

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**“Estudio del acoplamiento entre la transcripción y el  
procesamiento de micro ARNs en plantas”**

Lic. Lucía Gonzalo

Director de Tesis: Dr. Pablo A. Manavella

Laboratorio de Biología del ARN  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

-2024-

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado. Siempre apoyaré la universidad pública y gratuita.

A CONICET, por financiar este posgrado mediante el otorgamiento de una beca doctoral y por estar siempre a favor de la soberanía nacional.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y su comunidad, por el espacio de trabajo y por favorecer mi crecimiento profesional.

Al Dr. Pablo A. Manavella, por su guía durante todos estos años, tanto en lo experimental como en el estímulo a mi desarrollo como científica.

A mis compañeros de laboratorio, a cada uno de ellos con quienes compartí tiempo durante casi seis años. Gracias por las charlas académicas, pero sobre todo por el apoyo emocional.

A mi familia y amigos, por el ánimo y la energía que siempre me dieron.

A JP y Loli, por estar esperando en casa cada día y por acompañarme siempre.

*Esta tesis se la dedico a una gran mujer...*

*mi mamá...*

## APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO

### PUBLICACIONES

**Gonzalo L.**, Giudicatti A.J., Manavella P.A. “HYL1's multiverse: A journey through miRNA biogenesis and beyond canonical and non-canonical functions of HYL1” (2024) **Current Opinion in Plant Biology**, 80:102546. DOI: 10.1016/j.pbi.2024.102546

Marmisolle F.E., Borniego M.B., Cambiagno D.A., **Gonzalo L.**, García M.L., Manavella P.A., Hernández C., Reyes C.A. “Citrus psorosis virus 24K protein inhibits the processing of miRNA precursors by interacting with components of the biogenesis machinery” (2024) **Microbiology Spectrum**. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03513-23>

Mencia R.\*, **Gonzalo L.\***, Tossolini I.\*, Manavella P.A. “Keeping up with the miRNAs: current paradigms of the biogenesis pathway” (2022) **Journal of Experimental Botany**, erac322. DOI: 10.1093/jxb/erac322

\*All authors contributed equally to this work.

**Gonzalo L.**, Tossolini I., Gulanicz T., Cambiagno D.A., Kasproicz-Maluski A., Smolinski D.J., Mammarella M.F., Ariel F.D., Marquardt S., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A., Manavella P.A. “R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants” (2022) **Nature Plants**, 8:402-418. DOI: 10.1038/s41477-022-01125-x

Tomassi A.H., Re D.A., Romani F., Cambiagno D.A., **Gonzalo L.**, Moreno J.E., Arce A.L., Manavella P.A. “The intrinsically disordered protein CARP9 bridges HYL1 to AGO1 in the nucleus to promote micro RNA activity”. (2020) **Plant Physiology**, 184:316–329. DOI: 10.1104/pp.20.00258



# INDICE

<b>2 RESUMENES</b> .....	10
2.1 Resumen .....	10
2.2 Abstract.....	11
<b>3 INTRODUCCIÓN</b> .....	12
3.1 Genes <i>MIRNA</i> y su transcripción. ....	12
3.2 Estructura y procesamiento de los pri-miARN.....	14
3.3 Complejo de procesamiento y co-factores del procesamiento de <i>MIRNA</i> .....	18
3.4 Formación del microprocesador asociado a los loci <i>MIRNA</i> . ....	19
3.5 Eventos de procesamiento co-transcripcionales del ARN.....	20
3.6 R-loops, otro evento co-transcripcional.....	22
3.7 Exportación núcleo-citoplasma y movimiento de miARNs. ....	24
3.8 La historia de HASTY.....	27
3.9 Función de HWS en la biogénesis de miARNs y su previa relación con HST. ....	28
3.10 Complejo del poro nuclear y su rol en la expresión génica. ....	30
3.11 Proteínas asociadas al poro nuclear involucradas en la biogénesis de miARNs.....	32
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>5 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
5.1 Material vegetal. ....	36
5.2 Condiciones de crecimiento y tratamientos.....	36
5.3 Plásmidos.....	37
5.4 Cepas de bacterias y levaduras utilizadas. ....	38
5.5 Construcciones.....	38
5.6 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	40
5.7 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	40
5.8 Purificación de fragmentos de ADN.....	41
5.9 Clonados en vectores de entrada y vectores destino. ....	41
5.10 Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis</i> por inmersión floral. ....	42
5.11 Transformación transitoria de plantas de <i>N. benthamiana</i> por agroinfiltración. ....	42
5.12 Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	43
5.13 Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico. ....	44

5.14 Minipreparación de ADN plasmídico.....	44
5.15 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN. ....	45
5.16 Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.....	45
5.17 Aislamiento de ARN de plantas.....	45
5.18 Transcripción reversa (RT).....	46
5.19 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	47
5.20 <i>Northern blot</i> no radioactivo para la detección de ARNs pequeños. ....	47
5.21 Aislamiento de ARNs unido a la cromatina y ARNs libres en nucleoplasma. ....	48
5.22 Inmunoprecipitación de la cromatina. ....	48
5.23 Tratamiento con RNasa H de núcleos bioquímicamente activos. ....	49
5.24 Inmunoprecipitación del híbrido ADN-ARN (DRIP).....	50
5.25 <i>Cleavage Under Targets &amp; Release Using Nuclease (CUT&amp;RUN)</i> .....	51
5.26 Preparación de librerías y Secuenciación. ....	52
5.27 Tinción de raíces con fucsina básica.....	53
5.28 Separación de tejidos vasculares y epidérmicos en hojas de Arabidopsis... ..	53
5.29 Extracción de proteínas totales de Arabidopsis. ....	54
5.30 Separación de proteínas y análisis por <i>Western blot</i> . ....	54
5.31 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM). ....	55
5.32 Ensayos de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP) seguido de <i>Western blot</i> . ....	56
5.33 Co-transformación de levaduras.....	56
5.34 Ensayos de doble híbrido en levaduras. ....	57
5.35 Fraccionamiento núcleo-citoplasma.....	57
5.36 Mutagénesis en semillas de Arabidopsis con etil-metano-sulfonato (EMS).. ..	58
5.37 <i>Suppressor screening</i> por mutagénesis con EMS.....	59
5.38 Generación de grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo.....	59
5.39 Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación.....	60
5.40 Análisis bioinformático de los datos de plaNET-seq para el estudio del procesamiento co-transcripcional. ....	61
5.41 Análisis de datos de espectrometría de masas HWS/HWS. ....	62
5.42 Ontología Génica.....	62
5.43 Árboles filogenéticos. ....	63
5.44 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	63
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	71

<b>6.1 SECCIÓN 1: Procesamiento co-transcripcional</b> .....	71
6.1.1 Los pri-miARNs pueden ser procesados de forma co-transcripcional.....	71
6.1.2 Diferencias en el procesamiento co-transcripcional entre BTL y LTB.....	75
6.1.3 plaNET-seq como herramienta para predecir mecanismo de procesamiento de pri-miARNs.....	78
6.1.4 Los pri-miARNs son procesados tanto de manera co-transcripcional como post-transcripcional. ....	79
6.1.5 La tasa de procesamiento co-transcripcional es dinámica. ....	83
6.1.6 Los R-loops promueven el procesamiento co-transcripcional de miARNs. ....	85
6.1.7 miARNs policistrónicos y miRtrons en el procesamiento co-transcripcional.....	89
6.1.8 Dinámica del Procesamiento Co-transcripcional - Puesta a punto del tratamiento. ....	90
6.1.9 CUT&RUN: Análisis de la dinámica de ensamblaje del microprocesador.	93
<b>6.2 SECCIÓN 2: Regulación del procesamiento co-transcripcional</b> .....	95
6.2.1 El rol de HASTY en el procesamiento co-transcripcional.....	95
6.2.2 <i>Suppressor-Screenig</i> de <i>hst-15</i> . ....	97
6.2.3 Una mutación en <i>HWS</i> revierte el fenotipo de <i>hst-15</i> .....	99
6.2.4 La supresión del fenotipo <i>hst-15</i> en mutantes <i>hws</i> no sería causada por un cambio en los niveles proteicos de HST.....	102
6.2.5 HWS interactúa con el poro nuclear y un gran número de proteínas exportadoras/importadoras. ....	105
6.2.6 HWS afecta la localización celular de HST influenciando el movimiento no-autónomo de miARNs. ....	108
6.2.7 La transcripción y procesamiento de pri-miARNs ocurriría asociada al poro nuclear.....	112
6.2.8 HWS degradaría MED37 afectando de esta manera el procesamiento co-transcripcional y la asociación de HST con los loci de <i>MIRNA</i> .....	114
<b>7 CONCLUSIONES</b> .....	116
<b>8 SUPLEMENTARIA</b> .....	120
<b>9 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	126

# 1 ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

**μL:** Microlitros

**μM:** Micromolar

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

**AD:** Dominio de Activación

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia

**ADNdc:** ADN de doble cadena

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNasa:** Ribonucleasa

**ARNdc:** ARN de doble cadena

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ARNlnc:** ARN no codificante largo

**ARNsc:** ARN monocatenario o simple cadena

**BD:** Dominio de unión

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

**BTL:** tipo de procesamiento de la base al loop (*Base To Loop*)

**BTLs:** tipo de procesamiento de la base al loop con cortes secuenciales (*Base to Loop Sequential*)

**CaMV:** Virus del mosaico de la coliflor

**ChIP:** Inmunoprecipitación de la cromatina

**cm:** Centímetros

**Co-IP:** Co-inmunoprecipitación

**Col-0:** Ecotipo Columbia

**CTD:** dominio C-terminal (*C-terminal domain*)

**C-terminal:** dominio Carboxilo terminal de una proteína.

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

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

**OD:** Densidad óptica

**dc:** Doble cadena (*double stranded*)

**dsRBD:** Dominio de unión a ARN doble cadena

**DRB:** Diclorobenzimidazol 1-β-D-ribofuranósido

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilen diamino tetraacético

**EMS:** Metanosulfonato de etileno o etilmetanosulfonato

**FISH:** Hibridación Fluorescente *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridisation*)

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

**g:** Gravedad o gramos

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**IgG:** Inmunoglobulina G

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

**L:** Litro

**LB:** Luria-Bertani

**LTB:** tipo de procesamiento del loop a la base (*Loop to Base*)

**LTBs:** tipo de procesamiento del loop a la base con cortes secuenciales (*Loop to Base Sequential*)

**M:** Molar

**m6A:** N6-metiladenosina

**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”)

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetros

**mM:** Milimolar (milimoles/litro)

**mmol:** Milimoles

**MS:** Medio de cultivo Murashige-Skoog

**ng:** Nanogramos

**nm:** Nanómetros

**nM:** Nanomolar

**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

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pM:** picoMolar

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

**pre-miARN:** Precursor de micro ARN

**pri-miARN:** 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

**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.

**sARNs:** ARNs pequeños

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante

**sARN-seq:** Secuenciación masiva de sRNAs

**TAE:** Tris Acético EDTA

**TBE:** Tris Boro EDTA

**TdT:** transferasa terminal

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

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

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

**U:** unidades

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

**v/v:** Volumen en volumen (Mililitros de soluto en 100 ml de solución)

**V:** Volts

## 2 RESUMENES

### 2.1 Resumen

Los microARNs (miARNs) son una clase de ARNs pequeños no codificante que juegan un papel crucial en la regulación génica postranscripcional. Su biogénesis es un proceso complejo y finamente controlado. A grandes rasgos, este proceso implica la transcripción de genes *MIRNA* por la ARN polimerasa II (Pol II) y el posterior procesamiento del transcrito resultante (pri-miARN) por el complejo de procesamiento de miARNs. Recientemente se encontró que algunos componentes del complejo de procesamiento podían asociarse con regiones genómicas que codifican miARNs. En esta tesis, nos preguntamos si la transcripción de pri-miARNs y su procesamiento podrían ocurrir simultáneamente. Utilizando secuenciación de transcritos nacientes, herramientas bioinformáticas y otros ensayos moleculares confirmamos que el procesamiento de miARNs ocurre acoplado con la transcripción. Además, describimos que el procesamiento llevado a cabo desde el bucle hacia la base de los precursores de miARNs ocurre enteramente durante la transcripción, mientras que el procesamiento opuesto, desde la base hacia el bucle, requiere un paso post-transcripcional adicional para la liberación de miARNs maduros. Nuestros resultados también revelaron la existencia de un equilibrio entre el procesamiento co-transcripcional y el procesamiento post-transcripcional canónico para la mayoría de los miARNs. Este equilibrio se encuentra modulado tanto por la presencia de híbridos ADN/ARN, conocidos como R-loops, sobre los loci *MIRNA* como por la proteína HASTY (HST), que promueve la asociación de DICER-LIKE1 (DCL1) a los loci de *MIRNA* y el ensamblado co-transcripcional del complejo de procesamiento. Finalmente, y a través de un *suppressor screening*, encontramos que HAWAIIAN SKIRT (HWS), una proteína del tipo F-box, modula el procesamiento co-transcripcional de miARNs al interactuar con HST, alterando los niveles del complejo MEDIATOR, la asociación de pri-miARNs con la membrana nuclear y en última instancia impactando potencialmente la dinámica de exportación núcleo/citoplasma de miARNs maduros y el movimiento intercelular de miARNs.

## 2.2 Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNA that play a crucial role in post-transcriptional gene regulation. Their biogenesis is a complex and finely controlled process. This process involves the transcription of *MIRNA* genes by RNA polymerase II (Pol II) and the subsequent processing of the resulting transcript (pri-miRNA) by the miRNA processing complex. Recently, it has been found that some processing complex components can be associated with genomic regions encoding miRNAs. In this thesis, we asked whether the transcription of pri-miRNAs and their processing could occur simultaneously. Using nascent transcript sequencing, bioinformatics tools, and other molecular assays, we confirmed that miRNA processing occurs coupled with transcription. Additionally, we described that processing carried out from the loop to the base of miRNA precursors occurs entirely during transcription, whereas the opposite processing, from the base to the loop, requires an additional post-transcriptional step for the release of mature miRNAs. Our results also revealed the existence of a balance between co-transcriptional processing and canonical post-transcriptional processing for most miRNAs. This balance is modulated by the presence of DNA/RNA hybrids, called R-loops, on *MIRNA* loci, as well as by the protein HASTY (HST), which promotes the association of DICER-LIKE1 (DCL1) to *MIRNA* loci and the co-transcriptional assembly of the processing complex. Finally, through a suppressor screening, we found that HAWAIIAN SKIRT (HWS), an F-box type protein, modulates co-transcriptional processing of miRNAs by interacting with HST, altering the levels of the MEDIATOR complex, the association of pri-miRNAs with the nuclear membrane, and ultimately impacting the dynamics of nuclear/cytoplasmic export of mature miRNAs and the intercellular movement of miRNAs.



### 3 INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, han desarrollado una amplia gama de mecanismos para regular la expresión génica, lo que les permite adaptarse a diversas condiciones ambientales, incluidas adversidades climáticas, disponibilidad de nutrientes y diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. Entre estos mecanismos, se destaca la acción de ARN pequeños, moléculas de aproximadamente 20 a 24 nucleótidos de longitud, que desempeñan un papel central en las vías de silenciamiento génico transcripcional (TGS del inglés *Transcriptional Gene Silencing*) y post-transcripcional (PTGS del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*) en organismos superiores (Manavella et al., 2019; Zhan & Meyers, 2023). Los ARN pequeños se han clasificado en subfamilias según sus orígenes, mecanismos de biogénesis, proteínas involucradas en cada vía, y en sus modos de acción (Axtell, 2013). Una de estas subfamilias son los micro ARNs (miARNs), moléculas de 21 nt que, mediante complementariedad de bases, reconocen ARNs mensajeros (ARNm) diana y regulan su expresión por clivaje o inhibición de la traducción (Bologna & Voinnet, 2014). Esto convierte a los miARNs en las principales moléculas encargadas del PTGS en organismos superiores. A lo largo de esta tesis profundizaremos en la biogénesis de estas pequeñas moléculas, estudiando desde etapas tempranas como la transcripción de sus genes hasta etapas más tardías, cómo requisitos particulares para su acción.

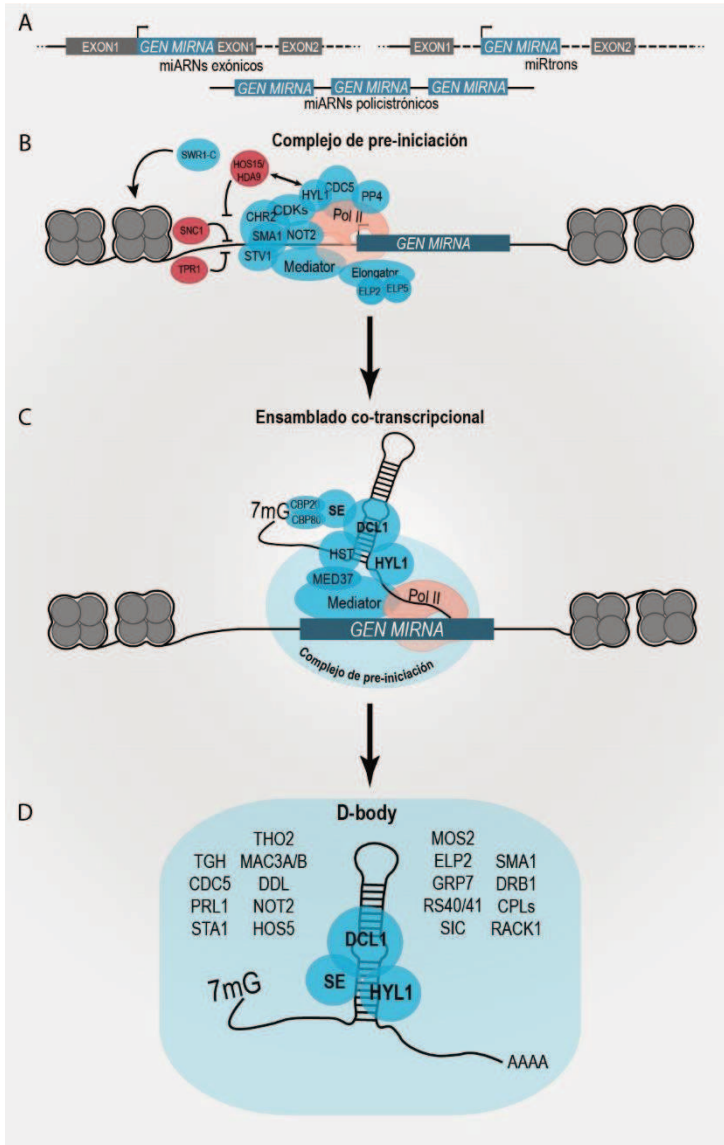
#### 3.1 Genes *MIRNA* y su transcripción.

A diferencia de lo que sucede en animales, donde las secuencias que codifican miARNs se encuentran comúnmente albergadas dentro de genes codificantes, en *Arabidopsis* la mayoría de los genes *MIRNA* representan unidades de transcripción independientes situadas en zonas intergénicas, aunque algunos están ubicados dentro de genes codificantes de proteínas, ya sea en exones (miARNs exónicos) o en intrones (miRtrones) (Meng & Shao, 2012; Xie et al., 2005) (Figura 1A). Los genes *MIRNA*, además de contener las secuencias que codifican para los precursores de miARNs, pueden contener intrones de longitud variable, que oscilan desde menos de 100 pb hasta 3649 pb, y cuya presencia constituyen elementos regulatorios para el procesamiento del transcrito (Bielewicz et al., 2013). En metazoos, los transcritos primarios que dan origen a los precursores de miARNs (pri-miARNs) son generalmente cortos y uniformes en longitud. Por el contrario, en plantas los pri-miARNs son extremadamente variables, llegando incluso a existir pri-miARNs policistrónicos. Estos últimos son precursores de miARNs adyacentes que se transcriben como un único transcrito primario (Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2009). Los eventos de empalme alternativo (o *splicing* en inglés), la selección alternativa de los sitios de

poliadenilación y/o múltiples sitios de inicio de transcripción (TSS, del inglés *Transcription Start Site*), contribuye a generar una población diversa de pri-miARNs con diferentes formas y longitudes, la cual es particularmente variable en especies vegetales (Cui et al., 2009).

Al igual que los ARNm, los pri-miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II (Pol II) y sufren modificaciones post-transcripcionales típicas como la adición del CAP en su extremo 5' y poliadenilación en su extremo 3'. Al igual que ocurre con los genes codificantes de proteínas, la regulación transcripcional de cada gen *MIRNA* está controlada por factores de transcripción específicos. Sin embargo, se han identificado factores de transcripción que afectan a la transcripción de todos los miARNs en conjunto y de forma menos específica. Por ejemplo, la fosforilación en el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la Pol II por parte de las CICLINAS-DEPENDIENTES KINASAS (CDKF1 y CDKDs) afecta su posicionamiento sobre genes *MIRNA* y el agregado del CAP (Hajheidari et al., 2012). El complejo MEDIATOR, las subunidades ELP2 y ELP5 del complejo Elongator y NEGATIVE ON TATA LESS 2 (NOT2), conocidos reguladores de la actividad de la Pol II, también interaccionan con genes *MIRNA* regulando su transcripción (Fang et al., 2015; Kim et al., 2011; Wang et al., 2013). Recientemente, se ha descubierto que la proteína HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) interactúa con la Pol II y controlando la iniciación y elongación de la transcripción de genes *MIRNA* (Bielewicz et al., 2023). Además, diversos estudios han demostrado que las proteínas MYB CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5), SHORT VALVE 1 (STV1), PROTEIN PHOSPHATASE 4 (PP4), el factor de *splicing* SMALL1 (SMA1) y CHROMATIN REMODELLING FACTOR 2 (CHR2) se asocian con promotores de los genes *MIRNA* para favorecer la asociación de la Pol II y la transcripción (Li et al., 2018; Su et al., 2017; Wang et al., 2019; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2013). A nivel de cromatina, se ha demostrado que el complejo de remodelación de cromatina SWR1 dependiente de ATP (SWR1-C) regula la transcripción de genes *MIRNA* alterando la dinámica de los nucleosomas (Choi et al., 2016) y que el complejo HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15 (HOS15) / HISTONE DEACETYLASE9 (HDA9), mediante su interacción con HYL1, promueve el silenciamiento de un grupo específico de genes *MIRNA* al promover la acetilación de la cromatina (Park et al., 2023) (Figura 1B). Se han identificado proteínas que actúan negativamente en la transcripción de los genes *MIRNA*, como por ejemplo SUPPRESSOR of npr1-1 CONSTITUTIVE 1 (SNC1) y TOPLESS RELATED 1 (TPR1) (Cai et al., 2018) (Figura 1B). También se han encontrado casos donde una misma proteína aumenta la transcripción de cierto grupo de miARNs mientras que disminuye el de otros, como es el caso de CYCLING DOF TRANSCRIPTION FACTORS 2 (CDF2), lo que

no dista mucho del mecanismo general de regulación transcripcional de muchos factores de transcripción (Sun et al., 2015). Para la mayoría de las proteínas aquí descritas se desconoce los mecanismos moleculares que les permiten reconocer específicamente genes miARNs.



**Figura 1. Transcripción de *MIRNA* y procesamiento de pri-miARNs en *Arabidopsis*.**

**A-** La mayoría de los genes *MIRNA* se expresan como unidades transcripcionales independientes, aunque existen excepciones como aquellos exónicos, miRtrons o los que están dispuestos en tándem para generar pri-miARNs policistrónicos. **B-** Todos los miARNs comparten factores de transcripción en común; algunos de estos factores promueven la transcripción mediante interacciones con la Pol II, mientras que otros se unen a los promotores de los *MIRNA*, y el complejo SWR1-C actúa sobre los nucleosomas para garantizar la apertura de la cromatina y la transcripción (factores representados en celeste). También se han identificado proteínas que ejercen un efecto negativo sobre este proceso (factores representados en rojo). **C-** Un número significativo de proteínas pertenecientes al complejo de procesamiento de pri-miARNs son capaces de asociarse a los loci *MIRNA*. **D-** La visión canónica del procesamiento de miARNs, establecía que completada la transcripción del pri-miARN, este es procesado en estructuras denominadas D-bodies.

### 3.2 Estructura y procesamiento de los pri-miARN.

La complementariedad de secuencias entre las repeticiones invertidas que constituyen los genes *MIRNA* causa que los pri-miARNs adopten, al transcribirse, una estructura de tallo-bucle característica, dominada por una región de ARN doble cadena imperfecta de longitud variable. Además de esta región característica, los pri-miARNs contienen dos regiones de

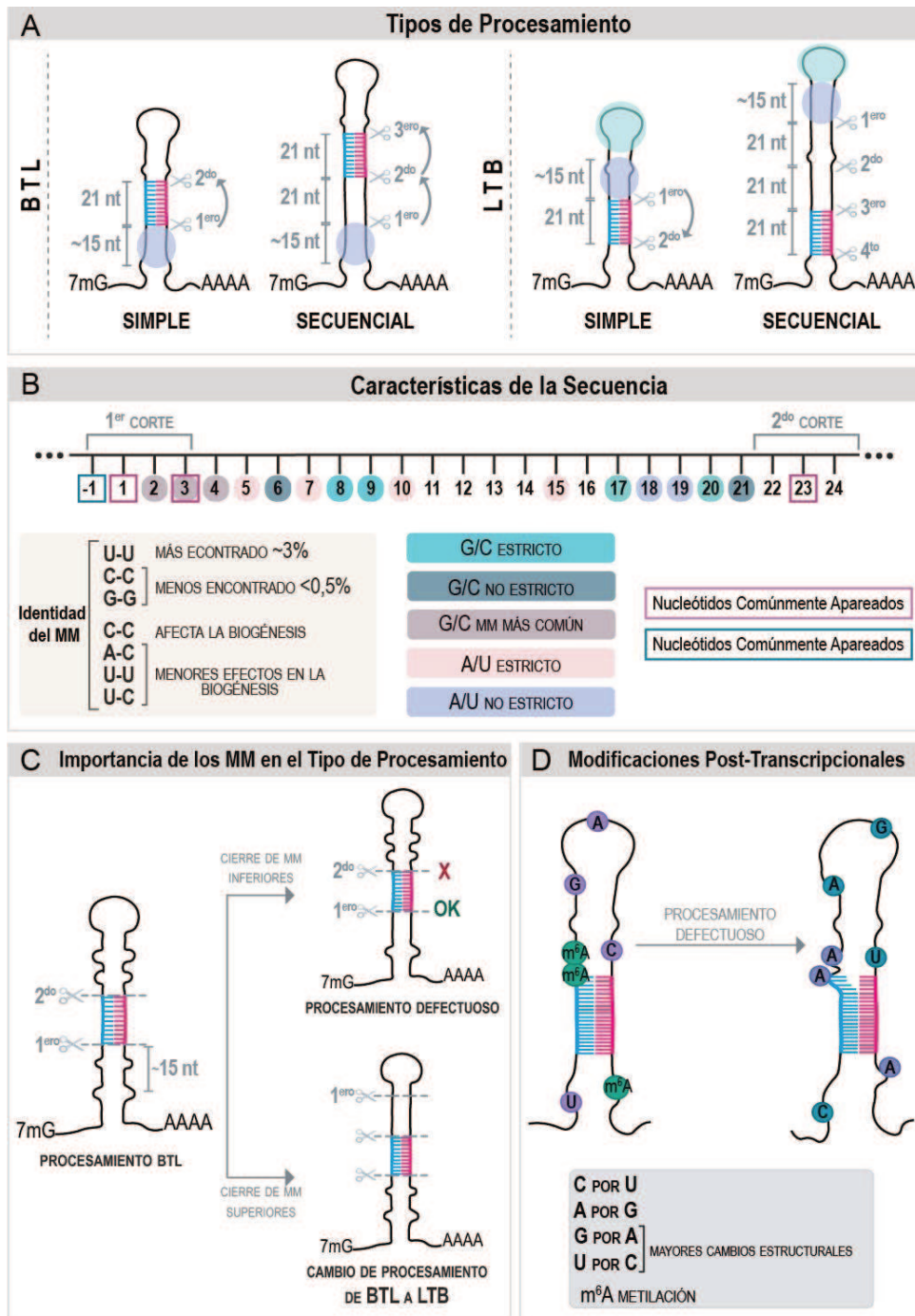
ARN simple cadena (ARNsc), en los extremos 5' y 3' cuya longitud puede variar dependiendo de ubicación variable del TSS y del sitio poliA (Mencia et al., 2022; Voinnet, 2009) (Figura 1C).

En animales, el procesamiento de los pri-miARNs sigue un proceso de etapas bien definidas. La primera etapa ocurre en el núcleo, donde la enzima Drosha corta el pri-miARN en su base, liberando los brazos 5' y 3' de ARNsc. Este paso resulta en la formación de lo que se conoce como pre-miARN, el cual es exportado al citoplasma para su posterior procesamiento. En este compartimento celular, la enzima Dicer realiza dos cortes adicionales liberando del dúplex de miARN maduro (miARN/miARN\*) del pre-miARN. En plantas, la enorme variabilidad estructural y de tamaño de los pri-miARN requiere de una maquinaria de procesamiento más flexible. En plantas el procesamiento de miARNs ocurre enteramente en el núcleo y es catalizado por una única enzima, DCL1 (Chapman & Carrington, 2007) (Figura 1D). Debido a la necesidad de poder procesar el heterogéneo conjunto de pri-miARNs de plantas, DCL1 es una enzima mucho más flexible que sus homólogos de animales pudiendo procesar los pri-miARNs tanto desde la base al bucle (procesamiento BTL, del inglés *Base To Loop*), como en animales, o desde el bucle a la base (procesamiento LTB, del inglés *Loop To Base*) (Bologna et al., 2009; Zhu et al., 2013) (Figura 2A). Además, tanto el procesamiento BTL como LTB pueden involucrar múltiples cortes por parte de DCL1 para liberar el dúplex miARN/miARN\*, lo que se conoce como procesamiento secuencial (BTLs o LTBs, del inglés *Base To Loop secuential* o *Loop To Base secuential*) (Moro et al., 2018) (Figura 2A). En parte, la flexibilidad de DCL1 está dada por un conjunto de proteínas accesorias que la asisten durante el procesamiento, en particular HYL1 y SE (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006).

En el mecanismo BTL, la maquinaria de procesamiento de miARNs reconoce una pequeña burbuja, generada por un apareamiento imperfecto, en el tallo de ARN doble cadena (ARNdc), aproximadamente 15–17 pb debajo del dúplex miARN/miARN\*, donde se produce el primer corte, luego DCL1 realiza el segundo corte 21 nucleótidos hacia el bucle (Mateos et al., 2010; Song et al., 2010; Werner et al., 2010) (Figura 2A). Por otro lado, en el mecanismo LTB, el primer corte mediado por DCL1 ocurre en la parte superior del precursor, debajo de un pequeño bucle terminal que sirve como guía (Addo-Quaye et al., 2009; Bologna et al., 2009; Moro et al., 2018) (Figura 2A). Además de la estructura secundaria, la secuencia misma del pri-miARN juega un papel fundamental en el procesamiento. Se ha observado la importancia de una secuencia rica en GC en la región

del dúplex miARN/miARN\*, necesaria para el preciso posicionamiento de HYL1 y, por consiguiente, para la correcta escisión del dúplex de miARN por DCL1 (Narjala et al., 2020) (Figura 2B). La identidad de los nucleótidos dentro de la región de corte de DCL1 también es crucial para la biogénesis del miARN, donde el emparejamiento de nucleótidos en las posiciones 1, 3 y 23, y nucleótidos no emparejados en la posición -1, son necesarios para un corte eficiente (Figura 2B) (Rojas et al., 2020). En este sentido, cerrar los nucleótidos no emparejados ubicados por encima de la región de miARNs, promueve el procesamiento LTB, y por el contrario, cerrar los nucleótidos desapareados en el lado inferior del dúplex miARN/miARN\* disminuye la eficiencia del segundo corte por DCL1 (Hirata et al., 2022) (Figura 2C). Teniendo en cuenta la relevancia de la estructura secundaria del pri-miARN durante su procesamiento, no es sorprendente que las modificaciones post-transcripcionales de ARNs que afectan la estructura de los pri-miARNs también impacten la biogénesis miARNs (Ebhardt et al., 2009; Iida et al., 2009; Meng et al., 2010). Por ejemplo, se ha encontrado que la metilación m6A es necesaria para mantener niveles adecuados de miARNs maduros y de sus precursores en Arabidopsis (Bhat et al., 2020) (Figura 2D).

Luego de culminado el procesamiento de los pri-miARNs, se produce la liberación del dúplex de miARN/miARN\*, el cual permanece asociado a HYL1, y es metilado su extremo 3' por HUA ENHANCER1 (HEN1) para evitar su degradación por exonucleasas y favorecer su exportación al citoplasma (Baranuske et al., 2015; Yu et al., 2005).



**Figura 2. Estructura y modificaciones de pri-miARNs.** A- El procesamiento de pri-miARNs por DCL1 puede ocurrir desde la base hacia el bucle (BTL o BTLs), o viceversa comenzando en el bucle (LTB o LTBs). En los tipos de procesamiento BTL, DCL1 reconoce un pequeño abultamiento cerca de la base del tallo del pri-miARN y corta 15-17 nt hacia arriba. Los siguientes cortes están separados entre sí por 21 nt cada uno. En los procesamientos LTB, DCL1 reconoce un pequeño bucle al final del tallo, cortando a 15-17 nt hacia abajo sobre el tallo y luego cada 21 nt. Para pri-miARNs largos, se requieren múltiples cortes secuenciales por DCL1 para liberar miARNs maduros. B- Posiciones críticas dentro de la secuencia del miARN y en las cercanías de los sitios de corte de DCL1, necesarios para un procesamiento eficiente de pri-miARNs (arriba).

Rigurosidad en la identidad de nucleótidos, bases no apareadas (MMs, del inglés *mismatches*) y nucleótidos apareados en diferentes posiciones de la región del miARN en el pri-miARN (abajo). **C-** Efecto de cerrar MMs cerca de la secuencia de miARN en el procesamiento de pri-miARNs. Cerrar MMs ubicados por debajo de la región del miARN no afecta el primer corte de DCL1, pero afecta el segundo, causando un procesamiento defectuoso. En cambio, cerrar MMs por arriba de la región del miARN produce un cambio en el tipo de procesamiento, de BTL a LTB. **D-** Después de la transcripción, los pri-miARNs experimentan sustitución de bases y metilación de adenina (m6A). Estos cambios perturban la estructura de pri-miARN y frecuentemente impactan negativamente en la biogénesis de miARNs.

### **3.3 Complejo de procesamiento y co-factores del procesamiento de *MIRNA*.**

El concepto de complejo de procesamiento de miARNs en plantas o “microprocesador” fue concebido poco después del descubrimiento de DCL1 como la RNasa central de la vía (Park et al., 2002) y al identificar a HYL1 y SE como elementos centrales del complejo de biogénesis de miARNs (Han et al., 2004; Lobbes et al., 2006; Vazquez et al., 2004). HYL1 es una proteína de unión a ARN doble cadena (ARNdc) que al formar homodímeros se une a la región doble hebra de los pri-miARNs facilitando la interacción y posicionamiento de DCL1 para dirigir el corte en los sitios específicos (Kurihara et al., 2006; Yang et al., 2010; Yang et al., 2014). Por otro lado, SE puede unirse tanto a DCL1 como al pri-miARN, orientando el precursor hacia el sitio catalítico de DCL1, actuando así como punto de anclaje entre el ARN, HYL1 y DCL1 (Dong et al., 2008; Machida et al., 2011; Yang et al., 2006). Por mucho tiempo, se postuló que el procesamiento de los pri-miARNs por el microprocesador ocurría en el nucleoplasma, específicamente en corpúsculos nucleares sin membrana conocidos como D-bodies, concepto desafiado por algunos trabajos, incluidas esta tesis (Fang & Spector, 2007; Xie et al., 2021) (Figura 1D). Independientemente del lugar donde ocurra el procesamiento de miARNs dentro del núcleo, décadas de investigación han ampliado enormemente el repertorio de proteínas identificadas como reguladoras de este proceso. La mayoría de estas proteínas, discutidas en revisiones recientes (Dong et al., 2022; Li & Yu, 2021) y enumeradas en la Figura 1D, fueron identificadas gracias a *screening* genéticos usando distintos sistemas reporteros (Chaabane et al., 2013; Francisco-Mangilet et al., 2015; Li et al., 2018; Speth et al., 2013). Aún, cuando el rol de la mayoría de estas proteínas en la biogénesis o acción de miARNs es generalmente indiscutido, sus mecanismos de acción precisos son mayormente desconocidos. Esto llevó a que en los últimos años se haya renovado el interés en el estudio de proteínas previamente descritas como co-factores de la biogénesis de miARNs, pero cuyo papel no estaba claro o era ambiguo. Por ejemplo, TOUGH (TGH), que inicialmente

fue identificada simplemente como una proteína de unión a pri-miARNs y proteínas del complejo de procesamiento (Ren et al., 2012), recientemente se ha demostrado que facilita el reclutamiento de DCL1 a los pri-miARNs y promueve la edición de N6-metiladenosina (m6A) de los precursores de miARNs (Bhat et al., 2020). Del mismo modo, un estudio reciente profundizó en la función de la PROTEÍNA FOSFATASA 4 (PP4), inicialmente descrita como un factor de biogénesis de miARNs que regula la fosforilación y estabilidad de HYL1 (Su et al., 2017), hoy se sabe que este complejo proteico se asocia con la cromatina en los loci *MIRNA*, interactúa con la Pol II y facilita el reclutamiento de HYL1 a estos genes (Wang et al., 2019) (Figura 1B). Casi veinte años después de haber sido asociada con la biogénesis de miARNs como su potencial exportina (Park et al., 2005), nuevos trabajos exploraron las funciones de HASTY (HST) y han definido que su acción en la biogénesis de miARNs es independiente de su actividad de exportina, situándola en etapas mucho más tempranas del procesamiento de miARNs y vinculándola con el transporte intercelular de miARNs, como se discute más adelante (Brioudes et al., 2021; Cambiagno et al., 2021) (Figura 1C).

### **3.4 Formación del microprocesador asociado a los loci *MIRNA*.**

Durante las últimas décadas nuestra visión de la vía de biogénesis de miARNs ha estado dominada por paralelismos a su contraparte en animales donde hay etapas separadas espacialmente dentro de la célula. Esto llevó al modelo actual donde cada etapa del procesamiento se la ilustra de forma aislada e independiente de la anterior y siguiente en el nucleoplasma celular. La naturaleza única de DCL1 como principal enzima en esta vía desdibuja estos límites y convierte a la biogénesis de miARNs en un proceso dinámico y continuo. De hecho, en los últimos años, se ha identificado que muchas de las proteínas clave en el procesamiento de pri-miARNs son capaces de unirse a los genes *MIRNA* a nivel cromosómico. Por ejemplo, el complejo Elongator, presente en todos los eucariotas promoviendo la actividad transcripcional de la Pol II (DeFraia & Mou, 2011; Kolaj-Robin & Séraphin, 2017), en plantas, interactúa con DCL1 y pri-miARNs sobre los genes *MIRNA* (Fang et al., 2015). Este trabajo fue el primer reporte directo sugiriendo que el complejo de procesamiento de pri-miARNs era capaz de unirse a la cromatina (Figura 1C). Esto planteaba la posibilidad de que la transcripción y el procesamiento de miARNs fueran procesos relacionados en plantas. De hecho, reportes anteriores vinculando a distintos cofactores de la Pol II, factores de *splicing* o proteínas del CAP, como SE, C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 (CPL1), ABA HYPERSENSITIVE 1 (ABH1) o el complejo

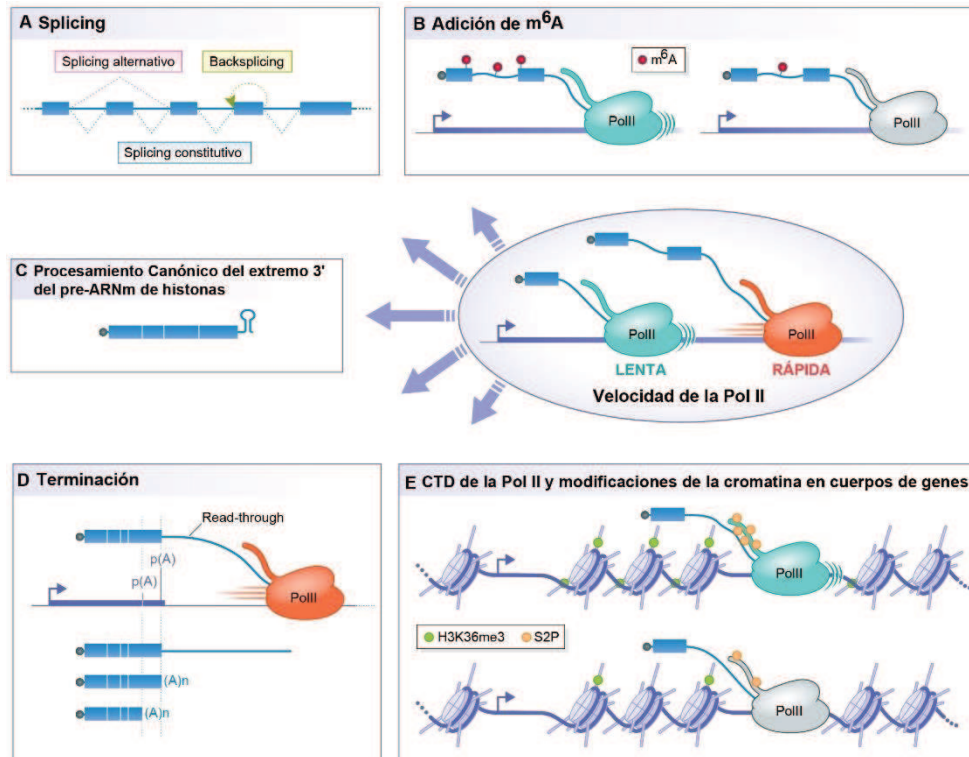


MEDIATOR, con la biogénesis de miARNs, insinuaban esta posibilidad (Kim et al., 2008; Kim et al., 2011; Laubinger et al., 2008; Manavella et al., 2012). En el caso del complejo MEDIATOR, compuesto en plantas por 21 subunidades compartidas con levaduras y animales y 6 exclusivas (Bäckström et al., 2007; Kim et al., 2011), se lo asocio tempranamente con la biogénesis de miARNs para recientemente confirmar que al menos su subunidad MED37 sirve de anclaje de HST al complejo transcripcional y ésta, a su vez, recluta a DCL1 a los loci *MIRNA* (Figura 1C) (Cambiagno et al., 2021).

