARNs evaluadas, 105 estaban por encima del umbral de expresión mínimo y fueron incluidas en el análisis. Detectamos una reducción significativa en 34 miARNs, que representa un 32,4% de las familias de miARNs analizadas. Además, cuando comparamos las familias diferencialmente expresadas entre Col-0 luz/Col-0 oscuridad y Col-0/*hyl1-2* luz hubo una superposición significativa de los miARNs regulados (Figura 18C). Este resultado indica una marcada similitud en la población de miARNs observados en una planta salvaje adaptada a oscuridad, en la cual HYL1 es degradada activamente, y una mutante nula para dicha proteína.

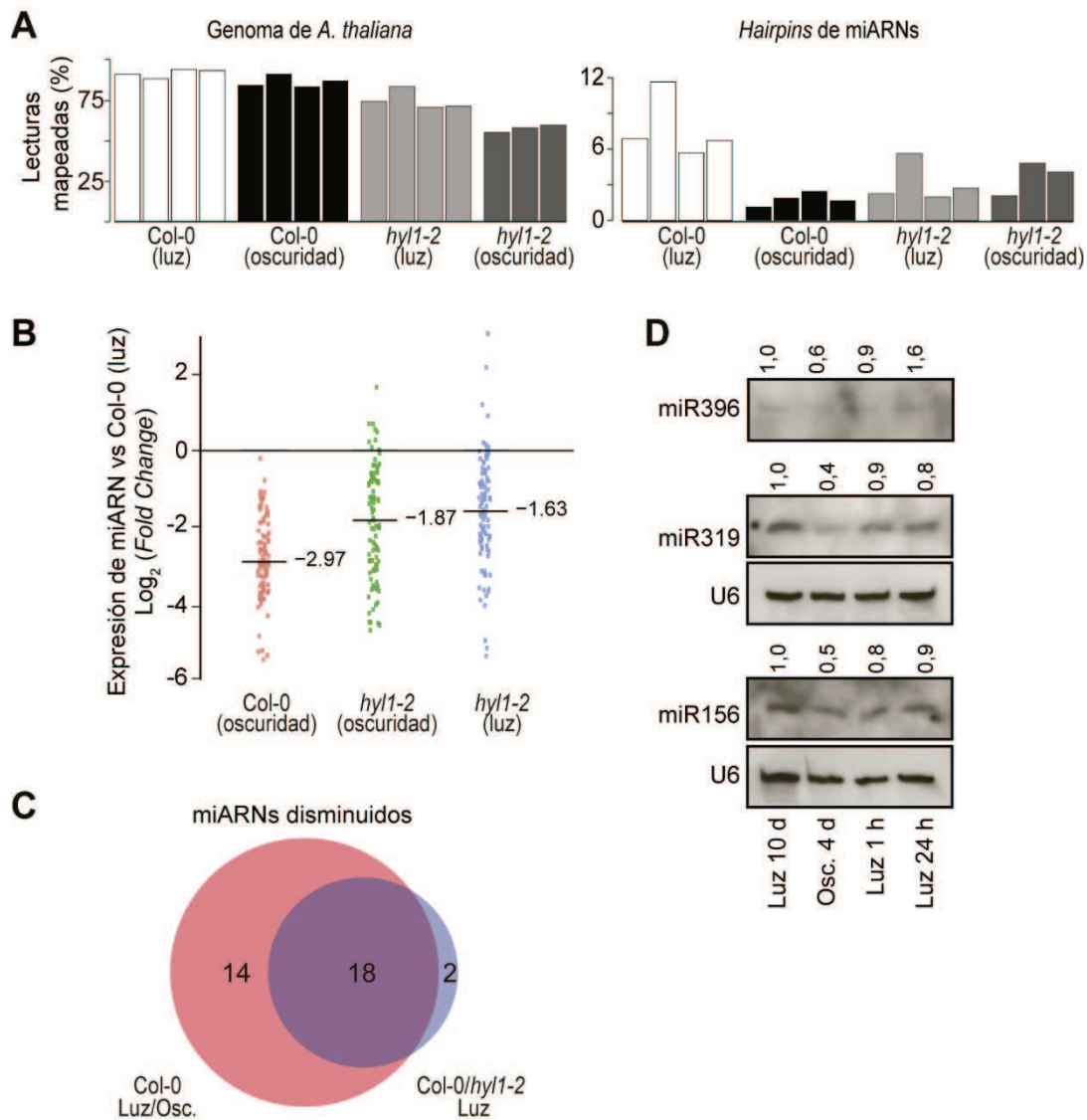


Figura 18. (A) Porcentaje de lecturas de la secuenciación de ARNs pequeños que mapean al genoma de *Arabidopsis* (izquierda) y a los *hairpins* de miARNs (derecha). Cada barra representa una réplica biológica. (B) Niveles de expresión medios de miARNs individuales en plantas Col-0 crecidas en oscuridad y en mutantes *hy1-2* crecidas en luz y oscuridad, respecto a plantas Col-0 crecidas en luz. Los segmentos horizontales indican la mediana de los niveles de expresión. Cada punto corresponde a un miARN individual o una familia de miARNs de secuencias idénticas. (C) Diagrama de Venn presentando la superposición de miARNs disminuidos en plantas Col-0 crecidas en luz vs oscuridad, contra aquellos regulados en plantas Col-0 vs *hy1-2* crecidas en luz. (D) Niveles de miARNs medidos por *small RNA blots*, con U6 como control de carga. La intensidad de la señal fue calculada con ImageJ [164] y normalizada a las U6. Se muestra la expresión relativa con plantas de 10 días crecidas en DL (Luz 10 d) como referencia. Después de 10 días, las plantas fueron transferidas a oscuridad por 4 días (Osc. 4 d) y luego retornadas a luz por 1 o 24 horas (luz 1 h y luz 24 h).

Aunque HYL1 sea un factor central en la biogénesis de miARNs, y su degradación en oscuridad explicaría la reducción de miARNs observada, no podemos descartar que la oscuridad *per se* tenga un efecto represivo sobre la expresión de los genes que codifican miARNs. Para descartar esta posibilidad evaluamos nuestros datos de *RNAseq* y encontramos que la gran mayoría de transcritos de pri-miARNs no se encuentran alterados en las plantas crecidas en oscuridad. Solo unos pocos, tal como los pri-miR159b, pri-miR163, pri-miR157c, estaban inducidos en oscuridad, mientras que el pri-miR172 fue el único reprimido en esta condición.

Por otro lado, al igual que la mutante *hyl1-2*, no todos los miARNs se encuentran reducidos significativamente en las plantas sometidas a oscuridad (Tablas 3-8 del Anexo 2). Recientemente se ha demostrado que en ciertas condiciones ambientales las plantas pueden producir miARNs aun en ausencia de cofactores esenciales [189]. De la misma manera, sabemos que los miARNs que comúnmente controlan el desarrollo de plantas son particularmente susceptibles a los niveles y actividad de HYL1. En nuestros experimentos las familias de miARNs más notoriamente reprimidas en oscuridad incluyen a miR159a, b (que regulan a los factores de transcripción MYB), miR319a-c (que regulan los factores de transcripción TCP), miR390a, b (que regulan TAS3>ARF) y miR396a (que regula GRF), todos ellos conocidos por ser importantes para el desarrollo de la planta, incluyendo la elongación del hipocotilo [190]–[193]. Para confirmar los resultados obtenidos por *smallRNAseq*, realizamos *small RNA blots*, validando la represión de dichas familias de miARNs en oscuridad (Figura 18D).

Cuando analizamos los datos de *RNAseq*, encontramos que más del 46% de los genes regulados por oscuridad en Col-0 también están regulados por oscuridad en la mutante *hyl1-2* (Figura 19A). Esto indica que además de la influencia causada por los miARNs, las condiciones de oscuridad tienen grandes efectos en el transcriptoma. Sin embargo, cuando comparamos los genes regulados por oscuridad en plantas salvajes (Col-0 Luz/Osc) con los transcritos regulados por HYL1 independientemente de la oscuridad (Col-0 Luz/*hyl1-2* luz) observamos una superposición significativa de genes regulados, 16,9%, que es más de lo esperado por azar (valor p en el test de Fisher = $2,2 \times 10^{-16}$, Figura 19B). Estos resultados son consistentes con el requerimiento de una reducción de los niveles de miARNs durante periodos largos de oscuridad, para modelar la respuesta a nivel transcripcional.

Cuando repetimos el mismo análisis, pero enfocándonos solo en los genes blancos de miARNs conocidos, la superposición se volvió aún más evidente, alcanzando el 30,8% de los genes regulados (valor p en el test de Chi cuadrado < 0,1, Figura 19C). Entre los mismos, aparecieron genes que son importantes para el desarrollo de la

planta, como TCP4, 2, y 10, ARF8 y 16, GRF2, 4 y 7 y MYB33 (Tablas 8-13 del Anexo 3). Análisis de RT-qPCR confirmaron la regulación positiva de estos factores de transcripción durante periodos de oscuridad, probablemente debido a la reducción de los miARNs que los mantienen silenciados (Figura 19D). Luego de la restauración de luz, la desfosforilación del pool de reserva de HYL1 reactiva la producción de miARNs, restaurando el silenciamiento (Figura 19D) para permitir el cambio entre los programas de desarrollo durante la transición de oscuridad a luz.

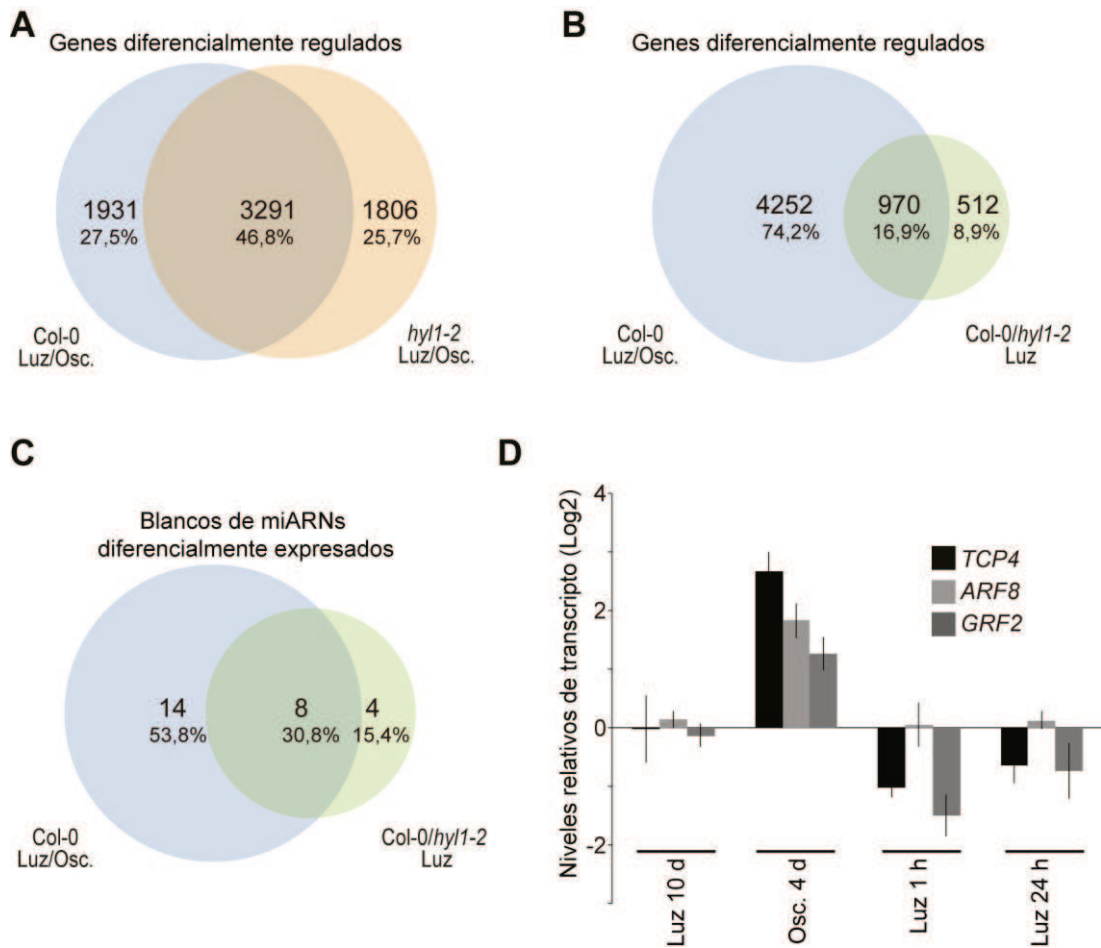


Figura 19. (A y B) Diagramas de Venn comparando genes diferencialmente expresados en función de la luz (A) o del genotipo (B) en plantas Col-0 y mutantes *hyl1-2*. (C) Diagrama de Venn comparando blancos de miARNs diferencialmente expresados en plantas Col-0 y mutantes *hyl1-2* en diferentes condiciones lumínicas. (D) Expresión de TCP4, ARF8 y GRF2, medidos por qRT-PCR, en plantas de 10 días crecidas en DL (Luz 10 d), luego transferidas a oscuridad por 4 días (Osc. 4 d) y luego a luz por 1 (Luz 1 h) y 24 horas (Luz 24 h). Las barras de error representan 2xSEM.

Sorprendentemente, nos encontramos con un panorama diferente cuando analizamos la expresión de miARNs en la etapa inicial de de-etiolación, es decir, el

cambio que se da en plántulas de 5 días germinadas en oscuridad (5D), e irradiadas con luz blanca por uno (5D+1L) o tres días (5D+3L). En los *smallRN*seq de las dos réplicas biológicas analizadas, encontramos que el nivel de expresión de miARNs se altera ligeramente en las plántulas irradiadas con luz respecto de las etioladas (Figura 20A).

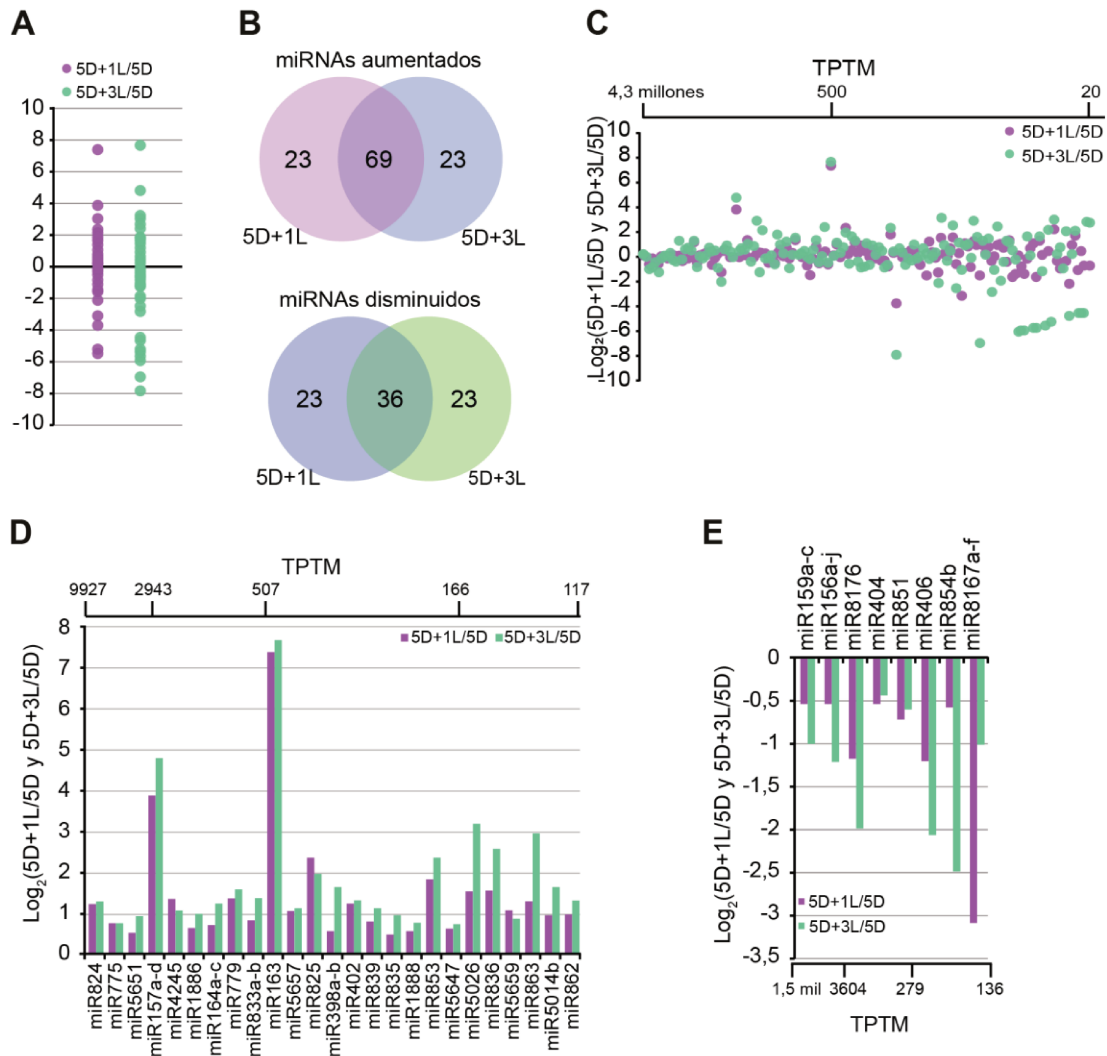


Figura 20. Análisis de secuenciación de ARNs pequeños en plántulas etioladas de cinco días (5D) y tratadas posteriormente con luz blanca durante 1 y 3 días (5D+1L y 5D+3L, respectivamente). (A) Nivel de expresión medio de miARNs. (B) Comparación de miARNs aumentados o disminuidos entre plántulas etioladas expuestas a 1 y 3 días de luz. (C) Perfil de expresión de miARNs totales (TPTM (*transcripts per ten million*) > 20). El eje x representa las frecuencias de lectura (TPTM) de miARNs. La relación de cambio ($\log_2\Delta$ TPTM) se muestra en el eje y. (D) miARNs altamente aumentados con frecuencias de lectura > 100. El 17% de los miARNs aumentaron con una tasa de cambio > 0,5 ($\log_2\Delta$ TPTM > 0,5). (E) miARNs altamente disminuidos con frecuencias de lectura > 100. El 5% de los miARNs disminuyó con una relación de cambio < -0,5 ($\log_2\Delta$ TPTM < -0,5). Realizado en colaboración por el laboratorio del Prof. Yang.

De los 151 miARNs con expresión por encima del umbral (20 TPTM, de inglés *transcripts per ten million*), alrededor del 60% tenía una expresión más alta en las plántulas irradiadas tanto por uno como por tres días con luz blanca, respecto a las que nunca fueron expuestas a luz (Figura 20B y C). Sin embargo, el aumento en la expresión fue muy bajo, con una relación de cambio menor a 0,5. Asimismo, los miARNs con niveles reducidos también mostraron una tasa de cambio baja, entre 0 y 0,5 (Figura 20C). Cuando filtramos los miARNs, considerando solo aquellos con recuentos de lecturas superiores a 100, solo el 17% aumentó por encima de 0,5 en las plántulas irradiadas con luz (Figura 20D), y el 5% mostró una disminución por debajo de -0,5 (Figura 20E). Por lo tanto, en la transición de escoto a fotomorfogénesis la mayoría de los miARNs no se alteran notablemente. En este análisis, realizado en colaboración con grupo del Prof. Seong Wook Yang, se encontró además que en dicha transición los niveles de pri-miARNs aumentan, y tanto DCL1, SE como HYL1, cuyos niveles proteicos se encuentran disminuidos en oscuridad, se estabilizan por la presencia de luz [194]. La acumulación de pri-miARNs, con la estabilización de los componentes principales de la maquinaria de biogénesis de miARNs, sin un cambio notorio en la acumulación de miARNs maduros, fue explicado por una disminución en la actividad de la maquinaria de procesamiento [194].

