

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**“Mecanismos no canónicos de regulación de
la expresión génica mediados por ARNs
pequeños en plantas”**

Lic. Delfina Gagliardi

Director de Tesis: Dr. Pablo A. Manavella

Laboratorio de Biología del ARN

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

-2022-

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.

A CONICET, por financiar este posgrado al otorgarme una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado.

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

Al Dr. Pablo A. Manavella por confiar en mí desde un principio para formar parte de su grupo de trabajo, por dirigirme y enseñarme desde 2014, sin dudas fue un camino largo en el que aprendí muchísimo. Gracias por transmitirme tu pasión por el trabajo y por la ciencia, a que con esfuerzo todo se puede lograr.

A mis compañeros de laboratorio, Agus, Dac, Nati, Axel, Luci, Regi, gracias por la buena onda, el compañerismo, el aguante. Gracias Dac por transmitirme ese entusiasmo incansable, por la motivación diaria, trabajar con vos a la par estuvo de lujo (dirías vos) y también aprendí mucho.

A mis amigos, los de siempre, los compas del IAL, gracias por hacer de este camino con idas y vueltas y complicado, más fácil y más feliz, gracias por el aguante.

A Dieguito, gracias por enseñarme a no rendirme, y a potenciarme siempre. Por bancarme en los momentos difíciles y por acompañarme y festejar conmigo mis logros por más pequeños que sean. Fuiste, sos y serás una persona super importante en mi vida.

A mi familia, por estar siempre bancando y acompañándome en todo. A mis hermanos, aunque estén lejos, los siento cerca siempre. Gracias por festejar mis logros y enseñarme a no bajar los brazos e ir siempre para adelante, por más difícil que sea. Soy lo que soy gracias a ustedes.

Aportes Científico-Tecnológicos Publicaciones

AH Tomassi, **D Gagliardi**, DA Cambiagno, PA Manavella (2017) Nonradioactive Detection of Small RNAs Using Digoxigenin-Labeled Probes. *Methods Mol. Biol.* 1640:199–210.

D Gagliardi, DA Cambiagno, AL Arce, AH Tomassi, JI Giacomelli, FD Ariel, PA Manavella (2019) Dynamic regulation of chromatin topology and transcription by inverted repeat-derived small RNAs in sunflower. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (35):17578–17583.

D Gagliardi y PA Manavella (2020) Short-range regulatory chromatin loops in plants. *New Phytologist.* 228: 466–471.

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. *Mol. Plant.* 14, 426–439.

1. Índice

1. Índice	4
2. Abreviaturas y símbolos	9
3. Resumen	15
4. Abstract	17
5. Introducción	20
6. Objetivos	25
7. Capítulo 1	27
7.1 Introducción	27
7.1.1 Los het-siRNAs y su rol en plantas: mecanismo canónico de la metilación del ADN mediada por ARNs	27
7.1.2 Patrones de metilación del ADN en plantas: funciones y como se generan.....	29
7.1.3 Conservación de las marcas de metilación del ADN.....	30
7.1.4 Vías no canónicas de RdDM que desencadenan metilación del ADN ...	31
7.1.5 Diversidad de TEs en plantas: clasificación y funciones	32
7.1.6 Marcas epigenéticas y estructura tridimensional del genoma	34
7.1.7 Interacciones de largo alcance	35
7.1.8 Interacciones de corto alcance	36
7.1.9 Gene looping	37
7.1.10 Loops intragénicos	37
7.1.11 Bucles de genes que afectan a transcritos divergentes y antisentido...	38
7.1.12 Bucles intergénicos.....	39
7.1.13 Bucles entre promotores y otros elementos reguladores	39
7.1.14 ARNs pequeños, metilación del ADN y su influencia en interacciones de cromatina de corto alcance	41

7.2	Objetivos	43
7.3	Materiales y métodos	44
7.3.1	Plásmidos.....	44
7.3.2	Cepas bacterianas.....	45
7.3.3	Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos.....	45
7.3.4	Construcciones.....	46
7.3.5	Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	47
7.3.6	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	47
7.3.7	Purificación de fragmentos de ADN	48
7.3.8	Clonados en vectores de entrada y vectores destino.....	48
7.3.9	Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	49
7.3.10	Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico ...	49
7.3.11	Minipreparación de ADN plasmídico.....	50
7.3.12	Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	50
7.3.13	Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
7.3.14	Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Helianthus annuus</i>	51
7.3.15	Chop-qPCR	52
7.3.16	Secuenciación post tratamiento con Bisulfito de sodio.....	52
7.3.17	Captura de la conformación del cromosoma.....	53
7.3.18	Inmunoprecipitación de la cromatina	54
7.3.19	Aislamiento de ARN de plantas	55
7.3.20	Transcripción reversa (RT)	55
7.3.21	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	55
7.3.22	<i>Northern blot</i> no radioactivo para la detección de ARNs pequeños (small RNA blot).....	56
7.3.23	Secuenciación de ARNs pequeños.....	56
7.3.24	Transformación estable de plantas de <i>A. thaliana</i> por inmersión floral... 57	
7.3.25	Transformación transitoria de plantas de <i>Helianthus annuus</i>	57

7.3.26	Tinción histoquímica GUS	58
7.3.27	Análisis de las librerías de sRNA-seq	58
7.3.28	Identificación de copias adicionales del <i>ncRNA-W6</i>	59
7.3.29	Predicción de repeticiones invertidas en el genoma del girasol	59
7.4	Resultados y discusión.....	63
7.4.1	Un ncRNA derivado de IR es transcrito desde la región proximal regulatoria del gen <i>HaWRKY6</i>	63
7.4.2	Abundantes sRNAs son producidos a partir del transcripto <i>ncW6</i>	64
7.4.3	<i>NcW6</i> modula la formación de bucles alternativos en la cromatina en el <i>locus HaWRKY6</i>	69
7.4.4	El promotor <i>HaWRKY6</i> controla la expresión tanto del gen <i>HaWRKY6</i> como del <i>ncW6</i>	73
7.4.5	El bucle L1 cambia la direccionalidad de la transcripción en el <i>locus HaWRKY6</i> en cotiledones.	75
7.5	Conclusiones.....	77
8.	Capítulo 2.....	81
8.1	Introducción.....	81
8.1.1	microRNAs: pequeñas moléculas con un gran impacto en el silenciamiento génico post-transcripcional.....	81
8.1.2	Biogénesis de miRNAs	81
8.1.3	Transcripción de los genes <i>MIR</i> y su regulación.....	84
8.1.4	Complejo MEDIATOR y su rol en biogénesis de miRNAs.....	85
8.1.5	Acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento de los pri-miRNAs	85
8.1.6	El complejo de procesamiento de los pri-miRNAs	86
8.1.7	Exportación nuclear de miRNAs y ensamblado del complejo miRISC ...	88
8.1.8	¿Cuál es el rol de HASTY en la biogénesis de miRNAs?.....	90
8.1.9	La asociación entre HST y HWS.....	93
8.2	Objetivos.....	95
8.3	Materiales y métodos	96
8.3.1	Plásmidos.....	96

8.3.2	Cepas de bacterias y levaduras utilizadas	97
8.3.3	Material vegetal y condiciones de cultivo	97
8.3.4	Construcciones	97
8.3.7	Reacción en cadena de la polimerasa de extensión superpuesta ("Overlapping PCR")	98
8.3.13	Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con CTAB	100
8.3.19	Transformación transitoria de plantas de <i>N. benthamiana</i> por agroinfiltración	101
8.3.20	Tinción de raíces con fucsina básica	101
8.3.21	Separación de tejidos vasculares y epidérmicos en hojas de <i>A. thaliana</i>	102
8.3.22	Extracción de proteínas totales de <i>A. thaliana</i>	102
8.3.23	Separación de proteínas y análisis por <i>Western blot</i>	102
8.3.24	Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	103
8.3.25	Ensayos de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP) seguido de <i>Western blot</i>	104
8.3.26	Co-transformación de levaduras	105
8.3.27	Ensayos de doble híbrido en levaduras	106
8.3.28	Mutagénesis en semillas de <i>A. thaliana</i> con etil-metano-sulfonato (EMS)	106
8.3.29	" <i>Suppressor screening</i> " por mutagénesis con EMS	107
8.3.30	Generación de los grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo	107
8.3.31	Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación	108
8.4	Resultados y discusión.....	116
8.4.1	Identificación de plantas mutantes capaces de suprimir el fenotipo <i>hst-15</i>	116
8.4.2	Una mutación en HWS es capaz de revertir el fenotipo de la mutante <i>hst-15</i>	120
8.4.3	HWS regula negativamente la biogénesis de miRNAs y tendría un efecto indirecto sobre HST	121

8.4.4	HWS interactúa con las proteínas MED promoviendo su degradación en los <i>loci</i> específicos de los genes <i>MIR</i>	126
8.4.5	Mutaciones en HWS son capaces de restaurar el movimiento de miRNAs, deficiente en mutantes <i>hst-15</i>	129
8.5	Conclusiones	131
9.	Conclusiones	135
10.	Bibliografía	139

2. Abreviaturas y símbolos

μL: Microlitros

μM: Micromolar

μmoles: Micromoles

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

3C: captura de la conformación del cromosoma (del inglés *Chromosome Conformation Capture*)

AD: Dominio de Activación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

BD: Dominio de unión

BIFC: Complementación bimolecular de la fluorescencia (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina

cis/trans-natsiRNAs: ARNs pequeños de interferencia antisentido naturales en *cis* o en *trans* (del inglés *natural antisense RNAs*)

cm: Centímetros

Co-IP: Co-inmunoprecipitación

Col-0: Ecotipo Columbia

Abreviaturas y símbolos

CPF: factor de escisión y poliadenilación (del inglés *Cleavage and Polyadenylation Factor*)

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

C-terminal: dominio Carboxilo terminal de una proteína.

CTs: Territorios cromosomales (del inglés *Chromosome Territories*)

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

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

OD: Densidad óptica

ds: Doble cadena (*double stranded*)

dsRBD: Dominio de unión a ARN doble cadena

dsRNA: ARN de doble cadena (del inglés *double-stranded RNA*)

DTT: Ditioneitol

easiRNAs: ARN pequeños de interferencia activados epigenéticamente (del inglés *epigenetically activated small interfering RNAs*)

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético

EEM: Error Estándar de la Media.

EMS: Metanosulfonato de etileno o etilmetanosulfonato

ESTs: Etiquetas de Secuencias Expresadas (del inglés *Expressed Sequence Tags*)

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

g: Gravedad o gramos

Gbm: metilación en el cuerpo del gen (del inglés *Gene body methylation*)

GFP: Proteína verde fluorescente

het-siRNAs: ARNs pequeños de interferencia heterocromáticos (del inglés *heterochromatic small interfering RNAs*).

hp-siRNAs: ARNs pequeños de interferencia derivados de horquillas (del inglés *hairpin small interfering RNAs*)

HRP: *Horseradish peroxidase*

IgG: Inmunoglobulina G

HIIs: Islas interactivas heterocromáticas (del inglés *Interactive Heterochromatic Islands*)

Indels: inserciones-delecciones

IP-MS: Inmunoprecipitación seguido de espectrometría de masas (del inglés *Immunoprecipitation and Mass Spectrometry*)

IRs: secuencias repetidas invertidas (del inglés *Inverted Repeats*)

KEEs: Elementos unidos a KNOT (del inglés *KNOT Engaged Elements*)

kpb: kilo pares de bases

L: Litro

LB: Luria-Bertani

lncRNA: ARN no codificante largo (del inglés *long non-coding RNA*)

LTR: retrotransposones de Repetición Terminal Larga (del inglés *Long Terminal Repeat*)

M: Molar

m²: Metros cuadrados

mA: Miliamper/s

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

mg: Miligramo

miARN: Micro ARN

miliQ: Agua calidad miliQ

MIM: “*target mimicry*” (del inglés *miRNA target mimicry*, que significa “imitar el objetivo”)

miRNAs: micro ARNs

MITEs: Elementos Transponibles con repeticiones invertidas en Miniatura (del inglés *Miniature inverted-repeat Transposable Elements*)

ml: Mililitro

mm: Milímetros

mM: Milimolar (milimoles/litro)

mmol: Milimoles

MS: Medio de cultivo Murashige-Skoog

ncRNA: ARN no codificante (del inglés *non-coding RNA*)

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

nM: Nanomolar

nmol: Nanomoles

nt: Nucleótidos

N-terminal: dominio Amino terminal de una proteína.

ORF: marco abierto de lectura (del inglés *Open Reading Frame*)

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

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

phasiRNAs: ARN pequeños de interferencia en fase (del inglés *phased small interfering RNAs*)

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

pre-miRNA: Precursor de micro ARN

pri-miRNA: Transcripto primario de micro ARN

PTGS: silenciamiento génico post-transcripcional (del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*)

PVDF: Polifluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RBP: proteínas de unión a ARN (del inglés *RNA Binding Protein*)

RdDM: Metilación del ADN dirigida por ARN (del inglés *RNA-dependant DNA Methylation*).

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

RPKM: lecturas por kb por millón de lecturas mapeadas (del inglés *Reads Per Kilo base per Million mapped reads*)

RT: transcriptasa reversa (del inglés *Reverse Transcriptase*)

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

sRNAs: ARNs pequeños

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante

siRNAs: ARNs pequeños de interferencia (del inglés *small interfering RNAs*)

SNPs: Polimorfismos de Nucleótido Único (del inglés *Single-Nucleotide Polymorphisms*)

sRNAs: ARNs pequeños (del inglés *small RNAs*)

sRNA-seq: Secuenciación masiva de sRNAs

ssRNA: ARN monocatenario (del inglés *single stranded RNA*)

TADs: dominios asociados topológicamente (del inglés *Topologically Associated Domains*)

TAE: Tris Acético EDTA

tasiRNAs: ARN pequeños de interferencia actuantes en trans (del inglés *trans acting small interfering RNAs*)

TBE: Tris Boro EDTA

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

Abreviaturas y símbolos

TEs: Elementos Transponibles (del inglés *Transposable Elements*)

TGS: silenciamiento génico transcripcional (del inglés *Transcriptional Gene Silencing*)

TSS: sitio de inicio de la transcripción (del inglés *Transcriptional Start Site*)

TTS: sitio de terminación de la transcripción (del inglés *Transcriptional Termination Site*)

UTR: regiones no traducidas (del inglés *Untranslated Regions*)

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

V: Volts

3. Resumen

La correcta y precisa expresión génica requiere de complejos mecanismos de regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. En este sentido, los ARNs pequeños (sRNAs) cumplen un rol fundamental en la mayoría de los procesos biológicos en organismos superiores. En plantas, aproximadamente el 75% de los sRNAs pertenecen al subgrupo de ARNs pequeños heterocromáticos (het-siRNAs). Estos sRNAs de 24 nucleótidos (nt) tienen como función principal controlar la actividad de elementos transponibles (TEs), con el fin último de conservar la integridad del genoma. Los het-siRNAs impiden la transposición de TEs mediante un proceso conocido como metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM), que implica la metilación *de novo* de *loci* específicos. Por lo general, las modificaciones epigenéticas inducidas por RdDM desencadenan la condensación de nucleosomas y un silenciamiento permanente de los *loci* afectados. En la primera parte de este trabajo, mostramos que un elemento repetido invertido (IR) derivado de un TE, insertado cerca del *locus HaWRKY6* de girasol, regula dinámicamente la expresión del gen codificado al alterar la topología de la cromatina en la región. Los transcriptos de este IR se procesan en sRNAs de 24 nt, desencadenando la metilación del propio IR, así como también de otras dos regiones presentes en el *locus*. Estas marcas epigenéticas, estabilizan la formación de diferentes bucles en la cromatina que afectan la expresión génica de maneras específicas de acuerdo al tejido. En hojas, se forma un bucle intragénico que bloquea la transcripción de *HaWRKY6* al interrumpir el progreso de la ARN polimerasa II (RNAPII) a lo largo del gen. Mientras que, en cotiledones, la formación de un bucle alternativo, que abarca todo el gen *HaWRKY6*, mejora la transcripción del gen en un fenómeno conocido como "gene-looping" donde la RNAPII se recicla más eficientemente. La primera parte de esta tesis, proporciona evidencia de que los TEs pueden actuar como elementos reguladores activos y dinámicos en un mecanismo que combina el silenciamiento de ARN, modificaciones epigenéticas y las maquinarias de remodelación de la cromatina.

El segundo tipo de sRNA más abundante en plantas corresponde a los micro ARNs (miRNAs). Estas moléculas, de ~21 nt de longitud, son los componentes centrales de la maquinaria de silenciamiento génico post-transcripcional regulando la mayoría de las vías de desarrollo y de respuesta al estrés en plantas. La biogénesis de miRNAs involucra, además de numerosos cofactores, a la proteína HASTY (HST). Desde su descubrimiento, se propuso que HST era capaz de exportar los miRNAs desde el núcleo al citoplasma en plantas, premisa basada en su homología con la EXPORTINA 5 humana que cumple dicha función. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que

HST interactúa con el complejo Mediator (MED), particularmente con MED37D/E, actuando como un andamio para reclutar DCL1 a los *loci* que codifican genes *MIR*. La evidencia sugiere que HST promueve la transcripción y el procesamiento de los precursores primarios de los miRNAs, así como la actividad no autónoma celular de los miRNAs, pero no participa en su exportación. Con el objetivo de dilucidar la función de HST, en la segunda parte de esta tesis realizamos una búsqueda, mediante mutagénesis al azar, de supresores del fenotipo característico de la mutante *hst-15*. Entre las plantas con una reversión del fenotipo identificamos un nuevo alelo mutante del gen que codifica para la proteína de tipo F-box HAWAIIAN SKIRT (HWS). Esta proteína, se ha relacionado previamente con la biogénesis de miRNAs, pero su papel sigue siendo incierto. Además, las plantas que expresan constitutivamente la versión completa de HWS, pero no una versión trunca que carece del dominio F-box, muestran fenotipos morfológicos y moleculares que se asemejan a los de mutantes defectuosos en la biogénesis y actividad de miRNAs. En la segunda parte de nuestro trabajo, exploramos la relación molecular entre HWS y HST para regular la vía de miRNAs. Nuestros datos sugieren que HWS no afecta directamente la estabilidad de HST, sino que es capaz de interactuar con diferentes componentes del complejo MED *in vivo* promoviendo su degradación.

4. Abstract

Correct and precise gene expression requires complex regulation mechanisms at transcriptional and post-transcriptional levels. In this sense, small RNAs (sRNAs) play a fundamental role in most biological processes of eukaryotic organisms. One of the most abundant types of sRNAs in plants are the heterochromatic siRNAs (het-siRNAs). These sRNAs of ~ 24-nucleotide (nt) in length, control the activity of transposable elements (TEs), with the ultimate goal of conserving the genome integrity. TEs are highly abundant in complex plant genomes, and het-siRNAs control their activity in a process known as RNA-dependent DNA methylation (RdDM) that involves *de novo* methylation of specific *loci*. Typically, RdDM-induced epigenetic modifications trigger nucleosome condensation and permanent silencing of affected *loci*. In the first part of this work, we show that a TE-derived inverted repeat (IR) element, inserted near the sunflower *HaWRKY6 locus*, dynamically regulates the expression of the encoded gene by altering chromatin topology in different ways. Transcripts from the IR are processed into 24 nt sRNAs, triggering the methylation of the IR itself and two other regions in the *locus*. These epigenetic marks, stabilize the formation of two particular chromatin loops in different tissues that affect gene expression in specific ways. In leaves, an intragenic loop is formed that blocks transcription of *HaWRKY6* by interrupting the progress of RNA polymerase II (RNAPII) along the gene. Whereas, in cotyledons, the formation of an alternative loop, which encompasses the entire *HaWRKY6* gene, enhances gene transcription in a phenomenon known as "gene-looping" where RNAPII is recycled along the gene. The first part of this thesis provides evidence that TEs can act as active and dynamic regulatory elements within coding *loci* in a mechanism that combines RNA silencing, epigenetic modification, and chromatin remodeling machineries.

On the other hand, another fundamental component responsible of controlling gene expression in plants are miRNAs, 21 to 24-nt molecules that regulate most development pathways and stress responses. In its biogenesis, in addition to numerous cofactors, it is known that HASTY (HST) protein is involved. Since it was first identified, this protein was proposed to be capable of exporting plant miRNAs from the nucleus to the cytoplasm, a premise based on its homology to human EXPORTIN 5, which is known to have this function. Recently, HST has been shown to interact with the Mediator Complex (MED), particularly MED37D/E, and act as a scaffold to recruit DCL1 to *MIR* gene *loci*. Such interaction promotes transcription and processing of pri-miRNAs, and the non-cellular autonomous function of miRNAs, ruling out its role in the export of processed miRNAs. In the second part of this thesis, we performed a suppressor screening of *hst*-

Abstract

15 mutants with the aim of elucidating the role of HST. Among the isolated plants displaying a reversion of the typical *hst-15* phenotype, we identified a new mutant allele of the F-box gene encoding HAWAIIAN SKIRT (HWS). This protein was previously related to the biogenesis of miRNAs, but its role remains uncertain. Furthermore, plants constitutively expressing the full-length version of *HWS*, but not a truncated version lacking the F-box domain, show morphological and molecular phenotypes that resemble those of mutants defective in miRNA biogenesis and activity. We explored the crosstalk between HWS and HST in regulating the miRNAs pathway. Our data suggest that HWS does not directly affect HST stability, but is capable of interacting with different components of the MED complex *in vivo*, promoting its degradation.

INTRODUCCIÓN

5. Introducción

El desarrollo de las plantas, su metabolismo y las respuestas al estrés, así como la mayoría de sus funciones, dependen de la correcta regulación de la expresión génica. Esto se logra mediante múltiples mecanismos que actúan tanto a nivel de la transcripción como posteriores a la transcripción. Una vez transcritos, la estabilidad de los ARN mensajeros (ARNm) depende de diversas señales que incluso pueden depender de secuencias específicas dentro de las moléculas de ARN. Uno de los mecanismos más importantes de regulación génica dependiente de secuencias, involucra la acción de ARNs pequeños (**sRNAs**, del inglés **small RNAs**) [1]. Los tejidos vegetales acumulan una gran variedad de sRNAs de entre 18 y 25 nt de longitud. En líneas generales, estas moléculas actúan reprimiendo la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [2],[3]. Además de sus roles en el patrón de desarrollo y el mantenimiento de la integridad del genoma, los sRNAs también son componentes integrales de las respuestas de las plantas a distintas condiciones ambientales adversas [4]–[6].

En plantas, todos los ARNs pequeños se producen a partir de precursores de ARN doble cadena (**dsRNA**, del inglés **double-stranded RNA**), los cuales son reconocidos y procesados por distintas proteínas DICER LIKE (DCL) [7],[8]. Estos intermediarios de dsRNA, pueden derivar de transcritos superpuestos en sentido y antisentido, de transcritos con regiones invertidas y repetidas o bien a partir de la acción de polimerasas dependientes de ARN (**RDR**, del inglés **RNA Dependant RNA Polymerase**) sobre moldes de ARN monocatenario (**ssRNA**, del inglés **single stranded RNA**). Una vez procesados estos dsRNAs, se generan dúplex de sRNA que se asocian a alguna de las proteínas ARGONAUTA (AGO) para cumplir su función. El complejo AGO-sRNA, conocido como RISC (del inglés **RNA-Induced Silencing Complex**), es capaz de unirse a ARNs blanco por complementariedad de bases. El posterior silenciamiento génico puede darse a nivel transcripcional (**TGS**, del inglés **Transcriptional Gene Silencing**), o a nivel post-transcripcional (**PTGS**, del inglés **Post-Transcriptional Gene Silencing**).

La duplicación de genes que codifican para proteínas DCL y RDR en plantas resultó en la diversificación de ARNs pequeños [9],[10], mientras que la variedad de proteínas AGO resultó en el desarrollo de distintos procesos de silenciamiento de genes basados en afinidades diferenciales de AGO con dúplex de ARNs pequeños [11] (Figura 1). En *Arabidopsis thaliana* existen 4 proteínas DCL que usan distintos tipos de dsRNAs como sustrato para generar ARNs pequeños con distintas funciones. Con respecto a los

precursores, se pueden definir dos grandes grupos de sRNAs. Por un lado, están aquellos que se producen a partir de precursores de dsRNA con apareamiento perfecto entre las hebras, conocidos como ARNs pequeños de interferencia (**siRNAs** del inglés *small interfering RNAs*), y aquellos que derivan de moléculas de ARN simple cadena que se pliegan sobre sí mismas formando estructuras de ARN doble cadena de apareamiento imperfecto, conocidos como micro ARNs (miRNAs) [1],[12]. Estas dos grandes clases, a su vez, pueden dividirse en distintos subgrupos (Figura 1) en función de los mecanismos de biogénesis involucrados, así como también el tamaño y la función de cada sRNA [1],[13]. Los miRNAs son producidos por DCL1 y mayoritariamente cargados en AGO1 para disparar PTGS (Figura 1A). Adicionalmente, muchos *loci* en los genomas de plantas derivados de repeticiones invertidas (**IR**, del inglés *Inverted Repeats*), producen ssRNAs que se pliegan sobre sí mismos formando una estructura de horquilla con apareamiento perfecto. Este apareamiento perfecto conlleva el procesamiento por DCL2, DCL3 o DCL4 generando respectivamente sRNAs de 22, 24 o 21 nt denominados sRNAs horquilla (**hp-sRNAs**, del inglés *hairpin small RNAs*) [14] (Figura 1B). Otros precursores de dsRNA pueden surgir de la hibridación de ARNs complementarios transcritos por separado, por ejemplo, a partir de hebras opuestas del mismo *locus* (**cis-natsiRNA**, del inglés *cis-natural antisense small interfering RNAs*) o bien a partir de transcritos altamente complementarios que se originan en diferentes *loci* (**trans-natsiRNAs**, del inglés *trans-natural antisense small interfering RNAs*) (Figura 1C). Sin embargo, la mayor población de ARNs pequeños, denominados het-siRNAs (del inglés *heterochromatic small interfering RNAs*), son producidos por DCL3 a partir de los transcritos de la ARN polimerasa IV (**RNAPIV**, del inglés *RNA Polymerase 4*) (Figura 1E). Estos transcritos, son inicialmente convertidos en dsRNA por parte de RDR2 que se encuentra asociada a la RNAPIV. Los het-siRNAs se cargan preferentemente en la proteína ARGONAUTA 4 (AGO4) para desencadenar, ya sea en *cis* y/o en *trans*, la metilación del ADN en un proceso conocido como metilación del ADN dirigida por ARN (**RdDM**, del inglés *RNA-dependant DNA Methylation*) [15]. La transcripción mediada por RNAPIV, y por ende la producción de het-siRNAs, es comúnmente observada en Elementos Transponibles (**TEs**, del inglés *Transposable Elements*) y conlleva cambios en el estado de la cromatina, la condensación de nucleosomas y al silenciamiento estable de los *loci* diana [1],[16]. Por último, existen sRNAs que pueden actuar tanto a nivel de PTGS como TGS, representados por los siRNAs secundarios (Figura 1D). Este tipo de sRNAs, puede dividirse en subclases dependiendo de su función, dando lugar a los ARNs pequeños de interferencia actuantes en *trans* (**tasiRNAs**, del inglés *trans acting small interfering small RNAs*), los

ARNs pequeños de interferencia en fase (**phasiRNAs**, del inglés *phased small interfering RNAs*) y los ARNs pequeños de interferencia epigenéticamente activados (**easiRNAs**, del inglés *epigenetically activated small interfering RNAs*). El factor común en la biogénesis de todos ellos es el corte inicial de un ARN largo por el accionar de miRNAs para su subsiguiente conversión en dsRNA por la proteína RDR6 [17]. Los tasiRNAs y los phasiRNAs, se producen a partir de ARNs (codificantes o no codificantes) cortados por ciertos miRNAs y algunos de ellos pueden dirigirse a sus ARNm complementarios en *trans* provocando su degradación [17]. Por otro lado, los easiRNAs se producen a partir de retrotransposones activados utilizando una vía genética similar a la utilizada por los tasiRNAs [18].

La diversificación y especialización de las vías de silenciamiento génico en plantas, refleja el importante rol que tienen los ARNs pequeños para estos organismos sésiles, principalmente permitiéndoles su adaptación al entorno que se encuentra en constante cambio. Sin embargo, la contribución de la mayoría de las clases de ARNs pequeños siguen sin estar claras, incluso se han descubierto numerosos mecanismos no canónicos tanto de acción como de biogénesis de distintos sRNAs que resultan extremadamente interesantes, alguno de los cuales desarrollaremos en este trabajo de tesis.

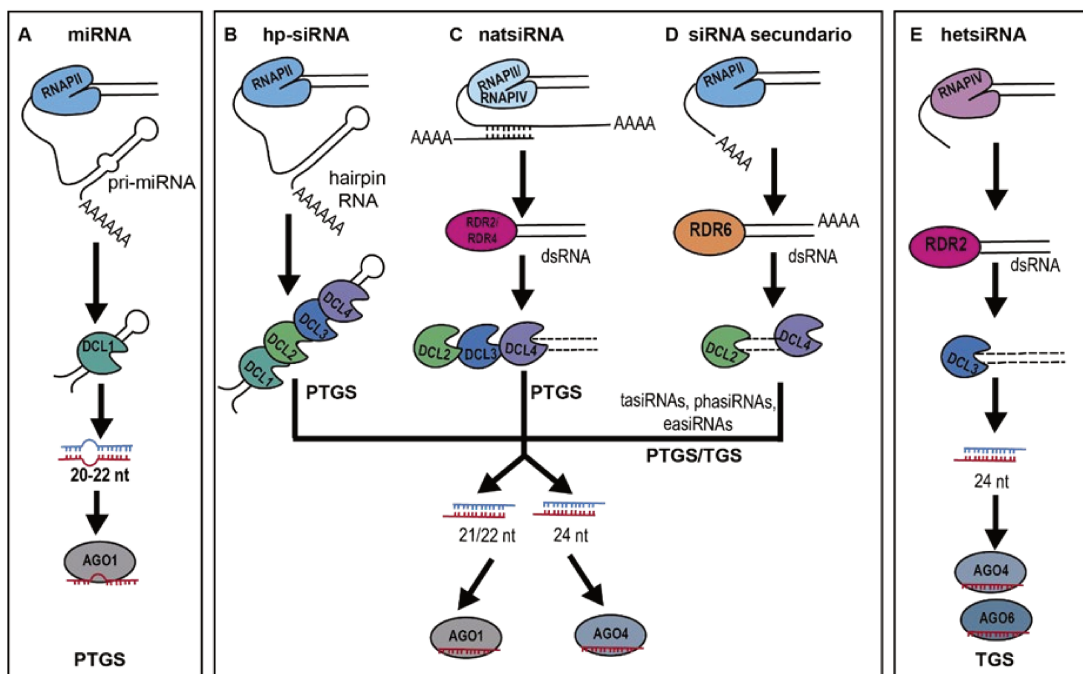


Figura 1. Diagramas simplificados de las principales vías de biogénesis de sRNAs endógenos en plantas. A. La ARN Polimerasa II (RNAPII, del inglés *RNA Polymerase II*)

genera transcritos primarios, denominados pri-miRNAs, de los genes que codifican miRNAs. Los pri-miRNAs se pliegan sobre sí mismos para formar estructuras tipo tallo-bucle de complementariedad imperfecta que son procesadas por DCL1 para formar precursores de miRNAs (pre-miRNAs). Éstos son procesados nuevamente por DCL1 dando como resultado un dúplex de miRNA maduro. Los miRNAs participan en PTGS al mediar el corte y degradación de ARNm o la represión de su traducción. **B.** Ciertas regiones del genoma, en particular aquellas con repeticiones invertidas, generan ARNs estructurados que poseen una conformación de tipo horquilla perfecta (hp-siRNAs) al ser transcritas por la RNAPII. Estos transcritos normalmente son procesados por cualquier proteína del tipo DCL y tienden a evolucionar a miRNAs o desaparecer tras acumular mutaciones. **C.** La transcripción superpuesta de un ARN (*cis*-asRNA) o de transcritos complementarios que se originan en diferentes *loci* (*trans*-asRNA) dan origen a dsRNAs que generan, al ser procesados por DCL, siRNAs antisentido naturales (natsiRNAs) [19]–[21]. **D.** Algunos ARNs, en especial aquellos no codificantes, son convertidos a dsRNAs por la acción de la ARN POLIMERASA DEPENDIENTE DE ARN 6 (RDR6) para luego ser procesados en siRNAs de 22 o 21 nt de longitud por DCL2 y DCL4, respectivamente. Estos siRNAs secundarios están principalmente involucrados en PTGS, pero también pueden iniciar RdDM en *loci* específicos. Se subdividen en siRNAs que actúan en trans (tasiRNAs) [22]–[25], siRNAs en fase (fasiRNAs) [17] y siRNAs activados epigenéticamente (easiRNAs) [18],[26]. **E.** Los siRNAs heterocromáticos (hetsiRNAs) derivan de elementos transponibles y repetitivos que se ubican preferentemente en la cromatina pericentromérica. Su biogénesis requiere la transcripción por la RNAPIV y la síntesis de dsRNA por RDR2, que posteriormente se procesa en siRNAs de 24 nt por DCL3. Estos sRNAs están involucrados en el mantenimiento de TGS mediada por RdDM [15] (Figura modificada de [1]).

OBJETIVOS

6. Objetivos

Los sRNAs son componentes esenciales en plantas, involucrados en numerosos procesos de regulación. Por un lado, los hetsi-RNAs son el tipo de sRNAs más abundantes en plantas, regulan TEs promoviendo su metilación y concomitante silenciamiento. Dada su abundancia, nos interesa estudiar su rol y relevancia biológica. Por otro lado, los miRNAs son componentes fundamentales de los procesos de PTGS en plantas, por lo que el estudio de su biogénesis resulta importante para comprender las respuestas de las plantas frente a distintos tipos de estímulos. Dentro de la biogénesis, nos interesa evaluar el rol de la proteína HST, la cual presenta una función controversial. Si bien ha sido vinculada con la exportación de miRNAs, esta hipótesis está solo basada en su homología funcional con la Exportina 5 de mamíferos, pero no se condice que la información experimental disponible [27]–[29].

El **objetivo general** de este plan de trabajo es, entonces, el de comprender comparativamente los mecanismos moleculares involucrados en la regulación génica mediada por distintos tipos de ARN pequeños en plantas y los componentes que intervienen en su regulación, acción y biogénesis.

De esto se desprenden nuestros dos objetivos específicos:

-Objetivo 1: Caracterizar el comportamiento de un ARN no codificante de naturaleza transposónica presente en la región promotora de *HaWRKY6* en girasol, evaluar su capacidad de generar het-siRNAs y analizar el efecto que causan a la topología del genoma en su vecindad.

-Objetivo 2: Estudiar, mediante una aproximación genética de “*suppressor screen*”, el rol de la proteína HST en la biogénesis de miRNAs en plantas.

Capítulo 1

“Regulación dinámica de la topología de cromatina por ARNs pequeños derivados de una Repetición Invertida (IR) en girasol”

7. Capítulo 1

7.1 Introducción

Existe una gran variedad de sRNAs en organismos eucariotas. En plantas, la diversidad de estas moléculas contribuye a su plasticidad fenotípica, necesaria para adaptarse al medio ambiente cambiante en el cual viven. Los sRNAs, son componentes ubicuos en plantas y están involucrados en numerosos procesos desde el desarrollo, la reproducción y la reprogramación del genoma, así como la respuesta a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos [1],[12],[30]. Estas moléculas son capaces de modular la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [1]. En plantas los sRNAs regulan la expresión génica mediante dos grandes mecanismos conocidos como TGS y PTGS [1],[30]. Mientras el principal actor en PTGS lo representan los miRNAs, el TGS es llevado a cabo y controlado principalmente por los het-siRNAs [1]. En plantas, los sRNAs son producidos por la acción catalítica de las ribonucleasas tipo III DCL luego del reconocimiento de precursores de dsRNA. En *A. thaliana*, hay cuatro enzimas DCL, cada una de ellas presenta una preferencia por un sustrato particular y genera sRNAs con distintas funciones [7],[8]. DCL1 actúa durante la biogénesis de miRNAs [31]; DCL2, DCL3 y DCL4, por su parte, procesan dsRNAs de elevada complementariedad en poblaciones de sRNAs de 22, 24 y 21 nt respectivamente. DCL2 participa principalmente en la defensa de plantas contra ARNs virales, DCL3 en la producción de het-siRNAs y TGS, mientras DCL4 es el principal actor en la producción de tasiRNAs [8],[30],[32].

7.1.1 Los het-siRNAs y su rol en plantas: mecanismo canónico de la metilación del ADN mediada por ARNs

Los het-siRNAs representan la gran mayoría de los sRNAs en plantas, rondando el 70% de los ARNs pequeños en una célula vegetal. En general, son producidos en regiones repetitivas y ricas en transposones del genoma de plantas. Su biogénesis comienza cuando la RNAPIV es reclutada a ciertas regiones del genoma por SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1), una proteína que es capaz de reconocer ciertas marcas en histonas (H3K4 no metilada y H3K9 metilada, siendo H: histona y K: Lisina) [33]. A su vez, las proteínas SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOG PROTEIN 2 (SUVH2) y SUVH9 reconocen marcas de metilación de ARN y reclutan a la ARN Polimerasa V (**RNAPV**, del inglés **RNA Polymerase V**) a las mismas regiones a del genoma [34]. Si bien se han identificado numerosos sitios reconocidos por la

RNAPIV y RNAPV, no hay evidencia de motivos consenso de unión de estas ARN polimerasas [16],[33],[35]. El mecanismo continúa cuando los transcritos de la RNAPIV son convertidos en dsRNA por parte de RDR2 y procesados en het-siRNAs de 24 nt por parte de DCL3 [36] (Figura 2). Los dúplex de het-siRNAs, son exportados al citoplasma donde se asocian a la proteína ARGONAUTA 4 (AGO4) o ARGONAUTA 6 (AGO6). Las proteínas AGO cargadas regresan al núcleo donde reconocen, por complementariedad de secuencias, los transcritos nacientes producidos por la RNAPV en la misma región [35]. Este reconocimiento dispara el reclutamiento de metiltransferasas como DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2 (DRM2) desencadenando la metilación *de novo* de las citosinas del *locus* blanco [37],[38]. Finalmente, la metilación del ADN en la región estimula el reconocimiento del *locus* por proteínas remodeladoras de la cromatina que, al modificar las histonas, generan la compactación de la cromatina. Este proceso se conoce como RdDM [16] (Figura 2). El mecanismo de RdDM, está dirigido principalmente a regiones constituidas por TEs y otras secuencias repetitivas distribuidas a lo largo del genoma, con el fin de restringir su transcripción y potencial transposición [36],[39]. En *A. thaliana*, se produce principalmente en TEs pequeños y jóvenes además de ciertas regiones eucromáticas [16],[40]. El silenciamiento estable de TEs en regiones heterocromáticas, no sería la función principal de RdDM sobre todo en especies con tamaño de genoma reducido [16],[41] mientras que, en otros cultivos con genomas más complejos, y por lo tanto mayor proporción de TEs y secuencias repetitivas, la vía tiene un rol más importante en cuanto a mantener la estabilidad del material genético [42],[43].

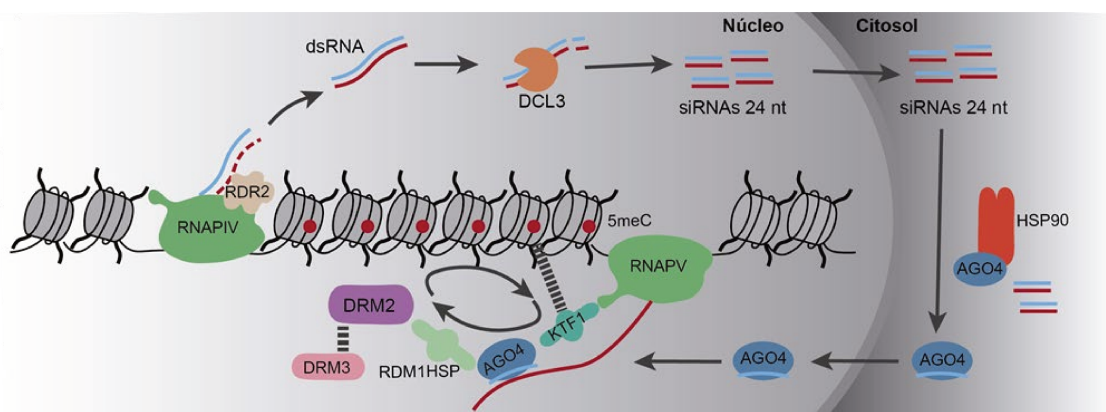


Figura 2. Vía canónica de la metilación del ADN dependiente de ARNs (RdDM). La RNAPIV transcribe el ARN monocatenario a partir de ciertos *loci* heterocromáticos repetitivos. RDR2, quien se asocia físicamente con RNAPIV, convierte el transcrito naciente en dsRNAs el cual es reconocido por DCL3 y procesado en het-siRNAs de 24 nt. Estos son transportados al citoplasma para su carga en AGO4, proceso facilitado por HEAT-SHOCK PROTEIN 90

(HSP90). Luego, AGO4 cargada se importa de vuelta al núcleo donde se dirige a los transcritos nacientes de la RNAPV (línea roja larga) por complementariedad de secuencias formando el complejo de RdDM, que contiene a DRM2 capaz de llevar a cabo la metilación *de novo* de las citosinas principalmente en el contexto CHH. (Figura modificada de [44]).

7.1.2 Patrones de metilación del ADN en plantas: funciones y como se generan.

La metilación del ADN, que consiste en la adición de un grupo metilo a una citosina (C), es un mecanismo conservado tanto en plantas como en animales. Patrones precisos de metilación son fundamentales para el correcto desarrollo de los individuos. De hecho, fallas en los mecanismos de metilación de ADN, causan letalidad embrionaria en animales o severos defectos morfológicos durante el desarrollo en plantas [45]. En mamíferos, la metilación de ADN ocurre exclusivamente en el contexto simétrico CG y se da muy frecuentemente a lo largo de todo el genoma [46]. En plantas, se da en todos los contextos: los simétricos CG y CHG (H=A, T o C) y en el contexto asimétrico CHH [36],[39].

En plantas, la función principal de la metilación del ADN está relacionada con el silenciamiento y control de TEs y secuencias repetitivas presentes en regiones heterocromáticas, con el fin último de conservar la integridad del genoma. Adicionalmente, estas marcas también se encuentran en regiones de eucromatina, tanto en el promotor como en el cuerpo de numerosos genes donde tiene roles regulatorios.

A diferencia de los TEs localizados en regiones heterocromáticas, que suelen estar fuertemente metilados en los tres contextos y silenciados, la metilación en regiones génicas es menos abundante y se da principalmente en contexto no-CG [39],[47],[48]. La metilación en el cuerpo de genes (**Gbm**, del inglés *Gene body methylation*), suele tener un efecto positivo sobre la transcripción, de hecho, la mayor parte de los genes que presentan Gbm en *A. thaliana*, presentan un nivel de expresión mayor respecto de aquellos que no están metilados [48],[49]. Se sabe que, en esta especie, además, las consecuencias generadas por Gbm son negativas si se produce en los extremos 3' o 5' del gen, dado que son puntos clave necesarios para el inicio y la terminación de la transcripción por parte de la RNAPII. Es por ello que las marcas de Gbm son más frecuentes en genes largos respecto de los más cortos. Esto implica que, en general, si los genes pequeños están metilados, se transcriben menos [49]. Por otro lado, las marcas de metilación presentes en las regiones promotoras, no son tan frecuentes y suelen estar asociadas con un efecto negativo sobre la transcripción, ya sea al impedir

la unión de activadores o promover la unión de represores. Sin embargo, también se ha asociado con efectos positivos [39],[48],[50]. En este sentido niveles bajos de metilación en los promotores correlacionan con un aumento en la expresión de ciertos genes en *A. thaliana*, soja y arroz [51]. Adicionalmente, en *A. thaliana* ha sido descrito recientemente un complejo de unión al ADN metilado que es capaz de promover la expresión de genes proximales tras su reclutamiento [52].

7.1.3 Conservación de las marcas de metilación del ADN

Los patrones de metilación en plantas, y la existencia de marcas no conservativas (CHH), les aportan gran versatilidad además de reversibilidad a estos organismos [53]. La metilación simétrica CG y CHG se mantiene luego de la replicación mediante la acción de las metiltransferasas de ADN MET1 y Cromometilasa 3 (CMT3) que reconocen la metilación en la hebra originaria y la copian en la hebra recién generada [16],[54]. Por otro lado la metilación asimétrica CHH se mantiene por CMT2 y la vía RdDM pero requiere metilación *de novo* de una de las cadenas hijas luego de la replicación (Figura 3) [45]. La metilación del ADN no es un proceso estático, sino que es regulado en forma dinámica mediante los procesos de metilación y desmetilación. Es decir que puede perderse, tanto por una falla en el mantenimiento de la metilación luego de la replicación (desmetilación pasiva del ADN), como por remoción por parte de enzimas específicas (desmetilación activa del ADN) [45],[55].