### **3.5 Eventos de procesamiento co-transcripcionales del ARN.**

Un evento de procesamiento o maduración co-transcripcional es aquel que se lleva a cabo durante la transcripción, mientras el ARN naciente está todavía asociado al ADN que lo codifica a través de la ARN polimerasa. Uno de los eventos co-transcripcionales más estudiados, el cual es afectado por la velocidad de la Pol II, es el *splicing* del ARNm. Cambios en la velocidad de la Pol II lleva a un aumento en los eventos de *splicing* alternativo y *back-splicing* (Braberg et al., 2013; De La Mata et al., 2003; Howe et al., 2003; Leng et al., 2020) (Figura 3A). Otro evento co-transcripcional influenciado por la velocidad de la Pol II es la poliadenilación. Un gen puede poseer múltiples sitios poli(A), y el uso diferencial de estos sitios conduce a la formación de distintas isoformas de ARNm, un fenómeno denominado poliadenilación alternativa (Derti et al., 2012; Hunt, 2022). Se ha visto que un aumento de la velocidad de la Pol II, produce transcritos más largos (Muniz et al., 2017) (Figura 3D). La marca m6A en los ARN influye en su *splicing*, degradación y traducción, y puede llevarse a cabo de forma co-transcripcional (He & He, 2021; Knuckles & Bühler, 2018). Una disminución en la velocidad de la Pol II induce un aumento en los nivel de deposición de m6A en los ARNm, y esto se ha relacionado con una reducción en eficiencia de la traducción del ARNm (Slobodin et al., 2017) (Figura 3B). Los ARNm que codifican para histonas carecen de cola poli(A) y en su lugar presentan una estructura de tallo-bucle (Marzluff & Koreski, 2017). Durante su transcripción, estos ARNs se someten a una escisión endonucleolítica en su extremo 3', lo que permite la correcta formación del tallo-bucle. El correcto plegamiento de esta región es esencial para su procesamiento (Dominski et al., 2003; Williams et al., 1994). Mutantes que poseen una velocidad reducida de la Pol II fallan en la formación del tallo-bucle (Saldi et al., 2018), siendo probable que se deba a una competencia entre la tasa de síntesis de ARN y la tasa de plegamiento del ARN naciente (Figura 3C). Diferentes modificaciones post-traduccionales en el CTD de la Pol II, son

necesarias para una correcta transcripción, dado que diferentes estados de fosforilación en el CTD promueven los distintos estados de la transcripción (iniciación, elongación y terminación). Estas modificaciones post-traduccionales se dan durante la transcripción misma de los genes, por lo que son un evento co-transcripcional también. La fosforilación de la Ser2 en el CTD se produce hacia el extremo 3' de los genes para promover la terminación de la transcripción, pero mutantes que presentan una velocidad disminuída de la Pol II poseen una hiperfosforilación de la Ser2 del CTD en el extremo 5' de los genes (Fong et al., 2017). Esto sugiere que el tiempo de permanencia de la Pol II dentro de una zona específica puede modular la deposición o eliminación de modificaciones postraduccionales (Fong et al., 2017) y por lo tanto la fosforilación del CTD estaría controlada por la velocidad de la ARN Pol II (Figura 3E). Las unidades transcripcionales en eucariotas se caracterizan por perfiles de histonas modificadas conservados desde su extremo 5' hasta el 3', las cuales se depositan durante la transcripción misma. Estos perfiles de histonas modificadas son sensibles a la velocidad de la Pol II dado que, una transcripción rápida se correlaciona con la disposición distal de la marca H3K36me3 (Jonkers et al., 2014), mientras que un mutante de la Pol II lenta acumula estas marcas hacia el extremo 5' de los genes (Fong et al., 2017; Soares et al., 2017) (Figura 3E). Todos estos procesos co-transcripcionales, regulados por la velocidad de la Pol II, la cual a su vez se regula en respuesta a estímulos intra y extracelulares, genera variaciones en la composición del transcriptoma afectando múltiples procesos celulares.



**Figura 3. Cambios en la velocidad de la Pol II afecta los eventos co-transcripcionales.** **A-** Eventos de *splicing* alternativo y *back-splicing* aumentan al modificarse la velocidad de la Pol II. **B-** La marca m<sup>6</sup>A aumenta en los ARN nacientes al disminuir la velocidad de la Pol II. **C-** El procesamiento de los ARNm de histonas se ve afectado cuando se afecta la velocidad de la Pol II. **D-** Afectar la velocidad de la Pol II aumentan los eventos de poliadenilación alternativa. Un aumento de la velocidad de la Pol II promueve la aparición de transcritos más largos a los correspondientes al gen. **E-** La fosforilación del CTD de la Pol II está controlado por la velocidad de la Pol II, al igual que las modificaciones en histonas. Figura adaptada de Muniz et al., 2021.

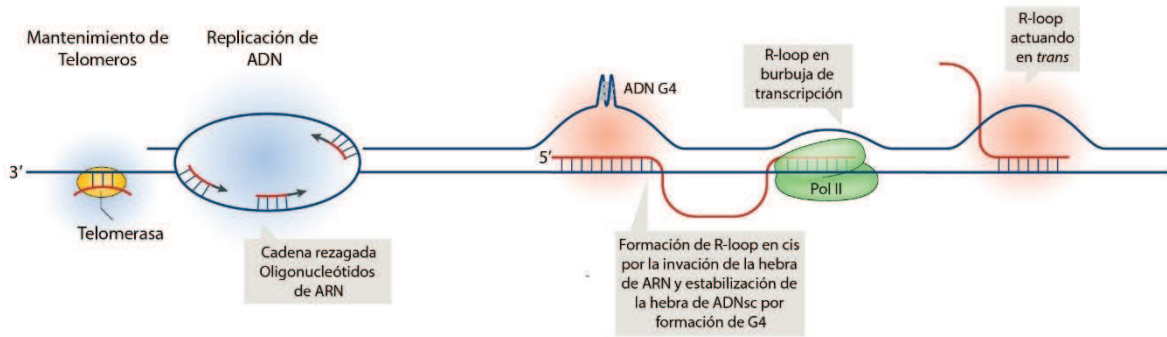
### 3.6 R-loops, otro evento co-transcripcional.

Los R-loops son estructuras tricatenarias que se forman naturalmente en los genomas cuando una molécula de ARN se introduce entre las dos hebras de ADN, emparejándose con una de ellas por complementariedad de bases. Esto da lugar a un híbrido ADN-ARN altamente estable, dejando la otra hebra como una cadena simple (ADNsc) (Niehrs & Luke, 2020) (Figura 4). Estas estructuras pueden originarse por ARNs en *cis*, cuando un ARN naciente se hibrida con su propio locus durante su transcripción, en particular cuando la transcripción es lenta (Florence et al., 2019; Zatreanu et al., 2019), o en *trans*, cuando la invasión de la doble hebra del ADN la realiza un ARN codificado en otra parte del genoma (Ariel et al., 2020). Además de la formación de R-loops en el cuerpo del gen por su transcrito naciente (R-loops sentido), es posible observar R-loops antisentido cortos cerca del TSS de los genes (Tan-Wong et al., 2019; Xu et al., 2017) (Figura 4). Estos R-loops asociados

al TSS abren la cromatina para facilitar el acceso de la maquinaria transcripcional, mejorando la transcripción en la dirección divergente. Además, actúan como una plataforma potencial para el reclutamiento de factores trans-activadores y modulan el epigenoma (Boque-Sastre et al., 2015; Kim & Wang, 2021; Rondón & Aguilera, 2019)

Los R-loops se encuentra en una amplia variedad de organismos, como bacterias, levaduras, animales y plantas, y desempeñan roles fundamentales en una gran variedad de procesos biológicos (Ginno et al., 2008; Santos-Pereira & Aguilera, 2015; Xu et al., 2020). Paradójicamente, los R-loops han sido descritos tanto como estructuras que interfieren en la replicación y transcripción, generando inestabilidad e interfiriendo en la integridad en el genoma y predisponiendo a mutaciones en la simple hebra de ADN (García-Muse & Aguilera, 2019; Skourti-Stathaki & Proudfoot, 1984; Sollier & Cimprich, 2015), como también han sido descritos como estructuras beneficiosas para estos mismos mecanismos (Niehrs & Luke, 2020). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la expresión del gen FLOWERING LOCUS C (FLC) está controlada por un ARN largo no codificante (ARNlnc), denominado COOLAIR, generado por la transcripción antisentido de FLC (Csorba et al., 2014; Liu et al., 2010; Swiezewski et al., 2009). El promotor COOLAIR, y por ende su transcripción, en concomitancia con la de FLC, está reprimido por un R-loop (Sun et al., 2013). Una vez formado este R-loop, el factor de transcripción ATNDX es capaz de unir el ADNsc resultante, estabilizando al R-loop e interfiriendo con la accesibilidad de enzimas capaces de resolver R-loops y, por ende, la transcripción de COOLAIR (Sun et al., 2013).

Los R-loops también son capaces de inducir la condensación de la cromatina, y por la tanto actúan como reguladores de la expresión génica (Castellano-Pozo et al., 2013; Nakama et al., 2012; Skourti-Stathaki et al., 2014). Otra función beneficiosa de los R-loops es el mantenimiento de los telómeros cuando la telomerasa falla y son necesarios mecanismos alternativos de alargamiento. Un ARNlnc llamado TERRA (del inglés *telomere repeat-containing RNA*), genera híbridos ADN:ARN en regiones ricas en C de los telómeros, que promueve la recombinación homóloga con otros telómeros (Arora & Azzalin, 2015; Balk et al., 2013) (Figura 4). Sin ir más lejos, unos de los R-loops más conocidos, y descritos hace más de cinco décadas, son los fragmentos de Okasaki, necesarios para la replicación de la hebra rezagada de ADN durante la replicación (Audoynaud et al., 2023) (Figura 4).



**Figura 4. Tipos y funciones de R-loops.** Los R-loops son esenciales para la replicación de los telómeros, previniendo su acortamiento crítico, así como para la replicación de la hebra rezagada durante la síntesis de ADN en la división celular. Además, pueden formarse R-loops durante la transcripción, cuando el ARN naciente se hibrida con la hebra de ADN que le dio origen en su mismo locus (R-loop en *cis* y en sentido). También existen R-loop formados por ARNs generados en otros lugares del genoma, que pueden interactuar debido a una alta complementariedad de bases en un nuevo lugar del genoma (R-loops en *trans*). Imagen adaptada de Niehrs & Luke, 2020.

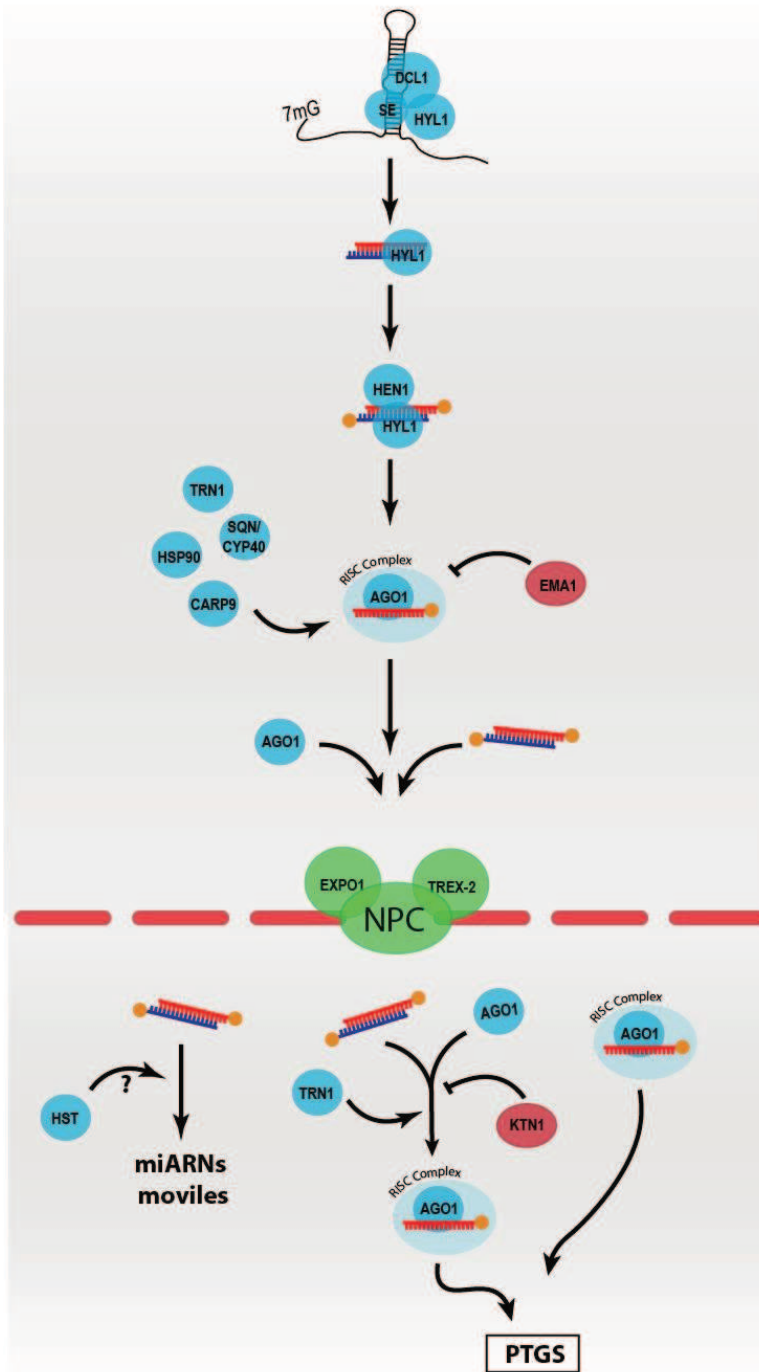
### 3.7 Exportación núcleo-citoplasma y movimiento de miARNs.

En contraste con animales, donde la liberación del miARN maduro desde sus precursores ocurre en el citoplasma, en plantas, como todo el proceso de biogénesis de miARNs tiene lugar dentro del núcleo celular, la liberación del miARN maduro se da en este compartimento. Por lo tanto, es necesario exportar los miARNs al citoplasma, donde cumplen su función silenciando ARNm diana dentro de la misma célula, o abandonar su célula de origen para ejercer su función en células circundantes o de manera sistémica (Achkar et al., 2016; Mencia et al., 2022). El mecanismo preciso de exportación de miARNs y aún más el que rige su movimiento fuera de la célula han sido esquivos a la ciencia por décadas, constituyendo una de las preguntas abiertas más intrigantes de este campo de estudio. En los últimos años, hemos empezado a entender algunos de los procesos que rigen el movimiento de miARNs, aunque aún distamos de comprender la imagen completa. Quizás el descubrimiento clave que ha cambiado el paradigma sobre cómo se exportan los miARNs fue el hallazgo de que AGO1 puede ingresar al núcleo cargar miARNs y salir al citoplasma ya formando un complejo activo en un proceso mediado por EXPO1 (Bologna et al., 2018) (Figura 5). Este proceso es independiente de HST, la exportina que debido a su homología con EXPORTINA 5 de animales, le fue atribuida esta función por años (Bollman et al., 2003; Cambiagno et al., 2021; Park et al., 2005).

La carga nuclear de AGO1 es asistida por un conjunto de proteínas que facilitan el proceso. Entre ellas se destacan CONSTITUTIVE ALTERATIONS IN THE SMALL RNAS PATHWAYS 9 (CARP9), HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90), SQUINT/CYCLOPHILIN 40 (SQN/CYP40), TRANSPORTIN 1 (TRN1) (Cui et al., 2016; Earley & Poethig, 2011; Iki et al., 2012; Tomassi et al., 2020) (Figura 5) y ENHANCED MiRNA ACTIVITY 1 (EMA1) que actúa de forma opuesta como un regulador negativo de la formación del RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) (Wang et al., 2011) (Figura 5). Sin embargo, mutaciones en ninguna de estas proteínas alteran la partición núcleo/citoplasma de los miARNs, lo que sugiere que AGO1 no es la única vía de salida de los miARNs. Esta particularidad concuerda con la presencia de gran cantidad de miARNs libres en el citoplasma (Dalmadi et al., 2019). De hecho, se ha postulado que esta población de miARNs no asociados a AGO1 son los que pueden actuar de forma no autónoma, viajando largas distancias (Brioudes et al., 2021; Zhang et al., 2020). Independientemente de su carga en AGO1, THP1, una de las principales proteínas del complejo TREX-2 (del inglés *transcription/export-2*), participa del movimiento intracelular de miARNs mediante su interacción con la nucleoporina NUP1 de la envoltura nuclear (Zhang et al., 2020) (Figura 5). Esto implica que AGO1 cargado, o incluso los dúplex de miARNs libres, pueden difundir a través del poro nuclear asistidos por THP1 posicionando a este complejo proteico como un potencial regulador activo de la actividad de miARNs.

El movimiento intercelular de pequeños ARN, incluidos los miARNs, es uno de los procesos menos comprendidos en las vías de silenciamiento génico, y la exportación de un miARN fuera del núcleo parece ser un paso determinante en este proceso. Informes recientes sugieren que la capacidad de un miARN para moverse entre células y a través del floema, llevando a cabo sus funciones no autónomas, depende de su capacidad de permanecer no asociados a AGO1, y por lo tanto salir del núcleo ya sea asociado a alguna otra proteína no definida, o de forma libre (Bologna et al., 2018; Brioudes et al., 2021; Cambiagno et al., 2021; Dalmadi et al., 2019; Fan et al., 2022). En este sentido, evidencia reciente ha demostrado que AGO1 es una proteína intracelular autónoma, lo que implica que los miARNs unidos a AGO1 no pueden salir de las células (Brioudes et al., 2021). En este proceso, la enzima KATANIN1 (KTN1), que organiza microtúbulos en el citoplasma, evita la carga citoplásmica de miARNs en AGO1 para promover su movimiento de célula a célula (Fan et al., 2022; Lin et al., 2013) (Figura 5). Curiosamente, HST desempeña un papel predominante durante el movimiento no autónomo de los miARNs entre células y órganos

distantes por algún mecanismo desconocido pero que potencialmente puede involucrar su actividad como exportina (Brioudes et al., 2021; Cambiagno et al., 2021) (Figura 5).



**Figura 5. Transporte del núcleo al citoplasma y miARNs no autónomos.** Una vez finalizado el procesamiento del pri-miARN, el dúplex de miARN permanece unido a HYL1, y mediante la interacción con HEN1, se metila en sus extremos 3'. La carga del miARN maduro en AGO1 para la formación del complejo RISC se ve facilitada por TRN1, SQN/CYP40, HSP90 y CARP9, mientras que es inhibida por EMA1. Los dúplex de miARNs, tanto libres como asociados a AGO1, son transportados desde el núcleo al citoplasma a través del NPC, en un proceso mediado por EXPO1 y el complejo TREX-2. En el citoplasma, los miARNs también pueden cargarse en AGO1, un proceso que es estimulado por TRN1, pero inhibido por KTN1. El complejo RISC maduro desempeña su función de silenciamiento génico en la misma célula de origen. Por otro lado, una fracción de miARNs, es capaz de moverse a células vecinas a través de plasmodesmos, o a órganos distantes mediante el floema, un proceso que implica la participación de HST pero que desconocemos los detalles mecánicos.

### 3.8 La historia de HASTY.

HST fue identificada inicialmente como un factor que controla la transición de la fase juvenil a la fase adulta, así como la floración, dos etapas críticas del desarrollo en las cuales los miARNs juegan un papel crucial (Telfer & Scott, 1998). Plantas mutantes deficientes en HST muestran una transición acelerada entre estas fases, lo que resulta en un crecimiento foliar anormal, con una disposición defectuosa de las hojas y esterilidad (Bollman et al., 2003; Telfer & Scott, 1998). En arroz, la versión homóloga de HST, CRD1, también desempeña un papel en el desarrollo apropiado de la corona de la raíz (Zhu et al., 2019).

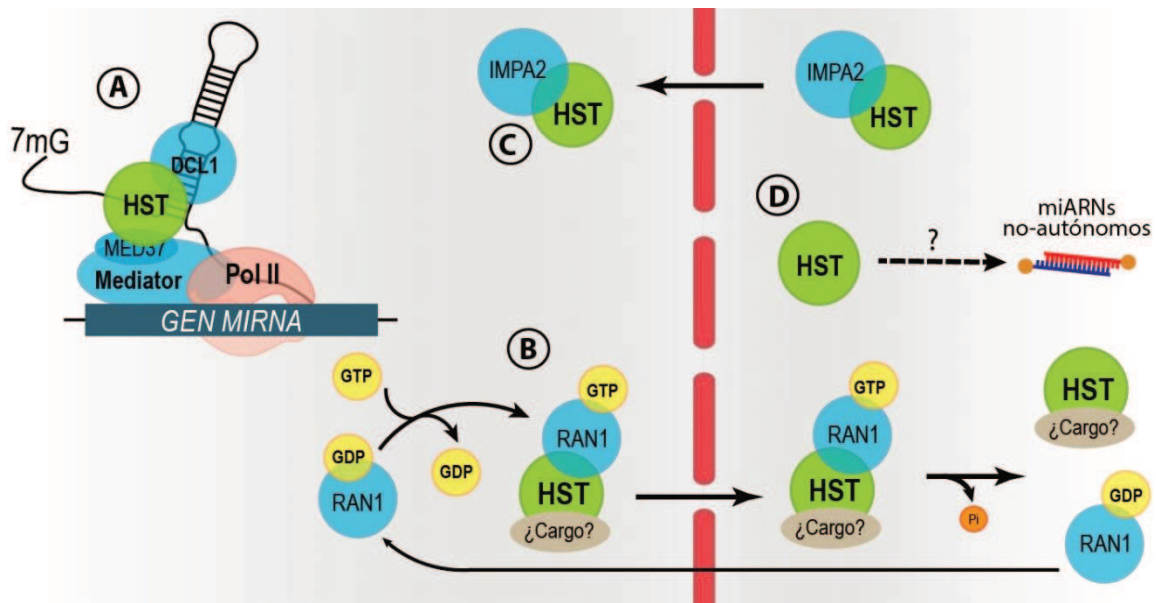
HST pertenece a la familia de las carioferinas, un grupo de proteínas esenciales en la exportación e importación de moléculas biológicas a través del complejo del poro nuclear (Bollman et al., 2003). El transporte mediado por carioferinas depende de otras proteínas capaces de hidrolizar GTP, conocidas como RAS-RELATED NUCLEAR PROTEIN (RAN). La interacción de las carioferinas con RAN-GTP facilita la exportación nuclear, mientras que la hidrólisis de GTP conduce a la liberación de cargas en el citoplasma (Rose & Meier, 2001). Se ha demostrado que RAN1 es la encargada de la exportación de HST desde el núcleo al citoplasma, mientras que su traslocación desde el citoplasma al núcleo está mediada por la IMPORTIN ALPHA ISOFORM 2 (IMPA2) (Cambiagno et al., 2021) (Figura 6B y 6C).

En el genoma de *Arabidopsis* podemos encontrar 18 genes que codifican para carioferinas. Algunas de ellas ya han sido relacionadas previamente con la vía de biogénesis de miARNs, como por ejemplo: EXPO1, involucrada en la exportación del complejo RISC activo (Bologna et al., 2018) y KETCH1 permite la translocación de HYL1 al núcleo (Zhang et al., 2017).

Por mucho tiempo, el rol de HST fue establecido por paralelismo con el sistema en animales, el cual asignaba a HST el papel de exportador de miARNs en plantas. Sin embargo, estudios posteriores, refutaron esta suposición al demostrar que HST, por su naturaleza proteica, es capaz de translocarse entre el núcleo y el citoplasma, pero esta capacidad no impacta el movimiento de miARNs (Cambiagno et al., 2021). En cambio, se demostró que HST modula la biogénesis de miARNs al actuar como un andamiaje que permite la asociación entre DCL1 y la subunidad 37 del complejo MEDIATOR directamente en los loci *MIRNA* (Cambiagno et al., 2021), favoreciendo el procesamiento co-transcripcional, tal como mostraremos posteriormente en esta tesis (Figura 6A).



Se ha observado que HST, aunque no interacciona con los precursores de miARNs, tiene la capacidad de interactuar directa o indirectamente con miARNs maduros (Cambiagno et al., 2021). Esta característica resulta intrigante, ya que en mutantes *hst*, los niveles de muchos miARNs no se ven afectados o solo se ven moderadamente afectados (Cambiagno et al., 2021). Este fenómeno podría indicar que HST actúa selectivamente sobre una fracción específica de estas moléculas. Un estudio reciente sugiere que HST podría estar involucrado específicamente en la regulación de miARNs que se encuentran en forma libre en la célula, es decir, aquellos que escapan de la carga nuclear en AGO1 (Brioudes et al., 2021; Dalmadi et al., 2019). Además, se encontró que HST controla el movimiento de miARNs entre células, independientemente de su capacidad para translocarse del núcleo al citoplasma (Brioudes et al., 2021) (Figura 6D).

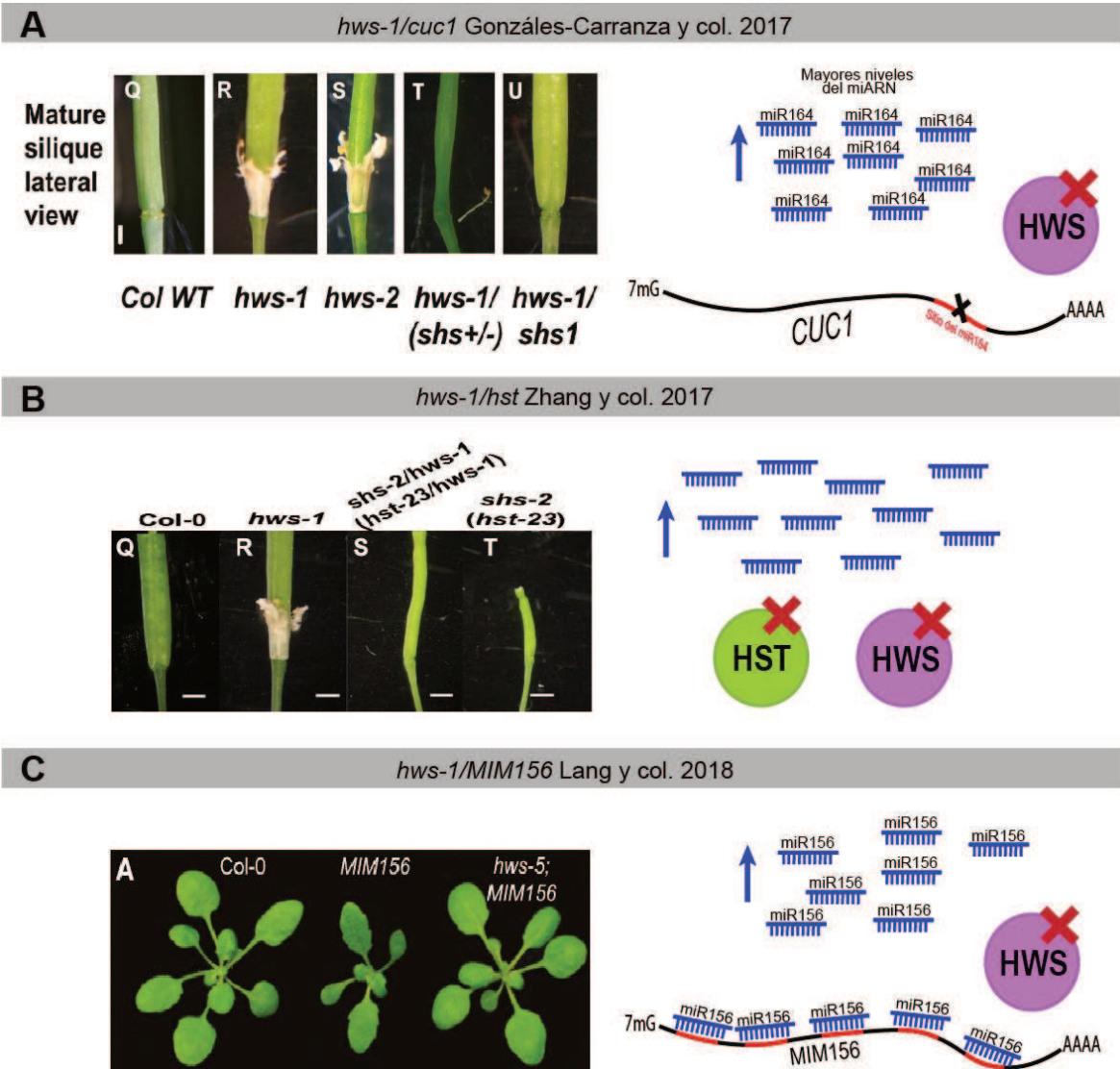


**Figura 6. Funciones de HST.** **A-** HST actúa como proteína de andamiaje entre la subunidad 37 del complejo MEDIATOR y DCL1 para reclutar esta última a los loci *MIRNA*. **B-** HST podría cargar miARNs u otras moléculas para sacarlas del núcleo con la ayuda de RAN1-GTP. En el citoplasma, se produce la ruptura del enlace de alta energía de GTP para liberar HST y su carga, mientras que de RAN1-GDP retorna al núcleo. **C-** HST ingresa al núcleo desde el citoplasma con la ayuda de IMPA2. **D-** En un proceso aún desconocido, HST estimula el movimiento de miARNs no autónomos hacia células vecinas u órganos distantes.

### 3.9 Función de HWS en la biogénesis de miARNs y su previa relación con HST.

HAWAIIAN SKIRT (HWS) es una proteína del tipo F-Box, que forma parte del complejo Skp-Cullin-F-box (SCF), responsable de reconocer sustratos específicos para su ubiquitinación

y posterior degradación (Risseeuw et al., 2003). Aunque se sabe que HWS interactúa con los componentes clásicos del complejo SCF (Kuroda et al., 2002; Lang et al., 2018) hasta el momento no se han identificado sus sustratos. Su nombre peculiar deriva del fenotipo característico de la mutante *hws*, el cual muestra fusión de sépalos, evitando la pérdida de órganos florales que permanecen unidos hasta la senescencia de la silicua generando la apariencia de una pollera hawaiana (González-Carranza et al., 2007) (Figura 7). Además, las plantas sobreexpresantes de HWS son fenotípicamente similares a mutantes deficientes en miARNs, ya que incluyen aserramiento foliar y defectos en los órganos florales (Lang et al., 2018). El fenotipo mutante de *hws* puede revertirse por una segunda mutación en el sitio de unión del miR164 sobre el transcripto de *CUC1* lo cual impide su regulación post-transcripcional (González-Carranza et al., 2017) (Figura 7A). En el mismo sentido, mutaciones en *hst*, y otras proteínas relacionadas a la síntesis de miARNs, también revierten el fenotipo de *hws* al reducir la actividad del miR164 (Zhang et al., 2017) (Figura 7B). Llamativamente, un *screening* genético realizado sobre plantas que expresan un “*target mimicry*” (MIM, del inglés *miRNA target mimicry*, que significa “imitar el objetivo”). identificó a HWS como una proteína asociación con la vía de miARNs (Lang et al., 2018) (Figura 7C). Hasta el momento, el accionar de HWS sobre la biogénesis de miARNs está poco dilucidado, aunque se propone que HWS podría tener una función en la eliminación del RISC asociados con los MIMs, denominados “RISC no óptimos”. Los MIMs podrían inducir cambios conformacionales o modificaciones post-traduccionales en AGO1 (Golden et al., 2017; Quévillon Huberdeau et al., 2017), que podrían ser reconocidos por HWS para su degradación, similar al accionar de la proteína FBW2, también del tipo F-box, que degrada formas mutadas y no funcionales de AGO1 (Hacquard et al., 2022). Otra posibilidad es que HWS tenga como blanco una proteína intermedia que afecte la actividad de AGO1. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por comprender el papel de HWS en la biogénesis de miARNs el mecanismo subyacente sigue siendo incierto.



**Figura 7. Rol de HWS en la biogénesis de miARNs.** **A-** Una mutación en el sitio de unión del miR164 el ARNm de *CUC1* hace que este se vuelva insensible a la acción del miARN, a su vez aumentan los niveles del miARN y el fenotipo *hws* se revierte. **B-** La mutación en *hst*, que generalmente conlleva a niveles más bajos de miARNs, revierte el fenotipo de *hws* probablemente, al equilibrar dichos niveles de estas moléculas. **C-** El uso del MIM156 reduce los niveles del miR156 al actuar como esponja para este miARN. La mutación en *HWS* genera un aumento en los niveles de este miARN, revirtiendo así el fenotipo. Figura adaptada de González-Carranza et al., 2017; Zhang et al., 2017; Lang et al., 2018.

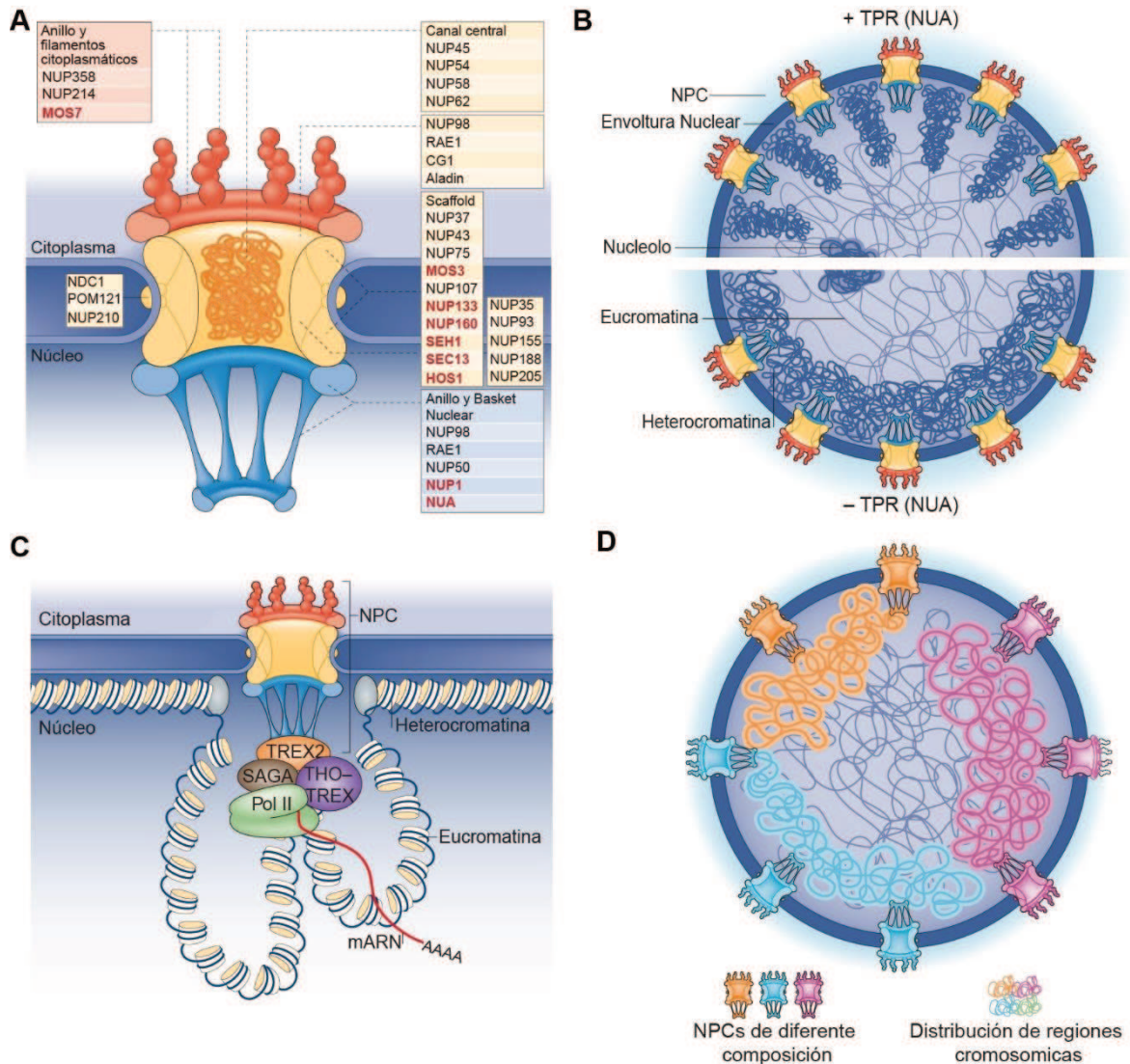
### 3.10 Complejo del poro nuclear y su rol en la expresión génica.

En eucariotas, la separación espacial entre el núcleo, donde ocurre la transcripción, y el citoplasma, donde se lleva a cabo la traducción, confiere un nivel adicional de la regulación de la expresión génica mediada por la envoltura nuclear y su sistema de transporte

altamente organizado. La envoltura nuclear está formada por una doble membrana lipídica que comprende la membrana nuclear externa, adyacente al retículo endoplásmico, y la membrana nuclear interna, que interactúa con el nucleoplasma. Estas membranas están conectadas por el complejo del poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*), una estructura altamente conservada entre especies evolutivamente distantes. El NPC presenta una simetría rotacional octuplicada y está construido alrededor de un canal de transporte central que consta de un anillo citoplasmático, un anillo nuclear y ocho filamentos unidos a cada anillo. Los filamentos del anillo nuclear se conectan a un segundo anillo nuclear distal más pequeño, formando lo que se conoce como cesta nuclear o en inglés *basket* del NPC (D'Angelo & Hetzer, 2008; Raices & D'Angelo, 2012) (Figura 8A).

Experimentos de microscopía electrónica han revelado que la envoltura nuclear está estrechamente asociada con la heterocromatina, mientras que los NPC están rodeados por regiones de cromatina descondensada o eucromatina (Engelhardt & Pusa, 1972). La regulación de estas zonas de cromatina más laxa implica la acción de TPR (*Translocated promoter region*), un componente del *basket* que forma filamentos que se extienden hacia el interior del núcleo (Krull et al., 2010) (Figura 8B). TPR modula indirectamente la expresión génica al excluir la heterocromatina de las regiones cercanas al NPC, y favorecer la cromatina descondensada asociada con un estado de transcripción activa. En *Arabidopsis* se ha identificado un homólogo de TPR, el cual se denominó NUCLEAR-PORE ANCHOR (NUA) (Xianfeng et al., 2007). Esta proteína, al igual que TPR, forma parte del NPC y está involucrada en la regulación de la expresión génica, la organización espacial del ADN y la exportación del ARNm (Figura 8A y 8B). Estudios anteriores han relacionado la ausencia de esta proteína a la disminución en los niveles de transcritos de FLC (Jacob et al., 2007; Xianfeng et al., 2007). Recientemente, se ha demostrado que durante la transcripción de FLC su locus se asocia al poro nuclear para favorecer su expresión y el transporte de su ARNm hacia el citoplasma (Huang et al., 2023).

La composición del NPC es heterogénea entre diferentes tipos celulares, así como dentro de la misma célula. Esto brinda una especificidad adicional en la regulación génica (D'Angelo et al., 2017; D'Angelo & Hetzer, 2008) (Figura 8D). En resumen, el complejo del poro nuclear juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica al controlar la organización de la cromatina y servir como punto de conexión entre la transcripción y la exportación de ARNm.



**Figura 8. Estructura del Poro Nuclear y Organización de la Cromatina.** **A-** Composición proteica del poro nuclear. En rojo se resaltan las proteínas estudiadas en plantas, junto a los nombres asignados correspondientes. **B-** Organización de la cromatina dentro del núcleo, en presencia y ausencia de TPR, conocido como NUA en plantas. **C-** Durante la transcripción, los complejos SAGA/TREX-2 y THO/TREX interactúan tanto con la Pol II como con el NPC para regular la expresión génica y facilitar la exportación eficiente del ARNm. **D-** Esquema que muestra la variada composición del NPC, lo que impacta en la regulación génica. Figura adaptada de Raíces & D' Angelo 2012.

### 3.11 Proteínas asociadas al poro nuclear involucradas en la biogénesis de miARNs.

Se ha demostrado que el NPC sirve como plataforma de ensamblaje o reclutamiento de la maquinaria de transcripción a la periferia nuclear a través de la asociación de complejos como SAGA-TREX2 (Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferasa-complejo de exportación de

transcripción 2) y THO-TREX (Ellisdon et al., 2010; Kurshakova et al., 2007; Moraga & Aquea, 2015; Rougemaille et al., 2008). Estos complejos están implicados en la unión de genes al NPC durante la transcripción y coordinan la elongación de la transcripción por la Pol II con la exportación del ARNm al citoplasma (Figura 8C).