8.6 HYL1 se comporta como una *shuttling protein* nuclear-citoplasmática en respuesta a la transición de luz y oscuridad

Es sabido que HYL1 es una proteína nuclear, y en un estudio reciente se reportó que HYL1 es activamente importada al núcleo por KETCH1 (*Karyopherin Enabling The Transport Of The Cytoplasmic HYL1*) [147]. En coincidencia, pudimos registrar la translocación activa de HYL1-YFP hacia el núcleo usando análisis de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) (Figura 21A). Se obtuvieron dos constantes de velocidad de recuperación, K1 (rápida) y K2 (lenta). K1 corresponde a la translocación activa de HYL1-YFP hacia el núcleo, potencialmente mediada por KETCH1, mientras K2 corresponde a la difusión pasiva de HYL1-YFP (Figuras 21A-C). Considerando que la proteólisis de HYL1 tiene lugar en el citoplasma [148], y que es activamente importada al núcleo, la degradación inducida por oscuridad de HYL1 no fosforilada podría ser explicada si HYL1 es una “*shuttling protein*” nuclear-citoplasmática con una capacidad activa de salir de núcleo.

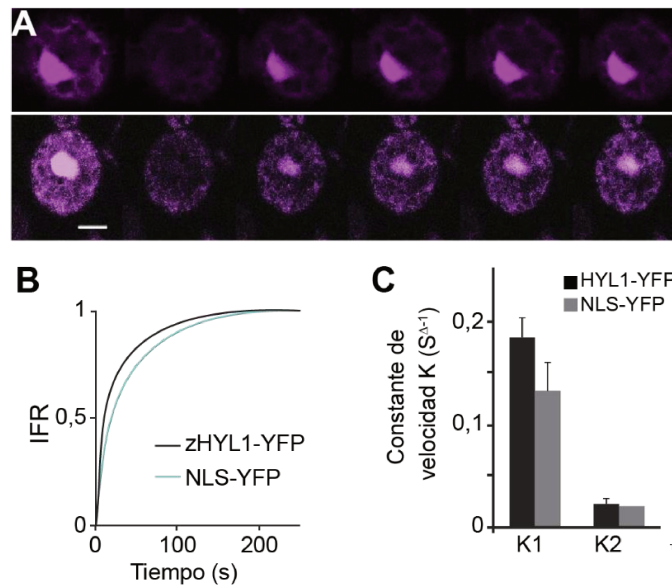


Figura 21. (A) Análisis de FRAP en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* expresando HYL1-YFP o NLS-YFP. Se muestra una selección de secciones ópticas seriales empezando desde la fluorescencia previa al *bleaching*, el núcleo completamente blanqueado y la recuperación de fluorescencia nuclear en el tiempo (las fotos muestran intervalos de 5 segundos). La barra de escala representa 10 μm . (B) Se calculó la Intensidad de Fluorescencia Relativa (IFR) del núcleo y se ajustó la curva para cada núcleo para obtener las constantes de tasa de recuperación promedio K1 y K2 (s^{-1}). (C) Curvas de recuperación normalizadas calculadas a partir del promedio Y_0 , *plateau*, y % de componentes K1 rápidos de NLS-YFP y HYL1-YFP. Realizado en colaboración por el laboratorio del Prof. Yang.

En este sentido, mediante un análisis bioinformático de la secuencia proteica de HYL1 se pudo detectar la presencia de una putativa señal de exportación nuclear (NES) entre los aminoácidos 79 y 92 (LRELAKSSELSQCV) (Figura 22A). A fin de investigar si la secuencia NES facilita la exportación citoplasmática de HYL1, se creó una versión de HYL1 (HYL1^{mNES}-YFP) que contiene dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia NES, cambiando dos codones de leucina (necesarios para el transporte activo hacia el citoplasma [195]) por alanina (L82A, L88A) (Figuras 22A-B). Mediante ensayos de FLIP (*Fluorescence Loss After Photobleaching*), investigamos la transferencia citoplasmática de HYL1-YFP, HYL1^{mNES}-YFP, y NLS-YFP como control. Para el experimento, una proporción mayoritaria del citoplasma fue continuamente blanqueado en oscuridad usando un laser, y se midió la pérdida de intensidad de fluorescencia de HYL1-YFP en el núcleo como medida de movimiento hacia el citoplasma de la proteína (Figura 22C). Se obtuvieron dos componentes de decaimiento (K1 y K2) para HYL1-YFP y HYL1^{mNES}-YFP, consistente con un transporte activo, mientras NLS-YFP solo mostro una sola componente de decaimiento (K2) (Figura 22C). La constante K1 de HYL1 mostró una

exportación nuclear activa y rápida. La velocidad de exportación nuclear de HYL1^{mNES}-YFP fue significativamente más lenta ($p < 0,05$), sugiriendo que las mutaciones en la NES dificultaron la exportación de HYL1 al citoplasma bajo condiciones de oscuridad (Figura 22D).

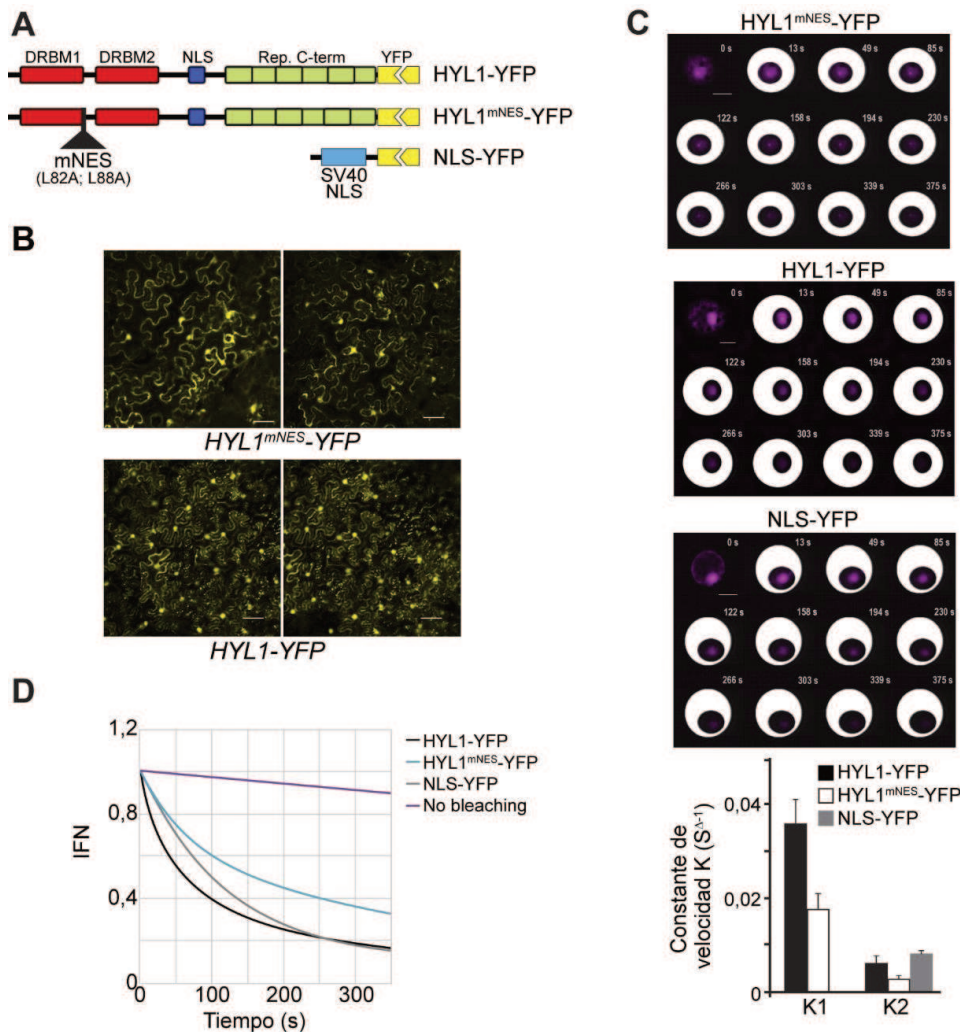


Figura 22. (A) Representación gráfica de las construcciones de HYL1-YFP, HYL1^{mNES}-YFP y NLS-YFP. (B) Localización subcelular de HYL1-YFP y HYL1^{mNES}-YFP. (C) Análisis de FLIP de HYL1-YFP, HYL1^{mNES}-YFP y NLS-YFP en protoplastos de *Arabidopsis*. Una gran área citoplasmática que encierra el núcleo fue fotoblanqueada continuamente, y se midió la intensidad media en el núcleo a lo largo del tiempo. El montaje muestra la pérdida de fluorescencia en el núcleo con el tiempo. Las barras de escala representan 10 μ m. Se sustrajo la intensidad de fluorescencia de fondo a la del núcleo y se ajustaron las curvas de desintegración de cada núcleo usando GraphPad para obtener las constantes de velocidad K1 y K2 (s^{-1}) (panel inferior). NLS-YFP mostró una sola curva de decaimiento exponencial. Las barras de error muestran 2xSEM. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$ en una prueba t con corrección de Bonferroni. (D) Curvas de recuperación normalizadas calculadas del *plateau*, K1 y K2. Realizado en colaboración por el laboratorio del Prof. Yang.

La constante K2 no se alteró de manera significativa entre las proteínas evaluadas. Por otro lado, la similitud entre los valores de K2 de HYL1-YFP y NLS-YFP, indica que una fracción de HYL1 preferencialmente retenida en el núcleo, potencialmente la versión fosforilada, coexiste con un componente transportado activamente (Figura 22C). La cinética de exportación mostró que la exportación nuclear de HYL1-YFP alcanza una meseta dentro de los 350 segundos, mientras que HYL1^{mNES}-YFP podría alcanzarla eventualmente después de los 1500 segundos (Figura 22D). Esto sugiere que, aunque sea importante para la exportación nuclear, la NES no es el único componente que dirige dicho proceso. En línea con este resultado, un fraccionamiento nuclear/citoplasmático de plantas de 10 días mantenidas luego por 12 horas en luz u oscuridad mostró que la mutante HYL1^{mNES}-YFP logra ser exportada eventualmente al citoplasma y finalmente degradada (Figura 23A).

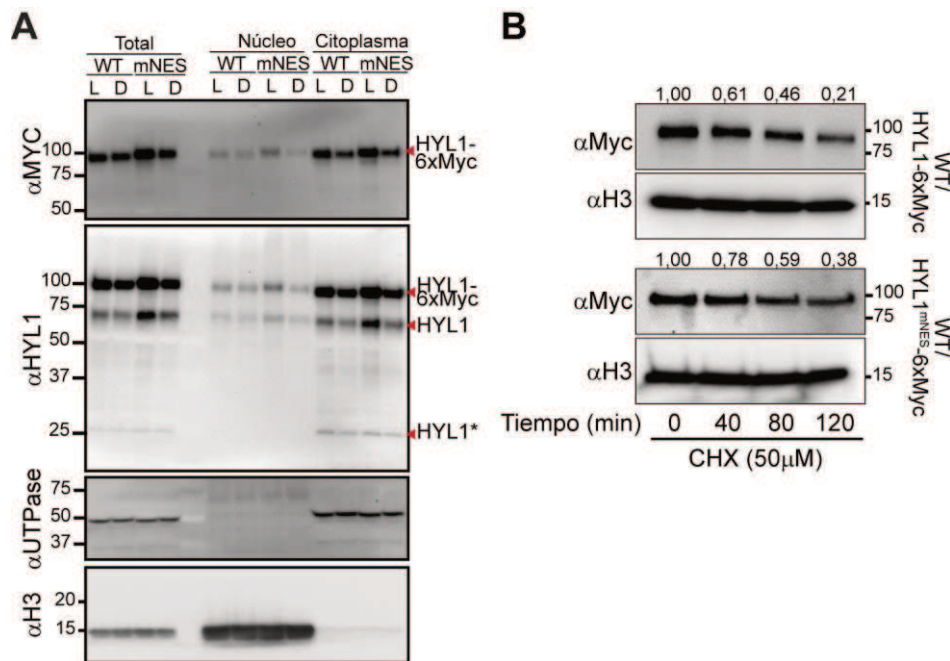


Figura 23. (A) Estabilidad proteica de HYL1-6xMyc y HYL1^{mNES}-6xMyc en respuesta a oscuridad detectada con un anticuerpo α -Myc o uno específico de HYL1. La fidelidad del fraccionamiento subcelular se confirmó con anticuerpos α -UTPasa y α -histona. Se recolectaron muestras de plantas transferidas a luz (L) u oscuridad (D) durante 12 horas. HYL1* indica los fragmentos escindidos N-terminales de HYL1 endógena, HYL1-6Myc y HYL1^{mNES}-6Myc. (B) Velocidad de degradación de HYL1-6xMyc y HYL1^{mNES}-6xMyc. Se incubaron plántulas transgénicas de diez días de edad en medio líquido MS con cicloheximida (CHX) 50 mM durante 15 minutos. Se tomaron muestras en los puntos de tiempo indicados y se determinaron con anticuerpo α -Myc. Realizado en colaboración por el laboratorio del Prof. Yang.

La degradación de esta versión HYL1^{mNES}, la cual es parcialmente retenida en núcleo, podría contradecir la hipótesis de que la retención nuclear de HYL1 fosforilada la protege de la degradación (Figuras 9B y 10). Sin embargo, las mutaciones en la NES solo disminuyeron la exportación de HYL1 al citoplasma, sin bloquearla por completo (Figura 22D). Para resolver esta discrepancia, realizamos un experimento de CHASE-ASSAY, que nos permite evaluar de manera más precisa la estabilidad de HYL1^{mNES} en un lapso de tiempo corto. El experimento mostró que, a pesar de ser degradada, la velocidad de degradación de HYL1^{mNES} es menor que la de su contraparte nativa (Figura 23B). Este resultado es compatible con la protección nuclear de HYL1 y la exportación nuclear-citoplasmática más lenta de HYL1^{mNES}. En este sentido, una construcción HYL1^{mNES}-6xMyc fue capaz de complementar el fenotipo morfológico de *hyl1-2* y la producción de miARNs, pero presentó hipocotilos más cortos que las plantas salvajes cuando fueron crecidas en oscuridad (Figura 24). Estos resultados fueron consistentes con el análisis de HYL1-GR y reforzaron la hipótesis de que una degradación citoplasmática eficiente de HYL1 es necesaria para una respuesta adecuada a la luz.

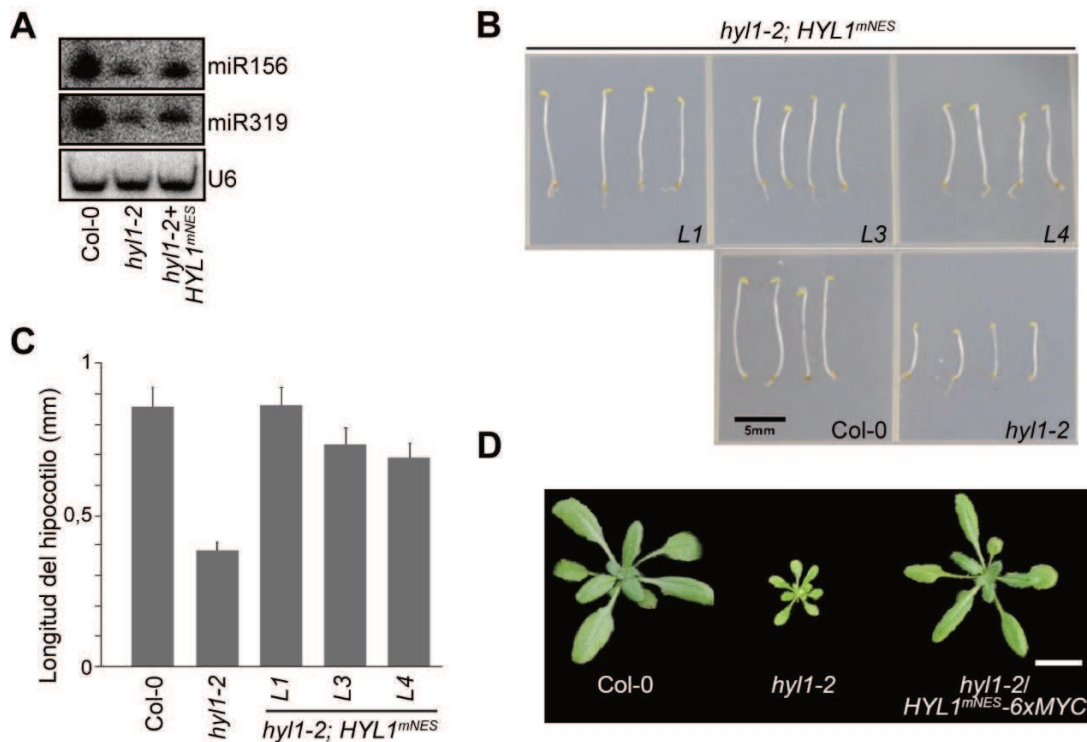


Figura 24. (A) *Small RNA blots* para la detección de miR156 y miR319, con U6 como control de carga, en Col-0, *hyl1-2* y *hyl1-2* complementada con la mutante HYL1^{mNES}. (B, C) Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas en oscuridad Col-0, *hyl1-2* y *hyl1-2* complementada con HYL1^{mNES}, medido a los 4 días. Se muestran tres líneas transgénicas independientes. (D) Fenotipo de la mutante *hyl1-2* complementada con HYL1^{mNES}-6xMyc, comparado con la mutante y la versión salvaje Col-0. Realizado en colaboración por el laboratorio del Prof. Yang.

8.7 La fosforilación del dominio C-terminal de HYL1 podría tener funciones reguladoras de la actividad de la proteína

A pesar de que ha sido demostrado que la ausencia del dominio C-terminal no compromete la actividad de HYL1 en la biogénesis de miARNs [143], con estudios de espectrometría de masas se encontró que el péptido EAAF~~G~~SVETEK, presente en cada una de las 6 repeticiones del dominio C-terminal de HYL1, es fosforilado [144]. Adicionalmente, al analizar la longitud de este dominio en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* (Col-0, C24, *Ler-1*), y especies relacionadas como *Arabidopsis lyrata* [196] y *Brassica napus* [197], se vio que la cantidad de repeticiones varían naturalmente [144]. Estas dos particularidades hacen suponer que la región C-terminal de HYL1, lejos de ser dispensable, podría cumplir funciones regulatorias. Basados en esta premisa, nos propusimos estudiar el efecto de la variación en el número de repeticiones y la fosforilación de este dominio sobre la actividad de HYL1.