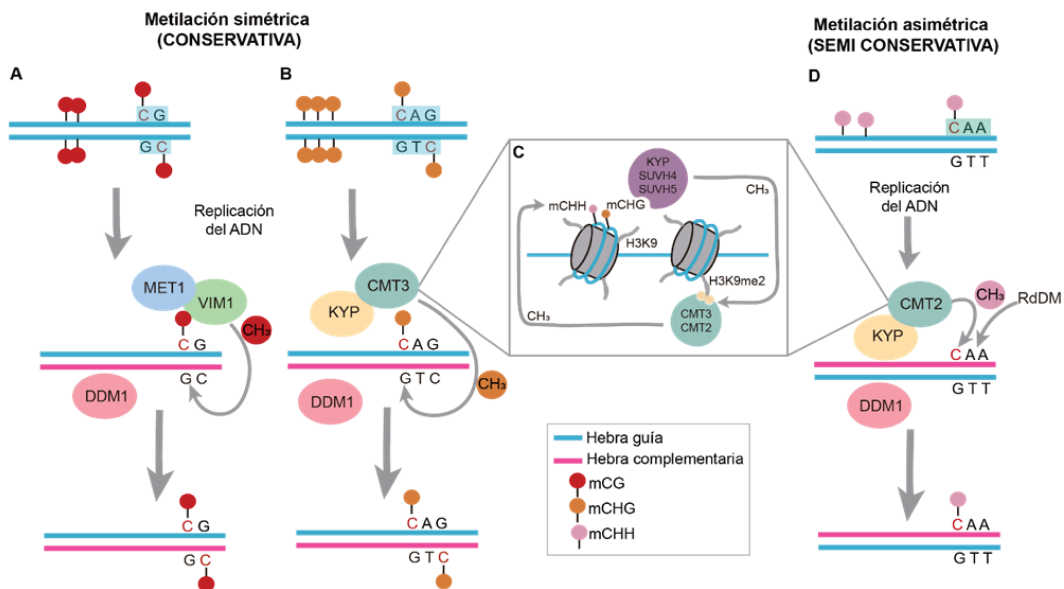


Figura 3. Mecanismos de conservación de la metilación simétrica y asimétrica. (A) El mantenimiento de las marcas de metilación en el contexto simétrico CG, se produce a través

de la metiltransferasa 1 (MET1), el ortólogo vegetal de DNMT1 perteneciente al reino animal, que metila el ADN hemimetilado después de la replicación del ADN [48],[56],[57]. Sin embargo, en algunos *loci*, se requiere de MET1 para la herencia correcta de sitios no-CG [58]. **(B)** CMT3 mantiene los sitios CHG (H= A, T o C) luego de la replicación. **(C)** CMT3 se une a la histona H3 dimetilada en la lisina 9 (H3K9me2) dirigiendo la metilación del ADN en los sitios antes mencionados [59]–[61]. A su vez, KRYPTONITE (KYP; también conocida como SUVH4), SUVH5 y SUVH6 son histonas metiltransferasas que se unen a sitios CHG y CHH metilados y metilan H3K9 [59],[62]–[65]. Este bucle de retroalimentación positiva mantiene a los sitios CHG metilados en numerosas regiones del genoma [59]. **(D)** Por último, los sitios CHH metilados, son restablecidos continuamente por la vía RdDM, y a su vez CMT2 mantiene muchos de estos sitios en un circuito de retroalimentación positiva similar [54],[66],[67] (C). La proteína remodeladora de la cromatina DDM1 facilita el acceso de todas las metiltransferasas al dsRNA. (Figura modificada de [68]).

7.1.4 Vías no canónicas de RdDM que desencadenan metilación del ADN

En plantas, la metilación del ADN varía significativamente entre y dentro de las especies [69],[70], siendo aquellas que se dan en los contextos CHH y CHG las más fluctuantes. Estas diferencias se deben tanto a las variaciones en las secuencias blanco de la metilación en cada especie, así como también la gran diversidad en las vías que la producen [60],[69],[71],[72].

Además de la vía canónica RdDM previamente descrita, existen otras no convencionales que alimentan esta ruta [73] (Figura 4). Tal es el caso de la vía independiente de RDR2, en la cual las moléculas molde de dsRNA se originan a partir de transcritos de la RNAPII. Un ejemplo de este tipo de transcritos, lo constituyen las IRs. Por las características intrínsecas de toda secuencia repetida invertida, al transcribirse los ARNs generados por estas regiones son capaces de plegarse sobre sí mismos generando dsRNAs perfectos, sin “gaps” o espacios sin hibridar, los cuales son reconocidos y procesados directamente por DCL3 sin necesidad del accionar de RDR2 [74]. Como resultado, se generan sRNAs de 24 nt que se cargan en AGO4 y participan en RdDM ya sea en *cis* (tienen como blanco al IR en sí mismo) o en *trans* (Figura 4A) [75]. Un análisis genómico global, ha determinado que esta vía tiene como blanco a numerosos TEs que son transcritos en condiciones particulares, conduciendo a su re-silenciamiento [74]. Un ejemplo de este tipo de mecanismo fue estudiado en maíz, en donde un IR derivado de un transposón (Muk) es capaz de generar sRNAs de 24 nt que

conducen a RdDM en *trans*, provocando el silenciamiento del resto de esta familia de transposones [76].

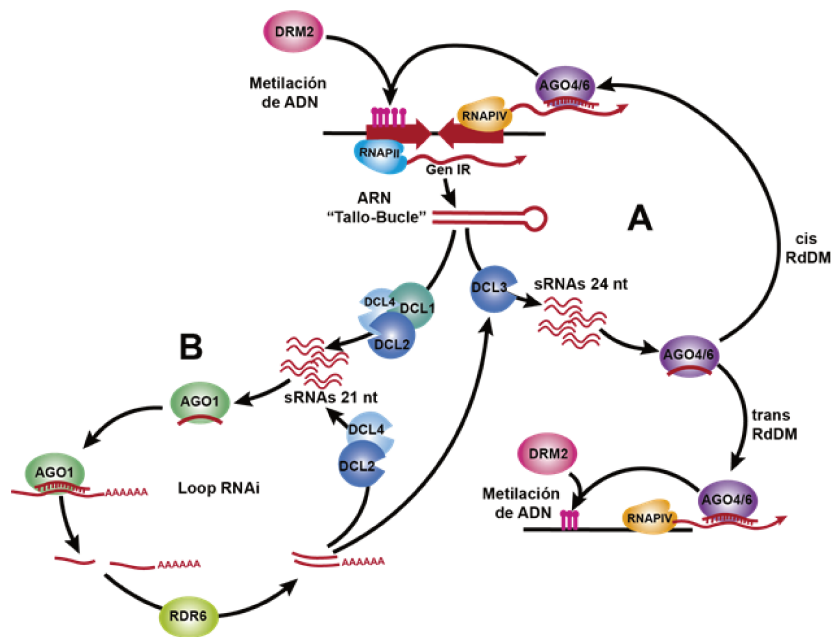


Figura 4. Vías no canónicas de RdDM. La transcripción por parte de RNAPII de ciertas regiones como IRs o precursores de microARN genera sRNAs primarios [18], que se producen independientemente de la actividad de RDR. Las proteínas DCL compiten por estos sustratos de dsRNA de forma jerárquica. Por un lado, **(A)** DCL3 es capaz de procesar estos transcritos con estructura característica de “Tallo-bucle” dando como resultado sRNAs de 24 nt que se cargan en AGO4/6 para luego participan en RdDM [74] en *cis* (sobre el propio IR) o en *trans* [75]. Por otro lado, **(B)** DCL1, DCL2 o DCL4 también pueden procesar estos transcritos dando lugar a sRNAs de 21 nt que son cargados en AGO1. Luego, estos se dirigen hacia el ARNm de RNAPII para su degradación. Algunos de estos ARNm escindidos producen siRNAs secundarios a través de la formación de dsRNA mediante RDR6 y el posterior procesamiento por parte de DCL2 y DCL4. Los siRNAs secundarios pueden seguir degradando el ARN mensajero (ARNm), conduciendo a la producción de más siRNAs a través del ciclo de ARN de interferencia (Figura modificada de [73]).

7.1.5 Diversidad de TEs en plantas: clasificación y funciones

Los TEs son segmentos de ADN que pueden moverse e insertarse (transponerse) en distintos sitios en los cromosomas, lo cual generalmente implica su duplicación durante el proceso. Las plantas presentan grandes cantidades y una enorme variabilidad en el contenido de secuencias repetitivas y TEs en sus genomas. Como ejemplos tenemos el

genoma compacto de *A. thaliana* con solo un ~20% de TEs [77] hasta extremos, como el girasol, con 78% de su genoma representado por estos elementos [78].

Estos elementos se clasifican como transposones de clase I o de clase II. Los TEs de clase I, se transponen a través de un intermediario de ARN, el cual se produce por la transcripción de una copia genómica que es luego retrotranscripta a ADN por una transcriptasa reversa (**RT**, del inglés *Reverse Transcriptase*). Dado que en cada ciclo completo de replicación se produce una nueva copia, los retrotransposones son uno de los grandes contribuyentes a la fracción repetitiva en aquellas especies con genomas grandes [79]. Los elementos de clase II, en cambio, se transponen a través de un intermediario de ADN, y la mayoría se escinde de una región del genoma y se reintegra en otra parte mediante una enzima transposasa [80]. A su vez, cada grupo de TEs contiene elementos autónomos y no autónomos. Los TEs autónomos, codifican los elementos necesarios para su transposición mientras que los no autónomos, carecen de algunos (o todos) los dominios que se encuentran en los elementos autónomos [79].

Si bien los genomas de plantas albergan una gran diversidad de TEs, los componentes mayoritarios lo representan los retrotransposones de Repetición Terminal Larga (**LTR**, del inglés *Long Terminal Repeat*) y los Elementos Transponibles con repeticiones invertidas en Miniatura (**MITEs**, del inglés *Miniature inverted-repeat Transposable Elements*) [80]. Los retrotransposones LTR, pertenecen a la clase I, y son menos abundantes en animales, pero predominan en plantas. Van desde unos cientos de pares de bases (pb) hasta incluso 25 kilo pares de bases (kpb) [79]. Por lo general, contienen orígenes de replicación para una transcriptasa inversa, una RNasa H y una integrasa, es decir que son autónomos. Por otro lado los MITEs, correspondientes a la clase II, fueron descritos por primera vez en plantas [81] y son secuencias cortas (50-500 pb) no autónomas con IRs terminales, que se insertan generalmente en regiones ricas en genes afectando su expresión. La familia MITE, a diferencia de lo que sucede con otros miembros de la clase II, se caracteriza por estar presente en un número de copias muy alto (hasta varios miles de copias). Después de su descubrimiento en plantas, se encontraron familias de MITEs en varias especies de animales, incluidos *C. elegans*, peces, *Xenopus* y humanos [82]. Del análisis de 19 ecotipos distintos de *A. thaliana* se sabe que esta especie, al igual que los cultivos de arroz, contiene una gran cantidad de MITEs en su genoma [83],[84].

Dado que los MITEs suelen encontrarse insertados cerca de genes, es de esperar que tengan impacto en la regulación de los mismos. Por ejemplo, un MITE ubicado dentro

de la región promotora del gen *RICE UBIQUITIN2 (RUBQ2)* de arroz es capaz de aumentar la expresión del gen, efecto neutralizado por la metilación del ADN que contiene al MITE [85]. Otro estudio sugirió que un MITE, ubicado aguas arriba del gen *SbMATE* en sorgo, actúa como un elemento en *cis* para promover el aumento en los niveles de expresión, aumentando de esta forma, la tolerancia al aluminio [86]. Por otro lado, se demostró que una inserción de un MITE en la región 3' UTR del gen *TaHSP16.9-3A* en trigo aumenta en gran medida el nivel de transcripción bajo estrés por calor en comparación con los otros haplotipos de trigo sin el MITE, lo que resulta en mayor tolerancia al calor [87],[88]. Al igual que con otros tipos de TEs, los MITEs también se asocian normalmente con una fuerte metilación del ADN, lo que proporciona una capa adicional para la regulación génica [83]. Sin embargo, en general, se desconoce como la cercanía de estos TEs a genes modula en la expresión génica.

7.1.6 Marcas epigenéticas y estructura tridimensional del genoma

La metilación de TEs mediada por RdDM generalmente desencadena modificaciones de histonas para reprimir de manera estable su expresión [45],[89]. Sin embargo, existen numerosos ejemplos en los que la metilación de los transposones influye en la expresión de genes cercanos sin un silenciamiento permanente, incluidos los *loci AGOUTI* y *AUXIN* en ratón [90], *FLC* [91] y *FWA* [92] en *A. thaliana*, *RUBQ2* en arroz [85] y *SbMATE* en sorgo [86], pero los mecanismos subyacentes no se comprenden en su totalidad.

Las distintas marcas epigenéticas como la metilación de ADN y la modificación de histonas, así como también los sRNAs, terminan influyendo en la estructura de la cromatina, conduciendo a la condensación de los nucleosomas llevando, en algunos casos, al silenciamiento estable de los *loci* blanco [1],[16]. Además de este control sobre la densidad de los nucleosomas, estas marcas son capaces de influir en la arquitectura de la cromatina al promover la interacción entre secuencias metiladas [93]–[95] conduciendo a la formación de bucles o “loops” tanto de larga como de corta distancia que permiten interaccionar regiones distantes del genoma y cambiar la expresión génica [96],[97] (Figura 5).

7.1.7 Interacciones de largo alcance

Los genomas eucariotas se organizan jerárquicamente dado que necesitan compactar su material genético de modo tal que éste pueda ser contenido dentro del núcleo. En primer lugar, el ADN genómico se empaqueta alrededor de las histonas para formar los nucleosomas. El siguiente nivel de organización, está dado por los bucles de cromatina formados entre distintas regiones separadas por grandes distancias en el genoma [98]. Estas interacciones dan lugar, por un lado, a dominios asociados topológicamente (**TADs**, del inglés *Topologically Associated Domains*), los cuales tienen decenas de kpb de longitud (Figura 5). Éstos se encuentran muy conservados entre distintas especies en mamíferos aunque en plantas fueron recientemente descritos en especies tales como arroz, sorgo, tomate, algodón y maíz a excepción de *A.thaliana* [99]. Los TADs dividen grandes porciones del genoma en regiones bien definidas y reguladas de forma autónoma donde se ven favorecidas las interacciones moleculares de largo alcance [99]–[102]. Por otro lado, las interacciones de largo alcance, también dan lugar a los compartimentos A/B los cuales ocupan de cientos a miles de kpb de longitud, y se corresponden con regiones eucromáticas y heterocromáticas, respectivamente (Figura 5). Sumado a estos dominios y compartimentos, las interacciones entre regiones del genoma permiten, además, la formación de territorios cromosómicos (**CTs**, del inglés *Chromosome Territories*), ordenando cada cromosoma dentro del núcleo e impactando en la accesibilidad y nivel de expresión génica [102],[103] (Figura 5).

Las interacciones intra e intercromosómicas específicas pueden moldear el plegamiento y la organización de los cromosomas en plantas. En *A. thaliana*, por ejemplo, se detectan fuertes interacciones entre varias regiones heterocromáticas [94],[104]. Estas regiones, denominadas IHIs (del inglés *Interactive Heterochromatic Islands*) o KEEs (del inglés *KNOT Engaged Elements*), están considerablemente enriquecidas con marcas represivas de histonas y TEs. Sin embargo, no está claro ni el significado biológico ni el mecanismo molecular que subyace a las interacciones entre IHI y KEE, pero se cree que estas regiones representan sitios de inserción preferenciales para TEs en el genoma [99].

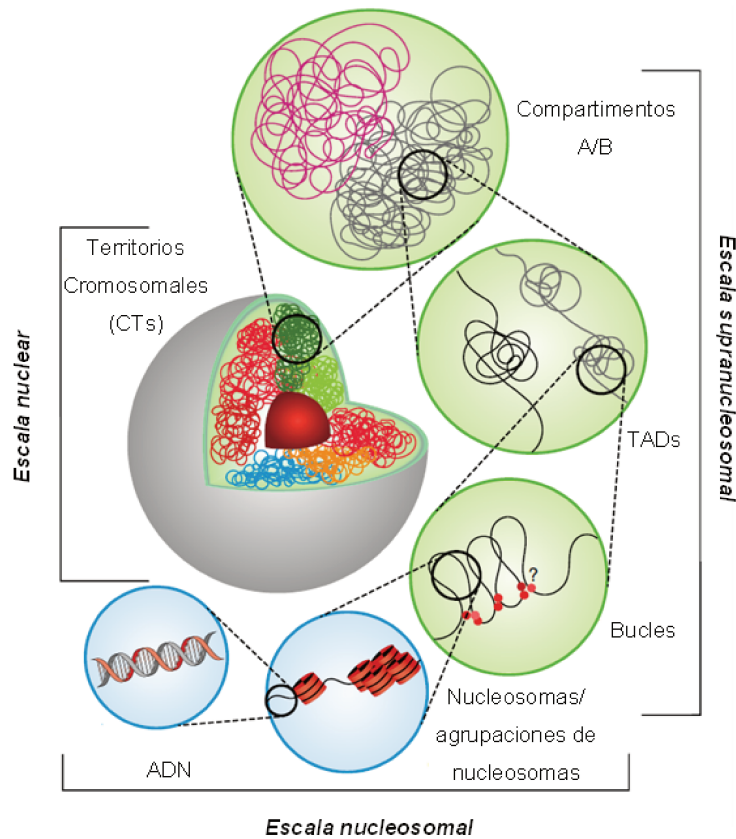


Figura 5. Representación esquemática de la organización jerárquica de la cromatina en las plantas. Los cromosomas individuales ocupan un determinado espacio en el núcleo llamado territorio cromosómico (CT). Estos, a su vez, se pueden dividir dando lugar a los compartimentos A y B, que presentan cromatina activa e inactiva, respectivamente. Luego, se ven favorecidas las interacciones entre las regiones contenidas dentro de los TADs, comparado con aquellas entre regiones vecinas fuera de los TADs. En un nivel menor de organización, están presentes los bucles de cromatina que conectan elementos reguladores con sus *loci* diana y otras interacciones de corto alcance (Figura modificada de [99]).

7.1.8 Interacciones de corto alcance

Las interacciones de la cromatina de corto alcance han surgido como mecanismos dinámicos de la regulación de la expresión génica en *loci* específicos [105]. Estas interacciones, vinculan regiones cercanas definidas dentro de un mismo gen o bien entre genes cercanos formando lo que se conoce como bucles o “loops” en la cromatina. Este proceso es fluctuante y, se sabe, interviene en la memoria transcripcional [97],[101],[106]. Estas interacciones pueden ser de varias clases dependiendo que

partes de los genes en la región están involucrados. Cada tipo de interacción, que se describen a continuación, tiene un efecto diferente sobre la transcripción de los genes involucrados [105].

7.1.9 Gene looping

Análisis recientes en *A. thaliana* revelaron la presencia de numerosos bucles de cromatina que conectan el extremo 5' de un gen con su extremo 3' [102], similar a lo que ocurre en levaduras [107]. Generalmente, los genes que adquieren esta estructura, tienden a mayores niveles de expresión, dado que permiten el uso más eficiente de la RNAPII con un "reciclado" desde el sitio de terminación de la transcripción (**TTS**, del inglés *Transcriptional Termination Site*) hacia el promotor en un proceso conocido como "gene looping" (Figura 6 A) [108],[109]. Este es el caso de gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, en el cual se forma un bucle entre el promotor y el TTS. Esta estructura, se disocia luego de incubación en frío, provocando una caída en los niveles de transcripción de *FLC* y la transición a la floración [108]. Por otro lado, en los *loci IPT3* e *IPT7*, bucles de este tipo promueven la transcripción de los genes, lo que conduce a una mayor producción de citoquininas, bloqueando el avance del ciclo celular en las células meristemáticas [110]. En el *locus TFL1* de *A. thaliana*, se forma un bucle de cromatina entre el promotor y una región ubicada aguas debajo del TTS, aumentando la transcripción de *TFL1*. Esta estructura se ve interrumpida en presencia de *APETALA 1 (AP1)*, proteína que se une al sitio de anclaje del bucle, impidiendo la formación del mismo y dando como resultado la represión del gen [111]. En animales, estos bucles en la cromatina pueden además afectar la direccionalidad de la transcripción forzando a la RNAPII a moverse en un sentido determinado, movimiento normalmente restringido dentro del bucle [112].

7.1.10 Loops intragénicos

Por otro lado, los frecuentes loops intragénicos son aquellos que comprenden solo una parte de un gen, por lo que la región génica incluida dentro del bucle determina su destino regulatorio. Tal es el caso del bucle formado entre la región promotora y el primer intrón del gen *FLC*, el cual reprime en forma estable su expresión (Figura 6 B [I]) [113]. En el *locus WUSCHEL (WUS)*, un bucle yuxtapone las regiones que flanquean el gen reprimiendo su expresión. A pesar de contener la secuencia codificante completa, este bucle excluye la región promotora, afectando de esta forma la expresión génica al bloquear la elongación de RNAPII (Figura 6 B [II]) [105]. Además, aunque no esté

descrito en plantas, los bucles intragénicos también son capaces de inducir el “*splicing*” alternativo de exones. Por ejemplo, en humanos, el factor de unión CCCTC (**CTCF**, del inglés *CCCTC-binding factor*) media la formación de bucles de cromatina entre los promotores y las regiones intragénicas, promoviendo la inclusión de exones ubicados en el sitio de anclaje alterando así la inclusión de dominios en proteínas implicados en la señalización y la respuesta al estrés celular (Figura 6 B [III]) [114]. Aunque es aún hipotético, los bucles intragénicos podrían conducir al bloqueo de la transcripción, promoviendo el uso alternativo de sitios de poliadenilación crípticos, dando como resultado ARNs mensajeros (ARNm) más cortos (Figura 6 B [IV]) [105].

7.1.11 Bucles de genes que afectan a transcritos divergentes y antisentido.

Al unirse a un promotor, la RNAPII puede iniciar la transcripción en ambas direcciones, produciendo dos moléculas de ARN diferentes. Este fenómeno, conocido como transcripción divergente, es común en la mayoría de los promotores activos en células eucariotas [115]. En *Saccharomyces cerevisiae*, un evento de “gene looping” mejora la direccionalidad del promotor de *FMP27* al afectar la transcripción de un ncRNA divergente (Figura 6 C [I]). Esto podría ocurrir porque la actividad RNAPII está restringida dentro del bucle, excluyendo las unidades transcripcionales fuera de él. En concordancia, una mutación en *Ssu72*, un componente fosfatasa del dominio Carboxilo terminal (C-terminal) de la RNAPII del factor de escisión y poliadenilación (**CPF**, del inglés *Cleavage and Polyadenylation Factor*), que interrumpe el bucle intragénico en *FMP27*, conduce a un incremento de transcripción divergente en todo el genoma [112]. La transcripción divergente, difiere de la transcripción antisentido en la que dos regiones promotoras, que flanquean una secuencia codificante, permiten la transcripción de ambas cadenas de un solo gen. Las interacciones de corto alcance también afectan la transcripción antisentido de los ARN complementarios; por ejemplo, en el *locus FLC*. Este *locus* codifica tres ncRNAs: *COLDWRAP*, que deriva del promotor de *FLC* [113]; *COLDAIR*, que se transcribe en orientación sentido desde el primer intrón del gen [108],[116]; y *COOLAIR*, que se transcribe en sentido contrario a *FLC* y requiere un promotor específico ubicado aguas abajo del sitio de terminación de la transcripción (**TTS**, del inglés *Transcriptional Termination Site*) de *FLC*. La región reguladora de *COOLAIR*, reside precisamente donde se encuentra el punto de anclaje 3' del bucle del gen *FLC* [108]. Se observó una correlación entre la interrupción del bucle y un incremento en la transcripción de *COOLAIR* [108],[117], sugiriendo que el bucle *FLC*

afecta la transcripción antisentido de *COOLAIR*, probablemente al bloquear la progresión de RNAPII (Figura 6 C [II]).

7.1.12 Bucles intergénicos

Este tipo de interacciones, involucran la yuxtaposición de regiones de cromatina entre genes adyacentes. Dada la densa distribución de genes de algunos genomas de plantas, como el de *A. thaliana*, los bucles intergénicos son potencialmente frecuentes. Los bucles intergénicos, pueden actuar reuniendo elementos reguladores de genes adyacentes, pero también podrían comprender la región promotora completa de *loci* divergentes, forzando la transcripción de ambos ARN en forma simultánea. El ejemplo más destacado, ocurre entre los *loci* *PID* y *APOLO* en las plantas de *A. thaliana*. *APOLO* es un ARN no codificante largo (**lncRNA**, del inglés *long non-coding RNA*) inducido por auxina y ubicado 4900 pb aguas arriba del TSS de *PID* en una orientación divergente. En ausencia de auxina, un bucle de cromatina que abarca la región intergénica *PID/APOLO* incluyendo ambos promotores, reprime la transcripción de ambos genes (Figura 6D). Tras la señalización de auxina, el *locus* *APOLO* se desmetila y el bucle se desarma, lo que a su vez promueve la transcripción divergente de *PID* y *APOLO*. Progresivamente, la acumulación de *APOLO* desencadena la re-metilación del *locus* y el restablecimiento del ciclo represivo [93].

7.1.13 Bucles entre promotores y otros elementos reguladores

Este tipo de interacciones, reúne elementos regulatorios que se localizan a grandes distancias de los promotores de genes (Figura 6E, [118]). El primer ejemplo de este tipo de bucle en plantas, se informó para el *locus* *b1* de *Zea mays*. Dos epialelos, BI y B', controlan la expresión de este *locus* formando bucles múltiples de cromatina entre el TSS de *b1* y las secuencias aguas arriba. En BI, un regulador ubicado 100 kpb aguas arriba se ubica en una región de cromatina en estado laxo, lo que permite la formación de una estructura multibucle que mejora la transcripción de *b1*. En el epialelo B', el regulador se encuentra en una región de cromatina con alto grado de compactación, lo que reduce la formación del multibucle, reprimiendo la expresión de *b1* [119].

Por otro lado, dos bucles de cromatina ubicados aguas arriba del TSS de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), permiten el reclutamiento de *CONSTANS* al promotor de *FT*, potenciando su transcripción (Figura 6E, [120]). De forma similar, un bucle se forma sobre el promotor del gen *VERDANDI* (*VDD*) mediante la heterodimerización de

SEEDSTICK y *SEPALLATA3*, lo que mejora la expresión génica y el desarrollo del óvulo [121].

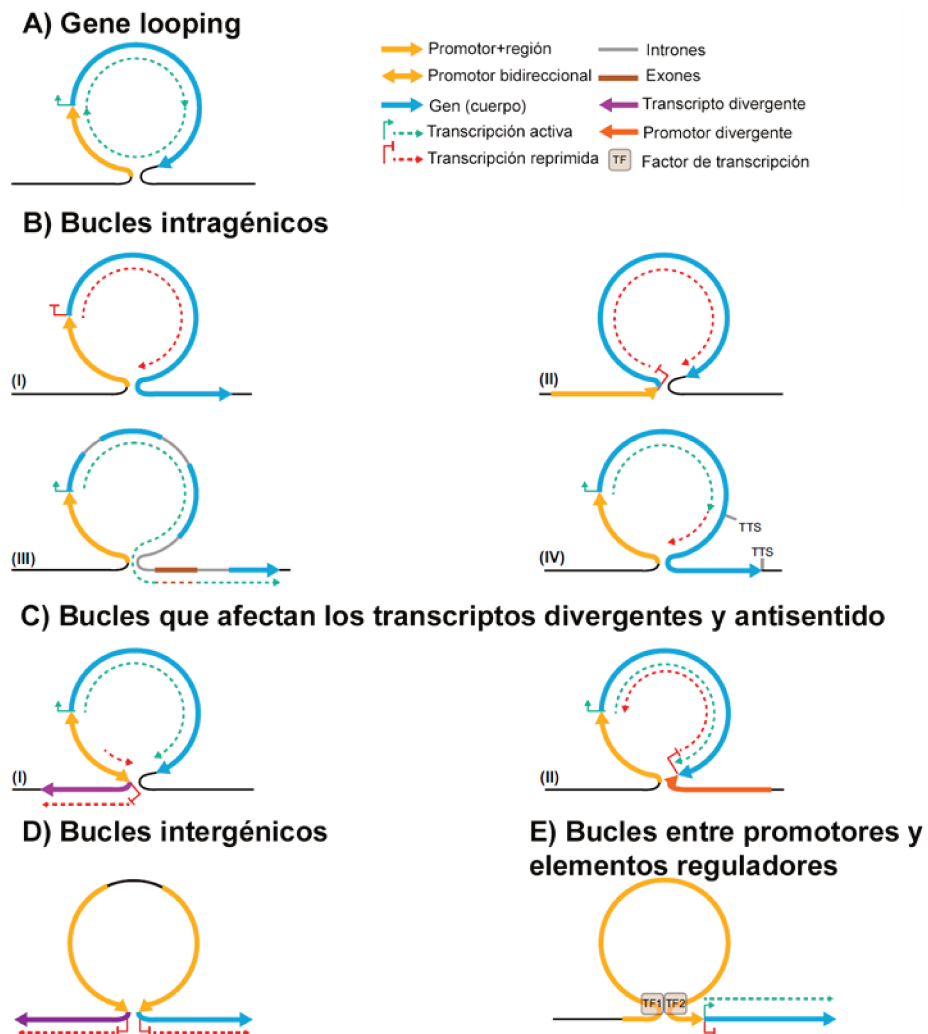


Figura 6. Bucles de cromatina de corto alcance en *loci* individuales. Representación gráfica de los distintos tipos de bucles de cromatina que yuxtaponen regiones cercanas dentro de *loci* únicos en plantas. **(A)** Gene looping, una interacción entre los extremos 5' y 3' de un gen que suele estar asociado con un aumento en la transcripción. **(B)** Diferentes tipos de bucles intragénicos en los cuales las interacciones ocurren dentro de diferentes partes de un gen: **(I)** interacciones que comprenden el promotor y una parte de un gen, con un efecto represivo sobre la transcripción; **(II)** interacciones que excluyen al promotor, resultando en una reducción de la transcripción del gen; **(III, IV)** interacciones entre promotores y regiones intragénicas que conducen a **(III)** eventos de corte y empalme alternativos o **(IV)** uso alternativo de sitios de poliadenilación críptica. **(C)** Bucles de genes que afectan la transcripción **(I)** divergente y **(II)** antisentido. **(D)** Bucles intergénicos, interacciones que involucran la yuxtaposición de regiones de cromatina entre genes adyacentes. **(E)** Bucle de elemento

regulador-promotor, son estructuras que reúnen elementos distales a los promotores de los genes. (Figura modificada de [105]).

7.1.14 ARNs pequeños, metilación del ADN y su influencia en interacciones de cromatina de corto alcance

Tal como fue mencionado antes, las marcas epigenéticas influyen en la estructura tridimensional de la cromatina. Uno de los casos más estudiados corresponde al bucle entre los *loci* *PID* y *APOLO*. Su formación se basa en la deposición, desencadenada por *APOLO*, de marcas represivas H3K27me3 (me3: triple metilada) en la región intergénica *PID/APOLO*. Estas marcas H3K27me3 sirven como puntos de anclaje para reclutar a los sitios de anclaje a la proteína LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) que interactúa con *APOLO* uniendo las histonas metiladas y estableciendo el bucle intergénico [93].

En *FLC*, el complejo de remodelación de histonas SWI/SNF, particularmente su subunidad BAF60, se asocia con el *locus*, aumentando las marcas de H3K27me3 y reduciendo H3K9Ac (Ac: Acetilada). Estas modificaciones, conducen a la interrupción del bucle del gen *FLC*, reprimiendo su expresión [122]. BAF60 también se une a las regiones promotoras de *IPT3*, *IPT7* y *KRP7* durante el desarrollo de la raíz. Como consecuencia, es capaz de reducir las marcas de H3K4me3 y el reclutamiento de RNAPII, aumentando la deposición de H3K27me3, lo que lleva a la desestabilización de los bucles de genes en estos *loci* con su consecuente represión [110].

La definición de los puntos de anclaje de los bucles, parece además implicar la metilación del ADN de regiones específicas que preceden a las modificaciones de histonas y la formación de estas estructuras. En el caso del *locus* antes mencionado *PID/APOLO*, la metilación *de novo* mediada por RdDM de regiones específicas en todo el cuerpo del gen *APOLO* estabiliza la formación de los bucles. El hecho de que RdDM pueda desencadenar estas interacciones, apunta a que los sRNAs son señales tempranas en este proceso. De acuerdo con ello, se han encontrado abundantes sRNAs que alinean con la región del extremo 3' del *locus FLC*, donde reside el punto de anclaje del bucle existente en este *locus* [91],[108].

Llamativamente, en la mayoría de los casos se desconoce el origen de los sRNAs o mecanismos que disparan la metilación de los puntos de anclaje de los bucles. En el caso de *PID/APOLO*, la metilación del ADN parece depender de los niveles del transcripto *APOLO*. Por lo tanto, es de esperar que los sRNAs se produzcan a partir de

este ncRNA y actúen en *cis*. En *FLC*, los sRNAs se unen a una región donde no se espera transcripción, lo que sugiere que éstos se producen en *trans* [91],[108]. Sin embargo, es posible que los dsRNAs, formados por la hibridación de los ARNm complementarios de *FLC* y *COOLAIR*, sirvan como molde para la producción de sRNAs.

Las interacciones de corto alcance en la cromatina, emergen como elementos particularmente dinámicos de la regulación génica [97],[105]. El mecanismo preciso por el cual ejercen control sobre la expresión génica aún se desconoce. En la mayoría de los casos, parece implicar una restricción física, ya sea agrupando elementos reguladores para facilitar la transcripción [108],[122] o dificultando la actividad RNAPII [112]. Muchas de las interacciones de cromatina actualmente reportadas, han sido identificadas en *A. thaliana* y esto se debe a que, tanto los bucles que afectan a genes divergentes como aquellos intergénicos, tienen más probabilidades de ocurrir en esta especie con genoma compacto que en otras plantas. Por otro lado, las especies con genomas más grandes y complejos, son más ricas en elementos repetitivos, como los MITEs [123], teniendo un impacto profundo en la topología de la cromatina y la expresión génica. Por lo tanto, es de esperarse que algunas características de la topología de la cromatina de *A. thaliana* no se conserven en otras especies y resulta interesante su estudio en detalle. Otro aspecto que requiere más investigación es cómo se forman y mantienen estos bucles en plantas, ya que no está claro qué factores se requieren para promover su formación y estabilización.

7.2 Objetivos

Dada la redundancia de los TEs en genomas de plantas, y que, lejos de ser considerados como “ADN Basura”, son los principales contribuyentes a la complejidad del genoma en eucariotas, resulta muy interesante analizar los efectos que estos generan al insertarse en regiones transcripcionalmente activas y evaluar su influencia sobre genes cercanos. En nuestro laboratorio, encontramos un elemento de naturaleza transposónica, del tipo MITE, presente en la región promotora del gen *HaWRKY6* en girasol. Al ser transcrito, este MITE produce un ARN no codificante estructurado. Es por ello que decidimos, en la primera parte de la tesis, focalizarnos en la caracterización del comportamiento del ARN no codificante encontrado, evaluar su capacidad de generar het-siRNAs y analizar los posibles efectos que genera en la expresión de su gen vecino.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Plásmidos

pCR™8/GW/TOPO™: Se utilizó como vector de entrada para clonar productos de PCR (del inglés *polymerase chain reaction*). El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina (T) en los extremos 5', para permitir la ligación mediada por la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida al vector. El sitio de clonado direccional TOPO® está flanqueado por las regiones de homología *attL1* y *attL2* para permitir la recombinación LR en vectores *Gateway* de destino. El vector confiere resistencia a espectinomicina a aquellas bacterias transformadas.

pENTR™/D-TOPO®: También es un vector de entrada (Life Technologies) que permite el clonado direccional de productos de PCR con extremos romos. Para tal fin, es necesario agregar la secuencia de 4 nt CACC, en el extremo 5' del cebador sentido, complementario al extremo sobresaliente GTGG del vector, permitiendo una única orientación de clonado. Al igual que *pCR™8/GW/TOPO™*, se provee lineal y contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. Este vector también es compatible con el sistema *Gateway*, permitiendo así la recombinación a diferentes vectores de destino. Como marcador de selección en *E. coli*, posee el gen de resistencia a kanamicina.

pGEM®-T Easy: Es un vector de clonado linealizado con una T en ambos extremos 3'-terminal, siendo compatible con los productos de PCR generados por polimerasas termoestables como *Taq* polimerasa, lo que mejora la eficiencia de ligación de los productos de PCR al evitar la recircularización del vector. Es de alto número de copias y contiene un sitio múltiple de clonado dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa. La inserción del fragmento de interés interrumpe la región codificante del péptido α de la enzima, lo que permite la identificación de las colonias recombinantes mediante la detección de las colonias blancas en placas que contengan X-gal, descartando así las que son azules.

pGWB433: Es un vector pGREEN-IIS [124] utilizado como vector de destino. El vector posee dos orígenes de replicación, siendo uno de ellos para *E. coli*, organismo donde la manipulación genética es más sencilla y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, posibilitando la infección de plantas. En este vector el gen de la replicasa *RepA* (necesario para la replicación del plásmido) se encuentra eliminado, de manera de generar un plásmido de tamaño más reducido para facilitar los clonados. Por lo tanto,

para poder replicarse, necesita como complemento la co-transformación con el plásmido *pSoup* el cual aporta el gen RepA en *trans*. El vector posee resistencia a espectinomicina y es empleado para realizar fusiones C-terminal al gen reportero GUS.

pFK205: Se utilizó como vector de destino. Es un vector pGREEN modificado y, como tal, posee dos orígenes de replicación como el vector *pGWB433*. No contiene promotor, lo que lo convierte en un vector vacío al que se le puede adicionar un promotor de interés y posee un terminador *rbsc*. Confiere resistencia a kanamicina a las plantas que fueron transformadas eficientemente.

pFK210: Es un vector pGREEN-IIS que se utilizó como vector de destino. Posee el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S CaMV (35S), el cual dirige la expresión constitutiva y ectópica del gen en estudio y un terminador *rbsc*. Confiere resistencia al herbicida BASTA a las plantas que fueron transformadas eficientemente.

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

7.3.2 Cepas bacterianas

Escherichia coli, DH5 α [F^- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K , m_K^+) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1] [125].

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 T-DNA 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 [126].

7.3.3 Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos

Todos los stocks de *A. thaliana* utilizados son del ecotipo Col-0. Las mutantes de *A. thaliana* *ago4-2* [127], *dcl2/3/4* [128], *rdr2-1* (CS879934), *rdr6-12* (CS24286) y *Helianthus annuus* L. cv HA89 fueron crecidos en una cámara de cultivo a 22-24°C en fotoperíodo de día largo (16 horas luz/8 horas oscuridad) con una intensidad lumínica aproximada de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las plántulas de *A. thaliana* fueron crecidas en placas de Petri conteniendo medio semisólido Murashige and Skoog (SigmaAldrich) 0,5X (pH 5,7) y agar al 0,6% (p/v). En el caso de selección con kanamicina, al medio MS-Agar se le adicionó 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del

antibiótico. Para germinar las semillas de *A. thaliana* en placas, se las desinfectó con etanol 70% (v/v) por 5 min, luego por 30 min 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. Finalmente, las semillas fueron resuspendidas en una solución de agar 0,1% (p/v) estéril, estratificadas en oscuridad a 4° C por 2-3 días, y sembradas en las placas de Petri conteniendo medio MS-Agar y antibiótico si correspondiese. El proceso anteriormente descrito se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo de aire laminar. Alternativamente, las plantas *A. thaliana* fueron cultivadas en macetas (837 cm³) con sustrato Klassman.

Por otro lado, las semillas de girasol fueron esterilizadas superficialmente al igual que las semillas de *A. thaliana* y colocadas en placas de Petri sobre papel de filtro saturado con agua. Se incubaron 3 días en oscuridad en cámaras de cultivo y luego las plántulas de girasol fueron transplantadas a macetas con sustrato Klassman. Posteriormente, fueron crecidas en la cámara de cultivo hasta llegar al estadio deseado de desarrollo (Generalmente V4). Para los tratamientos con 5-Azacidina (5-AZA), las semillas de girasol desinfectadas fueron colocadas en placas de Petri sobre papel de filtro saturado con una solución acuosa de 50 µM de 5-Aza-2-deoxicitidina (Sigma-Aldrich) o bien la misma cantidad de DMSO como control durante 3 días. Las plántulas tratadas fueron transferidas a macetas con arena suplementadas con Hakaphos en la cámara de cultivo hasta que se recolectaron las muestras 7 días después del trasplante. Las hojas y cotiledones infiltrados con un plásmido vacío fueron utilizadas como control para los tratamientos con P19. Se utilizó una mezcla de muestras control de P19 y 5-AZA, dado que no se detectaron diferencias entre estos dos controles.

7.3.4 Construcciones

La secuencia EST del gen *HaWRKY6* puede encontrarse en la base de datos de EMBL/GenBank bajo el código de acceso BU024714. El promotor de *HaWRKY6* fue aislado de plantas de girasol HA89 mediante PCR. Luego, distintas regiones del promotor fueron clonadas en el plásmido *pCRTM8/GW/TOPOTM* (Life Technologies). El IR presente en el promotor, fue subclonado en el vector *pFK210* en sentido y en anti-sentido bajo la expresión del promotor 35S. A su vez, las distintas versiones del promotor *HaWRKY6* fueron luego fusionadas al gen reportero de la β-glucuronidasa (GUS) mediante recombinación con el plásmido *pGWB433*. Todas las versiones del promotor fueron clonadas en sentido y en anti-sentido con respecto al gen reportero. Por otro lado, el ADN genómico del promotor *HaWRKY6* junto con el gen *HaWRKY6* fue

clonado en el plásmido *pENTR™/D-TOPO®* en dos versiones (con y sin el IR) para luego ser recombinados con el vector *pFK205*. Las construcciones generadas con sus descripciones se alistan en la Tabla 1. Los cebadores utilizados para los clonados, se alistan en la Tabla 2.

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

La amplificación de fragmentos de ADN para clonados, análisis de mutantes insercionales, 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, dNTPs 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 (Transgen Biotech) para reacciones de chequeo, o *Pfu* ADN polimerasa (Thermo Scientific) para amplificaciones de fragmentos que fueron luego clonados, por cada 10 μL de volumen de reacción. Los volúmenes finales de reacción fueron de 20 μL, o 50 μL para amplificaciones de fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: (30 s 94° C, 30 s [T_m - 5]° C, *t* a 72° C) x 30 ciclos + 10 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 min por cada 1000 pb a amplificar, mientras que para *Pfu* ADN polimerasa el tiempo estimado fue de 2 min por cada 1000 pb. Los productos de amplificación fueron resueltos y visualizados en geles de agarosa.

7.3.6 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. Para ello, se preparó agarosa en solución amortiguadora TAE 1X (Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L, ácido acético glacial 0,1% [v/v]) 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 (Glicerol 30% (v/v), Xylen cianol 0,25% (p/v), Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y Gel Red 1/1000 (Biotium®) y luego fueron

sembrados en el gel de agarosa. La corrida electroforética se llevó a cabo 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 transluminador de luz UV ENDURO GDS (Labnet, CA, USA).

7.3.7 Purificación de fragmentos de ADN

La purificación del fragmento de ADN luego de una corrida electroforética, se realiza con el objetivo de purificarlo para proceder con el proceso de clonado. Para ello, 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.

7.3.8 Clonados en vectores de entrada y vectores destino

Para los clonados en los vectores de entrada, en primer lugar, se obtuvieron los productos de amplificación mediante PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa para reducir la incorporación de mutaciones durante la amplificación. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa y purificados. En el caso del vector de entrada *pCR™8/GW/TOPO™* y el vector *pGEM®-T Easy*, y dado que la enzima *Pfu* genera fragmentos con extremos romos, se realiza la adición de un nucleótido de Adenina (A) al extremo 3' del fragmento amplificado para poder proseguir con los clonados. Luego, para obtener los vectores de entrada, después de la purificación de los fragmentos, se siguió el protocolo descrito por el fabricante de cada vector en particular. Brevemente, se mezclan 2,3 µL del producto de PCR purificado, 0,2 µL del vector de entrada *pCR™8/GW/TOPO™* o *pENTR™/D-TOPO®*, y 0,5 µL de solución salina provista con el vector. Se incubó a temperatura ambiente de 30 min a 2 h, y se transforman células de *E. coli* electrocompetentes. Luego de 24 hs de crecimiento de las bacterias a 37°C, se procedió al chequeo de las mismas mediante PCR de colonia. En el caso del vector *pGEM®-T Easy*, se agregaron 3 µl del producto PCR purificado en una mezcla de ligación de 10 µl. La mezcla se incubó a 4°C durante la noche y luego se utilizaron 5 µl para transformar *E. coli* competentes. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar LB-Ampicilina/IPTG/X-Gal y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se chequean por PCR de colonia solo las blancas.