El complejo TREX-2, está conservado evolutivamente y vincula la transcripción y la exportación de ARNm. En levaduras, TREX-2 consiste en Sac3, Thp1, Sem1 (Dss1), Sus1 y Cdc31 (Cen1), y se cree que está anclado al lado interno del NPC a través de la nucleoporina Nup1, la cual se localiza en el *basket* del poro nuclear. TREX-2 en levaduras se asocia directamente con el complejo MEDIATOR para coordinar la transcripción y la exportación de ARNm (Ellisdon et al., 2010; Raices & D'Angelo, 2012). En plantas, se ha demostrado que mutantes en componentes centrales de TREX-2, como THP1 y SAC3A, tienen defectos en la biogénesis y en la exportación de miARNs desde el núcleo al citoplasma (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2020). Además, tanto THP1 y SAC3A interactúan físicamente con la Pol II y factores claves en la transcripción de genes *MIRNA* como CDC5 y NOT2B (Zhang et al., 2020). También interactúan con SE y CPL1, la cual promueve la defosforilación de la proteína HYL1. Llamativamente, THP1 también interacciona con NUP1 (también conocida como NUP136), un homólogo de Nup1 de levadura, en la envoltura nuclear (Zhang et al., 2020). En mutantes *thp1* y *nup1* se reduce la exportación nuclear tanto de miARNs como de AGO1, lo que sugiere que TREX-2 promueve la exportación del RISC o de cada componente por separado (Zhang et al., 2020). Por lo tanto, TREX-2 parecería ser un elemento clave en la coordinación de la transcripción, procesamiento y exportación en la biogénesis de miARNs. Otro complejo ya conocido, asociado al poro nuclear es el complejo THO/TREX (Raices & D'Angelo, 2012) (Figura 8C). En *Arabidopsis* se ha identificado un complejo THO, similar al complejo THO/TREX en metazoos. Este consiste en al menos ocho proteínas: THO1/HPR1/EMU, THO2, THO3/TEX1, THO4, THO5, THO6, THO7 y UAP56 (Furumizu et al., 2010; Jauvion et al., 2010; Yelina et al., 2010). Existen estudios donde se determinó que al menos la subunidad THO2 participa en la biogénesis de miARNs, aunque no se pudo detectar interacción de esta proteína con ninguno de los componentes conocidos de la biogénesis de miARNs (Francisco-Mangilet et al., 2015). Llamativamente, se demostró que THO2 interactúa con precursores de miARNs, favoreciendo su asociación con el complejo de procesamiento de miARNs (Francisco-Mangilet et al., 2015). Otra proteína asociada al poro nuclear que ha sido vinculada con la biogénesis de miARNs es HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 (HOS1). Se ha informado que esta E3 ubiquitina ligasa regula la

expresión de *MIR168* al interactuar con su promotor, lo que incrementa la ocupación de la Pol II y favorece su transcripción (Wang et al., 2015). Los mutantes deficientes en HOS1 muestran una disminución en los niveles de miR168, acumulan ARNm en el núcleo y presentan una desregulación en el reloj circadiano (MacGregor et al., 2013; Wang et al., 2015).



## 4 OBJETIVOS

Los ARNs pequeños, moléculas de ~20 a 24 nucleótidos de longitud, son los componentes centrales de las vías de silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional en organismos superiores. Dentro de los distintos tipos de ARNs pequeños los microARNs (miARNs) cumplen funciones críticas durante el desarrollo de organismos multicelulares (Bologna & Voinnet, 2014). Por décadas, el modelo que explicaba la biogénesis de miARNs en plantas estuvo dominado por paralelismos e inferencias hechas a partir de la contraparte de esta vía en animal. Sin embargo, en los últimos años el modelo de biogénesis canónico ha comenzado a cuestionarse.

En esta tesis nos propusimos como **objetivo general** el estudio de las vías de silenciamiento génico mediadas por miARNs, focalizando nuestros esfuerzos en comprender los mecanismos que regulan las etapas más tempranas de esta vía, la transcripción de sus genes, el ensamblado del complejo de procesamiento y posibles moduladores de este mecanismo.

**Objetivo 1** - Estudiar los procesos de ensamblado co-transcripcional de la maquinaria de procesamiento de miARNs, y cómo esto se puede ver influenciado por la tasa y velocidad de transcripción de la Pol II.

**Objetivo 2** – Estudiar la dinámica de interacción entre la transcripción y el procesamiento de pri-miARNs. Nos interesa entender el efecto que genera el reclutamiento inicial del complejo de procesamiento sobre loci *MIRNA* en las subsiguientes rondas del procesamiento.

**Objetivo 3** – Examinar el potencial rol de HWS durante el procesamiento co-transcripcional de miARNs al ser un posible modulador de la actividad de HST, proteína esencial en el reclutamiento de DCL1 a los loci *MIRNA*.



## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material vegetal.

Todos los stocks de *Arabidopsis* utilizados son del ecotipo Col-0. Las líneas mutantes utilizadas fueron *abh1-285* (SALK\_024285), *hyl1-2* (SALK\_064863), *hst-15* (SALK\_079290), *hst-6* (Bollman et al., 2003), *hws-1* y *hws-3* (Lang et al., 2018). Las mutantes *hst-6*, *hws-1* y *hws-3* fueron cedidas gentilmente por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel del Departamento de Biología Molecular, Instituto Max Planck, Tübingen, Alemania. Las mutaciones se identificaron realizando PCR sobre ADN genómico de las mismas utilizando oligonucleótidos específicos en la Tabla 1. Para experimentos de expresión transciente se utilizaron plantas de *N. benthamiana*.

### 5.2 Condiciones de crecimiento y tratamientos.

Previo a ser cultivadas, todas las líneas utilizadas fueron estratificadas durante 3 días en agar 0,1% a 4 °C. Luego se crecieron a 23 °C en fotoperíodo de día largo (16 hs luz/8 hs oscuridad) con una intensidad lumínica aproximada de 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ . Al realizar experimentos de inmunoprecipitación o fraccionamiento las plantas se crecieron por un período de 20 días en sustrato sólido. Durante los tratamientos de estrés térmico prolongado (LHS12), las plántulas fueron cultivadas en medio Murashige and Skoog (Sigma Aldrich) 0,5X (pH 5,7) y agar al 0,6% (p/v) durante 12 días a 23 °C, transferidas a 37 °C durante 30 hs y devueltas a 23 °C durante 12 hs antes de ser colectadas en nitrógeno líquido. Para los ensayos de déficit de fosfato las plantas fueron germinadas y cultivadas por 10 días en Erlenmeyer de 100 mL, conteniendo 30 mL de Hoagland líquido (2M  $\text{KNO}_3$ ; 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 2M  $\text{MgSO}_4$ ; Micronutrientes:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnCl}_2$ ;  $\text{ZnSO}_4$ ;  $\text{CuSO}_4$ ;  $\text{NaMoO}_4$ ;  $\text{NaFe-DTPA}$ ) bajo agitación constante de 80 rpm. Pasado este tiempo, el medio líquido fue removido y se añadió nuevo medio Hoagland completo o Hoagland sin fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), según correspondía y se devolvieron a agitación por otros 5 días. Pasado este período el medio de cultivo fue reemplazado nuevamente por Hoagland completo e incubado en agitación por el lapso de 3 hs. Finalmente se añadió 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 5,6-Diclorobenzimidazol 1- $\beta$ -D-ribofuranósido (DRB) y se incubó por 2 hs más. Las muestras tomadas en distintos momentos de este esquema de crecimiento, según indicado en las figuras correspondientes, fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su procesamiento.

### 5.3 Plásmidos.

**pAS54:** Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-//S*. 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-//S*. 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 en 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 triptófano 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<sup>TM</sup>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.

**pFK209:** Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pFK* derivado del plásmido *pGREEN-//S*. Este vector posee un promotor 35S CaMV seguido del sitio de recombinación, utilizado para expresar proteínas sin ningún tag. Posee un gen de resistencia a spectinomicina para bacterias y kanamicina para plantas.

**pJV117:** Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pJV* derivado del plásmido *pGREEN-//S*. Este vector posee un promotor 35S CaMV el cual conduce la expresión de la proteína fluorescente mCherry, a la cual le continúa el sitio de recombinación. Posee un gen de resistencia a spectinomicina para bacterias y kanamicina para plantas.

#### **5.4 Cepas de bacterias y levaduras utilizadas.**

*Saccharomyces cerevisiae*, MAV203 [MAT $\alpha$ , leu2-3,112, trp1-901, his3 $\Delta$ 200, ade2-101, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2, can1R, cyh2R].  
*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$  [F $^-$   $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK, mK+) phoA supE44  $\lambda^-$  thi-1 gyrA96 relA1].

*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.

#### **5.5 Construcciones.**

Para evaluar la complementación de fenotipo de la mutante del *screening hst-15/hws-35*, se utilizaron construcciones que expresan la región codificante de *HWS* así como una versión sin su dominio F-Box (*HWS $\Delta$ F-box*). Ambas se expresaron bajo el control del promotor ubicuo 35S y fusionadas a la proteína fluorescente mCitrina en su extremo C-terminal, las cuales fueron publicadas previamente (Lang et al., 2018) y cedidas por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel. Además, se amplificó la región codificante de *HWS* y de

*HWSΔF-box* mediante PCR de los plásmidos que los contenían con oligonucleótidos específicos (Tabla 1) y se clonó en el vector pENTR™/D-TOPO® generando el “vector de entrada”, que luego fue recombinado con distintos “vectores destino” de la serie *pGREEN* //S 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 *Arabidopsis*. 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. Con el objetivo de obtener la versión HST15, y dada 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 miARNs clonados previamente en los mismos vectores de destino, cedidos por el Dr. Damián Cambiagno, miembro de nuestro laboratorio (Cambiagno et al., 2021).

Los vectores que contienen MED37D, MED37E, MED18, MED20, HST, HST sin su dominio C-terminal (HSTΔC), el dominio exportina de HST (HST-N) fusionadas a la proteína fluorescente eGFP, fueron cedidos 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 (Cambiagno et al., 2021). Las construcciones generadas con sus descripciones se alistan en la Tabla 2. Los cebadores utilizados para los clonados, se listan en la Tabla 1.

## **5.6 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).**

La amplificación de fragmentos de ADN para clonación, análisis de mutantes insercionales, líneas transgénicas, y verificación 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 una solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, dNTPs 0,2 mM y 0,4  $\mu$ M 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  $\mu$ L de volumen de reacción. Los volúmenes finales de reacción fueron de 20  $\mu$ L, o 50  $\mu$ L para amplificaciones de fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: (30 seg a 94 °C, 30 seg a [Ta] °C, *t* a 72° C) x 30 ciclos + 10 min a 72° C. La temperatura de hibridación se estableció utilizando la calculadora de New England BioLabs (NEB), 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.

## **5.7 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).

### **5.8 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.

### **5.9 Clonados en vectores de entrada y vectores destino.**

Para los clonados en los vectores de entrada, primero 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 mezclaron 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 hs, y se transformaron 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  $\mu$ L con solución amortiguadora TE 1X. Se incubó a temperatura ambiente de 2 a 4 hs, y se procedió a la transformación de bacterias.

#### **5.10 Transformación estable de plantas de *Arabidopsis* por inmersión floral.**

Las plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas por el protocolo de “floral dip” descrito previamente por Clough y Bent, 1998 (Clough & Bent, 1998). 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 hs a 28 °C con agitación células de *A. tumefaciens* en tubos de ensayo que contenían 3 mL de medio LB suplementado con 50  $\mu$ g/mL de rifampicina, gentamicina, tetraciclina y espectinomicina. 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 hs, a 28 °C, con agitación). Luego se precipitaron por centrifugación a 5500 g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 5% que contenía 40  $\mu$ L 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 seg, 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.

#### **5.11 Transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* por agroinfiltración.**

La transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (Zhang et al., 2020). Las bacterias *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés se cultivaron en medio YEB inducido (1g/L extracto de

levadura, 5 g/L extracto de carne, 5 g/L peptona, 5 g/L sacarosa, 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L agarosa, 1 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,15 g/L  $\text{KCl}$ , 0,01 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 0,0025 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM buffer fosfato pH 5,5, 20% Glucosa, 1M MES, 200 mM acetosiringona) a 28 °C durante 24 a 36 hs. Las células se rasparon y se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado (10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM acetosiringona). Después de agitar brevemente, 100  $\mu\text{L}$  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, 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 (Canto et al., 2006; Westhof, 2004). Se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 2:2:1 (Constr.A:Constr.B:p19) para los ensayos de co-expresión, localización y BiFC y 1,3:1,3:1,3:1 (Constr.A:Constr.B:Constr.C: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. Las hojas se mantuvieron durante 1 h en luz para permitir que las hojas se sequen. Posteriormente, se mantuvieron en oscuridad durante 24 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, las plantas transformadas se transfirieron nuevamente a la cámara de cultivos durante 2 a 3 días antes de la recolección de muestras/microscopía.

### **5.12 Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico.**

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por 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 después 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,  $\text{NaCl}$  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  $\mu\text{L}$  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, para identificar colonias transformadas con la construcción de interés. Las colonias positivas (la PCR amplificó un fragmento del tamaño



correcto), fueron repicadas en medio LB líquido para realizar posteriormente minipreparación de ADN plasmídico.

### **5.13 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  $\mu\text{L}$  del plásmido de interés y 0,3  $\mu\text{L}$  del plásmido pSoup (plásmido necesario para la correcta replicación de los plásmidos de la serie pGREEN-IIS). Inmediatamente después 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 hs a 28 °C. A continuación, se centrifugaron a 1500 g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de medio LB. Se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con gentamicina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), rifampicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tetraciclina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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 hs). Para la identificación de las colonias transformadas se realizó PCR en colonia siguiendo la misma metodología explicada para *E. coli*.

### **5.14 Minipreparación de ADN plasmídico.**

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* transformadas se realizó según el método de lisis alcalina (Lernmark et al., 1979). 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 un volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) para 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 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. En los casos 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.

#### **5.15 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.

#### **5.16 Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.**

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 seg 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 seg y se centrifugó a 16000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se trató el sobrenadante con un 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 un volumen de isopropanol. Luego se centrifugó a 16000 g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se resuspendió en 50 µL de agua miliQ estéril.

#### **5.17 Aislamiento de ARN de plantas.**

Las extracciones de ARN se realizaron con 100 µg de tejido vegetal fresco previamente pulverizado con nitrógeno líquido. A este tejido se le agregó 1 mL de reactivo TRIzol

preparado en el laboratorio (por cada 100 ml TRIzol: 38 mL de fenol ácido, 0,8 M tiocianato de guanidina, 0,4 M tiocianato de amonio, 0,1 M NaAc pH 5,0, 5% glicerol, y agua hasta completar los 100 mL). Se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló y se resuspendió completamente en el reactivo. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min en la mesada. Luego se añadió 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4º C. Se recuperó la fase acuosa, que se mezcló con un volumen de isopropanol y se centrifugó durante 30 min a 12000 g. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 12000 g. Posteriormente, se removió el etanol por pipeteo y se añadieron 100 µL de agua miliQ. Se resuspendió el pellet mediante vortex y se añadió 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó reposar por 30 min a -20 °C. Finalmente, para precipitar por segunda vez el ARN total de la muestra, se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4º C. El precipitado obtenido se lavó con etanol 70 % v/v. Una vez seco, el precipitado se disolvió en 30 µL de agua miliQ estéril. La calidad y concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### **5.18 Transcripción reversa (RT).**

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando ARN previamente tratado con DNase I (Thermo Fisher Scientific) y 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; se utilizaron oligonucleótidos dN6 (mezcla de oligonucleótidos de 6 pb con secuencias aleatorias) para amplificar ARNs que no poseen cola de poliA, como fragmentos de pri-miARNs procesados o ARNinc; oligonucleótidos específicos fueron utilizados para realizar RT-qPCRs de miARNs. Mientras que para RT realizadas con poli-dTv y dN6 se siguió el programa recomendado por el fabricante, para realizar RT de miARNs el ciclo utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de 25 °C 15 min; 60 ciclos de 30 °C 30 seg/42 °C 30 seg/50°C 1 seg; 1 ciclo de 85°C 5 min para inactivación de la enzima.

### **5.19 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).**

Las qPCRs (del inglés *quantitative PCRs*) se realizaron en un termociclador CFX Connect™ (Bio-Rad), en un volumen final de reacción de 10 µL conteniendo 1X de qPCR SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,2 µM de cada oligonucleótido específico (ver Tabla 1) y una dilución 1/150 de la reacción de retrotranscripción o DNA. La fluorescencia se midió a 60 °C durante 45 ciclos de PCR, según lo recomendado por el fabricante. Para las medidas se utilizaron tres o cuatro réplicas biológicas independientes de pools de plántulas. Como gene de referencia, para la normalización de los niveles de expresión de los transcritos analizados fue utilizado ACTINA 2 (AT3G18780) o un ARN nucleolar pequeño, U6 (AT3G13855) para el caso de los experimentos de RIP. Cada réplica se trató como muestras independientes para el análisis estadístico. Los promedios de las réplicas biológicas y la desviación estándar se calcularon utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y el error se mostró como desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante un análisis de test-t no pareado y se corrigieron con el método de corrección de Welch para comparaciones de pares.

### **5.20 Northern blot no radioactivo para la detección de ARNs pequeños.**

El ARN total se extrajo utilizando TRIzol, tal como se describió previamente en la sección 5.17 “Aislamiento de ARN de plantas”. Los ensayos de *Northern Blot* se realizaron según fue reportado anteriormente (Tomassi et al., 2017). Brevemente, se resolvieron 5 µg de ARN total en geles de poliacrilamida al 17% (v/v) en condiciones desnaturalizantes (7 M urea) y luego se transfirieron a membranas de nylon cargadas HyBond-N+ (Amersham) mediante transferencia semihúmeda. El ARN se fijó de forma covalente a las membranas mediante UV (UV Crosslinker Analytik Jena US). Las membranas se hibridaron durante toda la noche con sondas de oligonucleótidos de ADN marcadas con un kit de marcado del extremo 3' con Digoxigenina (DIG) (Roche). Se usaron sondas que reconocen distintos miARNs y la señal fue luego detectada con solución fosfato 3- (4-metoxispiro {1,2-dioxetano-3,2'- (5'-cloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 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 1.

### **5.21 Aislamiento de ARNs unido a la cromatina y ARNs libres en nucleoplasma.**

Entre 3 y 4 g de material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó usando un mortero y nitrógeno líquido. El polvo aún congelado se resuspendió en 30 mL de buffer de extracción 1 (10 mM de Tris-HCl pH 8; 0,4 M de sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; 0,2 mM PMSF; 20 U RNasa.In (PROMEGA)), se filtró a través de una membrana de nylon de 150 µm y se centrifugó a 2000 g durante 20 min a 4 °C. El pellet se lavó dos veces con buffer de extracción 2 (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,25 M de sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; 1% TRITON X100; 100 µM PMSF) y se centrifugó a 2000 g durante 10 min a 4 °C. Luego, se añadieron 500 µL de buffer de extracción 3 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1,7 M sacarosa; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; 0,15% TRITON X100) al pellet. La suspensión resultante se colocó suavemente sobre una columna de 1500 µL de Buffer de Extracción 3 y se centrifugó a 13000 g durante 5 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 500 µL de buffer de lisis (0,3 M de NaCl; 20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 mM de DTT; inhibidor de proteasas) y se incubó a 4 °C durante 2 hs en rotación. Se tomó el 10% de la muestra y se guardó como INPUT. Del 90% restante la mitad fue usada en una inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-IgG (AS09 605, Agrisera) como control negativo y el 45% restante se utilizó para el experimento de RNA-IP (RIP) usando un anticuerpo dirigido a la histona 3 (H3) de Arabidopsis (AS10 710, Agrisera). Para realizar el ensayo de IP, se añadieron 30 µL de SureBeads (Proteína A Magnética, BioRad), previamente incubadas con una dilución 1/1000 de los anticuerpos correspondientes, a la muestra y se incubó en rotación a 4 °C durante la noche. La fracción de IP se guardó como muestra de RIP mientras que el sobrenadante se consideró como nucleoplasma. La fracción de RIP se lavó tres veces con buffer de lavado (0,3 M de NaCl; 20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 mM de DTT; comprimido de inhibidor de proteasas; RNasa.In (PROMEGA)). El tratamiento con proteinasa K se realizó en 500 µL de buffer de PK (100 mM de Tris-HCl pH 8; 50 mM de NaCl; 10 mM de EDTA; proteinasa K 4 mg/mL; RNasa.In (PROMEGA)) durante 2 hs a 55 °C y 15 min a 95 °C. Se añadieron 2 U de DNasa I (Thermo Fisher) a la muestra y se incubó durante 30 min a 37 °C. Luego se realizó la extracción de ARN con 1 mL de TRIZOL y 200 µL de cloroformo. La precipitación se realizó con 1 µL de glicógeno, 10% de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante la noche.

### **5.22 Inmunoprecipitación de la cromatina.**

Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, del inglés *Chromatin ImmunoPrecipitation*) en plántulas de 20 días previamente crosslinkeadas con formaldehído

al 1% realizando dos rondas de 10 min de vacío y una tercera con el agregado de 2,5 mL de glicina 2 M para detener la reacción. Para la extracción de núcleos, se utilizó un procedimiento modificado de Sikorskaite y col., 2013 (Sikorskaite et al., 2013). Brevemente, los tejidos molidos se resuspendieron en buffer de extracción 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,4 M sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; PMSF 200 μM), se dejaron reposar 5 min en hielo y se filtraron a través de una doble capa de Miracloth (100 μm). El filtrado se centrifugó durante 20 min a 2000 g y a 4 °C. El pellet se lavó dos veces con 10 mL de buffer de extracción 2 (10 mM Tris-HCl pH 8; 0,25 M sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; 1 % TRITON X100; PMSF 200 μM) durante 10 min a 2000 g y a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 300 μL de buffer de extracción 3 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1,7 M sacarosa; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM BME; 0,15 % TRITON X100) y se colocó suavemente sobre una columna de 900 μL de buffer extracción 3 en un eppendorf nuevo. Para generar el correspondiente gradiente de sacarosa se centrifugó durante 5 min a 13000 g a 4 °C. Los núcleos obtenidos se resuspendieron por pipeteo en 500 μL de buffer de lisis de núcleos (50 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 % SDS; 10 mM EDTA; PMSF 200 μM). Esta solución se sonicó en Refrigerated PicoRuptor por 10 ciclos de 30 seg ON y 30 seg OFF. Finalizado este paso se centrifugó la muestra por 10 min a 13000 g a 4 °C. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se separó el 10 % del volumen obtenido para ser el INPUT, 45 % para el control negativo (IgG: AS09 605, Agrisera) y el 45 % restante para incubar con el anticuerpo correspondiente (GFP: AS15 2987, Agrisera). La inmunoprecipitación se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche con 50 μL de Sure Beads™ Proteín-A (Bio Rad) magnéticas previamente lavadas e incubadas por 1 h con los anticuerpos correspondientes en buffer de dilución CHIP (1,1 % TRITON X100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl pH 8; 167 mM NaCl). Después de la incubación realizada durante toda la noche de las beads y las muestras bajo estudio, se lavó cinco veces con buffer de dilución de CHIP, las beads se resuspendieron en 500 μL de solución PK buffer (100 mM Tris-HCl pH7,4; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA) y se agregó 1 μL de proteinasa K 20 mg/mL (Quiagen). Las muestras se incubaron a 55 °C durante 4 hs y la proteinasa K se inactivó mediante una incubación a 95 °C durante 15 min. Finalmente se prosiguió con extracción de ADN, utilizando Fenol-Cloroformo-Isoamílico. Se realizaron controles negativos con muestras en las que no se incluyeron anticuerpos específicos.

### **5.23 Tratamiento con RNasa H de núcleos bioquímicamente activos.**

Los núcleos fueron extraídos moliendo 5 g de material fresco de plantas enteras de 18 días de edad en un buffer de extracción (300 mM de sacarosa; 20 mM de Tris-HCl pH 8; 5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 mM de KCl; 0,2% de Triton X100; 5 mM de BME; 35% de glicerol; inhibidor de

RNasa). La suspensión se filtró a través de una membrana de 150  $\mu\text{m}$  de poro. Luego, el pellet nuclear se obtuvo mediante centrifugación a 4 °C, 2000 g durante 10 min y se lavó dos veces con buffer de lavado, el cual tiene la misma composición que el buffer de extracción, pero sin inhibidor de RNasa. El pellet se resuspendió en 600  $\mu\text{L}$  de buffer de congelación (50 mM de Tris-HCl pH 8; 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 20% de glicerol; 5 mM de BME). Los núcleos resuspendidos se dividieron en dos, el 50% se utilizó como MOCK y el otro 50% se utilizó para el tratamiento con RNasa H. El tratamiento se realizó con 5 U de RNasa H (Thermo Fisher), durante 1 h a 37 °C seguido de 1 h a 23 °C. Luego, las muestras se centrifugaron y el pellet se resuspendió en buffer de lisis (0,3 M de NaCl; 20 mM de Tris-HCl pH 7,5; 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM de DTT; inhibidores de proteasas) antes de continuar como se describió en el apartado 5.21 “Aislamiento de ARNs unidos a la cromatina y ARNs libres en nucleoplasma”.

#### **5.24 Inmunoprecipitación del híbrido ADN-ARN (DRIP).**

Estos experimentos se realizaron con 3 g de hojas de plantas de 3 semanas de edad, previamente congeladas en nitrógeno líquido. Después de triturar las muestras, realizamos la purificación de los núcleos como se describe en el punto 5.22 “Inmunoprecipitación de la cromatina”. El pellet de cromatina se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis de núcleos (50 mM de Tris-HCl pH 8; 0,1% de SDS; 10 mM de EDTA). Se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer de proteinasa K 2X (200 mM de Tris-HCl pH 7,5; 100 mM de NaCl; 20 mM de EDTA; 20 U/ $\mu\text{L}$  de RNasa.In (PROMEGA); 0,04 mg/mL de proteinasa K) y se incubó durante 1 h a 55 °C. Luego se procedió a realizar una extracción de ADN agregando un volumen de solución fenol-cloroformo-ácido isoamílico (25:24:1) y centrifugando durante 15 min a 13700 g a 4 °C. Luego de transferir la fase superior a un nuevo tubo, se agregó 1 volumen de cloroformo y se centrifugó durante 15 min a 13700 g, 4 °C. La fase superior fue transferida a un nuevo tubo donde la cromatina fue fragmentada usando un sonicador PicoRuptor refrigerado durante cuatro ciclos, 30 seg ON y 30 seg OFF. En este paso, la muestra se dividió en tres fracciones: un 10% de la muestra se utilizó como INPUT, un 45% para el tratamiento con RNasa H como control negativo y el 45% restante para DRIP con el anticuerpo S9.6 (MABE1095, Millipore-SIGMA), previamente unidos a Dynabeads Protein G. La mezcla de muestras con anticuerpos se incubó en rotación durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con buffer de dilución de ChIP (1,1% de Triton X100; 1,2 mM de EDTA; 16,7 mM de Tris-HCl pH 8; 167 mM de NaCl) durante 5 min en rotación a 4 °C. Después de los lavados, las Dynabeads fueron recuperadas en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de proteinasa K 1X e incubadas a 55–65 °C durante 1 h y luego a 95 °C durante 15 min. La

segunda purificación de ADN se realizó agregando un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico y centrifugando a 12000 g durante 15 min a 4 °C. Luego se tomó el sobrenadante y se le agregó un volumen de cloroformo, centrifugando en las mismas condiciones. A la fase superior recolectada se le añadió 1 µL de glicógeno, 10% del volumen de NaAc pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante la noche a -20 °C. El ADN se recuperó por centrifugación durante 30 min a 13700 g, 4 °C. El pellet se lavó con 300 µL de etanol al 70%. El pellet seco se resuspendió con 30 µL de agua suplementada con 0,5 µL de RNasa A (EN0531, Thermo Fisher) y el ADN resultante se utilizó para reacciones de qPCR como se describió anteriormente en la sección 5.19 “PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)”.

### **5.25 Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease (CUT&RUN).**

Para este experimento primero se realizó el tratamiento de déficit de fosfato según lo descrito en la sección 5.2 “Condiciones de crecimiento y tratamientos”. Se utilizaron plantas Col-0, para evaluar la interacción de HYL1 (AS06 136, Agrisera) con la cromatina en diferentes estadios, y plantas transgénicas pDC56/*hst-15*, para analizar la interacción de HST con la cromatina (AS15 2987, Agrisera). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada una bajo déficit de fosfato, denominadas como -Pho; otras tres réplicas biológicas, luego del déficit de fosfato, se recuperaron en medio con fosfato y DRB, y se denominaron -Pho/+Pho+DRB. A la par, se trataron tres réplicas biológicas como muestras control o MOCK. Como controles negativos de uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados se cultivaron líneas *hyl1-2* y *hst-15* bajo tratamiento MOCK. Otro control negativo utilizado, fueron muestras tratadas como MOCK e incubadas con anticuerpo IgG (AS09 605, Agrisera). El control positivo utilizado fue el anticuerpo H3K4me3 (ab8580, Abcam) en muestras Col-0 MOCK. En total se procesaron 33 muestras entre los diferentes tratamientos y controles. Se inició el experimento realizando extracción de núcleos a partir de 1 g de tejido previamente congelado en N2 líquido, según se describió en la sección 5.22 “Inmunoprecipitación de la cromatina”. Se analizó la cantidad e integridad de estos utilizando cámara de Neubauer y el programa informático ImageJ. Los experimentos de CUT&RUN se llevaron a cabo partiendo de 1 millón de núcleos con el kit proporcionado por EpiCypher siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se comenzó con la activación de las beads magnéticas conjugadas con Concanavalina A (ConA). Para esto se tomaron 11 µL de éstas para cada muestra, en tubos de 200 µL diferentes y se colocaron en un rack magnético, se removió el sobrenadante luego de 30 seg y se añadió 100 µL de buffer de activación de Beads. Se resuspendieron las Beads por pipeteo y se colocó



nuevamente en el rack magnético hasta que se aclaró el sobrenadante. El lavado anterior se repitió una vez más. Para finalizar este paso, se resuspendieron las Beads en buffer de activación. Los núcleos luego de su extracción fueron lavados dos veces con 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado mediante pipeteo suave y centrifugados a 600 g por 3 min. Una vez activadas las Beads y lavados los núcleos, el siguiente paso fue combinar ambos para la inmovilización de los núcleos sobre las Beads ConA. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente y luego colocaron en tubos de 200  $\mu\text{L}$  en rack magnético. Se removió el sobrenadante y se agregó 50  $\mu\text{L}$  de buffer para incubación con anticuerpo. A cada tubo se le agregó individualmente 0,5  $\mu\text{L}$  del anticuerpo correspondiente y se llevó a agitación suave a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Durante este paso es vital asegurar la correcta dispersión de las Beads en el líquido, evitando la formación de gotas sobre paredes y tapas de los tubos. Al día siguiente se colocaron los tubos en rack magnético y se realizaron dos lavados con buffer de digestión. Finalizados los lavados se añadió 2,5  $\mu\text{L}$  de proteína A y/o G unida a la Nucleasa Micrococcal (pAG-MNasa) a las Beads resuspendidas en buffer de digestión y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Culminado este paso se repitieron los lavados con buffer de digestión y finalmente las Beads se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  del buffer de digestión. En este paso, se añadió 100 mM  $\text{CaCl}_2$  necesario para activar la MNasa, se mezcló y se incubó por 2 hs a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Terminado este período se agregó 33  $\mu\text{L}$  de buffer de parada, el cual quela el  $\text{Ca}^{+2}$  del medio frenando la reacción de la MNasa y se llevó a incubación a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min para favorecer la liberación de los fragmentos de cromatina cortados al medio líquido. Los tubos con colocados en rack magnético y se recupera el sobrenadante por última vez para continuar con la extracción de ADN. En este punto las beads fueron descartadas. La purificación de ADN se llevó a cabo con el kit CUTANA™ DNA Purification Kit el cual sirve para purificar fragmentos >50 pb. La elusión se realizó con 12  $\mu\text{L}$  del buffer de elusión y se utilizó 1  $\mu\text{L}$  para cuantificar a través de Qubit™ fluorometer.

#### **5.26 Preparación de librerías y Secuenciación.**

Con las muestras obtenidas al finalizar el CUT&RUN se prepararon librerías utilizando el kit CUT&RUN Library Prep Kit (EpiCypher). Brevemente, se utilizaron 5 ng de ADN obtenido en la sección 5.25 "Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease (CUT&RUN)", llevándolo a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con TE buffer 0,5X. Posteriormente, se realizó la reacción de reparación de extremos agregando End Prep Buffer y End Prep Enzima, donde se añadió una a los extremos 3' del ADNdc para la posterior ligación de los adaptadores. La mezcla se incubó durante 20 min a 20  $^{\circ}\text{C}$  y durante 30 min a 65  $^{\circ}\text{C}$ . Luego la muestra se enfrió a 4  $^{\circ}\text{C}$  y se le agregó 1,25  $\mu\text{L}$  de adaptadores para secuenciación Illumina (1,5  $\mu\text{M}$ )

junto con el buffer de ligación y un enhancer. La mezcla se incubó durante 15 min a 20 °C y luego se dejó a temperatura ambiente. Tras alcanzar la temperatura, se añadió la enzima U-Excision y se incubó durante 15 min a 37 °C. A continuación, se añadió 47,75 µL del reactivo SPRIselect (Beckman Coulter, Inc.), se mezcló y se procedió a la separación de las beads en soporte magnético. Con el fin de limpiar el ADN unido a los adaptadores, de los adaptadores libres, se realizaron dos lavados con 180 µL de etanol 85%. Una vez concluidos, se le agregó 10,5 µL de buffer TE 0,1X, se incubó a temperatura ambiente por 2 min y se traspasó el sobrenadante a nuevos tubos. El siguiente paso fue agregar a cada muestra diferentes combinaciones de oligonucleótidos i7 e i5, 1 µL de cada uno, seguido de 12,5 µL de buffer High Fidelity 2X PCR Master Mix y se realizó el ciclado: 1 ciclo de 98 °C 45 seg; 14 ciclos de 98 °C 15 seg y 60 °C 10 seg; 1 ciclo de 72 °C 60 seg. Una vez terminado el ciclado, las muestras se limpiaron del exceso de oligonucleótidos i7 e i5 utilizando el reactivo SPRIselect (Beckman Coulter, Inc.) como se explicó anteriormente. Finalmente, se cuantificó 1 µL de la librería usando un fluorómetro Qubit™ y un Agilent BioAnalyzer. La concentración de la librería se realizó con Library Concentration Conversion Calculator de Integrated DNA Technologies (IDT). Para la secuenciación se realizó por Illumina, desde ambos extremos de la cadena (*paired-end*) con el secuenciador NextSeq™ 550.

### **5.27 Tinción de raíces con fucsina básica.**

La tinción fue llevada a cabo mediante una adaptación de un protocolo previamente descrito (Brioude et al., 2021). 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 min 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.

### **5.28 Separación de tejidos vasculares y epidérmicos en hojas de Arabidopsis.**

Para la separación de la 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 manera, 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, según se describió en la sección 5.17 “Aislamiento de ARN de plantas”.

### **5.29 Extracción de proteínas totales de Arabidopsis.**

Se procesaron aproximadamente 100 mg de plántulas de 15 días de Arabidopsis las cuales fueron pulverizadas en nitrógeno líquido. Luego, 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 un comprimido de Complete Protease Inhibitor Cocktail [Roche]). La muestra se centrifugó durante 20 min a 16000 g y 4 °C, y finalmente el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, obteniendo así los extractos proteicos. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando una solución de BSA (Invitrogen) como estándar. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

### **5.30 Separación de proteínas y análisis por *Western blot*.**

La separación de proteínas mediante geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales según lo descrito previamente (Laemmli, 1970). 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 por 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 proporción 4:1, respectivamente, y se incubaron por 5 min a 95 °C para desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se realizó la corrida electroforética en solución de corrida 1X (Tris-Base 25 mM; glicina 19,2 mM; SDS 0,1% [p/v]). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham) preactivada con metanol 100%, mediante 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, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (leche en polvo 5% [p/v] en TBS-T 1X). Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico para la proteína a visualizar en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C con 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 se incubó 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 añadió 1 mL del sustrato ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare), se incubó durante 2 min 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. HST-mCitrina y MED37D/E-GFP se detectaron utilizando un anticuerpo policlonal específico para la proteína GFP derivada de *Aequorea victoria* (Agrisera AS15 2987, dilución 1:10000), mientras que HYL1 se detectó usando un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína endógena de *Arabidopsis* (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.

### **5.31 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM).**

La localización de HWS en membrana nuclear se realizó observando raíces de plantas de 7 días, transformadas de manera estable con la construcción 35S:HWS:mCitrina. Para los ensayos de co-localización y para evaluar la 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 fluorescente eGFP y HWS/HWS $\Delta$ F-box a la proteína mCherry. Como control negativo, se utilizó una construcción que contiene a HYL1 fusionada a mCherry. En cuanto al análisis del cambio de localización de HST, se infiltraron hojas con la construcción HST-GFP y las versiones sin marcar de HWS/HWS $\Delta$ F-box. Posteriormente se extrajo ARN y se evaluó el material obtenido por RT-qPCR, como se describió en las secciones 2.17, 2.18 y 2.19. Después de 72 hs de la infiltración, se realizó la visualización y captura de imágenes con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Solms, Alemania). Las capturas se realizaron con un objetivo 40x, excitando las muestras con láseres de 488 nm y 552 nm, y recogiendo la emisión en los rangos de 500-530 nm, 600-630 nm y 500-530 nm para eGFP, mCherry y mCitrina respectivamente. Se añadió una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el software Fiji (Schindelin et al., 2009).

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 $\Delta$ F-box fusionadas al dominio N-terminal de la mCitrina. Después de 72 hs de la infiltración, se procedió como se describió anteriormente a la adquisición de imágenes, 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.

### **5.32 Ensayos de Co-Imunoprecipitación (Co-IP) seguido de *Western blot*.**

Para los ensayos de Co-IP, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de HYL1 y DCL1 utilizando anticuerpos anti-HYL1 (dilución 1:1000) y anti-DCL1 (dilución 1:1000) en muestras de plántulas transgénicas de *Arabidopsis* co-transformadas con las construcciones 35S::HWS junto con 35S::MED37E:eGFP, 35S::HWS $\Delta$ F-box junto con 35S::MED37E:eGFP y plantas mutantes *hws-3* transformadas con 35S::MED37E:eGFP. Se utilizó aproximadamente 3 g de material vegetal sometido a un proceso de *crosslinking* con formaldehído 37% y aplicando vacío durante 15 min. Posteriormente, se añadió Glicina 2 M para detener la reacción de *crosslinking* y se secaron las muestras antes de congelarlas en nitrógeno líquido. En primer lugar, se llevó a cabo el enriquecimiento de núcleos de las muestras antes mencionadas, como se mencionó en la sección 5.22 “Inmunoprecipitación de la cromatina”. Para la extracción de proteínas, el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8; 1% NP40; 10 mM EDTA; 200  $\mu$ M PMSF) y se sonicó en un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (5 ciclos de 30 seg ON y 30 seg OFF). Posteriormente, se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4 °C, y se recolectó el sobrenadante en un nuevo tubo. Se procedió entonces a la inmunoprecipitación utilizando las beads magnéticas Sure Beads™ Protein-A (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Culminada 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 h a 65°C, para revertir el *crosslinking*. Luego, se agregaron 200  $\mu$ L de buffer de carga Laemmli con urea (0,24 g/mL) y se incubó durante 10 min a 95 °C. Posteriormente, se detectó eGFP-MED37E en la fracción de IP mediante *Western blot* usando el anticuerpo anti-GFP Agrisera AS152987.

### **5.33 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 transfirió 100 mL de YPDA, y se incubó durante 4-5 hs a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una OD600 1,3-1,5. El cultivo se centrifugó a 4000 g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 mL de agua bidestilada estéril fría. Posteriormente, se repitió el paso de centrifugación y se resuspendió el pellet en 50 mL de agua bidestilada estéril fría y se repitió el paso de centrifugación. El precipitado resultante se resuspendió en el agua

remanente del volcado. La suspensión se transfirió 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 dispensaron las levaduras en distintos tubos para proceder con la transformación. Para la transformación, se tomaron 60-80 µL de células competentes, y se añadió 1 µg de ADN de cada construcción. La mezcla de células y 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 después del choque eléctrico, las células de *S. cerevisiae* se recuperaron en 1 mL de sorbitol 1 M, se incubaron 5 min a temperatura y 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) suplementado con sorbitol 1 M.

#### **5.34 Ensayos de doble híbrido en levaduras.**

Los ensayos de doble híbrido en levaduras 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<sub>600</sub> = 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.