En primer lugar, para evaluar si el número de repeticiones afecta naturalmente la degradación de HYL1, repetimos la cinética de DL/Osc con diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* cuyo dominio C-terminal varía en longitud. Por análisis de *western blot* pudimos confirmar el menor tamaño (sin determinar el número exacto de repeticiones) de HYL1 en otros ecotipos (Figura 25), como se había descrito por análisis de secuencia [144]. Además, en todos los casos observamos que HYL1 sigue siendo degradada cuando la planta percibe periodos largos de oscuridad independientemente del largo de la proteína, lo que sugiere la variación natural en el número de repeticiones no sería un factor adicional afectando la estabilidad proteica de HYL1 (Figura 25).

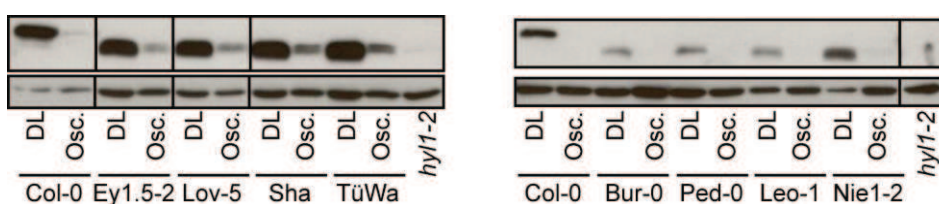


Figura 25. Análisis de degradación de HYL1 por *western blot* de diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Ey1.5-2/ICE228, Shahdara (Sha), Lövvik-5 (Lov-5), TüWa, Burren (Bur-0), Pedriza (Ped-0), Leo-1 y Niederreutin (Nie1-2)) crecidas por 10 días en día largo (DL) y mantenidas 5 días en oscuridad (Osc.).

Para analizar el efecto del número de repeticiones en HYL1 más allá de su variación natural, clonamos distintas versiones de HYL1 (denominadas HYL1 Δ) con deleciones sucesivas de las seis repeticiones que van desde ninguna repetición

(HYL1 Δ 6) hasta la secuencia codificante completa, pasando por cada una de las repeticiones (Figura 26). Además, obtuvimos clones en los que todas las serinas fosforilables de cada repetición se cambian por alanina o ácido aspártico (HYL1^{C-termS>A} y HYL1^{C-termS>D}, respectivamente). Dada la alta homología de secuencia entre cada repetición a nivel nucleotídico, estos clones fueron generados sintéticamente. Para sintetizar estos clones se tuvo que modificar la secuencia de nucleótidos para generar variación entre los dominios que permitan la síntesis, pero conservando la codificación de codones. Para verificar que el cambio a nivel nucleotídico no afecte la expresión de la proteína, incluimos un control adicional en el que los mismos nucleótidos son modificados en la versión salvaje de la proteína (HYL1^{C-termS>S}, Figura 26). Las construcciones fueron clonadas bajo la región reguladora de HYL1 (Pro_{HYL1}::HYL1 Δ /^{C-termS>S/A/D}) o bajo el promotor constitutivo 35S y fusionadas a eGFP (Pro_{35S}::eGFP-HYL1 Δ /^{C-termS>S/A/D}). Con ellas transformamos plantas mutantes *hyl1-2* y realizamos un análisis fenotípico (Figuras 27 y 28).

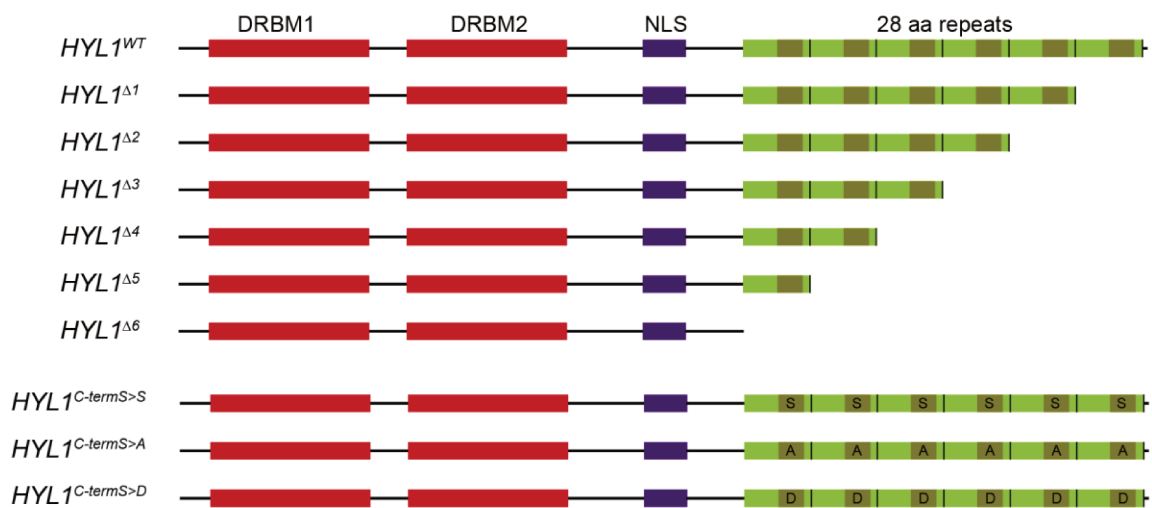


Figura 26. Distintas construcciones de *HYL1* utilizadas para evaluar el efecto del número de repeticiones y la fosforilación del dominio C-terminal sobre la funcionalidad de HYL1. Todas fueron clonadas bajo la región reguladora de HYL1 (Pro_{HYL1}::HYL1 Δ /^{C-termS>S/A/D}) o del promotor 35S y fusionadas a GFP en su extremo N-terminal (Pro_{35S}::eGFP-HYL1 Δ /^{C-termS>S/A/D}).

Evaluamos los fenotipos de las plantas transformadas con las diferentes construcciones a los 7, 10, 14 y 21 días de desarrollo, así como en plantas florecidas (Figuras 27 y 28). Las plantas transformadas con las construcciones Pro_{35S}::eGFP-HYL1 Δ /^{C-termS>A/D} y Pro_{HYL1}::HYL1 Δ mostraron una recuperación del fenotipo mutante *hyl1-2* tanto en estadios tempranos como tardíos del desarrollo, en condiciones estándar de crecimiento (ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 23°C) (Figura 27 y

28). Sin embargo, las plantas transformadas con las construcciones $Pro_{HYL1}::HYL1^{C-termS>A/D}$ mostraron algunas diferencias respecto a las versiones salvajes (Col-0 y *hyl1-2* transformada con $HYL1^{WT}$) (Figura 28). Específicamente, observamos que la construcción $Pro_{HYL1}::HYL1^{C-termS>D}$, que imita a HYL1 con el dominio C-terminal fosforilado en sus seis repeticiones, revierte solo parcialmente el fenotipo mutante en etapas tempranas del desarrollo pero lo hace completamente en etapas posteriores. Su contraparte desfosforilada, $Pro_{HYL1}::HYL1^{C-termS>A}$, por el contrario, muestra una recuperación del fenotipo en todos los estadios de desarrollo, aunque el tiempo de floración parece estar adelantado respecto a Col-0 (Figura 28). Estas diferencias sugieren que la fosforilación del dominio C-terminal podría tener efectos específicos en etapas tempranas del desarrollo de plantas. Por otro lado, la observación de que las plantas transformadas con $Pro_{35S}::eGFP-HYL1^{C-termS>A/D}$ complementan el fenotipo mutante, mientras sus contrapartes $Pro_{HYL1}::HYL1^{C-termS>A/D}$ muestran una complementación parcial, sugieren que el efecto regulatorio es dosis dependiente.

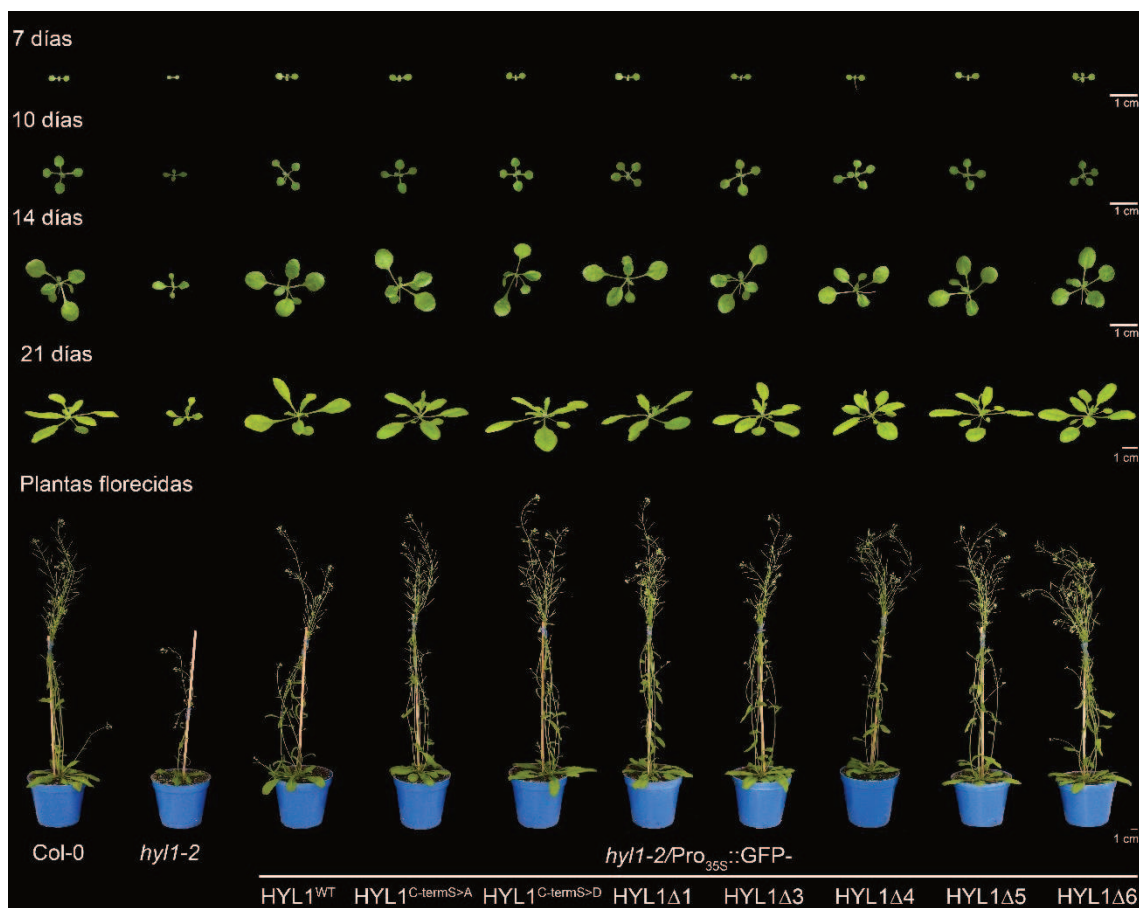


Figura 27. Evaluación fenotípica de plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con diferentes versiones de HYL1 bajo el control del promotor 35S y fusionadas a GFP ($Pro_{35S}::GFP-HYL1\Delta^{C-termS>A/D}$).

Dado que el dominio C-terminal de HYL1 representa una región de baja complejidad (LCD, del inglés *low-complexity domain*), que suelen ser asociadas a formación de organelas líquidas (como los D-Bodies) y a cambios en la localización subcelular [198]–[201], evaluamos la localización subcelular de cada versión de HYL1. Para esto infiltramos hojas de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens* transformados con las construcciones Pro_{35S}::eGFP-HYL1 Δ /^{C-termS>S/A/D}, y a los tres días observamos la fluorescencia en células abaxiales utilizando un microscopio confocal.

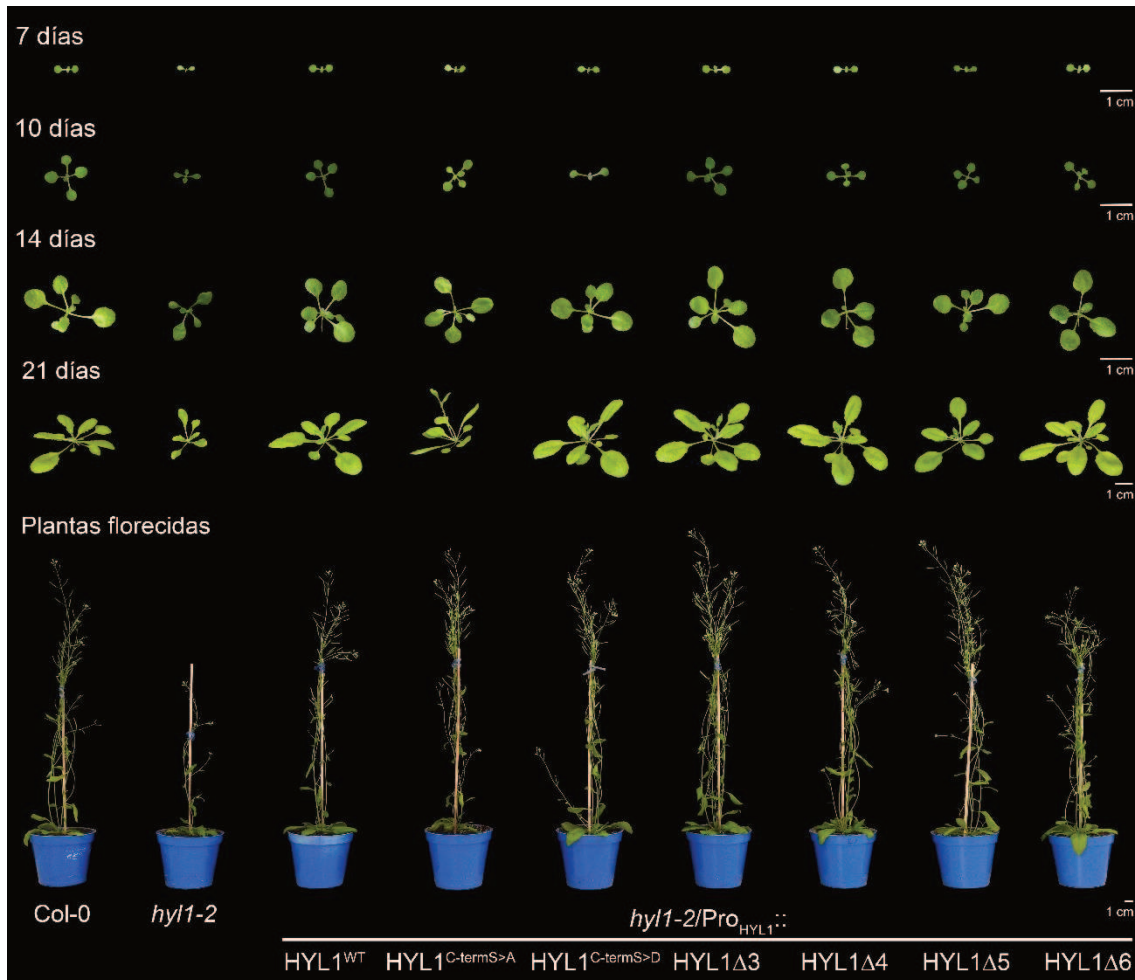


Figura 28. Evaluación fenotípica de plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con diferentes versiones de HYL1 bajo el control de la región reguladora de HYL1 (Pro_{HYL1}:HYL1 Δ /^{C-termS>A/D}).

Observamos que a medida que el número de repeticiones disminuye, la localización citoplasmática de HYL1 se hace cada vez más difícil de detectar, mientras en el núcleo la fluorescencia es cada vez más intensa, particularmente en el nucléolo (Figura 29). Incluso en el caso de HYL1 Δ 6, la observación requirió una reducción en la ganancia del detector del confocal (de 550 para la versión nativa, a 390 para HYL1 sin repeticiones) para poder obtener fotos sin saturación en el nucleolo. Adicionalmente, la

distribución dentro del nucleoplasma también se ve afectada. A medida que el número de repeticiones comienza a disminuir, encontramos con mayor frecuencia núcleos conteniendo cuerpos nucleares, posiblemente D-Bodies, de mayor tamaño y en gran cantidad, especialmente con la versión que no contiene ninguna repetición (HYL1 Δ 6) (Figura 29). Esto sugiere que la región C-Terminal de la proteína puede influenciar la distribución subcelular, e incluso sub-nuclear, de HYL1. Sin embargo, esta localización diferencial no parece afectar la participación de HYL1 en la biogénesis de miARNs, ya que observamos una complementación fenotípica de los defectos observados con la ausencia de HYL1 o con la fosforilación de los residuos S42 y S159 [144].

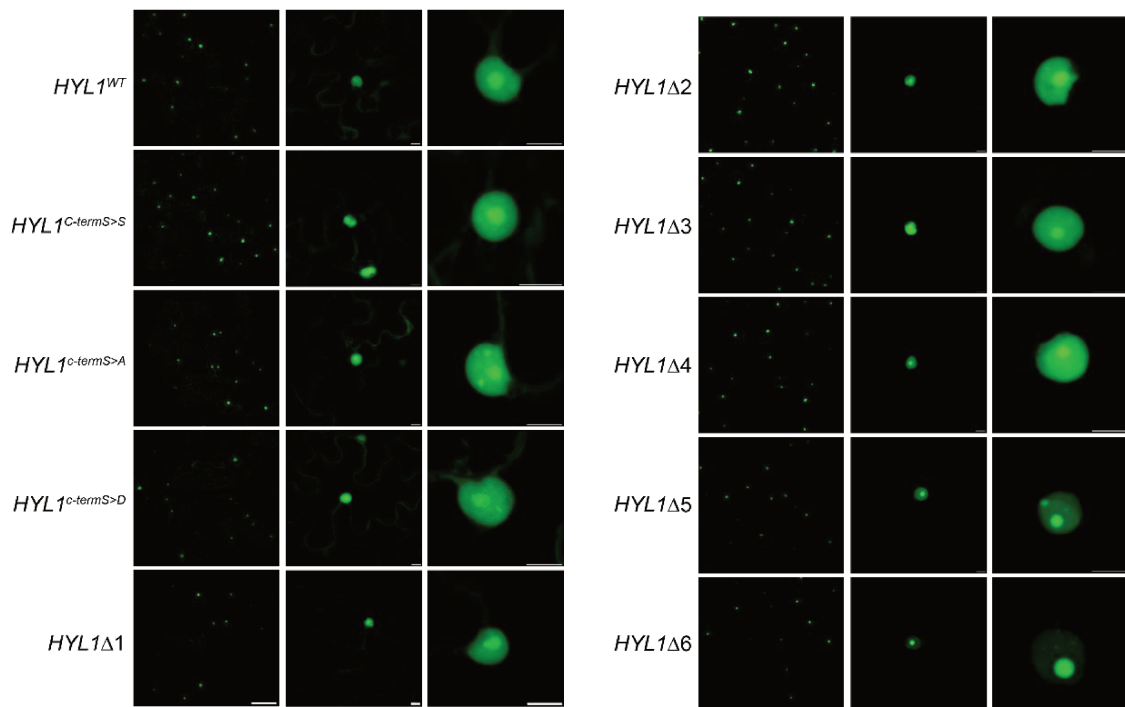


Figura 29. Localización subcelular de las distintas variantes en el dominio C-terminal de HYL1 fusionadas a GFP, en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las barras en las esquinas inferiores representan 100 μ m para la primera fila de imágenes, y 10 μ m para las dos restantes.