Una vez confirmados los clones positivos, se realizaron minipreparaciones del ADN plasmídico y se procedió con los clonados por recombinación *Gateway* en los vectores de la serie *pGREEN IIS* (Invitrogen). Los mismos se realizaron utilizando la enzima LR Clonase™ (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclan 150 ng del vector de entrada con el fragmento a recombinar, 100 ng del vector destino, 0,5 µL de LR Clonase™, y se lleva a volumen final 3 µL con solución amortiguadora TE 1X. Se incubó a temperatura ambiente de 2 a 4 h, y se procede a la transformación de bacterias.

7.3.9 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 (Peptona de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. A continuación, el cultivo de células se centrifugó a 1500 g durante 5 min y el sedimento celular se resuspendió en 100 µL de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar (Medio LB, agar 15 g/L) 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 fragmento del tamaño correcto), fueron repicadas en medio LB líquido para realizar posteriormente minipreparación de ADN plasmídico.

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

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens*, se tomaron células competentes a las que 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 1500g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en 100 µL de medio LB. Se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con gentamicina (5 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml), 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*.

7.3.11 Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* transformadas se realizó según el método de lisis alcalina [129]. Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB 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 I* de minipreparación (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de *solución II* de minipreparación (NaOH 0,2 N; SDS 1% [p/v]), los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de *solución III* (KAc 5 M [pH 5,2]) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 min antes de ser centrifugada a 13000 g por 10 min 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 min a 10000 g y 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 h y posteriormente se centrifugó a 13000 g por 10 min 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 min 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.

Para la obtención de 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.

7.3.12 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 ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron provistos en forma electrónica.

7.3.13 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 durante 15 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 300 µL de solución de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5% [p/v]), 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 min 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.

7.3.14 Extracción de ADN genómico de plantas de *Helianthus annuus*

El método utilizado para aislar ADN genómico proveniente de plantas de girasol fue adaptado de Zhang y col, 2014 [130]. Se agregaron 500 µL de solución amortiguadora CTAB 2% (por cada 200 mL: 4 g CTAB, 4 g PVP-10, 20 mL Tris-HCl 1 M pH 7.5, 56 mL NaCl 5 M, 16 mL EDTA 0.5 M pH 8.0, 0,2% β-mercaptoetanol, Agua miliQ hasta los 100 mL) por cada 100 mg de tejido congelado y pulverizado. Se homogeneizó e incubó a 65°C durante 30-60 minutos. Las muestras se enfriaron 15 minutos a temperatura ambiente y se les agregó 0,2% de β-mercaptoetanol. Se dejó actuar 5 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregó 1 volumen de cloroformo. Se mezcló en vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g. A la fase acuosa se le agregó 1 volumen de isopropanol y se precipitó el ADN por 30 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. Se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70%, centrifugando durante 5 minutos a 9000 g. Se evaporó el etanol durante 5 minutos y se disolvió en 50 µL de agua miliQ estéril. A continuación, se agregaron 2 µL de RNasa A (10 mg/mL) por cada 500 µL de solución de ADN, se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se agregó agua miliQ hasta llegar a los 350 µL de volumen final y se

agregaron 350 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:1:1) pH 8.0. Se sometió a vortex durante 5 segundos y luego se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos. La fase acuosa (300 µL aprox) se transfirió a un tubo limpio y se mezcló con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), llevándolo al vortex durante 5 segundos. Nuevamente, se centrifugó a 12000 g durante 8 minutos. Luego, la fase acuosa remanente (250 µL aprox) se transfirió a un tubo y se agregaron 2 volúmenes de etanol y 0,1 volumen de NaOAc 3 M (pH 5.2), mezclando hasta homogeneización. Se dejó precipitar a -20°C durante no menos de 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g por 10 minutos. Inmediatamente, se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70% centrifugando a 9000 g durante 5 minutos. Luego de eliminar por volcado la fase acuosa, se secó el pellet y se disolvió en 30-40 µL de agua bidestilada estéril.

7.3.15 Chop-qPCR

Los experimentos de Chop-qCR (Chop viene del inglés “*chopped*” que significa “picado”) se realizaron utilizando 100 ng de ADN genómico digerido con enzimas de restricción utilizando *HpaII* (sensible a la metilación) y *MspI* (insensible a la metilación) como fue descrito anteriormente [130]. Para la q-PCR, se prepararon 20 µl de la mezcla de reacción siguiendo el protocolo que se detalla en la sección 5.3 y se utilizó 1 µl del ADN digerido como molde por reacción. Las cantidades de ADN en las diferentes muestras se normalizaron mediante la amplificación de una secuencia de control interno que no contenía el sitio de restricción de la enzima utilizada.

7.3.16 Secuenciación post tratamiento con Bisulfito de sodio

La secuenciación post bisulfito se realizó mediante el procedimiento de Foerster y Mittelsten, 2010 [125]. En resumen, se hicieron extracciones de ADN genómico de los tejidos de girasol como fue descrito anteriormente en la sección 4.10. Posteriormente, se tomaron cantidades iguales de ADN y se realizó la conversión por bisulfito utilizando el kit EZ DNA Methylation-Lightning™ (Zymo Research, N° de cat. D5030). A continuación, se procedió con la amplificación por PCR de los fragmentos de interés utilizando oligonucleótidos degenerados para aislar cada hebra por separado. Las hebras de ADN deben analizarse por separado, ya que luego de la conversión probablemente no sean complementarias. Si hay una cantidad suficiente de ADN convertido al comienzo de la PCR, el amplicón representa copias diferentes de ADN genómico. Por lo tanto, la comparación de varios clones de plásmidos obtenidos por la inserción del mismo fragmento de PCR, permite un análisis estadístico y a la vez revela la variabilidad de los patrones de metilación entre copias genómicas. Por lo tanto,

posteriormente se clonan los fragmentos amplificados en vectores *pGEM-T-Easy* como ya fue especificado previamente en la Sección 7.3.8. Para evaluar el porcentaje de conversión, se amplifica un segmento de ADN completamente no convertido en una región que se sabe que no está metilada, en este caso se utilizó el gen de la ATPasa mitocondrial que se encuentra completamente desmetilada. Luego, el cálculo del porcentaje de citosinas metiladas/no metiladas en todos los contextos se realizó mediante el software abierto Kismeth [131], así como los gráficos de puntos incluidos en la Figura 7B. Los cebadores de los ensayos de Chop-qPCR y secuenciación luego del bisulfito se enumeran en la Tabla 2.

7.3.17 Captura de la conformación del cromosoma

Los ensayos de la conformación cromosómica (**3C**, del inglés *Chromosome Conformation Capture*) se realizaron como se describe en Louwers y col., 2009 [132]. Debimos ajustar las condiciones a las plantas de girasol, comenzando con 12 cotiledones y 12 hojas de plantas en estadio V4 y se realizó un crosslinking con formaldehído 1%, luego de lo cual se congeló en Nitrógeno líquido y se pulverizó. A este material, se le agregó **Solución de Extracción I** (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.4 M sacarosa, 10 mM MgCl₂, 5 mM BME, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.2 mM [**PMSF** del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*]) y fue homogeneizado con agitación suave hasta que se descongeló, posterior a lo cual se centrifugó a 2000g durante 20 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en **Solución de Extracción II** (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.25 M sacarosa, 10 mM MgCl₂, 5 mM BME, 1% Triton X-100, PMSF 0.2 mM). Luego, se centrifugó durante 10 minutos a 2000g 4° C. Este paso de lavado se repitió una vez y por último el pellet se resuspendió en **Solución de Extracción III** (10 mM Tris-HCl pH 8, 1.7 M sacarosa, 2 mM MgCl₂, 5 mM BME, 0.15% Triton X-100, PMSF 0.2 mM) en tubos eppendorf y, a continuación, se centrifugó a 13000g durante 5 minutos a 4°C. Luego, se procedió con la digestión con las enzimas correspondientes. Las mismas se realizaron durante la noche a 37°C con 400 U de *HindIII* o *MspI* (Promega). Luego, el ADN se ligó mediante incubación a 22°C durante 5 h en un volumen de 4 mL usando 100 U de ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific). Después de revertir el crosslinking realizando un tratamiento con proteinasa K (Invitrogen) a 65°C durante toda la noche, el ADN se recuperó mediante extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol. La frecuencia relativa de interacción se calculó mediante q-PCR, procedimiento que se detalla en la sección 5.3. Para normalizar la cantidad de ADN presente en las muestras, se utilizó una región que

no se corta ni por *HindIII* ni por *MspI*. Los cebadores utilizados para detectar y cuantificar la presencia de bucles se especifican en la Tabla 2.

7.3.18 Inmunoprecipitación de la cromatina

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (**ChIP**, del inglés *Chromatin ImmunoPrecipitation*) en plantas de girasol en estadio V4. Para la extracción de núcleos, utilizamos un procedimiento modificado de Sikorskaite y col., 2013 [133], adaptándolo al tejido de girasol. Brevemente, los homogenatos se decantaron a través de filtros Miracloth prehumedecidos (100 µm), se resuspendieron en 15 mL de Solución Tampón de aislamiento de núcleos (**NIB**, del inglés *Nuclei Isolation Buffer*) (1×NIB: 10 mM MES-KOH (pH 5.4), 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT). Luego, se añadió Triton X-100 al 10% hasta una concentración final del 1% y se agitó suavemente durante 20 minutos a 4°C. La suspensión, se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió suavemente en NIB. Luego, el extracto de núcleos se adicionó suavemente en la parte superior del gradiente de densidad previamente ensamblado (5 mL Percoll 60%/5 mL Sacarosa 2.5 M). El gradiente se sometió a centrifugación en un rotor oscilante a 2000 xg durante 30 minutos a 4°C. A continuación, el líquido por encima del gradiente se diluyó con 5 volúmenes de NIB, se incubó durante 10 minutos con agitación suave y se centrifugó a 2000 xg durante 10 minutos. Los núcleos extraídos fueron resuspendidos luego en Solución Tampón de lisis Nuclear (**NLB**, del inglés *Nuclei Lysis Buffer*) (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 10 mM EDTA, 200 µM PMSF) y la inmunoprecipitación se realizó mediante el procedimiento descrito anteriormente [93]. Brevemente, se procedió con la fragmentación de la cromatina, utilizando un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (10 ciclos de 30 s de pulsos a alta intensidad/30 s sin pulsos). Los residuos nucleares se sedimentaron y el sobrenadante se diluyó diez veces con **Solución de Dilución de ChIP** (Triton X-100 1,1% (v/v), EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8,0, NaCl 167 mM.). La inmunoprecipitación se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche con 100 µl de beads magnéticas lavadas, Sure Beads™ Proteín-A (Bio Rad) y la cantidad apropiada de anticuerpo anti-RNAPII (Santa Cruz). Después de lavar cinco veces con solución de dilución de ChIP, las beads se resuspendieron en 100 µl de solución TE 1X y se agregó 1 µl de proteinasa K 20 mg/L (Quiagen). Las muestras se incubaron a 43 °C durante 1 h y la proteinasa K se inactivó mediante una incubación a 95 °C durante 10 min. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a máxima velocidad, y finalmente se utilizaron 1,5 µl para las reacciones de q-PCR. Se realizaron controles negativos con muestras en las que no se incluyeron anticuerpos específicos.

7.3.19 Aislamiento de ARN de plantas

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 preparado (cada 100 ml Trizol: 38 mL fenol ácido, 0,8 M tiocianato de guanidina, 0,4 M tiocianato de amonio, 0,1 M NaAc pH 5,0, 5% glicerol, H₂O hasta 100 mL). Se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló y resuspendió completamente en el reactivo, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min en la mesada. Luego se adicionó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla se centrifugó durante 15 min 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 min a temperatura ambiente. Finalmente, para precipitar el ARN total de la muestra, se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4° C y el pellet obtenido se lavó con etanol 70 % v/v. 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).

7.3.20 Transcripción reversa (RT)

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando 1µg 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 nt 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 se utilizaron oligonucleótidos dN6 (mezcla de oligonucleótidos de 6 pb con secuencias aleatorias) que permite amplificar cualquier tipo de ARN, incluyendo ncRNAs.

7.3.21 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las RT-qPCRs (del inglés *RetroTranscribed quantitative PCRs*) se realizaron en un termociclador Mx300SP (Stratagene, La Jolla, CA, USA), en un volumen final de reacción de 20 µL conteniendo 1X solución amortiguadora para Taq ADN polimerasa (Transgen Biotech), 0,2 µM de cada oligonucleótido específico (especificados en la Tabla 2), 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) para la normalización de los niveles de expresión de los transcritos analizados. Los promedios de triplicados biológicos y EEM se calcularon a partir de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, y el error se mostró como dos veces EEM. Cada réplica se trató como muestras independientes para el análisis estadístico. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante un análisis de test T no pareado y se corrigieron con el método de Holm-Sidak para comparaciones de varios pares. Aquellos p-valores menores que 0.05 fueron marcados en las figuras como **, mientras que los valores inferiores a 0.01 como *.

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

El ARN total fue extraído utilizando Trizol, tal como fue descrito previamente en la sección 5.1. Los ensayos de *Northern Blot* fueron llevados a cabo según fue reportado anteriormente [134]. Brevemente, 5 µg de ARN total se resolvieron en geles de poliacrilamida al 17% (v/v) en condiciones desnaturalizantes (7 M urea) y luego fueron transferidos a membranas de Nylon cargadas HyBond-N+ (Amersham) mediante transferencia semihúmeda. Luego, el ARN fue fijado en forma covalente a las membranas mediante UV (UV Crosslinker Analytik Jena US). Las membranas fueron hibridadas durante toda la noche con sondas de oligonucleótidos de ADN marcadas con un kit de marcado del extremo 3' con Digoxigenina (DIG) (Roche). Distintas sondas que reconocen la región del IR fueron utilizadas para maximizar la detección de los sRNAs derivados; la señal fue luego detectada con solución fosfato 3- (4-metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2'- (5'-cloro) triciclo [3.3.1.13,7] decan} -4-il) fenil disódico lista para su uso (CSPD, Roche) por exposición con film ECL Amersham (GE Healthcare Life Science). Las secuencias de las sondas se enlistan en la Tabla 2.

7.3.23 Secuenciación de ARNs pequeños

Se prepararon bibliotecas de ARNs pequeños según lo indicado por el kit de preparación de bibliotecas de ARN pequeño TruSeq (Illumina). Se utilizaron 50 ng de ARNs pequeños purificados con el kit de recuperación PAGE de ARN pequeño ZR (Zymo Research) para la preparación de la biblioteca. Las bibliotecas de ARNm, fueron realizadas partiendo de 1 µg de ARN total, como se describe en la guía de preparación de muestras de ARN TruSeq V2 (Illumina). Las librerías de sRNAs y ARNm fueron

seleccionadas por tamaño usando el Sistema BluePippin (SAGE Science). La secuenciación de Illumina de un solo extremo se realizó con el equipo HiSeq3000.

7.3.24 Transformación estable de plantas de *A. thaliana* por inmersión floral

Las plantas de *A. thaliana* fueron transformadas por el protocolo de “floral dip” descrito previamente por Clough y Bent, 1998 [135]. Las plantas se cultivaron hasta la entrada en estado reproductivo donde la primera vara floral emergente fue cortada para estimular el nacimiento y desarrollo de varas secundarias. Las plantas fueron crecidas hasta floración en las condiciones descritas anteriormente. Cuando el número de inflorescencias y calidad de las flores fue el adecuado, se procedió a la transformación. Para esto se utilizaron células de la cepa de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido binario de interés, según la metodología descrita anteriormente. Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron durante 16 horas a 28 °C con agitación células de *A. tumefaciens* en frascos que contenían 3 mL de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, tetraciclina, espectinomicina y cloranfenicol. Estos cultivos se utilizaron para inocular un Erlenmeyer que contenía 200 mL del mismo medio suplementado con los antibióticos nombrados anteriormente. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28 °C, con agitación). Luego se precipitaron por centrifugación a 5500 g durante 20 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 5% que contenía 40 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.) y esta suspensión se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético. Las plantas se sumergieron entre 30 y 60 segundos, tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra y hojas. 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 colocaron en posición vertical y se cultivaron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra). Cuando las silicuas se secaron y se tornaron de un color marrón claro, se colectaron las semillas y se guardaron en cámara fría (4°C) para su posterior selección y análisis.

7.3.25 Transformación transitoria de plantas de *Helianthus annuus*

La transformación transitoria de hojas y cotiledones de plantas de girasol se llevó a cabo como fue descrito anteriormente [136]. Para preparar la suspensión de transformación, se procede como en el apartado anterior. Se inocula una colonia de la

cepa *A. tumefaciens* que posee el gen de interés en un vector binario en 3 mL de medio líquido LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, tetraciclina, espectinomicina y cloranfenicol. Luego, se incuba el cultivo durante 16 horas a 28 °C en agitación (180-200 rpm). Se transfiere el cultivo saturado a un Erlenmeyer que contiene 200 mL de medio LB suplementado con los antibióticos apropiados al que se le adiciona, además, 5 µM de acetosiringona. Se incuba durante 16 horas a 28 °C en agitación. Posteriormente, se transfiere el cultivo crecido a un tubo falcon estéril al que se le agrega 10 mL de tampón de infiltración. Se emplea esta solución para preparar una suspensión bacteriana de 0.5 D (600 nm) en tampón de infiltración. Se incuban las células durante 4-6 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Si el experimento implica la sobreexpresión de un gen, se agrega al mismo tubo 10% vol/vol de una suspensión bacteriana que contenga el plásmido que exprese p19, preparado en otro tubo al mismo tiempo. Las bacterias transformadas con el plásmido p19 suprimen el silenciamiento del gen sobreexpresado. La proteína codificada por este plásmido inhibe el silenciamiento mediado por sRNAs.

7.3.26 Tinción histoquímica GUS

Quince líneas independientes expresando cada construcción fueron utilizadas para la detección histoquímica de la actividad de GUS como se describe a continuación. Los distintos tejidos (plántulas, hojas, flores, inflorescencias y silicuas) fueron recolectadas e incubadas con solución de tinción (2 mM de solución reguladora de Potasio-Ferrocianuro, 2 mM solución reguladora de Potasio-Ferricianuro, 0,2% Triton X-100, 50 mM NaPO₄ pH7.2, 2 mM X-gluc). Las muestras fueron infiltradas al vacío durante 5 minutos y luego incubadas en oscuridad a 37°C durante toda la noche. Para la decoloración, se realizaron lavados sucesivos con etanol (20%, 30%, 50%) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, las muestras fueron incubadas en etanol 70% hasta que la clorofila se remueva completamente.

7.3.27 Análisis de las librerías de sRNA-seq

Las lecturas de sRNAs, se procesaron primero para eliminar los adaptadores de lectura 3' usando Trim_galore! con la opción small_rna (versión 0.4.2, https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore). Luego, se mapearon en la región genómica que contiene el locus *HaWRKY6* más la región flanqueante de 10,000 pb, 5,000 pb hacia arriba y hacia abajo (cromosoma HanXRQChr17, coordenadas 18992761-18999078 en el genoma de *Helianthus annuus* XRQ r1.0, [137]. Esto fue realizado con STAR (versión 2.5.2b) usando los siguientes parámetros:

outFilterScoreMinOverLread 0 outFilterMatchNmin 16 outFilterMatchNminOverLread 0
outFilterMismatchNoverLmax 0.05 seedSearchStartLmax 30 alignIntronMax 1
alignEndsType EndToEnd. Las lecturas mapeadas se filtraron adicionalmente en
alineaciones de lecturas de 21 o 24 nt de longitud, los perfiles de cobertura en las hebras
de Watson y Crick se obtuvieron con bedtools [138] y, finalmente, los perfiles de
cobertura se graficaron en R (R Core Team, 2017) con el paquete Gviz [139]. Los datos
de secuenciación, están disponibles en el European Nucleotide Archive (ENA) con los
números de acceso PRJEB28614.

7.3.28 Identificación de copias adicionales del ncRNA-W6

Se buscaron copias adicionales similares al TE que produce el ncRNA-W6 en el genoma
de *Helianthus annuus* XRQ r1.0 con Blast. La secuencia ncRNA-W6 de 260 nt se utilizó
como consulta y se consideraron aciertos con una identidad del 90% o superior y más
de 200 nt alineados. Se elaboró un gráfico circular que muestra la distribución genómica
de los aciertos utilizando CIRCOS (v0.69-3) [140].

7.3.29 Predicción de repeticiones invertidas en el genoma del girasol

Con el fin de identificar las repeticiones invertidas en los promotores de los genes de
girasol, excluyendo los genes de ARN de transferencia, se extrajeron regiones de 1000,
2000 y 5000 pb aguas arriba de los genes en todo el genoma XRQ r1.0 [137]. A
continuación, se identificaron las repeticiones invertidas utilizando el programa einverted
del paquete de software EMBOSS, estableciendo una longitud máxima de repetición de
1000 pb, una longitud mínima de 150 pb, una penalización por espacios o “gaps” de 8,
una puntuación de coincidencia de 3 y una puntuación de discordancia de -4. Además,
las lecturas de sRNA-Seq se mapearon al genoma con “bowtie” (permitiendo 1
desajuste, las mejores opciones y estratos y reportando hasta cinco alineamientos) y el
recuento de lecturas de 24 nt que coinciden perfectamente con los IR se determinó con
convergeBED de bedtools [138]. Las lecturas por kb por millón de lecturas mapeadas
(**RPKM**, del inglés *Reads Per Kilo base per Million mapped reads*) se determinaron en
función del recuento de lecturas mapeadas por cada librería y la longitud total de las dos
repeticiones en el IR.

Tabla 1. Construcciones utilizadas. Todas se basan en vectores pGREEN y confieren resistencia a Basta o kanamicina en plantas.

Transgen	Nombre	Descripción	Referencia
35S::ncRNA W6 (A)	pDG007	Promotor 35S (Pro35S) dirigiendo la expresión del <i>ncRNA-W6</i> en sentido.	Este trabajo
35S::ncRNA W6 S	pDG008	Promotor 35S (Pro35S) dirigiendo la expresión del <i>ncRNA-W6</i> en antisentido.	Este trabajo
Pro_{HaWRKY6} corto (S):GUS	pDG009	Versión corta del promotor <i>HaWRKY6</i> , excluyendo la región del IR (Pro _{HaWRKY6} corto) dirigiendo la expresión del gen reportero <i>Beta-glucuronidasa</i> (GUS).	Este trabajo
Pro_{HaWRKY6} corto (A):GUS	pDG010	Pro _{HaWRKY6} corto dirigiendo la expresión de GUS en antisentido.	Este trabajo
Pro_{HaWRKY6} (S):GUS	pDG011	Promotor entero <i>HaWRKY6</i> dirigiendo la expresión de GUS.	Este trabajo
Pro_{HaWRKY6} (A):GUS	pDG012	Promotor entero <i>HaWRKY6</i> dirigiendo la expresión de GUS en antisentido.	Este trabajo
pUBQ::ncRNA W6 (A)	pDG014	Promotor de la UBIQUITINA-10 dirigiendo la expresión del <i>ncRNA- W6</i> en antisentido.	Este trabajo
gHaWRKY6	pDG019	Fragmento genómico del <i>locus HaWRKY6</i> desde el extremo 5' de la región del <i>ncRNA-W6</i> hasta 93 pb corriente debajo de la <i>región 3</i> (Ver en sección Resultados).	Este trabajo
gHaWRKY6(ΔIR)	pDG020	Fragmento genómico del <i>locus HaWRKY6</i> excluyendo la región del <i>ncRNA-W6</i> hasta 93 pb corriente debajo de la <i>región 3</i> .	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos y sondas utilizadas. F: Forward, sentido. R: Reverse, antisentido.

Gen/sRNA	Secuencia	Utilizado para
Sonda HaWRKY6	TTTGCCCAAAGTAACATACTT	Northern blot
Sonda HaWRKY6 nueva	AAGTATGTTACTTTGGGCAAA	Northern blot
Sonda U6	GCTAATCTTCTCTGTATCGTTCC	Northern blot
Actina	F: GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG R: GGAGATCCACATCTGCTGGAATG	q-PCR
Beta-glucuronidasa	F: TCCGATCACCTGCGTCAATG R: ACAGCACATCAAAGAGATCGC	q-PCR
Basta	F: CTCCCGCAGACGGACGAGG R: AAGCACGGTCAACTTCCGTA	q-PCR
Kanamicina	F: CTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC R: GATACCGTAAAGCACGAGGAAG	q-PCR
HaWRKY6	F: ATACGCTTTAGCAAATGAGAGAGAG R: AGCAAGTTGTGAGGTGAAATTTGGG	q-PCR
ncRNA W6	F: ACTTTTTCATTTTGTAAACGTTTGGAGG R: GTCCCTGTGGTTTGCACAAAG	q-PCR
Bisulfito región 1	F: GAAAGYTTTGTGTTTGGATTATTA AAAAAG R: TTCATTTARCATTA AATTAATTTTTTCTCA	Bisulfito-PCR-secuenciación
Bisulfito región 2	F: AGATAAYGATGTYTGGTGGTATAA R: CCACATAAACCTARAAARACCAAAA	Bisulfito-PCR-secuenciación
Bisulfito región 3	F: TGTGGATTGGTGATYYAYAAAAGATTA R: AAAACAATCCRCTCAATTCAAATTC AAT	Bisulfito-PCR-secuenciación
ATPasa Mitocondrial	F: TGAAYGAGATTYAAGYTGGGGAAATGGT R: CCCTCTTCCATCAATARRTACTCCCA	Bisulfito-PCR-secuenciación
Región 1	F: AAATTTGTAAAAAGTGAGAAGAYATGAAAA R: CATRRTTTTCAATAAAATTTATTC CAAAAT	Chop-qPCR
Región 2	F: GTCCCTAGATGATTCTGTAGTCCCTG R: TATTCATGTCACCCAGGTACAGTG	Chop-qPCR
Región 3	F: TCGGATCGGATCGGCTCATGAAC R: CAAAAGATTACAGAGATTCGGCTC	Chop-qPCR
Loop 1	F: ATTAATGAAAGCTTTGTGTTTGG R: GTGTCTTCTTATAAAACCGAGCG	3C-PCR
Loop 1	F: TCGGATCGGATCGGCTCATGAAC R: GGGACTATGTAATTA ACTCTGAG	3C-qPCR
Loop 2	F: GCCACATCAGTTACCCTTGATC R: GTGGAAACCTAAC AATAGAG	3C-PCR
Loop 2	F: GATCATCATGACACCC CAGTAA R: GGCCAAATGACTAAGGGTTTG	3C-qPCR
Loop 1 desde transgen	F: ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT R: GTGGAAACCTAAC AATAGAG	3C-PCR
Loop 1 desde transgen	F: ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT R: GGCCAAATGACTAAGGGTTTG	3C-qPCR
Loop 2 desde transgen	F: GGGACTATGTAATTA ACTCTGAG R: AACTCAGTAGGATTCTGGTGTGTGC	3C-PCR

Loop 2 desde transgen	F: GGGACTATGTAATTA ACTCTGAG R: TCGGATCGGATCGGCTCATGAAC	3C-qPCR
Ocupación RNAPII P1	F: ACTTTTCATTTTGTAACGTTTGGAGG R: GTCCCTGTGGTTTGCACAAAG	ChIP-qPCR
Ocupación RNAPII P2	F: AAACAGGTGTGCCGCAATCTAAC R: GGGACTATGTAATTA ACTCTGAG	ChIP-qPCR
Ocupación RNAPII P3	F: GATCATCATGACACCCCAAGTAA R: TCGTCGTCATCTATATAAGCGACTTC	ChIP-qPCR
Ocupación RNAPII P4	F: GGGACAAGTATAACTCTCTAACAAAC R: GACGGGTCTACTTTTACATAAACTC	ChIP-qPCR
Ocupación RNAPII P5	F: CAAAAATCAATGTCCCTAGATGATTC R: TATTCATGTCACCCAGGTACAGTG	ChIP-qPCR
Ocupación RNAPII P6	F: ATACGCTTTAGCAAATGAGAGAGAG R: AGCAAGTTGTGAGGTGAAATTTGGG	ChIP-qPCR
ncRNA-W6 Sentido	F: CACCTTCTAGATTAAATTGAGAAGAGTTAATTAC R: AGAGTTAATTACATAGTCCCTGTGG	Clonado
ncRNA-W6 Antisentido	F: AGAGTTAATTACATAGTCCCTGTGG R: CACCTTCTAGATTAAATTGAGAAGAGTTAATTAC	Clonado
Promotor HaWRKY6 corto (Sentido)	F: CACCTAATTA ACTCTGAGAAAAAATTAATTTAATGC R: TGTTAAGTTAGTTGATGGTTTGAAG	Clonado
Promotor HaWRKY6 corto (Antisentido)	F: TGTTAAGTTAGTTGATGGTTTGAAG R: CACCTAATTA ACTCTGAGAAAAAATTAATTTAATGC	Clonado
Promotor HaWRKY6 largo (Sentido)	F: CACCTTCTAGATTAAATTGAGAAGAGTTAATTAC R: TGTTAAGTTAGTTGATGGTTTGAAG	Clonado
Promotor HaWRKY6 largo (Antisentido)	F: TGTTAAGTTAGTTGATGGTTTGAAG R: CACCTTCTAGATTAAATTGAGAAGAGTTAATTAC	Clonado
HaWRKY6 fragmento genómico	F: CACCTTCTAGATTAAATTGAGAAGAGTTAATTAC R: GTGTCTTCTTATAAAACCGAGCG	Clonado
HaWRKY6 fragmento genómico ΔIR	F: CACCTAATTA ACTCTGAGAAAAAATTAATTTAATGC R: GTGTCTTCTTATAAAACCGAGCG	Clonado

7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Un ncRNA derivado de IR es transcripto desde la región proximal regulatoria del gen *HaWRKY6*

El gen de girasol *HaWRKY6* ha sido identificado previamente como un elemento evolutivamente reciente que se ha incorporado a la red regulatoria mediada por el miRNA396 [141]. La existencia y regulación post-transcripcional de *HaWRKY6* en girasol, les permite a estas plantas controlar la respuesta y adaptación a temperaturas elevadas [141]. En busca de identificar el TSS de *HaWRKY6* y su región promotora, alineamos Etiquetas de Secuencias Expresadas (**ESTs**, del inglés *Expressed Sequence Tags*) disponibles al *locus* completo. Las regiones expresadas, incluyendo intrones y exones fueron rápidamente reconocidos (Figura 7A). Curiosamente, pudimos detectar la expresión de una región discreta dentro de la región regulatoria del gen, específicamente entre 623 y 883 pb corriente arriba del TSS de *HaWRKY6* (Figura 7A). El análisis de ensayos de transcriptómica, confirmó la expresión de esta región y reveló la existencia de un sitio de *splicing* alternativo involucrando el exón 2 de *HaWRKY6* (Figura 7B). El análisis de la secuencia de la región expresada aguas arriba del *HaWRKY6*, reveló que no existe ningún marco abierto de lectura (**ORF**, del inglés *Open Reading Frame*) posible para una proteína tanto en sentido como en anti-sentido. Esto nos permitió definir al ARN resultante como un transcripto no codificante, el cual designamos como *ncRNA-WRKY6* (*ncW6*) (Figura 7B). Por otro lado, el alineamiento de esta secuencia contra el genoma de girasol reveló la presencia de múltiples copias del *ncW6* a lo largo del genoma, mientras que no se detectó ninguna copia en el genoma de *A. thaliana* (Figura 7C). Estos resultados, sugirieron que esta secuencia podría corresponder a un TE específico de girasol. Al igual que sucede con los MITEs, el *ncW6* es una molécula corta de 260 pb, posee regiones IRs terminales y no codifica para una transposasa, hecho que lo convierte en un elemento no autónomo (Figura 7B). Un análisis *in silico* reveló que el *ncW6* se pliega formando una estructura estable con una larga región de dsRNA, típico de ncRNAs regulatorios, MITEs y precursores de miRNAs (Figura 7D).

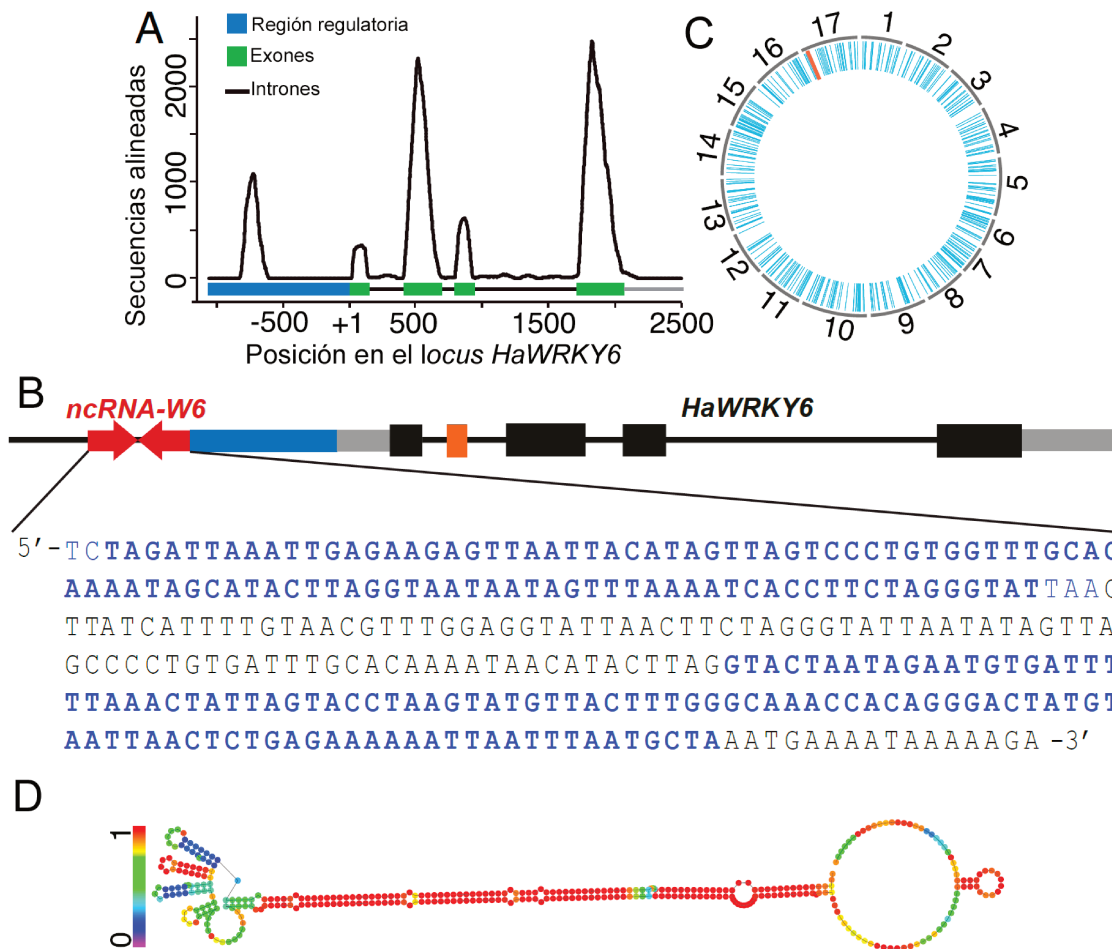


Figura 7. Un ncRNA derivado de IR es transcrito en el locus que codifica al gen *HaWRKY6*. (A) Alineamiento del locus *HaWRKY6* contra la base de datos de ESTs de girasol. (B) Análisis de la secuencia del promotor de *HaWRKY6*. Las bases coloreadas en azul, corresponden a las regiones repetidas invertidas con elevada complementariedad. Las flechas opuestas rojas, indican la región IR que se transcribe, los rectángulos representan los exones: en gris se muestran las UTRs, en negro las regiones codificantes mientras que en naranja se muestra el segundo exón alternativo. (C) Alineamiento de la secuencia del *ncW6* contra los 17 cromosomas de girasol. La línea roja muestra la posición del *ncW6* mientras que las líneas azules representan las copias similares al mismo a lo largo del genoma. (D) Estructura secundaria del *ncW6*. Las probabilidades de apareamiento de las bases están ordenadas en una escala que va desde 0 (Violeta) hasta 1 (Rojo). (Figura modificada de [142]).

7.4.2 Abundantes sRNAs son producidos a partir del transcripto *ncW6*

La naturaleza transposónica del *ncW6* y la estructura característica de dsRNA del transcripto generado, sugieren que éste podría actuar como sustrato de una proteína DCL para la producción de sRNAs que potencialmente podrían modular el contexto

epigenético de la región. Para evaluar esta posibilidad, en primera instancia, realizamos librerías de sRNAs en distintos tejidos de girasol y las sometimos a secuenciación de alto rendimiento Illumina (sRNA-seq). El análisis de las secuencias obtenidas, muestran un claro pico de sRNAs de 21 nt sobre el exón 3 que corresponde a las moléculas del miR396 que interaccionan con esta región regulando la expresión del gen [141] (Figura 8A). Por otro lado, hemos encontrado abundantes sRNAs de 24 nt que alinean con la región que codifica el *ncW6*, de aquí en adelante denominada Región 1, lo que indica que el *ncW6* es capaz de producir sRNAs. Sorprendentemente, la abundancia normalizada de estos sRNAs es mayor en cotiledones y raíces respecto de hojas (Figura 8A). A pesar de las múltiples copias encontradas de este MITE en el genoma de girasol (Figura 7C), los sRNAs de 24 nt que alinean sobre la secuencia del *ncW6* son en su mayoría únicos (Figura 8B), sugiriendo que se producen a partir de este transcripto no codificante. Además, pudimos detectar una cantidad considerable de sRNAs de 24 nt que mapean sobre otras dos regiones en el *locus HaWRKY6*: una dentro del cuarto intrón del gen y la otra corriente debajo de su región 3' UTR, de ahora en adelante denominadas como Región 2 y Región 3, respectivamente (Figura 8A). La discrepancia entre los niveles homogéneos del *ncW6* en cotiledones y hojas (Figura 8C), respecto a la variabilidad en estos tejidos en el contenido de sRNAs derivados de esta secuencia (Figura 8A) y en la expresión de *HaWRKY6* (Figura 8C), sugieren una potencial regulación entre estos elementos. Con el objetivo de determinar si el mecanismo de biogénesis de estos sRNAs provenientes del *ncW6* siguen la vía canónica de biogénesis de los het-siRNAs, transformamos plantas mutantes de *A. thaliana dcl2/3/4, rdr2-1, rdr6-12* y *ago4-2* con una copia del *ncW6* y cuantificamos los sRNAs mediante sRNA-seq. La falta de mutantes en estos genes en plantas de girasol, hizo necesario el uso de la planta modelo *A. thaliana* como sistema heterólogo para realizar estos ensayos. El análisis reveló niveles casi indetectables de los sRNAs derivados del *ncW6* en plantas mutantes *dcl2/3/4* (Figura 8D). Sin embargo, el *ncW6* es capaz de producir los sRNAs en mutantes *rdr2-1* (Figura 8E). Estos resultados, nos indican que la elevada complementariedad de secuencia del *ncW6* y su estructura estable lo convierten en un transcripto susceptible al procesamiento por parte de DCL3, dando lugar a sRNAs de 24 nt de forma independiente de RDR2, probablemente siguiendo la vía no canónica de generación de het-siRNAs (Figura 4A). Como era de suponerse, la mutación de AGO4, efector en la vía RdDM guiando la metilación del ADN, no afectó a la producción y acumulación de estos sRNAs en la región (Figura 8D). La generación de estas moléculas, seguía observándose en mutantes *rdr6-12*, eliminando la posibilidad de que sean producidos mediante la vía de silenciamiento de transgenes (Figura 4B, 8D).

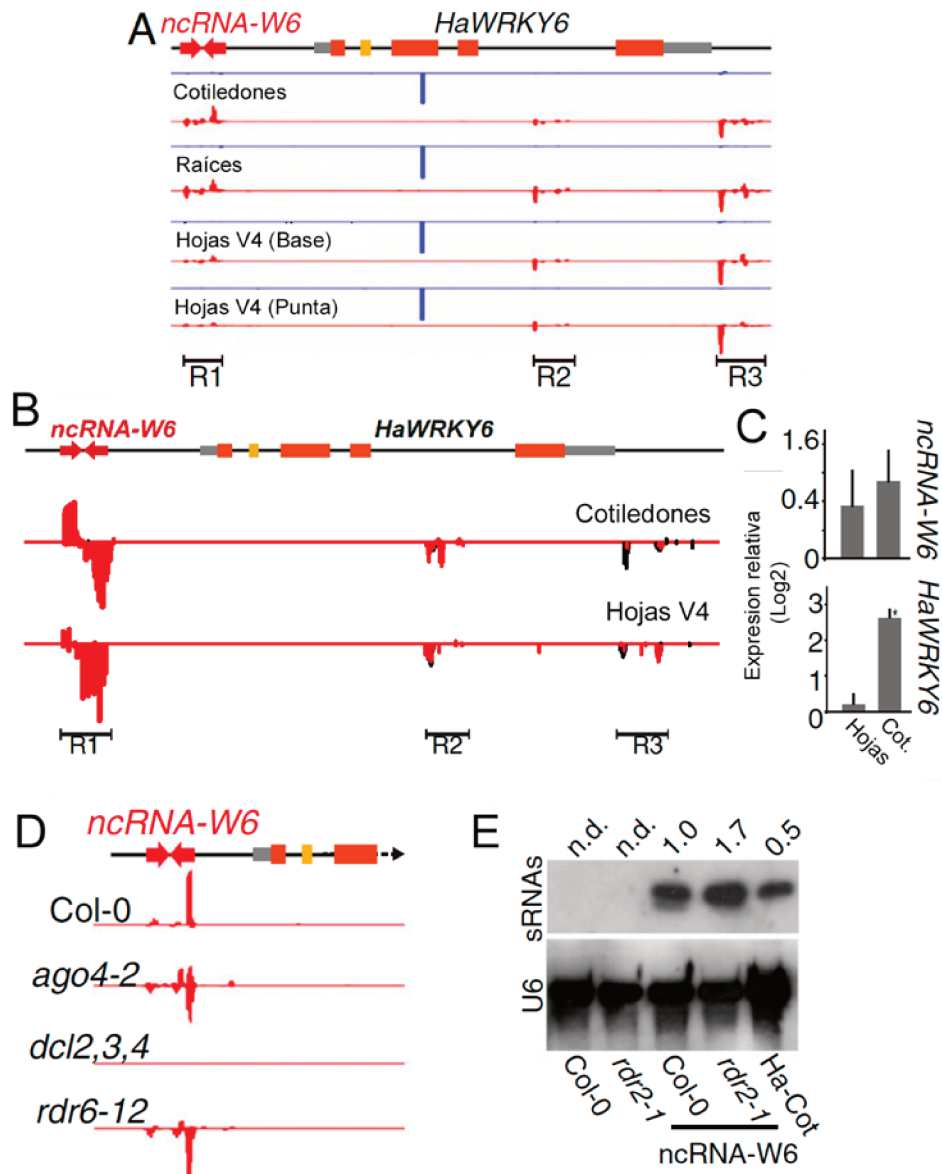


Figura 8. Los sRNAs se producen en cis y en trans a partir del locus *HaWRKY6*. (A) Alineamiento de las lecturas obtenidas del sRNA-seq al locus *HaWRKY6* en muestras de diferentes tejidos de girasol; en rojo, se observan los sRNAs de 24 nt que mapean contra las regiones 1, 2 y 3. En azul, se identifican los sRNAs de 21 nt correspondientes a lecturas del *ha-miR396* que se alinean en el sitio de unión de este miRNA al gen. (B) Alineación de las lecturas obtenidas mediante sRNA-seq de cotiledones y hojas de plantas de girasol en busca de aquellas que se correspondan únicamente con este locus (rojo) o con varias regiones del genoma de girasol (negro). Las regiones donde mapean los sRNAs se etiquetan como R1, R2 y R3 respectivamente. (C) Niveles del transcrito *ncW6* y *HaWRKY6* cuantificados mediante

RT-qPCR en cotiledones (Cot.) y hojas de plantas de girasol. **(D)** Alineamiento de los sRNAs de plantas de *A. thaliana* Col-0, y mutantes *ago4-2*, *dcl2/3/4* y *rdr6-12* transformadas con la construcción *35S::ncW6*. **(E)** Northern blot de plantas de *A. thaliana* Col-0 y mutantes *rdr2-1* control y transformadas con *35S::ncW6*. Como control positivo, se utilizaron cotiledones de plantas de girasol (designado en el gráfico como Ha-Cot). U6 fue empleada como control de carga. La cuantificación de la intensidad de las bandas fue llevada a cabo con el software ImageJ y expresada en forma relativa sobre las imágenes autoradiográficas. La señal no detectada se designó como n.d. (Figura modificada de [142]).