#### **5.35 Fraccionamiento núcleo-citoplasma.**

Para estos experimentos se partió de 2 g de material previamente congelado en nitrógeno líquido. Del polvo obtenido se tomaron 100 mg para realizar la extracción de ARN total como se explicó en la sección 5.17 "Aislamiento de ARN de plantas". Al resto del material pulverizado se le agregó 2 mL/g de Buffer de Lisis (20 mM Tris HCl pH 7,4; 20 mM KCl; 2 mM EDTA; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 % Glicerol; 250 mM Sacarosa; 5 mM DTT; 1µM Pefabloc). Se agitó suavemente hasta su resuspensión total y se filtró a través de una doble capa de Miracloth 100 µm. El filtrado se centrifugó durante 10 min a 1500 g a 4 °C. En este punto,

el sobrenadante es el citoplasma, el cual se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente por 10 min a 10000 g a 4 °C. El pellet correspondiente a los núcleos se lavó 4 veces con 5 mL de NRBT (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 25 % Glicerol; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2% Triton X-100). Entre cada lavado se centrifugó por 10 min a 1500 g a 4 °C. Después del último lavado, el pellet se resuspendió en 500 µL de NRB2 (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 250 mM Sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% Triton X-100; 5 mM β-Mercaptoetanol; 1 µM Pefabloc). Estos 500 µL se colocaron cuidadosamente sobre 1000 µL de NRB3 (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 1,7 M Sacarosa; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% Triton X-100; 5 mM β-Mercaptoetanol; 1 µM Pefabloc). La muestra se centrifugó durante 45 min a 16000 g a 4 °C y el pellet obtenido se resuspendió en 400 µL de Buffer de Lisis.

### **5.36 Mutagénesis en semillas de Arabidopsis con etil-metano-sulfonato (EMS).**

Para la mutagénesis de las semillas de *hst-15* con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS), se alicuotaron entre 17000 y 20000 semillas (equivalente a 300-400 mg de semillas) y se hidrataron con 45 mL de una solución de Tween-20 al 0,005% (v/v) durante 2-4 hs 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 eliminar el detergente. A partir de este punto se trabajó bajo campana de extracción química y en máximas condiciones de seguridad. Se mezclaron 150 µL de EMS con 350 µL de agua utilizando una jeringa con aguja hipodérmica 25G generando una emulsión de EMS al 30% (v/v). Esta emulsión (250 µL) fue añadida al tubo Falcon de 50 mL que contenía las semillas en agua, quedando el EMS en una concentración final del 0,15 % (v/v). Se selló la tapa del tubo con Parafilm, se lo introdujo en una bolsa con cierre hermético, y se incubó durante 16 hs en rotación para asegurar el contacto de todas las semillas con la solución. Superada esta incubación, se descartó la solución de EMS y se realizaron 8 lavados con 45 mL de agua durante 20 min en rotación continua. Tras el último lavado, las semillas se resuspendieron en agar 0,1% (p/v) y se estratificaron durante 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 maceta (15 cm de largo por 12 cm de ancho) y se cultivaron en cámara hasta que estuvieron listas para la cosecha (alrededor de 60 días). La tasa de mutagénesis se evaluó observando el porcentaje de plantas con 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 maceta. Cada maceta se cosecho por separado generando

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.

### **5.37 *Suppressor screening* por mutagénesis con EMS.**

La identificación de las plantas mutantes de interés se realizó por observación comparativa de fenotipos respecto a plantas Col-0 salvajes y mutantes de *hst*. 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 según se explicó en la sección 5.16 “Extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis*” y se realizó una PCR según la sección 5.6 “Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)”, para evaluar si presentaban la mutación *hst-15* en homocigosis. A su vez, se realizaron ensayos de *Northern blot* (Sección 5.20 “*Northern blot* no radioactivo para la detección de ARNs pequeños”) para evaluar aquellas plantas que podrían presentar niveles restaurados de miARNs dentro de la progenie mutagenizada. Aquellas plantas mutantes que presentaron homocigosis en la mutación *hst-15* así como niveles total o parcialmente restaurados de miARNs fueron seleccionadas como mutantes revertantes candidatas a presentar alteraciones en la selección y/o carga de las hebras de miARNs, el resto fueron catalogadas como mutantes en la biogénesis o acción de miARNs.

### **5.38 Generación de grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo.**

Las plantas mutantes seleccionadas se cruzaron con plantas de la línea parental *hst-15* para generar grupos de mapeo destinados a 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, tal como fue previamente descrito en la sección 5.16 “Extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis*”.

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  $\mu$ L de transposomas Tn5 (expresada y purificada según lo descrito por Picelli y colaboradores (Chitwood et al., 2009)) inmobilizadas en beads paramagnéticas con Streptavidina (New England Biolabs), 4  $\mu$ L de solución 5X TAPS-DMF MgCl<sub>2</sub> (50 mM TAPS; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 50% DMF [v/v]), y se llevó a volumen final 20  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de la solución de reacción Q5 5X, 2,5  $\mu$ L de dNTPs 2 mM, 0,75  $\mu$ L del P5 primer S5 10M, 7,5  $\mu$ L del P7 primer N7 1M, 0,25  $\mu$ L de Q5 high-fidelity DNA polymerase (M0491, New England BioLabs) y H<sub>2</sub>O miliQ estéril hasta un volumen final de 25  $\mu$ L por reacción, seguido del siguiente programa de termociclado: 5 min a 72 °C, 30 seg a 98 °C, seguido de 8 ciclos de desnaturalización (15 seg a 98 °C), anillado (20 seg a 65 °C), y extensión (90 seg 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).

### **5.39 Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación.**

Un total de nueve conjuntos (pooles) 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 (Bolger et al., 2014), quedando en promedio lecturas de 130 bases. Luego se mapearon al genoma de *Arabidopsis* usando bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), obteniéndose porcentajes promedio de mapeo superiores al 90% de las lecturas. Los mapeos de múltiples líneas 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, (H. Li et al., 2009)). A continuación, se utilizó el programa SHOREmap (versión 3.6, (Schneeberger et al., 2009)) 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.

#### **5.40 Análisis bioinformático de los datos de plaNET-seq para el estudio del procesamiento co-transcripcional.**

Las coordenadas de los precursores y de los miARNs maduros se clasificaron por su dirección de biogénesis según lo indicado por Moro et al. 2018 (Moro et al., 2018) y cada grupo se analizó por separado. Los pri-miARNs se escalonaron para excluir los brazos 5' y 3' para evitar ruido en la señal al perfilar los datos de plaNET-seq. Los pri-miARNs de BTL, LTB y LTBs se escalonaron desde las coordenadas cromosómicas del miRNA-5p hasta el miRNA-3p y los pri-miARNs de BTLs desde el primer corte de DCL1 hasta las coordenadas genómicas del miARN-3p. Para el análisis de la formación de R-loops sobre los loci de MIRNA, se definieron dos ventanas de coordenadas de la siguiente manera: una desde el TSS hasta el nt antes del inicio del miARN-5p y la otra desde el miARN-5p hasta el final del miARN-3p. Para definir la primera ventana, se anotó cada TSS de pri-miARN combinando información de diferentes fuentes: la base de datos PTSmiRNA, TSS de transcripciones primarias de MIRNA de Arabidopsis reportadas por Xie et al. 2005 (Z. Xie et al., 2005), lecturas mapeadas de plaNET-seq, etiquetas de secuencia expresadas de Arabidopsis y ADNc de longitud completa, análisis de extremo pareado de TSS95 y secuenciación de TSS a nivel genómico.

Las muestras de los estudios de secuenciación seleccionadas se descargaron de repositorios públicos en formato bigWig. Además, las lecturas de experimentos de plaNET-seq se descargaron en formato SRA y se convirtieron a formato fastq utilizando fasterq\_dump (SRA-Toolkit). El recorte, alineación al genoma TAIR10 y el post-procesamiento de las lecturas de plaNET-seq se realizaron utilizando los scripts 01-Alignment\_plaNET-Seq.sh y 02-Postprocessing\_plaNET-Seq.R disponibles en el repositorio de código: [https://github.com/Maxim-Ivanov/Kindgren\\_et\\_al\\_2019](https://github.com/Maxim-Ivanov/Kindgren_et_al_2019). El script loadNETSeqBAM.R se modificó en la línea 65 para obtener la cobertura genómica en los 5'-nt de las lecturas mapeadas (modo = "inicio") o la cobertura completa (modo = "lectura completa"). En cada caso, la cobertura genómica se exportó como archivos bigWig y bedGraph específicos de hebra utilizando rtracklayer\_1.42.2. Para la preparación de los gráficos metagenómicos con los datos de plaNET-seq, se fusionaron los dos replicas

biológicas utilizando la herramienta bigWigMergePlus ([https://github.com/c3g/kent/releases/tag/bigWigMergePlus\\_2.0.0](https://github.com/c3g/kent/releases/tag/bigWigMergePlus_2.0.0)). Para algunos gráficos, se mostraron archivos específicos de hebra por separado. Se utilizó el paquete deepTools para dibujar gráficos de metagenes de muestras de plaNET-seq y ssDRIP-seq. Se utilizó la herramienta ComputeMatrix en modo de regiones de escala seguido de la herramienta plotProfile. Para obtener la señal de R-loop de sentido y antisentido, se utilizó la herramienta computeMatrixOperations (paquete deepTools) para filtrar muestras de ssDRIP-seq por hebra (subcomando filterStrand) y combinar las matrices resultantes (subcomando rbind).

Para calcular la proporción de procesamiento co-transcripcional versus post-transcripcional para cada pri-miARN individual, se utilizaron alineamientos de procesamiento co-transcripcional de plaNET-seq y cobertura completa de lecturas de plaNET-seq remapeadas para pri-miARNs no procesados para calcular los puntajes, utilizando multiBigwigSummary de deepTools en modo de archivo BED97. Para simplificar el análisis, se excluyeron los loci de MIRNA con señal baja de plaNET-seq y con mecanismos de procesamiento poco claros.

#### **5.41 Análisis de datos de espectrometría de masas HWS/HWS.**

Los resultados de espectrometría de masas de proteínas que interactúan con HWS fueron obtenidos de (Lang et al., 2018). Estos resultados provienen de plantas que expresaban HWS fusionada a mCitrina. Con estas muestras, los autores realizaron una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra la proteína fluorescente, y luego hicieron una espectrometría de masas. Los controles usados fueron mCitrina fusionada a la versión HWS $\Delta$ Fbox y plantas expresando únicamente GFP (también reconocida por el anticuerpo). Las proteínas interactuantes con HST se obtuvieron de datos de espectrometría de masas realizadas por (Cambiagno et al., 2021). Para este experimento los autores utilizaron plantas mutantes *hst-15* complementadas con HST fusionada a la proteína fluorescente GFP y como control utilizaron plantas *hst-15* transformadas solamente con GFP. Para determinar los interactores comunes entre ambas proteínas, HWS y HST, se utilizó VennDiagram (Chen et al., 2023).

#### **5.42 Ontología Génica**

Los análisis de ontología génica (gene ontology) fueron realizados utilizando el paquete de anotaciones funcionales de Arabidopsis org.At.tair.db (Carlson (2024) Genome wide annotation for Arabidopsis. R packsge versión 3.19.1) y la función enrichGO del paquete de R clusterProfiler (Wu et al., 2021). Los resultados fueron visualizados con un dotplot

representando las categorías con círculos, que están coloreados en función de su valor p, ajustado por FDR, y con un tamaño proporcional al número de genes anotados en la categoría.

#### **5.43 Árboles filogenéticos.**

Los árboles filogenéticos fueron realizados en el servidor NGPhylogeny (<https://ngphylogeny.fr/>, (Lemoine et al., 2019)). Se utilizó la siguiente secuencia de procesamientos: alineamiento de secuencias con MAFFT (Kato & Standley, 2013), curado del alineamiento con BMGE (Criscuolo & Gribaldo, 2010) e inferencia del árbol filogenético con PhyML (Guindon et al., 2010), un programa basado en máxima verosimilitud. Para evaluar la confiabilidad de los diferentes clados obtenidos se hicieron 100 réplicas de bootstrap y se removieron en el árbol final los nodos con un valor de bootstrap menor al 50%. La visualización y manipulación de los árboles generados se realizó en el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

#### **5.44 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).**

Este experimento fue realizado por el Dr. Tomasz Gulanicz en el Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Adam Mickiewicz en Polonia. Para estos experimentos se utilizaron núcleos aislados de hojas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad según se describió en la sección “5.22 Inmunoprecipitación de la cromatina”. Antes del aislamiento, las plantas se fijaron durante 1 h en paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. Para la detección de pri-miARNs se aplicaron oligonucleótidos de ADN antisentido marcados con digoxigenina en sus extremos 5' y que reconocen el intrón de pri-miARN163 y pri-miARN156a (Tabla 1). Se usó transferasa terminal (TdT) (Sigma Merck) para agregar nt adicionales conjugados con digoxigenina al extremo 3' de cada sonda. Para dicha reacción cada sonda (a una concentración final de 10 pM) se incubó en buffer de reacción (CoCl<sub>2</sub> 5 mM, DIG-11-dUTP 0,1 mM (Sigma Merck), dATP 0,1 mM, Alexa Fluor 488-5-dUTP 0,2 mM (Thermo Fisher)) con 400 U de TdT por reacción (Sigma Merck) durante 40 min a 37 °C. Los pri-miARNs se localizaron aplicando FISH combinado con la inmunolocalización de digoxigenina unida a los extremos 5' y 3' de las sondas. Antes de la hibridación, los núcleos se trataron con PBS que contenía Triton X100 al 0,1%. Luego, se hibridaron con cada sonda en tampón de hibridación (formamida al 30% (v/v), SSC 4x (NaCl 600 mM, citrato de sodio 6 µM), solución de Denhardt 5x (Ficoll 400 al 0,1% (g/v), Polivinilpirrolidona al 0,1 % (g/v), BSA al 0,1 % (g/v), EDTA 1 mM y tampón fosfato 50 mM, pH 7,2)) en una cámara húmeda durante la noche a 26 °C. Después

del lavado, se añadió anti-DIG primario de ratón (Sigma Merck) o conejo (Sigma Merck) (diluido 1:100) en PBS que contenía BSA acetilada al 0,05 % y los portaobjetos se incubaron durante la noche a 10 °C. Posteriormente, los núcleos se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón o de cabra anti-conejo conjugados con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555 (diluido 1:100) (Thermo Fisher) en PBS que contenía BSA acetilada al 0,05% durante 2 hs a 37 °C. El ADN se tiñó con Hoechst 33342 (Thermo Fisher) y se montó en reactivo antidecoloración ProLong Gold (Life Technologies).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos y sondas utilizadas.

GEN	NOMBRE	SECUENCIA (5' -> 3')	USO
AT3G05040	<i>hst-6</i>	TTGCTAATGCAAGCGAGAATTGG	*Genotipado
		CATACCAGCTTCACTCATTGCAG	
		CAGCAGACTGACTCTTAAGAGGA	
AT3G05040	<i>hst-15</i>	CCTGGAATGTGGACATGCTTAG	*Genotipado
		GAAAAATCAAATGATCAATGCAAGG	
AT3G61590	<i>hws-1</i>	CTCTACCCTATCCCTTTTATAAC	*Genotipado
		TACACGGCAATGTCTACCTCCG	
AT3G61590	<i>hws-3</i>	CTTGGTACTTCATGTTCACTAC	*Genotipado
		TGCTTGGTTCGCTCGGTTTAA	
		TACACGGCAATGTCTACCTCCG	
		TCAGAGCTGTAGAGATGAATAGAG	
AT1G09700	<i>hyl1-2</i>	AGTTCTCCCAGCGCTAATCTC	*Genotipado
		TTCTTGGAATTGGATTGCAG	
AT2G13540	<i>abh-285</i>	AATACTTGCCATATCGCTCC	*Genotipado
		TAATTTAGGCTCTTCCGGGTG	
AT1G01183	MIR165A	CCATCATCACCATTACCAACC	*RIP-qPCR *Tratamiento con ARNs H + RIP-qPCR *Tratamiento LHS + RIP-qPCR
		CCTCAACTGAAATAGCTTAACCC	
		GTTGTCTGGATCGAGGATATTATAG	
		GTCCGAGGATACTCTATGATC	
		ACATGTTATTGCCTCTGATCACC	
AT3G61897	MIR166B	GGATCTGTTGGGGGACGAAC	*RIP-qPCR *Tratamiento LHS + RIP-qPCR
		CCTCAAAAGAAAAATCCCTC	
		GGCTCGAGGACTCTTATTC	
		CCGACGACACTAAAACCC	
		CAATTATCACTCCCTCACAATCC	
		CACATGGATTCATAGATAGAAACC	
AT4G19395	MIR168A	CATATCATAAACCTCATTTCCCA	*RIP-qPCR *DRIP-qPCR
		CGAGCCCGATGGTGAGACTC	
		GGAACCAATTCCGCTGACAC	
		GGGATCCAATCCCTGCTCAC	
		TCCTCGAGGTGTAAAAAACTCG	
		GAGAAGCGTAGAAATCTTCCAG	

AT1G73687	MIR159A	TGGTAGAGCTCCTTAAAGTT	*RIP-qPCR *DRIP-qPCR
		TAAAGCTCCTGAGATATGCA	
		GGTCTTTACAGTTTGCTTATG	
		CGACTCTCTATCTATCATTCTTCC	
		GAAAGTTTTGATGAGAACGTGG	
AT2G25095	MIR156A	GTGAGCACGCAAGAGAAGCAAG	*RIP-qPCR
		AAGAACTGACAGAAGAGAGTGAG	
		GAGAACGAAGACAGGCCAAAG	
AT2G47015	MIR408	GACAGGGAACAAGCAGAGCATGG	*RIP-qPCR *DRIP-qPCR
		GAGACAAAACAGAGTCGTTTAATG	
		GAACTAACTCAAAGGAACTGGC	
		CTCTCTCATTACCGCTTTGTCTTC	
		CATGCTCTGCTTGTTCCCTGT	
AT1G77235	MIR402	GGTTCATCGGAAGGAGTTAGC	*RIP-qPCR *DRIP-qPCR
		GCAACTCAAACCTTATCTACCACG	
		GAATCTGCTGTTGGAAATTGAGGC	
		CATGAAAATATGGGTTAACAAACAAAGG	
AT4G17788	MIR160B	CTCTGGTTCATGTTTTCCCC	*RIP-qPCR *Tratamiento con ARNsa H + RIP-qPCR
		GAACCCTTAAATATGATTGGTGG	
		TGCTTGACTACTCTGTACG	
AT2G46685	MIR166A	CTGGCTCGCTCTATTCATGTTGG	*Tratamiento LSH + RIP-qPCR
		GACGCTAAAACCCTAATCAAATC	
		GGGACGAACATAGAAAGAGAGAG	
		GCCCCTTTTTCTTTTCAGTCG	
AT5G01747	MIR164B	CAGACAAATCATACCCCAAGG	*Tratamiento con ARNsa H + RIP-qPCR *Tratamiento LSH + RIP-qPCR
		CACACCTTCATCATTCTCTCCG	
		CCACAAATGCGTGTATATATGC	
		CTAACTCATCCATATCATCACTC	
AT5G41663	MIR319B	TCTAGCACGCACAGAGAGG	*DRIP-qPCR
		CCATGAGTGGACCGAAGAAAGC	
AT3G51375	MIR171a	TTTCCTTTGATATCCGCACTTTAAG	*DRIP-qPCR
		GATATTGGCGCGGCTCAATC	
AT1G24260	SEP3	GGCTGGAAGAAAGCTTGGGAGT	*DRIP-qPCR
		AGATGCCACTCCAGCTGAACCC	
AT3G13855	U6	CGGGGACATCCGATAAAATTGG	*RIP-qPCR *Tratamiento con ARNsa H + RIP- qPCR *Tratamiento LHS + RIP-qPCR
		CGATTTGTGCGTGTATCCTTG	
AT3G18780	ACTINA	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	*qPCR déficit de fosfato
		GGAGATCCACATCTGCTGGAATG	
AT4G18480	SUL	GCAGGACAAGCTTCAAGACC	*RT-qPCR
		CGGTGCCTTAAGCAGTTAGG	
AT1G22710	SUC2	TAGCCATTGTCGTCCCTCA	*RT-qPCR
		CCTAACACAAATGCTGGAATGT	
AT4G21750	ATML1	GAGGAGGAGGAGGTAGTGCT	

		TGTGAGTAGTGAACCGCCAC	*RT-qPCR
AT2G33770	PHO2	AAGGATGGACCTTCTGCGTG CAGTCGCATCCCACCTGAAT	*qPCR déficit de fosfato
AT1G63005	miR399b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACAGGGC CGGCTGCCAAAGGAGAGTTGC	*RT-qPCR
AT2G34208	miR399f	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACCGGGC CGGCTGCCAAAGGAGATTTGC	*RT-qPCR
AT1G73687	miR159a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACTAGAGC GCGGCGTTGGACTGAAGGGAG	*RT-qPCR
AT2G39175	miR160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGATGGCAT TGGTATGCCTGGCTCCCTGT	*RT-qPCR
AT2G25095	miR156	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACGTGCTC GCGGCGGTGACAGAAGAGAGT	*RT-qPCR
AT4G23713	miR319	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGAGAGGGA GCGGCGTTGGACTGAAGGGAG	*RT-qPCR
AT2G47585	miR164	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACTGCACG AGGACATGGAGAAGCAGGGCA GTGCAGGGTCCGAGGT	*RT-qPCR
			miARN qPCR universal
AT3G61590	HWS/ HWS $\Delta$ FB <sub>ox</sub>	CCCGGATCCATGGAAGCAGAAACGTCTTG CCCCGCGGCCGCAGGAGCAATCTCGAGTC TTG	*Clonado
AT3G05040	HST15- fragmento 1	AATTTACTATTCTAGTCGACCTGCAGGCGG ATG GAAGATAGCAACTCCAC TACTAGTAGCTGGATCCTTCACAACGTGTG GAAGAG	*Clonado. *PCR overlapping
AT3G05040	HST15- fragmento 2	TCCACACGTTGTGAAGGATCCAGCTACTAG TACATC GCGGACTCTAGCATGGCCGCGGGATATCA TCAAACAA TTCTCCAACGTTTAC	*Clonado. *PCR overlapping
AT3G05040	HST15	CCCGGATCCATGGAAGCAGAAACGTCTTG CCCCGCGGCCGCAGGAGCAATCTCGAGTC TTG	*Clonado
AT2G25095	miR156a- 5'DIG	TGTGCTCACTCTCTTCTGTCA	*ARN blot
AT1G01183	miR165ab- 3'DIG	GGGGGATGAAGCCTGGTCCGA	*ARN blot

AT2G46685	miR166a-g 3'DIG	GGGGAATGAAGCCTGGTCCGA	*ARN blot
AT3G51375	miR171 3'DIG	GATATTGGCGCGGCTCAATC	*ARN blot
AT4G23713	miR319a 3'DIG	GGGAGCTCCCTTCAGTCCAA	*ARN blot
AT3G13855	U6 3'DIG	GCTAATCTTCTCTGTATCGTTCC	*ARN blot
AT1G66725	MIR163	GTTAATGTTAGTAGTTAAAAAGGATTAGTG	*FISH-intrón
AT2G25095	MIR156a	GCTAATCTCACTTAACCACGCG	*FISH-intrón

Tabla 2. Construcciones utilizadas

NOMBRE	CONSTRUCCIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pDG35	35S:HWS	Promotor 35S (Pro35S) dirigiendo la expresión del ADNc de HWS	Tesis Delfina Gagliardi
pDG36	35S::HWS $\Delta$ Fbox	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de HWS sin su dominio F-Box (HWS $\Delta$ F-box)	Tesis Delfina Gagliardi
pDG46	35S::HST15	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína HST15	Tesis Delfina Gagliardi
pPM442	35S::HYL1	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i>	(Manavella et al., 2012)
pDG42	35S::HWS:mCherry	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de HWS fusionada a mCherry en su dominio C-terminal	Tesis Delfina Gagliardi
pDG43	35S::HWS $\Delta$ Fbox:mCherry	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de HWS $\Delta$ F-box fusionada a mCherry en su dominio C-terminal	Tesis Delfina Gagliardi
pDG45	35S::HST15:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína HST15 fusionada a eGFP en su dominio C-terminal	Tesis Delfina Gagliardi
pMC21	35S:Citrina:HWS	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de HWS fusionada a mCitrina en su dominio N-terminal	(Lang et al., 2018)
pMC39	35S:HWS $\Delta$ Fbox:Citrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de HWS $\Delta$ F-box fusionada a mCitrina en su dominio N-terminal	(Lang et al., 2018)



pDC56	35S::eGFP:HST	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HST</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	(Cambiagno et al., 2021)
pDC103	35S::eGFP:HST $\Delta$ C	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HST</i> sin su dominio C-terminal ( <i>HST-<math>\Delta</math>C</i> ) fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	(Cambiagno et al., 2021)
pDC183	35S::MED37D:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37D</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio C-terminal	(Cambiagno et al., 2021)
pDC187	35S::MED37E:eGFP	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>MED37E</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio C-terminal	(Cambiagno et al., 2021)
pPM82	35S::eGFP:HYL1	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i> fusionada a <i>eGFP</i> en su dominio N-terminal	(Manavella et al., 2012)
pDG29	35S::HWS:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Tesis Delfina Gagliardi
pDG30	35S::HWS $\Delta$ Fbox:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS<math>\Delta</math>F-box</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Tesis Delfina Gagliardi
pDG31	35S::HWS- N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Tesis Delfina Gagliardi
pDG32	35S::HWS $\Delta$ Fbox:N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWS<math>\Delta</math>F-box</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Tesis Delfina Gagliardi
pDG44	35S::HST15-N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión de la proteína <i>HST15</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i>	Tesis Delfina Gagliardi
pDC87	35S::HASTY:N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión del ADNc de	(Cambiagno et al., 2021)

		<i>HST</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	
pDC90	35S::DCL1:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión deL ADNc de DCL1 fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	(Cambiagno et al., 2021)
pDC180	35S::MED37D:C-mCitrine	dirigiendo la expresión deL ADNc de <i>MED37D</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	(Cambiagno et al., 2021)
pDC182	35S::MED37E:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión deL ADNc de <i>MED37E</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	(Cambiagno et al., 2021)
pDC183	35S::IMPA2:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión deL ADNc de <i>IMPA2</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	(Cambiagno et al., 2021)c
pLG75	35S::RAN1:C-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión deL ADNc de <i>RAN1</i> fusionada al dominio C-terminal de <i>m-Citrina</i> .	Este trabajo
pAT26	35S:CARP9:N-mCitrine	Pro35S dirigiendo la expresión deL ADNc de <i>CARP9</i> fusionada al dominio N-terminal de <i>m-Citrina</i> .	(Tomassi et al., 2020)
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> .	(Tomassi et al., 2020)
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> .	(Cambiagno et al., 2021)
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> .	(Cambiagno et al., 2021)
pMC09	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.	(Lang et al., 2018)

pMC42	ProADH1::GAL4AD:HWSΔF-box	ProADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HWSΔF-box</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4 (AD)</i> para ensayo de doble híbrido en levaduras.	(Lang et al., 2018)
pAG56	ProADH1::GAL4BD:MED18	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.	(Cambiagno et al., 2021)
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.	(Cambiagno et al., 2021)
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.	(Cambiagno et al., 2021)

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 SECCIÓN 1: Procesamiento co-transcripcional

Los análisis bioinformáticos de presentados en esta sección fueron realizados en cooperación con la Dra. Ileana Tossolini.

#### 6.1.1 Los pri-miARNs pueden ser procesados de forma co-transcripcional.

La visión canónica de la biogénesis de miARNs plantea que luego de la transcripción de los genes *MIRNA*, los pri-miARNs son liberados al nucleoplasma y procesados por el microprocesador en orgánulos sin membrana denominados D-bodies (Achkar et al., 2016). Notoriamente, en los últimos años, se ha demostrado que el complejo de procesamiento de miARNs puede unirse a la cromatina en los loci que codifican pri-miARNs (Cambiagno et al., 2021; Fang et al., 2015), abriendo la posibilidad de que el procesamiento de los mismos se pueda generar en esta localización. Esto llevó a que nos preguntáramos si la asociación del complejo de procesamiento a los loci *MIRNA* puede conllevar el procesamiento co-transcripcional de miARNs. Para estudiar esta hipótesis primero realizamos ensayos de inmunoprecipitación (IP) de la cromatina usando anticuerpos contra la histona 3 (H3) seguido de aislamiento de ARNs asociados, con el objetivo de purificar ARNs nacientes de la transcripción. Luego de la extracción de ARN, y su retrotranscripción con dN6 (primers de 6 nucleótidos aleatorios), realizamos PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para estudiar la presencia de diferentes intermediarios del procesamiento asociados a la cromatina como indicativo de procesamiento co-transcripcional. Para tal fin utilizamos tres pares de oligonucleótidos diseñados para detectar el brazo 5' (par A), la sección del tallo-bucle (par B), y el brazo 3' (par C) de los pri-miARNs (Figura 9A). Al analizar los resultados, pudimos apreciar que para los tres pri-miARNs estudiados la sección del tallo-bucle está marcadamente subrepresentada respecto a los extremos de los pri-miARNs en plantas salvajes. Por el contrario, en las plantas mutantes en *HYL1*, donde el procesamiento de pri-miARNs está inhibido (Han et al., 2004; Vazquez et al., 2004), los niveles de los tres intermediarios estudiados son equivalentes (Figura 9A). La diferencia en los niveles entre los diferentes intermediarios de pri-miARNs encontrados unidos a la cromatina en las plantas salvajes, es un fuerte indicio de que el procesamiento de los mismo se está llevando a cabo mientras estos aún continúan unidos a la Pol II, en otras palabras, el procesamiento podría ocurrir durante la transcripción.

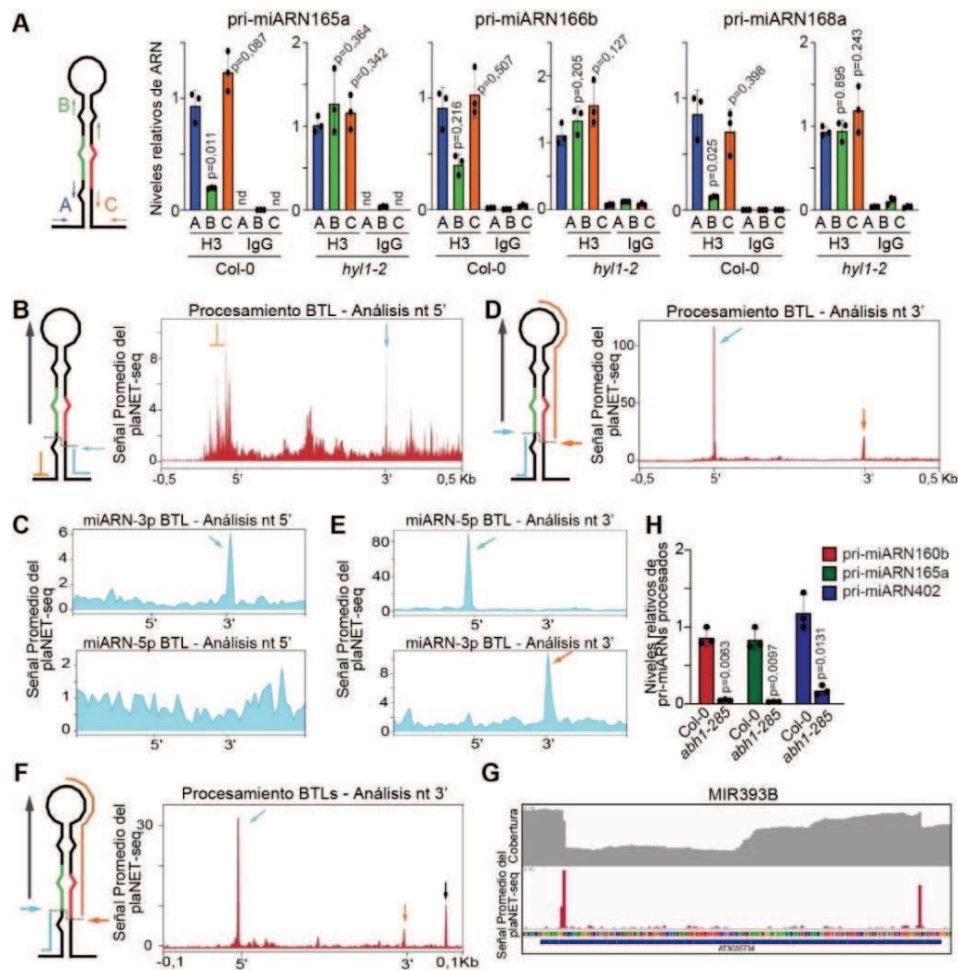
Con el objetivo de confirmar esta observación a escala genómica, utilizamos datos de plaNET-seq (de su nombre en inglés: *plant native elongating transcripts sequencing*), los cuales nos permiten identificar todos los transcritos nacientes unidos a la Pol II, pudiendo así analizar la presencia de posibles intermediarios de procesamiento de todos los pri-miARNs de Arabidopsis. En el plaNET-seq, una versión de la subunidad NRPB2 de la Pol II etiquetada con FLAG es utilizada para complementar mutantes *nrbp2-1* (Kindgren et al., 2020). Luego, realizando una IP con anticuerpo anti-FLAG, y por lo tanto de la Pol II, podemos aislar los transcritos aún unidos a este complejo, los cuales son posteriormente identificados usando secuenciación Illumina. Durante el análisis de los datos solo se grafica el nucleótido 3' de cada lectura mapeada en el genoma, la cual corresponde al último nucleótido incorporado por la Pol II (el nucleótido 5' es menos informativo ya que es variable según el sitio de inicio de la transcripción y otras potenciales modificaciones co-transcripcionales). A fin de hacer un análisis metagenómico, y dado que los loci *MIRNA* en plantas difieren mucho en longitud, escalamos la longitud de todos los pri-miARNs usando como referencia el primer nucleótido del miARN-5p (miARN más cercano al TSS) y el último nucleótido del miARN-3p (miARN más lejano del TSS). Además, sub-clasificamos los pri-miARNs según su dirección de procesamiento (BTL, LTB y sus contrapartes procesadas secuencialmente BTLs y LTBs) (Moro et al., 2018). En el caso de confirmarse el procesamiento co-transcripcional de miARNs, sería esperable encontrar principalmente al fragmento correspondiente al brazo 3' de los pri-miARN unidos a la Pol II. Por ende, comenzamos analizando el nucleótido 5' de cada lectura con la expectativa de visualizar el último corte realizado por DCL1. En el análisis del primer grupo, pri-miARNs procesados BTL, logramos detectar intermediarios del procesamiento, coincidentes con el sitio de clivaje de DCL1, unidos a la Pol II (visualizado como un pico en el nucleótido inmediatamente después del nt 3' del miARN-3p (Figura 9B y 9C, flecha cian). Las lecturas en la región del TSS de pri-miARN se pueden observar como un área de picos no definidos, esto es de esperar dado que el comienzo de la transcripción es diferente para cada *MIRNA* y esta región no fue escalada (Figura 9B, marca naranja). Como era de esperar, dada la dirección del procesamiento, ningún pico definido se produjo en la región del miARN-5p (Figura 9B y 9C). El análisis del nt 5' de las lecturas arrojó, como era de esperar, mucho ruido de fondo el cual corresponde a fragmentos de distinta longitud unidos a la Pol II. Para reducir este ruido repetimos nuestros análisis siguiendo la convención previamente utilizada para el análisis de los experimentos de NET-seq, la visualización del nucleótido 3' de cada lectura (Kindgren et al., 2020). Al realizar el análisis del nt 3', detectamos los intermediarios

de procesamiento con perfiles bien definidos y con menos ruido de fondo (Figura 9D). Como podemos observar en el nuevo perfil, el brazo 5' de los pri-miARNs aparece fuertemente retenido en el complejo transcripcional, dada la intensidad obtenida en el nt anterior al comienzo del miARN-5p (Figura 9D y E, flecha cian). Del mismo modo, los patrones obtenidos para los miARN-5p y miARN-3p son mucho más claros y definidos (Figura 9E), pudiendo identificarse el nt 3' anterior al comienzo del miARN-5p (flecha cian). Dado los mejores resultados obtenidos, decidimos continuar los análisis centrados el nt 3' de las lecturas del plaNET-seq. Examinamos el patrón obtenido al estudiar el subgrupo BTLs, y pudimos observar el mismo patrón obtenido para los BTL, la sobrerrepresentación del nt 3' anterior al comienzo del miARN-5p (Figura 9F, flecha cian).

En el análisis del nt 3' de ambos subgrupos de pri-miARNs (BTL y BTLs), podemos detectar la presencia de un segundo pico (Figura 9D, 9E y 9F, flecha naranja), el cual corresponde al nt 3' del miARN-3p. Al estudiar más en profundidad las lecturas que generan dicho pico, pudimos determinar que la señal es aportada principalmente por los pri-miARN166b/e, pri-miARN393a/b y el pri-miARN165a. Llamativamente, esto se debe a la retención de la mitad del tallo-bucle (Figura 9G y Suplementaria 1A). La presencia de este intermediario de procesamiento puede deberse al corte de DCL1 en sitios no canónicos (Moro et al., 2018), siendo el bucle un sector sensible a los clivajes endonucleolíticos. Además, en el análisis BTLs se detectó un pico adicional, de menor intensidad, aguas arriba del anterior (Figura 9F; flecha negra). Éste corresponde al sitio dador del primer exón de una isoforma de *splicing* del gen AT1G12290, que también contiene la secuencia codificante de miR472 (Suplementaria 1B). Esto demuestra que la técnica plaNET-seq también permite estudiar otros eventos co-transcripcionales, siendo estos datos de gran valor para la comunidad científica. En todos los casos analizados, los datos de plaNET-seq de la muestra utilizada como control negativo no mostró picos correspondientes a intermediarios de procesamiento, esto respalda que la señal detectada corresponde a pri-miARNs nacientes procesados unidos a la Pol II (Suplementaria 1C). En conjunto, nuestros resultados indican que los miARNs en plantas pueden procesarse co-transcripcionalmente mientras los pri-miARNs nacientes aún continúan asociadas a la Pol II (Figura 10F).

Los resultados obtenidos tanto en el RIP contra H3 como en el plaNET-seq, demuestran la retención del brazo 5' de los pri-miARNs al complejo transcripcional luego del corte por DCL1, lo que llevó a preguntarnos cuál es el factor que genera esta retención dado que post-procesamiento ya no es esperable que siga unida a la Pol II. Estudios anteriores de

secuenciación de transcritos nacientes han identificaron perfiles similares, por ejemplo, durante el *splicing* de ARNm, causados por la estabilización de los exones procesados co-transcripcionalmente al complejo de *splicing* (Nojima et al., 2015). En *Arabidopsis*, al igual que los ARNm de proteínas codificantes, el CAP presente en el extremo 5' de los pri-miARNs interacciona con proteínas de unión al CAP, CBP20 y CBP80 (del inglés *cap-binding protein*), y éstas a su vez interactúan con el microprocesador y el complejo de transcripción (Kim et al., 2008; Laubinger et al., 2008), pudiendo así estabilizar el fragmento 5' procesado a la cromatina y permitiendo que lo detectemos con un pico tan claros. Para probar esta idea, cuantificamos la cantidad de este intermediario de procesamiento asociado a la cromatina mediante RIP contra H3 seguido de RT-qPCR en plantas salvajes y mutantes *abh1-285*, el cual codifica para la proteína CBP80. Los resultados mostraron una disminución en la retención del brazo 5' en las plantas mutantes, sugiriendo que este complejo estabiliza al pri-miARN a la cromatina a través del CAP presente en el extremo 5' y favorece el procesamiento co-transcripcional (Figura 9H).



**Figura 9. Procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs.** **A-** Medición de intermediarios del procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs medida por RT-qPCR en muestras de RIP contra H3 o IgG de Col-0 y *hyl1-2*. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no emparejada con corrección de Welch y se indican para cada comparación. Las qPCR utilizando los pares de cebadores A, B y C en la fracción de IP se normalizaron al transcripto U6 y a los niveles de input. Los niveles de ARN no detectados se muestran como ND; n = 3 muestras biológicamente independientes. **B y C-** Análisis metagenómico de fragmentos del procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs BTL nacientes asociados a la Pol II obtenidos por plaNET-seq graficando el nt 5'. **D y E-** Análisis metagenómico de fragmentos del procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs BTL nacientes asociados a la Pol II obtenidos por plaNET-seq graficando el nt 3'. **F-** Análisis metagenómico de fragmentos del procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs BTLs nacientes asociados a Pol II obtenidos por plaNET-seq graficando el nt 3'. Los pri-miARNs se escalonaron desde el inicio de miARN-5p hasta el final de miARN-3p (B, D y F) o utilizando solo las secuencias de miARNs maduros (C y E). Las flechas cian y naranja indican los fragmentos de procesamiento detectados. La flecha negra indica el sitio dador del primer exón del gen AT1G12290. **G-** Cobertura de las lecturas obtenidas por plaNET-seq para el miR393B. **H-** Niveles del brazo 5' de diferentes pri-miARNs asociados a la cromatina en Col-0 y *abh1-285*, medidos por RT-qPCR. El intermediario de procesamiento asociado a la cromatina en el experimento de RIP se normalizó por los valores de input en la muestra. Los valores de n = 3 muestras biológicamente independientes se expresan en relación con las plantas Col-0. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no emparejada con corrección de Welch.