Excluyendo la variación natural del número de repeticiones entre plantas de *Arabidopsis*, la reducción de la cantidad de repeticiones en nuestros experimentos es artificial para plantas de ecotipo Col-0. Para evaluar si estos cambios en la localización representan un potencial escenario regulatorio relevante dentro de un ecotipo en particular analizamos la distribución subcelular de las versiones fosfo-miméticas del dominio C-terminal de HYL1. Como era de esperar, no observamos diferencias en la expresión y localización entre la versión HYL1^{WT} y HYL1^{C-termS>S}, por lo que el cambio en la secuencia de nucleótidos no parece afectar la expresión o localización de la proteína.

Cuando simulamos tanto el dominio C-terminal no fosforilable (HYL1^{C-termS>A}), como el fosforilado (HYL1^{C-termS>D}) no observamos cambios drásticos en la localización citoplasmática, y tampoco detectamos variaciones en la intensidad de fluorescencia de los núcleos (Figura 30A) ni en el perfil de fluorescencia dentro de ellos (Figura 30B).

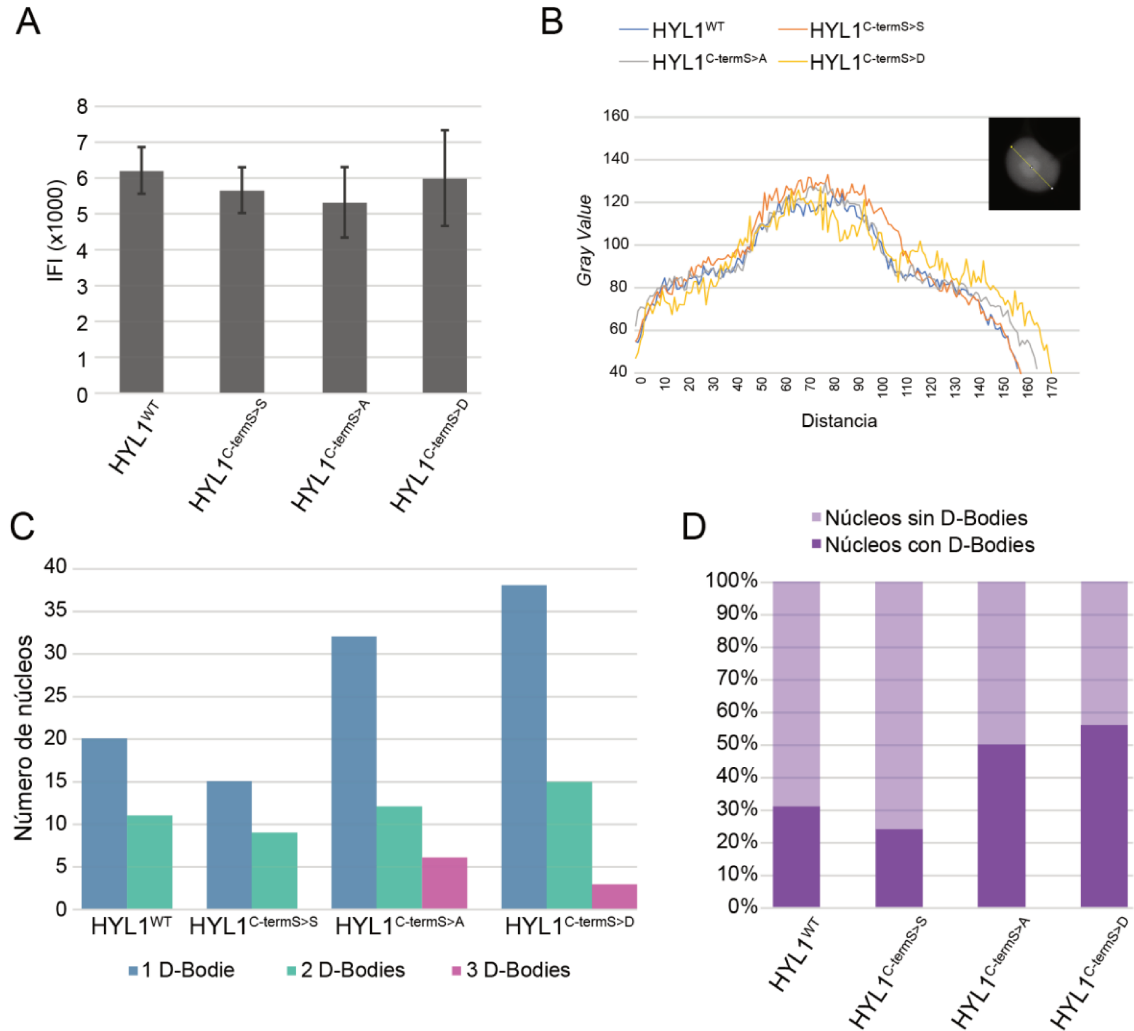


Figura 30. Caracterización de núcleos de células transformadas con la versión nativa de HYL1 (HYL1^{WT}), las versiones fosforilada y no fosforilada en el dominio C-terminal (HYL1^{C-termS>D} y HYL1^{C-termS>A}, respectivamente) y el respectivo control (HYL1^{C-termS>S}). (A) Intensidad de fluorescencia integrada (IFI) medida con ImageJ [164]. Las barras de error muestran 2xSEM. Los valores $p < 0,05$ en el test t con la corrección de Bonferroni fueron considerados significativos. (B) Perfil de fluorescencia medido como *Gray Value* a lo largo del núcleo, utilizando ImageJ. (C) Porcentaje de núcleos con y sin D-Bodies. (D) Cantidad de núcleos con uno, dos o tres D-Bodies.

Para evaluar la localización sub-nuclear observamos núcleos de células transformadas con las construcciones Pro_{35S}::eGFP-HYL1^{WT}, Pro_{35S}::eGFP-HYL1^{C-termS>S}, Pro_{35S}::eGFP-HYL1^{C-termS>A} y Pro_{35S}::eGFP-HYL1^{C-termS>D}, y registramos tanto el porcentaje de núcleos con D-Bodies visibles, como la cantidad de D-Bodies en aquellos

núcleos que los poseen. Nuevamente no observamos diferencias entre la versión nativa del gen (HYL1^{WT}) y la versión modificada a nivel nucleotídico (HYL1^{C-termS>S}). Curiosamente, encontramos que tanto con la versión fosforilada como con la no fosforilada hay una mayor frecuencia de núcleos con D-Bodies (Figura 30C), así como un mayor número de D-Bodies por núcleo (Figura 30D). Estos resultados sugieren que la fosforilación del dominio C-terminal podría regular a HYL1 de manera distinta a la observada para sus dominios DRBM1 y DRBM2, ya que la fosforilación de las S42 y S159, ubicadas estos dominios, impide la formación de D-Bodies detectados con HYL1 [144].

Es llamativo observar que tanto la fosforilación, como su estado opuesto, la desfosforilación, induzcan la formación de D-Bodies. Resultados recientes del laboratorio sugieren que existen dos tipos de D-Bodies [109]. Ambos contienen a HYL1, pero la función es potencialmente distinta. Mientras en un tipo, caracterizado por la presencia de CPL1, HYL1 actúa en el procesamiento de pri-miARNs, en el otro, que contiene a CARP9, HYL1 actuaría transfiriendo los miARNs maduros a la proteína AGO1 para la formación del RISC. En este escenario sería fascinante la idea que la fosforilación/desfosforilación de la región C-terminal de HYL1 permita la maduración de los D-Bodies entre ambas etapas de la vía. Resta definir en una próxima etapa de este proyecto si las dos variantes de fosforilación en el dominio C-terminal localizan en los mismos D-Bodies, o si podrían estar participando en diferentes etapas del procesamiento de miARNs.

En concordancia con la idea de que la fosforilación del dominio C-terminal podría tener un rol regulatorio sobre HYL1, cuando evaluamos la capacidad de sus variantes en el dominio C-terminal de interactuar con SE mediante un ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H), la única que falló en interactuar fue la mimica desfosforilada HYL1^{C-termS>A} (Figura 31). Debido a que HYL1^{WT/C-termS>S} no sería fosforilada en levaduras, esperaríamos encontrar que la versión HYL1^{C-termS>A} se comporte como la versión salvaje. Una posible explicación de la pérdida de interacción de esta variante podría ser un cambio drástico en la estructura terciaria de la proteína, que afecte el plegamiento del dominio DRBM2, que es el responsable de la interacción de HYL1 con otras proteínas y consigo misma ([104], [108], Figura 12B). Sin embargo, si esto fuese así, no deberíamos ver una reversión del fenotipo en las mutantes *hyl1-2* (Figuras 27 y 28). En consecuencia, la interacción de estas versiones con SE u otras proteínas asociadas a HYL1 debe ser evaluada mediante otra metodología, y especialmente *in planta*.

Resultados preliminares del laboratorio del Prof. Yang, en donde realicé una estancia corta de investigación, muestran que COP1, la E3 ligasa que protege a HYL1 de la degradación en el citoplasma en las horas de luz [185], además de interactuar con CRY1 [202], interacciona con HYL1, pero sólo en núcleo. A su vez, encontraron que HYL1 también interacciona con CRY1.

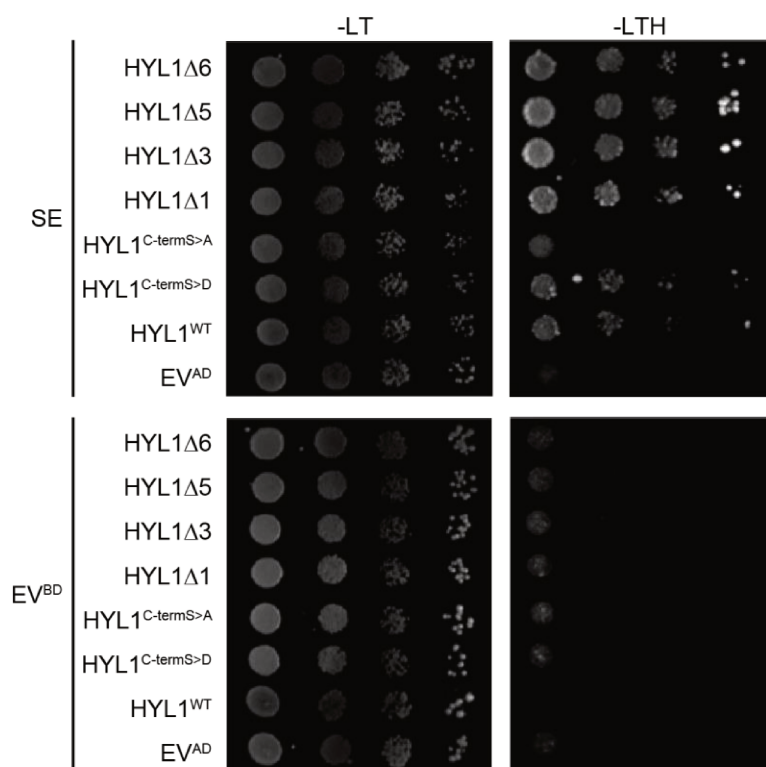


Figura 31. Ensayo de doble híbrido en levaduras para evaluar la interacción de distintas variantes de HYL1 en el dominio C-terminal (ver Figura 26) fusionadas al dominio de activación de GAL4 (AD), con SERRATE (SE) fusionada al dominio de unión de GAL4 (BD). Como controles negativos se utilizaron los vectores vacíos (EV^{BD} y EV^{AD}).

Para evaluar si el dominio C-terminal de HYL1 involucra a esta proteína en la vía de señalización de luz azul, evaluamos la interacción *in vitro* de todas las variantes (Figura 26) con CRY1 mediante ensayos de *pull down*. Para esto, clonamos las versiones de HYL1 en un vector de expresión y obtuvimos las diez versiones recombinantes y fusionadas a una etiqueta de histidina. CRY1 fue purificada fusionada a MBP. En la Figura 32A se muestran dos réplicas del ensayo, con el que encontramos que tanto el número de repeticiones como la fosforilación de este dominio afectan la interacción HYL1-CRY1. A medida que el número de repeticiones disminuye, la interacción con CRY1 se hace más débil, sugiriendo que este dominio es importante para dicha interacción. Además, la versión no fosforilada HYL1^{C-termS>A} mostró una interacción más fuerte que sus contrapartes fosforilada y salvaje. Estos resultados son

particularmente interesantes, ya que sugieren que el dominio C-terminal de HYL1, cuya presencia en la proteína no sería relevante para su función en la biogénesis de miARNs, podría ser importante para la participación de HYL1 en la vía de señalización de luz azul. Asimismo, el resultado obtenido por Y2H, en donde HYL1^{C-termS>A} pierde su interacción con SE, podría sugerir que cambios en la fosforilación del dominio C-terminal dirigirían a HYL1 a participar en una u otra vía en mayor medida.

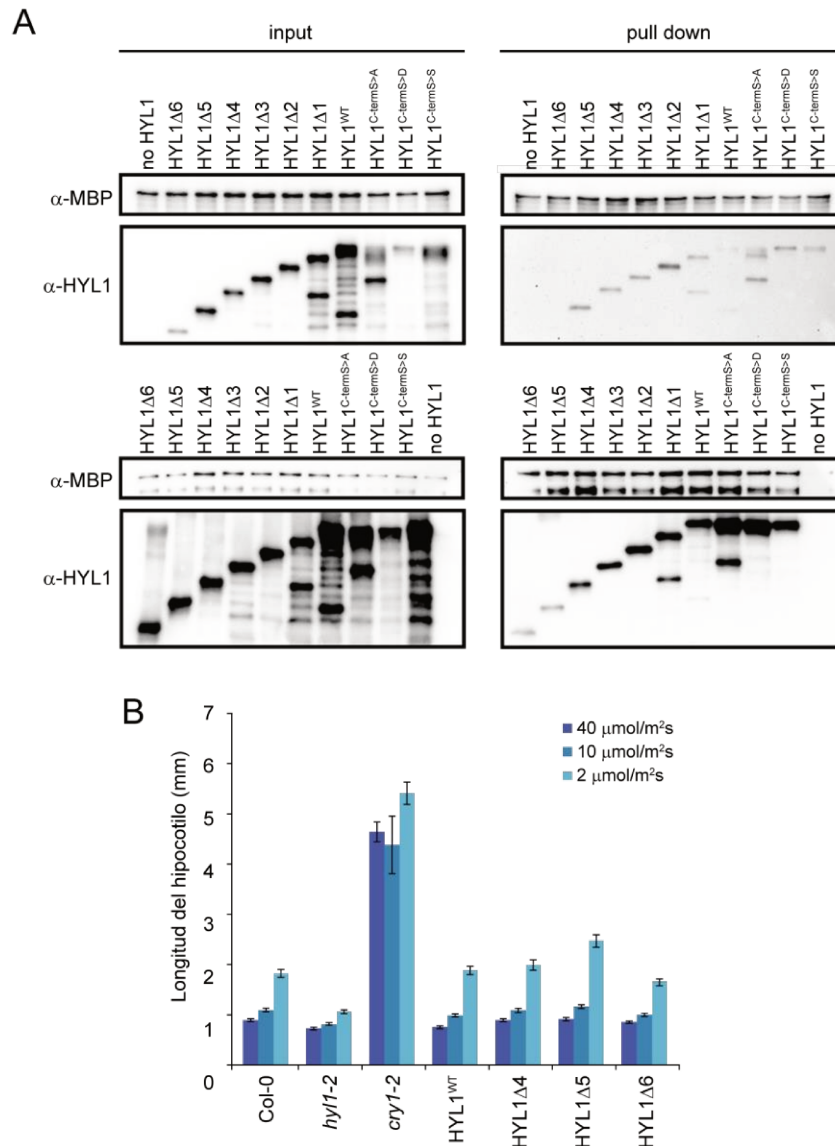


Figura 32. (A) Ensayo de interacción *in vitro* de las distintas variantes de HYL1 en el dominio C-terminal (ver Figura 26) con CRY1 fusionada a MBP. En los paneles de la izquierda se muestran los niveles iniciales de cada proteína (input), y en los de la derecha los niveles de proteína interaccionando (pull down). (B) Evaluación de la respuesta a luz azul de plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con distintas variantes de HYL1 en el dominio C-terminal. Como controles se utilizaron plantas salvajes (Col-0), mutantes en HYL1 (*hyl1-2*) y en CRY1 (*cry1-2*). Las barras de error muestran 2xSEM. Los valores $p < 0,05$ en el test t con la corrección de Bonferroni fueron considerados significativos.

Dados estos resultados, analizamos la respuesta a luz azul de plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con las distintas versiones de HYL1 bajo el control de su propia región reguladora. Para esto, germinamos las semillas en placas con discos de papel embebidos en agua, colocadas en una cámara de luz azul bajo tres intensidades diferentes (40, 10 y 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). A los cinco días medimos la respuesta como la longitud de los hipocotilos. Mientras que con las intensidades más altas no notamos una respuesta diferente en los genotipos analizamos, con 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ encontramos una respuesta a luz azul alterada en plántulas transformadas con las versiones de HYL1 que poseen una repetición (HYL1 Δ 5) o ninguna (HYL1 Δ 6) (Figura 32B). Curiosamente, la respuesta de estos dos fue contraria, teniendo una respuesta disminuida (mayor elongación del hipocotilo) para HYL1 Δ 5 y una respuesta exacerbada (mayor represión de la elongación del hipocotilo) para HYL1 Δ 6 (Figura 32B).

Teniendo en consideración la variación natural en las repeticiones de HYL1 entre distintos ecotipos y especies relacionadas [144], estos resultados sugieren que HYL1 podría cumplir distintos roles en la percepción de luz azul, en relación con la adaptación a los ambientes lumínicos en las que evolucionó cada especie. Sería interesante evaluar la respuesta a luz azul de *A. lyrata* y *B. napus*, que poseen naturalmente a HYL1 con solo una repetición. Por otro lado, también debemos analizar qué sucede con la fosforilación del dominio C-terminal en esta respuesta, ya que encontramos una mayor interacción de HYL1^{C-termS>A} con CRY1, en comparación con HYL1^{WT}.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

9 DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

HYL1 es un componente central de la maquinaria de biogénesis de miARNs que puede estar presente en estado desfosforilado (activo) o fosforilado (inactivo) [144]. Sin embargo, la relevancia biológica de esta regulación post-traduccional era ampliamente desconocida. Era llamativo observar en el trabajo original donde se describieron las dos isoformas que la isoforma fosforilada, inactiva, era por lejos la más abundante. Esto sugería que esta isoforma tenía algún rol en la homeostasis de la planta. En este trabajo de tesis mostramos que la fosforilación de HYL1 genera un pool de reserva de la proteína que es resistente a la degradación proteolítica inducida por oscuridad/sombra. Después de un periodo prolongado de deficiencia de luz, y cuando las plantas vuelven a condiciones lumínicas más favorables, una rápida desfosforilación del pool de reserva restaura la actividad de HYL1 y la biogénesis de miARNs (Figura 33). Estos cambios en HYL1 son importantes para las transiciones de desarrollo que tienen lugar durante oscuridad o sombra prolongada y luego de la exposición subsecuente a la luz y pusieron en relieve la importancia de la existencia del reservorio de proteína fosforilado e inactivo (Figuras 14, 15 y 17).