El origen no canónico de los het-siRNAs derivados del *ncW6*, nos hizo preguntarnos si estos sRNAs pueden desencadenar la metilación del ADN en el *locus* parental. Para estudiar esa posibilidad, en primer lugar, realizamos secuenciación posterior al tratamiento con bisulfito de sodio para identificar las regiones de metilación del ADN en el *locus HaWRKY6*. El ensayo se realizó en cotiledones y hojas, órganos que presentan acumulación diferencial de sRNAs y *HaWRKY6* (Figura 8A, C). Los resultados muestran que, en cotiledones, se acumula mayor nivel de metilación de Citosinas en el contexto asimétrico CHH en las regiones 1 y 3 respecto de hojas, mientras que esa diferencia resulta menos pronunciada entre los tejidos en la región 2 (Figura 9A, B). Para confirmar este resultado y cuantificar las diferencias en el grado de metilación de ADN en cada región, realizamos ensayos de Chop-qPCR donde se digiere el ADN con enzimas sensibles e insensibles a la metilación antes de amplificar la región de interés (Figura 9C). A su vez, y con la intención de evidenciar si la metilación de estas regiones está asociada a los niveles de sRNAs, expresamos transitoriamente en hojas y cotiledones la proteína viral P19 que secuestra e induce la degradación de sRNAs [143]–[145]. Alternativamente, también sobre expresamos el *ncW6* a fin de aumentar los niveles de sRNAs derivados de esta secuencia. Ambas estrategias, mostraron ser exitosas en reducir o aumentar los niveles de sRNAs derivados del *ncW6* (Figura 9D). Los ensayos de Chop-qPCR en los tejidos salvajes o transformados, muestran que el *locus HaWRKY6* está metilado en las tres regiones anteriormente enunciadas (Figura 9C). También, confirmamos que los niveles de metilación en las regiones 1 y 3, pero no en la región 2, son mayores en cotiledones que hojas (Figura 9C). La gran diferencia en los niveles de metilación en la región 3 detectada por la técnica de Chop-qPCR realizada con *HpaII*, incluso cuando el contexto CG esta casi completamente metilado en ambos tejidos, posiblemente refleja un aumento en la inhibición de esta enzima causada por la metilación adicional de la primera citosina del sitio (sitio de restricción de *HpaII*, CCGG) en cotiledones, pero no en hojas. Por último, el análisis de los tejidos transformados con P19 o sobreexpresando al *ncW6* muestran que la metilación de las 3 regiones es

dependiente de sRNAs pero solo la región uno depende de los sRNAs producidos por el *ncW6* (Figura 9C).

Estos resultados, confirmaron que la metilación del *locus* depende de la vía RdDM y que los sRNAs derivados del *ncW6* son capaces de inducir la metilación de su propio ADN codificante.

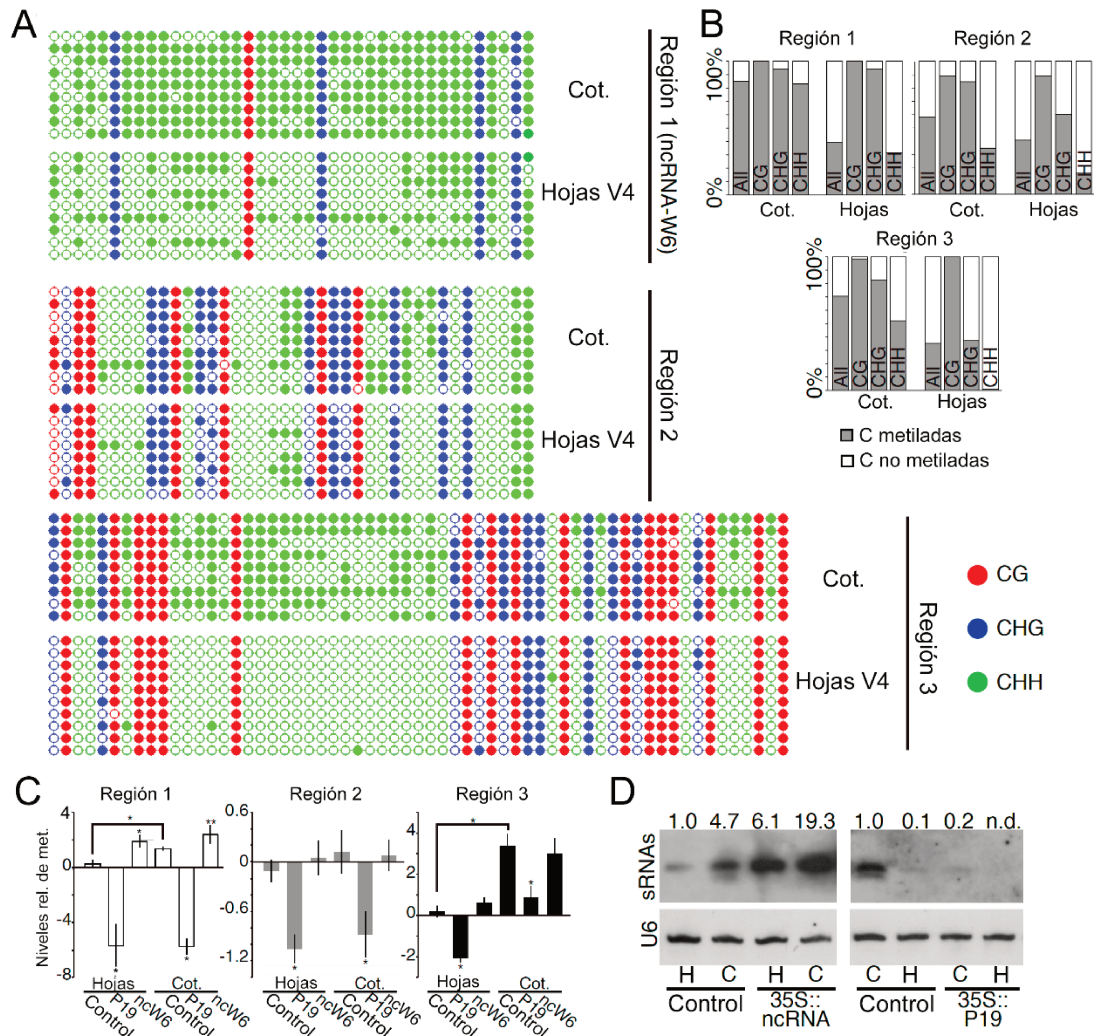


Figura 9. *ncW6* genera sRNAs epigenéticamente activos. (A) Gráficos de puntos que muestran las citosinas metiladas (puntos rellenos) y las no metiladas (puntos vacíos) en todos los contextos (CG: rojo, CHG: azul, CHH: verde). Estos resultados se generaron utilizando el software Kismeth [131]. (B) Porcentaje de citosinas metiladas. El resultado se obtuvo realizando conversión de ADN genómico de hojas y cotiledones (Cot.) de plantas de girasol utilizando bisulfito de sodio seguido de amplificación por PCR y posterior clonado y secuenciación de los fragmentos amplificados. (C) Chop-qPCR del *locus HaWRKY6* utilizando la enzima *HpaII* en muestras de cotiledones (Cot.) y hojas de girasol. Se utilizaron, por un lado, plantas que expresan en forma ectópica la proteína P19 (P19) para reducir los niveles de

sRNAs y, por otro lado, plantas expresando en forma ectópica el *ncW6* (*ncW6*) y ambas se compararon con muestras control (Control). La eficiencia de la digestión fue cuantificada mediante q-PCR utilizando oligonucleótidos que abarcan sitios de restricción en las regiones de mapeo de sRNAs y normalizado con una región no digerida. Las barras de error muestran 2 veces el valor del EEM (Error Estándar de la Media). Los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron estadísticamente significativos (**D**) *Northern blots* para detectar los sRNAs derivados del *ncW6* en hojas de girasol (H) o cotiledones (C) transformados con un vector vacío (Control), *35S::ncRNA-W6* o *35S::P19*. U6 se utilizó como control de carga y la intensidad de la señal fue calculada mediante el software ImageJ. La cuantificación se expresó en relación con la primer muestra (Figura modificada de [142]).

7.4.3 *NcW6* modula la formación de bucles alternativos en la cromatina en el *locus HaWRKY6*

Se sabe que los MITEs ubicados cerca de a genes son capaces de afectar su expresión [83],[123],[146]. Para evaluar si el *ncW6* afecta la expresión de *HaWRKY6*, expresamos al ncRNA, tanto en orientación sentido como en antisentido, en hojas y cotiledones de girasol usando un promotor fuerte y medimos la expresión tanto del *ncW6* como del gen *HaWRKY6*. Llamativamente, los resultados muestran que la expresión ectópica del *ncW6* fue suficiente como para reducir la abundancia del transcripto endógeno *HaWRKY6* en hojas, pero inducir su expresión en cotiledones (Figura 10A). Estas conductas regulatorias opuestas, son inesperadas y contrarias a un escenario donde la metilación disparada por el ncRNA impacte directamente sobre la transcripción del *locus*. Además, es necesario destacar que, de acuerdo a los resultados obtenidos, la fuerte metilación del ADN en cotiledones se correlaciona con una expresión alta de *HaWRKY6*, y esto no suele suceder en los *loci* controlados por la vía canónica RdDM. Se sabe además que, la metilación del ADN no solo influye directamente sobre la transcripción, sino que también puede afectar la estructura tridimensional de la cromatina e indirectamente la expresión génica [97]. Dados los patrones de metilación observados a lo largo del *locus HaWRKY6*, nos preguntamos si la metilación en la región 1 podría servir como punto de anclaje para la estabilización de interacciones entre esta región y los restantes sitios de metilación en las regiones 2 y 3. Para evaluar esta hipótesis, realizamos ensayos de captura de la conformación del cromosoma (3C) en muestras extraídas de hojas y cotiledones de plantas de girasol y utilizando oligonucleótidos diseñados para explorar todas las posibles combinaciones de interacciones entre las regiones metiladas. Utilizando este enfoque, pudimos detectar la formación de un bucle en la cromatina, al que llamamos "Loop 1 (L1)", que une la región

1 con la región 3 en cotiledones (Figura 10B). También pudimos identificar un segundo bucle en la cromatina entre la región 1 y la región metilada 2 (de aquí en adelante denominado “Loop 2” (L2)) (Figura 10B). Para determinar la abundancia de cada bucle, acoplamos ensayos de 3C a cuantificación por q-PCR de las interacciones formadas. Los resultados, mostraron que la abundancia del Loop 1 fue considerablemente mayor en cotiledones respecto de hojas, tejido en el cual se observaron niveles casi indetectables de esta estructura (Figura 10C). Esta observación, está de acuerdo con el alto grado de metilación y los mayores niveles de sRNAs derivados del *ncW6* alineando sobre las regiones 1 y 3 en cotiledones comparado con hojas (Figura 8A, B y 9A-C). A diferencia de L1, el segundo loop parece ser exclusivo de hojas y ausente en cotiledones (Figura 10C). La formación de este bucle alternativo en hojas condice con una drástica reducción de la metilación CHH en la región 3, lo que podría causar el uso de la región 2, la cual se encuentra uniformemente metilada entre los dos tejidos en estudio, como un sitio de anclaje alternativo (Figura 9B, C). Para confirmar que la metilación de estas regiones permite la formación de estos bucles tejido-específicos en la cromatina, realizamos tratamiento de plantas de girasol con 5-AZA, una droga capaz de inhibir la actividad ADN metiltransferasa, resultando en la desmetilación del ADN o infiltrando P19 que, al titular sRNAs, conlleva una reducción en la metilación mediada por RdDM. Los ensayos de Chop-qPCR de hojas y cotiledones tratados de esta forma, mostraron una drástica caída en los niveles de metilación en las tres regiones analizadas del *locus HaWRKY6* al compararlas con las muestras control (Figura 9C, D). Ambos tratamientos, fueron capaces de inducir la apertura de L1 y L2 en los tejidos correspondientes (Figura 10C). Estos resultados, confirman que la estabilidad de los dos bucles depende del estado de metilación de las tres regiones del *locus*. Adicionalmente, clonamos dos construcciones genómicas de *HaWRKY6*: una de ellas comprendiendo el *locus* entero (desde la región 1 a la 3) y otra excluyendo la región del *ncW6*. Luego, utilizamos estas construcciones para transformar hojas y cotiledones de plantas de girasol en forma transitoria y evaluamos la capacidad para formar bucles en la cromatina utilizando la técnica previamente mencionada (3C-qPCR). Para el paso de q-PCR, los oligonucleótidos utilizados estaban diseñados para unirse a secuencias específicas del vector de expresión, evitando de esta forma, la cuantificación del *locus* endógeno *HaWRKY6*. De acuerdo con la hipótesis que el IR es necesario para la formación de los bucles en estudio fuimos capaces de detectar L1 y L2 solo en aquellas plantas transformadas con la construcción que expresaba la versión completa del *locus* (Figura 10E).

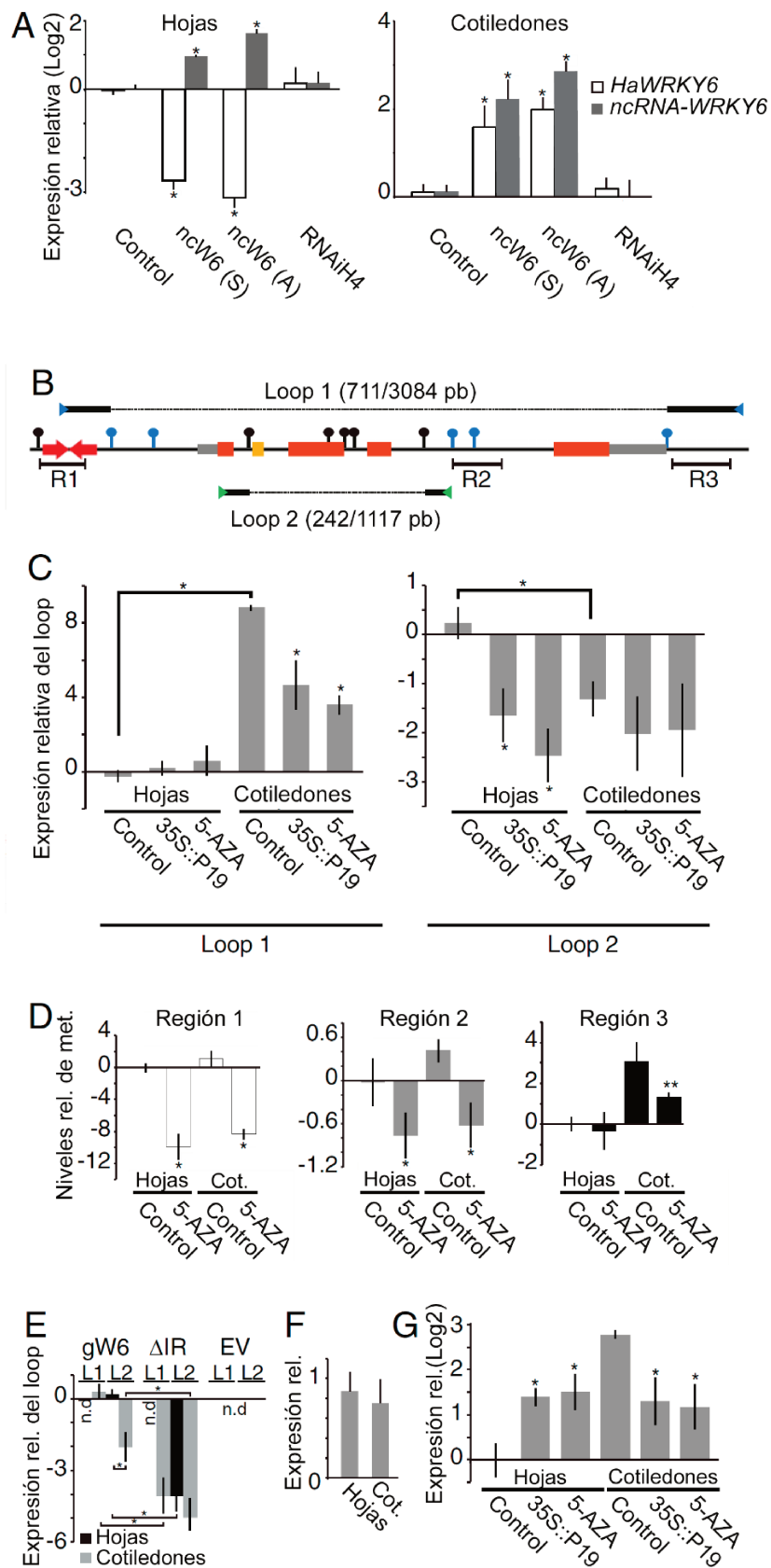


Figura 10. El *ncW6* modula la estructura tridimensional de la cromatina a través de la formación de bucles alternativos en el locus *HaWRKY6*. (A) Niveles de transcripto de *HaWRKY6* y *ncW6* en plantas de expresando el *ncW6* en sentido o anti-sentido bajo el promotor fuerte 35S. Un ARN con estructura similar al *ncW6* (RNAiH4) fue utilizado como control negativo. (B) Esquema de la región genómica de *HaWRKY6*. Los sitios de restricción de *HindIII* y *MspI* usados en los ensayos de 3C se marcan en negro y azul, respectivamente. R1-R3 denotan las regiones de mapeo de los sRNAs. Las flechas azules y verdes indican respectivamente los cebadores utilizados para detectar L1 y L2 en los ensayos de q-PCR. Las líneas sólidas superior e inferior muestran la secuencia obtenida luego de realizar la ligación durante el ensayo 3C, mientras que las líneas de puntos indican la secuencia faltante. La longitud de la secuencia obtenida y la no digerida se muestra entre paréntesis. (C) Cuantificación de la formación de los bucles en la cromatina en hojas y cotiledones mediante 3C-qPCR en muestras control y tratadas con 5-AZA o expresando P19. (D) Chop-qPCR de ADN genómico tomado de hojas y cotiledones control o tratados para cuantificar los niveles de metilación en la Región 1 (Barras blancas), región 2 (Barras grises) y en la región 3 (Barras negras). (E) Niveles de formación de los bucles L1 y L2 mediante 3C-qPCR en hojas y cotiledones transformadas con una copia del ADN genómico del locus *HaWRKY6* (gW6), una versión que excluye el *ncW6* (Δ IR) o un vector vacío (EV, del inglés *Empty Vector*). (F) Actividad del promotor *HaWRKY6* medido por RT-qPCR de plantas de girasol transformadas en forma transitoria con el gen reportero GUS bajo la expresión del promotor *HaWRKY6*. (G) Niveles de transcripto de *HaWRKY6* medido por RT-qPCR en muestras de cotiledones y hojas de plantas de girasol tratadas con 5-AZA o transformadas transitoriamente con P19. En todos los paneles, las barras de error muestran 2xEEM y los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron significativos. (Figura modificada de [142]).

A pesar que los niveles de *HaWRKY6* en cotiledones y hojas son muy diferentes (Figura 8C), la evaluación de la región regulatoria de este gen realizada mediante el clonado del gen reportero GUS bajo el control de este promotor revelo que la actividad regulatoria del promotor, medida como la tasa de transcripción de GUS, es muy similar en cotiledones y hojas (Figura 10F). Ha sido reportado que los bucles en la cromatina que contienen tanto la región regulatoria del gen como la unidad transcripcional completa, como el L1 en cotiledones, mejoran la eficiencia de la RNAPII, favoreciendo la transcripción del locus en un proceso conocido como “gene looping” [108],[109]. En este escenario, es posible un papel regulador positivo por parte de L1 sobre la expresión de *HaWRKY6* en cotiledones. Por otro lado, la formación de “loops intragénicos”, tal como L2 en hojas, podría afectar la procesividad de la RNAPII, resultando en un descenso en la tasa de transcripción [113]. El hecho de que L2 sea más abundante en hojas, tejido

en el cual el promotor es activo pero el transcripto de *HaWRKY6* es prácticamente indetectable, sugiere que L2 funciona para limitar la expresión por este mecanismo previamente reportado. De acuerdo con esta interpretación, encontramos que al desestabilizar a L2 mediante tratamientos con 5-AZA o bien con P19, se favorece la transcripción de *HaWRKY6* en hojas, tejido en el cual L2 es más abundante mientras que, contrariamente, la transcripción en cotiledones, donde predomina L1, disminuye (Figura 10G).

7.4.4 El promotor *HaWRKY6* controla la expresión tanto del gen *HaWRKY6* como del *ncW6*.

La posición del *ncW6* corriente arriba del *locus HaWRKY6* sugiere que la misma región regulatoria podría actuar como un promotor bidireccional de genes divergentes tal como ha sido reportado previamente [147]. En línea con esta hipótesis, un análisis bioinformático reveló la existencia de dominios TATA box en ambos extremos de la región analizada, compatible con la transcripción bidireccional (Figura 11A). Para confirmarlo, clonamos una versión corta y otra larga del promotor *HaWRKY6* (890 pb y 623 pb corriente arriba del TSS, respectivamente) incluyendo o no el *ncW6* (Figura 11A). Ambas versiones del promotor fueron clonadas en sentido y en anti-sentido dirigiendo la expresión del gen reportero GUS y luego estas construcciones fueron utilizadas para transformar plantas salvajes de *A. thaliana* ecotipo Col-0. La tinción histoquímica para evaluar la expresión de GUS fue utilizada para cuantificar la actividad del promotor. Hemos observado que ambas versiones del promotor de *HaWRKY6*, independientemente de la orientación, son capaces de dirigir la expresión del gen reportero en hipocotilos, cotiledones, nervaduras de hojas, pecíolos, hojas caulinares, así como también en flores (Figura 11B). Es oportuno mencionar que ambas versiones y orientaciones del promotor comparten los mismos patrones de expresión, así como también los mismos niveles en los distintos tejidos analizados, apoyando la hipótesis de una actividad bidireccional similar y reforzando la idea que la expresión diferencial de *HaWRKY6* en hojas y cotiledones no responde a una actividad diferencial del promotor (Figura 11B). Ensayos de transformación transitoria de cotiledones de plantas de girasol, con las mismas construcciones del promotor, estuvieron en concordancia con las observaciones en *A. thaliana*, mostrando niveles de expresión similares en todas las construcciones probadas (Figura 11C).

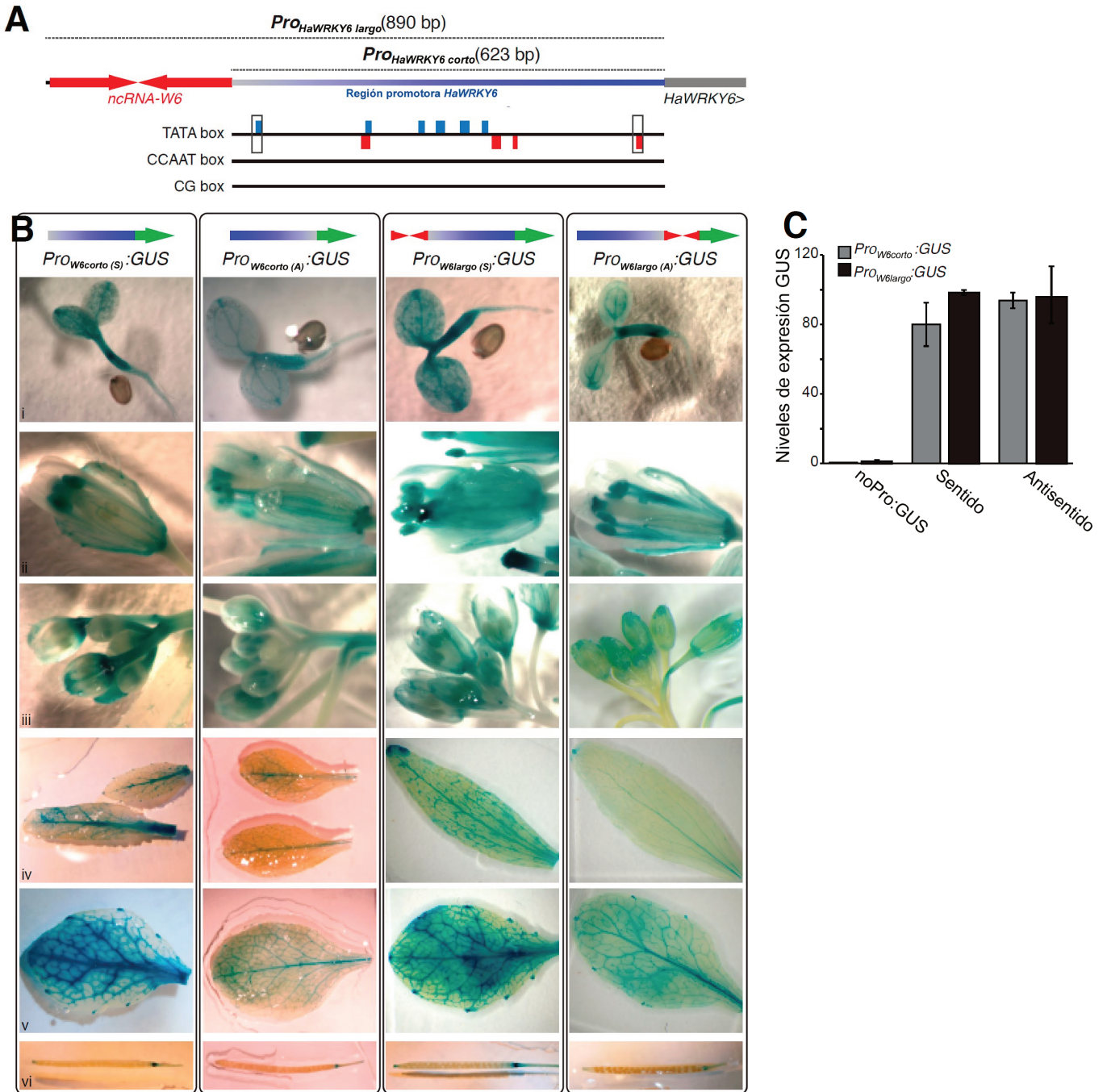


Figura 11. El promotor *HaWRKY6* controla la expresión en sentido y en antisentido del locus *HaWRKY6*. (A) Representación esquemática de la región reguladora de *HaWRKY6* que muestra los segmentos clonados designados como promotor “corto o largo”. En el extremo inferior, se muestran las predicciones informáticas de las cajas TATA, CCAAT y CG. Las cajas vacías resaltan las regiones ubicadas en posición -25 a -35 de cada transcripto como sitios potenciales de cajas TATA activas. (B) Tinción histoquímica GUS de plántulas de 3 días, hojas de roseta y caulinares, silicuas, flores e inflorescencias de plantas de *A. thaliana* de 34 días transformadas con distintas construcciones del promotor clonadas con orientación sentido (S) o anti-sentido (A) respecto al gen reportero. (C) Niveles de expresión del gen reportero GUS

cuantificado por RT-qPCR en cotiledones de plantas de girasol transformadas transitoriamente. Las barras de error muestran 2xEEM y los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron significativos (Figura modificada de [142]).

7.4.5 El bucle L1 cambia la direccionalidad de la transcripción en el locus *HaWRKY6* en cotiledones.

El fenómeno de la transcripción divergente, como es el caso del *locus HaWRKY6* y el *ncW6*, es común en la mayor parte de los promotores activos en distintos organismos [148],[149]. Recientemente, fue reportado que el mecanismo de “gene-looping” juega un rol muy importante en la regulación de la actividad bidireccional de las regiones promotoras, reduciendo la producción de ncRNAs transcritos en forma divergente [112]. El hecho de que la actividad transcripcional del promotor *HaWRKY6* sea similar en ambos sentidos (Figura 11C), pero que el ARNm sea detectado casi exclusivamente en cotiledones (Figura 8C), sugiere que la formación del bucle de cromatina alternativo podría modular la direccionalidad del promotor. En este contexto, la formación de L1 en cotiledones podría restringir la transcripción del *ncW6* y forzar a la RNAPII dentro del bucle del gen que abarca el *locus HaWRKY6*. Para evaluar esta teoría, estudiamos la ocupación de la RNAPII a lo largo del *locus HaWRKY6* a través de ensayos de ChIP seguido de q-PCR en cotiledones y hojas. Los resultados mostraron que, en cotiledones, la RNAPII se acumula en la región promotora (P2), hay una mayor densidad sobre el TSS de *HaWRKY6* (P3) e incluso niveles considerables a lo largo de todo el cuerpo del gen (P4-P6) como es de esperar en genes transcripcionalmente activos (Figura 12A). Sin embargo, observamos que los niveles de la RNAPII se encuentran muy bajos en la región del *ncW6* (P1), indicando transcripción reducida en la dirección opuesta (Figura 12A, B). El tratamiento con 5-AZA o P19, que relajan la formación de L1 (Figura 10C), impacta en la ocupación de la RNAPII aumentando sus niveles divergentes, pero reduciendo su ocupación sobre el cuerpo de gen (Figura 12A, B). Este patrón, confirma que la formación de L1 promueve la transcripción dentro del bucle, pero impide la transcripción divergente del *locus*. En hojas, por otro lado, encontramos niveles bajos pero homogéneos de RNAPII en las regiones P1-P4 y un marcado descenso en la densidad de la RNAPII en las regiones P5 y P6, sugiriendo un bloqueo en la transcripción a partir del intrón 4 causado por la formación del bucle intragénico L2 (Figura 12A). Cuando repetimos el ensayo con 5-AZA o P19 para provocar la apertura de L2, observamos un aumento de la RNAPII más allá del intrón 4, confirmando que L2 restringe la elongación del transcripto (Figura 12B). Estos resultados, demuestran que

L1 y L2 regulan de forma diferencial la expresión de *HaWRKY6* en cotiledones y hojas al promover, restringir o direccionar la actividad de la RNAPII.

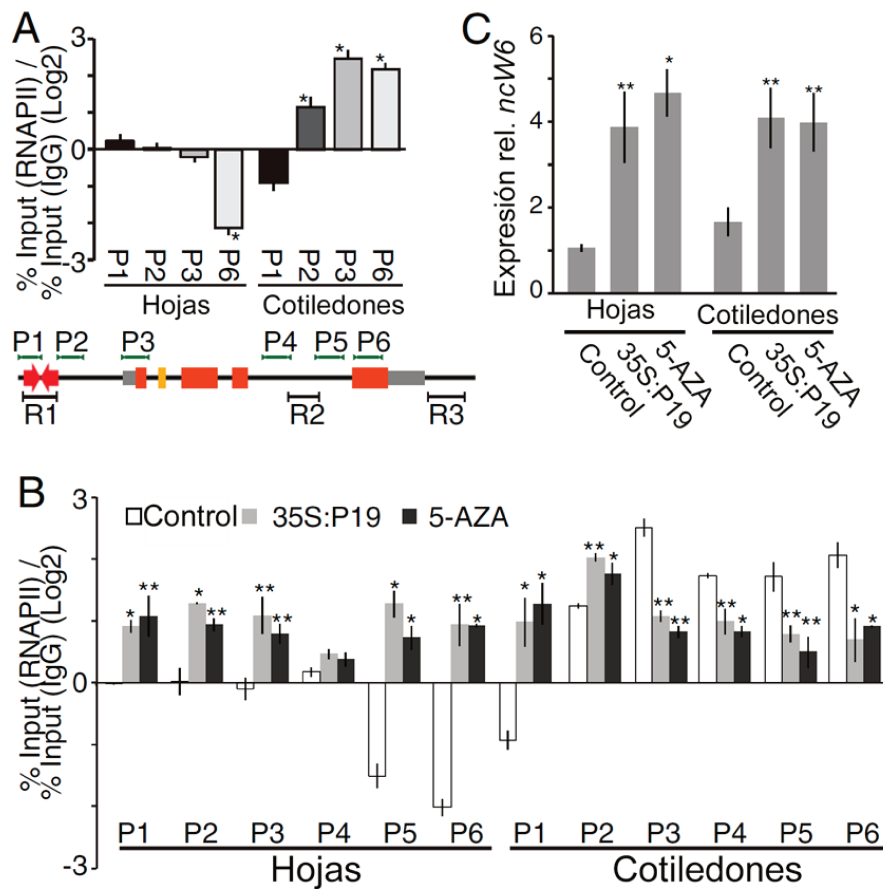


Figura 12. Los loops alternativos de la cromatina en el locus *HaWRKY6* promueven, restringen o direccionan la actividad de la RNAPII. (A y B) Inmunoprecipitación de la cromatina de RNAPII seguido por cuantificación por q-PCR. Perfil de distribución de la RNAPII a lo largo del locus *HaWRKY6* en cotiledones y hojas de plantas de girasol en condiciones control (A) o en plantas tratadas con 5-AZA o expresando P19 (B). En la parte inferior del panel A, se muestra un diagrama del locus y los oligonucleótidos utilizados (P1-P6). (C) Niveles del transcripto *ncW6* medido por RT-qPCR en plantas tratadas con 5-AZA o expresando P19. Las barras de error muestran 2xEEM y los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron significativos (Figura modificada de [142]).

7.5 Conclusiones

Durante mucho tiempo después de que la genetista Barbara McClintock descubrió los TEs en 1965 [150], la mayoría de los científicos consideraron a estos elementos como "ADN inútil" o "basura". Sin embargo, tal como pensaba McClintock, actualmente sabemos que estos elementos son componentes esenciales en los genomas eucariotas. Si bien su movilización puede causar inestabilidad, y es por esta razón que los organismos intentan mantenerlos silenciados, muchos de ellos son los encargados de impulsar la diversidad y evolución del genoma, por ejemplo, al insertarse en regiones transcripcionalmente activas e influir en la actividad transcripcional de los genes vecinos. Particularmente, los TEs han surgido en los últimos años como una fuente importante de lncRNAs y sRNAs funcionales [151].

Al explorar la región regulatoria del gen *HaWRKY6*, pudimos identificar un TE similar a un MITE (*ncW6*) el cual consiste en una secuencia de tipo IR y, como tal, es capaz de plegarse formando una estructura de tipo tallo-bucle característica de otros ncRNAs. El análisis de sRNA-seq en distintos tejidos de girasol, mostró además que sRNAs de 24 nt se alinean a la secuencia del IR y que éstos son considerablemente más abundantes en cotiledones que en hojas [142]. Comúnmente, la metilación mediada por sRNAs en TEs, desencadena modificaciones en histonas para terminar reprimiendo en forma estable su expresión [45],[89]. Sin embargo, el *locus HaWRKY6* no parece ser regulado por este mecanismo canónico, dado que una gran cantidad de sRNAs y metilación del ADN se observa en aquellos tejidos con mayor expresión del *locus*. Existen numerosos ejemplos en los cuales el silenciamiento heterocromático de TEs ejerce influencia sobre la expresión de genes cercanos sin generar un silenciamiento permanente, incluyendo los *loci* más conocidos tal como *AGOUTI* y *AXIN* [90] en ratón, *FLC* [91] y *FWA* [92] en *A. thaliana*, entre otros. Sin embargo, los mecanismos involucrados en esta regulación no se comprenden totalmente. Incluso un reporte reciente, describe un complejo de unión al ADN metilado que promueve la expresión de genes proximales a esta marca [52], dejando atrás la idea de que la metilación es siempre una marca represiva. La metilación del ADN también es capaz de influir en la arquitectura de la cromatina, al promover la interacción entre distintas secuencias metiladas [93],[94]. Nuestro estudio, reveló que la metilación del ADN en las secuencias que flanquean el *locus HaWRKY6*, está asociada con la formación de bucles en la cromatina y, a su vez, con un aumento en los niveles de transcripción del gen. En contraste, niveles bajos de metilación en estas regiones, especialmente en la región 3, en conjunto con marcas estables de metilación en el intrón 4, se correlacionan con la formación de un bucle intragénico en

hojas que reprime la expresión del gen en este tejido. Además, los ensayos de ocupación de la RNAPII revelaron que la estabilización de los bucles en la cromatina no solo afecta la transcripción de *HaWRKY6*, sino que también modifica la direccionalidad de su promotor para reducir la transcripción del *ncW6*, la producción de sRNAs pequeños y la metilación del *locus*, resultando en la desestabilización de los bucles (Figura 13). Esto implica que la metilación en las regiones 2 y 3 podrían dictar el tipo de bucle (inhibitorio o positivo) que se formará en el *locus*, pero la metilación dinámica de la región 1 los modula [142].

Por lo general, el mecanismo RdDM se inicia a partir de transcritos de TEs provenientes de la RNAPIV/V en un proceso dependiente de RDR [45],[152]. Sin embargo, la RNAPII puede transcribir TEs insertados cerca de genes en orientación divergente, como observamos en nuestro sistema [147],[153]. Los IR transcritos por la RNAPII, pueden también producir sRNAs de 24 nt y desencadenar la propagación de la metilación del ADN sobre el *locus* objetivo y silenciarlo [74]. En línea con estos hechos, en la primer parte de esta tesis, pudimos demostrar que la transcripción del *ncW6* está controlada por el promotor bidireccional del gen *HaWRKY6* de manera dependiente de RNAPII para producir sRNAs a través de un mecanismo dependiente de DCL2,3 y 4 pero independiente de RDR [142].

En conjunto, estas características definen al *ncW6* como un elemento regulador autónomo. Una predicción de IR cercanos a TSS en girasol reveló que elementos similares al *ncW6* son comunes en las regiones que flanquean genes (Figura 14), lo que sugiere un posible papel regulador general para estos IRs, similar al que hemos descrito para el *locus HaWRKY6*. Además, resulta muy estimulante pensar que la transposición de este tipo elementos bajo condiciones de estrés represente una forma rápida y dinámica, en términos adaptativos, de responder al entorno.

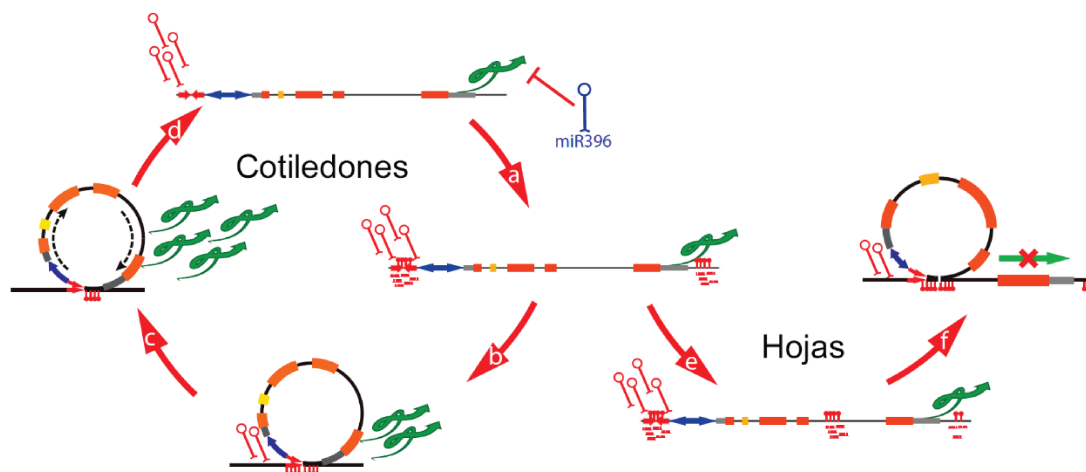


Figura 13. Modelo propuesto para la regulación dinámica mediada por IR del locus HaWRKY6. En Cotiledones, la transcripción del promotor bidireccional *HaWRKY6* produce una transcripción del *ncW6*, el cual adquiere una estructura de tipo tallo-bucle que se procesa en siRNAs desencadenando RdDM en su propio locus **(a)**. Una región adicional de ADN metilado ubicada aguas debajo del 3'UTR de *HaWRKY6* estabiliza la formación de un bucle que abarca todo el locus **(b)**, lo que potencialmente promueve un uso eficiente de RNAPII y un aumento en la transcripción del gen *HaWRKY6* **(c)**. La metilación de la secuencia *ncW6* y la formación del bucle se asocian con un cambio en la dirección de la transcripción que, a su vez, reduce la abundancia y la metilación del ncRNA, lo que da como resultado la disolución del bucle **(d)**. En hojas, en cambio, la metilación de una región dentro del cuarto intrón, junto con la reducción de la metilación de la región 3, **(e)** desencadena la formación de un bucle de cromatina intragénico que bloquea la transcripción RNAPII **(f)**. Las marcas en rojo muestran las regiones metiladas. (Figura modificada de [142]).

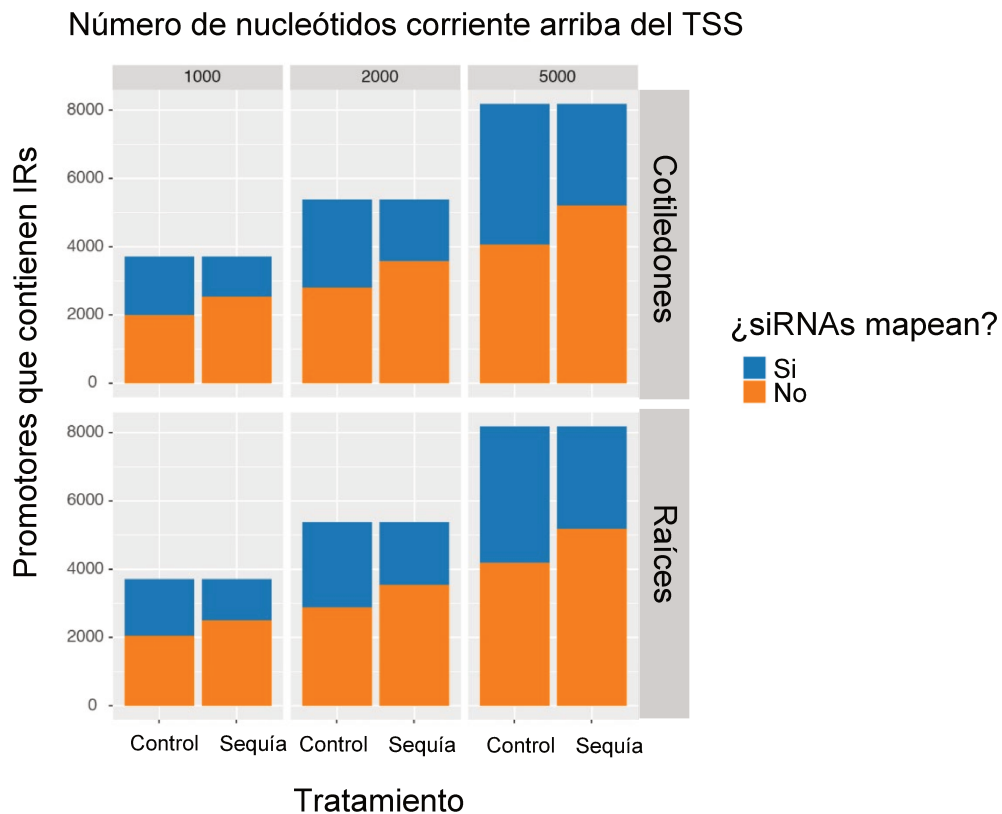


Figura 14. Predicción de IRs y mapeo de siRNAs en regiones promotoras de genes de girasol. La predicción de IR se realizó utilizando las secuencias 1000, 2000 y 5000 pb aguas arriba de los TSS de todos los genes anotados de girasol. La población de siRNAs en plantas control y tratadas con sequía (raíces y cotiledones) se graficó frente a las regiones IR predichas. Los IRs que contienen promotores con siRNAs mapeados se indican en azul, mientras que los IRs sin siRNAs mapeados se representan en naranja. (Figura modificada de [142]).

Capítulo 2

“Análisis genético del rol de HWS en biogénesis de miRNAs”

8. Capítulo 2

8.1 Introducción

8.1.1 microRNAs: pequeñas moléculas con un gran impacto en el silenciamiento génico post-transcripcional

La precisa expresión temporal y espacial de genes específicos en cada célula, permite el crecimiento y desarrollo normal de los organismos eucariotas. A fin de lograr esta homeostasis celular, todos los genes son regulados a nivel transcripcional, post-transcripcional e incluso durante la traducción de sus productos. La regulación transcripcional de la expresión génica está controlada por factores de transcripción y, como vimos en el capítulo anterior, por la metilación y compactación de la cromatina, procesos controlados por siRNAs. La regulación génica mediante PTGS, está gobernada por los procesos de edición, maduración y estabilidad de los ARNs mensajeros. En este último caso, uno de los principales actores son los miRNAs, una clase de ARNs pequeños no codificantes endógenos que regulan la expresión génica principalmente induciendo la degradación de ARNs mensajeros blanco [2],[30],[154]–[157]. Si bien estas moléculas fueron descubiertas por primera vez como reguladores temporales de la diferenciación larvaria en *Caenorhabditis elegans* [158], actualmente se sabe que están presentes en casi todos los organismos eucariotas desde levaduras hasta plantas y animales [159]–[162].

Estas moléculas, están involucradas en la regulación de casi todos los procesos biológicos y metabólicos, tales como mantenimiento y diferenciación celular, desarrollo de órganos, vías de señalización y respuesta a distintos tipos de estrés, entre otros [6],[30],[163]. En plantas, los miRNAs tienen una tendencia evolutiva a regular transcritos que codifican para factores de transcripción principalmente asociados a procesos de desarrollo [30],[164]. Esta particularidad, conlleva fenotipos pleiotrópicos en el desarrollo de plantas mutantes defectuosas en la acumulación de miRNAs [27],[165]–[167].