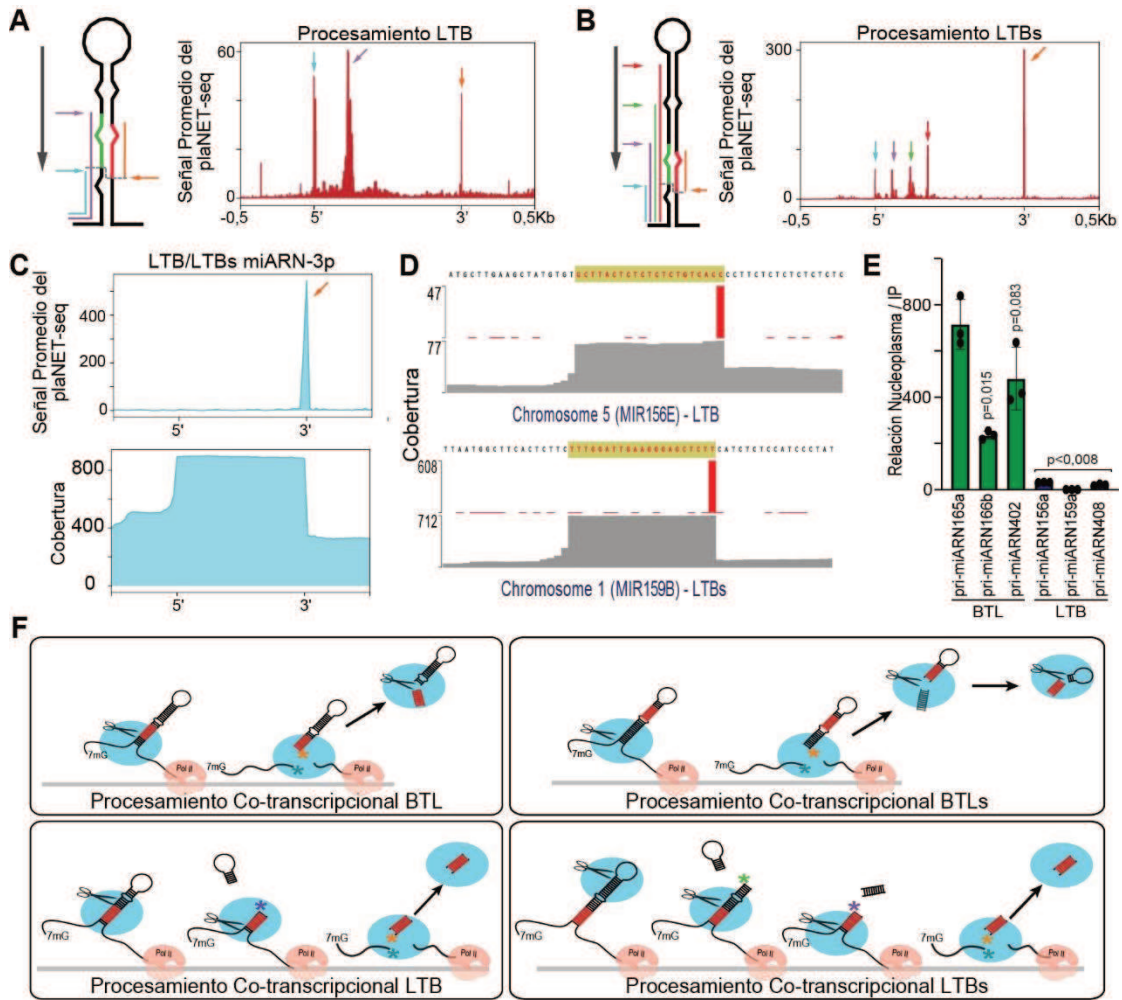
### 6.1.2 Diferencias en el procesamiento co-transcripcional entre BTL y LTB.

Con el objetivo de explorar si los tipos de procesamiento LTB y LTBs también ocurren de manera co-transcripcional, clasificamos los miARNs restantes en estos dos grupos y analizamos sus perfiles de plaNET-seq. Al contrario de lo sucedido en el análisis BTL, los pri-miARNs LTB, presentan dos picos claros correspondientes a los intermediarios generados luego del primer y segundo corte de DCL1 (Figura 10A, flechas cian y violeta). La detección de ambos intermediarios de procesamiento unidos a la Pol II indica que todas las etapas de la biogénesis de miARNs de este tipo de precursores ocurre de manera co-transcripcional, pudiendo DCL1 realizar la totalidad de sus cortes mientras el pri-miARN aún está asociado a la cromatina (Figura 10F). De la misma forma el análisis de los pri-miARNs con procesamiento LTBs exhibió un perfil muy similar (Figura 10B). Este subgrupo de pri-miARNs, reveló un patrón definido de picos donde cada uno de los picos coinciden con los sitios predichos de corte de DCL1 (Figura 10B, flechas cian, violeta, verde y roja). Nuevamente en estos análisis encontramos un pico adicional correspondiente al último nt 3' del miARN-3p (Figura 10A y 10B, flechas naranjas). En los pri-miARNs LTB, este pico fue debido a la contribución de los pri-miARN156b/e y pri-miARN408, mientras que en LTBs, fue por el pri-miARN159a/b. La presencia de este patrón fue inquietante, dado que la



existencia del pre-miARNs o un intermediario similar, como sucede con BTL, no eran esperados para pri-miARNs procesados de forma LTB o LTBs, ya que el primer paso del procesamiento evitaría su existencia. Cuando mapeamos las lecturas de plaNET-seq sobre estos loci, encontramos que todas las lecturas que terminan en esta posición corresponden al miARN-3p maduro (Figura 10C y 10D). Estos resultados muestran que todos los pasos de procesamiento en pri-miARNs LTB y LTBs ocurren de manera co-transcripcional y que algunos miARNs maduros pueden quedar retenidos temporalmente en sus loci codificantes, probablemente por su unión a alguna proteína de biogénesis como HYL1, la cual une miARNs maduros (Tomassi et al., 2020; Yang et al., 2021) (Figura 10F). La observación de que solo algunos miARNs maduros derivados de pri-miARNs LTB o LTBs permanecen asociados con sus loci puede representar una afinidad diferencial de cada miARN por las proteínas del complejo de biogénesis o una asociación más prolongada del complejo con loci específicos. También es posible que un procesamiento más eficiente de algunas pri-miARNs libere los miARNs maduros más rápidamente. Esta observación también podría estar influenciada por la abundancia de cada pri-miARN, lo que hace más fácil detectar tales productos de procesamiento para algunos pri-miARNs en comparación con otros.

Los resultados obtenidos hasta este punto indican que los pri-miARNs BTL y BTLs, al contrario que los LTB y LTBs, experimentan un primer paso de procesamiento co-transcripcional, pero el pre-miARN resultante debería ser procesado en el nucleoplasma para culminar con la producción del miARN maduro (Figura 10F). Para evaluar esta hipótesis, purificamos nucleoplasma y cromatina y cuantificamos mediante RT-qPCR la abundancia de la región del tallo-bucle en relación con pri-miARNs no procesados en cada fracción, tanto para pri-miARNs con procesamiento LTB, como para pri-miARNs con procesamiento BTL. Confirmando nuestra hipótesis, encontramos que las regiones del tallo-bucle de pri-miARNs BTL, pero no LTB, estaban enriquecidas en el nucleoplasma en comparación con la cromatina (Figura 10E). Este resultado respalda un escenario donde los pri-miARNs BTL/BTLs se procesan parcialmente de forma co-transcripcional (el paso de pri- a pre-miARN), y culmina su procesamiento de forma post-transcripcional (desde pre-miARN hasta el dúplex de miARN) (Figura 10F).

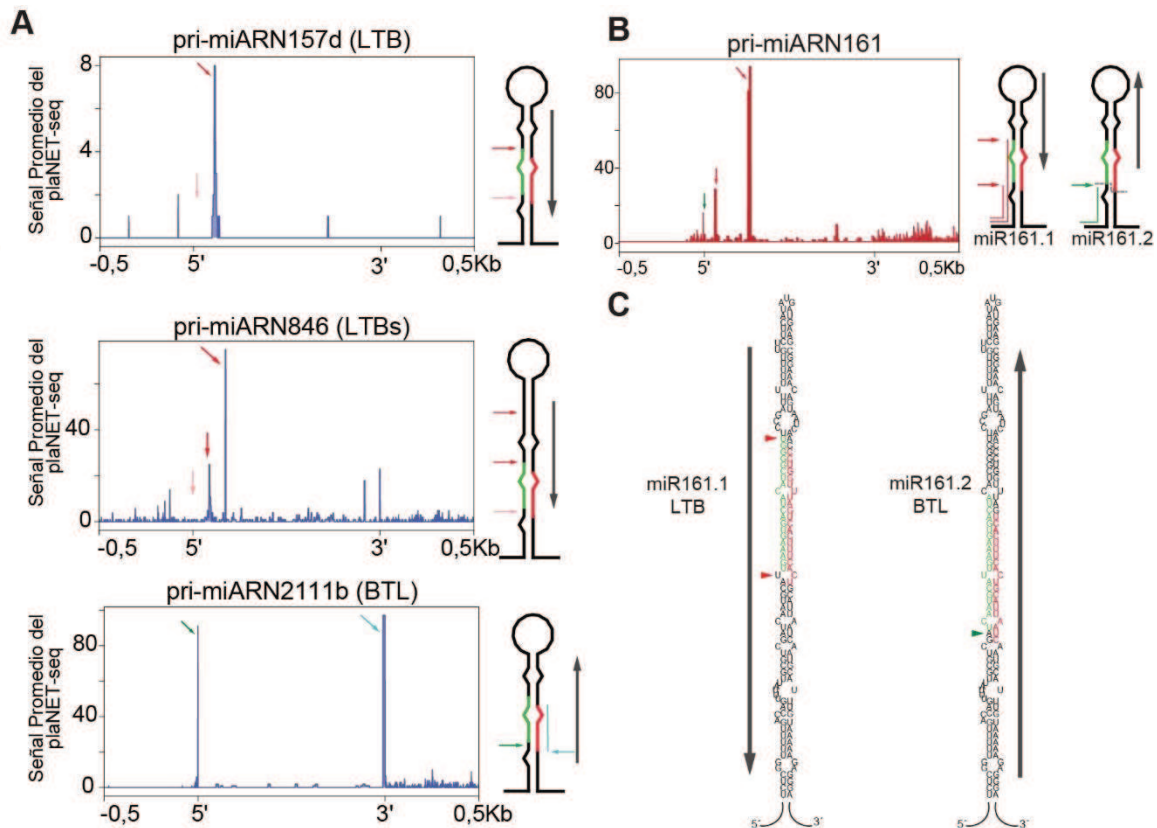


**Figura 10. Diferencias en el procesamiento co-transcripcional entre BTL y LTB.** **A y B-** Análisis metagenómico de fragmentos del procesamiento en pri-miARNs nacientes con procesamiento tipo LTB (**A**) y LTBs (**B**). Los pri-miARNs están escalados desde el inicio de miARN-5p hasta el final de miARN-3p. Las flechas indican los fragmentos de procesamiento detectados. **C-** Análisis metagenómico de la señal de plaNET-seq utilizando pri-miARNs con procesamiento LTB y LTBs escalados, utilizando la secuencia de miARN-3p (arriba). La flecha naranja coincide con las representadas en A y B. Análisis metagenómico de la cobertura total de lecturas de plaNET-seq sobre los loci *MIRNA* LTB y LTBs, en las regiones que codifican para el miARN-3p, mostrando la acumulación de lecturas de 21 nt de longitud correspondientes a las secuencias maduras de miARN-3p (abajo). **D-** Señal de plaNET-seq en los loci *MIR156E* y *MIR159B* (barras rojas). Cobertura de lecturas de plaNET-seq sobre los mismos loci (gris). La secuencia correspondiente al miARN-3p maduro se indica en la parte superior de cada panel resaltada en amarillo. **E-** Abundancia relativa de la región del tallo-bucle de pri-miARNs BTL y LTB en el nucleoplasma en comparación con la fracción de IP de H3 (cromatina), medida por RT-qPCR en muestras de plantas Col-0. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar;  $n = 3$  muestras biológicamente independientes. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no emparejada con corrección de Welch y se indican para cada comparación. Las mediciones de los tallo-bucle en el nucleoplasma y la fracción de IP de H3 se

normalizaron a los niveles del input. Luego, las cuantificaciones se expresaron como una relación nucleoplasma/IP. **F-** Representación esquemática del procesamiento co-transcripcional en los diferentes tipos de procesamiento. En los tipos de procesamiento BTL y BTLs solo el primer corte realizado por DCL1 en la base del pri-miARN se produce en asociación a la cromatina. El pre-miARN liberado, termina su procesamiento en una etapa post-transcripcional en el nucleoplasma. En los procesamientos LTB y LTBs, los cortes realizados por DCL1 pueden producirse en su totalidad de forma co-transcripcional.

### **6.1.3 plaNET-seq como herramienta para predecir mecanismo de procesamiento de pri-miARNs.**

Un trabajo anterior pudo determinar el tipo de procesamiento que sufría la gran mayoría de los pri-miARN a través de la técnica SPARE, la cual permitió detectar cada uno de los cortes producidos por DCL1 (Moro et al., 2018). Estos datos, fueron utilizados en esta tesis para realizar la división de pri-miARNs en subgrupos según su forma de procesamiento (BTL, BTLs, LTB, LTBs). Sin embargo, este trabajo no había logrado determinar el tipo de procesamiento de algunos pri-miARNs puntuales. Usando nuestros análisis de plaNET-seq fuimos capaces de definir la dirección de procesamiento de pri-miARNs hasta el momento desconocido. Según el patrón de picos obtenidos, definimos que el pri-miARN157d sufre procesamiento del tipo LTB, el pri-miARN2111b procesamiento BTL y produce la retención del miARN maduro y el pri-miARN846 como LTBs (Figura 11A). Curiosamente, además pudimos determinar que el pri-miARN161 presenta procesamiento dual. Esto quiere decir que puede ser procesado tanto de forma LTB como BTL a partir del mismo precursor. La orientación del procesamiento determina el miARN maduro que se genera. Cuando el precursor del miR161 se procesa LTB da lugar al miR161.1, mientras que cuando el mismo precursor se procesa de forma BTL se produce el miR161.2 (Figura 11B y 11C). Estos resultados muestran que los análisis de plaNET-seq puede utilizarse como herramienta para identificar mecanismos de procesamiento de pri-miARNs en diferentes especies vegetales o etapas de desarrollo y condiciones de crecimiento, así como en mutantes de proteínas involucradas en la biogénesis de miARN.



**Figura 11. Predicciones.** **A-** Tipos de procesamientos co-transcripcionales del miR157d, miR2111b y miR846 basados en sus perfiles de señal de plaNET-seq. Los pri-miARNs se escalonaron desde el inicio de miARN-5p hasta el final de miARN-3p. Las flechas de colores indican el sitio de procesamiento de DCL1, marcados a su vez en los esquemas adyacentes. Las flechas rojas claras indican sitios de clivaje esperados que no fueron detectados, probablemente debido a una baja cobertura de los loci analizados. La flecha cian en pri-miARN2111b indica un pico correspondiente a la retención del miARN-3p maduro en el complejo de procesamiento. **B-** Perfil de la señal de plaNET-seq del pri-miARN161, cuyos mecanismos de procesamiento se habían inferido previamente exclusivamente BTL: nuestro análisis ahora lo definen como BTL y LTB, un mecanismo dual. El pri-miARN se escaló desde el inicio de miARN-5p hasta el final de miARN-3p. Las flechas de colores indican el sitio de procesamiento de DCL1, también representados en los esquemas adyacentes y en el panel C. **C-** Estructuras secundarias predichas del pri-miARN161.1 y pri-miARN161.2. Las cabezas de flecha de colores indican la posición de los picos de plaNET-seq mostrados en el panel B. La secuencia correspondiente al miARN-5p maduro se muestra en verde y el miARN-3p en rojo. La dirección de procesamiento determinada se indica con las flechas junto a las estructuras.

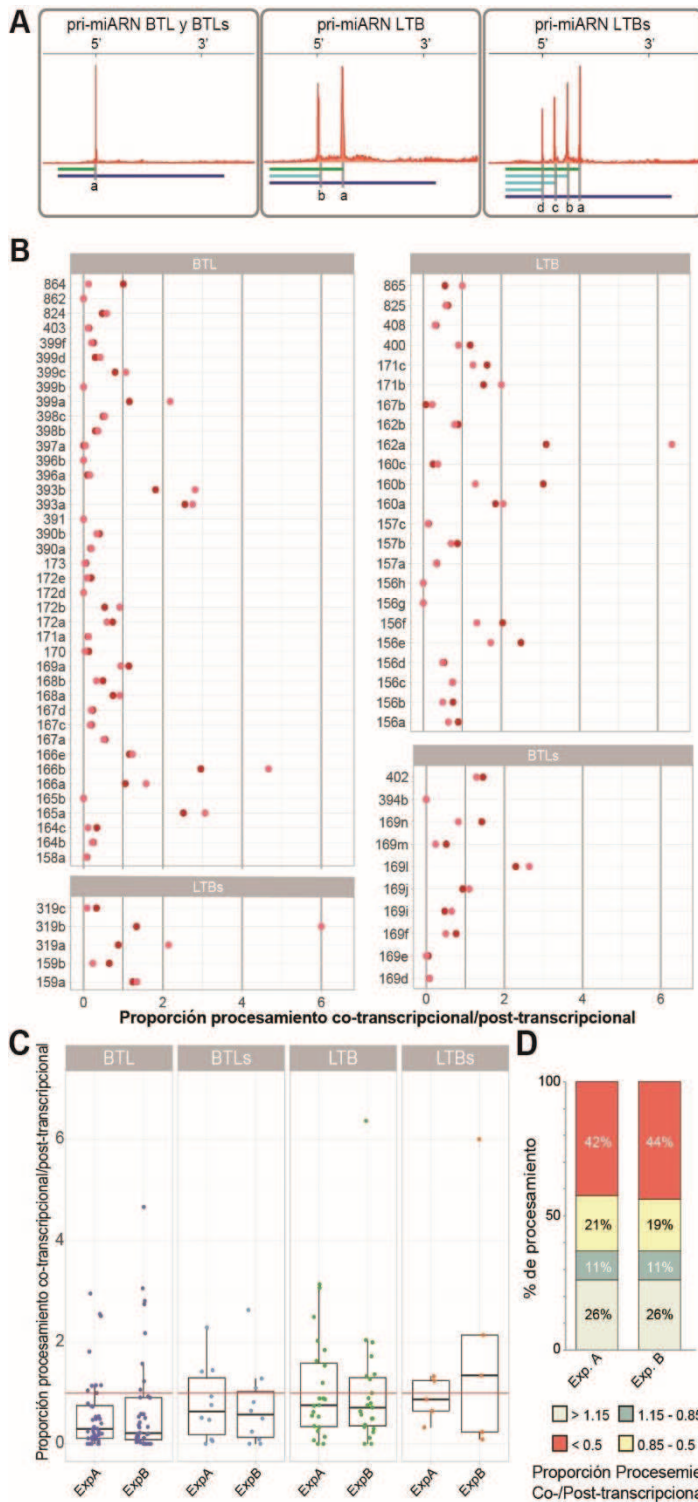
#### 6.1.4 Los pri-miARNs son procesados tanto de manera co-transcripcional como post-transcripcional.

Haber sido capaces de detectar la existencia del procesamiento co-transcripcional no implica necesariamente que todos los miARNs, o incluso que todos los transcritos de pri-miARNs generados a partir de un locus, sean procesados exclusivamente cuando aún

están unidos a la Pol II. De hecho, pri-miARNs no procesados pueden ser detectados en la en las células e incluso podrían moverse al citoplasma sin ser procesados para traducirse en pequeños péptidos (Lauressergues et al., 2015). Esto implica que algunos pri-miARNs, o al menos una fracción de los transcriptos, podrían escapar al procesamiento co-transcripcional. Este escenario se asemeja a lo ocurrido en el *splicing* de ARNm, donde coexisten el procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional (Zhu et al., 2020).

Para evaluar la relevancia del procesamiento co-transcripcional, reanalizamos los datos de plaNET-seq y calculamos la relación entre las lecturas que terminan en el sitio de corte de DCL1 (pri-miARNs procesados co-transcripcionalmente; Figura 12A, líneas verdes) y las que corresponden a pri-miARNs completos (pri-miARNs no procesados; Figura 12A, líneas azules). La proporción de fragmentos de procesamiento, indicativo de procesamiento co-transcripcional, y los pri-miARN enteros, indicativos de procesamiento post-transcripcional, unidos a la Pol II nos indica cuán propenso es cada pri-miARN a ser procesado co-transcripcionalmente en una condición particular. En el caso de los pri-miARNs con procesamiento BTL o BTLs, realizamos este cálculo utilizando el pico correspondiente al primer sitio de corte (Figura 12A, sitio 'a'), ya que los cortes subsiguientes no se detectan y probablemente ocurran post-transcripcionalmente. Para LTB y LTBs también usamos el primer sitio de corte de DCL1 hacia la región del bucle (Figura 12A, sitio 'a'), ya que los sitios siguientes sobreestiman las lecturas no procesadas al contar intermediarios de procesamiento (líneas cian). Utilizamos dos experimentos independientes y representamos gráficamente la proporción de procesamiento co-transcripcional versus post-transcripcional para cada pri-miARN clasificado por su tipo de procesamiento (Figura 12B y 12C). En las condiciones probadas, y entre los pri-miARNs que muestran ambos tipos de procesamiento, el análisis reveló que ~26% de los pri-miARNs se procesan preferentemente de manera co-transcripcional. Aproximadamente el 11% de los miARNs mostraron una preferencia igual por el procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional. El ~63% de los pri-miARNs pareciera procesarse preferentemente post-transcripcionalmente, aunque el ~20% de estos tienen una proporción  $< 0,5$ , lo que indica que esos pri-miARNs se procesan co-transcripcionalmente una cuarta parte del tiempo (Figura 12D). Varios pri-miARNs, incluyendo aquellos que codifican miR862, miR399b, miR165b y miR394b, se destacan entre aquellos con una señal casi indetectable de procesamiento co-transcripcional (Figura 12B). Estos resultados sugieren que el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs es probablemente un proceso dinámico, potencialmente regulado y no idéntico para cada locus. Esta clasificación debe tomarse con precaución, ya que la proporción calculada

puede estar influenciada por parámetros adicionales, como la estabilidad de los intermediarios de procesamiento. Por lo tanto, validamos estas proporciones seleccionando un pri-miARN de cada grupo y cuantificamos mediante RT-qPCR los niveles de pri-miARN no procesado e intermediarios del procesamiento asociados a la cromatina y en nucleoplasma depletado de cromatina. Los resultados obtenidos reflejan nuestras observaciones anteriores, mostrando una tasa de procesamiento co-transcripcional alta para miR160b y baja para miR408 (Suplementaria 2A).



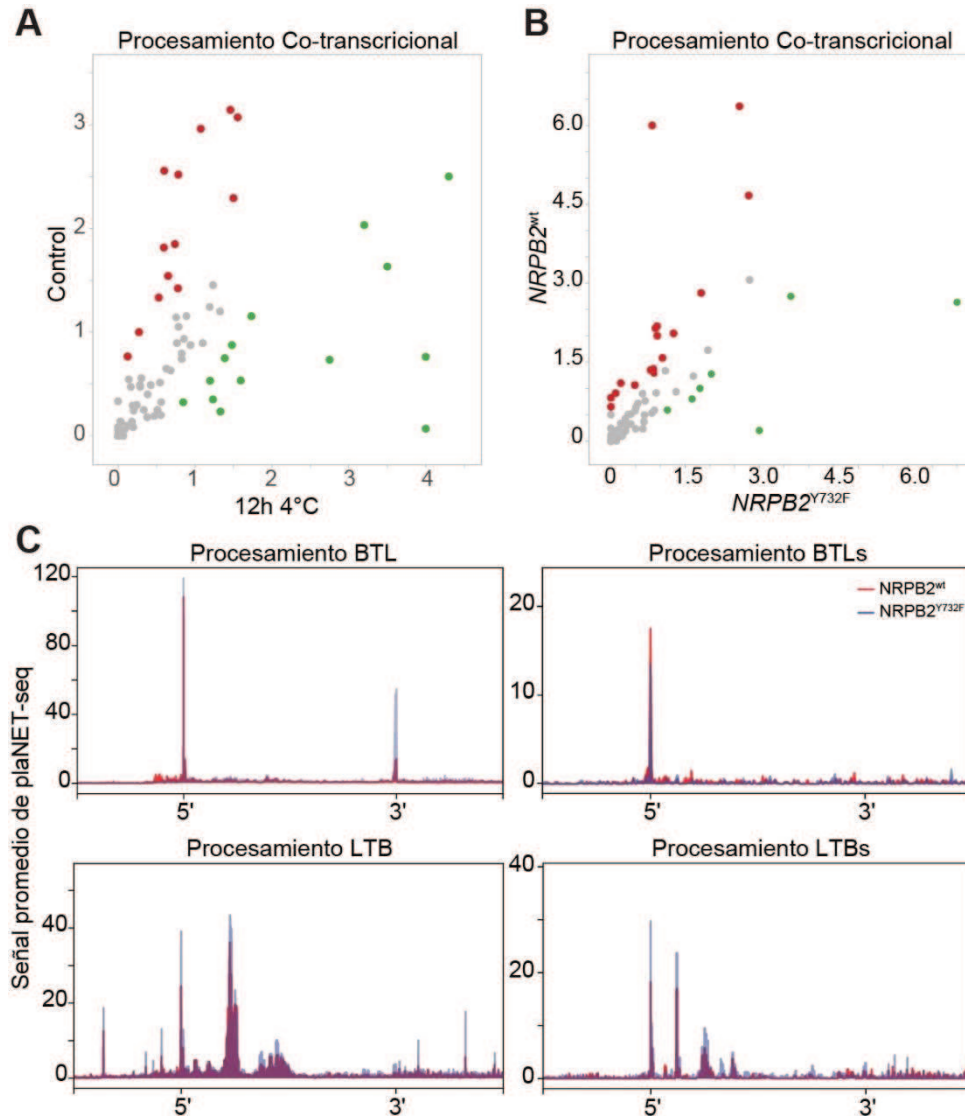
**Figura 12. El procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional coexisten para la mayoría de los pri-miARNs.** **A-** Representación esquemática de las posiciones utilizadas para cuantificar las relaciones de procesamiento co-transcripcional versus post-transcripcional. En todos los casos, el número total de lecturas que terminan en el nucleótido marcado como 'a' (líneas verdes) se relativizo con las lecturas del pri-miARN sin procesar (líneas azules). **B-** Relaciones de procesamiento co- y post-transcripcional correspondientes a todos los miARNs analizados en dos experimentos independientes de plaNET-seq y organizados por el mecanismo de procesamiento. **C-** Representación de cajas de las relaciones de procesamiento co- y post-transcripcional. La línea roja marca la relación = 1 donde el procesamiento co- y post-transcripcional son igualmente frecuentes. ExpA y ExpB muestran dos experimentos independientes, respectivamente, de n = 2 muestras biológicamente independientes cada uno. Los puntos representan pri-miARNs individuales, las barras indican los valores mínimos/máximos (no más allá de 1.5x el rango intercuartil (IQR) desde la bisagra), la caja define el IQR, el centro representa la mediana y los límites de la caja representan los cuartiles inferior y superior. **D-** Fracción de pri-miARNs procesados preferentemente co-transcripcionalmente, post-transcripcionalmente o con igual preferencia. Dos experimentos independientes en condiciones de control.

### 6.1.5 La tasa de procesamiento co-transcripcional es dinámica.

Habiendo determinado que los pri-miARNs poseen diferentes niveles de procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional, nos preguntamos si la actividad transcripcional de la Pol II o incluso el entorno medioambiental podrían afectar el equilibrio entre ambos procesamientos. Para esto repetimos nuestros análisis utilizando datos de plaNET-seq de plantas incubadas a 4 °C durante 12 hs (Kindgren et al., 2020). Los resultados indicaron que reducir la temperatura de crecimiento de la planta afecta la relación entre procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional, especialmente para ciertos miARNs específicos (Figura 13A y Suplementaria 2B y 2D). Como mencionamos en la introducción, la velocidad de la Pol II afecta muchos eventos co-transcripcionales, por lo que también podría afectar el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs. Para evaluar esto analizamos datos de plaNET-seq obtenidos de plantas mutantes *nrbp2-1* complementadas con la construcción NRPB2:FLAG del tipo salvaje (NRPB2<sup>wt</sup>) o con una versión de esta proteína que contiene la mutación Y732F (NRPB2<sup>Y732F</sup>), que acelera la transcripción de la ARN Pol II *in vivo* (Leng et al., 2020). Encontramos que, con algunas excepciones, un aumento en la velocidad de la Pol II produce una reducción en el procesamiento co-transcripcional (Figura 13B). Dado que para que un pri-miARN sea procesado es imprescindible que toda su región del tallo-bucle sea transcrita, para poder dar origen a la región de ARN doble reconocida por DCL1, nuestro resultado podría implicar que una transcripción rápida libera el transcripto maduro antes de que este pueda ser reconocido y procesado co-transcripcionalmente. Sin embargo, esto es evidente para una fracción relativamente pequeña de todos los miARNs analizados (Suplementaria 2C y 2E). Basados en nuestros resultados, es difícil establecer una regla general sobre el efecto de la actividad de la Pol II en el modo de procesamiento siendo que cada locus parece responder de manera específica. Esto es de esperar, dado que la secuencia, longitud, estructura y la tasa de transcripción de cada locus es muy diferente. Además, analizamos el perfil de procesamiento co-transcripcional en plantas NRPB2<sup>Y732F</sup>, preguntándonos si la velocidad de la Pol II podría afectar la eficiencia de corte en lugar de la frecuencia de procesamiento. En general, no encontramos ningún efecto notable sobre los pri-miARNs procesados BTL más allá de un aumento en la retención del tallo-bucle (Figura 13C). Por otro lado, y llamativamente, encontramos un aparente aumento en la eficiencia de procesamiento en los pri-miARNs de LTB y LTBs (Figura 13C). Al ser una cantidad pequeña los pri-miARNs con procesamiento LTBs debemos considerar la posibilidad de que este resultado sea una coincidencia. En general, estos resultados sugieren que el equilibrio entre



el procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional de cada pri-miARN es dinámico y responde a condiciones específicas. Esto plantea la pregunta de si un miARN puede tener diferentes funciones dependiendo de cuándo/dónde se procesa o en otras palabras llevamos a la pregunta de porque un pri-miARN puede procesarse de distintas maneras.



**Figura 13. Las relaciones entre procesamiento co- y post-transcripcional de miARNs son variables en diferentes condiciones. A y B-** Gráficos de dispersión de la proporción de procesamiento co-transcripcional en experimentos de plaNET-seq realizados en plantas de control o en plantas incubadas durante 12 hs a 4 °C (**A**) o transformadas con versiones WT o mutantes Y732F de NRPB2 (**B**). Los puntos rojos y verdes muestran aquellos pri-miARNs con proporciones de procesamiento co-transcripcional más altas o más bajas en condiciones de control. **C-** Superposición de análisis metagenómicos de intermediarios de procesamiento de pri-miARNs de plaNET-seq en plantas de control (rojo) o en plantas transgénicas  $NRPB2^{Y732F}$  (azul). Los pri-miARNs se escalaron desde el inicio de miARN-5p hasta el final de miARN-3p.

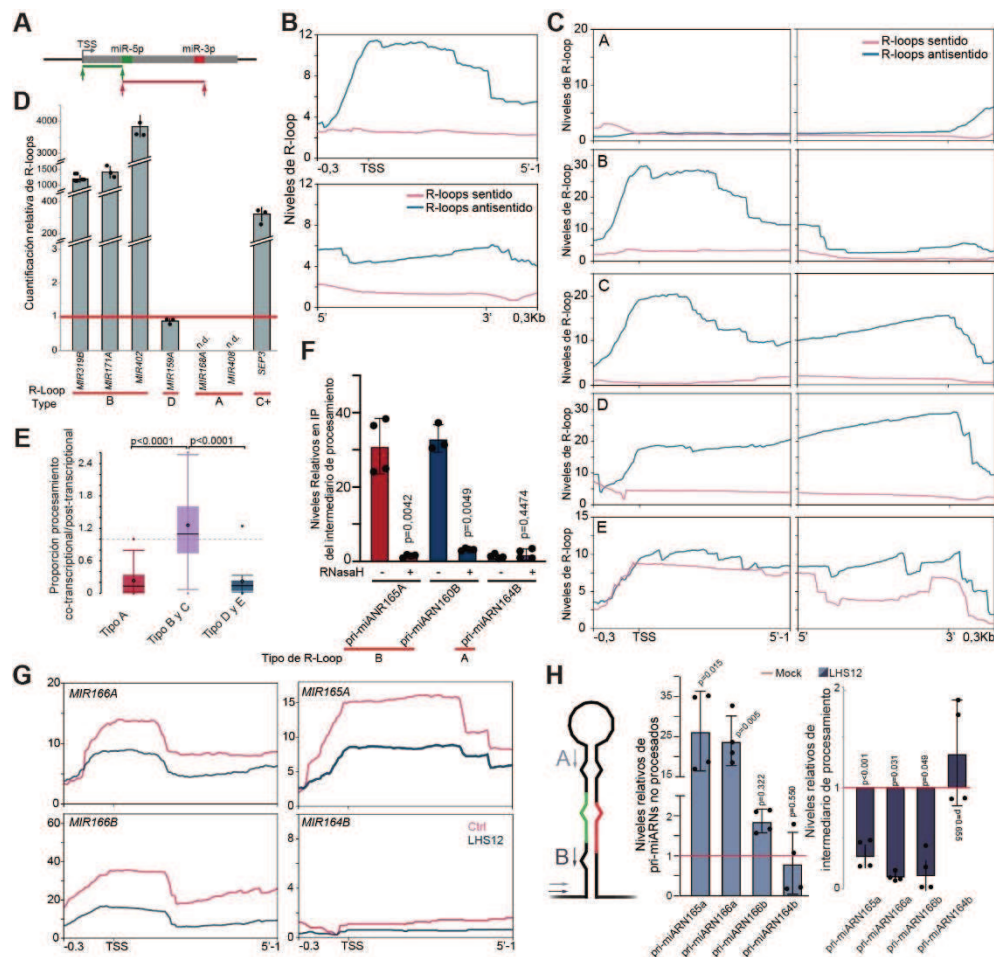
### 6.1.6 Los R-loops promueven el procesamiento co-transcripcional de miARNs.

A diferencia del *splicing* co-transcripcional de ARNm donde los intrones pueden eliminarse mientras la transcripción progresa, el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs requiere al menos la transcripción de toda la región del tallo-bucle antes de que DCL1 pueda reconocer la estructura de ARN doble cadena y procesarla. Por lo tanto, es posible que la retención del brazo 5' del pri-miARN observada en los ensayos de IP sean pri-miARNs estabilizados o anclados a los loci para proporcionar el tiempo necesario para finalizar la transcripción del tallo-bucle y el consiguiente procesamiento co-transcripcional. El efecto aparente de la velocidad de transcripción en la eficiencia del procesamiento co-transcripcional nos hizo preguntarnos si la transcripción *per se* influye en dicho proceso. Una transcripción lenta puede causar, por ejemplo, la formación de R-loops dentro del locus codificante, lo que a su vez causa la retención del transcrito naciente, el reclutamiento de ciertas proteínas e incluso cambio en las marcas epigenéticas (Chédin, 2016; Santos-Pereira & Aguilera, 2015; Xu et al., 2017; Zatreanu et al., 2019). Por lo tanto, un R-loop en un locus que codifica un *MIRNA* podría afectar cómo progresa la transcripción del pri-miARN, promover el reclutamiento de proteínas de biogénesis de miARN o incluso cambiar la estabilidad del ARN, afectando directa o indirectamente el procesamiento co-transcripcional. Con el objetivo de explorar si los R-loops afectan el procesamiento co-transcripcional de miARNs, analizamos datos de inmunoprecipitación de ADN-ARN seguida de secuenciación (DRIP-seq), buscando la presencia y patrón de formación de R-loops sobre los loci de *MIRNA* (Xu et al., 2020). Para ello, escalamos todos los pri-miARNs utilizando una longitud fija desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) hasta el nucleótido justo antes del miARN-5p o desde el primer nt del miARN-5p hasta el último del miARN-3p como muestra la Figura 14A, y graficamos los perfiles encontrados en dichas ventanas (Figura 14B). Se puede observar un perfil diferencial en la ventana correspondiente a la región que va desde el TSS hasta el comienzo del miARN-5p. Para estudiar esto en profundidad, clasificamos todos los pri-miARNs en categorías según su perfil de R-loop pudiendo observar cinco tipos de disposiciones: (A) aquellos que no muestran R-loops en absoluto, (B) aquellos con R-loops restringidos a los brazos de ARN 5' del pri-miARN cerca del TSS, (C) aquellos con un R-loop como el tipo (B) pero con un patrón adicional hacia el final del locus, (D) aquellos donde los R-loops se extienden uniformemente sobre todo el locus y (E) miARNs con R-loops en espejo, probablemente debido a una transcripción bidireccional (Figura 14C). Chequeamos la existencia de algunos de estos R-loops mediante DRIP-qPCR y pudimos detectar altos niveles de R-loops tipo B

en los loci *MIR319B*, *MIR171A* y *MIR402*, R-loops tipo D en el locus *MIR159A* y, como era de esperar, detectamos una señal muy baja o indetectable para loci del tipo A como el *MIR168A* y *MIR408* (Figura 14D). Evaluamos la relación entre los diferentes patrones de R-loops encontrados y el procesamiento co-transcripcional, medido como la proporción de procesamiento co-/post-transcripcional, y pudimos encontrar que los miARNs con R-loops tipo B y C (con R-loops cerca del TSS) se procesan mayormente de manera co-transcripcional. Por el contrario, los pri-miARNs que no muestran R-loops sobre los loci o un R-loop cerca del TSS mostraron menor proporción de procesamiento co-transcripcional (Figura 14E). Para confirmar el efecto potencial de los R-loops sobre el procesamiento co-transcripcional, aislamos núcleos bioquímicamente activos, los tratamos durante dos horas con RNasa H, que corta específicamente el ARN en la doble hebra ARN/ADN (Cerritelli et al., 2022; Hyjek et al., 2019), antes de realizar un experimento de RIP. Después de la IP, cuantificamos por RT-qPCR la cantidad del intermediario de procesamiento correspondiente al brazo 5' del pri-miARN aún asociado a la cromatina. Los resultados mostraron una drástica disminución en la retención del intermediario de los pri-miARN165A y pri-miARN160B cuando se trató con RNasa H (Figura 14F). Por el contrario, el pri-miARN164B, el cual no presenta R-loops, no sufrió cambios en la retención del brazo 5' (Figura 14F). Estos resultados demuestran que la presencia del R-loop influencia, aunque por un mecanismo aún desconocido, el procesamiento co-transcripcional de miARNs.

Datos de DRIP-seq obtenidos de plantas en diferente estado de desarrollo o condiciones de crecimiento muestran patrones de R-loop diferentes en algunos loci de *MIRNA* (Xu et al., 2020). Esto sugiere que la formación de R-loops puede cambiar dependiendo de las condiciones y potencialmente esto podría afectar directamente al procesamiento co-transcripcional de miARNs. Exploramos los datos de DRIP-seq mencionados, buscando condiciones de crecimiento con patrones alterados en la formación de R-loops y exploramos si se correlacionan con cambios en la tasa de procesamiento co-transcripcional. Una alteración en los patrones de R-loops puede representar un mecanismo regulador que se traduce en cambios en el modo de procesamiento y potencialmente en la función del miARN maduro. Entre las condiciones probadas, encontramos que el estrés térmico prolongado (30 hs a 37 °C) seguido de un período de recuperación a 23 °C, produjo cambios significativos en los patrones de R-loop sobre los *MIR165a*, *MIR166a* y *MIR166b*, entre otros (Figura 14G). En concordancia con el papel de los R-loops en la promoción del procesamiento co-transcripcional, observamos que cuando realizamos el mismo tratamiento de estrés térmico prolongado, también obtuvimos una reducción del

procesamiento co-transcripcional, lo que se midió como un aumento en los pri-miARNs no procesados unidos a la cromatina en las muestras de RIP-qPCR (Figura 14H). Este cambio en el procesamiento co-transcripcional no se observó para pri-miR164b, que no presenta R-loop sobre su locus y mostró signos indetectables de procesamiento co-transcripcional (Figura 12B y 14H). Además, también encontramos que el brazo 5' procesado de los pri-miR165a, pri-miARN166a/b, pero no pri-miARN164b, se retuvo menos en la fracción de RIP de plantas sometidas a estrés térmico, coincidiendo con la reducción de los R-loops (Figura 14H). Estos resultados sugieren que los R-loops son un elemento crítico promoviendo el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs en plantas. Es probable que el procesamiento co-transcripcional todavía ocurra en loci de *MIRNA* sin R-loop, pero de manera menos eficiente. No podemos concluir si este es un efecto directo del híbrido ARN-ADN en sí o un efecto secundario desencadenado por la apertura de la cromatina a causa del R-loop. Este escenario podría, por ejemplo, permitir un reclutamiento más eficiente de la maquinaria de transcripción, incluidos los complejos Elongator y Mediator, que ayudan a reclutar el complejo de procesamiento a los loci *MIRNA* (Fang et al., 2015; Kim et al., 2011).