En cuanto al mecanismo subyacente a esta regulación, encontramos que la fosforilación de HYL1 en la serina 159 protege a la proteína de la degradación al restringir su localización al núcleo (Figura 10). La fosforilación de esta serina, localizada en el dominio DRBM2, también impide la dimerización de HYL1 y su interacción con SE (Figura 12B). Estas observaciones sugieren que la localización nuclear exclusiva de HYL1 fosforilada, y por lo tanto su estabilidad, podrían responder a su falla para interactuar con otras proteínas. Esto podría implicar que la exportación desde el núcleo de HYL1 requiere la interacción con proteínas asociadas al DRBM2. Sin embargo, también es posible que la fosforilación en el DRBM2 produzca un cambio conformacional que esconda la NES, localizada en su proximidad, bloqueando parcialmente el transporte nuclear/citoplasmático. Nuestros resultados concuerdan con los reportes en sistemas animales que muestran que los homólogos funcionales de HYL1 (TRBP y DGCR8) son estabilizados por fosforilación [203], [204]. La estabilidad nuclear propuesta de HYL1 fosforilada también coincide con la observación de que en ausencia de las kinasas SnRK2, requeridas para la fosforilación nuclear de HYL1, la proteína se desestabiliza durante estrés osmótico [205]. Sin embargo, estas observaciones están en contraposición con un trabajo que afirma que la fosforilación de HYL1 lleva a su desestabilización y degradación, y que la desfosforilación, mediada por Protein Phosphatase 4 (PP4)/complejo SMEK1, estabiliza a HYL1 [149]. Una posible explicación a esta discrepancia podría basarse en que, en dicho trabajo, se realizaron

los ensayos de estabilidad de HYL1 en extractos libres de células. En los mismos se realiza una ruptura celular que anula la partición nuclear-citoplasmática de HYL1, que nosotros encontramos como crucial para el control de la estabilidad (Figuras 10 y 11). Esto está en concordancia con nuestra observación de que la fosforilación de HYL1 por sí misma no es responsable de la estabilidad de esta isoforma, pero sí de su localización nuclear exclusiva (Figura 11D). Nuestra propuesta de que la fosforilación estabiliza a HYL1 *in vivo*, mientras que la isoforma desfosforilada es degradada también es consistente con los geles mostrados en Su y col., 2017 [149], donde solo la forma no fosforilada se reduce en las mutantes *smek*, mientras la forma fosforilada no se ve afectada.

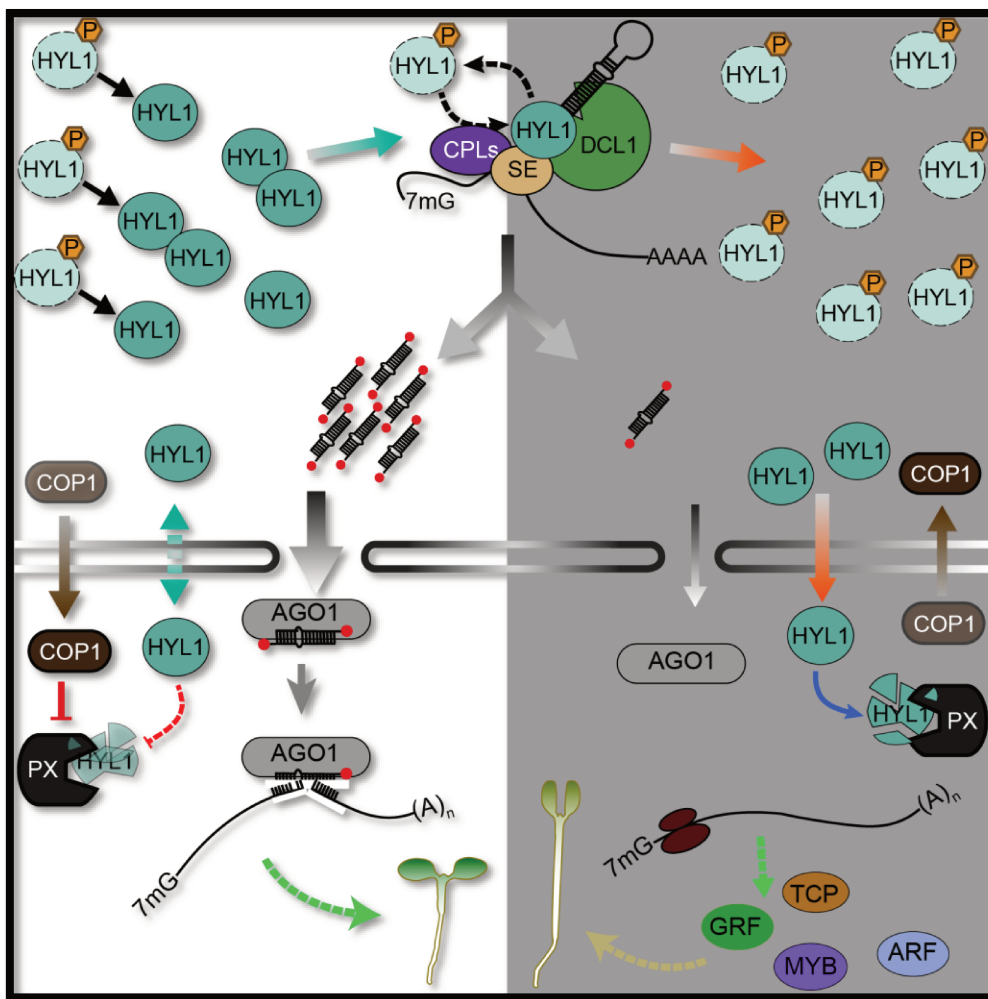


Figura 33. Representación esquemática de la regulación de HYL1 por oscuridad/sombra y luz, y la relevancia biológica para el crecimiento de la planta.

Diversas pruebas apoyan la noción de un rol importante de los patrones dinámicos de fosforilación de HYL1 en el ajuste del crecimiento de la planta, y el perfil

de expresión génica asociado, en función de las condiciones de luz ambientales. Por ejemplo, encontramos que la distorsión de la cinética de fosforilación de HYL1 redujo el crecimiento del hipocotilo en plántulas jóvenes expuestas a entierro simulado (oscuridad completa) y la hiponastía de hojas en plantas expuestas a sombra simulada. Estos patrones de crecimiento alterados disminuyen las probabilidades de la planta para alcanzar una fuente de luz adecuada, resaltando la importancia de la fluctuación entre fosforilación/desfosforilación de HYL1. A nivel molecular, el re-entierro simulado (transferencia de plantas crecidas en luz a oscuridad completa) reprimió a un grupo de miARNs importantes para el desarrollo, incluyendo miR159, miR319, miR390 y miR396, dando lugar a un concomitante incremento en la expresión de sus targets. Estos targets incluyen a los factores de transcripción MYB, TCP, ARF y GRF, que son conocidos mediadores las respuestas de crecimiento observadas en respuesta a la luz [206]–[208]. Sin embargo, en plántulas que germinan en oscuridad y luego de un periodo de escotomorfogénesis logran alcanzar la luz y comenzar el crecimiento fotomorfogénico, el cambio en el nivel de miARNs maduros no fue notorio (Figura 20). En un trabajo realizado en colaboración con el laboratorio del Prof. Yang, se encontró que en la transición de escoto a fotomorfogénesis se produce un aumento en los niveles de DCL1, SE y HYL1, componentes centrales de la biogénesis de miARNs. Es decir, durante la escotomorfogénesis los niveles proteicos de estos tres componentes son bajos, y aumentan en cuando la plántula percibe una fuente de luz favorable [194]. Adicionalmente, los niveles de pri-miARNs también aumentan, pero el nivel de miARNs apenas se ve afectado, excepto por algunos casos puntuales (Figura 20), debido a una menor actividad los componentes del procesamiento. A este fenómeno se lo denominó inconsistencia biogenética [194]. A través de este mecanismo, las plántulas de-etioladas podrían modular el equilibrio entre el transcriptoma inducido por luz y el silenciamiento génico mediado por miARNs en las primeras etapas de la fotomorfogénesis. Sin un mecanismo de este tipo, las plántulas de-etioladas posiblemente podrían experimentar conflictos internos entre los miARNs y los transcritos que responden a la luz (la mayoría de los cuales son factores de transcripción [209]), que eventualmente resultan en defectos pleiotrópicos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, o arriesgan su supervivencia. La inconsistencia biogenética de miARNs podría ser esencial para las plántulas enterradas profundamente en el suelo. Para las mismas, llegar a la superficie con un hipocotilo alargado gasta la mayor parte de la energía acumulada en su endosperma. Las plántulas apenas emergidas podrían mejorar su capacidad de supervivencia al suprimir condicionalmente la biogénesis de miARNs para promover la expresión de genes favorables, lo que puede permitir el ahorro de energía y facilitar la

adaptación a las condiciones de luz siempre cambiantes [194]. Así, los periodos de oscuridad prolongada podrían inducir mecanismos diferentes en las plantas para escapar de esas condiciones, dependiendo de si la misma estuvo expuesta previamente a condiciones de luz favorables. En los casos en los que sí lo estuvo, la degradación y cambios en la fosforilación de HYL1 tendrían un rol central en la regulación de la biogénesis miARNs. Cuando la planta germina en oscuridad, la vía estaría regulada de manera más fina en conjunto por DCL1, SE y HYL1, y con un aumento en los niveles de HYL1 luego de la exposición a luz [194]. Desconocemos si durante esta etapa de escotomorfogénesis (sin crecimiento fotomorfogénico previo) HYL1 es degradada en menor medida, y la estabilización observada al comenzar la fotomorfogénesis se debe a una inhibición de su proteasa, o si rigen otros mecanismos de regulación de su estabilidad.

Mientras que la respuesta a oscuridad o sombra prolongada es inevitablemente lenta, debido a que implica medir la duración de la señal, la respuesta a la luz subsecuente tiene que ser rápida para maximizar la captación lumínica. En este proceso, observamos una conversión rápida de HYL1 a su forma activa a expensas de la desfosforilación de una reserva inactiva de proteína cuando hay luz vuelve a estar disponible luego de un periodo prolongado de oscuridad/sombra (Figuras 4 a 9). Este cambio rápido en la fosforilación es requerido para la apertura normal de los cotiledones (Figura 14), una respuesta de crecimiento que rápidamente expone los tejidos fotosintéticos a luz durante la de-etiolación.

Mientras la forma inactiva de HYL1 es la más abundante en órganos maduros tal como hojas, flores desarrolladas, raíces y silicuas, la forma activa domina en plántulas y tejidos jóvenes. Esta distribución inusual puede reflejar una mayor necesidad de regulación génica mediada por miARNs en estadios tempranos de desarrollo. Un escenario compatible con la conocida función de los miARNs en controlar el desarrollo de plantas. La forma activa de HYL1 es mayormente degradada en plantas crecidas en luz y transferidas a condiciones de completa oscuridad o sombra simulada, mientras que en plántulas que germinan en oscuridad, y por lo tanto no estuvieron expuestas previamente a luz, la degradación de HYL1 es solo parcial [194]. Por otro lado, los niveles de HYL1 solo se modifican levemente durante un ciclo de luz/oscuridad (día/noche) normal, reducción que a su vez no tuvo consecuencias detectables en los niveles de miARNs. Esto sugiere que la degradación de HYL1 en periodos breves de oscuridad no afecta la producción de miARNs ubicando al proceso de fosfo-degradación de HYL1 solo en periodos particularmente prolongados de escasez de luz. Así, la degradación de la forma activa de HYL1, y la formación de un pool de reserva inactivo,

capaz de afectar la producción de miARNs, ocurre solo en respuesta a periodos inusualmente prolongados de privación de luz y luego del crecimiento fotomorfogénico. Las vías de señalización involucradas en esta homeostasis de HYL1 no son claras, pero parecen involucrar señales retrogradadas desde los cloroplastos y potencialmente una señal móvil. La identificación de la proteasa de HYL1 será un hito importante para entender la cascada de señalización celular que regula la actividad de HYL1, y por lo tanto la biogénesis de miARNs.

La plasticidad de las plantas para afrontar los desafíos impuestos por las fluctuaciones en la disponibilidad de luz depende de la habilidad para integrar señales ambientales en diferentes escalas de tiempo y combinar respuestas rápidas y reversibles con modificaciones a largo tiempo [210]. En este trabajo mostramos que cinéticas lentas de desactivación de HYL1 (degradación y fosforilación) y la rápida reactivación de HYL1 mediante desfosforilación proveen un mecanismo molecular para combinar una aclimatación gradual en periodos de escasez de luz prolongada con un rápido re-ajuste cuando condiciones de luz más favorables son restauradas.

Por último, en este trabajo también surge la idea, con resultados preliminares, de que la región C-terminal de HYL1 podría tener roles regulatorios sobre esta proteína. Como ha sido demostrado, HYL1 sin este dominio es capaz de complementar el fenotipo mutante ([143], Figuras 27 y 28), y la cantidad de repeticiones tampoco parece afectar su actividad en la biogénesis de miARNs (Figuras 27 y 28). Por el contrario, al variar la longitud cambia la capacidad de interacción de HYL1 con CRY1, un factor clave en la percepción de luz azul [211]. Además, cuando variamos el estado de fosforilación de este dominio, encontramos que las plantas responden de manera diferente (Figura 28). Adicionalmente, las interacciones con CRY1 y con SE también se vieron afectadas, sugiriendo que la fosforilación no solo regularía la actividad de HYL1 en la biogénesis de miARNs, sino también su participación en la señalización de luz azul. Sin embargo, se necesitan pruebas adicionales para confirmar esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] H Tsukaya, T Tsuge (2001) Morphological adaptation of inflorescences in plants that develop at low temperatures in early spring: The convergent evolution of “downy plants.” *Plant Biology* 3 (5):536–543.
- [2] G Li, S Hu, X Zhao, S Kumar, Y Li, J Yang, H Hou (2021) Mechanisms of the morphological plasticity induced by phytohormones and the environment in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2):1–17.
- [3] M Mizutani, MM Kanaoka (2018) Environmental sensing and morphological plasticity in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 83:69–77.
- [4] SH Wu (2014) Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma. *Annual Review of Plant Biology* 65:311–333.
- [5] M Floris, H Mahgoub, E Lanet, C Robaglia, B Menand (2009) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 10 (7):3168–3185.
- [6] W Filipowicz, L Jaskiewicz, FA Kolb, RS Pillai (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* 15 (3 SPEC. ISS.):331–341.
- [7] BC Meyers, MJ Axtell (2019) Micronas in plants: Key findings from the early years. *Plant Cell* 31 (6):1206–1207.
- [8] MA Matzke, M Primig, J Trnovsky, AJM Matzke (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO Journal* 8 (3):643–649.
- [9] C Napoli, C Lemieux, R Jorgensen (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* 2 (4):279–289.
- [10] AR van der Krol, LA Mur, M Beld, JNM Mol, AR Stuitje (1990) Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2 (4):291–299.
- [11] RC Lee, RL Feinbaum, V Ambros (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75 (5):843–854.

- [12] B Wightman, I Ha, G Ruvkun (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5):855–862.
- [13] JA Lindbo, L Silva-Rosales, WM Proebsting, WG Dougherty (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5 (12):1749–1759.
- [14] S Guo, KJ Kemphues (1995) *par-1* a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. *Cell* 81:611–620.
- [15] DC Baulcombe (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8 (10):1833–1844.
- [16] JJ English, E Mueller, DC Baulcombe (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8 (2):179–188.
- [17] DC Baulcombe (1996) RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 32 (1–2):79–88.
- [18] JJ English, GF Davenport, T Elmayan, H Vaucheret, DC Baulcombe (1997) Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant Journal* 12 (3):597–603.
- [19] O Voinnet, P Vain, S Angell, DC Baulcombe (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95 (2):177–187.
- [20] A Fire, S Xu, MK Montgomery, SA Kostas, SE Driver, CC Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669):806–811.
- [21] AJ Hamilton, DC Baulcombe (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441):950–952.
- [22] PD Zamore, T Tuschl, PA Sharp, DP Bartel (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101 (1):25–33.

- [23] SM Hammond, E Bernstein, D Beach, GJ Hannon (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 (6775):293–296.
- [24] RC Lee, V Ambros (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543):862–864.
- [25] M Lagos-Quintana, R Rauhut, W Lendeckel, T Tuschl (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294 (5543):853–858.
- [26] NC Lau, LP Lim, EG Weinstein, DP Bartel (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543):858–862.
- [27] M Bots, S Maughan, J Nieuwland (2006) RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants [1]. *Nature* 443 (7114):906.
- [28] VN Kim, J Han, MC Siomi (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (2):126–139.
- [29] X Chen (2012) Small RNAs in development - insights from plants. *Current Opinion in Genetics and Development* 22 (4):361–367.
- [30] F Borges, RA Martienssen (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16 (12):727–741.
- [31] MJ Axtell (2013) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:137–159.
- [32] V Gascioli, AC Mallory, DP Bartel, H Vaucheret (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology* 15 (16):1494–1500.
- [33] IR Henderson, X Zhang, C Lu, L Johnson, BC Meyers, PJ Green, SE Jacobsen (2006) Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics* 38 (6):721–725.
- [34] MJ Axtell, JO Westholm, EC Lai (2011) Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology* 12 (221):1–13.
- [35] J Li, Z Yang, B Yu, J Liu, X Chen (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15 (16):1501–1507.

- [36] B Yu, Z Yang, J Li, S Minakhina, M Yang, RW Padgett, R Steward, X Chen (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307 (5711):932–935.
- [37] W Liu, J Meng, J Cui, Y Luan (2017) Characterization and Function of MicroRNA*s in Plants. *Frontiers in Plant Science* 8:2200.
- [38] K Bohmert, I Camus, C Bellini, D Bouchez, M Caboche, C Banning (1998) AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO Journal* 17 (1):170–180.
- [39] C Ender, G Meister (2010) Argonaute proteins at a glance. *Journal of Cell Science* 123:1819–1823.
- [40] FD Ariel, PA Manavella (2021) When junk DNA turns functional: transposon-derived non-coding RNAs in plants. *Journal of Experimental Botany* .
- [41] H Vaucheret (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13 (7):350–358.
- [42] M Matzke, T Kanno, L Daxinger, B Huettel, AJ Matzke (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 21 (3):367–376.
- [43] JA Law, SE Jacobsen (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11 (3):204–220.
- [44] E Allen, Z Xie, AM Gustafson, JC Carrington (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121 (2):207–221.
- [45] M Yoshikawa, A Peragine, YP Mee, RS Poethig (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 19 (18):2164–2175.
- [46] J Thody, L Folkes, V Moulton (2020) NATpare: A pipeline for high-throughput prediction and functional analysis of nat-siRNAs. *Nucleic Acids Research* 48 (12):6481–6490.
- [47] M Lapidot, Y Pilpel (2006) Genome-wide natural antisense transcription: Coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Reports* 7 (12):1216–1222.