8.1.2 Biogénesis de miRNAs

Aunque tanto los miRNAs de plantas como los de animales derivan de precursores de ARN que se pliegan dando lugar a estructuras de tipo horquilla, su biogénesis muestra algunas diferencias (Figura 15) [30],[168]–[170]. Los miRNAs de mamíferos, se encuentran alojados principalmente en intrones de genes codificantes y no codificantes [171], mientras que los miRNAs de plantas son, en su mayoría, exónicos y están codificados por unidades transcripcionales independientes [2],[30]. Los transcritos de

miRNAs en animales son procesados primero por la endonucleasa de ARN DROSHA, liberando el pre-miRNA, que posteriormente se exporta al citoplasma mediante la EXPORTINA 5 (EXP5) donde otra endonucleasa de ARN llamada DICER da lugar a un dúplex de ARN, formado por un miRNA maduro o funcional y su hebra complementaria (miRNA/miRNA*) (Figura 15B) [169]. Tanto DROSHA como DICER son asistidas en los procesos de escisión por proteínas de unión a dsRNA específicas, por ejemplo, PASHA y LOQUACIOUS en *Drosophila melanogaster* [172] (Figura 15B). En plantas, en cambio, los precursores de miRNAs, transcritos por la RNAPII son procesados enteramente por la endonucleasa de ARN DCL1 dando lugar al dúplex miRNA/miRNA* maduro (Figura 15A). A diferencia de lo que ocurre en animales, el procesamiento de los pre-miRNAs ocurre completamente en el núcleo en plantas y está asociado al proceso de transcripción [173]. Luego de su procesamiento, una de las hebras es cargada en una proteína ARGONAUTA, principalmente AGO1, conformando el complejo de silenciamiento inducido por miRNAs (**miRISC**, del inglés *miRNA Induced Silencing Complex*) [30],[170]. Dentro de este complejo el miRNA dirige, por complementariedad de secuencias, a la proteína AGO1 hacia su RNA mensajero blanco para silenciarlo, ya sea por inhibición de la traducción o al catalizar su degradación (Figura 15A). Cada paso de este proceso, presenta una compleja regulación en la cual están involucrados numerosos factores con el fin de asegurar la correcta expresión de cada miRNA en el momento y lugar indicados [3]. A continuación, se describen detalladamente cada una de las etapas de la biogénesis de miRNAs en plantas, así como algunos de los factores que las regulan (Figura 15A).

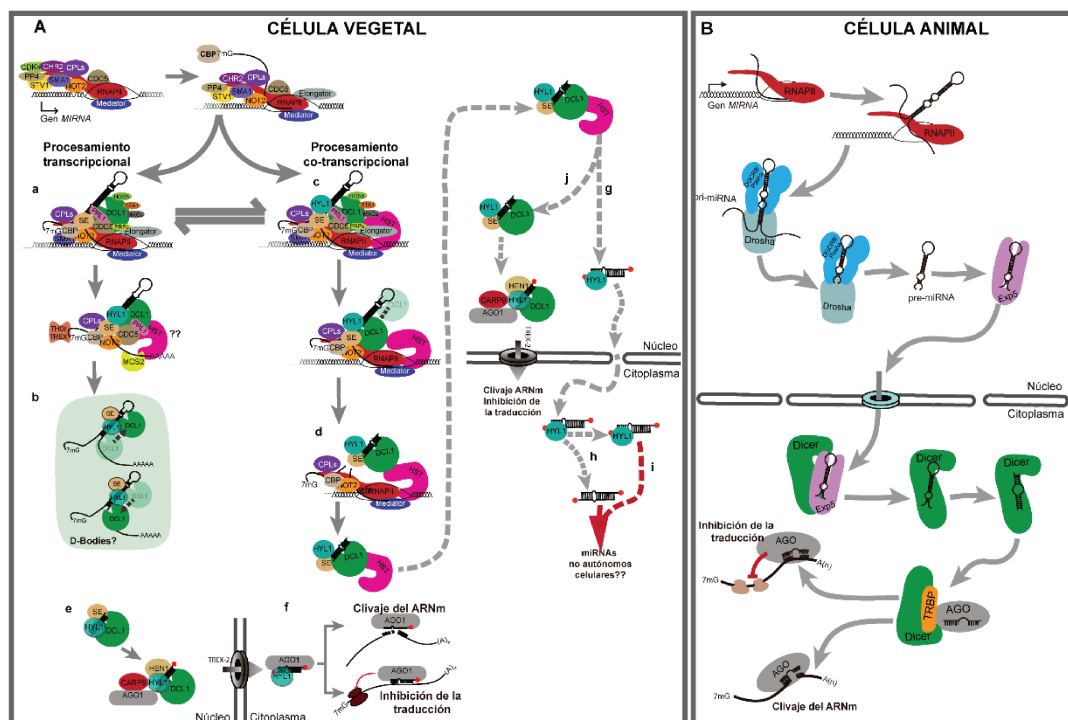


Figura 15. Biogénesis de miRNAs en plantas versus animales. (A) Vía de miRNAs en plantas. **a)** El proceso comienza con la transcripción de los genes *MIR* por parte de la RNAPII. En plantas, el procesamiento se lleva a cabo por el complejo de procesamiento compuesto principalmente por DCL1, HYL1 y SE, junto a otras proteínas accesorias. El procesamiento, puede ocurrir en forma post-transcripcional o co-transcripcional, existiendo normalmente un equilibrio entre estos dos modos [173]. **b)** Si el precursor se procesa en forma post-transcripcional, es posible que se lleve a cabo en los conocidos D-bodies. **c)** Por otro lado, existen otros precursores que son procesados en forma co-transcripcional. En este caso, el complejo de procesamiento (DCL1, HYL1 y SE) van procesando el precursor en simultáneo con su transcripción [173]. **d)** HST actúa como andamio entre DCL1 y MED37, permitiendo el reclutamiento temprano de DCL1 a los *loci MIR* [174]. **e)** Ambos caminos, (procesamiento post-transcripcional o co-transcripcional) dan lugar a un dúplex miRNA/miRNA* de 21 nt, el cual es metilado para protegerse de la degradación. Posteriormente, una de las hebras del dúplex se carga en AGO1 para ser exportada hacia el citosol de forma dependiente del complejo TREX-2. En este proceso, HYL1, que permanece unida al dúplex de miRNA, es un cofactor importante para la correcta selección de la hebra. **f)** Una vez en el citosol, el complejo RISC se dirige hacia sus genes objetivo para ejercer su función, ya sea degradando el ARNm o bien inhibiendo su traducción. **g)** Por otro lado, un posible destino para algunos miRNAs es el de actuar de forma no autónoma celular. Este subgrupo de miRNAs podrían ser aquellos que fueron detectados recientemente libres, es decir, no unidos a AGO1 [175]. Para ser exportados hacia el citosol, podrían hacerlo unidos a HYL o bien salir por difusión pasiva. **h)** Una vez en el citoplasma, podrían permanecer unidos a HYL1 o bien **(i)** podrían no estar unidos a ninguna proteína. En ambos casos, estos miRNAs cumplirían funciones hasta el momento desconocidas. **j)** A su vez, algunos miRNAs podrían cargarse en AGO1 y producir PTGS en la misma célula en la que fueron producidos. Las líneas discontinuas muestran las rutas posibles que aún permanecen inciertas. **(B) Representación esquemática simplificada de la ruta de biogénesis de miRNAs en animales.** Los pri-miRNAs se transcriben en el núcleo por parte de la RNAPII y se les adiciona el CAP (7mG) y la cola de poli A. El procesamiento del pri-miRNA se produce en el núcleo por parte del complejo microprocesador, compuesto mínimamente por Drosha y DGCR8/Pasha, dando como resultado un pre-miRNA. Luego, éste se exporta a través del complejo del poro nuclear hacia el citoplasma, a través de la Exportina5. Una vez allí, Dicer es capaz de realizar el subsiguiente corte del precursor dando lugar al dúplex miRNA/miRNA*. Éste último, se carga en la proteína Ago, reteniéndose preferentemente una de las hebras. A continuación, el miRNA cargado en la proteína Ago es capaz de ejercer su función ya sea por inhibición de la traducción o por degradación del ARNm objetivo. (Figura modificada de [31],[176]).

8.1.3 Transcripción de los genes *MIR* y su regulación

La biogénesis de miRNAs en plantas, comienza con la transcripción de los genes *MIR* por parte de la RNAPII de transcriptos largos primarios denominados pri-miRNAs. A diferencia de los pri-miRNAs de animales, que tienen una longitud relativamente corta y homogénea, en plantas los pri-miRNAs tienen una longitud muy variable que puede alcanzar los miles de bases en pri-miRNAs policistrónicos. Al ser transcriptos por la RNAPII, estos precursores adquieren el capuchón (CAP) en su extremo 5', presentan poliadenilación en su extremo 3' y pueden ser sometidos, aunque no en todos los casos, al proceso de *splicing* [170],[177]. En *A. thaliana* la mitad de los pri-miRNAs conocidos contienen intrones [178],[179], mientras que solo un 8% de los miRNAs están codificados dentro de intrones en genes hospedadores [179]. La presencia de intrones en los precursores de miRNAs pueden estimular su procesamiento por DCL1 en un proceso no del todo comprendido [180].

Al igual que en otros genes, la transcripción de genes *MIR* por la RNAPII está controlada por factores de transcripción como los factores de respuesta a auxina (ARF) y MYC2 [3],[181], el factor de transcripción NEGATIVE ON TATA LESS 2 (NOT2) [182] y la proteína de unión al ADN CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5) [183]. Por otro lado, existen numerosos cofactores que fueron recientemente relacionados con la transcripción de los pri-miRNAs, tal como la proteína ribosomal SHORT VALVE 1 (STV1) [184], la PROTEÍNA FOSFATASA 4 (PP4) [185], el factor de *splicing* SMALL1 (SMA1) [186], el FACTOR DE REMODELACIÓN DE CROMATINA ATPasa 2 (CHR2) [187], las proteínas asociadas al complejo del poro nuclear THO/HRP1 PHENOTYPE 1 (THP1) y SUPPRESSOR OF ACTIN 3A (SAC3A) del complejo TREX-2 [28]. Muchas de las proteínas relacionadas con la transcripción de los genes *MIR*, están asociadas con el procesamiento y *splicing* de los precursores, sugiriendo que estos pasos están fuertemente vinculados durante la biogénesis de miRNAs.

Como en cualquier gen codificante, el inicio de la transcripción de los genes *MIR* está marcado por la fosforilación del dominio C-terminal (CTD, del inglés **C Terminal Domain**) de la subunidad mayor de la RNAPII. En este sentido, el accionar de las quinasas F;1 (CDKF;1) y CDKD DEPENDIENTE DE CICLINA, que catalizan la fosforilación del CTD, tienen un rol muy importante, al promover tanto la transcripción como el procesamiento y la estabilidad de los transcriptos nacientes de pri-miRNAs [188]. A su vez, C-TERMINAL DOMAIN POSPHATASE-LIKE1 (CPL1) y 2 (CPL2) también modulan la actividad de la RNAPII al defosforilar su CTD [189] y son capaces de interactuar con proteínas del procesamiento [190].

Por otro lado, como ocurre con otros genes, ciertas características de la cromatina, como la acetilación y la metilación de histonas, también pueden influir en la transcripción de los genes *MIR*. Por ejemplo, el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) reprime la transcripción del gen *MIR156A/C* al aumentar la deposición de H3K27me3 en sus promotores [191]. Adicionalmente, se ha demostrado que el complejo remodelador de la cromatina SWR1 dependiente de ATP (SWR1-C) regula la transcripción de genes *MIR* alterando la distribución de los nucleosomas alrededor de los promotores [192].

8.1.4 Complejo MEDIATOR y su rol en biogénesis de miRNAs

MED es un complejo de múltiples subunidades conservado en eucariotas, identificado por primera vez en levaduras [193],[194]. Este complejo, promueve el inicio de la transcripción de los *loci* transcritos por la RNAPII. En particular, MED vincula los activadores de la transcripción que se unen a promotores o “enhancers” ubicados aguas arriba con la maquinaria general de la transcripción ubicada en el promotor basal. MED regula no solo la transcripción de genes que codifican para proteínas, sino que, en animales, asiste a la transcripción de otros ARNs no codificantes dependientes de la RNAPII [195]. En plantas ocurre lo mismo, es decir que, MED promueve la transcripción tanto de regiones codificantes como no codificantes dependientes de la RNAPII. En el caso particular de los genes *MIR*, las subunidades MED17, MED18 y MED20a promueven su transcripción al reclutar a RNAPII [196].

Si bien se sabe que las subunidades 17, 18 y 20a están involucradas en transcripción de los genes *MIR*, recientemente se vincularon también a las subunidades MED37D y MED37E en la biogénesis de miRNAs como se describe más adelante [174].

8.1.5 Acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento de los pri-miRNAs

Los pri-miRNAs, son procesados para generar dúplex de miRNA/miRNA* de 21 nt por el complejo de biogénesis de miRNAs. Este complejo, se compone por un conjunto de proteínas dentro de las cuales se destacan DCL1, HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) y SERRATE (SE), [190],[197]–[200] (Figura 15A).

En plantas, el modelo general de biogénesis de miRNAs plantea un proceso bien dividido en etapas, emulando su contraparte en animales (Figura 15B). En este modelo, los “D-bodies” (del inglés *Dicing bodies*, que significa “cuerpos de corte”) fueron postulados como el sitio de procesamiento de miRNAs [198],[201]. Sin embargo, no hay pruebas suficientes de que el procesamiento de los pri-miRNAs tenga lugar exclusivamente en estas estructuras. Incluso, ensayos *in vitro* sugieren que estos

cuerpos no son esenciales para el procesamiento de pri-miRNAs [197]. Sumado a esto, evidencia creciente sugeriría que la transcripción y el procesamiento de los precursores de miRNAs están fuertemente asociados. En particular, y a partir del descubrimiento de la asociación de DCL1 con los *loci* de los genes *MIR* mediado por el complejo ELONGATOR [202], se empezó a observar que el ensamblado del complejo de procesamiento comienza durante la transcripción. Este trabajo pionero sugirió que DCL1 y SE, podrían unirse a los pri-miRNAs nacientes en forma co-transcripcional, posiblemente durante el proceso de elongación de los transcritos. Del mismo modo, otros cofactores accesorios del procesamiento, por ejemplo NOT2, CDC5 y PRL1, también son reclutados en forma temprana durante la transcripción de los genes *MIR* [182],[183],[203] (Figura 15A). Las proteínas HYL1, HASTY (HST) y AGO1 también se asocian a los *loci* de los genes *MIR* [31],[174],[190],[204], reafirmando la hipótesis que el complejo de biogénesis de miRNAs se ensambla temprano durante la transcripción (Figura 15A).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el procesamiento de los pri-miRNAs puede darse tanto en forma co-transcripcional como post-transcripcional, esto implica que ambos mecanismos coexisten en las células [173] (Figura 15A). En particular, se detectó que aquellos precursores que se procesan desde la base al bucle presentan un componente co-transcripcional de procesamiento y una etapa post-transcripcional. Por el contrario, los precursores que se procesan desde el bucle a la base, siguen una vía más fluida con todas las etapas del procesamiento ocurriendo mientras el gen se transcribe, desdibujando el modelo canónico por etapas [173]. Adicionalmente, se descubrió que algunos miRNAs, independientemente de su naturaleza, parecen siempre procesarse post-transcripcionalmente. Estos hallazgos, implican la existencia de al menos dos rutas alternativas de procesamiento, las cuales podrían coexistir y potencialmente dar lugar a miRNAs con diferentes funciones (Figura 15A).

8.1.6 El complejo de procesamiento de los pri-miRNAs

Como se ha mencionado anteriormente, el complejo principal de procesamiento de los precursores de miRNAs está compuesto principalmente por DCL1, HYL1 y SE. Si bien en *A. thaliana* hay cuatro DCLs, la estructura de tallo-bucle imperfecta de los pri-miRNAs es principalmente susceptible al accionar de DCL1. Sin embargo, en tejidos donde es particularmente abundante DCL3, ésta puede competir con DCL1 para producir miRNAs de 24 nt que desencadenan la metilación del ADN [75],[205]. Además, ciertos precursores con elevada complementariedad de secuencia como los del miR822,

miR839 y miR869 son procesados por DCL4 de forma independiente de DCL1 [206],[207].

Las proteínas DCL funcionan como “reglas moleculares” que miden y cortan los precursores dando lugar a un dúplex de ARN de una longitud específica [208]. Los pri-miRNAs se pueden procesar de distintas formas, dependiendo de su estructura. Aquellos que son cortos, son procesados por DCL1 a través de una sola escisión, ya sea de la base al bucle o del bucle a la base. Mientras que los precursores largos, se procesan desde la base hasta el bucle, desde el bucle hasta la base, o de forma bidireccional mediante tres o más cortes sucesivos cada 21 nt generando varios dúplex ARNs pequeños [31],[209]–[213] (Figura 16).

Para asegurar el correcto procesamiento de los pri-miRNAs, HYL1, miembro de la familia de DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING PROTEINS (DRBs) y SE, asisten el posicionamiento de DCL1 [197],[199]. HYL1 se une a la región de doble hebra del pri-miRNA como homodímero a través de sus dominios de unión a ARN doble cadena (**dsRBDs** del inglés *double-strand RNA binding domains*) e interactúa con DCL1 para ubicarla en los sitios de corte correctos [214]–[216]. Por otro lado, SE es capaz de unirse tanto a DCL como al pri-miRNA para guiar el posicionamiento del precursor hacia el sitio catalítico de DCL1. De esta forma, actúa como punto de anclaje entre el ARN, HYL1 y DCL1 [197],[200],[217],[218].

Además de HYL1 y SE, existen numerosas proteínas que están involucradas en el procesamiento de los pri-miRNAs y que se han postulado como co-factores del procesamiento, aunque su mecanismo molecular de acción es aún desconocido (Figura 15A). Principalmente, ciertos factores de *splicing* tienen una fuerte influencia en el procesamiento de los precursores de miRNAs [219],[220]. Además, otras proteínas como TOUGH (TGH) y DAWDLE (DLL), también son necesarias para el correcto y preciso funcionamiento de la maquinaria de procesamiento al estabilizar la interacción entre los pri-miRNAs y el complejo de procesamiento [221]–[224].

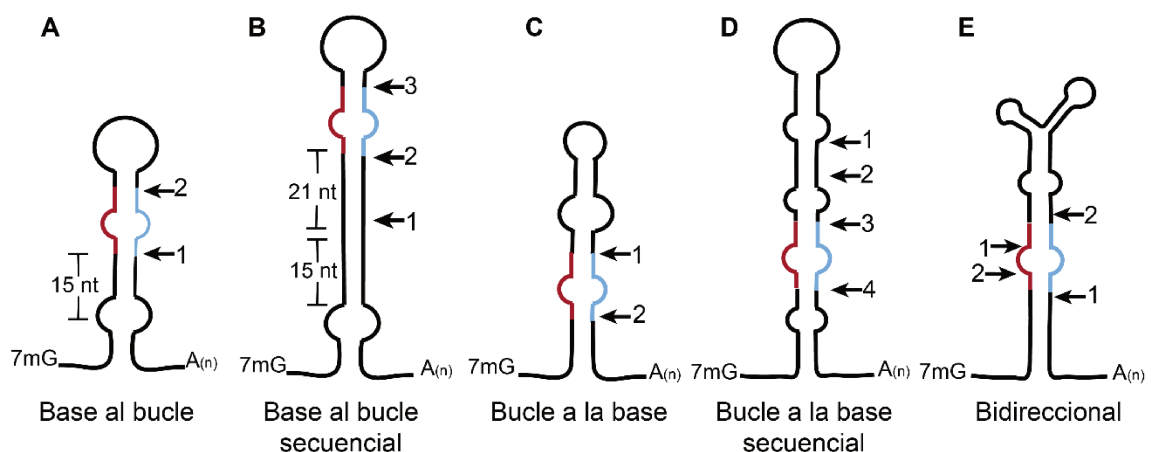


Figura 16. Tipos de procesamiento de los precursores de miRNAs. Las estructuras de los pri-miRNAs afectan sus patrones de procesamiento. **(A)** Procesamiento de la base a bucle de pri-miRNA. Algunos pri-miRNAs con un tallo de ~15 pb seguido de un bucle interno debajo del miRNA/miRNA*, se cortan primero en una posición distal al bucle y luego se cortan en una posición próxima al bucle que libera el dúplex miRNA/miRNA*. **(B)** Procesamiento secuencial de la base al bucle. Algunos pri-miRNAs con tallos largos se escinden inicialmente en una posición distal al bucle, que está a unos 21 nt del miRNA/miRNA*. miRNA/miRNA* luego se libera a través de la escisión secuencial. Frecuentemente, hay un tallo de 15 pb seguido de un bucle interno debajo de la primera posición de corte. **(C)** Patrón de procesamiento del bucle a la base. Los pri-miRNAs que contienen una región terminal estructurada y homogénea con un tallo de ~42 pb y un bucle pequeño generalmente se escinden inicialmente en una posición próxima al bucle. **(D)** Patrón de procesamiento secuencial del bucle a la base. Algunos pri-miRNAs con bucles y de tallo largo se procesan a través de múltiples escisiones que comienzan desde la posición próxima al bucle. **(E)** Procesamiento bidireccional. Algunos pri-miRNAs con bucles multiramificados se pueden procesar bidireccionalmente. Sin embargo, no todos los patrones de procesamiento son productivos (Figura modificada de [213]).

8.1.7 Exportación nuclear de miRNAs y ensamblado del complejo miRISC

Posterior a su procesamiento nuclear, el dúplex de miRNA/miRNA* maduro es metilado en sus extremos 3' por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1), protegiéndolos de la degradación [225]–[227].

Para cumplir sus funciones, los miRNAs deben salir del núcleo hacia el citoplasma [2],[27],[170],[228],[229]. Durante mucho tiempo, se pensó que el dúplex miRNA/miRNA* era exportado hacia el citosol por la proteína HST, y allí acoplado al complejo RISC. En gran parte, este modelo de exportación fue postulado, y ampliamente aceptado, cuando en el año 2005 se descubrió que esta proteína, ortóloga a la EXP5 en mamíferos, presentaba niveles disminuidos de miRNAs [27]. En humanos, la EXP5A media la exportación nuclear de los pre-miRNAs, tras unir dsRNA de forma dependiente de RAN-GTP [229]–[231]. A pesar que los resultados no mostraban cambios en la distribución subcelular de miRNAs en mutantes de *HST*, el paralelismo con el sistema de humanos estableció por años un mecanismo de exportación de miRNAs sin sustento experimental.

Recientemente, se ha demostrado que AGO1 no sólo se encuentra en el citosol, sino también en el núcleo, cumpliendo funciones en la regulación de la expresión génica y reparación del ADN dañado por UV [232]. Adicionalmente, refutando la hipótesis de que

el complejo RISC se forma estrictamente en el citosol, se demostró que AGO1 es capaz de ingresar al núcleo celular, asociarse con miRNAs y salir al citoplasma ya cargada [233].

Por otro lado, dos proteínas de la familia de las β -importinas denominadas ENHANCES MIRNA ACTIVITY 1 (EMA1) y TRANSPORTIN 1 (TRN1) participan en el proceso de carga miRNAs en el complejo RISC aunque sin participar en el movimiento núcleo/citoplasma de estas moléculas [234],[235]. Recientemente se postuló que el complejo THO/TREX, que había sido relacionado a la biogénesis de miRNAs, tiene un rol fundamental en la salida de miRNAs asociados a AGO1 al citoplasma [28],[236],[237]. Se observó que THP1, uno de los componentes principales del complejo TREX-2, en conjunto con la nucleoporina NUP1, facilitan la exportación de los complejos RISCs desde el núcleo hacia el citosol a través del complejo del poro nuclear [28]. Este mecanismo explica, al menos parcialmente, como los miRNAs son exportados al citoplasma. Sin embargo, recientemente se observó la presencia de abundantes dúplex de miRNA/miRNA* libres en el citoplasma [175], lo que sugiere que al menos una porción de los miRNAs salen del núcleo en un mecanismo independiente de AGO1 (Figura 15A).

En cualquier caso, una vez asociado con la proteína AGO1, una de las cadenas del dúplex se selecciona como cadena guía y permanece retenida en el complejo miRISC, mientras que la cadena pasajera (generalmente la hebra miRNA*) es degradada [2],[170]. El ensamblado del complejo RISC, requiere de la chaperona HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90), la cual homodimeriza e interacciona con AGO1, la proteína SQUINT (SQN), proteína ortóloga a la CYCLOPHYLIN 40 (CYP40) de animales, y la proteína nuclear desordenada CARP9 [238]–[242].

Una vez que el complejo RISC se encuentra ensamblado, la regulación mediada por miRNAs se produce a través de dos mecanismos principales: clivaje endonucleolítico del transcripto blanco o represión de su traducción [30],[170],[243]. En plantas, el grado de complementariedad de secuencia entre un miRNA y sus genes blanco influyen en su accionar posterior. Dado que en plantas, los miRNAs y sus ARNm blanco tienen una complementariedad casi perfecta, el modo de acción predominante es el corte endonucleolítico del transcripto [30],[157],[243],[244]. Sin embargo, la inhibición de la traducción sería mucho más común de lo que se pensaba en plantas, dado que recientemente se han encontrado numerosos miRNAs asociados con ribosomas y con el retículo endoplasmático [245]–[247].

8.1.8 ¿Cuál es el rol de HASTY en la biogénesis de miRNAs?

HST fue descrita por primera vez como un factor que regula la transición de la fase juvenil a la fase adulta y de floración, dos procesos de desarrollo en los que los miRNAs desempeñan un papel fundamental [248]. Las mutantes *hst* presentan una transición acelerada de estas fases, lo que se manifiesta en un desarrollo foliar aberrante, filotaxis defectuosa y esterilidad [248],[249]. En arroz, el ortólogo de HST, CRD1, también participa en el desarrollo adecuado de la corona de la raíz [29].

HST es un miembro de la familia de las carioferinas [249]. Este tipo de proteínas, son receptores de transporte necesarios para la exportación o importación de moléculas biológicas a través del complejo del poro nuclear. El transporte mediado por carioferinas, depende de pequeñas proteínas que hidrolizan GTP llamadas RAS-RELATED NUCLEAR PROTEIN (RAN). La asociación de las carioferinas con RAN-GTP, promueve la exportación nuclear, mientras que la hidrólisis de GTP conduce a la disociación de cargas en el citoplasma [250],[251]. *A. thaliana* codifica cuatro proteínas similares a RAN entre 93 proteínas de unión a GTP. RAN1, RAN2 y RAN3, tienen más del 95 % de identidad entre sí, mientras que RAN4 es divergente y es aproximadamente un 65 % idéntico a los otros tres [252]. A su vez, el genoma de *A. thaliana* codifica 17 carioferinas, de las cuales cuatro están relacionadas con la vía de biogénesis de miRNAs. TRANSPORTIN 1 participa en la carga del miRNA a la proteína AGO1 [234],[235]; KETCH1 permite la translocación de HYL1 al núcleo [253]; EXPORTIN 1 (EXP1/XPO1) ayuda al movimiento de AGO1 desde el núcleo hasta el citoplasma [233]; y HST modularía la acumulación de miRNAs por un mecanismo largamente desconocido [27],[249]. Como se planteó previamente, durante muchos años, reinó el modelo basado únicamente en paralelismos con el sistema en humanos, atribuyendo a HST el rol como exportadora de miRNAs en plantas. Posteriormente, refutando esta suposición, nuestro laboratorio mostró que HST, por su naturaleza proteica, es capaz de translocar entre núcleo y citoplasma, pero esta capacidad está desacoplada de su rol en la biogénesis de miRNAs [174] (Figura 17). En este sentido, se encontró que HST requiere de RAN1 para salir desde el núcleo al citoplasma (Figura 17F, G), mientras que IMPORTIN ALPHA ISOFORM 2 (IMPA2) media su ingreso al núcleo (Figura 17H). Sin embargo, ninguna de estas proteínas es necesaria para el transporte de miRNAs fuera del núcleo, dado que las mutantes *ran* e *impa* no presentan alteración en la distribución de miRNAs entre núcleo y citosol. Muy lejos de cumplir un rol en la exportación de miRNAs, se demostró que HST modula la biogénesis de estas moléculas al actuar como un andamio que permite la formación de un complejo proteico entre DCL1 y MED37 directamente sobre los *loci* MIRNA [174]. Esto permite el ensamblaje del complejo de procesamiento

de miRNAs en forma temprana, posiblemente gatillando el procesamiento co-transcripcional descrito previamente (Figura 17A, B).

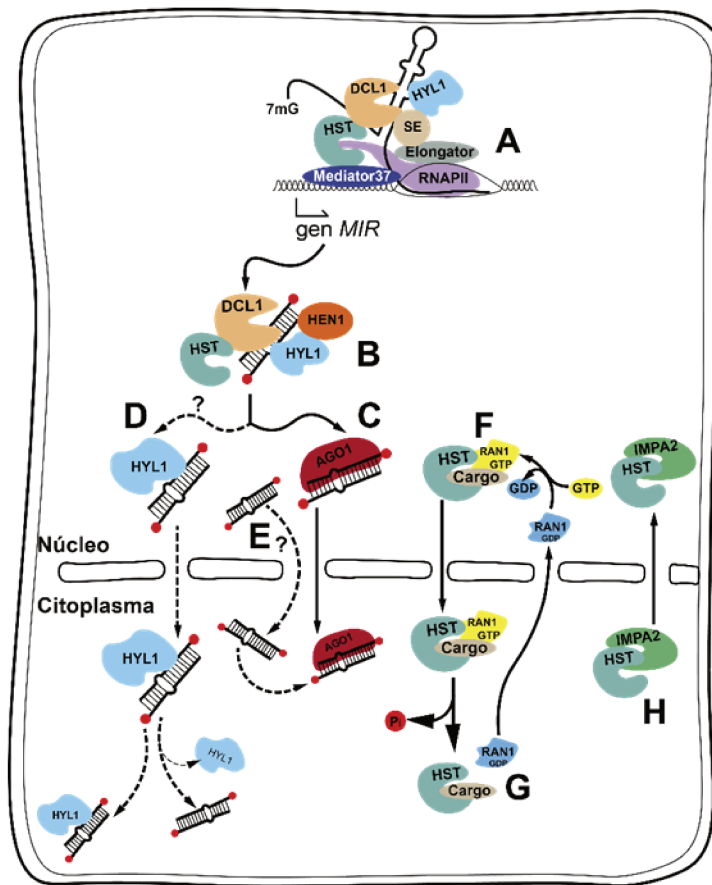


Figura 17. Funciones de HST durante la biogénesis de miRNAs y las potenciales vías de exportación de miRNAs. (A) HST interactúa con MED37 favoreciendo la asociación de DCL1 a los *loci* de los genes *MIR*. Esta interacción podría permitir el ensamblaje inicial del complejo de procesamiento a nivel co-transcripcional. **(B)** Después del procesamiento los miRNAs aún unidos a HYL1 y posiblemente de forma indirecta a HST toman diferentes caminos. **(C)** Por un lado, pueden translocar al citoplasma asociados con AGO1 [233]. **(D)** Por otro lado, podrían permanecer unidos a HYL1 y ser exportados al citosol en forma independiente de AGO1, para cumplir funciones desconocidas, aunque potencialmente de forma no autónoma celular. **(E)** Alternativamente podrían, difundir de forma pasiva al citosol sin estar unidos a ninguna proteína. **(F)** Independientemente de la biogénesis de miRNAs, HST puede actuar como una carioferina para transportar cargas desde el núcleo hacia el citoplasma cuando interactúa con RAN1 **(G)** y desde el citoplasma al núcleo cuando interactúa con IMPA2 **(H)**. Los mecanismos hipotéticos se muestran con flechas discontinuas (Figura modificada de [174]).

Si bien se ha visto que HST no interactúa con los precursores de miRNAs, si es capaz de interactuar directa o indirectamente con miRNAs maduros [174]. Esta capacidad

resulta intrigante, dado que los niveles de muchos miRNAs no se ven afectados o solo se ven afectados moderadamente en mutantes *hst*. Esto podría sugerir que HST solo actúa sobre una subfracción de estas moléculas. En este sentido, un estudio reciente sugiere que HST podría actuar específicamente sobre aquellos miRNAs que se encuentran libres en la célula, es decir, aquellos que de algún modo evaden la carga nuclear en AGO1 [254]. En este trabajo, se encontró además que HST regula el movimiento célula a célula y de larga distancia de miRNAs, y que esto resulta independiente de su capacidad de translocar del núcleo al citosol [254]. Recientemente, se encontró que KTN1, la cual reorganiza en forma dinámica los microtúbulos en el citosol, está involucrada en el movimiento de miRNAs entre células [255]. Se ha demostrado que KTN1 inhibe la carga de ciertos miRNAs móviles en AGO1 para promover su movimiento [255]. Dado que las proteínas AGO actúan de forma autónoma celular [256]–[259], el mecanismo de movimiento de miRNAs mediado por HST parece involucrar a miRNAs no unidos a proteínas AGO (Figura 18). Estos descubrimientos, ponen en evidencia una nueva e interesante función de HST en la cual esta proteína podría determinar si un miRNA es cargado en AGO1 o no.

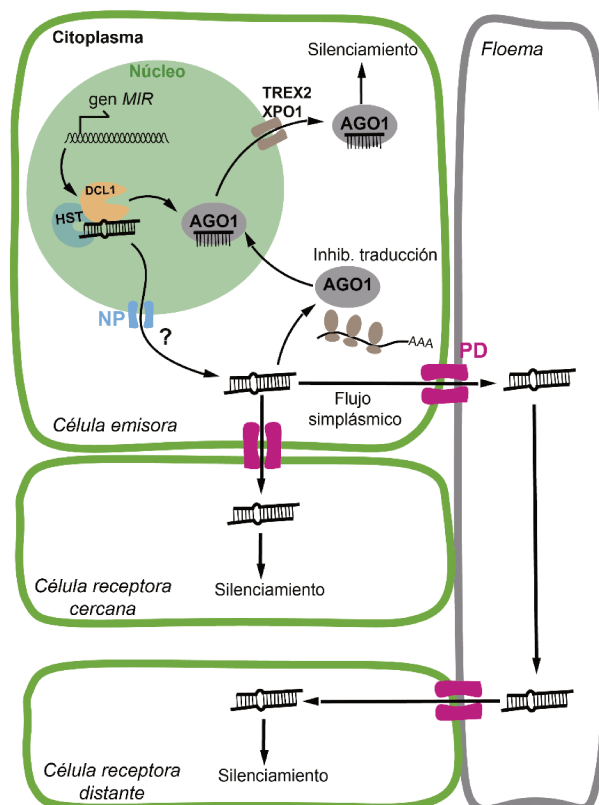


Figura 18. HST y su rol en movimiento de miRNAs. Un subconjunto de miRNAs en plantas se mueven de una célula a otra y pueden recorrer largas distancias a través de la vasculatura. HST regula, por un mecanismo desconocido, ambos tipos de movimiento probablemente

desde el núcleo de las células emisoras, siendo prescindible en las células receptoras. Los miRNAs que actuarían en forma independiente de AGO1 [175], podrían ser exportados del núcleo al citosol a través del poro nuclear (NP) por un mecanismo desconocido. Una vez en el citosol, podrían moverse mediante transporte simplástico a través de plasmodesmos (PD) hacia células vecinas o bien vía floema hacia células receptoras distantes (Figura modificada de [254]).

8.1.9 La asociación entre HST y HWS

HAWAIIAN SKIRT (HWS) es una proteína de tipo F-Box y, como tal, es parte de un complejo Skp-Cullin-F-box (SCF), que reconoce sustratos específicos para su ubiquitinación y degradación [260]. Si bien se demostró previamente que HWS interactúa con los componentes clásicos de un complejo SCF [261],[262] hasta el momento no se han identificado sustratos para HWS, que sean marcados para degradación mediada por proteasoma u otros procesos moleculares mediados por ubiquitina. Esta proteína, posee un dominio F-Box en su extremo N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio Kelch que está encargado de la interacción con otras proteínas. Su curioso nombre, se debe al fenotipo característico de la mutante *hws* la cual presenta fusión de sépalos, impidiendo la pérdida de órganos florales, los cuales permanecen unidos incluso hasta la senescencia de la silicua generando la apariencia de una “pollera hawaiana” [263]. Durante la caracterización de las funciones de HWS se realizó un “*suppressor screening*” de mutantes de *hws* para encontrar las plantas mutantes capaces de revertir el fenotipo. Entre las mutantes aisladas se aisló un alelo de *CUC1* que contiene una mutación en el sitio de unión de miR164 interrumpiendo su regulación post-transcripcional [264]. Por otro lado, y producto de ese mismo *screening*, se aislaron varias mutantes de *hst* que también son capaces de revertir el fenotipo de *hws* [265]. Los fenotipos foliares y de las flores en plantas que sobreexpresan HWS (*35S::HWS*), son notablemente similares al de las mutantes deficientes en miRNAs, incluido el característico aserramiento foliar [265]. Complementario a estos hallazgos, un “*suppressor screening*” en plantas que expresan un “*target mimicry*” artificial del miR156 (MIM156) identificó a HWS reforzando su asociación con la vía de miRNAs [266]. Un “*target mimicry*” (**MIM**, del inglés *miRNA target mimicry*, que significa “imitar el objetivo”), consiste en expresar un ARN no digerible que “imita” al blanco de algún miRNA pero no es degradable por el complejo RISC, es decir, compete con su gen blanco natural actuando como una esponja de miRNAs. Lo que posiblemente sucede, es que una mutación en *hws* haría que los niveles de miRNAs sean más elevados saturando al MIM y restaurando el silenciamiento del gen endógeno, y por lo tanto el fenotipo, como un efecto “derrame” [266]. De forma similar, un “*suppressor screening*” del MIM160

también identificó una mutación en *hws* capaz de revertir el fenotipo de la mutante progenitora [267]. En este trabajo, proponen que HWS tendría una posible función en la eliminación de complejos miRISC asociados con MIMs, denominados tentativamente "RISC no óptimos". Los MIMs podrían inducir cambios conformacionales específicos o modificaciones postraduccionales en AGO1 [268],[269], que podrían ser reconocidos por HWS para ser degradados. Algo similar sucede con FBW2, una proteína de tipo F-box que se encargaría de degradar formas mutadas y disfuncionales de AGO1 [270]. Otro ejemplo análogo ocurre con la regulación de Ago1 en *Drosophila* la cual, cuando no se encuentra cargada con un miRNA, es reconocida y posteriormente degradada por la ubiquitin ligasa IRUKA [271].

Alternativamente, HWS podría tener como objetivo a una proteína intermedia que finalmente afecta la actividad de AGO1 o la eliminación de los complejos RISC no óptimos. A pesar de los esfuerzos en tratar de encontrar el rol de HWS en la biogénesis de miRNAs, y su llamativa interacción génica con HST, el mecanismo subyacente sigue siendo incierto.

Considerando la escasa información disponible al inicio de esta tesis sobre la función de HST en la biogénesis de miRNAs, así como en el movimiento de estas moléculas, nos propusimos en este capítulo investigar genéticamente la función de esta proteína.

8.2 Objetivos

En esta etapa de la tesis nos proponemos estudiar la vía de biogénesis de miRNAs en plantas, particularmente el rol de la proteína HST. Si bien actualmente tenemos evidencia reciente de la función de esta proteína, su mecanismo de acción es incierto, y lo era aún más al inicio de esta tesis. En esta parte del proyecto, tomamos una aproximación genética para tratar de comprender el rol de HST en la biogénesis de miRNAs. Para esto realizamos un “*suppressor screening*” en plantas mutantes para el gen que codifica a la proteína HST, buscando aquellas que presenten una atenuación en el fenotipo característico de estas plantas. Una reversión del fenotipo, podría conducirnos a mutantes en nuevos cofactores en la vía y, por ende, nos permitirá estudiar y comprender los procesos en los que HST está involucrada.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Plásmidos

pAS54: Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, y luego del sitio de recombinación, contiene la mitad N-terminal de la secuencia codificante de la proteína mCitrina. Se lo utilizó para ensayos de BiFC.

pAS59: Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, y luego del sitio de recombinación, contiene la mitad C-terminal de la secuencia codificante de la proteína mCitrina. Se lo utilizó ensayos de BiFC.

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 GAL4 (GAL4AD). 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 GAL4AD 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 GAL4 (GAL4BD). 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 *LEU2* como marcador de selección en medios carentes de leucina para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAL4BD 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.

pEXP-AD502: Este vector tiene las mismas características que el *pDEST™ 22* a excepción de los sitios de recombinación *attR* y el casete de muerte flanqueado por estos sitios. Los sitios *attR* fueron reemplazados por los sitios de recombinación *attB* que flanquean un SMC para generar bibliotecas para la realización de *screenings* de interacción proteína-proteína. Este vector se utilizó como control de vector vacío frente a las proteínas de interés fusionadas al GAL4BD en los ensayos de doble híbrido, para

descartar falsos positivos de interacción.

pDB-Leu: Este vector tiene las mismas características que el *pDEST*TM 32 a excepción de los sitios de recombinación *attR* y el casete de muerte flanqueado por estos sitios. Además, tiene el gen de resistencia a kanamicina en lugar del gen de resistencia a gentamicina. Este vector se utilizó como control de vector vacío frente a las proteínas de interés fusionadas al GAL4AD en los ensayos de doble híbrido, para descartar falsos positivos de interacción.

8.3.2 Cepas de bacterias y levaduras utilizadas

Saccharomyces cerevisiae, MAV203 [MAT α , leu2-3,112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2, can1^R, cyh2^R]. El resto de las cepas bacterianas, fueron descritas en la Sección 7.3.2.

8.3.3 Material vegetal y condiciones de cultivo

Todos los stocks de *A. thaliana* utilizados son del ecotipo Col-0. Las líneas mutantes *hst-15* (SALK_079290), *hst-6* [249], *hws-1* y *hws-3* [266] fueron cultivadas tal como fue descrito en la sección 7.3.3. Las mutantes *hst-6*, *hws-1* y *hws-3* fueron cedidas gentilmente por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel (Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Alemania). Se identificaron las mutaciones realizando PCR sobre ADN genómico de las mismas utilizando oligonucleótidos específicos (ver Tabla 4).

8.3.4 Construcciones

Para evaluar la complementación de fenotipo de la mutante del screening *hws-35/hst-15*, se utilizaron construcciones que expresan la región codificante de *HWS* así como una versión sin su dominio F-Box (*HWS* Δ F-box) ambas corriente abajo del promotor ubicuo 35S y fusionadas a la proteína fluorescente mCitrina en su extremo C-terminal, las cuales fueron publicadas previamente [266] y cedidas por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel. Por otro lado, se amplificó la región codificante de *HWS* y de *HWS* Δ F-box mediante PCR de los plásmidos que los contenían con oligonucleótidos específicos (ver Tabla 4) y se clonó en el vector pENTRTM/D-TOPO[®] generando el “vector de entrada”, que luego fue recombinado con distintos “vectores destino” de la serie *pGREEN* IIS de acuerdo al objetivo. Por un lado, se recombinaron ambas versiones de *HWS* con el vector pFK209, para expresarlas bajo el control del promotor 35S, con el fin de realizar ensayos de co-infiltración en plantas de tabaco o bien para transformar en forma estable plantas de *A. thaliana*. A su vez, los mismos vectores de entrada se recombinaron con el plásmido pJV117 para expresar las dos versiones de *HWS* fusionadas a la proteína

fluorescente mCherry, también con el objetivo de co-infiltrar plantas de tabaco y observar intensidad de fluorescencia en el microscopio confocal. Por último, los vectores de entrada antes mencionados, se recombinaron con los vectores pAS054 y pAS059 para expresar las dos versiones de HWS fusionadas a la mitad N-terminal o C-terminal de la proteína fluorescente mCitrina, respectivamente, con el objetivo de realizar los ensayos de Complementación bimolecular de la Fluorescencia (**BIFC**, del inglés **Bimolecular Fluorescence Complementation**) y luego observar fluorescencia por microscopía confocal.

Por otro lado, dado por la imposibilidad de aislarla directamente de mutantes *hst-15*, se realizó una versión del ADNc de *hst-15*, mediante reacción en cadena de la polimerasa de extensión superpuesta (PCR *overlapping*) descrita en las siguientes secciones.

Las construcciones utilizadas en los experimentos de doble híbrido en levaduras de las dos versiones de HWS, fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel. Las mismas, fueron utilizadas para co-transformar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa MAV203 junto con construcciones que expresen cofactores de la maquinaria de biogénesis de miRNAs clonados previamente en los mismos vectores de destino, cedidos por el Dr. Damián Cambiagno, miembro de nuestro laboratorio [174].

Los vectores que contienen MED37D, MED37E, MED18, MED20, HST, HST sin su dominio C-terminal (HST Δ C), el dominio exportina de HST (HST-N) fusionadas a la proteína fluorescente eGFP, fueron cedidas por el Dr. Damián Cambiagno, miembro de nuestro laboratorio. Por otro lado, las versiones de esas mismas proteínas fusionadas al dominio C-terminal de m-Citrina y aquellas fusionadas al dominio BD de la proteína GAL4 para realizar ensayos de doble híbrido, también fueron cedidas por el Dr. Damián Cambiagno [174].

Las construcciones generadas con sus descripciones se alistan en la Tabla 3. Los cebadores utilizados para los clonados, se alistan en la Tabla 4.

8.3.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.5.

8.3.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.6.

8.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa de extensión superpuesta (“Overlapping PCR”)

En primer lugar, se realizó un primer paso de amplificación por PCR generando productos con secuencias superpuestas para la extensión solapada del paso siguiente.