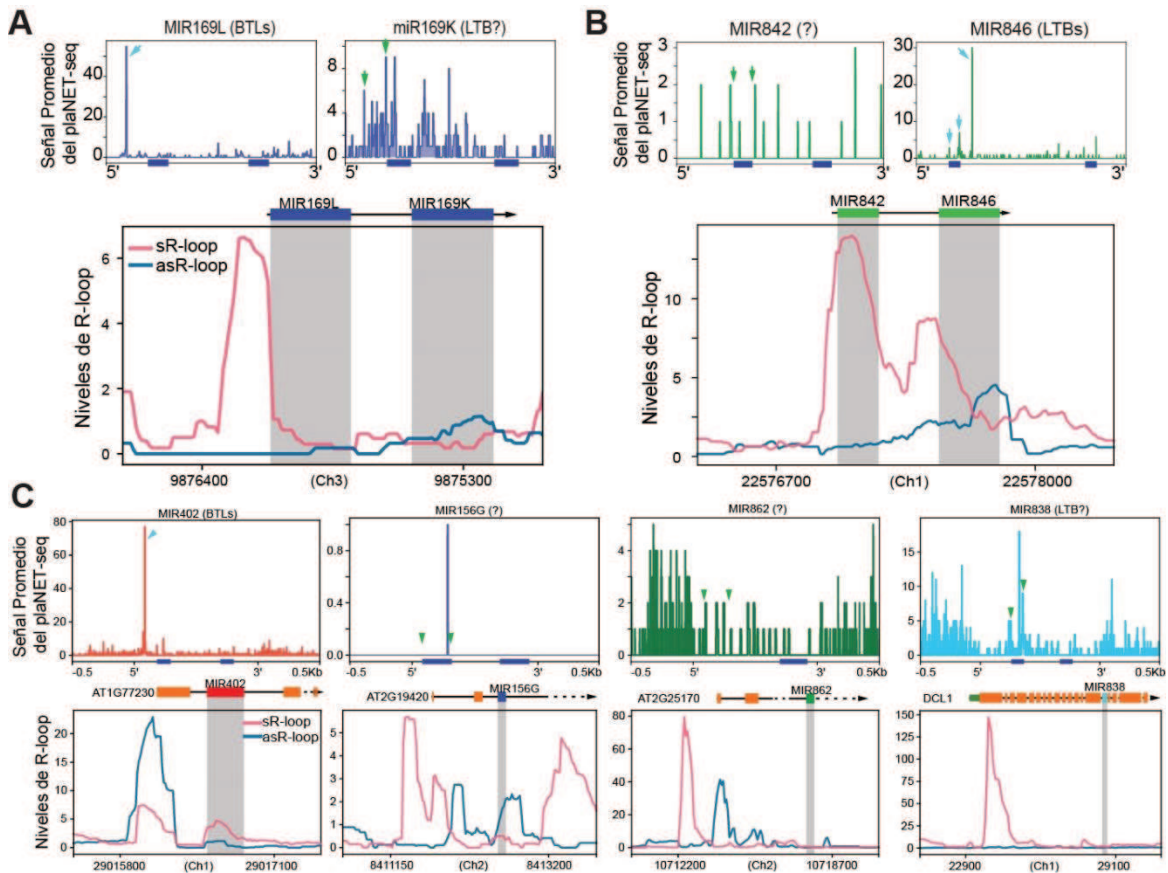


**Figura 14. R-loops promueven el procesamiento co-transcripcional.** **A-** Representación esquemática de la región escalada para el análisis metagenómico de formación de R-loop sobre los loci *MIRNA*. Los mismos se escalaron desde el TSS hasta el nt antes del miARN-5p (verde) o desde el miARN-5p hasta el final del miARN-3p (rojo). A los análisis metagenómicos graficados en B, C y G se les agregó 300 pb aguas arriba o aguas abajo de las ventanas, respectivamente. **B-** Análisis metagenómico de R-loops sentido (rojo) y antisentido (azul) sobre todos los loci *MIRNA*. **C-** Análisis metagenómico de formación de R-loops sobre loci *MIRNA* clasificados según su distribución: A- loci *MIRNA* sin R-loops; B-loci *MIRNA* con R-loops sobre el brazo 5' de los pri-miARNs; C- loci *MIRNA* con doble señal de R-loop, al principio y al final de los pri-miARNs; D- loci *MIRNA* con R-loops sobre todo su locus; E- loci *MIRNA* con R-loops en ambas direcciones, sentido (rojo) y antisentido (azul). **D-** Cuantificación de R-loops sobre *MIRNA* de diferentes categorías de R-loop (definidas en panel C) medidas por DRIP-qPCR. Los valores obtenidos se normalizaron por el input y se expresan relativo a la señal de DRIP-qPCR en la muestra de IP después del tratamiento con RNasa H (línea roja). La falta de detección de R-loops se describe como no detectado (ND). Se usó SEPALLATA3 (SEP3), que posee un R-loop ya descrito, como control positivo (C+). Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  las desviaciones estándar; n = 3 muestras biológicamente independientes. **E-** Gráfico de cajas del nivel de procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs separados en los diferentes perfiles de R-loop: categorías A, B y C y D y E. La frecuencia de procesamiento =1 se marca con una línea discontinua. Las barras de error muestran los valores máximos y mínimos. El valor P fue definido por una prueba t de dos colas no pareada; n = 2 conjuntos de datos biológicamente independientes. La caja representa los bordes de Q3 y Q1, con la mediana (línea horizontal) y la media (punto blanco). Las barras muestran los valores más grandes y más pequeños, mientras que los puntos de colores indican valores atípicos. **F-** Niveles del intermediario de procesado, brazo 5' de pri-miARNs, asociados a la cromatina medidos por RT-qPCR de muestras de RIP de H3. Los núcleos aislados de plantas Col-0 fueron tratados con RNasa H o una solución sin la enzima (MOCK), durante 1 h a 37 °C seguido de 1 h a 23 °C antes de realiza la RIP. El intermediario de procesamiento asociado a la cromatina en el experimento de RIP se normalizó por los valores del input y en relación con los pri-miARNs no procesados normalizados en la misma fracción de IP. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no pareada con corrección de Welch. n = 4 muestras biológicamente independientes. **G-** Perfil de R-loop sobre locus individuales de miARN en muestras control (Ctrl, línea roja) y plantas incubadas durante 30 hs a 37 °C y luego devueltas a 23 °C durante 12 hs (LHS12, línea azul). **H-** Niveles de retención de pri-miARNs no procesados en la fracción de IP de H3 (par A) medidos por RT-qPCR y normalizados por el input (izquierda). Niveles de retención de los brazos del extremo 5' de pri-miARNs (par B) en la muestra de IP normalizados por el input, medidos por RT-qPCR. En ambos paneles, la cuantificación se realizó en las plantas incubadas durante 30 hs a 37 °C más 12 hs a 23 °C (LHS12, barras) y se expresó en relación con las muestras de control (línea roja). Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no pareada con corrección de Welch y se indican para cada comparación. n = 4 muestras biológicamente independientes.

### 6.1.7 miARNs policistrónicos y miRtrons en el procesamiento co-transcripcional.

A pesar de que los miARNs de plantas están codificados individualmente existen varios ejemplos de miARNs policistrónicos donde más de un precursor de miARN está codificado en un mismo transcrito primario y MIRtrons, donde el miARN está codificado dentro de un gen que codifica una proteína. El largo de estos transcritos, su complejidad estructural y su naturaleza única nos llevó a preguntarnos como actúa el procesamiento co-transcripcional en estos loci. Al analizar duetos de miARNs policistrónicos, codificados por un solo transcrito, como es el caso de los *MIR169L/MIR169K*, observamos que solo el primer elemento, el *MIR169L*, que además está adyacente a un R-loop, se procesa de forma co-transcripcional, mientras que el segundo precursor parece procesarse enteramente de forma post-transcripcional (Figura 15A). Esto concuerda con un informe reciente donde se indica que el tallo-bucle policistrónico más cerca al extremo 5' se procesa de manera más eficiente que el tallo-bucle hacia el 3' del transcrito (Lunardon et al., 2021). En el caso del dueto *MIR842/MIR846*, el segundo miARN, pero no el primero, muestra signos de procesamiento co-transcripcional. Al analizar los patrones de R-loops, encontramos la existencia de un R-loop que abarca toda la región codificante del *MIR842* (R-loops tipo D) probablemente afectando su procesamiento. Por el contrario, en este caso, el segundo primario (miR846) es el que presenta mayor señal de procesamiento co-transcripcional, dada la presencia de un R-loop tipo B en su TSS. Aunque sea armonioso con nuestros resultados, no podemos confirmar que el R-loop sobre el *MIRNA842* promueva el procesamiento co-transcripcional del miR846 (Figura 15B).

Al explorar algunos miARNs codificados dentro de genes que codifican proteínas, encontramos que miARNs codificados cerca del TSS del gen huésped que presentan R-loops, como el caso del miR402 que se ubica en el primer intrón del gen AT1G77230, se procesa de manera eficiente de forma co-transcripcional (Figura 15C). Por el contrario, los miARNs codificados lejos del TSS y de los R-loops asociados a esta región, como miR156g, miR862 o miR838, no muestran señales de procesamiento co-transcripcional (Figura 15C). Esta observación refuerza la idea de que los R-loops ubicados en la proximidad y aguas arriba de los genes *MIRNA* promueven su procesamiento co-transcripcional.



**Figura 15. Procesamiento co-transcripcional y R-loops en miARN policistrónicos y miRtrons.** Perfil de R-loop y señales de plaNET-seq en el contexto genómico de miARNs policistrónicos (**A y B**) y miRtrones (**C**). Las flechas cian en los gráficos de plaNET-seq indican sitios de procesamiento detectados con precisión. Las flechas verdes marcan las posiciones donde se esperarían picos si los pri-miARN se procesaran co-transcripcionalmente. Las posiciones de los *MIRNA* se marcan con cajas debajo de los gráficos de plaNET-seq y se señalan en gris dentro de los perfiles de R-loop. Las posiciones de los cromosomas (Ch) se indican en el eje x de los paneles A y B.

### 6.1.8 Dinámica del Procesamiento Co-transcripcional - Puesta a punto del tratamiento.

El descubrimiento que el procesamiento de los pri-miARNs en plantas puede ocurrir durante su transcripción abrió un abanico de preguntas: ¿cuál es la dinámica del ensamblado proteico del microprocesador sobre los loci *MIRNA*? ¿cómo afecta esto el equilibrio entre el procesamiento co- y post-transcripcional de los transcritos primarios? ¿Puede permanecer el complejo de procesamiento anclado a la cromatina en genes *MIRNA* transcripcionalmente inactivos en espera de una nueva ronda de transcripción?

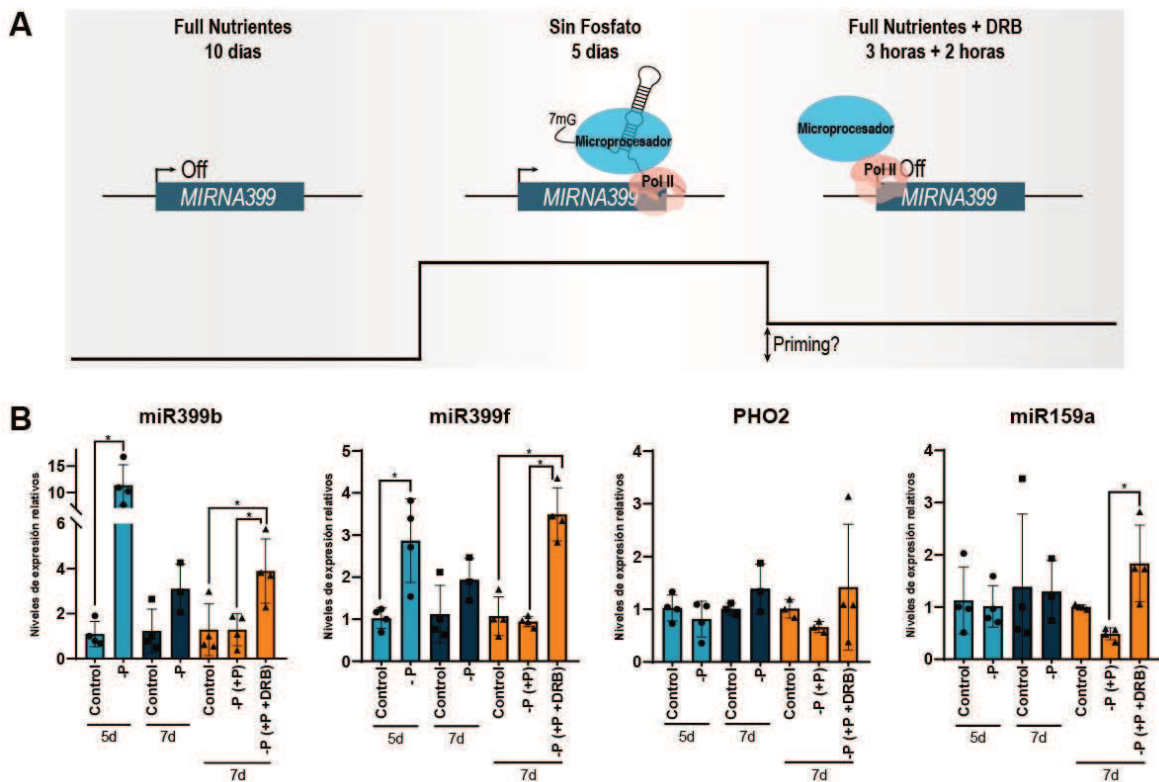
Para responder estas preguntas, decidimos enfocar nuestro estudio en los loci que codifican los miembros de la familia de miR399, los cuales se activan en respuesta al déficit de fosfato. En condiciones de crecimiento optimas los loci que codifican miR399 son transcripcionalmente inactivos. Sin embargo, cuando la planta detecta la escasez de fosfato la expresión y producción del miR399 aumenta marcadamente en la parte aérea de la planta (Fujii et al., 2005; Lei et al., 2016). Este miARN luego viaja a través del floema hasta la raíz, donde regula post-transcripcionalmente el ARNm de PHO2. La reducción de PHO2 permite la activación de factores que estimulan el aumento de canales de fosfato en las raíces (Baek et al., 2013; Prathap, et al., 2022). El miR399 está codificado por cinco genes, denominados *MIR399A/B/C/D/E/F*, alguno de los cuales algunos son más activos transcripcionalmente que otros ante una baja en los niveles intramoleculares de fosfato. En nuestro estudio, optamos por analizar los miR399b y miR399f, ya que son los más activos (Bari et al., 2006). El uso de este miARN como modelo de estudio nos permite trabajar con un locus que en condiciones de crecimiento normales permanece inactivo, dándonos un estado basal pre-transcripción, y que luego podemos activar o reprimir simplemente manipulando el contenido de fosfato del medio.

Debido a la necesidad de cambiar el medio de crecimiento de las plántulas para alterar sus niveles de fosfato, decidimos trabajar con un protocolo de crecimiento en medio líquido (Scheible et al., 2004). Pusimos a punto este nuevo método de crecimiento y llevamos a cabo diferentes períodos de deficiencia de fosfato para determinar el momento en que estos genes comenzaban a expresarse. Inicialmente, cultivamos las plantas en medio líquido con todos los nutrientes durante 10 días, luego cambiamos el medio por uno deficiente en fosfato, y mantuvimos la deficiencia durante 5 y 7 días (Figura 16A). Al final de cada período, tomamos muestras y medimos los niveles de los miR399b y miR399f, así como de su ARNm diana PHO2. Utilizamos el miR159 como control. Observamos un aumento en los niveles de los miR399 en ambos tiempos medidos en comparación con el control (Figura 16B). Mientras que los niveles de PHO2 no muestran una disminución brusca, esto puede deberse a una dilución de la muestra dado que los experimentos fueron realizados en plántulas enteras y la regulación de este ARNm ocurre solamente en raíces. Los niveles de miR159 no se vieron afectados (Figura 16B). Basados en estos resultados, decidimos continuar los experimentos con un déficit de fosfato por 5 días.

Por último, para investigar si el microprocesador permanece unido a los loci *MIRNA* después de terminada la transcripción, en espera de una nueva ronda, utilizamos la



combinación de restitución de fosfato en conjunto con el reactivo 5,6-Diclorobenzimidazol 1-β-D-ribofuranósido (DRB). El DRB detiene la síntesis de ARNm al promover la fosforilación del CTD de la Pol II y por ende su inactivación, de manera reversible. Esto detiene la transcripción y, simultáneamente, el procesamiento de miARNs, lo que nos permite analizar la estabilidad de la interacción entre las proteínas del complejo de procesamiento y la cromatina en una etapa transcripcional estacionaria. Para esto, luego del tratamiento de déficit de fosfato por 7 días, devolvimos a las plantas a un medio completo con y sin el agregado de DRB y analizamos los niveles de transcritos. Pudimos observar que cuando la planta vuelve a crecer en un medio con fosfato, los niveles de miR399 disminuyen a niveles comparables con los basales (Figura 16B). Curiosamente, cuando analizamos los niveles de transcritos ante la presencia de DRB, en todos los casos fueron mayores a los niveles control (Figura 16B). Una explicación posible sobre este fenómeno es que el agregado de DRB también frena la transcripción de enzimas necesarias en la degradación de ARNs y por tal motivo los niveles de estos no disminuyen.



**Figura 16. Dinámica del procesamiento co-transcripcional.** **A-** Esquema donde se muestra el protocolo de déficit de fosfato que se siguió para activar la expresión del miR399. **B-** RT-qPCR de diferentes isoformas del miR399, el miR159a utilizado como control y el ARNm *target* del miR399, PHO2. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t.

### 6.1.9 CUT&RUN: Análisis de la dinámica de ensamblaje del microprocesador.

CUT&RUN, abreviatura de *Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease*, es una estrategia revolucionaria de mapeo genómico. Esta técnica emplea la Proteínas A y/o G fusionada a la Nucleasa Micrococcal (pAG-MNase), la cual se une específicamente a las cadenas pesadas de un anticuerpo de interés que reconoce alguna proteína de unión al ADN. Posteriormente, al unirse a su blanco el anticuerpo y su MNase asociada cliva selectivamente al ADN a los lados del punto de anclaje. En el proceso de CUT&RUN, las células o núcleos se inmovilizan en un soporte sólido, y los fragmentos de ADN digeridos por pAG-MNase difunden a la solución donde pueden ser purificados y secuenciados para identificar los sitios de unión de la proteína de interés. El flujo de trabajo es compatible con secuenciación Illumina y proporciona perfiles de alta resolución.

Las proteínas de interés para este experimento, cuyo objetivo es evaluar la unión del microprocesador en diferentes momentos de la transcripción, son HYL1 y HST. HYL1 por ser una proteína crucial en la biogénesis de miARNs, siendo una de las primeras en reconocer el ARNdc de los pri-miARNs. Por otro lado, HST debido a su papel fundamental en el procesamiento co-transcripcional, reclutando a DCL1 a los loci *MIRNA*, lo que resulta esencial en este proceso.

Para evaluar la unión de HYL1 a la cromatina, se empleó un anticuerpo contra esta proteína, utilizando plantas Col-0 y mutantes *hyl1-2* como control negativo. En cuanto al estudio de HST, se utilizaron plantas *hst-15/HST-GFP* y *hst-15* como control negativo, utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína fluorescente GFP. Además, como controles para verificar el desarrollo adecuado del experimento, se realizaron pruebas en plantas Col-0 utilizando anticuerpos contra H3K4me3 e IgG, para su comparación con los patrones ya conocidos. Las muestras para el experimento fueron tomadas después de 5 días de tratamiento con déficit de fosfato, seguido de una recuperación de 3 horas de adición de fosfato y 2 horas después de agregado de DRB. Luego de la secuenciación Illumina de todas las muestras y obtención de los datos, se inició el análisis, que aún está en curso en el momento de escribir esta tesis.

Esperamos que estos resultados puedan ayudarnos a dilucidar la posible continuidad de la asociación de los factores del microprocesador con los loci *MIR399*, tras un estímulo por déficit de fosfato. Además, los controles realizamos en cada etapa, tanto después de 15

días en condiciones nutricionales óptimas, como luego de las 2 horas de exposición a DRB, nos permita entender cómo se ve afectada la unión del microprocesador cuando se detiene la transcripción en todos los genes de miARNs de Arabidopsis.

Los hallazgos que obtengamos de este experimento, para mejorar el entendimiento del proceso, deben complementarse con datos experimentales que aborden los niveles de procesamiento co- y post-transcripcional de pri-miARNs, así como con el análisis de la ocupación de la Pol II en los loci *MIRNA*, para evaluar si la unión del Microprocesador depende de esta o no. Asimismo, resulta interesante investigar si la presencia de R-loops en los TSS de estos genes desempeñan un papel en el reclutamiento del Microprocesador.

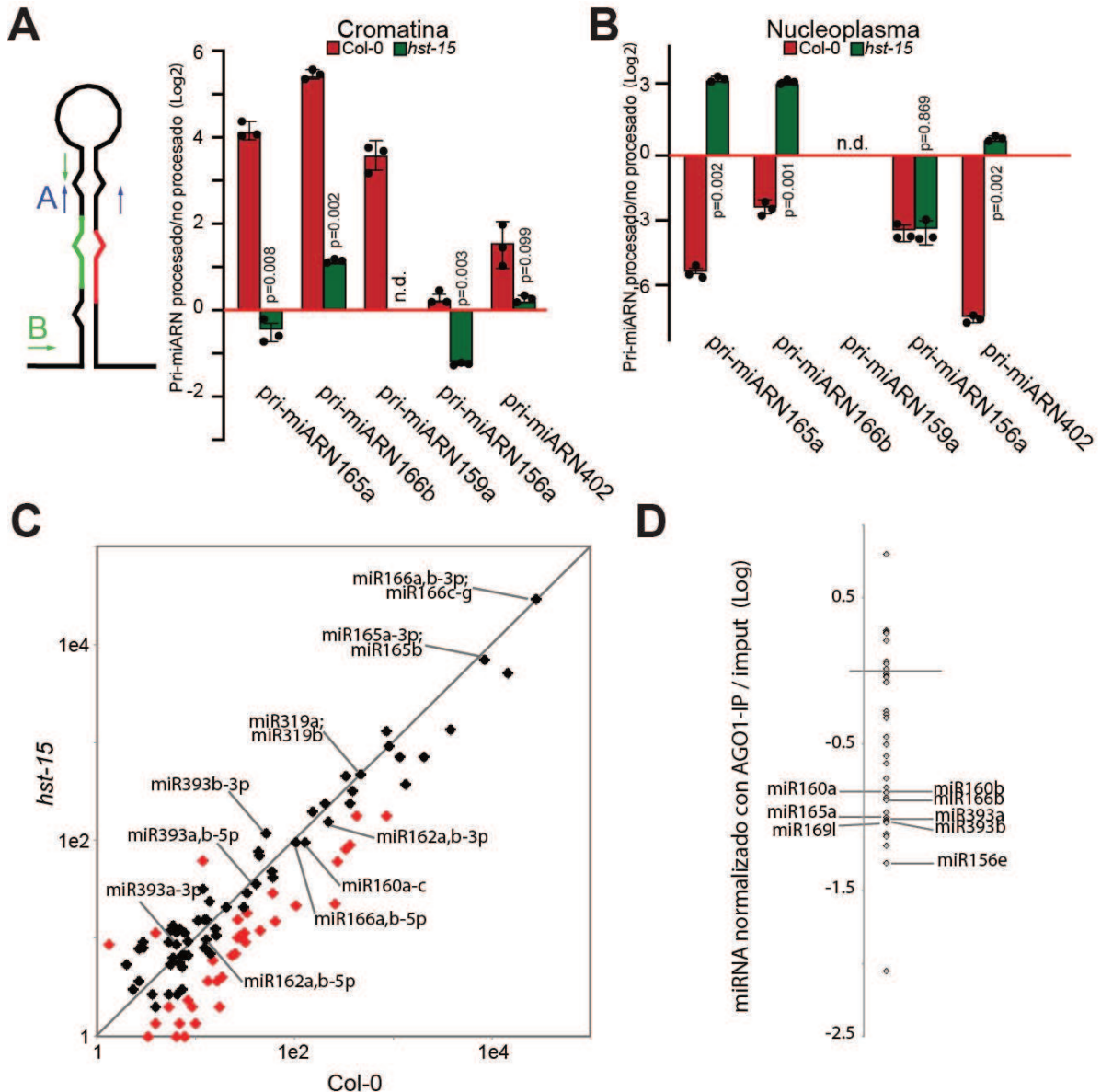
## **6.2 SECCIÓN 2: Regulación del procesamiento co-transcripcional**

Esta sección es una continuación de lo realizado por la Dr. Delfina Gagliardi durante su proyecto de tesis doctoral titulado “Mecanismos no canónicos de la regulación de la expresión génica mediado por ARNs pequeños en plantas”, por lo que muchos de los experimentos aquí presentados han sido realizados por ella. Los análisis bioinformáticos realizados en esta sección fueron realizados por el Dr. Agustín Arce. En colaboración con el Dr. Tomasz Gulanicz del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Adam Mickiewicz en Polonia se realizaron los experimentos de FISH aquí presentados.

### **6.2.1 El rol de HASTY en el procesamiento co-transcripcional.**

Recientemente, nuestro grupo descubrió que HST es capaz de reclutar a DCL1 a loci *MIRNA* a través de la interacción con el complejo MEDIATOR (Cambiagno et al., 2021). Esta particularidad podría sugerir que la dinámica del procesamiento co-transcripcional depende de la actividad de HST. Para evaluar esta posibilidad medimos los niveles de pri-miARNs procesados y no procesados en la cromatina y en nucleoplasma depletado de cromatina en plantas salvajes y mutantes *hst-15*. Pudimos confirmar que las plantas *hst-15* poseen un procesamiento co-transcripcional deficiente al observar una reducción en la proporción de pri-miARNs procesados en relación con los no procesados en la fracción de la IP en las mutantes (Figura 17A). Observamos el patrón opuesto en la fracción de nucleoplasma, sugiriendo que el equilibrio entre el procesamiento co-transcripcional y post-transcripcional cambia en esta mutante, manteniendo los niveles generales de miARNs compensados (Figura 17B). Coincidentemente con estos resultados, el análisis de secuenciación de ARN pequeño de las mutantes *hst-15* reveló que la mayoría de los miARNs, y particularmente aquellos con una alta proporción de procesamiento co-transcripcional, no se alteran en las mutantes (Figura 17C). Estos resultados concuerdan con el rol de HST en reclutar el complejo de procesamiento a los loci de *MIRNA*. Recientemente, se mostró que las mutantes en HST presentan alteraciones en la capacidad de los miARNs maduros de moverse entre células (Brioudes et al., 2021). Notablemente, la mayoría de los miARNs que actúan de manera no autónoma, como miR160, miR165 y miR166 (Pyott & Molnar, 2015), se encontraban entre los miARNs con mayor tasa de procesamiento co-transcripcional (Figura 12B). Trabajos realizados por otros grupos sugieren que los miARNs que se cargan en AGO1 realizan sus funciones en la misma célula, siendo los miARNs no cargados en AGO1 lo que probablemente tengan un comportamiento móvil (Brioudes et al., 2021; Fan et al., 2022). Coincidente con este

escenario, encontramos que los miARNs procesados mayoritariamente de forma co-transcripcional aparecieron entre los menos cargados en AGO1 en experimentos de RIP-seq (Figura 17D). Esto sugiere que los miARNs procesados co-transcripcionalmente pueden tener un destino diferente después del procesamiento, por alguna razón aún no definida. Esta idea concuerda con la reducción del procesamiento co-transcripcional de miARNs observada en *hst-15* (Figura 17A) y la falta de movimiento de miARNs en esta mutante.



**Figura 17. El rol de HASTY en el procesamiento co-transcripcional.** **A** y **B**- Procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs en plantas Col-0 y mutantes *hst-15*, medido por RT-qPCR en muestras de RIP (cromatina) (**A**) o procesamiento post-transcripcional en nucleoplasma depletado de cromatina (**B**). El procesamiento se midió como la abundancia relativa de la región

del tallo-bucle (par A) en relación con la cantidad de pri-miARNs no procesados (par B). Los intermediarios de procesamiento se normalizaron por el input y se expresaron en relación con las muestras de IP contra IgG (línea roja). Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no pareada con corrección de Welch y se indican para cada comparación.  $n = 3$  muestras biológicamente independientes. ND, no detectado. **C-** Gráfico de dispersión que compara los recuentos por millón +1 (escala logarítmica) de miARNs maduros entre WT (Col-0) y mutantes *hst-15*. Los miARNs diferencialmente expresados se muestran en rojo. Se indican individualmente los miARNs con la mayor proporción de procesamiento co-transcripcional. **D-** Gráfico de puntos de miARNs cargados en AGO1. Los miARNs en la fracción de IP de AGO1, así como en el input, se expresaron primero como una fracción del recuento total de miARNs en la muestra respectiva. La preferencia de carga de AGO1 para cada miARN se expresa luego como la proporción de la frecuencia de un miARN en la IP frente a la muestra de entrada. Se indican individualmente los miARNs con la mayor proporción de procesamiento co-transcripcional.

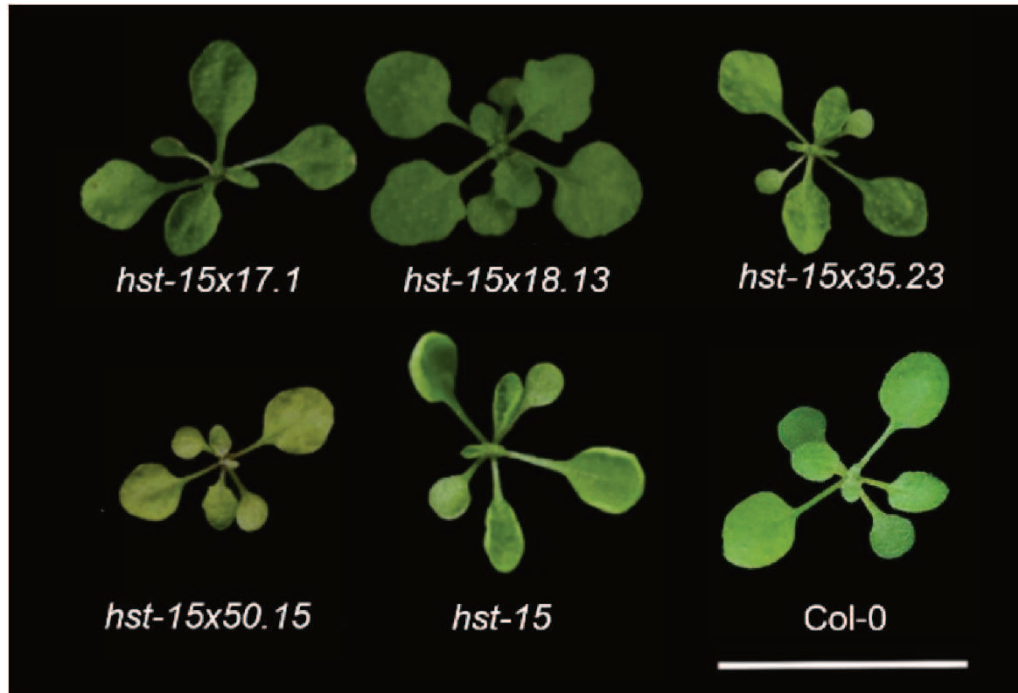
### 6.2.2 *Suppressor-Screening* de *hst-15*.

Aunque en los últimos años diversos estudios han tratado de dilucidar la función de HST, su rol específico en la biogénesis de miARNs, sobre todo en el movimiento de miARNs entre células, continúa altamente discutido. Con el objetivo de explorar la función de HST de una manera no sesgada decidimos abordar su estudio desde una perspectiva genética, realizando un *suppressor-screening* de plantas mutantes *hst-15*. Un *suppressor-screening* (o supresión por mutagénesis) es una técnica que permite estudiar las funciones y vías moleculares en las que participa una proteína. Este método se basa en realizar una mutagénesis al azar sobre un genotipo mutante determinado, con la finalidad de encontrar una segunda mutación, diferente a la primera, que suprima o atenúe el primer fenotipo, asemejándose al fenotipo de una planta salvaje. En general, la segunda mutación que causa la reversión del fenotipo estará dada en alguna proteína que interactúe y/o ejerza un efecto inhibitorio sobre la proteína en estudio.

El alelo mutante *hst-15* usado en este estudio presenta una inserción por T-DNA en el exón 17 de *HST*. El fenotipo de plantas mutantes *hst* es muy característico, presentando hojas curvadas, pérdida de tricomas en la cara adaxial y retaso en la floración, acompañada por alteraciones en el desarrollo del carpelo, flores con estigma expandido y óvulos expuestos, lo que conduce a una caída abrupta en su fertilidad (Bollman et al., 2003) (Figura 18A). Muchos de estos fenotipos fueron atribuidos recientemente a la falla de los miARNs de moverse fuera de la célula en estas plantas mutantes (Brioudes et al., 2021). Esto convierte a un *suppressor-screening* en una herramienta ideal para tratar de descubrir como HST controla el movimiento intercelular de miARNs.

El resultado del *suppressor-screening* arrojó un conjunto de plantas mutantes que se podían dividir en 3 tipos; aquellas que presentan una atenuación parcial del fenotipo de *hst-15*, otras que revierten el fenotipo en etapas tempranas del desarrollo pero no en etapas más avanzadas, y aquellas que presentan una reversión marcada en todos los estadios, siendo muy similares a plantas salvajes. Para seleccionar aquellas mutantes de mayor interés, además del análisis fenotípico, se realizaron genotipados para corroborar que la mutación en *hst-15* se encuentre en homocigosis y se midieron los niveles de distintos miARNs mediante *Northern blots*. Varias de las plantas que habían restaurado el fenotipo al de una planta salvaje, además presentaban niveles de miARNs similares a las plantas salvajes (Figura S3). De todas las líneas aisladas se seleccionaron algunas con características más llamativas para la secuenciación de su genoma e identificación de mutaciones secundarias (Figura 18A). Durante el análisis de los genomas secuenciados, se valoraron aquellas mutaciones que se encontraban en regiones codificantes o sitios de *splicing*, descartándose aquellas otras mutaciones en intrones o regiones intergénicas, dado que es más difícil predecir el impacto que podrían tener sobre la expresión del gen. A través de este análisis, se identificaron las posibles mutaciones causantes de la reversión del fenotipo en las líneas secuenciadas (Figura 18B).

Al estudiar cada línea en profundidad, encontramos que línea *hst-15/17.1* poseía una mutación en un gen hipotético, el cual nunca ha sido estudiado. La línea *hst-15/18.13* poseía una mutación en una proteína transportadora de UDP-N-acetilglucosamina, un nucleótido-monosacárido que cumple diversas funciones biológicas, entre ellas la glicosilación de proteínas (Chen et al., 2022; Niemann et al., 2015) y la línea *hst-15/50.15* presentaba una mutación en un miembro de la familia VESICLE ASSOCIATED MEMBRANE PROTEINS 72 (VAMP72), proteína a la cual fue relacionada con el tráfico vesicular (Zhang et al., 2015). Una de las líneas que más llamó nuestra atención fue la línea *hst-15/50.15*, donde podemos encontrar una mutación en *IMPA-2*. *IMPA-2* es una importina tipo alfa, que interviene en la translocación de HST desde el citoplasma al núcleo (Cambiagno et al., 2021). Aunque ya existe una relación establecida entre ambas proteínas, esta mutación hace énfasis en la importancia del movimiento de HST entre ambos compartimentos celulares y su posible función en cada uno de ellos. Por último, una mutación que captó nuestra atención fue la presente en línea *hst-15/35.23*. En esta, pudimos identificar una mutación en *HWS*, proteína que anteriormente había sido relacionada a la biogénesis de miARNs pero sin poder adjudicarle un rol claro (Lang et al., 2018). En adelante centramos nuestros esfuerzos en caracterizar esta línea mutante explorando la interacción entre HST y HWS.

**A****B**

MUTANTE	GEN	DESCRIPCIÓN
<i>hst-15 x 17.1</i>	AT4G05612	Proteína hipotética.
<i>hst-15 x 18.13</i>	AT5G59740	Proteína de la familia de transportadores de UDP-N-acetilglucosamina (UAA).
<i>hst-15 x 35.23</i>	AT3G61590	HWS. Componente del complejo SCF E3 ubiquitina ligasa.
<i>hst-15 x 50.15</i>	AT4G16143	IMPA-2. Isoforma de importina alfa.
	AT4G15780	VSR7. Miembro de la familia de genes VAMP72

**Figura 18. Líneas secuenciadas obtenidas en el *suppressor-screening*.** **A-** Fenotipo de plantas Col-0, línea parental *hst-15* y líneas dobles mutantes revertantes del fenotipo *hst-15* obtenidas después de la mutagénesis con EMS. **B-** Genes candidatos mutados encontrados en las dobles mutantes secuenciadas, posibles causantes de la reversión del fenotipo *hst-15*.

### 6.2.3 Una mutación en *HWS* revierte el fenotipo de *hst-15*.

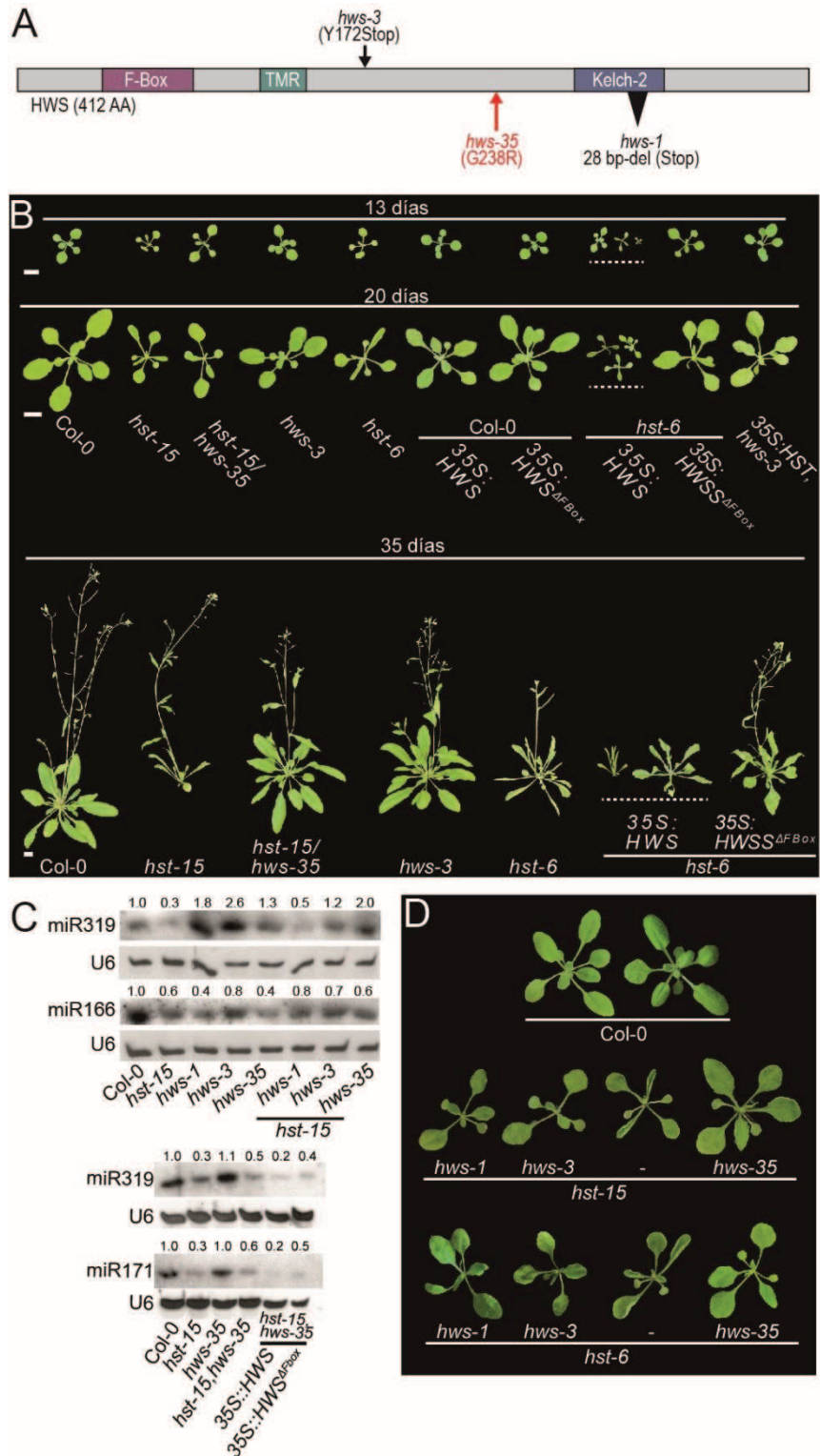
La mutación en *HWS* (AT3G61590) presente en la línea *hst-15/35.23* consiste en el cambio de un nucleótido G por A que causa la modificación del aminoácido de Glicina (G) ubicado en la posición 238 por un aminoácido de Arginina (R) (Figura 19A). Teniendo en cuenta que la mutación genera el cambio de una Glicina, el cual es un aminoácido neutro y con un grupo R de solo un hidrógeno, por una Arginina, el cual es un aminoácido con carga positiva y posee un grupo R de gran tamaño, podría causar una alteración en la conformación tridimensional de la proteína y por lo tanto en su función. Una particularidad interesante es que, como mencionamos en la introducción, una mutación en *hst* identificada en un



*suppressor-screening* anterior es capaz de revertir el fenotipo de mutantes de *hws* (Zhang et al., 2017). La existencia de una regulación recíproca entre estas dos proteínas es llamativa, ya que no solo actuarían en la misma vía, sino que podrían intercambiar el orden de su acción o bien actuar en el mismo punto de la vía pudiendo inclinar levemente el mecanismo hacia un lado o el otro.