- [48] V Ambros, B Bartel, DP Bartel, CB Burge, JC Carrington, X Chen, G Dreyfuss, SR Eddy, S Griffiths-Jones, M Marshall, M Matzke, G Ruvkun, T Tuschl (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9 (3):277–279.
- [49] BC Meyers, MJ Axtell, B Bartel, DP Bartel, D Baulcombe, JL Bowman, X Cao, JC Carrington, X Chen, PJ Green, S Griffiths-Jones, SE Jacobsen, AC Mallory, RA Martienssen, RS Poethig, Y Qi, H Vaucheret, O Voinnet, Y Watanabe, D Weigel, JK Zhu (2008) Criteria for annotation of plant microRNAs. *Plant Cell* 20 (12):3186–3190.
- [50] G Riolo, S Cantara, C Marzocchi, C Ricci (2021) miRNA targets: From prediction tools to experimental validation. *Methods and Protocols* 4 (1):1–20.
- [51] MW Jones-Rhoades (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Molecular Biology* 80 (1):3–16.
- [52] V Ambros, B Bartel, DP Bartel, CB Burge, JC Carrington, X Chen, G Dreyfuss, SR Eddy, S Griffiths-Jones, M Marshall, M Matzke, G Ruvkun, T Tuschl (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9 (3):277–279.
- [53] V Ambros (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 (7006):350–355.
- [54] DP Bartel (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116 (2):281–297.
- [55] Y Yu, T Jia, X Chen (2017) The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytologist* 216 (4):1002–1017.
- [56] T Yang, L Xue, L An (2007) Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science* 172 (3):423–432.
- [57] K Rogers, X Chen (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25 (7):2383–2399.
- [58] NP Achkar, DA Cambiagno, PA Manavella (2016) miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science* 21 (12):1034–1044.
- [59] J Wang, J Mei, G Ren (2019) Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science* 10:360.

- [60] YJ Kim, B Zheng, Y Yu, SY Won, B Mo, X Chen (2011) The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 30 (5):814–822.
- [61] M Hajheidari, S Farrona, B Huettel, Z Koncz, C Koncz (2012) CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-Terminal domain of *Arabidopsis* RNA polymerase II. *Plant Cell* 24 (4):1626–1642.
- [62] Z Xie, E Allen, N Fahlgren, A Calamar, SA Givan, JC Carrington (2005) Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiology* 138 (4):2145–2154.
- [63] X Fang, Y Cui, Y Li, Y Qi (2015) Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 1 (6):1–9.
- [64] L Wang, X Song, L Gu, X Li, S Cao, C Chu, X Cui, X Chen, X Cao (2013) NOT2 Proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25 (2):715–727.
- [65] S Zhang, M Xie, G Ren, B Yu (2013) CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (43):17588–17593.
- [66] S Li, K Liua, S Zhang, X Wang, K Rogers, G Ren, C Zhang, B Yu (2017) STV1, a ribosomal protein, binds primary microRNA transcripts to promote their interaction with the processing complex in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (6):1424–1429.
- [67] S Wang, L Quan, S Li, C You, Y Zhang, L Gao, L Zeng, L Liu, Y Qi, B Mo, X Chen (2019) The PROTEIN PHOSPHATASE4 Complex Promotes Transcription and Processing of Primary microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 31 (2):486–501.
- [68] S Li, R Xu, A Li, K Liu, L Gu, M Li, H Zhang, Y Zhang, S Zhuang, Q Wang, G Gao, N Li, C Zhang, Y Li, B Yu (2018) SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 46 (17):9148–9159.
- [69] Z Wang, Z Ma, C Castillo-González, D Sun, Y Li, B Yu, B Zhao, P Li, X Zhang (2018) SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature* 557 (7706):516–521.

- [70] DA Cambiagno, AJ Giudicatti, AL Arce, D Gagliardi, L Li, W Yuan, DS Lundberg, D Weigel, PA Manavella (2021) HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular Plant* 14 (3):426–439.
- [71] B Zhang, C You, Y Zhang, L Zeng, J Hu, M Zhao, X Chen (2020) Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 6 (8):957–969.
- [72] M Li, B Yu (2021) Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA Biology* :1–10.
- [73] Q Cai, C Liang, S Wang, Y Hou, L Gao, L Liu, W He, W Ma, B Mo, X Chen (2018) The disease resistance protein SNC1 represses the biogenesis of microRNAs and phased siRNAs. *Nature Communications* 9 (1):1–14.
- [74] Z Sun, T Guo, Y Liu, Q Liu, Y Fang (2015) The Roles of *Arabidopsis* CDF2 in Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Primary MicroRNAs. *PLoS Genetics* 11 (10):e1005598.
- [75] H Koiwa, S Hausmann, WY Bang, A Ueda, N Kondo, A Hiraguri, T Fukuhara, JD Bahk, DJ Yun, RA Bressan, PM Hasegawa, S Shuman (2004) *Arabidopsis* C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (40):14539–14544.
- [76] S Zhang, Y Liu, B Yu (2014) PRL1, an RNA-Binding Protein, Positively Regulates the Accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 10 (12):e1004841.
- [77] S Li, K Liu, B Zhou, M Li, S Zhang, L Zeng, C Zhang, B Yu (2018) MAC3A and MAC3B, two core subunits of the MOS4-associated complex, positively influence miRNA biogenesis. *Plant Cell* 30 (2):481–494.
- [78] S Li, M Li, K Liu, H Zhang, S Zhang, C Zhang, B Yu (2020) MAC5, an RNA-binding protein, protects pri-miRNAs from SERRATE-dependent exoribonuclease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (38):23982–23990.
- [79] T Jia, B Zhang, C You, Y Zhang, L Zeng, S Li, KCM Johnson, B Yu, X Li, X Chen (2017) The *Arabidopsis* MOS4-associated complex promotes microRNA biogenesis and precursor messenger RNA splicing. *Plant Cell* 29 (10):2626–2643.

- [80] S Kim, JY Yang, J Xu, IC Jang, MJ Prigge, NH Chua (2008) Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant and Cell Physiology* 49 (11):1634–1644.
- [81] S ben Chaabane, R Liu, V Chinnusamy, Y Kwon, JH Park, SY Kim, JK Zhu, SW Yang, BH Lee (2013) STA1, an *Arabidopsis* pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research* 41 (3):1984–1997.
- [82] T Chen, P Cui, L Xiong (2015) The RNA-binding protein HOS5 and serine/arginine-rich proteins RS40 and RS41 participate in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 43 (17):8283–8298.
- [83] K Knop, A Stepien, M Barciszewska-Pacak, M Taube, D Bielewicz, M Michalak, JW Borst, A Jarmolowski, Z Szweykowska-Kulinska (2017) Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of *Arabidopsis* microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Research* 45 (5):2757–2775.
- [84] AG Francisco-Mangilet, P Karlsson, MH Kim, HJ Eo, SA Oh, JH Kim, FR Kulcheski, SK Park, PA Manavella (2015) THO2, a core member of the THO/TREX complex, is required for microRNA production in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 82 (6):1018–1029.
- [85] T Köster, K Meyer, C Weinholdt, LM Smith, M Lummer, C Speth, I Grosse, D Weigel, D Staiger (2014) Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 42 (15):9925–9936.
- [86] X Zhan, B Wang, H Li, R Liu, RK Kalia, JK Zhu, V Chinnusamy (2012) *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (44):18198–18203.
- [87] Y Fang, DL Spector (2007) Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants. *Current Biology* 17 (9):818–823.
- [88] Q Liu, L Shi, Y Fang (2012) Dicing bodies. *Plant Physiology* 158 (1):61–66.
- [89] X Wu, Y Shi, J Li, L Xu, Y Fang, X Li, Y Qi (2013) A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in *Arabidopsis*. *Cell Research* 23 (5):645–657.

- [90] D Xie, M Chen, J Niu, L Wang, Y Li, X Fang, P Li, Y Qi (2021) Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* 23 (1):32–39.
- [91] H Zhu, Y Zhou, C Castillo-González, A Lu, C Ge, YT Zhao, L Duan, Z Li, MJ Axtell, XJ Wang, X Zhang (2013) Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by *Arabidopsis* Dicer-like1. *Nature Structural and Molecular Biology* 20 (9):1106–1115.
- [92] B Moro, U Chorostecki, S Arikiti, IP Suarez, C Hobartner, RM Rasia, BC Meyers, JF Palatnik (2018) Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Research* 46 (20):10709–10723.
- [93] NG Bologna, AL Schapire, J Zhai, U Chorostecki, J Boisbouvier, BC Meyers, JF Palatnik (2013) Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Research* 23 (10):1675–1689.
- [94] JT Cuperus, N Fahlgren, JC Carrington (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23 (2):431–442.
- [95] L Song, MJ Axtell, N v. Fedoroff (2010) RNA Secondary Structural Determinants of miRNA Precursor Processing in *Arabidopsis*. *Current Biology* 20 (1):37–41.
- [96] S Werner, H Wollmann, K Schneeberger, D Weigel (2010) Structure Determinants for Accurate Processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 20 (1):42–48.
- [97] JL Mateos, NG Bologna, U Chorostecki, JF Palatnik (2010) Identification of MicroRNA Processing Determinants by Random Mutagenesis of *Arabidopsis* MIR172a Precursor. *Current Biology* 20 (1):49–54.
- [98] U Chorostecki, B Moro, AML Rojas, JM Debernardi, AL Schapire, C Notredame, JF Palatnik (2017) Evolutionary footprints reveal insights into plant microRNA biogenesis. *Plant Cell* 29 (6):1248–1261.
- [99] AML Rojas, SI Drusin, U Chorostecki, JL Mateos, B Moro, NG Bologna, EG Bresso, A Schapire, RM Rasia, DM Moreno, JF Palatnik (2020) Identification of key sequence features required for microRNA biogenesis in plants. *Nature Communications* 11 (1):1–11.
- [100] JT Cuperus, N Fahlgren, JC Carrington (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23 (2):431–442.

- [101] Y Kurihara, Y Takashi, Y Watanabe (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12 (2):206–212.
- [102] Z Dong, MH Han, N Fedoroff (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29):9970–9975.
- [103] DA Re, PLM Lang, C Yones, AL Arce, G Stegmayer, D Milone, PA Manavella (2019) Alternative use of miRNA-biogenesis co-factors in plants at low temperatures. *Development (Cambridge)* 146 (5).
- [104] SW Yang, H-YY Chen, J Yang, S Machida, N-HH Chua, YA Yuan (2010) Structure of *Arabidopsis* Hyponastic Leaves1 and its molecular implications for miRNA Processing. *Structure* 18 (5):594–605.
- [105] A Narjala, A Nair, V Tirumalai, G Vivek Hari Sundar, P v. Shivaprasad (2020) A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research* 48 (6):3103–3118.
- [106] SK Cho, MY Ryu, C Poulsen, JH Kim, TR Oh, SW Choi, M Kim, JY Yang, KH Boo, N Geshi, WT Kim, SW Yang (2017) HIGLE is a bifunctional homing endonuclease that directly interacts with HYL1 and SERRATE in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 591 (10):1383–1393.
- [107] S Baranauske, M Mickute, A Plotnikova, A Finke, Č Venclovas, S Klimašauskas, G Vilkaitis (2015) Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Research* 43 (5):2802–2812.
- [108] X Yang, W Ren, Q Zhao, P Zhang, F Wu, Y He (2014) Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Research* 42 (19):12224–12236.
- [109] AH Tomassi, DA Re, F Romani, DA Cambiagno, JE Moreno, AL Arce, PA Manavella, S Fe, L Gonzalo, JE Moreno, AL Arce, PA Manavella (2020) The intrinsically disordered protein CARP9 bridges HYL1 to AGO1 in the nucleus to promote micro RNA activity. *Plant Physiology* 184 (1):316–329.

- [110] NG Bologna, R Iselin, LA Abriata, A Sarazin, N Pumplin, F Jay, T Grentzinger, M Dal Peraro, O Voinnet (2018) Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular Cell* 69 (4):709-719.e5.
- [111] B Zhang, C You, Y Zhang, L Zeng, J Hu, M Zhao, X Chen (2020) Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 6 (8):957–969.
- [112] Á Dalmadi, P Gyula, J Bálint, G Szittyá, Z Havelda (2019) AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic acids research* 47 (18):9803–9817.
- [113] A Buhtz, J Pieritz, F Springer, J Kehr (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biology* 10 (1):1–13.
- [114] MG Lewsey, TJ Hardcastle, CW Melnyk, A Molnar, A Valli, MA Urich, JR Nery, DC Baulcombe, JR Ecker (2016) Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (6):E801–E810.
- [115] S Li, X Wang, W Xu, T Liu, C Cai, L Chen, CB Clark, J Ma (2021) Unidirectional movement of small RNAs from shoots to roots in interspecific heterografts. *Nature Plants* 7 (1):50–59.
- [116] SI Lin, SF Chiang, WY Lin, JW Chen, CY Tseng, PC Wu, TJ Chiou (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* 147 (2):732–746.
- [117] A Molnar, CW Melnyk, A Bassett, TJ Hardcastle, R Dunn, DC Baulcombe (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328 (5980):872–875.
- [118] W Zhang, G Kollwig, E Stecyk, F Apelt, R Dirks, F Kragler (2014) Graft-transmissible movement of inverted-repeat-induced siRNA signals into flowers. *Plant Journal* 80 (1):106–121.
- [119] DS Skopelitis, K Hill, S Klesen, CF Marco, P von Born, DH Chitwood, MCP Timmermans (2018) Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals. *Nature Communications* 9 (1):1–10.

- [120] L Fan, C Zhang, Y Zhang, E Stewart, J Jez, K Nakajima, X Chen (2021) Microtubules Promote the Non-cell Autonomy of MicroRNAs by Inhibiting their Cytoplasmic Loading into ARGONAUTE1 in *Arabidopsis*. *bioRxiv* :1–39.
- [121] T Iki, M Yoshikawa, M Nishikiori, MC Jaudal, E Matsumoto-Yokoyama, I Mitsuhashi, T Meshi, M Ishikawa (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular Cell* 39 (2):282–291.
- [122] MR Smith, MR Willmann, G Wu, TZ Berardini, B Möller, D Weijers, RS Poethig (2009) Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13):5424–5429.
- [123] A Takeda, S Iwasaki, T Watanabe, M Utsumi, Y Watanabe (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology* 49 (4):493–500.
- [124] X Zhang, DD Niu, A Carbonell, A Wang, A Lee, V Tun, Z Wang, JC Carrington, CEA Chang, H Jin (2014) ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 5 (1):1–11.
- [125] AL Eamens, NA Smith, SJ Curtin, MB Wang, PM Waterhouse (2009) The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *Rna* 15 (12):2219–2235.
- [126] X Yang, W Dong, W Ren, Q Zhao, F Wu, Y He (2021) Cytoplasmic HYL1 modulates miRNA-mediated translational repression. *The Plant Cell* koab090.
- [127] C Llave, Z Xie, KD Kasschau, JC Carrington (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297 (5589):2053–2056.
- [128] MA German, M Pillay, DH Jeong, A Hetawal, S Luo, P Janardhanan, V Kannan, LA Rymarquis, K Nobuta, R German, E de Paoli, C Lu, G Schroth, BC Meyers, PJ Green (2008) Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnology* 26 (8):941–946.

- [129] MJ Aukerman, H Sakai (2003) Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *Plant Cell* 15 (11):2730–2741.
- [130] X Chen (2004) A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* Flower Development. *Science* 303 (5666):2022–2025.
- [131] M Gandikota, RP Birkenbihl, S Höhmann, GH Cardon, H Saedler, P Huijser (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal* 49 (4):683–693.
- [132] P Brodersen, L Sakvarelidze-Achard, M Bruun-Rasmussen, P Dunoyer, YY Yamamoto, L Sieburth, O Voinnet (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320 (5880):1185–1190.
- [133] D v. Dugas, B Bartel (2008) Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Molecular Biology* 67 (4):403–417.
- [134] L Beauclair, A Yu, N Bouché (2010) MicroRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 62 (3):454–462.
- [135] B Raghuram, AH Sheikh, Y Rustagi, AK Sinha (2015) MicroRNA biogenesis factor DRB1 is a phosphorylation target of mitogen activated protein kinase MPK3 in both rice and *Arabidopsis*. *FEBS Journal* 282 (3):521–536.
- [136] A Hiraguri, R Itoh, N Kondo, Y Nomura, D Aizawa, Y Murai, H Koiwa, M Seki, K Shinozaki, T Fukuhara (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57 (2):173–188.
- [137] SJ Curtin, JM Watson, NA Smith, AL Eamens, CL Blanchard, PM Waterhouse (2008) The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Letters* 582 (18):2753–2760.
- [138] AL Eamens, KW Kim, SJ Curtin, PM Waterhouse (2012) DRB2 Is Required for MicroRNA Biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7 (4):e35933.
- [139] RS Reis, G Hart-Smith, AL Eamens, MR Wilkins, PM Waterhouse (2015) Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nature Plants* 1 (3):1–6.

- [140] AL Eamens, KW Kim, PM Waterhouse (2012) DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior* 7 (10):1224.
- [141] TM Karve, AK Cheema (2011) Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *Journal of Amino Acids* 2011:1–13.
- [142] C Lu, N Fedoroff (2000) A Mutation in the *Arabidopsis* HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *The Plant Cell* 12:2351–2366.
- [143] F Wu, L Yu, W Cao, Y Mao, Z Liu, Y He (2007) The N-Terminal Double-Stranded RNA Binding Domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 Are Sufficient for Pre-MicroRNA Processing. *The Plant Cell* *the Plant Cell Online* 19 (3):914–925.
- [144] PA Manavella, J Hagmann, F Ott, S Laubinger, M Franz, B MacEk, D Weigel (2012) Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* 151 (4):859–870.
- [145] P Karlsson, MD Christie, DK Seymour, H Wang, X Wang, J Hagmann, F Kulcheski, PA Manavella (2015) KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (45):14096–14101.
- [146] J Yan, P Wang, B Wang, CC Hsu, K Tang, H Zhang, YJ Hou, Y Zhao, Q Wang, C Zhao, X Zhu, WA Tao, J Li, JK Zhu (2017) The SnRK2 kinases modulate miRNA accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 13 (4):1–21.
- [147] Z Zhang, X Guo, C Ge, Z Ma, M Jiang, T Li, H Koiwa, SW Yang, X Zhang (2017) KETCH1 imports HYL1 to nucleus for miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (15):4011–4016.
- [148] SK Cho, S ben Chaabane, P Shah, CP Poulsen, SW Yang (2014) COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microrna biogenesis. *Nature Communications* 5:1–10.
- [149] C Su, Z Li, J Cheng, L Li, S Zhong, L Liu, Y Zheng, B Zheng (2017) The Protein Phosphatase 4 and SMEK1 Complex Dephosphorylates HYL1 to Promote miRNA Biogenesis by Antagonizing the MAPK Cascade in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 41 (5):527-539.e5.

- [150] RP Hellens, E Anne Edwards, NR Leyland, S Bean, PM Mullineaux (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42 (6):819–832.
- [151] A v. Bryksin, I Matsumura (2010) Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* 48 (6):463–465.
- [152] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory,.
- [153] HC Bimboim, J Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7 (6):1513–1523.
- [154] M Pacín, M Semmoloni, M Legris, SA Finlayson, JJ Casal (2016) Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytologist* 211 (3):967–979.
- [155] SJ Clough, AF Bent (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16 (6):735–743.
- [156] FF de Felippes, D Weigel (2010) Transient assays for the analysis of miRNA processing and function. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 592:255–264.
- [157] T Canto, JF Uhrig, M Swanson, KM Wright, SA MacFarlane (2006) Translocation of Tomato Bushy Stunt Virus P19 Protein into the Nucleus by ALY Proteins Compromises Its Silencing Suppressor Activity. *Journal of Virology* 80 (18):9064–9072.
- [158] E Westhof (2004) How to silence silencing. *Chemistry and Biology* 11 (2):158–160.
- [159] B Charrier, A Champion, Y Henry, M Kreis (2002) Expression profiling of the whole *Arabidopsis* Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology* 130 (2):577–590.
- [160] A Carbonell (2017) Immunoprecipitation and high-throughput sequencing of ARGONAUTE-bound target RNAs from plants, En: *Methods in Molecular Biology*, 1640, Humana Press Inc., p. :93–112.