La primera reacción de amplificación se realizó utilizando *Pfu* ADN polimerasa (Thermo Scientific), como fue descrito en la Sección 7.3.5 con oligonucleótidos específicos para amplificar los dos fragmentos que se desean unir (Tabla 4). Luego, se hace una purificación por gel de los productos (Sección 7.3.7) y se cuantifica la concentración de ADN de los mismos. Posteriormente, se preparó la mezcla de PCR (Productos de PCR, 0,2 mM dNTPS y 0,3 U de *Pfu*), sin oligonucleótidos, incluyendo los productos de PCR que se desean unir en una relación molar de ~1:1, en caso de que los fragmentos a unir sean de tamaño similar. De lo contrario, se deberá calcular la relación molar correcta para poder favorecer la unión de los productos. Se recomienda utilizar 50 ng del fragmento de PCR de mayor tamaño. Se procedió, entonces, con la reacción de PCR (2 minutos 94°C; 2 minutos 68°C; 2 minutos 60°C; 2 minutos 55°C y 5-10 minutos a 72°C x 10 ciclos). Luego, se tomó todo el producto del primer paso de PCR del ciclador y se continuó inmediatamente con el siguiente paso. En la siguiente reacción de PCR, se agregaron los dos oligonucleótidos que flanquean las partes externas del producto de fusión, tal como se procede en una PCR estándar (Producto de PCR del paso anterior [solapada], 0.2 mM dNTPS, 0.4µM de cada oligonucleótido y 0.3 U de *Pfu*). En este caso, se realizaron 30 ciclos, esta vez utilizando una temperatura de hibridación específica para los oligonucleótidos empleados en esta segunda parte. Posteriormente, se hizo una corrida electroforética para luego purificar del producto de PCR para proseguir con el clonado en vectores de entrada.

8.3.8 Clonados en vectores de entrada y vectores destino

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.8.

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

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.9.

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

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.10.

8.3.11 Minipreparación de ADN plasmídico

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.11.

8.3.12 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.12.

8.3.13 Extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis thaliana* con CTAB

Para realizar genotipados o clonados, se procedió tal como fue descrito en la Sección 7.3.13.

Para obtener ADN genómico de mayor pureza para ser secuenciado, se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción de ADN con CTAB [272]. Brevemente, se pulverizó el material con nitrógeno líquido en un mortero y el polvo congelado se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL (el equivalente a aproximadamente 4 mL de tejido pulverizado proveniente de 300 plantas de 15 días). Se agregó a cada tubo 6 mL de solución CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CTAB] 2% [p/v], NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, Polivinilpirrolidona [PVP] 1% [p/v]) y 5 µL de ARNasa A 100 mg/mL (Promega) y se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló por completo. Luego se incubó por 30 min a 65 °C en un baño de agua, mezclando por inversión cada 5 min. Luego de 15 min de incubación, se suplementó cada tubo con 12 µL de β-mercaptoetanol, se mezcló y se dejó incubando a 65 °C los restantes 15 min. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min, luego de lo cual, se agregó 6 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitó hasta emulsión completa, y se centrifugó a 3000 g durante 20 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se mezcló con 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), y se centrifugó a 3000 g durante 20 min a 4 °C. Se transfirió nuevamente la fase acuosa a otro tubo limpio, y se adicionó el mismo volumen de isopropanol para precipitar el ADN genómico, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 3000 g durante 10 min. A continuación, se lavó el pellet de ADN con 5 mL de etanol 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 3000 g por 5 min, y se dejó secar completamente el pellet de ADN. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 200 µL de TE 1X pH 8,0, se agregó 0,5 µL de ARNasa A 100 mg/mL (Promega), y se incubó a 55 °C por al menos 30 min. Por último, se centrifugó a 3000 g por 2 min para eliminar sedimentos no disueltos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

8.3.14 Aislamiento de ARN de plantas

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.19.

8.3.15 Transcripción reversa (RT)

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.20.

8.3.16 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.21.

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

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.22.

8.3.18 Transformación estable de plantas de *A. thaliana* por inmersión floral

Este procedimiento fue descrito en la Sección 7.3.24.

8.3.19 Transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* por agroinfiltración

La transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente [273]. Para ello, se crecieron las bacterias *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés en medio YEB inducido (1g/L extracto de levadura, 5g/L extracto de carne, 5 g/L peptona, 5 g/L sacarosa, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 10 g/L agarosa, 1 g/L NH₄Cl, 0.15 g/L KCl, 0.01 g/L CaCl₂, 0.0025 g/L FeSO₄.7H₂O, 50mM buffer fosfato pH 5.5, 20% Glucosa, 1M MES, 200 mM acetosiringona) a 28 °C durante 24 a 36 horas. Las células se rasparon y se resuspendieron en 500 µL de solución de lavado (10 mM MgCl₂, 100 mM acetosiringona). Después de agitar brevemente, 100 µL de bacterias resuspendidas se diluyeron 10 veces para medir la OD₆₀₀. Finalmente, las bacterias se diluyeron a una OD₆₀₀ de 0,5 en solución de infiltración (1/4 MS [pH = 6,0], 1% sacarosa, 100 mM acetosiringona, 0.005% Silwet L-77 [v/v, 50 ml/l]). 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, inhibiendo su función [274],[275]. Se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 2:2:1 (Constr.A:Constr.B:p19) para los ensayos de co-expresión y BiFC y 1,3:1,3:1,3:1 (Constr.A:Constr.B:ConstrC:p19) para los ensayos de TriFC. Las bacterias se infiltraron en la cara abaxial de hojas de tabaco con una jeringa de plástico de 1 mL, luego de lo cual se mantuvieron durante 1 hora en luz para permitir que las hojas se sequen. Posteriormente, se mantuvieron en oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, las plantas transformadas se transfirieron nuevamente a la cámara de cultivos durante otros 2 a 3 días antes de la recolección de muestras/microscopía.

8.3.20 Tinción de raíces con fucsina básica

La tinción fue llevada a cabo mediante una adaptación de un protocolo previamente descrito [254]. Se tomaron plántulas de 7 días de edad cultivadas *in vitro* en placas

verticales en medio MS. Posteriormente, las raíces se aclararon en KOH 1 M durante 3 horas a 37 °C, luego de lo cual fueron lavadas con agua bidestilada una vez. A continuación, las raíces se tiñeron con fucsina básica al 0,01 % durante 10 minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavaron dos veces en etanol 70 % y se rehidrataron en agua antes de la toma de imágenes con el microscopio confocal.

8.3.21 Separación de tejidos vasculares y epidérmicos en hojas de *A. thaliana*

Para llevar a cabo la separación de vasculatura de la epidermis, se utilizaron plantas de 18 días post-germinación y se dispusieron las hojas de roseta en un “sándwich” de cinta de papel. De esta forma, se separó la epidermis inferior de la vasculatura y otros tejidos presentes en la parte superior de la hoja. Ambas partes fueron procesadas por separado para extraer ARN, tal como fue descrito en la sección 7.3.19.

8.3.22 Extracción de proteínas totales de *A. thaliana*

Se procesaron aproximadamente 100 mg de plántulas de 15 días de *A. thaliana* las cuales fueron pulverizadas en N₂ líquido. Posteriormente, se agregaron 100 µl de 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]). Luego se centrifugó durante 20 min a 16000 g y 4 °C, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio, teniendo así los extractos proteicos. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Invitrogen). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

8.3.23 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 previamente [276]. Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida del 8% (p/v), con geles superiores de concentración del 6% (p/v). Los extractos proteicos a sembrar fueron mezclados con 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]) en una relación 4:1, respectivamente, y luego fueron incubados por 5 min a 95 °C con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética en solución de corrida 1X (Tris-Base 25 mM; glicina 19,2 mM; SDS 0,1% [p/v]). A continuación, las proteínas se transfirieron a

una membrana de PVDF (Amersham) pre-activada con metanol 100%, por el método estándar de transferencia húmeda, con solución de transferencia 1X (Tris-Base 2,5 mM; glicina 19,2 mM; metanol 5% [v/v]). Para determinar el peso molecular de las bandas y para confirmar la eficiencia de transferencia se utilizó el marcador de peso molecular proteico PageRuler Pretined Protein Ladder (Thermo Scientific). Posteriormente, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente la membrana en solución de bloqueo (leche en polvo 5% [p/v] en TBS-T 1X). Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a visualizar en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. Después de 3 lavados por 10 min con solución TBS-T 1X (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1% [v/v]), 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 h 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 ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare), se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente, 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. MED37D/E fusionada a eGFP se detectó con un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína GFP derivada de *Aequorea victoria* (Agrisera AS15 2987, dilución 1:10000), mientras que HYL se detectó usando un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína endógena de *A. thaliana* (Agrisera AS09532; dilución 1:10000). Como controles de carga en diferentes experimentos se utilizó el anticuerpo de ACTINA 8 (Agrisera AS132640; dilución 1:10000) y tinción con azul de Coomassie.

8.3.24 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Para los ensayos de co-localización y para evaluar degradación de HST/MED37D/E por parte de HWS, se co-transformaron de manera transitoria hojas de *N. benthamiana* con las fusiones de HST/MED37D/E a la proteína fluorescentes eGFP y HWS/HWSΔF-box a la proteína mCherry utilizando como control negativo, una construcción que contiene a HYL fusionada a mCherry. Pasadas 72 h 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, excitando las muestras con los láseres de 488 nm y 552 nm, y recolectando la emisión a 500-530 nm, 600-630 nm y 500-530 nm para eGFP, mCherry y mCitrina respectivamente, agregando

una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. Luego, el procesamiento de las imágenes se realizó en el software Fiji [277].

Por otro lado, para los ensayos de BiFC/TriFC, se co-infiltraron hojas de *N. benthamiana* con las construcciones de HST-MED37D/E y CARP9 (control negativo) fusionadas al dominio C-terminal de la mCitrina junto con HWS/HWS Δ F-box fusionadas al dominio N-terminal de la mCitrina. Luego de cumplidas las 72 h post infiltración, se procedió tal como fue descrito anteriormente, pero utilizando el láser de 514 nm para excitar las muestras, y recolectando la emisión en un rango de 525-560 nm para la mCitrina.

8.3.25 Ensayos de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP) seguido de Western blot

Para el ensayo de Co-IP, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de HYL1 y DCL1 con anticuerpos anti-HYL1 (dilución 1:1000) y anti-DCL1 (dilución 1:1000) de muestras de plántulas transgénicas de *A. thaliana* co-transformadas con las construcciones 35S::HWS junto con 35S::MED37E:eGFP, 35S::HWS Δ F-box junto con 35S::MED37E:eGFP y plantas mutantes *hws-3* transformadas con 35S::MED37E:eGFP. Aproximadamente 3 g de material vegetal, fue sometido a un proceso de “crosslinking” utilizando Formaldehído 37%. Este es un paso crítico necesario para mantener estables las interacciones proteína-proteína dentro de las células antes de la inmunoprecipitación. El proceso se realizó aplicando vacío durante 15 minutos. Posteriormente, para frenar la reacción de “crosslinking”, se agregó Glicina 2 M, se secaron las muestras y se congelaron en N₂ líquido. En primer lugar, se llevó a cabo el enriquecimiento de núcleos de las muestras antes mencionadas. Para ello, se pulverizaron los 3 g de material vegetal con 15 mL de solución de extracción I (Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.4 M sacarosa, 10 mM MgCl₂, 5mM Beta-mercaptoetanol, 200 μ M PMSF). El homogenato se filtró a través de una capa de Miracloth, y la fase acuosa se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El sedimento se lavó 2 veces con 10 mL de solución de extracción II (Tris-HCl 10 mM pH 8, 0.25 M sacarosa, 10 mM MgCl₂, 5mM Beta-mercaptoetanol, 1% Triton X100, 200 μ M PMSF) y luego se resuspendió en 500 μ l de solución de extracción III (Tris-HCl 10 mM pH 8, 1.7 M sacarosa, 2 mM MgCl₂, 5mM Beta-mercaptoetanol, 0.15% Triton X100, 200 μ M PMSF). La resuspensión se pipeteó cuidadosamente sobre 700 μ l de solución de extracción III. El gradiente de sacarosa obtenido se centrifugó a 16000g y 4 °C durante 5 minutos. Para la extracción de proteínas, el sedimento se resuspendió en 100 μ L de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, 1% NP40, 10 mM EDTA, 200 μ M PMSF) y se sonicó en un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (5 ciclos de 30 s de pulsos a alta intensidad/30 s

sin pulsos). A continuación, se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante a un nuevo tubo. Luego, se procedió a la inmunoprecipitación utilizando las beads magnéticas Sure Beads™ Protein-A (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a la incubación con las beads magnéticas, se realizaron lavados con Chip dilution buffer (1.1% Triton X100, 1.2 EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH8.0, 120 mM NaCl) y se incubaron las muestras durante 1 hora a 65°C, para revertir el “crosslinking”. Luego, se agregaron 200 µL de buffer de siembra Laemmli con el agregado de urea (0.24 g/mL) y las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 95°C. Posteriormente, se detectó eGFP-MED37E en la fracción de IP mediante *Western blot* usando el anticuerpo anti-GFP Agrisera AS152987.

8.3.26 Co-transformación de levaduras

La co-transformación de células de las cepas *S. cerevisiae* MaV203 se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo descrito en el manual “*Yeast Protocols Handbook*” (Clontech Laboratories). Se inocularon 2-3 colonias en 10 mL de YPDA (peptona de carne 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, glucosa 20 g/L, adenina hemisulfato dihidrato 43,9 mg/L) y se incubaron ON a 200 rpm, 30°C. Luego, todo el volumen, se traspasó a 100 mL de YPDA, y se incubó durante 4-5 hs a 30°C y 200 rpm hasta llegar a OD₆₀₀ 1,3-1,5. El cultivo se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a 4°C, luego de lo cual se descartó el sobrenadante por volcado y el pellet se resuspendió en 100 mL de agua bidestilada estéril fría. Posteriormente, se repitió el paso de centrifugación y luego se resuspendió el pellet en 50 mL de agua bidestilada esteril fría. A continuación, se repitió el paso de centrifugación y luego de extraer el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en el agua remanente del volcado. Posteriormente, se traspasaron a tubos de 2 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 4000 g a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M, luego de lo cual se descartó nuevamente el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100-200 µL de sorbitol 1 M. Posteriormente, se alicuotaron las levaduras en distintos tubos para proceder con la transformación. Para esto último, se tomaron 60-80 µL de células competentes, y se agregó 1 µg de ADN de cada construcción. La mezcla de las células con los plásmidos de interés se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad). El pulso eléctrico se realizó ajustando las variables de electroporación según las recomendaciones del fabricante (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Inmediatamente luego del choque eléctrico, las células de *S. cerevisiae* se recuperaron en 1 mL de sorbitol 1 M. Consecutivamente, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente luego de lo cual se plaquearon en medio YNB selectivo -LT (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) en todos los casos suplementado con sorbitol 1 M.

8.3.27 Ensayos de doble híbrido en levaduras

Los ensayos de doble híbrido en levaduras [278] 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 -LT, y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. La suspensión se llevó a una $OD_{600} = 0,5$ y se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10. Se sembraron en placas con medio selectivo -LT como control de crecimiento y -LTH (Yeast Nitrogen Base [YNB] 7,6 g/L, glucosa 20 g/L, suplemento DO -leu -trp -his [Clontech] 0,62 g/L, agar 15 g/L) 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 -LTH se suplementó con 10 mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) para reducir la autoactivación propia de algunas construcciones.

8.3.28 Mutagénesis en semillas de *A. thaliana* con etil-metano-sulfonato (EMS)

Para la mutagénesis de las semillas de *hst-15* con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS), se alicuotaron de 17.000 a 20.000 semillas (equivalente a 300-400 mg de semillas) y se las hidrató con 45 mL de una solución de Tween-20 al 0,005% (v/v) por 2-4 horas en un tubo Falcon de 50 mL en rotación suave. Pasado ese tiempo, las semillas se lavaron 2 veces con 45 mL de agua para remover el detergente. A partir de este punto se trabajó bajo campana de extracción química y en máximas condiciones de seguridad. Se mezclaron 150 μ L de EMS con 350 μ L de agua utilizando una jeringa con aguja hipodérmica 25G generando una emulsión EMS 30% (v/v). Al tubo Falcon de 50 mL conteniendo las semillas en agua, se le adicionó 250 μ L de EMS 30% (v/v) y se llevó a volumen final 50 mL con agua, quedando el EMS en una concentración final del 0,15 % (v/v). Se selló la tapa del tubo con Parafilm, se introdujo el tubo Falcon dentro de una bolsa con cierre hermético, y se incubó durante 16 horas en rotación para mantener a todas las semillas en contacto con la solución. Luego, se descartó la solución de EMS y se realizaron 8 lavados con 45 mL de agua durante 20 min en rotación continua. Luego del último lavado, se resuspendieron las semillas en agar 0,1% (p/v) y se las estratificó por 3 días a 4 °C en oscuridad. Todos los desechos contaminados con EMS, tanto líquidos como sólidos, fueron descontaminados mediante tratamiento con una solución de NaOH 1N durante toda la noche.

Pasados los 3 días de estratificación, las semillas fueron sembradas en tierra con una densidad de aproximadamente 60 semillas por pote (15 cm de largo por 12 cm de ancho) y se las cultivó en cámara hasta que estuvieron listas para la cosecha de sus semillas (alrededor de 60 días). La tasa de mutagénesis, la cual deber ser lo suficientemente alta para garantizar el éxito del experimento, pero no excesiva para evitar causar una letalidad masiva, fue medida observando el porcentaje de plantas que presentan clorosis en mosaico (falta de clorofila como signo de mutación en las vías de biogénesis de este compuesto), porcentaje que comúnmente debe rondar una planta por pote. Luego, se cosechó cada pote por separado, de modo de tener aproximadamente unos 300 grupos de unas 60 plantas cada uno. Con estos grupos de semillas se procedió a realizar el “*suppressor screening*” para aislar plantas mutantes con restauración del fenotipo Col-0.

8.3.29 “*Suppressor screening*” por mutagénesis con EMS

La identificación de plantas mutantes de interés fue realizada por observación de los fenotipos, al compararlo con una planta Col-0 crecida en iguales condiciones. Para el *screening* se sembraron conjuntos (*pooles*) de semillas de unas 60 plantas en tierra, las cuales fueron analizadas fenotípicamente durante todo su desarrollo, descartando aquellas que presentaban fenotipos aberrantes o bien fenotipos análogos a su progenitora *hst-15*. A las plantas seleccionadas como revertantes o parcialmente revertantes, se les extrajo ADN genómico (Sección 7.3.13) y se realizó una PCR (Sección 7.3.5) para evaluar si presentaban la mutación *hst-15* en homocigosis. A su vez, se realizaron ensayos de *Northern blot* (Sección 7.3.22) para evaluar aquellas plantas que podrían presentar niveles restaurados de miRNAs dentro de la progenie mutagenizada. Aquellas plantas mutantes que presentaron homocigosis en la mutación *hst-15* así como niveles total o parcialmente restaurados de miRNAs fueron seleccionadas como mutantes revertantes candidatas a presentar alteraciones en la selección y/o carga de las hebras de miRNAs, el resto fueron catalogadas como mutantes en la biogénesis o acción de miRNAs.

8.3.30 Generación de los grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo

Las plantas mutantes seleccionadas fueron cruzadas con plantas de la línea progenitora (backcross) con el fin de generar los grupos de mapeo para la secuenciación de genoma completo. Una vez alcanzada la segunda filial de semillas, las mismas se sembraron en tierra y se seleccionaron aquellas plantas con el fenotipo revertante de interés. Para el

armado de los grupos de mapeo, se tomaron muestras de aproximadamente unas 300 plantas por cada mutante de interés, y se realizó la extracción de ADN genómico con CTAB, tal como fue previamente descrito en la Sección 8.4.13.

El armado de las bibliotecas genómicas y su posterior secuenciación fueron realizadas por el Dr. Damián Cambiagno, miembro de nuestro laboratorio, en las instalaciones del laboratorio del Dr. Detlef Weigel, en el Instituto Max-Planck de Biología del Desarrollo en Tübingen, Alemania. Las bibliotecas se prepararon de la siguiente manera: 1-10 ng del ADN genómico se mezclaron con 10 μL de transposomas Tn5 (expresada y purificada según lo descrito por Picelli y colaboradores [256]) inmovilizadas en *beads* paramagnéticas con Streptavidina (New England Biolabs), 4 μL de solución 5X TAPS-DMF MgCl_2 (50 mM TAPS; 25 mM MgCl_2 ; 50% DMF [v/v]), y se llevó a volumen final 20 μL con H_2O miliQ estéril. La mezcla fue incubada por 10 min a 55 °C, mezclando para resuspender las *beads* magnéticas pasados los primeros 5 min de incubación. Inmediatamente pasados los 10 min, se colocó cada muestra en hielo. Luego de la tagmentación, se eliminó la transposasa Tn5 del ADN utilizando 25 μL de solución de lavado con SDS 0,6% (p/v), e incubando a 55°C por 5 min. Luego se lavaron las *beads* dos veces con 125 μL de solución de lavado (30 mM Tris pH 8; 50 mM NaCl; 0,1% Tween-20 [v/v]) en un soporte magnético para retener las *beads*. A continuación, se realizó la amplificación por PCR y extensión de adaptadores adicionando 5 μL de la solución de reacción Q5 5X, 2,5 μL de dNTPs 2 mM, 0,75 μL del P5 primer S5 10M, 7,5 μL del P7 primer N7 1M, 0,25 μL de Q5 high-fidelity DNA polymerase (M0491, New England BioLabs) y H_2O miliQ estéril hasta un volumen final de 25 μL por reacción, seguido del siguiente programa de termociclado: 5 min a 72 °C, 30 s a 98 °C, seguido de 8 ciclos de desnaturalización (15 s a 98 °C), anillado (20 s a 65 °C), y extensión (90 s a 72 °C), con un paso final de 5 min a 72 °C. Los fragmentos obtenidos de los productos de PCR fueron seleccionados con el kit HighPrep beads (MagBio Genomics). Finalmente, las bibliotecas fueron secuenciadas en un equipo Illumina HiSeq3000 (Illumina, San Diego, CA, USA).

8.3.31 Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación

Un total de nueve conjuntos (*pools*) de plantas procedentes de la retrocruza con el genotipo *hst-15* fueron secuenciadas, además del parental *hst-15*. Se hizo una secuenciación de lecturas pareadas de 150 bases por lectura, obteniéndose en promedio un total de 72 millones de pares de lecturas por conjunto y 25 millones para la línea parental.

El análisis bioinformático se realizó comenzando por eliminar bases de mala calidad del extremo 3' de las lecturas con el programa trimmomatic [279], quedando en promedio lecturas de 130 bases. Luego se mapearon al genoma de *Arabidopsis thaliana* usando bowtie2 [280], obteniéndose porcentajes promedio de mapeo superiores al 90% de las lecturas. Los mapeos de múltiples líneas (*lanes*) fueron combinados y se determinaron las variantes genómicas en los conjuntos haciendo un análisis de apilamiento de lecturas con samtools y bcftools (versión 0.1.19 compatible con SHORE, [281]). A continuación, se utilizó el programa SHOREmap (versión 3.6, [282],[283]) para identificar variantes candidato a explicar el fenotipo de las plantas. Las variantes de los conjuntos se contrastaron con las variantes presentes en la línea *hst-15* usando *SHOREmap backcross* con un qscore mínimo de 25 y se seleccionaron las variantes con una frecuencia alélica mayor a 0.9. Finalmente, las variantes fueron anotadas con *SHOREmap annotate* para identificar los genes afectados y el potencial efecto de la mutación.

Tabla 3. Construcciones utilizadas. Todas se basan en vectores pGREEN y confieren resistencia a Basta o kanamicina en plantas.

Nombre	Transgen	Descripción	Referencia
pDG035	35S:HWS	Promotor 35S (Pro35S) dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i>	Este trabajo
pDG036	35S::HWSΔFbox	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> sin su dominio F-Box (<i>HWSΔF-box</i>)	Este trabajo
pDG046	35S::HST15	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína <i>HST15</i>	Este trabajo
pPM442	35S::HYL1	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i>	[190]
pDG042	35S::HWS:mCherry	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada a <i>mCherry</i> en su	Este trabajo

		dominio C-terminal	
pDG043	35S::HWS Δ Fbox:mCherry	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionada a <i>mCherry</i> en su dominio C-terminal	Este trabajo
pDG045	35S::HST15:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína <i>HST15</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio C-terminal	Este trabajo
pMC021	35S:Citrina:HWS	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada a <i>mCitrina</i> en su dominio N-terminal	[266]
pMC039	35S:HWS Δ Fbox:Citrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionada a <i>mCitrina</i> en su dominio N-terminal	[266]
pDC056	35S::eGFP:HST	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HST</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	[174]
pDC103	35S::eGFP:HST Δ C	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HST</i> sin su dominio C-terminal (<i>HST-ΔC</i>) fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	[174]

pDC186	35S::MED37D:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37D</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio C-terminal	[174]
pDC187	35S::MED37E:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37E</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio C-terminal	[174]
pPM082	35S::eGFP:HYL1	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	[190]
pDG029	35S::HWS:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Este trabajo
pDG030	35S::HWSΔFbox:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Este trabajo
pDG031	35S::HWS- N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Este trabajo
pDG032	35S::HWSΔFbox:N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del	Este trabajo

		ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	
pDG044	35S:: <i>HST15-N-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína <i>HST15</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i>	Este trabajo
pDC087	35S:: <i>HASTY:N-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HST</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pDC090	35S:: <i>DCL1:C-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>DCL1</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pDC180	35S:: <i>MED37D:C-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37D</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pDC182	35S:: <i>MED37E:C-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37E</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pDC183	35S:: <i>IMPA2:C-mCitrine</i>	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>IMPA2</i> fusionada al dominio C-	[174]

pAT26	35S:CARP9:N-mCitrine	terminal de <i>m-Citrina</i> . Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[242]
pAT27	35S:CARP9:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[242]
pAG59	35S:MED17:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED17</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pAG60	35S:MED20:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED20</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	[174]
pMC009	ProADH1::GAL4AD:HWS	ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4 (AD)</i> para ensayo de doble híbrido en levaduras.	[266]
pMC042	ProADH1::GAL4AD:HWS Δ F-box	ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4 (AD)</i> para	[266]

pAG56	ProADH1::GAL4BD:MED18	ensayo de doble híbrido en levaduras. ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED18</i> fusionado al dominio de unión de <i>GAL4 (BD)</i> para ensayo de doble híbrido en levaduras.	[174]
pAG57	ProADH1::GAL4BD:MED20	ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED20</i> fusionado al dominio de unión de <i>GAL4 (BD)</i> para ensayo de doble híbrido en levaduras.	[174]
pAG58	ProADH1::GAL4BD:MED37D	ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37D</i> fusionado al dominio de unión de <i>GAL4 (BD)</i> para ensayo de doble híbrido en levaduras.	[174]

Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas utilizadas.

Gen/ miRNA	Secuencia	Utilizado para
miR156a-5'DIG	TGTGCTCACTCTCTTCTGTCA	ARN blot
miR165ab-3'DIG	GGGGGATGAAGCCTGGTCCGA	ARN blot
miR166a-g	GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA	ARN blot
miR171	GAT ATT GGC GCG GCT CAA TC	ARN blot
miR319a	GGG AGC TCC CTT CAG TCC AA	ARN blot
U6	GCT AAT CTT CTC TGT ATC GTT CC	ARN blot
ACTINA	F: GGAGATCCACATCTGCTGGAATG	q-PCR
	R:TTTCATGTGAAAGGAGGATGAAGG	q-PCR
HST	F: TGTTCTCGGCAGTCATTCGT	q-PCR
	R: GCAAGTCGTTGGGAGTGAGA	q-PCR
HWS	F: CGCGAGTAGTGGCACGGATG	q-PCR
	R: GTAGTAACAGGACATTTCTGAG	q-PCR

SUC2	F: TAGCCATTGTCGTCCCTCA	q-PCR
	R: CCTAACACAAATGCTGGAATGT	q-PCR
ATML1	F: GAGGAGGAGGAGGTAGTGCT	q-PCR
	R: TGTGAGTAGTGAACCGCCAC	q-PCR
MIR160	F: TGGTATGCCTGGCTCCCTGT	q-PCR
	R: GTGCAGGGTCCGAGGT	q-PCR
GFP	F: GTCCTGCTGGAGTTCGTGACC	q-PCR
	R: CTTGTACAGCTCGTCCATGCC	q-PCR
hst-6	F: TTGCTAATGCAAGCGAGAATTGG	Genotipado
	R: CATAACAGCTTCACTCATTGCAG	Genotipado
hst-6 MUT	R: CAGCAGACTGACTCTTAAGAGGA	Genotipado
hws-35 WT	F: TGCAGATCACACTCTCGTTCCT	Genotipado
	R: GTCTTATCCGGATGGAGAGGAG	Genotipado
hws-35 mut	F: TGCAGATCACACTCTCGTTCCT	Genotipado
	R: TACACGGCAATGTCTACCTCCG	Genotipado
hst-15 WT	F: CCTGGAAATGTGGACATGCTTAG	Genotipado
	R: GAAAAATCAAATGATCAATGCAAGG	Genotipado
hws-1	F: CTCTACCCTATCCCTTTTATAAC	Genotipado
	R: TACACGGCAATGTCTACCTCCG	Genotipado
hws-3 MUT	F: CTTGGTACTTCATGTTCACTAC	Genotipado
	R: TGCTTGTTTCGCTCGGTTTAA	Genotipado
hws-3 WT	F: TACACGGCAATGTCTACCTCCG	Genotipado
	R: TCAGAGCTGTAGAGATGAATAGAG	Genotipado
HST15 fragmento 1 (cDNA)	F: AATTTACTATTCTAGTCGACCTGCAGGCGGATG	PCR
	GAAGATAGCAACTCCAC	<i>overlapping</i>
	R: TACTAGTAGCTGGATCCTTCACAACGTGTGGAAGAG	PCR
HST15 fragmento 1 (ADNg)	F: TCCACACGTTGTGAAGGATCCAGCTACTAGTACATC	PCR
	R: GCGGACTCTAGCATGGCCGCGGGATATCATCAAACAA	<i>overlapping</i>
	TTCTCCAACGTTTAC	PCR
HST15	F: CAACAATTCTCCAACGTTTACTG	<i>overlapping</i>
	R: CACCATGGAAGATAGCAACTCCACGG	Clonado
HWS/HWSFBOX	F: CCCGGATCCATGGAAGCAGAAACGTCTTG	Clonado
	R: CCCC GCGGCCGCAGGAGCAATCTCGAGTCTTG	Clonado

8.4 Resultados y discusión

8.4.1 Identificación de plantas mutantes capaces de suprimir el fenotipo *hst-15*

Las técnicas de supresión por mutagénesis (comúnmente conocidas como “*suppressor genetic screening*”) son poderosos métodos genéticos para estudiar las funciones y vías moleculares en las que participa un gen. Estas técnicas se basan en la supresión o atenuación del fenotipo causado por una mutación conocida como consecuencia de una segunda mutación en otra parte del genoma. La mutación causal de dicha reversión del fenotipo puede ser una mutación compensatoria en el mismo gen o estar presente en otra parte del genoma, por ejemplo, en alguna proteína que interactúe y/o ejerza un efecto inhibitorio sobre la proteína en estudio. Para abordar el estudio de la función de HST desde una perspectiva genética, decidimos realizar un “*suppressor genetic screening*” utilizando plantas mutantes en el gen que codifica esta proteína, particularmente el alelo *hst-15* que presenta una inserción por T-DNA en el exón 17 de *HST* y un fenotipo fácilmente reconocible. Las plantas mutantes *hst-15*, presentan alteraciones en el desarrollo del carpelo produciendo flores con estigma expandido, carpelos no fusionados y óvulos expuestos, lo que conduce a una caída abrupta en su fertilidad [249]. Como objetivo de este *screening*, decidimos seleccionar aquellas mutantes que fueran capaces de revertir el fenotipo inicial ya sea total o parcialmente (de aquí en adelante llamadas "revertantes"). Las mismas deben presentar además de la mutación *hst-15*, una mutación adicional que sea la encargada de la reversión (Figura 19).

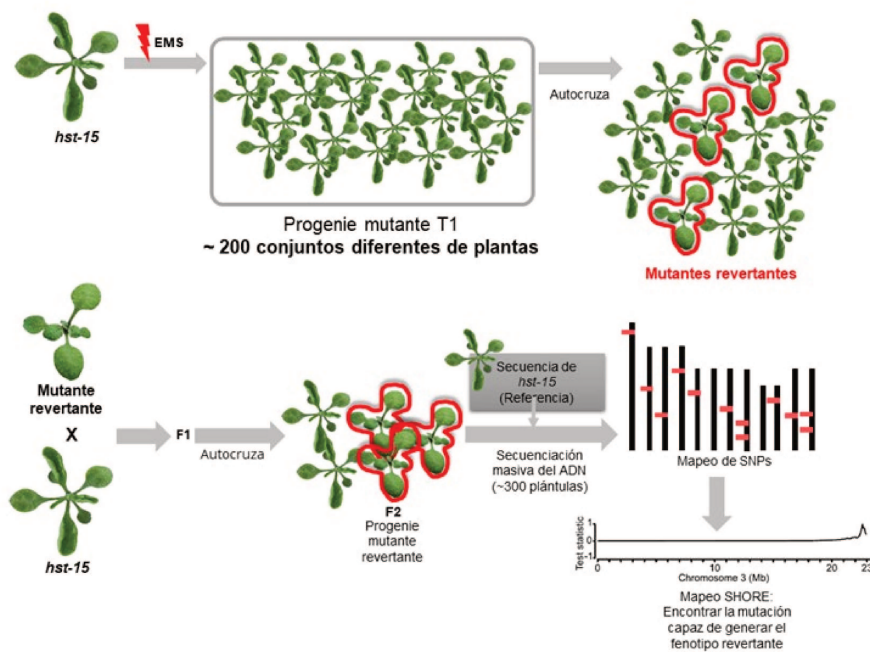


Figura 19. Esquema representativo del diseño experimental del “Suppressor screening” realizado. El mismo se basa en el fenotipo mutante de *hst-15* y se buscan en la progenie mutagenizada aquellas plantas que fueron capaces de revertirlo. En una primera etapa (panel superior), se generan las mutantes y en una segunda etapa (panel inferior), se trata de localizar aquella mutación adicional que fue la encargada de revertir el fenotipo de la mutante progenitora usando la aproximación de mapeo SHORE de genoma completo [282]. **SNPs:** Polimorfismos de Nucleótido Único, del inglés *Single-Nucleotide Polymorphisms* (Figura modificada de [284]).

Para realizar este *screening*, se tomaron ~20.000 semillas de mutantes *hst-15* y se las incubó durante 12 horas al agente mutagenizante metanosulfonato de etilo (EMS) como se describe en la sección materiales y métodos. Las semillas mutagenizadas, fueron sembradas en macetas individuales con unas 50 semillas por pote para generar grupos de mapeo. Muchas de las semillas, abortan o no producen descendencia debido al proceso de mutagénesis por lo que, en la práctica, los grupos de mapeo provienen de un número menor de plantas de las sembradas. Producto de este *screening*, se obtuvieron 192 grupos cosechados independientemente. Dada la capacidad de *A. thaliana* de autofecundarse, un cuarto de las mutaciones generadas por el EMS se estabiliza en homocigosis en la primera generación de semillas, la mitad permanecen en heterocigosis y el cuarto restante se pierden. A fin de buscar plantas cuyas nuevas mutaciones reviertan el fenotipo de *hst-15*, sembramos unas ~2000 semillas de cada uno de estos grupos. La evaluación fenotípica de todas las plantas germinadas, mostró que la mayoría de los grupos de mutantes evaluados presentaron plántulas con diferentes niveles de reversión del fenotipo *hst-15*.

En la figura 20A, se muestran algunas de las plantas que fueron aisladas para ser estudiadas en detalle. Se observa que, algunas de ellas, presentan una atenuación parcial del fenotipo, otras tienen fenotipo *hst-15* en etapas más avanzadas de su desarrollo, mientras que otras tienen una reversión casi total en todos los estadios, siendo muy similares a una planta salvaje (Col-0).

Para seleccionar aquellas mutantes de mayor interés, a los fines de reducir la cantidad de mutantes a analizar, se usaron algunos criterios de filtrado. Además del análisis fenotípico de las plantas, se realizaron genotipados para corroborar que la mutación en *hst-15* se encuentre en homocigosis y se midieron los niveles de distintos miRNAs mediante *Northern blots*. Varias de las plantas que habían restaurado el fenotipo de una planta salvaje, mostraban a su vez niveles de miRNAs similares al del ecotipo Col-0, por lo tanto, resultaron interesantes para su posterior análisis (Figura 20B).

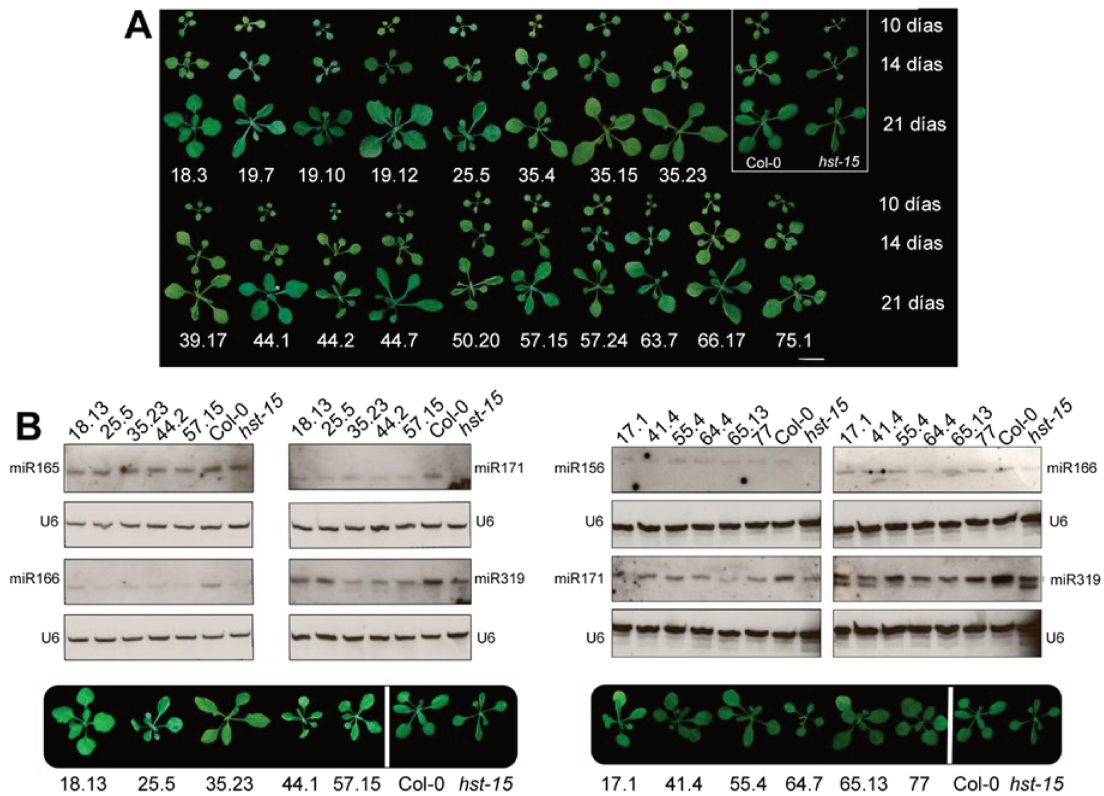


Figura 20. Análisis fenotípico de las mutantes obtenidas luego del screening. (A) Fenotipo de plántulas revertantes de 10, 14 y 21 días posteriores a su germinación. **(B)** Ensayos de *Northern blot* evaluando los niveles de miRNAs de distintas plántulas revertantes de 14 días. U6 se utilizó como control interno. En la parte inferior se observan los fenotipos correspondientes ordenados como fueron analizadas por *Northern blots*.

En la Figura 21A se muestran las mutantes seleccionadas, y se aprecia como en todos los casos revierten considerablemente el fenotipo de la mutante progenitora *hst-15*. Para encontrar las mutaciones causales de la reversión del fenotipo, se cruzaron las plantas mutantes con plantas *hst-15* a fin de obtener plantas 100% heterocigotas para todas las mutaciones generadas y, por lo tanto, con fenotipo *hst-15*. Nuevamente, a estas plantas se las dejó autofecundar y se colectaron ~300 plantas que nuevamente presentaban reversión del fenotipo. De este modo, no solo se eliminaron un 25% de las mutaciones no relacionadas, sino que también se generó variabilidad en la heterocigosis del resto de los *loci* mutados en la población obtenida. Posteriormente, se extrajo ADN genómico de conjuntos (pool) de 300 plantas colectadas para cada grupo de mapeo y, se re-secuenció el genoma completo de la muestra como si se tratara de una muestra de un solo individuo. Las lecturas obtenidas, se compararon contra el genoma de la línea parental no mutada en busca de nuevos SNPs e inserciones-delecciones (*indels*). Dado el efecto azaroso de la recombinación homóloga de cromosomas durante la

gametogénesis producida en la cruce realizada, todas las mutaciones en el pool secuenciado tendrán una frecuencia esperada de 0.5 dado que puede haber heredado la copia salvaje o mutante del alelo. Sin embargo, en la región donde se encuentre la mutación que causa la reversión del fenotipo, la frecuencia (coverage) alélica será de 1 dado que las 300 plantas seleccionadas solo incluyeron aquellas plantas con reversión de fenotipo. Por lo tanto, la posición de los SNPs causales y su frecuencia alélica, pueden ser utilizados eficientemente como marcadores para identificar la mutación que genera el fenotipo en estudio [282].

Los resultados resumidos se muestran en la Figura 20B. Dentro de las mutantes secuenciadas, se seleccionaron para su posterior estudio aquellas que presentaron mutaciones en regiones codificantes o sitios de *splicing*, descartándose aquellas con mutaciones en intrones o regiones intergénicas, dado que es más difícil predecir el impacto sobre la expresión del gen.

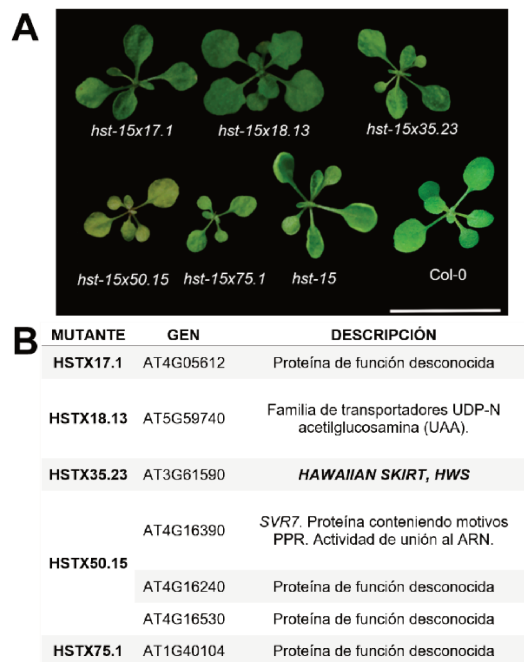


Figura 21. Resumen de las mutantes de interés aisladas del screening.

A. Fenotipo de plántulas de 14 días de la segunda filial de las retrocruzas entre las distintas mutantes revertantes obtenidas con su progenitora *hst-15*. **B.** Tabla que muestra el/los genes mutantes candidatos a causar la reversión del fenotipo en algunas de las mutantes que fueron secuenciadas. Los códigos de los genes correspondientes se muestran en la columna GEN y en la columna DESCRIPCIÓN, se encuentra una breve reseña de cada uno de ellos. Algunos de los genes que aparecen no fueron reportados previamente, por lo tanto, se indican como “Proteína de función desconocida”.

8.4.2 Una mutación en HWS es capaz de revertir el fenotipo de la mutante *hst-15*

Para nuestra sorpresa, el mapeo SHORE de la línea doble mutante *hst-15/35.23*, reveló una mutación puntual en el gen que codifica para la proteína HAWAIIAN SKIRT (AT3G61590). Dicha mutación, de aquí en adelante denominada *hst-15/hws-35*, consiste en el cambio de un nucleótido G por A, causando la modificación del aminoácido de Glicina (G) ubicado en la posición 238 por un aminoácido de Arginina (R) (Figura 22A). Esto podría potencialmente resultar en una alteración en el comportamiento de la proteína mutante resultante, al pasar de un aminoácido neutro (G) a un aminoácido cargado positivamente (R). El fenotipo de la doble mutante es similar al de una planta salvaje (Figura 22B). Lo sorprendente de este hallazgo radica en que, como describimos en la introducción, una mutación en *HST* es capaz de suprimir el fenotipo de *HWS*. Esto plantea un escenario único donde dos genes son capaces de interactuar suprimiendo mutuamente los fenotipos causados por las mutaciones individuales de cada uno de ellos.