La mutación aislada en este estudio, y de ahora en adelante denominada *hws-35*, mostró una supresión parcial del fenotipo *hst-15*, especialmente en lo que respecta a la pérdida de la hiponastía de la hoja (Figura 18A y S4). Para corroborar que la mutación en *hws* es la causante de la reversión del fenotipo, se transformó la línea doble mutante *hst-15/hws-35* con la construcción *35S:HWS* y *35S:HWS $\Delta$ FBox* (versión mutada de la proteína sin su dominio F-Box, el cual le otorgaría su capacidad de marcar proteínas para degradación) (Figura 19A). La complementación con la versión completa de HWS restaura el fenotipo de *hst-15* e incluso lo exagera (Figura S4). Por su parte, la versión *HWS $\Delta$ FBox* no fue capaz de revertir el fenotipo de la doble mutante *hst-15/hws-35* (Figura S4). La exacerbación del fenotipo mutante *hst* también se observa cuando HWS es sobreexpresada en otro alelo mutantes de *HST* (*hst-6*), pero no en plantas salvajes (Figura 19B). Nuevamente, la sobreexpresión de la versión *HWS $\Delta$ FBox* no produce cambios significativos en plantas *hst-6* (Figura 19B). Esto nos indica que el dominio F-Box de la proteína podría tener un rol importante en la relación existente entre HST y HWS. Adicionalmente, cruzamos la mutante *hst-15* con otros alelos de *HWS* (*hws-1* y *hws-3*) y observamos que también son capaces de suprimir el fenotipo de hojas hiponásticas de *hst-15* descartando que otra mutación secundaria del tratamiento con EMS cause la reversión observada (Figura 19D).

Como pudimos observar en la sección anterior y también en estudios realizados por otros laboratorios, los niveles de la mayoría de los miARNs maduros no está fuertemente afectada en mutantes *hst*, sino que su fenotipo es causado principalmente por una disminución de la movilidad de ciertos miARNs (Brioude et al., 2021; Cambiagno et al., 2021). Pudimos determinar que una mutación en *HWS* no es suficiente para restaurar los niveles endógenos de miARNs reducidos en *hst-15* (Figura 19C). Por lo tanto, esto sugiere que la supresión del fenotipo no implica una restauración de los niveles de miARNs, sino potencialmente una restauración en su función relativa al movimiento de miARNs. Además, la sobreexpresión de HWS en mutantes *HST* provocó una caída más fuerte en los niveles de miARNs, lo que explica la exacerbación del fenotipo observada (Figura 19B y 19C).



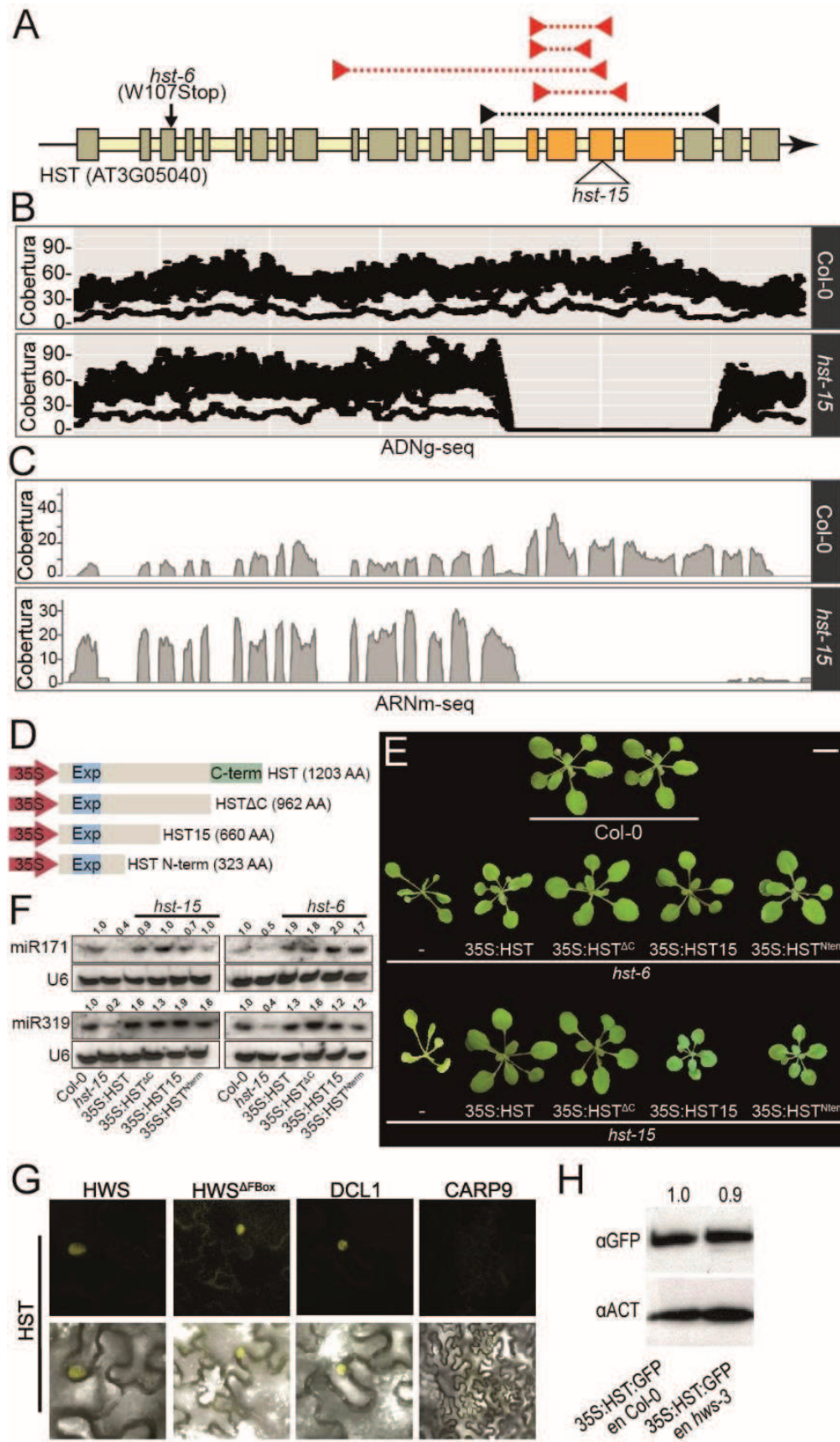
**Figura 19. Una mutación en *HWS* revierte el fenotipo de *hst*.** **A-** Representación esquemática de *HWS*. Se señala en negro dos alelos mutantes del gen utilizados a lo largo de este trabajo. En rojo se marca el nuevo alelo mutante de *HWS* obtenido en este estudio. La caja lila representa el dominio F-Box, la caja verde el dominio TMR y la caja azul el dominio Kelch-2. **B-** Fenotipo a los 13, 20 y 35 días de edad de plantas Col-0, diferentes mutantes *hst* y *hws*, doble mutantes *hst/hws*

y complementación de mutantes *hst* con construcciones que sobreexpresan la versión completa de HWS, así como una versión sin su dominio F-Box. **C-** Análisis de los niveles de miARNs maduros en las mutantes anteriormente nombradas a través de la técnica *Northern Blot*. Se utilizó U6 para relativizar los niveles de los miARNs seleccionados. **D-** Reversión del fenotipo de diferentes alelos mutantes en *HST* obtenidos por cruce con diferentes alelos mutantes de *HWS*.

#### **6.2.4 La supresión del fenotipo *hst-15* en mutantes *hws* no sería causada por un cambio en los niveles proteicos de HST.**

Como se mencionó en la introducción, HWS posee un dominio F-Box y forma parte del complejo SCF (Lang et al., 2018). Por lo tanto, nuestra primera hipótesis es que HWS podría inducir la degradación de HST. De ser así, la ausencia de HWS aumentaría los niveles de HST y esto explicaría la reversión del fenotipo. Este escenario solo sería posible si *hst-15* es un alelo hipomórfico, produciendo una proteína parcialmente activa. Curiosamente, cuando tratamos de genotipar mutantes *hst-15* fallamos en obtener productos de amplificación al usar cebadores diseñados para unirse a la inserción de T-DNA de esta mutante, y solo podíamos amplificar la región contigua al T-DNA en plantas Col-0 pero no en *hst-15* (Figura 20A y S5). De hecho, solo pudimos amplificar la región que contiene T-DNA en *hst-15* al usar cebadores distantes de la supuesta inserción, y aún en este caso, el fragmento de amplificación fue mucho más pequeño que el amplificado en Col-0 (Figura S5). Dado que el mapeo por secuenciación de las líneas del *suppressor-screening* implicó también re-secuenciar la línea parental *hst-15* disponemos de los datos necesarios para reconstruir el locus mutado y resolver el misterio. Sorprendentemente al mapear las lecturas obtenidas al locus que codifica HST no solo detectamos que faltaba la inserción de T-DNA predicha, lo cual explicaba la falta de amplificación por PCR al usar cebadores de T-DNA, sino que también encontramos que una región del gen, que abarcaba los exones 16 al 20, faltaba en *hst-15* (Figura 20B). Esta delección es probablemente un efecto secundario de la eliminación natural de la inserción de T-DNA, la cual se vio acompañada de la eliminación de la región contigua. Además, los datos de secuenciación de ARNm de *hst-15* revelaron que esta delección produce un ARNm aberrante que incluye parte del intrón 15, el cual contiene un codón de parada 21 aminoácidos después del final del exón 15. Esto lleva a la traducción de una proteína truncada de 660 aminoácidos, aproximadamente la mitad del tamaño de HST (Figura 20C). Este hallazgo abre la posibilidad de que la proteína truncada presente en *hst-15* sea suficiente para complementar parcialmente el fenotipo *hst* cuando se estabiliza por la falta en conjunción de HWS. Para probar esta posibilidad, primero creamos tres versiones truncadas de HST, una que falta el dominio C-terminal (HST $\Delta$ C), la

versión truncada presente en *hst-15* (HST15) y una proteína más pequeña que contiene solo el dominio N-terminal de HST (HST N-term) (Figura 20D). Luego, sobreexpresamos estas proteínas en mutantes *hst-15* y *hst-6* y analizamos la capacidad de cada una para complementar del fenotipo. En nuestras manos, todas las construcciones pudieron complementar los fenotipos causados por la mutación en *HST*, especialmente la hiponastía de las hojas, y los niveles de los miARNs estudiados (Figura 20E y 20F). Este escenario sugiere que HST truncada en *hst-15*, tendría actividad hipomórfica y podría explicar la reversión del fenotipo si es que aumenta sus niveles al volverse estable en la mutante *hws-35*. Sin embargo, otras evidencias sugieren que este no sería el caso. En primer lugar, observamos que mutaciones en alelos mutantes *HWS* no solo revierten el fenotipo *hst-15*, sino también *hst-6* que, dado su codón de parada prematuro, es probablemente un alelo nulo (Figura 19D y 20A). Además, incluso cuando pudimos detectar la interacción HWS-HST mediante ensayos de BiFC (Figura 20G), no pudimos detectar ningún cambio en los niveles proteicos de HST en mutantes *hws-3* (Figura 20H). En conclusión, nuestros datos revelaron la naturaleza hipomórfica del alelo *hst-15* y señalan la necesidad de tomar ciertas precauciones al trabajar con este alelo, pero también descartan la posibilidad de que el efecto supresor de la mutación en *HWS* causado por una degradación defectuosa de HST.



**Figura 20. *hst-15* es un alelo hipomórfico.** **A-** Esquema del gen *HST*. Los rectángulos representan los exones, mientras que la línea gruesa hace referencia a los intrones. Los rectángulos amarillos representan los exones delecionados durante la pérdida del T-DNA. El triángulo marca la posición donde se encontraba dicho T-DNA en el alelo *hst-15*; con una flecha negra se marca el alelo *hst-6*. Los triángulos rojos unidos por la línea de puntos representan el fragmento no amplificado en *hst-15*; los triángulos negros unidos por línea de puntos representa el único producto de amplificación en dicho alelo. **B-** Cobertura sobre el locus *HST* de las lecturas obtenidas en la secuenciación de ADN genómico de la mutante *hst-15*. **C-** Cobertura sobre el locus *HST* de las lecturas obtenidas en la secuenciación de ARNm en la mutante *hst-15*. **D-** Representación esquemática de las diferentes versiones de HST utilizadas para la complementación de fenotipo. HST: versión completa; HST $\Delta$ C: versión sin el dominio C-terminal; HST15: versión posiblemente funcional en la mutante *hst-15*; HST N-term: versión que sólo posee en N-terminal de la proteína. **E-** Fenotipos de complementación de los alelos *hst-15* y *hst-6* con las diferentes versiones de HST, donde todos son capaces de revertir el fenotipo *hst* a uno WT. **F-** Restablecimiento de los niveles de miARNs maduros en plantas *hst* complementadas con las diferentes versiones. **G-** Interacción entre HST-HWS y HST-HWS $\Delta$ FBox mediante BiFC; DCL1 fue utilizada como control positivo de interacción de HST; CARP9 se utilizó como control negativo. **H-** *Western blot* para detectar los niveles de HST:GFP en plantas salvajes y mutantes *hws-3*. Los niveles de ACTINA fueron usados como control de carga.

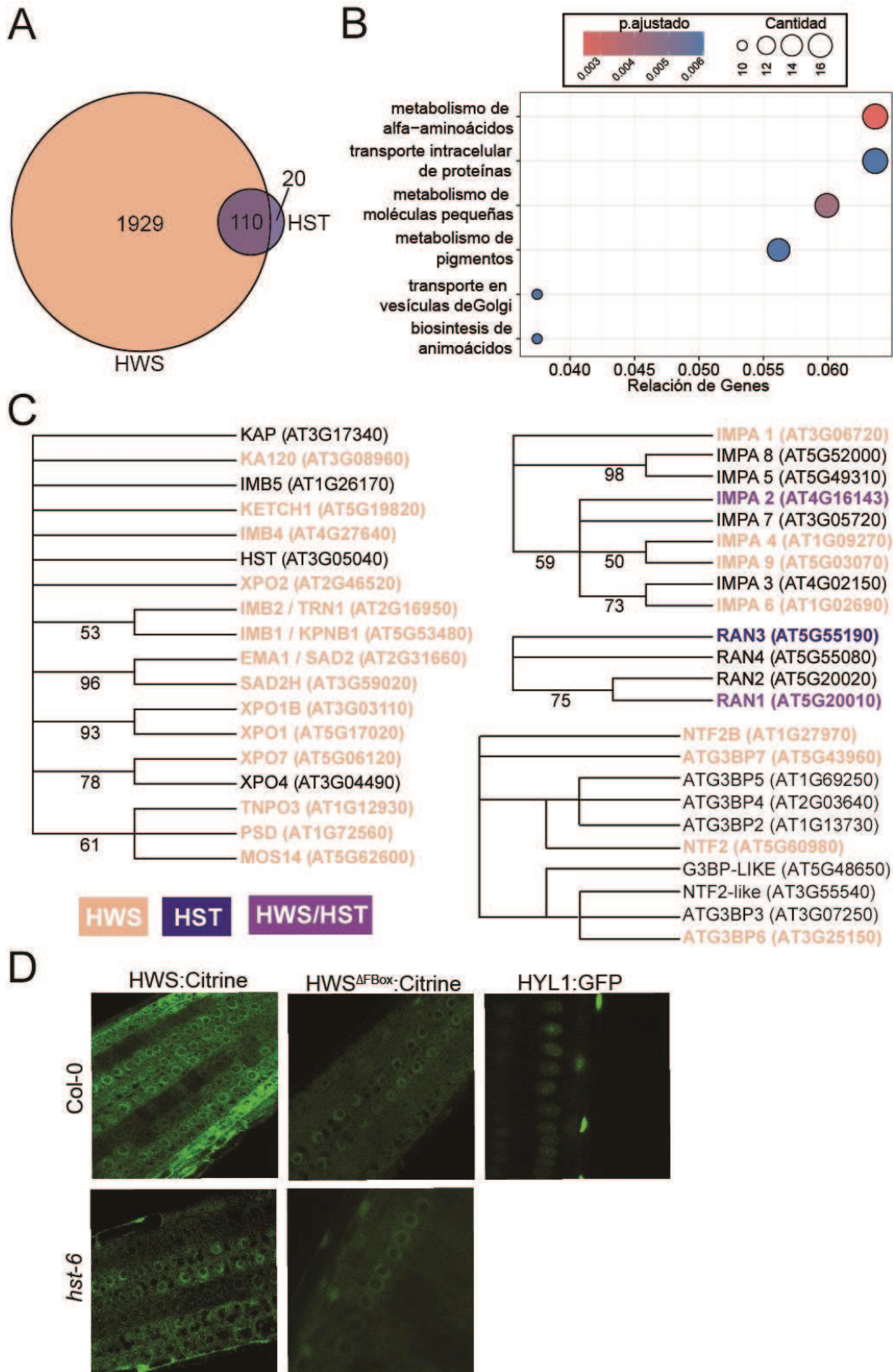
### 6.2.5 HWS interactúa con el poro nuclear y un gran número de proteínas exportadoras/importadoras.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente que sugieren que HWS no altera la homeostasis de HST, la relación entre ambas proteínas podría ser mediada por alguna proteína que interactúe con ambas. Con el objetivo de identificar estas potenciales proteínas, exploramos datos de espectrometría de masas de HWS y HST, buscando interactores comunes. Encontramos 110 proteínas que interactúan tanto con HWS como con HST (Figura 21A). Entre ellos, identificamos a IMPA2 y RAN1, proteínas necesarias para la traslocación de HST entre el núcleo y el citoplasma (Cambiagno et al., 2021), y pudimos validar su interacción mediante BiFC (Figura S6, Tabla S1). Esto sugiere la posibilidad de que HWS pueda influir en el movimiento de HST entre ambos compartimentos celulares. Entre los interactores comunes también pudimos identificar varias subunidades del complejo MED, entre ellas a MED37D, recientemente descrita como proteína necesaria en el reclutamiento de HST a los loci de miARNs durante el procesamiento co-transcripcional de miARNs (Tabla S1). Al realizar un análisis de ontología de genes de las proteínas enriquecidas en la espectrometría de masas de HWS, llamó nuestra atención el gran número de genes relacionados al transporte intracelular de proteínas (Figura 21B). Al estudiar en detalle este grupo de proteínas, encontramos que HWS interactúa con la mayoría de las proteínas exportadoras, así como un importante

número de proteínas importadoras, RAN GTPasas y factores de transporte nuclear (Figura 21C). De todas las proteínas pertenecientes a estos grupos, HWS interactúa con 26 de las 41. Dado este alto número de interacciones, es probable que HWS también se relacione con las restantes en tejidos o tipos celulares específicos, en alguna determinada etapa del desarrollo o bajo ciertas condiciones de estrés. En este sentido, aunque los experimentos de espectrometría de masas no evidencian la interacción HWS-HST, nosotros hemos sido capaces de detectar su interacción por metodologías alternativas (Figuras 20G).

La sobrerrepresentación de proteínas relacionadas al transporte de moléculas a través del poro nuclear puede indicar que HWS interfiere con el transporte de miARNs o proteínas relacionadas a la biogénesis de estos a través del poro nuclear. De hecho, entre los interactores más fuertes de HWS encontramos NUA, uno de los principales componentes del denominado *basket* del poro nuclear, y aunque en niveles menores, encontramos interacción con NUP93, componente del canal del poro nuclear (Figura 8A). Dada esta fuerte interacción de HWS con componentes del poro nuclear, fue de interés estudiar su localización nuclear. El análisis microscópico reveló que HWS localiza en la periferia interna del núcleo en plantas salvajes (Figura 21D), una observación compatible con las interacciones detectadas. Esta localización fue observada tanto en plantas salvajes como en mutantes *hst* lo sugiere que su potencial interacción con el poro nuclear es independiente de HST. A su vez, la eliminación de su dominio F-Box tampoco altera su ubicación. Esta localización podría sugerir que HWS afecta el paso de ciertas moléculas a través del poro nuclear.







**Figura 21. Interactores comunes de HWS y HST.** **A-** Diagrama de Venn donde se observan 110 proteínas que interactúan tanto con HWS como con HST. **B-** Ontología de gene. Enriquecimiento de proteínas después del filtrado para  $\log_2FC > 10$ . **C-** Filogenética de Exportinas Alfa, Importinas Beta, proteínas RAN y WIP. Se marcan las proteínas interactuantes con HWS (rosa), HST (azul) o ambas, HWS y HST (violeta). **D-** Localización de HWS:Citrina y HWS $\Delta$ FBox:Citrina en raíces de plantas Col-0 y *hst-6*. Como control de localización nuclear se utilizó raíces de Col-0 transformadas con HYL1:GFP.

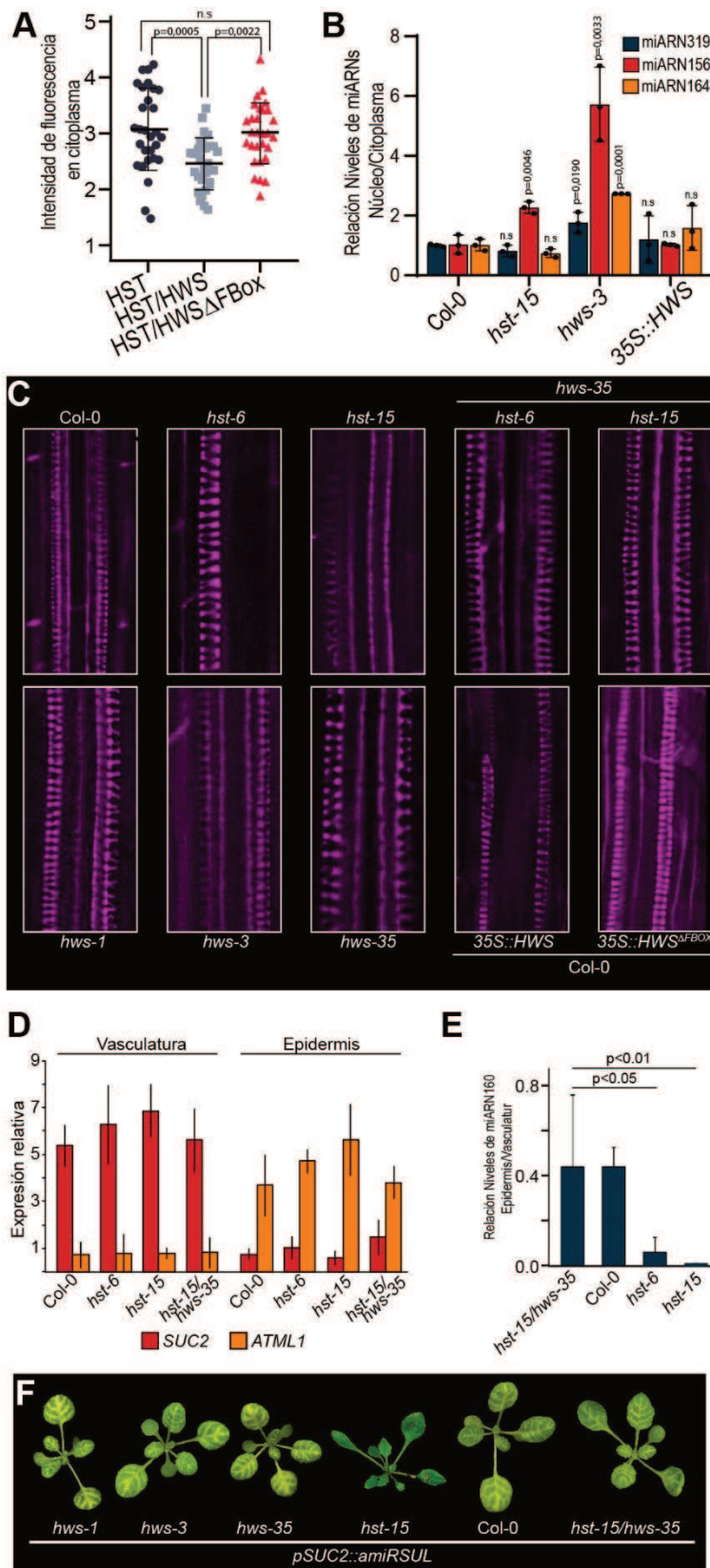
### 6.2.6 HWS afecta la localización celular de HST influenciando el movimiento no-autónomo de miARNs.

Como hemos demostrado en las secciones anteriores, HWS interactúa con HST sin afectar sus niveles proteicos (Figura 20G y 20H), y también lo hace con IMPA-2 y RAN-1, proteínas encargadas en el transporte entre núcleo y citoplasma de HST (Figura S6, Tabla S1). Por este motivo, nos preguntamos si HWS afecta la distribución de HST entre núcleo y citoplasma en lugar de sus niveles proteicos. Para analizar esto, infiltramos hojas de *N. benthamiana* con HST-GFP, HST-GFP junto a HWS, o HST-GFP junto a HWS $\Delta$ FBox-GFP. Luego cuantificamos la fluorescencia de esta proteína en citoplasma. Pudimos observar que los niveles de HST en citoplasma son comparables cuando infiltramos HST sola o cuando expresamos HST en conjunto con HWS $\Delta$ FBox (Figura 22A). Sin embargo, cuando expresamos HST con HWS en su versión completa, los niveles de HST disminuyen en el citoplasma permaneciendo retenida en el núcleo (Figura 22A). Esto plantea que HWS influye negativamente el movimiento de HST desde el núcleo al citoplasma. Curiosamente, cuando analizamos los niveles de miARNs en núcleo y citoplasma, observamos el patrón contrario, los miARNs maduros se retienen en el núcleo en ausencia de HWS y no observamos diferencias en su localización cuando sobreexpresamos la misma, siendo estos niveles similares a los obtenidos para Col-0 (Figura 22B). La retención de HST en el núcleo podría estar mediada por una regulación específica de HWS sobre RAN-1, proteína encargada de la exportación de HST. Sin embargo, no poseemos evidencia para poder afirmar si los niveles proteicos de RAN-1 son afectados por HWS. Además, la retención de miARNs en el núcleo en ausencia de HWS plantea la posibilidad de que HWS estimule el pasaje de miARNs desde el núcleo al citoplasma. No detectar un aumento de este movimiento en plantas que sobreexpresan HWS, podría deberse a una saturación del sistema, siendo necesarios solo ciertos niveles de HWS para cumplir la función. La posibilidad de que HWS estimule la exportación de miARNs maduros al citoplasma, podría generar un escenario donde estos miARNs aumenten sus funciones no-autónomas. Sin embargo, quedaría pendiente

evaluar la unión de estos miARNs maduros a AGO1 dado que se ha planteado que solo los miARNs libres, y no así los cargados en AGO1, serían capaces de cumplir funciones no autónomas (Brioudes et al., 2021; Dalmadi et al., 2019).

Para estudiar el posible efecto de HWS sobre las funciones de los miARNs no autónomos, realizamos tinciones de raíces de 5 días con fucsina básica. La correcta formación del protoxilema y metaxilema en las raíces depende del movimiento de los miR165/166. Estos miARNs se expresan específicamente en la endodermis y se mueven hacia la stela (centro de la raíz). En este movimiento los miR165/166 disminuyen los niveles de PHABULOSA (PHB), permitiendo la formación del protoxilema. La correcta expresión de PHB hacia el centro de la raíz, permite la formación del metaxilema. Defectos en el movimiento de los miR165/166 altera la estructura la vasculatura de la raíz, inhibiendo la formación del protoxilema o interrupciones de este (Miyashima et al., 2011). En concordancia con informes previos, la tinción de raíces con fucsina básica evidencia mal formaciones del protoxilema y metaxilema en plantas *hst-6* y *hst-15* ((Brioudes et al., 2021), Figura 22C). Ninguna de estas alteraciones se detectó en mutantes *hws* (Figura 22C). Sin embargo, encontramos que los defectos detectados en las raíces de mutantes *hst* se restauran en las doble mutantes *hws/hst* (Figura 22C). Además, observamos un defecto similar en la arquitectura de las raíces en plantas que sobreexpresan HWS, pero no así con la versión  $HWS\Delta FBox$  (Figura 22C) sugiriendo que aun cuando HWS no parece afectar la estabilidad de HST si lo hace con su función en el movimiento intercelular de miARNs. Para confirmar el accionar de HWS en la restauración del movimiento célula a célula de los miARNs, analizamos los niveles de miR160 en el vasculatura y epidermis de hojas separadas por meselcción (Svozil et al., 2016). La transcripción de *MIR160* está restringida a la vasculatura de hojas, sin embargo, el miR160 maduro se mueve desde este tejido hacia la epidermis de la hoja, lo que nos permite cuantificar el movimiento de este miARN separando la vasculatura de la epidermis. Para confirmar la pureza de la separación del tejido, medimos la expresión de *SUC2* y *ATML1* en los tejidos aislados, ya que estos genes se expresan exclusivamente en vasculatura y epidermis, respectivamente (Figura 22D). Como se observó en estudios previos, detectamos un movimiento deficiente de miR160 en las mutantes *hst-15* y *hst-6* ((Brioudes et al., 2021), Figura 22D). En concordancia con lo visto en raíces, este defecto se revierte completamente en las líneas *hst-15/hws-35* (Figura 22E). Adicionalmente, utilizamos plantas transgénicas pSUC2::amiRSUL. En este sistema, un miARN artificial móvil (amiRSUL), que silencia el ARNm de la subunidad de quelatasa de magnesio CHLORINA42 (SUL), se expresa específicamente en las células acompañantes

del floema (CC) usando el promotor SUC2. Usando esta construcción, el movimiento del miARN artificial se puede evaluar por el área de clorosis proximal a la vena causada por su movimiento desde las CC (de Felippes et al., 2011). Es sabido que mutaciones en HST causan una reducción en el movimiento de amiRSUL, evaluado tanto por el área reducida de clorosis como por los niveles más altos de ARNm de SUL ((Brioude et al., 2021), Figura 22F). Por el contrario, una mutación en HWS, que por sí sola no parece afectar el movimiento de amiRSUL, pero si es capaz de restaurar el movimiento de amiRSUL en los mutantes *hst-15* (Figura 22F), sugiriendo una vez más que la mutación en HWS puede restaurar el movimiento reducido de los miARNs no autónomos de los mutantes *hst*. Es posible que HWS logre revertir el movimiento deficiente de miARNs de mutantes de *hst* afectando el tráfico a través del poro nuclear, aunque es necesario profundizar este aspecto para confirmar esta tesis.



**Figura 22. Restauración del movimiento de miARNs no autónomos.** **A-** Intensidad de fluorescencia de HST-GFP en citoplasma en transformaciones transciente de *N. benthamiana*. Se muestran los resultados de transformaciones realizadas solo con HST-GFP o con las combinaciones HST-GFP/HWS y HST-GFP/HWSΔFBox. **B-**

Niveles de miARNs, medidos por RT-qPCR, en núcleo y citoplasma en distintos genotipos. Los valores fueron normalizados con los valores obtenidos para *ACTINA* y en el input. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no pareada y se indican para cada comparación. n = 3 muestras biológicamente independientes. **C-** Tinción con Fucsina básica de raíces de 5 días donde se observan el protoxilema (estructura de rayas horizontales ubicadas hacia el exterior en ambos lados) y metaxilema (estructura lisa ubicada hacia el interior, contenida entre el protoxilema).

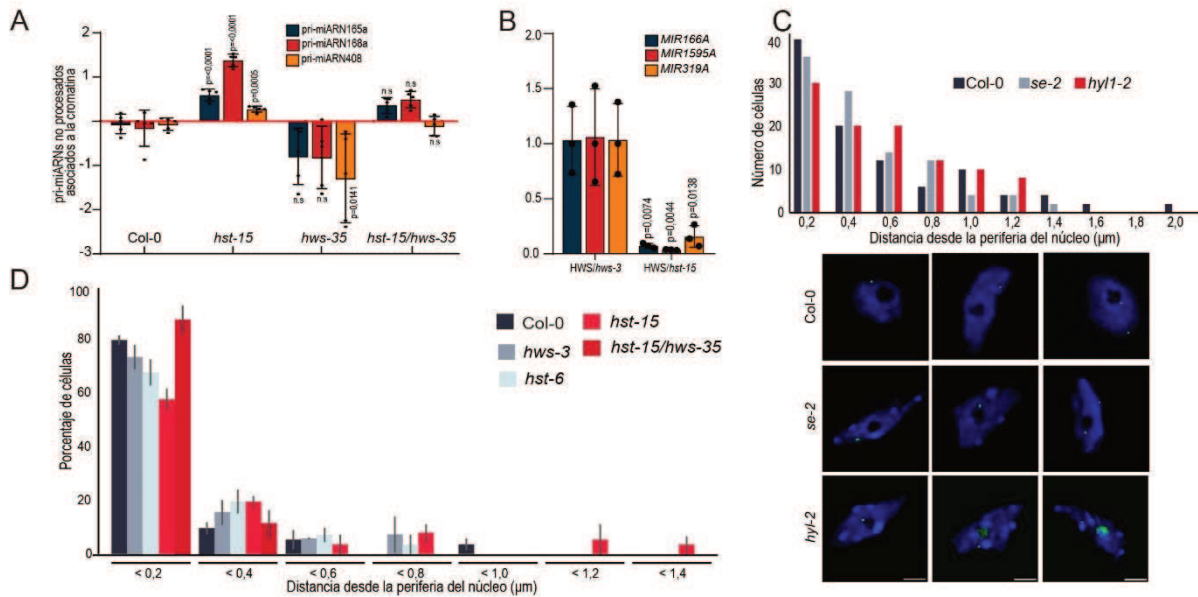
**D-** RT-qPCRs donde se evidencia la correcta separación de los tejidos de epidermis (*ATML1*) y vasculatura (*SUC2*). **E-** Relación epidermis/vasculatura de los niveles del miR160. **F-** Fenotipo de clorosis de diferentes genotipos transformados con la construcción pSUC2::amiRSUL.

### **2.6.7 La transcripción y procesamiento de pri-miARNs ocurriría asociada al poro nuclear.**

HST, además de su función putativa como exportina, participa en la biogénesis de miARNs actuando como una proteína de andamiaje al interactuar con el complejo MEDIATOR en loci *MIRNA* permitiendo al complejo transcripcional reclutar a DCL1 (Cambiagno et al., 2021). A su vez, como hemos demostrado en esta tesis, este accionar promueve el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs nacientes, un proceso que encontramos alterado en mutantes *hst-15*. Para evaluar la posibilidad de que HWS altere el procesamiento co-transcripcional cuantificamos los niveles de pri-miARNs nacientes no procesados asociados a loci *MIRNA* después de realizar una IP de la cromatina. Pudimos observar que la reducción del procesamiento co-transcripcional de las mutantes *hst-15*, fue en gran medida revertido en las plantas dobles *hst-15/hws-35* (Figura 23A). Curiosamente, en la mutantes *hws-35* observamos una tendencia a tener el efecto opuesto a *hst-15* sobre el procesamiento co-transcripcional, aumentándolo (Figura 23A), lo que sugiere que, aunque los niveles de miARNs no se ve afectado por HWS (Figura 19C), regula negativamente el procesamiento co-transcripcional de miARNs. El hecho que el procesamiento co-transcripcional de miARNs aumente en mutantes *hws*, junto a nuestra observación que los miARNs procesados de esta manera son los que tiene naturaleza móvil, van en concordancia con la restitución del movimiento de miARNs observado en las doble mutantes *hst-15/hws-35*. Por otro lado, el efecto de HWS sobre el procesamiento co-transcripcional nos lleva a preguntar si esta proteína también se encuentra unida a los loci *MIRNA* y si esto depende de la presencia de HST. Para estudiar esto realizamos una inmunoprecipitación de la cromatina utilizando HWS-GFP en mutantes *hws-3* y *hst-15* y cuantificamos loci *MIRNA* unidos a esta. Pudimos observar que HWS solo se encuentra asociada a estos genes en presencia de HST, siendo ésta una conexión clave para su función (Figura 23B).

Aun cuando toda la evidencia es armoniosa asociando el procesamiento co-transcripcional con el movimiento de miARNs entre células, no es claro cómo esto podría suceder, y cuál es el rol de HST en el proceso. La interacción de HWS con HST y el poro nuclear abre la posibilidad de que la transcripción y el procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs ocurra en las cercanías al poro nuclear, y que esto promueva la salida de miARNs libres al citoplasma y su función no autónoma. Es sabido que proteínas presentes en el poro nuclear, principalmente aquellas del *basket*, regulan la conformación de la cromatina en las cercanías a este y generan una zona transcripcionalmente activa (Raices & D'Angelo, 2012;

Tamura, 2020). Por lo tanto, fue motivador investigar si la transcripción de los miARNs tiene lugar asociada a la envoltura nuclear, y si este mecanismo depende de HST. En colaboración con el Dr. Tomasz Gulanicz del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Adam Mickiewicz en Polonia, se realizaron experimentos de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para visualizar pri-miARNs dentro del núcleo usando microscopía confocal. Para estos experimentos, seleccionamos pri-miARN163 y pri-miARN156a ya que ambos contienen intrones y esto nos permite diferenciar pri-miARNs nacientes de las moléculas maduras. El sitio de transcripción activa de pri-miARNs puede detectarse como puntos nucleares discretos (uno o dos por célula) y luego medimos la distancia de estos puntos a la periferia nuclear como se describió previamente (Huang et al., 2023). Apoyando la idea de la transcripción y potencial procesamiento de pri-miARNs en asociación al poro nuclear, pudimos observar que la mayoría de los pri-miARNs detectados están ubicados en la cercanía de la envoltura nuclear en plantas salvajes mientras se observan desplazados hacia el nucleoplasma en mutantes de biogénesis de miARNs, especialmente mutantes *hyl1-2* (Figura 23C). Curiosamente, en aquellas plantas salvajes donde se observan dos puntos de transcripción de pri-miARNs solo uno aparece comúnmente en la periferia nuclear, mientras que el otro presenta una ubicación interna. Cuando repetimos los experimentos en mutantes de *HST* y *HWS*, observamos un aumento en la distancia del pri-miARN a la envoltura nuclear en mutantes *hst*, efecto no observado en mutantes *hws* (Figura 23D). En coincidencia con la supresión del fenotipo *hst-15* por *hws-35*, la distribución periférica de pri-miARNs se restaura en mutantes *hst-15/hws35* (Figura 23D). Estos datos sugieren que probablemente algunos pri-miARNs podrían transcribirse y procesarse, unidos al poro nuclear y que HWS y HST tendrían una función clave en este proceso. En este sentido podríamos especular que la asociación de HST con los loci de miARN y la naturaleza de exportina de esta proteína podría posicionar a los loci *MIRNA* adyacentes al poro nuclear permitiendo así un eficiente acoplamiento entre transcripción, procesamiento co-transcripcional y exportación de los miARNs maduros. Dado que HWS parece interactuar con el poro y con casi todas las exportinas, y parece ejercer un efecto negativo sobre HST en relación al movimiento de miARNs, es de esperar que en ausencia de ambas proteínas alguna otra exportina supla la falta de HST en ausencia del regulador negativo del proceso.



**Figura 23. Los genes *MIRNA* son transcritos y potencialmente procesados en las cercanías del poro nuclear en un mecanismo regulado por HST y HWS.** **A-** Cuantificación de pri-miARNs no procesados unidos a la cromatina en diferentes genotipos. La doble mutante *hst-15/hws-35* restaura los niveles de pri-miARNs procesados de la mutante *hst-15* a valores comparados con Col-0. **B-** ChIP-qPCR de HWS-GFP realizado en plantas *hws-3* y *hst-15* transformadas establemente con la construcción 35S:HWS:mCitrina. HWS puede interactuar con los loci *MIRNA* en forma dependiente de HST. Los valores de qPCRs representados corresponden a un n=3 de muestras biológicamente independientes se expresan en relación con las plantas Col-0. Los datos se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar. Los valores P se calcularon con una prueba t. **C-** Cuantificación por FISH y microscopía confocal de la distancia de locus *MIRNA* activos transcripcionalmente a la envoltura nuclear en plantas Col-0, *se-3* y *hyl-2* y imágenes representativas de los resultados obtenidos en la cuantificación. **D-** Cuantificación de la distancia entre locus activos transcripcionalmente y la envoltura nuclear en plantas Col-0 y mutantes *hws-3*, *hst-6* y *hst-15*, así como en la doble mutante *hst-15/hws-35*.