- [161] MM Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2):248–254.
- [162] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680–685.
- [163] W Wang, R Ye, Y Xin, X Fang, C Li, H Shi, X Zhou, Y Qi (2011) An importin β protein negatively regulates microRNA activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23 (10):3565–3576.
- [164] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak, A Cardona (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 (7):676–682.
- [165] D Gietz, AS Jean, RA Woods, RH Schiestl (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* 20 (6):1425.
- [166] S Fields (1993) The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Methods* 5 (2):116–124.
- [167] D Hanahan (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4):557–580.
- [168] B Miroux, JE Walker (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* 260 (3):289–298.
- [169] C Koncz, J Schell (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Molecular & General Genetics* 204 (3):383–396.
- [170] M Vidal (1997) The Reverse Two-Hybrid System, En: *The Two-Hybrid System*, (Ed: P. Bartel and S. Fields), Oxford University Press, Oxford, UK, p. :109–147.
- [171] AA Millar (2020) The function of miRNAs in plants. *Plants* 9 (2):198.
- [172] S Li, C Castillo-González, B Yu, X Zhang (2017) The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *Plant Journal* 90 (4):654–670.
- [173] EJ Brant, H Budak (2018) Plant small non-coding RNAs and their roles in biotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 9.

- [174] V Shriram, V Kumar, RM Devarumath, TS Khare, SH Wani (2016) MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science* 7 (JUNE2016).
- [175] J Wang, J Mei, G Ren (2019) Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science* 10:360.
- [176] EJ Chapman, AI Prokhnevsky, K Gopinath, V v. Dolja, JC Carrington (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* 18 (10):1179–1186.
- [177] KD Kasschau, Z Xie, E Allen, C Llave, EJ Chapman, KA Krizan, JC Carrington (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4 (2):205–217.
- [178] E Kenesi, A Carbonell, R Lózsa, B Vértessy, L Lakatos (2017) A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Research* 45 (13):7736–7750.
- [179] MN Pouch-Pélissier, T Pélissier, T Elmayan, H Vaucheret, D Boko, MF Jantsch, JM Deragon (2008) SINE RNA induces severe developmental defects in *Arabidopsis thaliana* and interacts with HYL1 (DRB1), a key member of the DCL1 complex. *PLoS Genetics* 4 (6).
- [180] AL Eamens, NA Smith, SJ Curtin, MB Wang, PM Waterhouse (2009) The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* 15 (12):2219–2235.
- [181] SN Gangappa, JF Botto (2016) The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development, *Molecular Plant*, 9 (10). Cell Press, :1353–1365, 10-Oct-2016.
- [182] A Boonman, E Prinsen, LACJ Voesenek, TL Pons (2009) Redundant roles of photoreceptors and cytokinins in regulating photosynthetic acclimation to canopy density. *Journal of Experimental Botany* 60 (4):1179–1190.
- [183] JJ Casal (2007) Phytochromes, Cryptochromes, Phototropin: Photoreceptor Interactions in Plants. *Photochemistry and Photobiology* 71 (1):1–11.
- [184] KX Chan, SY Phua, P Crisp, R Mcquinn, BJ Pogson (2016) Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu. Rev. Plant Biol* 67:25–53.

- [185] SK Cho, S ben Chaabane, P Shah, CP Poulsen, SW Yang (2014) COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nature Communications* 5:1–10.
- [186] B Brockmann, MW Smith, AG Zaraisky, K Harrison, K Okada, Y Kamiya (2001) Subcellular Localization and Targeting of Glucocorticoid Receptor Protein Fusions Expressed in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42 (9):942–951.
- [187] A Seluzicki, Y Burko, J Chory (2017) Dancing in the dark: Darkness as a signal in plants. *Plant Cell and Environment* 40 (11):2487.
- [188] JJ Casal (2012) Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book* 10:e0157.
- [189] DA Re, PLM Lang, C Yones, AL Arce, G Stegmayer, D Milone, PA Manavella (2019) Alternative use of miRNA-biogenesis co-factors in plants at low temperatures. *Development (Cambridge)* 146 (5):1–7.
- [190] MA Omidbakhshfard, S Proost, U Fujikura, B Mueller-Roeber (2015) Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant* 8 (7):998–1010.
- [191] N Fahlgren, TA Montgomery, MD Howell, E Allen, SK Dvorak, AL Alexander, JC Carrington (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in *Arabidopsis*. *Current Biology* 16 (9):939–944.
- [192] M Martín-Trillo, P Cubas (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* 15 (1):31–39.
- [193] S Ambawat, P Sharma, NR Yadav, RC Yadav (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19 (3):307–321.
- [194] SW Choi, MY Ryu, A Viczián, HJ Jung, GM Kim, AL Arce, NP Achkar, P Manavella, U Dolde, S Wenkel, A Molnár, F Nagy, SK Cho, SW Yang (2020) Light Triggers the miRNA-Biogenetic Inconsistency for De-etiolated Seedling Survivability in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 13 (3):431–445.
- [195] T la Cour, L Kiemer, A Mølgaard, R Gupta, K Skriver, S Brunak (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection* 17 (6):527–536.

- [196] ME Nasrallah, K Yogeewaran, S Snyder, JB Nasrallah (2000) *Arabidopsis* species hybrids in the study of species differences and evolution of amphiploidy in plants. *Plant Physiology* 124 (4):1605–1614.
- [197] IAP Parkin, SM Gulden, AG Sharpe, L Lukens, M Trick, TC Osborn, DJ Lydiate (2005) Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171 (2):765–781.
- [198] GL Dignon, RB Best, J Mittal (2020) Biomolecular phase separation: From molecular driving forces to macroscopic properties. *Annual Review of Physical Chemistry* 71:53–75.
- [199] BG O'Flynn, T Mittag (2021) The role of liquid–liquid phase separation in regulating enzyme activity. *Current Opinion in Cell Biology* 69:70–79.
- [200] A Bremer, M Farag, WM Borchers, I Peran, EW Martin, R v Pappu, T Mittag (2021) Deciphering how naturally occurring sequence features impact the phase behaviors of disordered prion-like domains. *bioRxiv* :2021.01.01.425046.
- [201] W Borchers, A Bremer, MB Borgia, T Mittag (2021) How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid–liquid phase separation? *Current Opinion in Structural Biology* 67:41–50.
- [202] H-Q Yang, R-H Tang, AR Cashmore (2001) The Signaling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell* 13 (12):2573–2587.
- [203] Z Paroo, X Ye, S Chen, Q Liu (2009) Phosphorylation of the Human MicroRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling. *Cell* 139 (1):112–122.
- [204] KM Herbert, G Pimienta, SJ DeGregorio, A Alexandrov, JA Steitz (2013) Phosphorylation of DGCR8 Increases Its Intracellular Stability and Induces a Progrowth miRNA Profile. *Cell Reports* 5 (4):1070–1081.
- [205] J Yan, P Wang, B Wang, CC Hsu, K Tang, H Zhang, YJ Hou, Y Zhao, Q Wang, C Zhao, X Zhu, WA Tao, J Li, JK Zhu (2017) The SnRK2 kinases modulate miRNA accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 13 (4):e1006753.
- [206] RE Rodriguez, MA Mecchia, JM Debernardi, C Schommer, D Weigel, JF Palatnik (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137 (1):103–112.

- [207] K Sarvepalli, U Nath (2011) Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* accelerates multiple aspects of plant maturation. *Plant Journal* 67 (4):595–607.
- [208] MM Alonso-Peral, J Li, Y Li, RS Allen, W Schnippenkoetter, S Ohms, RG White, AA Millar (2010) The MicroRNA159-Regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed Cell Death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154 (2):757–771.
- [209] Y Jiao, OS Lau, XW Deng (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* 8 (3):217–230.
- [210] JJ Casal, C Fankhauser, G Coupland, MA Blázquez (2004) Signalling for developmental plasticity. *Trends in Plant Science* 9 (6):309–314.
- [211] E Liscum, DW Hodgson, TJ Campbell (2003) Blue Light Signaling through the Cryptochromes and Phototropins. So That's What the Blues Is All about. *Plant Physiology* 133 (4):1429–1436.

ANEXOS

ANEXO 1. Construcciones y cebadores utilizados en este trabajo

Tabla 1. Construcciones utilizadas en este trabajo

Construcción	Nombre	Descripción	Referencia
eGFP:HYL1 (S>D)	pNA027	Promotor 35S (Pro _{35S}) dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a aspartato	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S>A)	pNA028	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en extremo 3' al ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a alanina	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S42D)	pNA029	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S42D	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S159D)	pNA030	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S159D	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S42A)	pNA031	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S42A	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S159A)	pNA032	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S159A	Este trabajo
eGFP:HYL1	pNA035	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S>D)	pNA133	Promotor nativo de HYL1 (Pro _{HYL1}) dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a aspartato	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S>A)	pNA134	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a alanina	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S42D)	pNA041	Pro _{Hyl1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S42D	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S159D)	pNA042	Pro _{Hyl1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S159D	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S42A)	pNA043	Pro _{Hyl1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S42A	Este trabajo
eGFP:HYL1 (S159A)	pNA044	Pro _{Hyl1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la mutación S159A	Este trabajo
eGFP:HYL1	pNA045	Pro _{Hyl1} dirigiendo la expresión de <i>eGFP</i> fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1	Este trabajo
HYL1 (S>A)	pPM445	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a alanina	Este trabajo
HYL1 (S42D)	pNA046	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S42D	Este trabajo

HYL1 (S159D)	pNA047	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S159D	Este trabajo
HYL1 (S42A)	pNA048	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S42A	Este trabajo
HYL1 (S159A)	pNA049	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S159A	Este trabajo
HYL1	pPM416	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1	Este trabajo
HYL1 (S>A)	pPM419	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con 7 codones de serina mutadas a alanina	Manavella <i>et al.</i> , 2012
HYL1 (S42A)	pPM436	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S42D	Este trabajo
HYL1 (S159A)	pNA051	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S159D	Este trabajo
HYL1 (S42D)	pNA050	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S42A	Este trabajo
HYL1 (S159D)	pPM434	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la mutación S159A	Manavella <i>et al.</i> , 2012
HYL1	pPM442	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1	Este trabajo
GAL4AD:HYL1	pPM273	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1	Manavella <i>et al.</i> , 2012
GAL4AD:HYL1 (S42D)	pNA052	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con la mutación S42D	Este trabajo
GAL4AD:HYL1 (S42A)	pMA003	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con la mutación S42A	Este trabajo
GAL4AD:HYL1 (S159D)	pMA002	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con la mutación S159D	Este trabajo
GAL4AD:HYL1 (S159A)	pNA053	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con la mutación S159A	Este trabajo
GAL4BD:HYL1	pPM398	Dominio de unión de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1	Manavella <i>et al.</i> , 2012
GAL4BD:SE	pPM400	Dominio de unión de GAL4 fusionado al ADNc de SE	Manavella <i>et al.</i> , 2012
HYL1:GR	pNA060	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 fusionado en su extremo 3' al receptor de glucocorticoide de ratón (GR)	Este trabajo
HYL1 (S159D): GR	pNA096	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 S159D fusionado en su extremo 3' al GR	Este trabajo
HYL (S159A) : GR	pNA098	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 S159A fusionado en su extremo 3' al GR	Este trabajo
HYL1:YFP	pSW142	ADNc de HYL1 fusionada en su extremo 3' a YFP	Este trabajo
HYL1 ^{mNES} :YFP	pSW161	ADNc de HYL1 con las mutaciones en la señal de exportación nuclear (NES) fusionada en su extremo 3' a YFP	Este trabajo
NLS:YFP	pSW195	ADNc del péptido señal de localización nuclear (NLS) fusionado en su extremo 3' a YFP	Este trabajo

HYL1:6xMyc		Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 fusionado en su extremo 3' a 6xMyc	Cho <i>et al.</i> , 2014
HYL1 ^{mNES} :6xMyc	pSW163	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con las mutaciones en NES fusionado en su extremo 3' a 6xMyc	Este trabajo
HIS:HYL1		ADNc fusionado a un <i>tag</i> de histidina	Cho <i>et al.</i> , 2014
HYL1D6	pNA083	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
HYL1D5	pNA084	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin 5 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
HYL1D4	pNA085	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin 4 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
HYL1D3	pNA086	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin 3 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
HYL1D2	pNA087	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin 2 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
HYL1D1	pNA088	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 sin 1 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D6	pNA089	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D5	pNA090	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin 5 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D4	pNA091	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin 4 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D3	pNA092	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin 3 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D2	pNA093	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin 2 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1D1	pNA094	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 sin 1 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal	Este trabajo
eGFP:HYL1 ^{C-termS>A}	pNA171	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por alanina	Este trabajo

eGFP:HYL1 ^{C-termS>D}	pNA172	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por aspartato	Este trabajo
eGFP:HYL1 ^{C-termS>S}	pNA173	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de eGFP fusionada en su extremo 3' al ADNc de HYL1 con la secuencia nucleotídica del dominio C-terminal modificada	Este trabajo
HYL1 ^{C-termS>A}	pNA175	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por alanina	Este trabajo
HYL1 ^{C-termS>D}	pNA176	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por aspartato	Este trabajo
HYL1 ^{C-termS>S}	pNA177	Pro _{HYL1} dirigiendo la expresión del ADNc de HYL1 con la secuencia nucleotídica del dominio C-terminal modificada	Este trabajo
GAL4AD:HYL1D6	pAG031	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con las seis repeticiones del dominio C-terminal deletionadas	Este trabajo
GAL4AD:HYL1D5	pAG032	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con cinco repeticiones del dominio C-terminal deletionadas	Este trabajo
GAL4AD:HYL1D3	pAG034	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con tres repeticiones del dominio C-terminal deletionadas	Este trabajo
GAL4AD:HYL1D1	pAG035	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con una repetición del dominio C-terminal deletionada	Este trabajo
GAL4AD:HYL1 ^{C-termS>A}	pAG036	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con los codones de serinas fosforilables del dominio C-terminal cambiados a alanina	Este trabajo
GAL4AD:HYL1 ^{C-termS>D}	pAG037	Dominio de activación de GAL4 fusionado al ADNc de HYL1 con los codones de serinas fosforilables del dominio C-terminal cambiados a ácido aspártico	Este trabajo
6xHis:HYL1D6	pNA179	ADNc de HYL1 sin las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1D5	pNA180	ADNc de HYL1 sin 5 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1D4	pNA181	ADNc de HYL1 sin 4 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1D3	pNA182	ADNc de HYL1 sin 3 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1D2	pNA183	ADNc de HYL1 sin 2 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo

6xHis:HYL1D1	pNA184	ADNc de HYL1 sin 1 de las 6 repeticiones del dominio C-terminal fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1 ^{C-termS>A}	pNA185	ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por alanina fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1 ^{C-termS>D}	pNA186	ADNc de HYL1 con las serinas fosforilables del dominio C-terminal mutadas por aspartato fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1 ^{C-termS>S}	pNA187	ADNc de HYL1 con la secuencia nucleotídica del dominio C-terminal modificada fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo
6xHis:HYL1	pNA188	ADNc de HYL1 fusionado en su extremo 5' a un <i>tag</i> de histidina	Este trabajo

Tabla 2. Cebadores de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Gen/ARN pequeño	Secuencia	Utilizado en
<i>miR156a-f</i>	GTG CTC ACT CTC TTC TGT CA	sARN blot
<i>miR161a</i>	CCC CGA TGT AGT CAC TTT CAA	sARN blot
<i>miR168a-b</i>	TTC CCG ACC TGC ACC AAG CGA	sARN blot
<i>miR172</i>	TAT GCA GCA TCA TCA AGA TTC T	sARN blot
<i>miR319a</i>	GGG AGC TCC CTT CAG TCC AA	sARN blot
<i>miR396a</i>	TCA GTT CAA GAA AGC TGT GGA A	sARN blot
<i>U6</i>	GCT AAT CTT CTC TGT ATC GTT CC	sARN blot
<i>HYL1</i>	F: CAG AAG CAA GCC ACG CAT AAC R: CTC AAT CGA CCA CCA AAT TGT ACC	qPCR
<i>TCP4</i>	F: CAA CCG ATA CAG GAA ACG GAG R: CTG GTA TGC GAA AAC CCG AAG	qPCR
<i>ARF8</i>	F: CCA CCA CTG CCT TCT CCA R: TTC AGC AGC TAC CAC GAG CTG	qPCR
<i>GRF2</i>	F: CTT GGC CTG AAG AGC TGA CA R: GTG TGT GGA GGA AGG GGA TG	qPCR
<i>ACTIN2/8</i>	F: GGT AAC ATT GTG CTC AGT GGT GG R: GGA GAT CCA CAT CTG CTG GAA TG	qPCR
<i>Pri-miR156a</i>	F: GTT AAA ACT CAG ATC TAA CAC AAA G R: GAG AAC GAA GAC AGG CCA AAG	RT-PCR/RIP

<i>Pri-miR157c</i>	F: GAT GTT GCA TAT CAC ACA TAG R: ATG TGC GTA TAT GTA GGT TAG	RT-PCR/RIP
<i>Pri-miR159a</i>	F: GGT CTT TAC AGT TTG CTT ATG R: AGA AGG TGA AAG AAG ATG TAG	RT-PCR/RIP
<i>eGFP:HYL1</i>	F: CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G R: TTC GCC CTT TTA TGC GTG GC	Clonado
<i>HYL1:GR</i>	F: CAC CAT GAC CTC CAC TGA TGT TTC CTC R: TCA TTT TTG ATG AAA CAG AAG C	Clonado
<i>HYL1D6</i>	F: CAC CAT GAC CTC CAC TGA TGT TTC CTC R: TTA CTC TGA CTG ATC GTT TTG ACA ATG	Clonado
<i>HYL1D5-1</i>	F: CAC CAT GAC CTC CAC TGA TGT TTC CTC R: TTA CTC TGT CTC CAC ACT CCC AAA TGC	Clonado
<i>HYL1^{C-}</i> <i>termS>A/D/S</i>	F1: CAC CAT GAC CTC CAC TGA TGT TTC CTC R1: CAG TAG GTT GAG GTG GGA TGA TAA TAT CT F2: CCT GAA GAT ATT ATC ATC CCA CCT CAA C R2: TTC GCC CTT TTA GGC GTG AG	Clonado

ANEXO 2. Niveles de expresión de miARNs. Relativo a la Figura 18

Tabla 3. miARNs diferencialmente expresados en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad.