En primer lugar, y para corroborar que la mutación en *HWS* es la causante de la reversión del fenotipo, realizamos la transformación de la doble mutante *hst-15/hws-35* con una construcción que contiene una copia salvaje del ADN copia (ADNc) del gen *HWS* bajo el promotor constitutivo 35S (*35S::HWS*). Las plantas transgénicas resultantes, nuevamente presentan el fenotipo típico de la mutante progenitora *hst-15* siendo incluso más marcado que el de la mutante original (Figura 22B, C). Este resultado, confirma que *HWS* es el gen responsable de la reversión fenotípica observada en la doble mutante. Por otro lado, al transformar las dobles mutantes con el ADNc de una versión de *HWS* sin su dominio F-Box (*35S::HWS Δ FBox*), no fue suficiente para causar la reversión al fenotipo *hst-15* (Figura 22B, C), sugiriendo un posible rol de este dominio en la regulación de HST por parte de HWS. Para descartar que la reversión del fenotipo de *hst-15* esté influenciada por mutaciones secundarias causadas por el EMS, realizamos cruza de plantas *hst-15* con las mutantes por inserción de T-DNA *hws-3* y *hws-5*. Al igual que el alelo *hsw-35* obtenido en nuestro *screening*, estas otras dos mutantes también fueron capaces de restaurar al fenotipo salvaje (Figura 23A), así como restaurar los niveles de miRNAs (Figura 23B), confirmando el efecto regulatorio de HWS sobre HST.

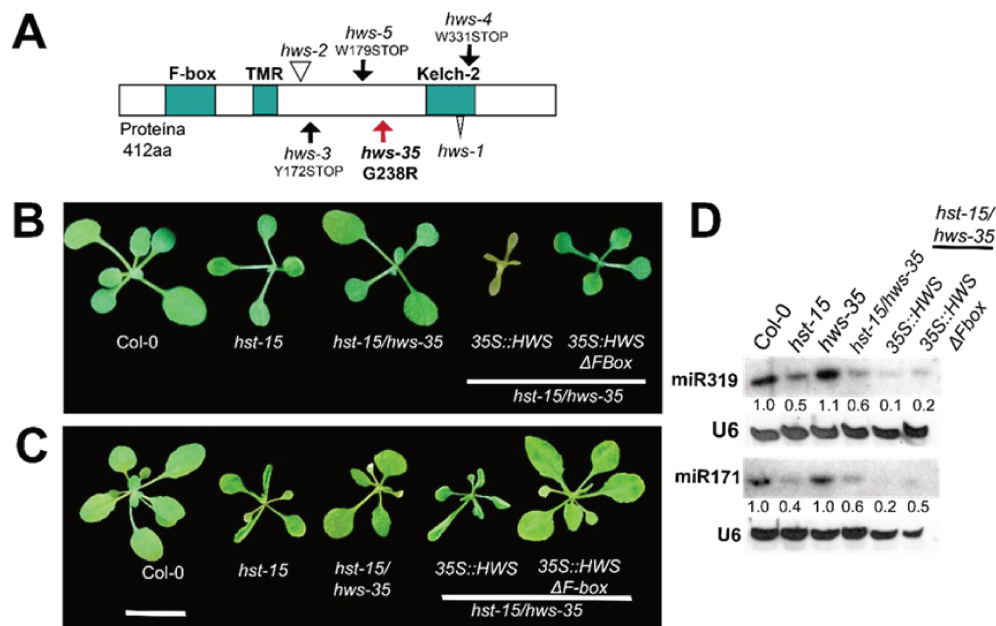


Figura 22. Una mutación en *HWS* es capaz de revertir el fenotipo de *hst-15*. (A) Esquema del gen que codifica para la proteína HWS. En verde se marcan los dominios conocidos de la misma. Los triángulos muestran las posiciones de mutantes por inserción, las flechas negras muestran la posición de otros alelos mutantes *hws*, y la flecha roja muestra la localización de la mutación obtenida en nuestro *screening*. (B) Fenotipos de plantas de 14 días Col-0, *hst-15*, la doble mutante del *screening* *hst-15/hws-35*, y la mutante *hws-3/hst-15* complementada con una copia completa del ADN copia de HWS y con la versión sin su dominio F-Box (*HWSΔFBox*). (C) Fenotipo de las mismas plantas en B, 21 días post germinación. (D) Ensayos de *Northern blot* de las plantas que se muestran en el panel B. U6 se utilizó como control interno. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando ImageJ y expresado en relación con la fracción de ARN correspondiente de las plantas Col-0.

8.4.3 HWS regula negativamente la biogénesis de miRNAs y tendría un efecto indirecto sobre HST

La observación que la mutación del gen que codifica a HWS es capaz de revertir el fenotipo de mutantes *hst* causado por los bajos niveles de miRNAs, junto con los reportes que muestran que mutantes *hws* también son capaces de revertir los fenotipos causados por la remoción de miRNAs ocasionada por “target mimicry” [266],[267], sugieren que esta proteína en condiciones salvajes tiene un efecto negativo sobre la producción de miRNAs. De esta manera, un aumento en la producción de miRNAs en mutantes *hws* podría compensar los defectos causados por la reducción de miRNAs

tanto en las mutantes *hst* como en las líneas MIM. Teniendo en cuenta que HWS es una proteína del tipo F-Box, sería factible especular que marque proteínas de la biogénesis de miRNAs para su degradación y así, en su ausencia, la producción de miRNAs aumente. Estudios anteriores, fallaron en detectar algún efecto de HWS sobre la estabilidad de AGO1, DCL1 o HYL1 [266]. Sin embargo, los resultados de nuestro *screening*, traen la posibilidad que HWS regule directamente la estabilidad de HST o de alguna de las proteínas que encontramos asociadas a ella [174]. En este escenario, una disminución en los niveles de HWS en las dobles mutantes *hst-15/hws-35* podría causar un aumento de la estabilidad de HST y revertir el efecto de su mutación. Sin embargo, esta posibilidad solo es viable si el alelo mutante *hst-15* es hipomórfico, y produce una proteína al menos parcialmente funcional. Para evaluar esta posibilidad decidimos, en primera instancia, estudiar el producto del alelo *hst-15*, al que llamaremos de aquí en adelante HST15.

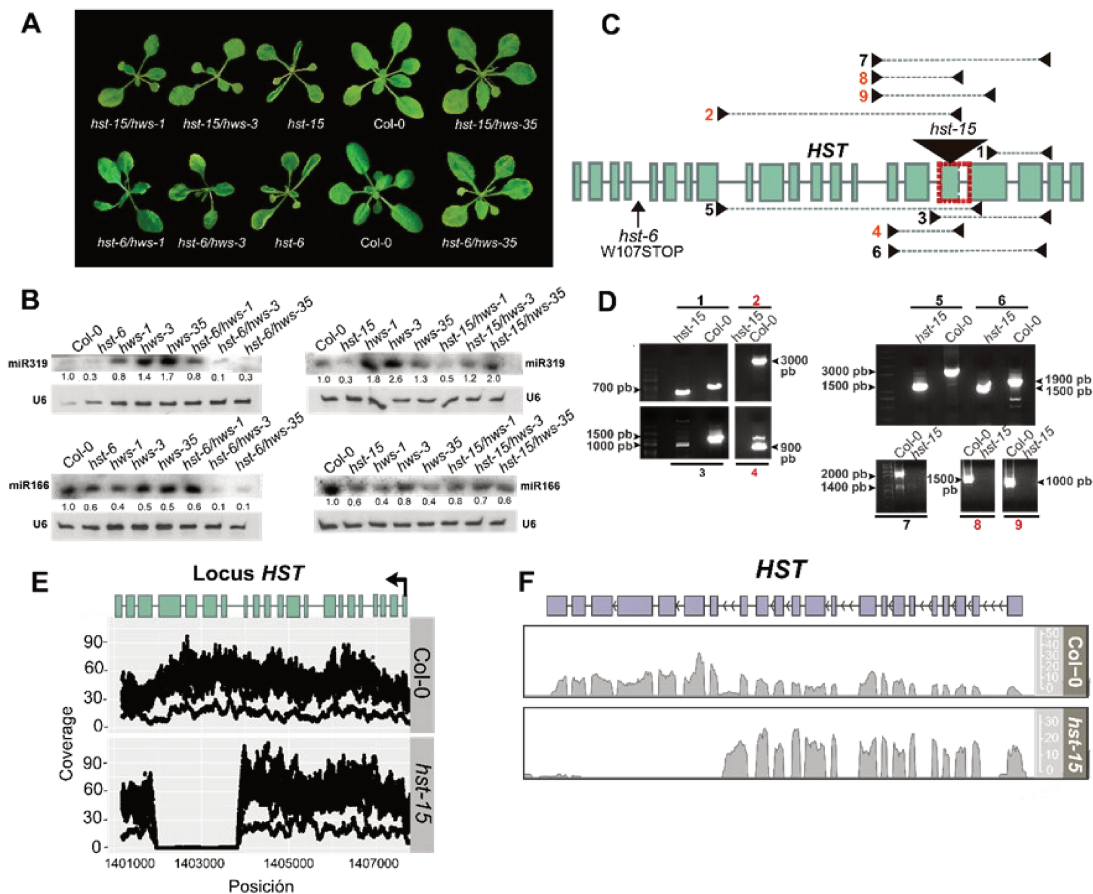


Figura 23. La mutante *hst-15* perdió su T-DNA llevándose parte del ADN genómico de *HST*. (A) Fenotipo de plántulas de 10 días post germinación de las cruces entre *hws-1* y *hws-3* con *hst-15* (panel superior) y *hws-1* y *hws-3* con *hst-6* (panel inferior). (B) Ensayos de Northern blot de las plantas que se muestran en la figura A. U6 se utilizó como control interno. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando ImageJ y expresado en relación con

la fracción de ARN correspondiente de las plantas Col-0. **(C)** Esquema del gen que codifica para la proteína HST. Los rectángulos verdes corresponden a los exones mientras que las líneas grises representan los intrones. Se muestra la localización de la inserción del T-DNA que posee la mutante *hst-15* (Triángulo negro) mientras que la flecha negra vertical muestra la localización de la mutación puntual que posee el alelo mutante *hst-6*. Las líneas numeradas ubicadas entre triángulos, corresponden a los productos de amplificación obtenidos a partir de PCRs realizadas sobre ADN genómico de *hst-15* y Col-0. En negro se denotan los productos amplificados en *hst-15* y en Col-0, mientras que en rojo aquellos que no se amplificaron en *hst-15*. El rectángulo en rojo con línea de puntos, corresponde a la región faltante en el ADN genómico de *hst-15*. **(D)** Productos de las PCR denotadas en C a partir de ADN genómico de plantas Col-0 y mutantes *hst-15*. Se indican los tamaños (en pb) correspondientes de los productos obtenidos en *hst-15* y en Col-0. Los números en negro, indican los productos que fueron amplificados tanto en Col-0 como en *hst-15* mientras que los números rojos indican aquellos productos que no se amplificaron en *hst-15*. **(E)** Lecturas provenientes del análisis de secuenciación masiva del ADN genómico de plantas Col-0 (Panel superior) y mutantes *hst-15* mapeadas sobre el *locus* que codifica a la proteína HST. **(F)** Alineamientos de las lecturas de secuenciación masiva de ARNs mensajeros de plantas Col-0 comparadas con mutantes *hst-15*. En la parte superior se muestran los exones e intrones del *locus HST*, en los paneles inferiores se muestran los picos correspondientes a los exones.

El alelo mutante usado en el *screening*, *hst-15*, está causado por una inserción de un T-DNA en el exón 17 de *HST* (Figura 23C). Las mutaciones por T-DNA, suelen tener una frecuencia alta de duplicaciones o transposiciones produciendo la eliminación del T-DNA, muchas veces acompañado de parte del gen. Llamativamente, PCRs diseñadas para detectar la inserción de T-DNA en el gen *HST* fallaban en amplificar el fragmento insertado en el genoma (Figura 22D). Este resultado nos indica que, a pesar de haber sido generada por una inserción de T-DNA, el alelo *hst-15* ha perdido dicha inserción, aunque retiene su naturaleza mutante (Figura 23C, D). Afortunadamente, y producto de las múltiples secuenciaciones del genoma de *hst-15* realizadas durante el *screening*, contamos con una elevada cobertura de secuencias sobre el *locus* de *HST*, lo que nos permitió evaluar que efecto que la inserción del T-DNA causó en el *locus* de *HST*. El alineamiento de estas lecturas sobre el genoma de *A. thaliana*, no solo confirmó que la mutante *hst-15* perdió la inserción de T-DNA en el *locus HST*, sino que además durante esta escisión se perdió parte de la región codificante del gen *HST* (Figura 23E). Cuando cotejamos esta información con librerías de secuenciación de ARNs mensajeros de la mutante *hst-15* [174], observamos que la "cicatriz" dejada tras la eliminación del T-DNA induce un evento de *splicing* alternativo luego del exón 15, reteniendo parte del intrón 16, lo que causa la incorporación de un codón de terminación prematuro 21 nt luego del

exón 15. Esto, convierte a HST15 en una versión trunca de la proteína salvaje, y a la mutante *hst-15* en un potencial alelo hipomórfico (Figura 23F). La proteína resultante de unos 600 aminoácidos, tiene aproximadamente la mitad del tamaño de la proteína salvaje, pero no por ello es necesariamente disfuncional. Tal como fue recientemente reportado, la función de HST en la biogénesis de miRNAs mediando la interacción entre DCL1 y MED37D/E solo requiere el extremo N-terminal de HST [174]. Esto implica que, dado que HST15 presenta una delección hacia el extremo C-terminal, podría ser posible que esta versión sea parcialmente funcional al menos en la vía de miRNAs.

Para analizar esta posibilidad, tomamos distintas versiones truncadas del ADNc de HST (Figura 24A), incluyendo la versión HST15, y con esas construcciones transformamos en forma estable mutantes *hst-15* y *hst-6* para explorar su capacidad de revertir el fenotipo causado por la caída de los miRNAs. El alelo *hst-6* posee un codón de terminación prematuro al inicio de la región codificante (Figura 23C), generando una proteína trunca de solo 107 aminoácidos [249]. Observamos que la sobre-expresión de todas las versiones de HST, fueron capaces de restaurar el fenotipo de las mutantes *hst* (Figura 24B), así como también los niveles de miRNAs en comparación con las mutantes (Figura 24C). Este resultado, no solo confirma que la región N-Terminal de HST es suficiente para su función en la vía de miRNAs, sino también que *hst-15* es un alelo hipomórfico que produce una proteína parcialmente funcional.

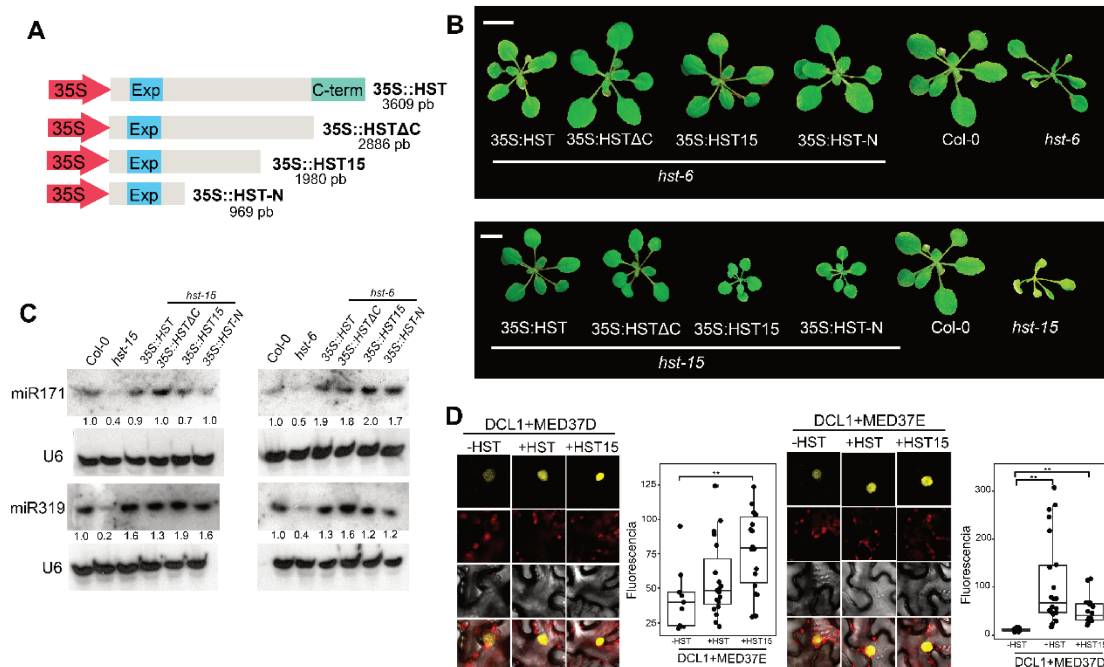


Figura 24. *hst-15* es un alelo hipomórfico. (A) Esquema de distintas construcciones que consisten en versiones truncadas del ADNc de *HST* incluyendo su versión completa (35S::HST)

junto con otras sin su dominio C-terminal ($35S::HST\Delta C$), el alelo HST15 ($35S::HST15$) y un segmento que abarca solamente el dominio N-terminal de la proteína ($35S::HST-N$). Las mismas fueron utilizadas para transformar plantas mutantes *hst-6* y *hst-15*. **(B)** Fenotipo de plántulas de 20 días transformadas con las construcciones especificadas en E. En el panel superior se observan las mutantes *hst-6* complementadas mientras que en el panel inferior se observan las plantas de *hst-15* complementadas. **(C)** Ensayos de *Northern blot* de las plantas que se muestran en B. U6 se utilizó como control interno. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando ImageJ y se expresaron en relación con la fracción de ARN correspondiente de las plantas Col-0. **(D)** Ensayos de TriFC que muestra la interacción DCL1-MED37-D y DCL1-MED37-E en hojas de *N. benthamiana* en presencia o ausencia de HST y HST15, respectivamente. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada mediante el software ImageJ y fue expresada en relación a la intensidad de fluorescencia del “background” (ruido de fondo). Las barras de error muestran 2x EEM y los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron significativos.

Adicionalmente decidimos evaluar si, al igual que HST [174], HST15 es capaz de interactuar con DCL1 y MED37 actuando como andamio estabilizando dicho complejo. Para ello, realizamos ensayos de Complementación Trimolecular de la Fluorescencia (**TriFC**, del inglés *Trimolecular Fluorescence Complementation*) expresando DCL1, MED37 y HST15. Apoyando la funcionalidad de HST15, observamos mayor intensidad de fluorescencia cuando co-infiltramos DCL1 y MED37D/E junto con HST15 respecto de la infiltración de DCL1 y MED37D/E (Figura 24D). Esto implica que la versión HST15 también es capaz de estabilizar el complejo DCL1-MED, confirmando con mayor sustento que este alelo es hipomórfico.

Estos hallazgos, sugieren que un potencial aumento de HST15 en las mutantes *hws/hst-15* podría compensar su actividad reducida y explicar la reversión del fenotipo de la doble mutante. Si esta hipótesis es correcta, deberíamos encontrar niveles elevados de HST en mutantes *hws*. Como no contamos con un anticuerpo capaz de reconocer la proteína endógena, clonamos el cDNA de *HST* fusionado a la proteína fluorescente GFP y transformamos plantas salvajes y mutantes *hws*. Con las plantas obtenidas, realizamos ensayos de *Western blot* para detectar los niveles de HST en los distintos genotipos. Contrario a lo que dictaba nuestra hipótesis, no fuimos capaces de detectar cambios en los niveles de HST en mutantes *hws* (Figura 25A). También refutando nuestra hipótesis, observamos que la mutación en *hws* es igualmente capaz de revertir el fenotipo de mutantes *hst-6*, alelo que se considera nulo [249] (Figura 22A). Todos estos resultados, en su conjunto, nos indicarían que HWS no actúa en forma directa sobre la estabilidad de HST, sino que podría estar ejerciendo su efecto sobre alguna de

las proteínas que fueron recientemente vinculadas con HST.

8.4.4 HWS interactúa con las proteínas MED promoviendo su degradación en los *loci* específicos de los genes *MIR*

Aun cuando nuestros resultados parecen indicar que HWS no es capaz de regular directamente la estabilidad de HST, es posible afecte su función al regular la homeostasis de algunas de sus proteínas asociadas. Llamativamente, el análisis de resultados publicados de ensayos de inmunoprecipitación de HWS seguidos de espectrometría de masas (**IP-MS**, del inglés *Immunoprecipitation and Mass Spectrometry*) [266] muestran que HWS, además de interactuar con proteínas que forman parte del complejo SCF, es capaz de interactuar con proteínas recientemente relacionadas con HST, como lo son MED37D/E, RAN1 e IMPA2 [174]. Para corroborar esta interacción, realizamos ensayos de BiFC en plantas de tabaco. Curiosamente, encontramos que la versión de HWS sin su dominio F-Box es capaz de interactuar al menos con los cofactores de HST MED37D/E y MED20 mientras que la versión completa de HWS no interactúa o lo hace con menor intensidad (Figura 25B). Estos resultados, sugieren que HWS podría estar degradando a las proteínas que interactúan con HST, sin afectar a ésta última directamente. Se sabe que el dominio F-Box de esta familia de proteínas es el encargado de interactuar con el complejo SCF, que finalmente marca a la proteína blanco para su degradación. Esto lleva a que la interacción entre proteínas F-Box y sus blancos sea transitoria en presencia del dominio F-Box, haciendo dificultosa la detección de estas interacciones. Esto podría explicar por qué la versión completa de HWS, pero no aquella sin su dominio F-Box, falla en complementar la fluorescencia en los ensayos de BiFC. En este sentido, la proteína HWS Δ F-Box falla en ubiquitinar a sus proteínas blanco, estabilizando la interacción.

Por otro lado, el hecho que se observe complementación de la fluorescencia, no necesariamente implica que las proteínas involucradas interaccionen directamente, sino que pueden hacerlo de forma indirecta, por ejemplo, al formar parte del mismo complejo proteico. Para evaluar si la interacción entre estas proteínas y HWS es directa, realizamos un ensayo de doble híbrido en levaduras. Apoyando la idea de que HWS podría estar regulando a cofactores de HST, observamos que HWS Δ F-Box es capaz de interactuar en forma directa con MED37D y MED20 pero no con HST (Figura 25C). La menor interacción entre estas proteínas y la versión salvaje de HWS respecto a HWS Δ F-Box, replican lo observado en los ensayos de BiFC y son esperables dado que el complejo SCF en levaduras es homólogo al de plantas [285],[286].

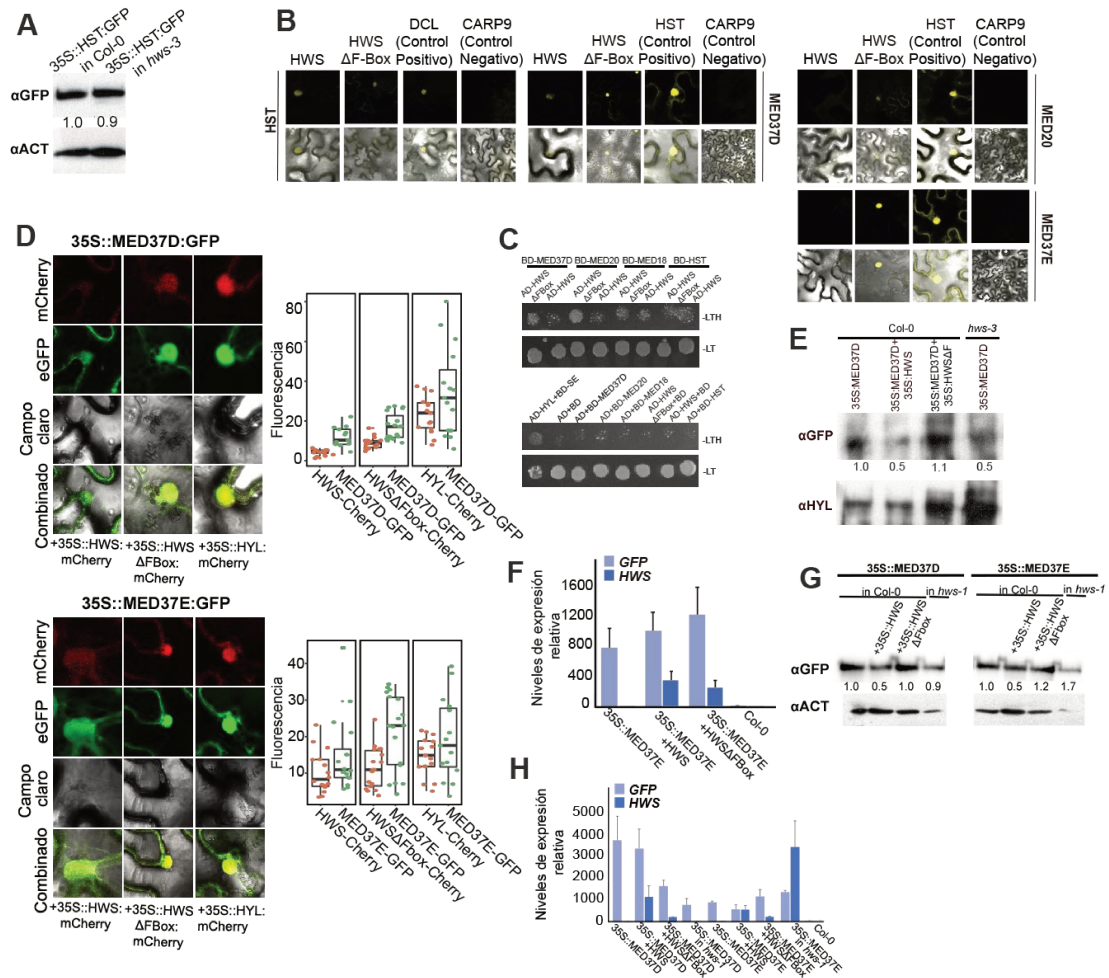


Figura 25. HWS interactúa con MED promoviendo su degradación en los *loci* específicos de los genes *MIR*. (A) Western blot de plantas de *A. thaliana* Col-0 y mutantes *hws-3* transformadas en forma estable que expresan *HST* bajo el promotor fuerte 35S, fusionada a la proteína fluorescente GFP en su extremo N-terminal. Actina fue utilizada para normalizar las muestras. Las bandas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ y se expresaron en relación con la fracción de proteínas correspondiente de las plantas Col-0 que sobreexpresan *HST*. (B) Ensayos de BiFC en células de *N. benthamiana* que muestra la interacción entre HWS/HWSΔF-Box y distintos componentes de la biogénesis de miRNAs. DCL1 se utilizó como control positivo y CARP9 se utilizó como control negativo. (C) Ensayo de doble híbrido que prueba la interacción entre HWS/HWSΔF-Box y *HST*, *MED37D*, *MED18* y *MED20*. Como control de carga, las levaduras fueron crecidas en medio sintético sin leucina ni triptófano (-LT). Las interacciones entre proteínas se detectaron cuando las levaduras crecieron en medio sintético sin leucina, triptófano e histidina (-LTH) con 3-AT 10 mM. Dominio de activación GAL4 (AD); Dominio de unión al ADN GAL4 (BD). (D) Co-infiltración de plantas de tabaco que expresan en forma ectópica *MED37D* o *MED37E* corriente arriba del gen reportero GFP junto con HWS o HWSΔF-Box etiquetados con el gen reportero mCherry. Como control de co-infiltración se utilizó *HYL1* etiquetada con mCherry. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada mediante el

software ImageJ y fue expresada en relación a la intensidad de fluorescencia del “background” (ruido de fondo). **(E)** IP-*Western blot* de plantas de *A. thaliana* que co-expresan en forma estable tanto MED37E fusionada a eGFP como HWS/HWS Δ F-Box para detectar niveles proteicos de MED37E en los *loci* de los genes *MIR*. Para la inmunoprecipitación se utilizaron anticuerpos α HYL y α DCL, mientras que para el *Western blot* se utilizó el anticuerpo α HYL. HYL se utilizó como gen control para normalizar las muestras. Las bandas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ y se expresaron en relación con la fracción de proteínas correspondiente de las plantas Col-0 que sobreexpresan MED37D. **(F)** RT-qPCR de las muestras empleadas en E cuantificando los niveles de MED37E y HWS en todas las líneas analizadas. Las barras de error muestran 2xEEM. **(G)** *Western blot* de plantas de *A. thaliana* co-transformadas en forma estable con construcciones que expresan en forma ectópica HWS y HWS Δ F-Box junto con MED37D/E. También están presentes aquellas que sobreexpresan MED37D/E en plantas mutantes *hws*. Actina fue utilizada para normalizar las muestras. Las bandas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ y se expresaron en relación con la fracción de proteínas correspondiente de las plantas Col-0 que sobreexpresan MED37D o MED37E según corresponda. **(H)** RT-qPCR de las plantas en G para evaluar niveles de transcripto de *GFP* y *HWS*. Las barras de error muestran 2xEEM.

Alentados por la interacción detectada entre HWS y el complejo MED, decidimos indagar si efectivamente HWS es capaz de inducir la degradación de MED *in vivo*. Para ello, tomamos plantas de tabaco y las co-transformamos en forma transiente con MED37D y MED37E etiquetadas con GFP junto con HWS, HWS Δ F-Box etiquetadas con Cherry. Como control negativo, se utilizó a HYL1 etiquetada con Cherry. Posteriormente, observamos en el microscopio confocal la intensidad de fluorescencia al co-infiltrar las construcciones previamente mencionadas. Obtuvimos un descenso en la intensidad de fluorescencia, en las plantas que co-expresaban HWS y MED37D/E pero mayor intensidad en aquellas plantas que expresaban en simultáneo HWS Δ F-Box o HYL1 junto con MED37D/E (Figura 25D). Esto nos indica que existiría una degradación del complejo MED por parte de HWS. A continuación, decidimos corroborar estos resultados en plantas de *A. thaliana*. Para ello, transformamos plantas salvajes, mutantes *hws* o plantas que sobreexpresan HWS o HWS Δ F-Box con versiones etiquetadas con GFP de MED37D o MED37E. Con este material biológico, realizamos extracciones de proteínas totales o de proteínas asociadas al complejo de biogénesis de miRNAs utilizando anticuerpos contra HYL1 y DCL1 para inmunoprecipitar el complejo. Esta estrategia, nos permitiría ver el efecto de HWS tanto en el pool general de MED, asociado a innumerables regiones del genoma, y de los complejos MED específicamente asociados a genes que codifican miRNAs. Finalmente, los niveles de MED37 fueron cuantificados por *Western blot* con anticuerpos contra GFP. Los resultados mostraron que HWS, pero

no HWS Δ F-Box, induce la degradación de MED37D (Figura 25E, F). Sorprendentemente, esta degradación solo se observó en la fracción de MED37 unida a los *loci* de miRNA pero no en el pool general (Figura 25G, H) indicando que la regulación de HWS sobre MED37 es específica.

8.4.5 Mutaciones en HWS son capaces de restaurar el movimiento de miRNAs, deficiente en mutantes *hst-15*

Se sabe que HST modula la biogénesis de miRNAs, sin alterar considerablemente la producción de estas moléculas [174],[254]. En cambio, se ha observado que HST es fundamental para el movimiento de miRNAs que actúan de forma no autónoma celular [254]. Como se demostró en este artículo, el fenotipo foliar observado en mutantes de *hst*, y usado en nuestro *screening*, es causado casi completamente por la falla en el movimiento de unos pocos miRNAs. En línea con estos hallazgos, evaluamos la posibilidad que las dobles mutantes del *screening* sean capaces de restaurar el movimiento de estos miRNAs y, por ende, explique la reversión del fenotipo. Para evaluar si el movimiento de miRNAs está restaurado en la doble mutante, empezamos por estudiar los miRNAs miR165/166 en raíces. Esos miRNAs, se mueven desde la endodermis hacia la estela en raíces, permitiendo el desarrollo de dos capas de metaxilema y dos de protoxilema. En mutantes *hst*, estos patrones se ven distorsionados debido a la deficiencia en el movimiento de esos miRNAs [254]. Al teñir las raíces con fucsina básica, observamos que tanto las cruces *hst-15/hws-35* como *hst-6/hws-35* fueron capaces de restaurar el movimiento del miR165/166 en raíces, conduciendo al correcto desarrollo de las mismas, en comparación con los patrones anormales que se observan en las mutantes *hst-6* y *hst-15* (Figura 26A). Por otro lado, al analizar que sucede en plantas salvajes que sobreexpresan HWS, se observan patrones similares a los de la mutante *hst-15* y *hst-6* (Figura 26A), nuevamente reforzando la idea de una regulación de HST por parte de HWS. Contrariamente, las plantas transgénicas que sobreexpresan la versión de HWS sin su dominio F-box, presentan una arquitectura radicular normal (Figura 26A).

Para validar estos resultados analizando el movimiento del miR160, el cual se mueve desde la vasculatura hacia la epidermis en hojas. Para realizar este experimento, se separó la epidermis de hojas de distintos genotipos de las células de mesófilo y vasculatura. Se procedió a extraer RNA de ambos tejidos y a medir los niveles de miR160 por Stem-loop RT-qPCR. Los resultados nuevamente muestran que las dobles mutantes *hst-15/hws-35* son capaces de restaurar el movimiento de este miRNA desde la vasculatura a la epidermis (Figura 26B). En conjunto, estos resultados asocian

fuertemente la acción de HWS sobre HST. Aun cuando el efecto no es directo sobre la estabilidad de HST es claro que HWS, al regular sus cofactores, impacta en la biología de esta proteína.

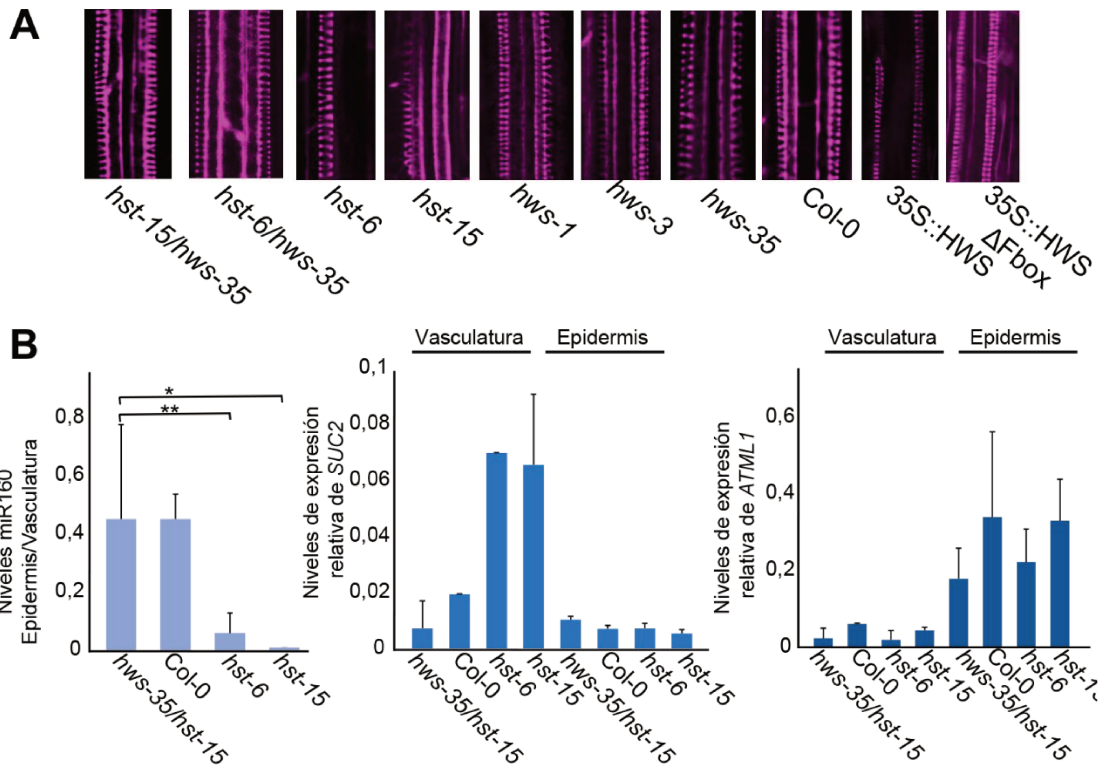


Figura 26. Una mutación en HWS es capaz de restaurar el movimiento de miRNAs deficiente de mutantes *hst-15*. **A.** Imágenes de microscopía confocal de raíces de plántulas de 5 días, teñidas con fucsina básica. **B.** RT-qPCR para cuantificar los niveles de miR160 en muestras de vasculatura y epidermis de plantas de 20 días. Como controles, se midieron los niveles de transcripción de SUC2, presente predominantemente en vasculatura y ATML1, presente mayoritariamente en epidermis. Las barras de error muestran 2x EEM y los valores de p inferiores a 0,05 (*) o 0,01 (**) en una prueba t no pareada se consideraron significativos.

8.5 Conclusiones

Durante mucho tiempo, la exportación de miRNAs desde el núcleo hacia el citosol, ha sido una temática controversial. Si bien el proceso de salida de miRNAs del núcleo al citoplasma está bien establecido en animales [287], en plantas permaneció incierto durante muchos años. En este sentido, la proteína HST ha sido considerada durante 15 años como la encargada de realizar dicha función [27], basándose casi exclusivamente en su analogía con la EXP5 de animales y sin pruebas concretas al respecto. Sin embargo, refutando dicha teoría, recientemente se encontró un mecanismo mediante el cual los miRNAs son exportados hacia el citosol en forma independiente de HST [233]. Sumado a esto, se han descubierto distintas funciones de HST en biogénesis de miRNAs, que no están relacionadas con su capacidad como proteína transportadora [174],[254].

Con el objetivo de dilucidar posibles roles de HST o de comprender su mecanismo de acción, realizamos un “*suppressor screening*” en busca de aquellas mutantes que sean capaces de revertir el fenotipo de la mutante *hst-15*. Producto de este análisis, encontramos una mutación en *HWS* que fue capaz de revertir el fenotipo de la mutante inicial. Esta proteína, del tipo F-box, ya había sido vinculada previamente con la biogénesis de miRNAs [265]–[267]. Si bien todos los reportes previos coinciden en que *HWS* tiene un rol negativo en la biogénesis de miRNAs, ninguno de ellos tuvo éxito en encontrar un papel concreto de la misma [265]–[267]. Considerando que *HWS* es capaz de marcar proteínas para su ubiquitinación y posible degradación, y dado por nuestros resultados del *screening*, era de esperarse que esté involucrada en la regulación post-traducciona de HST o bien de algún otro componente de la vía. Finalmente, encontramos que *HWS* es capaz de regular negativamente la biogénesis de miRNAs al controlar los niveles de las proteínas MED, factores que fueron recientemente vinculados con HST, necesarios para el reclutamiento inicial de DCL1 a los *loci MIRNA* [174].

A su vez, HST ha sido vinculada con el movimiento de miRNAs [254]. Se sabe que es necesaria en los tejidos emisores de miRNAs pero no en los tejidos receptores, y el movimiento *per se* es independiente de HST. Ensayos realizados en mutantes *hst*, muestran desacoplamiento en el movimiento de ciertos miRNAs en raíces y hojas [254]. Dado que los niveles de la mayoría de los miRNAs maduros no se encuentran alterados en las mutantes *hst*, esto podría significar que HST esté regulando solo algunos miRNAs, particularmente aquellos móviles, es decir que actúan de forma no autónoma

celular. En este sentido, y dado que AGO1 es autónoma celular, los miRNAs no unidos a AGO1 que fueron recientemente encontrados podrían ser los componentes móviles [254],[255],[257] y posiblemente dependientes de HST. Efectivamente, las dobles mutantes del *screening hst-15/hws-35* fueron capaces de restaurar el movimiento de miRNAs, desacoplado en las mutantes *hst-15*, sugiriendo que HWS también posee un rol negativo sobre el movimiento de miRNAs afectando de forma indirecta la actividad de HST. Llamativamente, estudios recientes muestran que la mayoría de los miRNAs móviles tienden a ser procesados de forma co-transcripcional, hecho que se da solo en algunos *loci* de genes *MIRNA* y promovidos por híbridos RNA/DNA llamados “R-loops” [173]. Considerando nuestros resultados, es tentador especular que la formación de “R-loops” pueda favorecer el reclutamiento de MED37, y por consiguiente de HST, a los *loci* de miRNAs móviles. Este reclutamiento, indefectiblemente favorece la asociación de DCL1 al pri-miRNA naciente, induciendo el procesamiento co-transcripcional de los miRNAs, evento que de alguna forma aun no establecida parece fomentar el movimiento de miRNAs al evitar su asociación con AGO1. En este escenario, HWS parece interferir con el proceso al degradar a MED37. Quizás este proceso provea a la célula de un mecanismo para favorecer el procesamiento post-transcripcional de miRNAs y su acción de forma autónoma dentro de la célula (Figura 27).

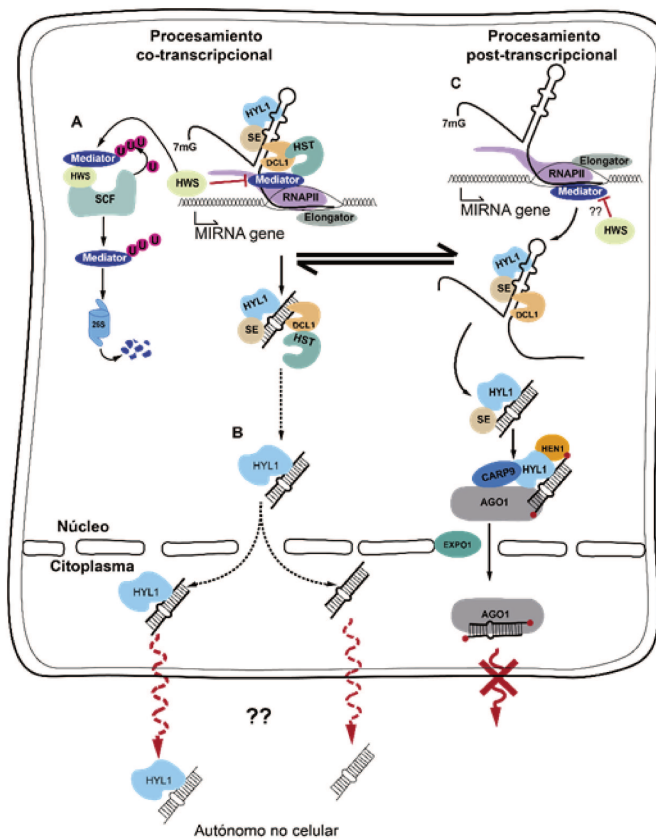


Figura 27. Modelo regulatorio de HWS en biogénesis de miRNAs. (A) HWS es capaz de degradar a MED37 en los *loci* de los genes *MIR*. Posiblemente, HWS esté presente específicamente en aquellos genes *MIR* cuyos transcritos sean procesados en forma co-transcripcional, regulando indirectamente la actividad de HST. **(B)** Probablemente, estos miRNAs sean los que actúen de forma autónoma no celular, y realicen otras funciones. **(C)** Por otro lado, en los *loci* de los genes *MIR* procesados en forma post-transcripcional HWS también podría estar presente, alterando los niveles del complejo MED.

CONCLUSIONES

9. Conclusiones

Existe una gran variedad de sRNAs en genomas de plantas, siendo éstos actores fundamentales en la regulación de la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [1]. En la primera parte de este trabajo de tesis, estudiamos particularmente los sRNAs mayoritarios en plantas representados por los hetsi-RNAs. Éstos, median la regulación génica transcripcional a través de un mecanismo conocido como RdDM [2],[3], y tienen como función principal la de silenciar TEs asegurando la estabilidad del genoma. Los TEs, fueron considerados durante mucho tiempo como “ADN basura”, pero hoy en día se sabe que son componentes esenciales en los genomas eucariotas. Si bien su movilización puede causar inestabilidad, y es por esta razón que los organismos intentan mantenerlos silenciados, muchos de ellos impulsan la diversidad y evolución del genoma, principalmente al insertarse cercanos a genes. Particularmente, los TEs han surgido en los últimos años como una fuente importante de lncRNAs y sRNAs funcionales [4].

Al explorar la región regulatoria del gen *HaWRKY6*, pudimos identificar un TE similar a un MITE (*ncW6*) el cual consiste en una secuencia de tipo IR y, como tal, es capaz de plegarse sobre sí mismo formando una estructura de tipo tallo-bucle característica de otros ncRNAs. El análisis de sRNA-seq en distintos tejidos de girasol, mostró además que sRNAs de 24 nt se alinean a la secuencia del IR y que éstos son considerablemente más abundantes en cotiledones que en hojas [5]. Comúnmente, la metilación mediada por sRNAs en TEs, desencadena modificaciones en histonas para terminar reprimiendo en forma estable su expresión [6],[7]. Sin embargo, el *locus HaWRKY6* no parece ser regulado por este mecanismo canónico, dado que una gran cantidad de sRNAs y metilación del ADN se observa en aquellos tejidos con mayor expresión del *locus*. La metilación del ADN también es capaz de influir en la arquitectura de la cromatina, al promover la interacción entre distintas secuencias metiladas [8],[9]. Nuestro estudio, reveló que la metilación del ADN en las secuencias que flanquean el *locus HaWRKY6*, está asociada con la formación de bucles en la cromatina y, a su vez, con un aumento en los niveles de transcripción del gen. En contraste, niveles bajos de metilación en estas regiones, especialmente en la región 3, en conjunto con marcas estables de metilación en el intrón 4, se correlacionan con la formación de un bucle intragénico en hojas que reprime la expresión del gen en este tejido. Además, los ensayos de ocupación de la RNAPII revelaron que la estabilización de los bucles en la cromatina no solo afecta la transcripción de *HaWRKY6*, sino que también modifica la direccionalidad de su promotor para reducir la transcripción del *ncW6*, la producción de sRNAs

pequeños y la metilación del *locus*, resultando en la desestabilización de los bucles. Esto implica que la metilación en las regiones 2 y 3 podrían dictar el tipo de bucle (inhibitorio o positivo) que se formará en el *locus*, pero la metilación dinámica de la región 1 los modula [5].