miARN	log2FoldChange	padj
miR156a-5p;miR156b-5p;miR156c-5p;miR156d-5p;miR156e;miR156f-5p	-3,33	0,000124
miR156g	-3,96	0,00149
miR156h	-3,08	0,0222
miR157a-5p;miR157b-5p;miR157c-5p	-3,54	2,93E-05
miR158a-3p	-4,96	1,15E-10
miR158b	-3,62	0,000199
miR159a	-3,8	0,00845
miR159b-3p	-3,82	0,00834
miR161.1	-1,5	0,00897
miR162a-3p;miR162b-3p	-3,67	7,87E-05
miR163	-3,58	3,95E-07
miR167d	-4,41	2,95E-05
miR168a-5p;miR168b-5p	-3,25	0,00145
miR170-3p	-3,07	0,0491
miR171b-3p;miR171c-3p	-3,92	0,00149
miR172a;miR172b-3p	-3,22	0,00964
miR173-5p	-3,33	0,0191
miR319a;miR319b	-3,95	2,43E-06
miR319c	-3,77	2,18E-06
miR390a-5p;miR390b-5p	-2,99	0,000201
miR391-5p	-3,17	0,0114
miR393a-5p;miR393b-5p	-2,95	0,000718
miR396a-5p	-3,33	2,91E-05
miR398b-3p;miR398c-3p	-5,58	3,95E-07
miR399b;miR399c-3p	-3,59	0,000326
miR403-3p	-3,09	0,000394
miR775	-3,72	0,00133
miR823	-3,88	0,00183
miR825	-5,37	3,95E-07
miR829-3p.1	-3,52	0,00129
miR840-5p	-3,64	1,78E-05
miR848	-2,81	0,0264
miR850	-2,55	0,000635
miR861-3p	-2,45	0,0421
miR863-3p	-4,18	0,00164
miR869.2	-3,79	0,00528

Tabla 4. miARNs sin diferencia significativa en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad.

miARN	log2FoldChange	padj
miR159c	-2,94	NA
miR160a-5p;miR160b;miR160c-5p	-1,42	NA
miR164a;miR164b-5p	-4	NA
miR165a-3p;miR165b	-1,28	0.0897
miR166a-3p;miR166b-3p;miR166c;miR166d;miR166e-3p;miR166f;miR166g	-0,81	0.278
miR167a-5p;miR167b	-3,38	NA
miR167c-5p	-0,22	NA
miR169a-5p	-2,83	0.0897
miR169b-5p;miR169c	-3,17	NA
miR169d;miR169e;miR169f-5p;miR169g-5p	-2,48	NA
miR169h;miR169i;miR169j;miR169k;miR169l;miR169m;miR169n	-4,09	NA
miR171a-3p	-3,04	NA
miR172c;miR172d-3p	-1,69	NA
miR391-3p	-2,66	0.0697
miR394a;miR394b-5p	-5,47	NA
miR395a;miR395d;miR395e	-2,64	NA
miR395b;miR395c;miR395f	-5,34	NA
miR396b-5p	-2,19	NA
miR397b	-2,31	NA
miR399a	-2,76	0.152
miR400	-3,75	NA
miR401	-2,41	NA
miR402	-2,5	0.205
miR404	-1,93	NA
miR405a;miR405b;miR405d	-1,74	NA
miR408-3p	-1,52	0.211
miR415	-3,24	0.105
miR416	-1,79	0.323
miR419	-2,71	0.166
miR447a-3p;miR447b	-3,06	0.0697
miR771	-2,97	NA
miR773a	-1,24	NA
miR777	-2,71	NA
miR781a;miR781b	-1,5	NA
miR822-5p	-3,96	NA
miR824-5p	-3,35	NA
miR827	-2,28	0.228
miR828	-2,26	NA
miR839-5p	-1,13	NA
miR842	-1,11	NA

miR843	-3,23	0.0621
miR844-5p	-2,44	NA
miR845a	-1,3	NA
miR845b	-2,71	0.125
miR846-3p	-1,9	0.223
miR847	-1,59	0.395
miR852	-1,94	NA
miR854a;miR854b;miR854c;miR854d;miR854e	-1,98	NA
miR855	-1,88	NA
miR858a	-1,13	NA
miR860	-2,65	NA
miR862-5p	-3,33	0.0952
miR862-3p	-1,85	NA
miR863-5p	-3,04	0.131
miR865-5p	-2,15	NA
miR866-5p	-1,64	0.382
miR866-3p	-1,27	NA

Tabla 5. miARNs con niveles de expresión por debajo del umbral de inclusión en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad.

miARN
miR157d
miR397a
miR398a-3p
miR399d
miR399e
miR399f
miR406
miR407
miR164c-5p
miR172e-3p
miR413
miR414
miR417
miR418
miR420
miR426
miR447c-3p
miR774a
miR776
miR778
miR779.1
miR780.2

miR782
miR826a
miR830-3p
miR831-3p
miR832-5p
miR834
miR835-5p
miR836
miR837-5p
miR838
miR849
miR851-5p
miR853
miR856
miR857
miR859
miR861-5p
miR864-5p
miR864-3p
miR865-3p
miR867
miR868-3p
miR869.1
miR870-3p
miR773b-5p
miR773b-3p
miR774b-5p
miR774b-3p
miR858b
miR826b

Tabla 6. miARNs diferencialmente expresados en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

miARN	log2FoldChange	padj
miR156a-5p;miR156b-5p;miR156c-5p;miR156d-5p;miR156e;miR156f-5p	-2,62	0,0133
miR157a-5p;miR157b-5p;miR157c-5p	-2,19	0,0233
miR158a-3p	-2,75	0,000858
miR159a	-5,27	0,0257
miR159b-3p	-3,88	0,0145
miR161.1	-2,55	0,0174
miR162a-3p;miR162b-3p	-5,07	2,87E-07
miR165a-3p;miR165b	-2,09	0,0255

miR171b-3p;miR171c-3p	-3,67	0,0193
miR172a;miR172b-3p	-1,32	0,0178
miR173-5p	-5,48	0,00315
miR319a;miR319b	-2,05	0,0233
miR319c	-3,22	0,000858
miR391-5p	-3,33	0,0415
miR393a-5p;miR393b-5p	-2,36	0,0372
miR396a-5p	-2,6	0,012
miR403-3p	-2,31	0,0255
miR775	-3,31	0,0255
miR823	-3,22	0,0488
miR825	-3,7	0,00275
miR829-3p.1	-3,77	0,012
miR840-5p	2,2	0,0119
miR848	-4	0,0233

Tabla 7. miARNs sin diferencia significativa en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

miARN	log2FoldChange	padj
miR156g	-1,68	0.372
miR156h	-1,12	0.632
miR158b	-1,31	0.334
miR159c	-3,73	NA
miR160a-5p;miR160b;miR160c-5p	-0,1	NA
miR163	-1,18	0.256
miR164a;miR164b-5p	-1,6	NA
miR166a-3p;miR166b-3p;miR166c;miR166d;miR166e-3p;miR166f;miR166g	-0,08	0.974
miR167a-5p;miR167b	-2,5	NA
miR167c-5p	-0,62	NA
miR167d	-2,04	0.145
miR168a-5p;miR168b-5p	-0,23	0.953
miR169a-5p	-1,21	0.69
miR169b-5p;miR169c	-2,24	0.294
miR169d;miR169e;miR169f-5p;miR169g-5p	-1,42	NA
miR169h;miR169i;miR169j;miR169k;miR169l;miR169m;miR169n	-2	NA
miR170-3p	-2,82	0.238
miR171a-3p	-1,69	NA
miR172c;miR172d-3p	-1,23	NA
miR390a-5p;miR390b-5p	-0,15	0.953
miR391-3p	-1,51	0.591
miR394a;miR394b-5p	-2,15	NA
miR395a;miR395d;miR395e	-1,05	NA

miR395b;miR395c;miR395f	-0,53	NA
miR396b-5p	-0,82	NA
miR397b	-0,62	NA
miR398b-3p;miR398c-3p	-0,88	0.678
miR399a	1,2	0.69
miR399b;miR399c-3p	0,07	0.974
miR400	-4,14	NA
miR401	0,14	0.974
miR402	-2,43	NA
miR404	-0,34	NA
miR405a;miR405b;miR405d	-0,48	NA
miR408-3p	-0,91	0.69
miR415	-1,27	0.713
miR416	-0,23	0.974
miR419	-0,83	0.849
miR447a-3p;miR447b	-3,32	0.198
miR771	-1,86	NA
miR773a	-1,75	NA
miR777	-0,98	NA
miR781a;miR781b	-2,3	NA
miR822-5p	-0,9	NA
miR824-5p	-2,7	NA
miR827	0,08	0.983
miR828	-0,83	NA
miR839-5p	-0,47	NA
miR842	-0,58	NA
miR843	-1,67	0.632
miR844-5p	-1,38	NA
miR845a	-0,99	NA
miR845b	-1,27	0.696
miR846-3p	-1,32	0.688
miR847	-1,85	NA
miR850	3,1	NA
miR852	-0,75	NA
miR854a;miR854b;miR854c;miR854d;miR854e	0,91	0.827
miR855	-0,04	0.991
miR858a	-0,31	NA
miR860	-2,39	NA
miR861-3p	-1,48	0.471
miR862-5p	-2,29	0.494
miR862-3p	-2,37	NA
miR863-5p	-2,24	NA
miR863-3p	-2,64	0.141
miR865-5p	-1,63	NA

miR866-5p	-1,76	NA
miR866-3p	0,19	NA
miR869.2	-2,62	0.235

Tabla 8. miARNs con niveles de expresión por debajo del umbral de inclusión en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

miARN
miR157d
miR397a
miR398a-3p
miR399d
miR399e
miR399f
miR406
miR407
miR164c-5p
miR172e-3p
miR413
miR414
miR417
miR418
miR420
miR426
miR447c-3p
miR774a
miR776
miR778
miR779.1
miR780.2
miR782
miR826a
miR830-3p
miR831-3p
miR832-5p
miR834
miR835-5p
miR836
miR837-5p
miR838
miR849
miR851-5p
miR853
miR856
miR857
miR859
miR861-5p
miR864-5p
miR864-3p
miR865-3p
miR867

miR868-3p
miR869.1
miR870-3p
miR773b-5p
miR773b-3p
miR774b-5p
miR774b-3p
miR858b
miR826b

ANEXO 3. Niveles de expresión de genes. Relativo a la Figura 19

Tabla 9. Genes diferencialmente expresados en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad.

Gen	Nombre	log2FoldChange	padj
AT4G14680	APS3	6,05	0,0036
AT2G28190	CSD2	3,9	0,0006
AT3G15030	TCP4	3,71	0,0006
AT4G18390	TCP2	3,57	0,0411
AT2G39250	SNZ	3,51	0,0135
AT4G37740	GRF2	3,2	0,0205
AT2G31070	TCP10	2,82	0,0006
AT3G60630	HAM2	2,63	0,0019
AT2G28550		2,35	0,0043
AT4G30080	ARF16	2,24	0,0011
AT2G41720	EMB2654	2,2	0,0093
AT2G34710	PHB	1,9	0,0061
AT3G22890	APS1	1,83	0,0006
AT5G37020	ARF8	1,7	0,0327
AT3G15640		1,54	0,0024
AT1G76810	eIF-2	1,32	0,0019
AT5G06100	MYB33	1,76	0,0500
AT2G33770	PHO2	2,32	0,0006
AT3G09220	LAC7	5,45	0,0024
AT1G66700	PXMT1	N/A(no detectable en luz)	0,0006
AT3G12977	NAC	N/A(no detectable en luz)	0,0006
AT3G16710	PPR4	N/A(no detectable en luz)	0,0176

Tabla 10. Genes sin diferencia significativa en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad.

Gen	log2FoldChange	padj
AT3G52910	-6,94	0,403
AT3G57920	-6,55	0,583
AT2G30210	-6,15	0,443
AT2G42200	-5,26	0,255
AT1G62630	-4,89	0,444
AT2G38080	-4,47	0,434
AT3G15270	-4,3	0,497
AT3G17185	-4,12	0,463
AT1G62910	-3,13	0,133
AT5G43740	-3,1	0,06
AT2G33810	-3,01	0,487
AT2G35160	-2,43	0,48

AT1G63230	-2,18	0,511
AT5G39710	-2,06	0,161
AT1G62860	-2,03	0,526
AT2G02850	-1,91	0,186
AT1G63130	-1,65	0,26
AT5G50670	-1,61	0,182
AT4G19440	-1,6	0,157
AT2G22740	-1,57	0,109
AT5G50570	-1,48	0,171
AT1G62670	-1,45	0,583
AT5G43270	-1,41	0,12
AT3G45090	-1,28	0,153
AT2G28350	-1,19	0,071
AT1G63360	-1,18	0,289
AT3G23690	-1,04	0,197
AT4G32880	-1,03	0,226
AT2G39675	-0,92	0,795
AT4G00150	-0,87	0,243
AT1G62590	-0,83	0,828
AT4G03190	-0,72	0,415
AT1G63080	-0,68	0,661
AT5G41170	-0,33	0,813
AT5G10180	-0,21	0,621
AT3G62980	-0,2	0,634
AT3G26810	-0,19	0,696
AT4G36920	-0,13	0,892
AT3G44860	0,08	0,928
AT3G54990	0,13	0,898
AT2G22840	0,18	0,908
AT2G45160	0,2	0,716
AT2G39681	0,29	0,785
AT5G43780	0,54	0,191
AT2G36400	0,62	0,73
AT3G57230	0,63	0,379
AT5G53890	0,84	0,459
AT2G27400	0,93	0,57
AT1G63150	1,02	0,674
AT1G69170	1,05	0,548
AT5G46680	1,07	0,812
AT3G20910	1,08	0,738
AT1G63400	1,19	0,441
AT1G62930	1,45	0,354
AT3G05690	1,55	0,283
AT3G22470	1,55	0,569

AT1G77850	1,56	0,265
AT5G12840	1,97	0,531
AT5G41610	2,28	0,454
AT1G72830	2,53	0,456
AT3G11440	2,98	0,455
AT5G43730	3,26	0,442
AT5G07680	3,37	0,442
AT5G39610	9,09	0,382
AT3G22700	N/A(no detectable en luz)	0,163

Tabla 11. Genes con niveles de expresión por debajo del umbral de inclusión en plantas Col-0 crecidas en luz vs transferidas a oscuridad

Gen
AT1G62720
AT1G63070
AT1G63330
AT1G64100
AT1G64580
AT1G66690
AT1G66720
AT2G26950
AT2G29130
AT2G32460
AT2G47460
AT3G03580
AT3G08500
AT3G15170
AT3G17265
AT3G17490
AT3G19890
AT3G22720
AT3G44870
AT3G60460
AT4G10780
AT4G14140
AT4G24150
AT4G26800
AT4G26930
AT4G27190
AT4G34060
AT5G05400
AT5G06510
AT5G16640

AT5G23480
AT5G38550
AT5G47260
AT5G51270
AT5G53660
AT5G53950
AT5G55020

Tabla 12. Genes diferencialmente expresados en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

Gen	Nombre	log2FoldChange	padj
AT1G63360	LRR	1,62	0,0160
AT1G76810	eIF-2	1,44	0,0011
AT2G28190	CSD2	0,89	0,0011
AT2G30210	LAC3	2,69	0,0166
AT2G31070	TCP10	1,3	0,0143
AT2G39250	SNZ	2,9	0,0500
AT3G16710	PPR4	N/A(no detectable en luz)	0,0006
AT3G22890	APS1	0,96	0,0006
AT3G52910	GRF4	1,86	0,0140
AT4G14680	APS3	1,21	0,0043
AT4G30080	ARF16	1,43	0,0182
AT5G53660	GRF7	N/A(no detectable en luz)	0,0006

Tabla 13. Genes sin diferencia significativa en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

Gen	log2FoldChange	padj
AT1G77850	2,64	0,063
AT3G05690	2,75	0,072
AT2G27400	2,3	0,074
AT1G69170	2,34	0,075
AT3G62980	-0,71	0,081
AT1G63130	1,57	0,082
AT4G18390	-1,07	0,113
AT3G15030	-0,66	0,131
AT5G43780	-0,68	0,133
AT3G15640	-0,65	0,137
AT3G09220	2,02	0,139
AT1G62630	2,29	0,189
AT5G53950	N/A(no detectable en luz)	0,196
AT2G42200	1,8	0,213
AT3G57230	0,83	0,228

AT1G63080	1,71	0,242
AT4G19440	-1,2	0,291
AT1G63400	2,88	0,298
AT3G26810	-0,54	0,302
AT2G22840	1,17	0,306
AT2G39675	2,12	0,331
AT5G43740	-0,7	0,344
AT1G62930	1,44	0,351
AT1G62670	1,39	0,357
AT1G62590	2,88	0,371
AT5G39610	3,76	0,4
AT5G37020	0,49	0,424
AT5G43270	0,53	0,426
AT1G72830	3,12	0,441
AT2G28350	-0,5	0,442
AT4G32880	0,51	0,443
AT3G03580	2,57	0,447
AT5G53890	0,89	0,448
AT1G63150	2,92	0,449
AT4G37740	-0,89	0,45
AT1G64580	3,06	0,45
AT2G39681	0,71	0,452
AT3G11440	2,77	0,463
AT5G46680	2,13	0,493
AT5G23480	2,11	0,496
AT4G36920	0,57	0,497
AT1G62860	1	0,502
AT1G63330	2,27	0,507
AT3G22470	2,21	0,507
AT5G43730	2,08	0,523
AT2G35160	-0,82	0,535
AT5G06100	0,56	0,55
AT2G45160	-0,34	0,56
AT5G10180	0,23	0,579
AT3G44860	-0,53	0,585
AT2G02850	-0,9	0,587
AT2G33770	-0,24	0,596
AT3G23690	0,34	0,605
AT2G22740	-0,36	0,622
AT5G41170	0,1	0,629
AT1G63230	-0,82	0,639
AT2G29130	0,79	0,644
AT4G26800	2,27	0,644
AT5G12840	0,82	0,65

AT3G20910	1,05	0,654
AT3G57920	0,98	0,672
AT4G00150	0,26	0,681
AT3G17185	-0,29	0,692
AT2G36400	0,97	0,759
AT5G06510	1,58	0,767
AT4G03190	-0,23	0,767
AT2G38080	0,32	0,781
AT5G39710	-0,26	0,787
AT2G33810	0,4	0,798
AT3G54990	0,28	0,799
AT5G50670	-0,18	0,812
AT2G34710	0,09	0,863
AT3G60630	-0,1	0,873
AT2G41720	-0,06	0,914
AT5G07680	0,25	0,928
AT2G28550	-0,05	0,934
AT5G50570	-0,05	0,952
AT3G15270	-0,04	0,969
AT3G45090	0,01	0,987
AT1G62910	0	0,999

Tabla 14. Genes con niveles de expresión por debajo del umbral de inclusión en plantas Col-0 vs hyl1-2 crecidas en fotoperiodo de DL (Luz).

Gen	
AT1G62720	AT3G22720
AT1G63070	AT3G44870
AT1G64100	AT3G60460
AT1G66690	AT4G10780
AT1G66700	AT4G14140
AT1G66720	AT4G24150
AT2G26950	AT4G26930
AT2G32460	AT4G27190
AT2G47460	AT4G34060
AT3G08500	AT5G05400
AT3G12977	AT5G16640
AT3G15170	AT5G38550
AT3G17265	AT5G41610
AT3G17490	AT5G47260
AT3G19890	AT5G51270
AT3G22700	AT5G55020