Observamos, además, que la transcripción del *ncW6*, está controlada por el promotor bidireccional del gen *HaWRKY6* de manera dependiente de RNAPII para producir sRNAs a través de un mecanismo dependiente de DCL2,3 y 4 pero independiente de RDR [5]. En conjunto, estas características definen al *ncW6* como un elemento regulador autónomo, definiendo un mecanismo dinámico y complejo de regulación transcripcional para el *locus HaWRKY6* (Figura 13). A su vez, la presencia de numerosos IRs cercanos a genes en girasol, nos sugirió un rol regulatorio de estos componentes sobre la expresión génica en plantas, lo cual resulta sumamente interesante como un mecanismo emergente de regulación rápida y dinámica que le permitiría a las plantas responder eficientemente a su entorno.

Por otro lado, en la segunda parte de esta tesis, profundizamos en el estudio de los miRNAs, factores principales de la regulación génica post-transcripcional en plantas. Particularmente, nos focalizamos en el estudio de la proteína HST, considerada durante 15 años como la encargada de exportar los miRNAs maduros desde el núcleo hacia el citosol, aunque sin pruebas concretas al respecto [10]. Si bien, recientemente, HST ha sido vinculada con distintas funciones en cuanto a biogénesis de miRNAs, descartando su rol como proteína transportadora de estos sRNAs [11],[12], al momento de iniciar esta tesis la supuesta función de HST en biogénesis de miRNAs era contradictoria e incierta. Es por ello que, en busca de dilucidar posibles roles de esta proteína o de comprender su mecanismo de acción, realizamos un “*suppressor screening*” en busca de aquellas mutantes que sean capaces de revertir el fenotipo de la mutante *hst-15*. Producto de este análisis, encontramos una mutación en *HWS* que fue capaz de revertir el fenotipo de la mutante inicial. Esta proteína, del tipo F-box, ya había sido vinculada previamente con la biogénesis de miRNAs, sin éxito en encontrar un papel concreto de la misma [13]–[15]. Considerando la naturaleza de esta proteína, era de esperarse que esté involucrada en la regulación post-traducciona de HST o bien de algún otro componente de la vía. Finalmente, encontramos que *HWS* es capaz de regular negativamente la biogénesis de miRNAs al controlar los niveles de las proteínas MED, factores que fueron recientemente vinculados con HST, necesarios para el reclutamiento inicial de DCL1 a los *loci MIRNA* [11]. A su vez, y dado que HST ha sido vinculada recientemente con el movimiento de miRNAs [12], observamos que las dobles mutantes del *screening hst-15/hws-35* fueron capaces de restaurar el movimiento de

miRNAs, desacoplado en mutantes *hst-15*, sugiriendo que HWS también posee un rol negativo sobre el movimiento de miRNAs afectando de forma indirecta la actividad de HST. Adicionalmente, estudios recientes muestran que la mayoría de los miRNAs móviles tienden a ser procesados de forma co-transcripcional, hecho que se da solo en algunos *loci* de genes *MIRNA* y promovidos por híbridos RNA/DNA llamados “R-loops” [16]. Considerando nuestros resultados, podemos pensar que la formación de estos híbridos pueda favorecer el reclutamiento de MED37, y por consiguiente de HST, a los *loci* de miRNAs móviles. Esto, a su vez, favorecería la asociación de DCL1 al pri-miRNA naciente, induciendo el procesamiento co-transcripcional de los miRNAs, evento que de alguna forma aun no establecida parece fomentar el movimiento de miRNAs al evitar su asociación con AGO1. En este contexto, HWS sería un obstáculo de este proceso al degradar a MED37 (Figura 27). Quizás, este proceso, provea a la célula de un mecanismo para favorecer el procesamiento post-transcripcional de miRNAs y su acción de forma autónoma dentro de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

10. Bibliografía

1. Borges F, Martienssen RA. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(12):1–15.
2. Wang J, Mei J, Ren G. Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Front Plant Sci.* 2019 Mar 22;10.
3. Yu Y, Jia T, Chen X. The “how” and “where” of plant microRNAs. Vol. 216, *New Phytologist*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1002–17.
4. Leung AKL, Sharp PA. MicroRNA Functions in Stress Responses. Vol. 40, *Molecular Cell*. 2010. p. 205–15.
5. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* 2007;12(7):301–9.
6. Manavella PA, Yang SW, Palatnik J. Keep calm and carry on: miRNA biogenesis under stress. *Plant J.* 2019;99(5):832–43.
7. Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H. Partially redundant functions of arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-Acting siRNAs. *Curr Biol.* 2005 Aug 23;15(16):1494–500.
8. Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, et al. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet.* 2006 Jun;38(6):721–5.
9. Willmann MR, Endres MW, Cook RT, Gregory BD. The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in *Arabidopsis*. *Arab B.* 2011 Jan;9:e0146.
10. Mukherjee K, Campos H, Kolaczowski B. Evolution of animal and plant dicers: Early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Mol Biol Evol.* 2013 Mar;30(3):627–41.
11. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: Matchmaking for argonautes. Vol. 12, *Nature Reviews Genetics*. 2011. p. 19–31.
12. Axtell MJ. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2013 Apr;64:5.1–5.23.
13. Axtell MJ. Evolution of microRNAs and their targets: Are all microRNAs biologically relevant? *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2008;1779(11):725–34.
14. Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet.* 2007;8(11):884–96.
15. Matzke MA, Moshier RA. RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway

- of increasing complexity. Vol. 15, Nature Reviews Genetics. Nature Publishing Group; 2014. p. 394–408.
16. Matzke M a, Kanno T, Matzke AJM. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;(December 2014):1–25.
 17. Fei Q, Xia R, Meyers BC. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. Vol. 25, *Plant Cell*. American Society of Plant Biologists; 2013. p. 2400–15.
 18. Creasey KM, Zhai J, Borges F, Van Ex F, Regulski M, Meyers BC, et al. MiRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature.* 2014;508(7496):411–5.
 19. Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell.* 2005 Dec 29;123(7):1279–91.
 20. Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2007 Dec 1;21(23):3123–34.
 21. Ron M, Saez MA, Williams LE, Fletcher JC, McCormick S. Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2010 May 15;24(10):1010–21.
 22. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell.* 2005 Apr 22;121(2):207–21.
 23. Felippes FF, Weigel D. Triggering the formation of tasiRNAs in *Arabidopsis thaliana*: The role of microRNA miR173. *EMBO Rep.* 2009;10(3):264–70.
 24. Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell.* 2008 Apr 4;133(1):128–41.
 25. Yoshikawa M, Peragine A, Mee YP, Poethig RS. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2005 Sep 15;19(18):2164–75.
 26. McCue AD, Nuthikattu S, Reeder SH, Slotkin RK. Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS Genet.* 2012 Feb;8(2).
 27. Yeon Park M, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Scott Poethig R. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis* [Internet]. 2005.
 28. Zhang B, You C, Zhang Y, Zeng L, Hu J, Zhao M, et al. Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nat Plants.* 2020 Aug 1;6(8):957–69.

29. Zhu J, Li Y, Lin J, Wu Y, Guo H, Shao Y, et al. CRD1, an Xpo1 domain protein, regulates miRNA accumulation and crown root development in rice. *Plant J.* 2019 Oct 1;100(2):328–42.
30. Bologna NG, Voinnet O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. Vol. 65, *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews Inc.; 2014. p. 473–503.
31. Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. Vol. 21, *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd; 2016. p. 1034–44.
32. Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 2005;102(36):12984–9.
33. Law JA, Du J, Hale CJ, Feng S, Krajewski K, Palanca AMS, et al. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature.* 2013;498(7454):385–9.
34. Liu ZW, Shao CR, Zhang CJ, Zhou JX, Zhang SW, Li L, et al. The SET Domain Proteins SUVH2 and SUVH9 Are Required for Pol V Occupancy at RNA-Directed DNA Methylation Loci. *PLoS Genet.* 2014;10(1).
35. Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell.* 2008 Nov 14;135(4):635–48.
36. Henderson IR, Jacobsen SE. Epigenetic inheritance in plants. *Nature.* 2007 May 24;447(7143):418–24.
37. Kumar S, Mohapatra T. Dynamics of DNA Methylation and Its Functions in Plant Growth and Development. *Front Plant Sci.* 2021 May 21;12.
38. Zhong X, Du J, Hale CJ, Gallego-Bartolome J, Feng S, Vashisht AA, et al. Molecular mechanism of action of plant DRM de novo DNA methyltransferases. *Cell.* 2014 May 22;157(5):1050–60.
39. Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, et al. Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell.* 2006 Sep 22;126(6):1189–201.
40. Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Aufsatz W, Matzke AJM, Matzke M. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *EMBO J.* 2006 Jun 21;25(12):2828–36.
41. Ito H, Kakutani T. Control of transposable elements in Arabidopsis thaliana. Vol. 22, *Chromosome Research*. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 217–23.
42. Pikaard CS, Tucker S. RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V in maize: More

- than one flavor? Vol. 5, PLoS Genetics. 2009.
43. Wei L, Gu L, Song X, Cui X, Lu Z, Zhou M, et al. Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 11;111(10):3877–82.
 44. Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: Roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Vol. 14, *Nature Reviews Genetics*. 2013. p. 100–12.
 45. Law JA, Jacobsen SE. Establishing , maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010;11:204–20.
 46. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo+ KC, Mccune+ RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(8):2709–21.
 47. Takuno S, Ran JH, Gaut BS. Evolutionary patterns of genic DNA methylation vary across land plants. *Nat Plants*. 2016;2(2).
 48. Zhang H, Lang Z, Zhu JK. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Aug 1;19(8):489–506.
 49. Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):61–9.
 50. Lang Z, Wang Y, Tang K, Tang D, Datsenka T, Cheng J, et al. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 30;114(22):E4511–9.
 51. An YQC, Goettel W, Han Q, Bartels A, Liu Z, Xiao W. Dynamic Changes of Genome-Wide DNA Methylation during Soybean Seed Development. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(12263):1–14.
 52. Harris CJ, Scheibe M, Wongpalee SP, Liu W, Cornett EM, Vaughan RM, et al. A DNA methylation reader complex that enhances gene transcription. *Science* (80-). 2018 Dec 7;362(6419):1182–6.
 53. Meyer P. DNA methylation systems and targets in plants. Vol. 585, *FEBS Letters*. 2011. p. 2008–15.
 54. Zemach A, Kim MY, Hsieh PH, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, et al. The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):193–205.
 55. Zhang H, Zhu JK. Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2012;77:161–73.

56. Jean finnegan E, Dennis ES. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(10):2383–8.
57. Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, et al. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics.* 2003;163(3):1109–22.
58. Watson M, Hawkes E, Meyer P. Transmission of epi-alleles with MET1-dependent dense methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2014;9(8).
59. Kenchanmane Raju SK, Ritter EJ, Niederhuth CE. Establishment, maintenance, and biological roles of non-CG methylation in plants. Vol. 63, *Essays in Biochemistry.* Portland Press Ltd; 2019. p. 743–55.
60. Papa CM, Springer NM, Muszynski MG, Meeley R, Kaeppler SM. Maize Chromomethylase *Zea methyltransferase2* Is Required for CpNpG Methylation [Internet]. Vol. 13, *The Plant Cell.* 2001.
61. Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, et al. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* (80-). 2001;292(5524):2077–80.
62. Johnson LM, Cao X, Jacobsen SE. Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol.* 2002;12(16):1360–7.
63. Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J, et al. The SRA Methyl-Cytosine-Binding Domain Links DNA and Histone Methylation. *Curr Biol.* 2007;17(4):379–84.
64. Du J, Johnson LM, Groth M, Feng S, Hale CJ, Li S, et al. Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Mol Cell.* 2014;55(3):495–504.
65. Li X, Jake Harris C, Zhong Z, Chen W, Liu R, Jia B, et al. Mechanistic insights into plant SUVH family H3K9 methyltransferases and their binding to context-biased non-CG DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(37):E8793–802.
66. Li Q, Eichten SR, Hermanson PJ, Zaunbrecher VM, Song J, Wendt J, et al. Genetic perturbation of the maize methylome. *Plant Cell.* 2014;26(12):4602–16.
67. Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, et al. Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Jan;21(1):64–72.
68. Lloyd JPB, Lister R. Epigenome plasticity in plants. *Nat Rev Genet.* 2022;23(1):55–68.
69. Dubin MJ, Zhang P, Meng D, Remigereau MS, Osborne EJ, Paolo Casale F, et

- al. DNA methylation in Arabidopsis has a genetic basis and shows evidence of local adaptation. 2015;4:5255.
70. Kawakatsu T, Huang S, Shan C, Jupe F, Sasaki E, Schmitz RJJ, Urich MAA, et al. Epigenomic Diversity in a Global Collection of Arabidopsis thaliana Accessions. *Cell*. 2016 Jul 14;166(2):492–505.
 71. Bewick AJ, Ji L, Niederhuth CE, Willing EM, Hofmeister BT, Shi X, et al. On the origin and evolutionary consequences of gene body DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 9;113(32):9111–6.
 72. Bewick AJ, Niederhuth CE, Ji L, Rohr NA, Griffin PT, Leebens-Mack J, et al. The evolution of CHROMOMETHYLASES and gene body DNA methylation in plants. *Genome Biol*. 2017 May 1;18(1).
 73. Cuerda-Gil D, Slotkin RK. Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nat Plants*. 2016 Nov 3;2(11).
 74. Panda K, Ji L, Neumann DA, Daron J, Schmitz RJ, Slotkin RK. Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biol*. 2016 Aug 9;17(1).
 75. Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, et al. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Mol Cell*. 2010 May 14;38(3):465–75.
 76. Slotkin RK, Freeling M, Lisch D. Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. *Nat Genet*. 2005 Jun;37(6):641–4.
 77. Ahmed I, Sarazin A, Bowler C, Colot V, Quesneville H. Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep;39(16):6919–31.
 78. Staton SE, Bakken BH, Blackman BK, Chapman MA, Kane NC, Tang S, et al. The sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome reflects a recent history of biased accumulation of transposable elements. Vol. 72, *Plant Journal*. 2012. p. 142–53.
 79. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*. 2007;8:973–82.
 80. Bennetzen JL, Wang H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. Vol. 65, *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews Inc.; 2014. p. 505–30.
 81. Wessler SR, Bureau TE, White SE. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5:814–21.

82. Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. Vol. 3, Nature Reviews Genetics. 2002. p. 329–41.
83. Guo C, Spinelli M, Ye C, Li QQ, Liang C. Genome-Wide Comparative Analysis of Miniature Inverted Repeat Transposable Elements in 19 *Arabidopsis thaliana* Ecotype Accessions. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
84. Turcotte K, Srinivasan S, Bureau T. Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *Plant J.* 2001;25(2):169–79.
85. Yang G, Lee YH, Jiang Y, Shi X, Kertbundit S, Hall TC. A two-edged role for the transposable element Kiddo in the rice ubiquitin2 promoter. *Plant Cell.* 2005;17(5):1559–68.
86. Magalhaes J V., Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang YH, et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet.* 2007 Sep;39(9):1156–61.
87. Li J, Wang Z, Peng H, Liu Z. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of TaHSP16.9 in common wheat. *Crop J.* 2014 Dec 1;2(6):381–7.
88. Wu N, Yao Y, Xiang D, Du H, Geng Z, Yang W, et al. A MITE variation-associated heat-inducible isoform of a heat-shock factor confers heat tolerance through regulation of JASMONATE ZIM-DOMAIN genes in rice. *New Phytol.* 2022;234:1315–31.
89. Volpe T, Martienssen RA. RNA interference and heterochromatin assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(9):1–11.
90. Michaud EJ, Van Vugt MJ, Bultman SJ, Sweet HO, Davisson MT, Woychik RP. Differential expression of a new dominant agouti allele (A is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage). *Genes Dev.* 1994;8:1463–72.
91. Swiezewski S, Crevillen P, Liu F, Ecker JR, Jerzmanowski A, Dean C. Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the *Arabidopsis* gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(9):3633–8.
92. Soppe WJJ, Jacobsen SE, Alonso-Blanco C, Jackson JP, Kakutani T, Koornneef M, et al. The Late Flowering Phenotype of *fwa* Mutants Is Caused by Gain-of-Function Epigenetic Alleles of a Homeodomain Gene. *Mol Cell.* 2000;6:791–802.
93. Ariel F, Jegu T, Latrasse D, Romero-Barrios N, Christ A, Benhamed M, et al. Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Mol Cell.* 2014;55(3):383–96.
94. Feng S, Cokus SJ, Schubert V, Zhai J, Pellegrini M, Jacobsen SE. Genome-wide

- Hi-C Analyses in Wild-Type and Mutants Reveal High-Resolution Chromatin Interactions in Arabidopsis. *Mol Cell*. 2014;55(5):694–707.
95. Lizarraga A, O’Brown ZK, Boulias K, Roach L, Greer EL, Johnson PJ, et al. Adenine DNA methylation, 3D genome organization, and gene expression in the parasite *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(23):13033–43.
 96. Kadauke S, Blobel GA. Chromatin loops in gene regulation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2009;1789(1):17–25.
 97. Rodriguez-Granados NY, Ramirez-Prado JS, Veluchamy A, Latrasse D, Raynaud C, Crespi M, et al. Put your 3D glasses on: Plant chromatin is on show. *J Exp Bot*. 2016 May 28;67(11):3205–21.
 98. Pontvianne F, Liu C. Chromatin domains in space and their functional implications. *Curr Opin Plant Biol*. 2020 Apr 1;54:1–10.
 99. Doğan ES, Liu C. Three-dimensional chromatin packing and positioning of plant genomes. *Nat Plants*. 2018 Aug 1;4(8):521–9.
 100. Chung IM, Ketharnathan S, Kim SH, Thiruvengadam M, Rani MK, Rajakumar G. Making sense of the tangle: Insights into chromatin folding and gene regulation. Vol. 7, *Genes*. MDPI AG; 2016.
 101. Dekker J, Marti-Renom MA, Mirny LA. Exploring the three-dimensional organization of genomes: Interpreting chromatin interaction data. *Nat Rev Genet*. 2013 Jun;14(6):390–403.
 102. Liu C, Wang C, Wang G, Becker C, Zaidem M, Weigel D. Genome-wide analysis of chromatin packing in *Arabidopsis thaliana* at single-gene resolution. *Genome Res*. 2016 Aug 1;26(8):1057–68.
 103. Gibcus JH, Dekker J. The Hierarchy of the 3D Genome. Vol. 49, *Molecular Cell*. 2013. p. 773–82.
 104. Grob S, Schmid MW, Grossniklaus U. Hi-C Analysis in *Arabidopsis* Identifies the KNOT, a Structure with Similarities to the flamenco Locus of *Drosophila*. *Mol Cell*. 2014;55(5):678–93.
 105. Gagliardi D, Manavella PA. Short-range regulatory chromatin loops in plants. *New Phytol*. 2020 Oct 1;228(2):466–71.
 106. Cavalli G, Misteli T. Functional implications of genome topology. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(3):290–9.
 107. Hsieh THS, Weiner A, Lajoie B, Dekker J, Friedman N, Rando OJ. Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C. *Cell*. 2015 Jul 2;162(1):108–19.

108. Crevillén P, Sonmez C, Wu Z, Dean C. A gene loop containing the floral repressor FLC is disrupted in the early phase of vernalization. *EMBO J.* 2013 Jan 9;32(1):140–8.
109. Tan-Wong SM, Wijayatilake HD, Proudfoot NJ. Gene loops function to maintain transcriptional memory through interaction with the nuclear pore complex. *Genes Dev.* 2009 Nov 15;23(22):2610–24.
110. Jégu T, Domenichini S, Blein T, Ariel F, Christ A, Kim SK, et al. A SWI/SNF chromatin remodelling protein controls cytokinin production through the regulation of chromatin architecture. *PLoS One.* 2015 Oct 12;10(10).
111. Liu C, Teo ZWN, Bi Y, Song S, Xi W, Yang X, et al. A Conserved Genetic Pathway Determines Inflorescence Architecture in Arabidopsis and Rice. *Dev Cell.* 2013 Mar 25;24(6):612–22.
112. Tan-Wong SM, Zaugg JB, Camblong J, Xu Z, Zhang DW, Mischo HE, et al. Gene loops enhance transcriptional directionality. *Science* (80-). 2012 Nov 2;338(6107):671–5.
113. Kim DH, Sung S. Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs. *Dev Cell.* 2017 Feb 6;40(3):302–12.e4.
114. Ruiz-Velasco M, Kumar M, Lai MC, Bhat P, Solis-Pinson AB, Reyes A, et al. CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals. *Cell Syst.* 2017 Dec 27;5(6):628–37.e6.
115. Seila AC, Core LJ, Lis JT, Sharp PA. Divergent transcription: A new feature of active promoters. *Cell Cycle.* 2009 Aug 15;8(16):2557–64.
116. Heo JB, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* (80-). 2011 Jan 7;331(6013):76–9.
117. Whittaker C, Dean C. The FLC Locus: A Platform for Discoveries in Epigenetics and Adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017;33:8.1–8.21.
118. Krivega I, Dean A. Enhancer and promoter interactions-long distance calls. Vol. 22, *Current Opinion in Genetics and Development.* 2012. p. 79–85.
119. Louwers M, Bader R, Haring M, Van Driel R, De Laat W, Stam M. Tissue- and expression level-specific chromatin looping at maize b1 epialleles. *Plant Cell.* 2009;21(3):832–42.
120. Cao S, Kumimoto RW, Gnesutta N, Calogero AM, Mantovani R, Holt BF. A distal CCAAT/NUCLEAR FACTOR Y complex promotes chromatin looping at the FLOWERING LOCUS T promoter and regulates the timing of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2014;26(3):1009–17.
121. Mendes MA, Guerra RF, Berns MC, Manzo C, Masiero S, Finzi L, et al. MADS

- domain transcription factors mediate short-range DNA looping that is essential for target gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2013;25(7):2560–72.
122. Jégu T, Latrasse D, Delarue M, Hirt H, Domenichini S, Ariel F, et al. The BAF60 subunit of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex directly controls the formation of a gene loop at FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2014;26(2):538–51.
 123. Lu C, Chen J, Zhang Y, Hu Q, Su W, Kuang H. Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) have been accumulated through amplification bursts and play important roles in gene expression and species diversity in *Oryza sativa*. *Mol Biol Evol*. 2012 Mar;29(3):1005–17.
 124. Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation [Internet]. Vol. 42, *Plant Molecular Biology*. 2000.
 125. Foerster AM, Mittelsten Scheid O. Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing. *Methods Mol Biol*. 2010;631:1–11.
 126. Koncz C, Schell J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet*. 1986;204:383–96.
 127. Agorio A, Vera P. ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2007;19(11):3778–90.
 128. Deleris A, Gallago-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* (80-). 2006 Jul 7;313(5783):68–71.
 129. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513–23.
 130. Zhang H, Tang K, Wang B, Duan CG, Lang Z, Zhu JK. Protocol: a beginner's guide to the analysis of RNA-directed DNA methylation in plants. *Plant Methods*. 2014;10:18.
 131. Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R. Kismeth: Analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics*. 2008 Sep 11;9.
 132. Louwers M, Splinter E, van Driel R, de Laat W, Stam M. Studying physical chromatin interactions in plants using Chromosome Conformation Capture (3C). *Nat Protoc*. 2009;4(8):1216–29.
 133. Sikorskaite S, Rajamäki ML, Baniulis D, Stanys V, Pt Valkonen J. Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the

- Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*. 2013;9(31).
134. Tomassi AH, Gagliardi D, Cambiagno DA, Manavella PA. Nonradioactive detection of small RNAs using digoxigenin-labeled probes. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 199–210.
 135. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 1998;(6):735–43.
 136. Manavella PA, Chan RL. Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1699–707.
 137. Badouin H, Gouzy J, Grassa CJ, Murat F, Staton SE, Cottret L, et al. The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*. 2017 Jun 1;546(7656):148–52.
 138. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010 Jan 28;26(6):841–2.
 139. Hahne F, Ivanek R, Hahne Florian, Robert I. Visualizing Genomic Data Using Gviz and Bioconductor. *Stat Genomics*. 2016;1418(301):444 and 455.
 140. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009 Sep;19(9):1639–45.
 141. Giacomelli JI, Weigel D, Chan RL, Manavella PA. Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. *New Phytol*. 2012 Sep;195(4):766–73.
 142. Gagliardi D, Cambiagno DA, Arce AL, Tomassi AH, Giacomelli JI, Ariel FD, et al. Dynamic regulation of chromatin topology and transcription by inverted repeat-derived small RNAs in sunflower. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Aug 27;116(35):17578–83.
 143. Kontra L, Csorba T, Tavazza M, Lucioli A, Tavazza R, Moxon S, et al. Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. *PLoS Pathog*. 2016 Oct 1;12(10).
 144. Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, et al. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*. 2003 Jul 1;132(3):1382–90.
 145. Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4671–9.
 146. Shen J, Liu J, Xie K, Xing F, Xiong F, Xiao J, et al. Translational repression by a miniature inverted-repeat transposable element in the 3' untranslated region. *Nat*

- Commun. 2017 Mar 3;8(14651).
147. Wang Q, Wan L, Li D, Zhu L, Qian M, Deng M. Searching for bidirectional promoters in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Bioinformatics*. 2009 Jan 30;10(SUPPL. 1).
 148. Lacadie SA, Ibrahim MM, Gokhale SA, Ohler U. Divergent transcription and epigenetic directionality of human promoters. *FEBS J*. 2016 Dec 1;283(23):4214–22.
 149. Wu X, Sharp PA. Divergent transcription: A driving force for new gene origination? *Cell*. 2013 Nov 21;155(5):990–6.
 150. McClintock B. Components of action of the regulators Spm and Ac. Vol. 64, *Carnegie Institution of Washington Year Book*. 1965. 528-534 p.
 151. Ariel FD, Manavella PA. When junk DNA turns functional: Transposon-derived non-coding RNAs in plants. *J Exp Bot*. 2021 May 18;72(11):4132–43.
 152. Sigman MJ, Slotkin RK. The first rule of plant transposable element silencing: Location, location, location. *Plant Cell*. 2015 Feb 1;28(2):304–13.
 153. Trinklein ND, Force Aldred S, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res*. 2004 Jan;14(1):62–6.
 154. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116:281–97.
 155. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008 Feb;9(2):102–14.
 156. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522–31.
 157. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their Regulatory Roles in Plants. *Plant Biol*. 2011;57:1–16.
 158. Lee RC, Feinbaum RL, Ambrost V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
 159. Brantl S. Plasmid Replication Control by Antisense RNAs. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug 15;2(4).
 160. He S, Yang Z, Skogerbo G, Ren F, Cui H, Zhao H, et al. The properties and functions of virus encoded microRNA, siRNA, and other small noncoding RNAs. *Crit Rev Microbiol*. 2008 Aug;34:175–88.
 161. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien H, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of

- Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80-). 2004 Apr 30;304(5671):734–6.
162. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Mol Cell*. 2010 May 14;38(3):323–32.
 163. Li C, Zhang B. MicroRNAs in Control of Plant Development. *J Cell Physiol*. 2016;231(2):303–13.
 164. Samad AFA, Sajad M, Nazaruddin N, Fauzi IA, Murad AMA, Zainal Z, et al. MicroRNA and transcription factor: Key players in plant regulatory network. *Front Plant Sci*. 2017;8(April):1–18.
 165. Boutet S, Vazquez F, Liu J, Béclin C, Fagard M, Gratias A, et al. Arabidopsis HEN1: A Genetic Link between Endogenous miRNA Controlling Development and siRNA Controlling Transgene Silencing and Virus Resistance HHS Public Access Author manuscript. *Curr Biol*. 2003;13(10):843–8.
 166. Vaucheret H, Vazquez F, Crété P, Bartel DP. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*. 2004 May 15;18(10):1187–97.
 167. Vazquez F, Gascioli V, Crété P, Vaucheret H. The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. *Curr Biol*. 2004 Feb;14(4):346–51.
 168. Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs: At the root of plant development? *Plant Physiol*. 2003 Jun 1;132(2):709–17.
 169. Axtell M, Westholm J, Lai E. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*. 2010;12(221).
 170. Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*. 2013;25(7):2383–99.
 171. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb;10(2):126–39.
 172. Saito K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in drosophila cells. *PLoS Biol*. 2005;3(7):1202–12.
 173. Gonzalo L, Tossolini I, Gulanicz T, Cambiagno DA, Kasproicz-Maluski A, Dariusz Smolinski J, et al. R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants. *Nat Plants*. 2022;8:402–18.
 174. Cambiagno DA, Giudicatti AJ, Arce AL, Gagliardi D, Li L, Yuan W, et al. HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Mol Plant*. 2021 Mar 1;14(3):426–39.
 175. Dalmadi Á, Gyula P, Bálint J, Szittyá G, Havelda Z. AGO-unbound cytosolic pool

- of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic Acids Res.* 2019 Oct 10;47(18):9803–17.
176. Leitão AL, Enguita FJ. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-coding RNA.* 2022;8(1).
 177. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol.* 2005;138(4):2145–54.
 178. Stepien A, Knop K, Dolata J, Taube M, Bajczyk M, Barciszewska-Pacak M, et al. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. Vol. 8, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2016. Blackwell Publishing Ltd; 2017.
 179. Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Vazquez F. The crosstalk between plant microRNA biogenesis factors and the spliceosome. *Plant Signal Behav.* 2013 Dec 3;8(11).
 180. Bielewicz D, Kalak M, Kalyna M, Windels D, Barta A, Vazquez F, et al. Introns of plant pri-miRNAs enhance miRNA biogenesis. *EMBO Rep.* 2013 Jun;14(7):622–8.
 181. Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG. MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA.* 2006;12(9):1612–9.
 182. Wang L, Song X, Gu L, Li X, Cao S, Chu C, et al. NOT2 Proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2013;25(2):715–27.
 183. Zhang S, Xie M, Ren G, Yu B. CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 22;110(43):17588–93.
 184. Li S, Liua K, Zhang S, Wang X, Rogers K, Ren G, et al. STV1, a ribosomal protein, binds primary microRNA transcripts to promote their interaction with the processing complex in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Feb 7;114(6):1424–9.
 185. Wang S, Quan L, Li S, You C, Zhang Y, Gao L, et al. The PROTEIN PHOSPHATASE4 Complex Promotes Transcription and Processing of Primary microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2019 Feb 1;31(2):486–501.
 186. Li S, Xu R, Li A, Liu K, Gu L, Li M, et al. SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2018 Sep 28;46(17):9148–59.
 187. Wang Z, Ma Z, Castillo-González C, Sun D, Li Y, Yu B, et al. SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature.* 2018 May 24;557(7706):516–21.

188. Hajheidari M, Farrona S, Huettel B, Koncz Z, Koncz C. CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-Terminal domain of arabidopsis RNA polymerase II. *Plant Cell*. 2012;24(4):1626–42.
189. Koiwa H, Phane Hausmann S, Ueda A, Kondo N, Hiraguri A, Fukuhara T, et al. Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(40):14539–44.
190. Manavella PA, Hagmann J, Ott F, Laubinger S, Franz M, MacEk B, et al. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell*. 2012 Nov 9;151(4):859–70.
191. Xu M, Hu T, Smith MR, Poethig RS. Epigenetic regulation of vegetative phase change in arabidopsis. *Plant Cell*. 2016 Jan 1;28(1):28–41.
192. Choi K, Kim J, Müller SY, Oh M, Underwood C, Henderson I, et al. Regulation of microRNA-mediated developmental changes by the SWR1 chromatin remodeling complex. *Plant Physiol*. 2016 Jun 1;171(2):1128–43.
193. Flanagan PM, Raymond JK, Sayre MH, Tschochner H, Kornberg RD. A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature*. 1991;350:436–8.
194. Kelleher R, Flanagan PM, Kornberg RD. A Novel Mediator between Activator Proteins and the RNA Polymerase II Transcription Apparatus. *Cell*. 1990;61:1209–15.
195. Krebs AR, Demmers J, Karmodiya K, Chang NC, Chang AC, Tora L. ATAC and Mediator coactivators form a stable complex and regulate a set of non-coding RNA genes. *EMBO Rep*. 2010 Jul;11(7):541–7.
196. Kim YJ, Zheng B, Yu Y, Won SY, Mo B, Chen X. The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. *EMBO J*. 2011 Mar 2;30(5):814–22.
197. Dong Z, Han MH, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(29):9970–5.
198. Fang Y, Spector DL. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. *Curr Biol*. 2007 May 1;17(9):818–23.
199. Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(34):12753–8.
200. Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H. SERRATE is a novel nuclear regulator in

- primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J.* 2006 Sep;47(6):841–50.
201. Liu Q, Shi L, Fang Y. Dicing bodies. *Plant Physiol.* 2012;158(1):61–6.
 202. Fang X, Cui Y, Li Y, Qi Y. Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. *Nat Plants.* 2015 Jun;1(6).
 203. Zhang S, Liu Y, Yu B. PRL1, an RNA-Binding Protein, Positively Regulates the Accumulation of miRNAs and siRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 2014 Dec 1;10(12).
 204. Dolata J, Bajczyk M, Bielewicz D, Niedojadlo K, Niedojadlo J, Pietrykowska H, et al. Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiol.* 2016;172(1):297–312.
 205. Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, Boller T, Meins F. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(20):6429–38.
 206. Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3407–25.
 207. Tsuzuki M, Takeda A, Watanabe Y. Recovery of dicer-like 1-late flowering phenotype by miR172 expressed by the noncanonical DCL4-dependent biogenesis pathway. *RNA.* 2014;20(8):1320–7.
 208. MacRae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* (80-). 2006 Jan 13;311(5758):195–8.
 209. Addo-Quaye C, Snyder JA, Park YB, Li YF, Sunkar R, Axtell MJ. Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *RNA.* 2009 Dec;15(12):2112–21.
 210. Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG, Palatnik JF. A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J.* 2009 Dec;28(23):3646–56.
 211. Zhang W, Gao S, Zhou X, Xia J, Chellappan P, Zhou X, et al. Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. *Genome Biol.* 2010 Aug 9;11(8).
 212. Zhu H, Zhou Y, Castillo-González C, Lu A, Ge C, Zhao YT, et al. Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Sep;20(9):1106–15.
 213. Zhang S, Liu Y, Yu B. New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015;6(5):533–45.

214. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 2006 Feb;12(2):206–12.
215. Yang SW, Chen HY, Yang J, Machida S, Chua NH, Yuan YA. Structure of arabidopsis Hyponastic Leaves1 and its molecular implications for miRNA Processing. *Structure*. 2010 May;18(5):594–605.
216. Yang X, Ren W, Zhao Q, Zhang P, Wu F, He Y. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res*. 2014 Oct 29;42(19):12224–36.
217. Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J. SERRATE: A new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep*. 2006 Oct;7(10):1052–8.
218. Machida S, Chen HY, Adam Yuan Y. Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(17):7828–36.
219. Gregory BD, O'Malley RC, Lister R, Urich MA, Tonti-Filippini J, Chen H, et al. A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Dev Cell*. 2008 Jun 10;14(6):854–66.
220. Laubinger S, Sachsenberg T, Zeller G, Busch W, Lohmann JU, Ră Tsch † G, et al. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(25):8795–800.
221. Bin Y, Bi L, Zheng B, Ji L, Chevalier D, Agarwal M, et al. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(29):10073–8.
222. Machida S, Yuan YA. Crystal structure of arabidopsis thaliana dawdle forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding. *Mol Plant*. 2013;6(4):1290–300.
223. Morris ER, Chevalier D, Walker JC. DAWDLE, a forkhead-associated domain gene, regulates multiple aspects of plant development. *Plant Physiol*. 2006;141(3):932–41.
224. Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C, Yu B. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12817–21.
225. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* (80-). 2005 Feb 11;307(5711):932–5.
226. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from

- a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol.* 2005 Aug 23;15(16):1501–7.
227. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* 2006 Feb;34(2):667–75.
228. Köhler A, Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):761–73.
229. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (80-)*. 2004;303(5654):95–8.
230. Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004 Feb;10(2):185–91.
231. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003 Dec 15;17(24):3011–6.
232. Bajczyk M, Bhat SS, Szewc L, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Dolata J. Novel nuclear functions of arabidopsis argonaute1: Beyond rna interference. *Plant Physiol.* 2019 Mar 1;179(3):1030–9.
233. Bologna NG, Iselin R, Abriata LA, Sarazin A, Pumplin N, Jay F, et al. Nucleocytoplasmic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol Cell.* 2018 Feb 15;69(4):709–19.e5.
234. Cui Y, Fang X, Qi Y. TRANSPORTIN1 promotes the association of microRNA with ARGONAUTE1 in arabidopsis. *Plant Cell.* 2016 Oct 1;28(10):2576–85.
235. Wang W, Ye R, Xin Y, Fang X, Li C, Shi H, et al. An importin β protein negatively regulates microRNA activity in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2011;23(10):3565–76.
236. Francisco-Mangilet AG, Karlsson P, Kim MH, Eo HJ, Oh SA, Kim JH, et al. THO2, a core member of the THO/TREX complex, is required for microRNA production in Arabidopsis. *Plant J.* 2015 Jun 1;82(6):1018–29.
237. Furumizu C, Tsukaya H, Komeda Y. Characterization of EMU, the Arabidopsis homolog of the yeast THO complex member HPR1. *RNA.* 2010;16(9):1809–17.
238. Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhara I, et al. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell.* 2010 Jul;39(2):282–91.
239. Iki T, Yoshikawa M, Meshi T, Ishikawa M. Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J.* 2012 Jan 18;31(2):267–78.
240. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, et al. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of

- small RNA duplexes. *Mol Cell*. 2010 Jul;39(2):292–9.
241. Smith MR, Willmann MR, Wu G, Berardini TZ, Möller B B, Weijers D, et al. Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5424–9.
242. Tomassi AH, Re DA, Romani F, Cambiagno DA, Gonzalo L, Moreno JE, et al. The Intrinsically Disordered Protein CARP9 Bridges HYL1 to AGO1 in the Nucleus to Promote MicroRNA Activity. *Plant Physiol*. 2020 Sep 1;184(1):316–29.
243. Chen X. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009 Nov;25:21–44.
244. German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol*. 2008 Aug;26(8):941–6.
245. Hou CY, Lee WC, Chou HC, Chen AP, Chou SJ, Chen HM. Global analysis of truncated RNA ends reveals new insights into Ribosome Stalling in plants. *Plant Cell*. 2016 Oct 1;28(10):2398–416.
246. Li S, Le B, Ma X, Li S, You C, Yu Y, et al. Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in Arabidopsis. *Elife*. 2016 Dec 12;5.
247. Yu X, Willmann MR, Anderson SJ, Gregory BD. Genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts reveals a role for the nuclear mRNA cap-binding complex in cotranslational RNA decay in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2016 Oct 1;28(10):2385–97.
248. Telfer A, Poethig RS. HASTY: a gene that regulates the timing of shoot maturation in Arabidopsis thaliana. *Development*. 1998;125(1996):1889–98.
249. Bollman KM, Aukerman MJ, Park MY, Hunter C, Berardini TZ, Scott Poethig R. HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*. 2003 Apr;130(8):1493–504.
250. Meier I, Brkljacic J. The Arabidopsis Nuclear Pore and Nuclear Envelope. *Arab B*. 2010 Jan;8:e0139.
251. Merkle T. Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Rep*. 2011 Feb 1;30(2):153–76.
252. Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2003 Mar 1;131(3):1191–208.
253. Zhang Z, Guo X, Ge C, Ma Z, Jiang M, Li T, et al. KETCH1 imports HYL1 to nucleus for miRNA biogenesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Apr 11;114(15):4011–6.
254. Brioudes F, Jay F, Sarazin A, Grentzinger T, Devers EA, Voinnet O. HASTY, the

- Arabidopsis EXPORTIN5 ortholog, regulates cell-to-cell and vascular microRNA movement . EMBO J. 2021 Aug 2;40(15).
255. Fan L, Zhang C, Zhang Y, Stewart E, Jez J, Nakajima K, et al. Microtubules Promote the Non-cell Autonomous action of MicroRNAs by Inhibiting their Cytoplasmic Loading onto ARGONAUTE1 in Arabidopsis. *Dev Cell*. 2022;57:1–14.
 256. Chitwood DH, Nogueira FTS, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MCP. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev*. 2009 Mar 1;23(5):549–54.
 257. Devers EA, Brosnan CA, Sarazin A, Albertini D, Amsler AC, Brioudes F, et al. Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference. *Nat Plants*. 2020 Jul 1;6(7):789–99.
 258. Melnyk CW, Molnar A, Baulcombe DC. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. Vol. 30, *EMBO Journal*. 2011. p. 3553–63.
 259. Skopelitis DS, Hill K, Klesen S, Marco CF, von Born P, Chitwood DH, et al. Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
 260. Risseeuw EP, Daskalchuk TE, Banks TW, Liu E, Cotelesage J, Hellmann H, et al. Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J*. 2003;34(6):753–67.
 261. Kuroda H, Takahashi N, Shimada H, Seki M, Shinozaki K, Matsui M. Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol*. 2002;43(10):1073–85.
 262. Ogura Y, Ihara N, Komatsu A, Tokioka Y, Nishioka M, Takase T, et al. Gene expression, localization, and protein-protein interaction of Arabidopsis SKP1-like (ASK) 20A and 20B. *Plant Sci*. 2008;174(5):485–95.
 263. González-Carranza ZH, Rompa U, Peters JL, Bhatt AM, Wagstaff C, Stead AD, et al. Hawaiian skirt: An F-box gene that regulates organ fusion and growth in arabidopsis. *Plant Physiol*. 2007;144(3):1370–82.
 264. González-Carranza ZH, Zhang X, Peters JL, Boltz V, Szecsi J, Bendahmane M, et al. HAWAIIAN SKIRT controls size and floral organ number by modulating CUC1 and CUC2 expression. *PLoS One*. 2017 Sep 1;12(9).
 265. Zhang X, Jayaweera D, Peters JL, Szecsi J, Bendahmane M, Roberts JA, et al. The Arabidopsis thaliana F-box gene HAWAIIAN SKIRT is a new player in the microRNA pathway. *PLoS One*. 2017 Dec 1;12(12).
 266. Lang PLM, Christie MD, Dogan ES, Schwa R, Hagmann J, Van De Weyer AL, et

- al. A role for the F-box protein HAWAIIAN SKIRT in plant microRNA function. *Plant Physiol.* 2018 Jan 1;176(1):730–41.
267. Mei J, Jiang N, Ren G. The F-box protein HAWAIIAN SKIRT is required for mimicry target-induced microRNA degradation in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol.* 2019 Nov 1;61(11):1121–7.
268. Golden RJ, Chen B, Li T, Braun J, Manjunath H, Chen X, et al. An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature.* 2017 Feb 9;542(7640):197–202.
269. Quévillon Huberdeau M, Zeitler DM, Hauptmann J, Bruckmann A, Fressigné L, Danner J, et al. Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for micro RNA -guided gene silencing in vivo . *EMBO J.* 2017 Jul 14;36(14):2088–106.
270. Hacquard T, Clavel M, Baldrich P, Lechner E, Pérez-Salamó I, Schepetilnikov M, et al. The Arabidopsis F-box protein FBW2 targets AGO1 for degradation to prevent spurious loading of illegitimate small RNA. *Cell Rep.* 2022;39(2).
271. Kobayashi H, Shoji K, Kiyokawa K, Negishi L, Tomari Y. Iruka Eliminates Dysfunctional Argonaute by Selective Ubiquitination of Its Empty State. *Mol Cell.* 2019;73(1):119–29.e5.
272. Doyle J, Doyle J. A rapid DNA isolation from small. amount of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull .* 1987;19:11–5.
273. Zhang Y, Chen M, Siemiatkowska B, Toleco MR, Jing Y, Strotmann V, et al. A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Commun.* 2020 Sep 14;1(5).
274. Canto T, Uhrig JF, Swanson M, Wright KM, MacFarlane SA. Translocation of Tomato Bushy Stunt Virus P19 Protein into the Nucleus by ALY Proteins Compromises Its Silencing Suppressor Activity . *J Virol.* 2006 Sep 15;80(18):9064–72.
275. Westhof E. How to silence silencing. Vol. 11, *Chemistry and Biology.* Elsevier Ltd; 2004. p. 158–60.
276. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
277. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;9(7):676–82.
278. Fields S. The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Methods.*

- 1993;5:116–24.
279. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20.
 280. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr;9(4):357–9.
 281. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug;25(16):2078–9.
 282. Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, et al. SHOREmap: Simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods*. 2009;6(8):550–1.
 283. Sun H, Schneeberger K. Shoremap v3.0: Fast and accurate identification of causal mutations from forward genetic screens. *Methods Mol Biol*. 2015;1284:381–95.
 284. Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*. 2012 Feb;30(2):174–8.
 285. Deshaies RJ. SCF AND CULLIN/RING H2-BASED UBIQUITIN LIGASES. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:435–67.
 286. Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol*. 2000;1(5):reviews3002.1–3002.7.
 287. Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol*. 2002 Jan 7;156(1):53–64.