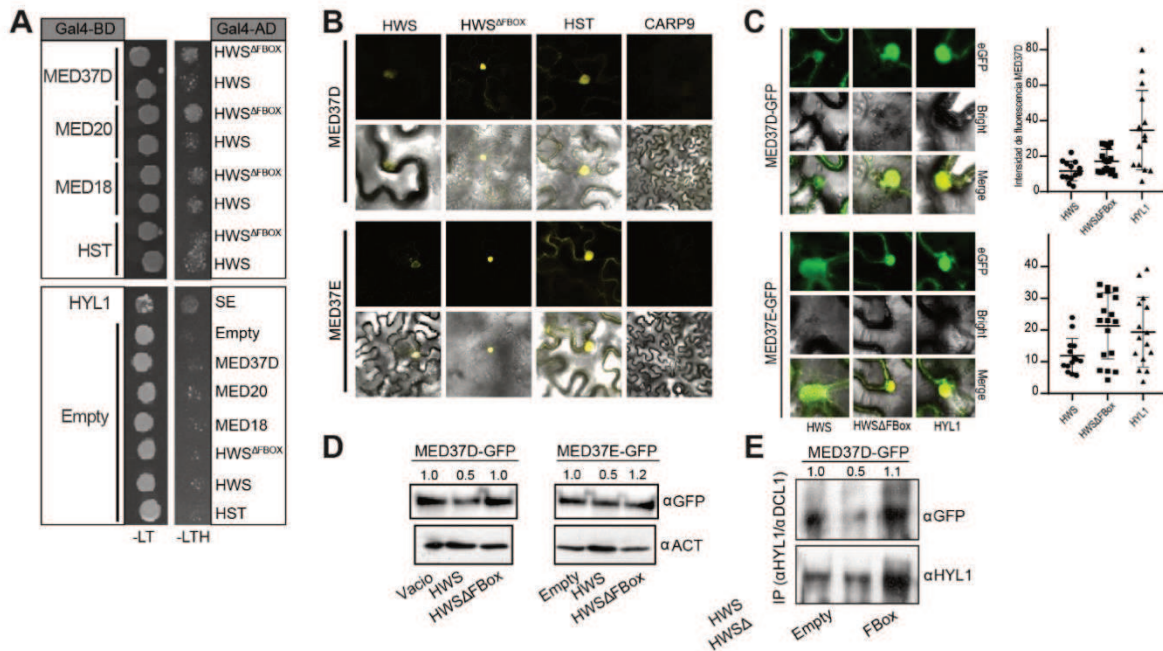
### 6.2.8 HWS degradaría MED37 afectando de esta manera el procesamiento co-transcripcional y la asociación de HST con los loci de *MIRNA*.

Los experimentos de espectrometría de masas de HWS, mostraron la interacción de esta proteína con nueve proteínas del complejo MEDIATOR, interacciones que fueron particularmente fuertes con MED37, la misma subunidad que previamente se ha encontrado que interactúa con HST (Cambiagno et al., 2021). Confirmamos la interacción de HWS con diferentes proteínas MED mediante Y2H y BiFC (Figuras 24A y 24B). Curiosamente, la señal de interacción, en ambos experimentos, fue particularmente fuerte cuando usamos la versión de HWS sin su dominio F-Box (Figuras 24A y 24B), pudiendo deberse a que la pérdida del dominio F-Box permite una interacción más estable entre HWS y las proteínas

MED. Esta observación nos llevó a plantearnos la posibilidad de que HWS induzca la degradación de MED37, reduciendo así su capacidad de interacción con HST y que por tal motivo en las mutantes *hws-35* observamos un aumento del procesamiento co-transcripcional (Figura 23A). Para estudiar esta hipótesis, se cuantificó la intensidad de fluorescencia cuando sobreexpresamos de forma transciente HWS o HWS $\Delta$ FBox con MED37D-GFP y MED37E-GFP. El experimento indicó una disminución en la intensidad de la fluorescencia para ambas proteínas, mientras que cuando co-expresamos MED37D-GFP y MED37E-GFP con HYL1, utilizada como control negativo, arrojó intensidades de fluorescencia similares a las obtenidas al infiltrar estas con la HWS $\Delta$ FBox (Figura 24C). Para corroborar la degradación de MED37D y MED37E, se cuantificó sus niveles proteicos mediante *Western Blot* (Figura 24D). En ambos casos se detectó una disminución de los niveles proteicos, pero esta reducción fue aún más evidente cuando cuantificamos los niveles de MED37 asociado a los loci *MIRNA*, detectándose mediante *Western Blot* después de una inmunoprecipitación de la cromatina realizada con anticuerpos contra DCL1 y HYL1 (Figura 24E).

El análisis más parsimonioso del conjunto de nuestros resultados, sugieren que HWS al degradar MED37 afecta la interacción de HST con los loci *MIRNA* y esto finalmente perturbaría el procesamiento co-transcripcional de los pri-miARNs y su asociación con el poro nuclear. A su vez, como los miARNs no autónomos se procesarían preferentemente de forma co-transcripcional, HWS terminaría afectando su biogénesis y función. Todo esto nos lleva a imaginar un mecanismo de alta eficiencia donde HST es capaz de posicionar a los loci *MIRNA* junto al poro nuclear a la vez que recluta a DCL1 para iniciar el procesamiento co-transcripcional de miARNs. Esto permitiría un transporte rápido de los miARNs generados de esta manera fuera del núcleo antes de que puedan asociarse a AGO1, confiriéndoles una naturaleza móvil. En contraparte, HWS parece actuar de forma negativa al degradar MED37 previniendo la asociación de HST a los loci de miARNs, favoreciendo en el proceso el procesamiento post-transcripcional de miARNs en el nucleoplasma, lo que podría generar una mayor ventana temporal para la asociación de miARNs con AGO1 dentro del núcleo, sentenciando su destino como miARNs no móviles.





**Figura 24. HWS degradaría a MED37 afectando de esta forma el accionar de HST.** **A-** Doble híbrido de HWS y HWS $\Delta$ FBox con diferentes subunidades del complejo MEDIATOR y HST. Como control positivo se utilizó la interacción descrita entre SE y HYL1. Como control negativo se utilizó la construcción utilizada con la subunidad GAL4-AD y la subunidad GAL4-BD vacía. **B-** BiFC de HWS y HWS $\Delta$ FBox con MED37D y MED37E. Como control positivo de interacción se utilizó HST y como control negativo CARP9. **C-** Cuantificación de la intensidad de MED37D-GFP y MED37E-GFP en presencia de HWS o HWS $\Delta$ FBox para analizar su degradación. Como control negativo se utilizó MED37D-GFP y MED37E-GFP en presencia de HYL1. Las imágenes representativas de las situaciones se acompañan con gráficos de distribución de puntos que muestran las cuantificaciones realizadas. **D-** Cuantificación de los niveles proteicos de MED37D y MED37E en plantas transformadas de forma estable con la construcción 35S:HWS o 35S:HWS $\Delta$ FBox. ACTINA fue utilizada para relativizar los valores. **E-** Cuantificación de los niveles proteicos de MED37D y MED37E en plantas transformadas de forma estable con la construcción 35S:HWS o 35S:HWS $\Delta$ FBox luego de realizada una inmunoprecipitación de HYL1 y DCL1.

## 7 CONCLUSIONES

Durante muchos años, la biogénesis de miARNs en plantas estuvo influenciada por paralelismo e inferencias heredadas de la vía en animales. Hasta hace poco se asumió, por ejemplo, que el procesamiento de los pri-miARNs ocurría desde la base del tallo hacia el bucle como ocurre en animales. Sin embargo, ahora sabemos que en las plantas, el procesamiento de muchos pri-miARNs comienza cerca del bucle y luego se desplaza hacia la base del tallo (Bologna et al., 2009; Zhu et al., 2013). Además, el procesamiento de pri-miARNs en plantas incluye un nivel adicional de complejidad dado que para la liberación de muchos miARNs maduro se requieren más de dos cortes sobre el tallo (procesamiento secuencial) (Moro et al., 2018). Una de las asunciones más llamativas, basadas en este paralelismo, fue la atribución a HST, debido a su homología con EXP5 de animales, la función del transporte los miARNs desde el núcleo al citoplasma, aun cuando la evidencia ponía en dudas este accionar (Bollman et al., 2003; Park et al., 2005; Telfer & Scott, 1998). En los últimos años no solo se demostró que HST es prescindible para el movimiento núcleo/citoplasma de miARNs si no también AGO1 es capaz de cargar miARNs maduros en el núcleo y salir del mismo ya formando el RISC (Bologna et al., 2018). Diferente de la función de su homólogo en animales, investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han determinado que HST actúa en etapas mucho más tempranas de la biogénesis de miARNs, siendo necesaria para atraer a DCL1 a los loci *MIRNA*, actuando como mediador entre esta y el complejo MEDIATOR (Cambiagno et al., 2021). Más recientemente, se ha demostrado que HST está involucrada en el movimiento de miARNs a través de las plantas, ya sea hacia células cercanas o a órganos distantes (Brioudes et al., 2021).

Continuando con la ruptura del paralelismo planteado, en esta tesis hemos demostrado que el procesamiento de los pri-miARNs es un proceso mucho más dinámico de lo que se pensaba hasta el momento. Pudimos determinar que los pri-miARNs nacientes pueden procesarse aún asociados a la Pol II, mecanismo denominado procesamiento co-transcripcional. Dependiendo del tipo de procesamiento de cada pri-miARN, estos pueden procesarse en su totalidad de forma co-transcripcional, como en los casos del procesamiento LTB y LTBs, en los cuales DCL1 realiza todos los cortes asociada a la cromatina, o bien, los pri-miARNs pueden comenzar su procesamiento de forma co-transcripcional y culminar con la liberación del miARN maduro en el nucleoplasma en un paso desacoplado de la transcripción, de forma post-transcripcional, como los casos del procesamiento BTL y BTLs. Además, algo interesante que pudimos evidenciar es que diferentes moléculas del mismo pri-miARNs se procesan en un balance entre el

procesamiento co- y post-transcripcional. A su vez, este balance entre ambos procesamientos puede variar en diferentes etapas del desarrollo de la planta o ante diferentes condiciones de crecimiento. La coexistencia de estas dos formas de procesamiento abre algunas preguntas sumamente intrigantes: ¿Por qué existe la necesidad de procesar los miARN de dos formas alternativas? ¿Tienen los productos de cada mecanismo funciones distintas? Considerando que el producto final de ambas vías, los miARNs maduros, son idénticos independientemente de cómo se produzcan estas son preguntas complejas y que van a necesitar años de estudios para ser respondidas.

Durante el estudio del procesamiento co-transcripcional pudimos determinar que este mecanismo es estimulado por la presencia de R-loops en la zona del TSS. Los R-loops formados en esta zona, según nuestros análisis, serían generados por la invasión de un ARN antisentido a la transcripción y no por el propio ARN naciente del miARN. La causa exacta de por qué la presencia del R-loop predispone al procesamiento co-transcripcional no es clara, pero puede deberse a que esta estructura genera una zona más abierta y relajada de la cromatina, permitiendo el reclutamiento de ciertas proteínas o complejos, que de forma contraria no podrían acceder. Además, pudimos observar que los miARNs que son procesados preferentemente de forma co-transcripcional, son aquellos miARNs con capacidad de cumplir funciones no autónomas en la planta. Esto nos recuerda las preguntas formuladas anteriormente, es posible que miARNs procesados de forma co-transcripcional, mecanismo que involucra el accionar de HST, tiendan a poseer capacidad de movimiento y funciones no autónomas, acciones que previamente han sido relacionadas a HST (Brioude et al., 2021), en comparación con aquellos que son procesados mayormente de forma post-transcripcional. Aunque la relación entre procesamiento co-transcripcional, miARNs con funciones no autónomas y HST es fuerte, demostrar la fiabilidad de esto y determinar el mecanismo exacto del mecanismo es una ardua tarea que queda por delante.

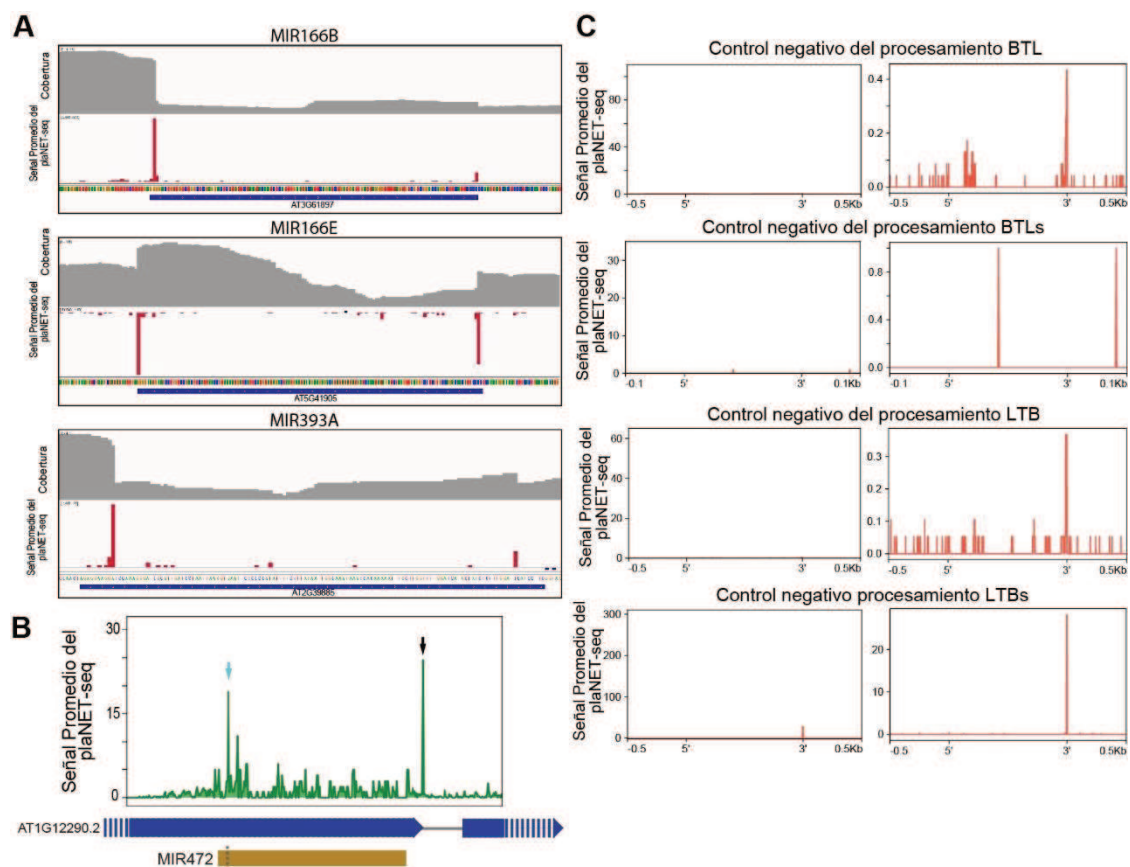
Otro objetivo de esta tesis fue profundizar el estudio de la dinámica entre la transcripción y procesamiento de pri-miARNs. Para tal objetivo buscamos analizar los distintos patrones de unión de proteínas del procesamiento de pri-miARNs en diferentes etapas de la transcripción. Nos hemos centrado en la transcripción del miR399, el cual responde a los niveles de fosfato en el medio de crecimiento, siendo transcripcionalmente activo ante déficit de fosfato y apagando rápidamente su transcripción ante valores normales de este (Chiou et al., 2006; Prathap et al., 2022). Hemos desarrollado un método de crecimiento de plántulas en medio líquido, el cual nos permite cambiar el medio de cultivo de forma rápida

y eficiente, para determinar los puntos en los cuales la transcripción del *MIR399* se activada y apagada. Después de identificados estos puntos de importancia, hemos realizado CUT&RUN de HYL1 y HST en diferentes estadios nutricionales, cuyos resultados aún se encuentran bajo análisis, pero esperamos obtener información que nos aliente a continuar este estudio.

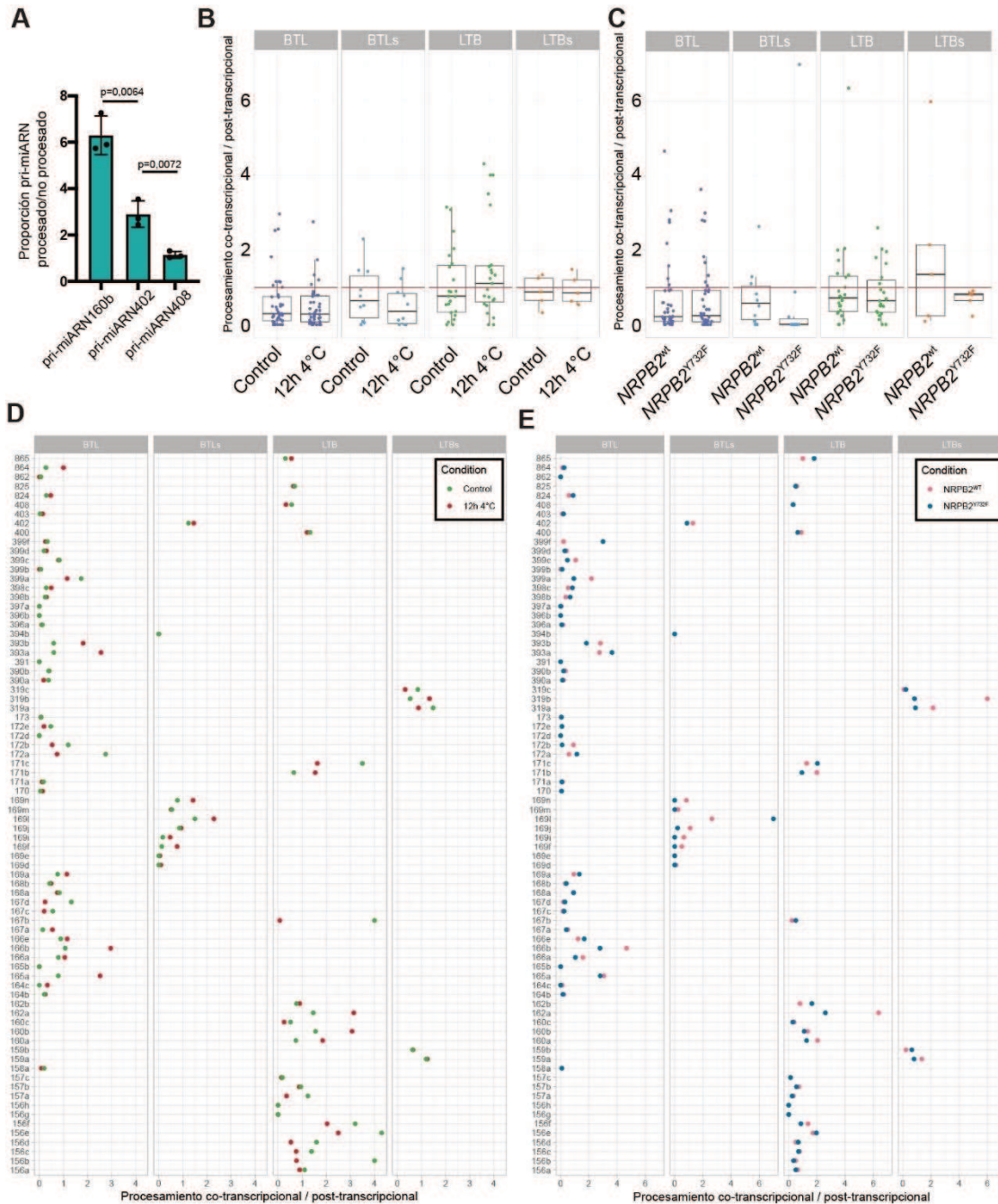
Ya en una segunda etapa de esta tesis, nos centramos en evaluar posibles mecanismos regulatorios del procesamiento co-transcripcional. El candidato más interesante por analizar, debido a su acción de reclutar a DCL1 a los loci *MIRNA*, era la proteína HST (Cambiagno et al., 2021). Pudimos determinar que en mutantes *hst-15* el procesamiento co-transcripcional era menor en comparación con plantas Col-0, pero, llamativamente, en estas plantas el procesamiento post-transcripcional se veía aumentado, generando niveles de miARNs maduros relativamente similares a las plantas Col-0. Además, pudimos observar que aquellos miARNs con funciones no autónomas, que se procesan mayormente de forma co-transcripcional, son los menos se cargados en AGO1, lo que se condice con una investigación reciente en la cual se afirma que los miARNs cargados en AGO1 ya no pueden salir de su célula de origen (Brioudes et al., 2021). Esto nos lleva a pensar que el rol de HST y AGO1 difieren en gran medida, siendo HST necesaria para la biogénesis de miARNs móviles y AGO1 se relacionaría en mayor medida con miARNs autónomos. En búsqueda de comprender aún más el rol de HST en el procesamiento co-transcripcional, hallamos a HWS como un regulador de este proceso, manteniendo los niveles adecuados de MED37 a través de su degradación vía proteosoma. A su vez, HST por su naturaleza de carioferina posicionaría los loci *MIRNA* en las cercanías del poro nuclear, lo cual podría ser dependiente de su interacción con HWS, promoviendo la transcripción y procesamiento de los miARNs en esta ubicación y afectando por algún mecanismo poco clarificado la función de aquellos miARNs no autónomos.

Durante el desarrollo de toda esta tesis fuimos capaces de romper varios dogmas de la biogénesis de miARNs en plantas. Además, pudimos hallar nuevos conceptos que ayudarán a comprender mejor la biogénesis de miARNs móviles.

## 8 SUPLEMENTARIA



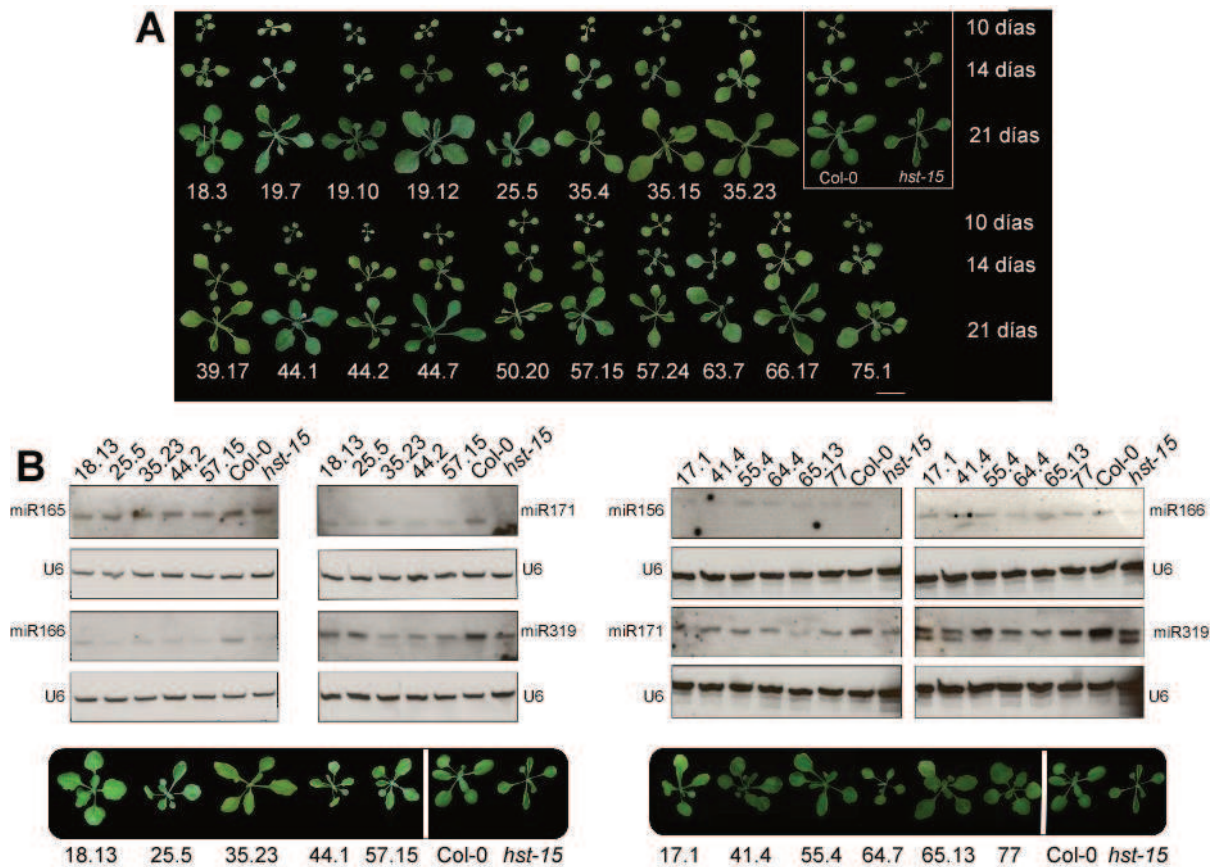
**Figura S1.** **A-** Cobertura de las lecturas obtenidas por plaNET-seq para *MIR166B*, *MIR166E* y *MIR393A*. **B-** La posición de *MIR472* dentro de AT1G12290 está marcada en amarillo con el sitio de clivaje de DCL1 señalado con una línea discontinua. Los exones de AT1G12290.2 están marcados con cajas azules. En el perfil de plaNET-seq se señala con una flecha el pico que coincide con el sitio donante del exón. **C-** Análisis metagenómico de intermediarios de procesamiento co-transcripcional de pri-miARNs nacientes BTL, BTLs LTB y LTBs en muestras control negativo de FLAG-IP. Los paneles a la izquierda muestran una escala idéntica a la utilizada en la Figura 1 y 2, mientras que los paneles a la derecha se muestra un acercamiento.



**Figura S2. A-** Niveles de intermediarios de procesamiento de pri-miARNs asociados a la cromatina en relación con los pri-miARNs no procesados, medidos por RT-qPCR en muestras de RIP de H3. Los datos se presentan como los valores medios +/- la desviación estándar. Dado que los cebadores utilizados para detectar los subproductos de procesamiento también amplificaron los pri-miRNAs no procesados, un valor de ~1 en este experimento representa un pobre procesamiento co-transcripcional. Los valores P se calcularon con una prueba t de dos colas no pareada con corrección de Welch. n = 3 muestras biológicamente independientes. **B y C-** Representaciones de cajas de las proporciones de procesamiento co-transcripcional en plántulas crecidas a 4 °C durante 12 hs o mantenidas en condiciones de control (B) o plantas mutantes *nrbp2* que expresan una versión WT de las proteínas o una mutación puntual (Y732F) que confiere una mayor procesividad a la Pol II (C).



La línea roja marca la proporción = 1 donde el procesamiento co- y post-transcripcional son igualmente frecuentes.  $n = 2$  muestras biológicamente independientes. Los puntos representan pri-miARNs individuales, las barras indican los valores mínimos/máximos (no más allá de  $1.5 \times$  IQR desde la bisagra), el centro representa la mediana y los límites de la caja representan los cuartiles inferior y superior. **D y E**- Proporciones de procesamiento co-transcripcional correspondientes a todos los miARNs analizados en experimentos de plaNET-seq realizados en las mismas muestras utilizados en los gráficos B y C.



**Figura S3. Líneas obtenidas en el *suppressor-screening*.** **A-** Fenotipo de diferentes líneas dobles mutantes, *hst-15* y *Col-0*. **B-** Niveles de miARNs en líneas dobles mutantes, *hst-15* y *Col-0* en plantas de 15 días de edad.

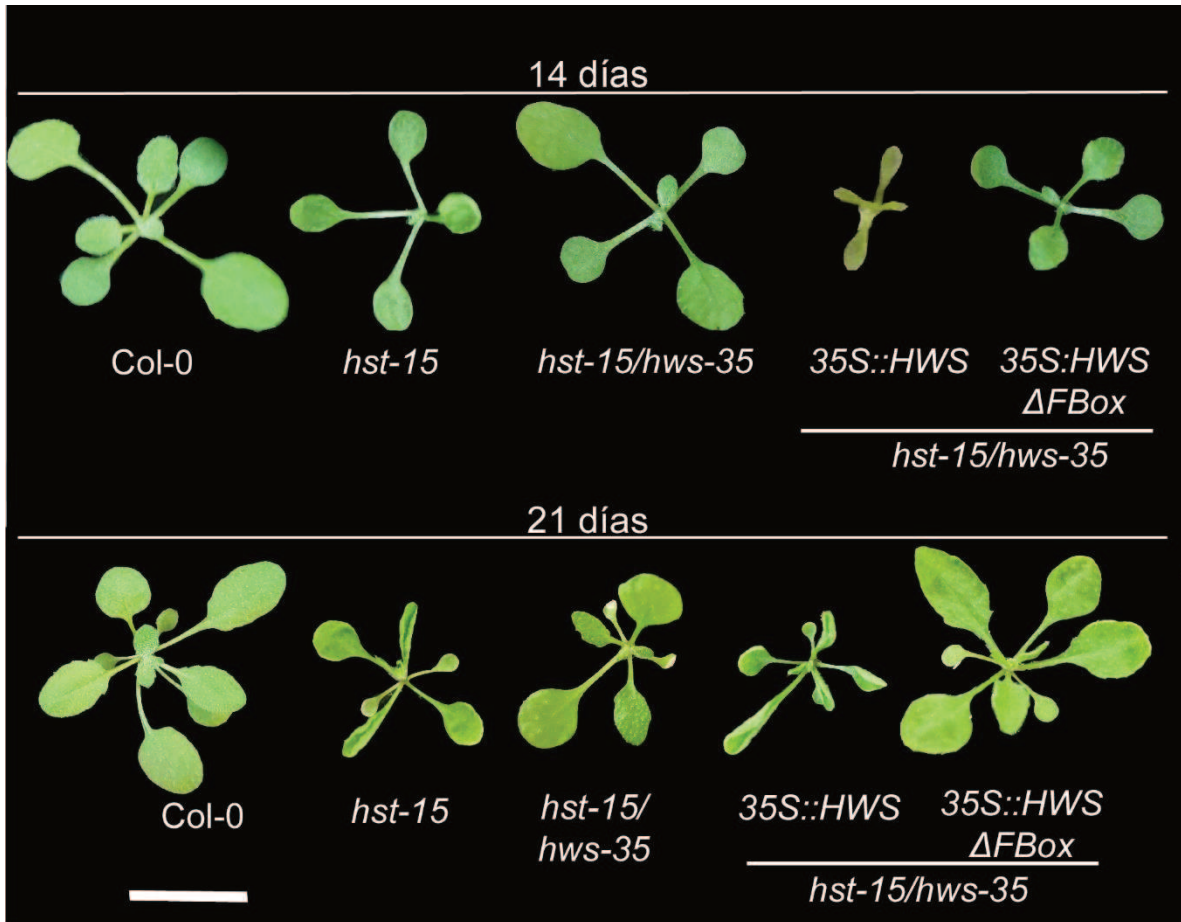


Figura S4. Complementación de la doble mutante *hst-15/hws-35* con diferentes construcciones de HWS.

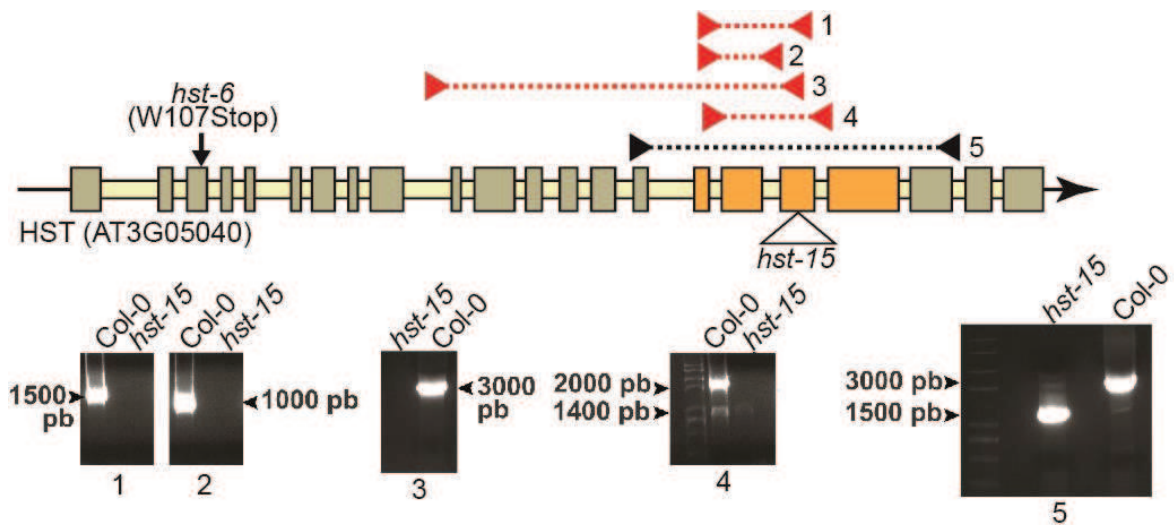
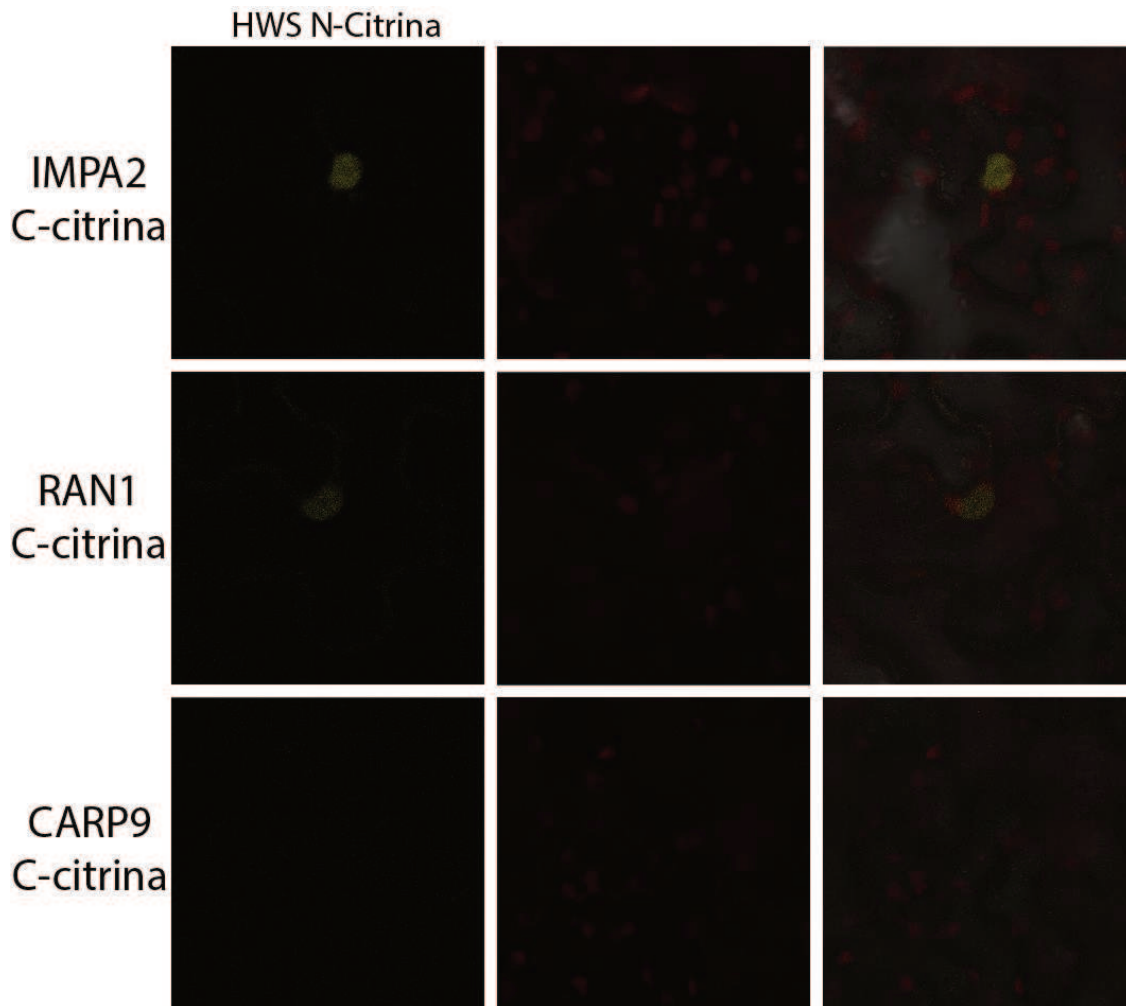


Figura S5. *hst-15* es un alelo hipomórfico PCR. Esquema del gen HST. Los rectángulos representan los exones, mientras que la línea gruesa hace referencia a los intrones. Los rectángulos



amarillos representan los exones deletados durante la pérdida del T-DNA. El triángulo marca la posición donde se encontraba dicho T-DNA en el alelo *hst-15*; con una flecha negra se marca el alelo *hst-6*. Los triángulos rojos unidos por la línea de puntos representan el fragmento no amplificado en *hst-15*; los triángulos negros unidos por línea de puntos representa el único producto de amplificación en dicho alelo.



**Figura S6. Interacción de HWS con IMPA2 y RAN1, proteínas involucradas en la traslocación de HST entre núcleo y citoplasma.** BiFC realizado en hojas de *N. benthamiana* por la expresión transciente de HWS-N-Citrina y IMPA2-C-Citrina o RAN1-C-Citrina. Como control negativo de interacción se utilizó la co-expresioón con CARP9-C-Citrina.

**Tabla S1. ID de interactores comunes entre HST y HWS.** Resaltado en rojo y con su respectivos nombres se encuentran proteínas ya antes relacionadas a HST.

AT1G04820	AT4G26530	ATCG00540	AT1G78300	AT5G60790	AT1G78300
AT1G50010	AT3G09440	ATCG00020	AT1G33680	AT5G47010	AT1G33680
AT5G19770	AT2G44060	ATMG01190	AT3G11130	AT5G66420	AT3G11130
AT5G19780	AT4G01850	ATMG00510	AT4G34450	AT5G61780	AT4G34450
AT1G52360	<b>AT5G02490 (MED37D)</b>	AT5G28840	AT3G15730	AT5G28840	AT3G15730
AT3G55410	AT1G02500	AT5G46800	AT4G11150	AT5G46800	AT4G11150
AT3G07770	AT5G44340	AT5G05010	AT1G72150	AT5G05010	AT1G72150
AT4G09000	AT1G20010	AT3G53110	AT2G13360	AT3G53110	AT2G13360
<b>AT4G16143 (IMPA-2)</b>	AT5G12250	AT1G10510	AT5G62690	AT1G10510	AT5G62690
AT4G24190	AT2G29550	AT1G62020	AT5G62700	AT1G62020	AT5G62700
AT4G20850	AT5G23860	AT3G19760	AT4G36250	AT3G19760	AT4G36250
ATCG00490	AT4G20890	AT3G03960	AT4G37910	AT3G03960	AT4G37910
AT2G23350	AT4G34110	ATMG00070	AT4G08520	ATMG00070	AT4G08520
AT2G41680	AT5G22060	AT3G02520	AT5G65840	AT3G02520	AT5G65840
AT4G16130	AT1G47128	AT1G20110	AT3G58510	AT1G20110	AT3G58510
AT1G78900	AT3G44320	AT1G51100	AT1G02150	AT1G51100	AT1G02150
AT5G17920	AT5G19550	AT1G29670	AT3G13930	AT1G29670	AT3G13930
AT5G67360	AT5G09810	AT5G43830	AT1G16720	AT5G43830	AT1G16720
AT4G35250	AT3G09840	AT5G49360	AT1G12000	AT5G49360	AT1G12000
AT5G66420	AT3G23700	AT3G62120	AT3G02530	AT5G60790	AT1G09850
AT5G61780	AT1G06410	AT3G58570	AT1G80480	AT5G47010	AT5G09660
AT5G14040	AT1G29250	AT1G22410	AT3G05530	AT1G03880	AT1G76030
AT1G49760	AT3G12800	AT1G53750	AT5G58290	AT1G03890	AT3G12580
AT5G09590	AT3G17390	AT4G31480	AT1G76160	AT1G54520	AT1G60550
AT3G52930	AT1G52730	AT4G37930	AT2G20580	AT1G79720	AT1G52570
AT3G29360	AT3G42050	AT1G53240	AT2G36880	AT5G43060	AT5G38660
AT3G29320	AT4G04910	AT4G02930	AT2G21390	AT5G11720	AT5G08690
AT1G62660	AT1G22530	<b>AT5G55190 (RAN1)</b>	AT1G10200	AT2G21960	AT4G29040

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., & Manavella, P. A. (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*, *21*(12), 1034–1044. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>
- Addo-Quaye, C., Snyder, J. A., Park, Y. B., Li, Y. F., Sunkar, R., & Axtell, M. J. (2009). Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *RNA*, *15*(12), 2112–2121. <https://doi.org/10.1261/rna.1774909>
- Ariel, F., Lucero, L., Christ, A., Mammarella, M. F., Jegu, T., Veluchamy, A., Mariappan, K., Latrasse, D., Blein, T., Liu, C., Benhamed, M., & Crespi, M. (2020). R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA. *Molecular Cell*, *77*(5), 1055-1065.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.015>
- Arora, R., & Azzalin, C. M. (2015). Telomere elongation chooses TERRA ALTERNatives. *RNA Biology*, *12*(9), 938–941. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1065374>
- Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(January), 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- Bäckström, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G., & Björklund, S. (2007). Purification of a Plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* Identifies PFT1 as the Med25 Subunit. *Molecular Cell*, *26*(5), 717–729. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.007>
- Baek, D., Kim, M. C., Chun, H. J., Kang, S., Park, H. C., Shin, G., Park, J., Shen, M., Hong, H., Kim, W. Y., Kim, D. H., Lee, S. Y., Bressan, R. A., Bohnert, H. J., & Yun, D. J. (2013). Regulation of miR399f transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *161*(1), 362–373. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205922>
- Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klermund, J., Luke-Glaser, S., Bender, K., & Luke, B. (2013). Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(10), 1199–1206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2662>
- Baranauske, S., Mickute, M., Plotnikova, A., Finke, A., Venclovas, Č., Klimašauskas, S., & Vilkaitis, G. (2015). Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase:

- HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2802–2812. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv102>
- Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M., & Scheible, W.-R. (2006). PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *Plant Physiology*, 141(1), 988–999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707.988>
- Bhat, S. S., Bielewicz, D., Gulanicz, T., Bodi, Z., Yu, X., Anderson, S. J., Szewc, L., Bajczyk, M., Dolata, J., Grzelak, N., Smolinski, D. J., Gregory, B. D., Fray, R. G., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2020). mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m6A on pri-miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 117(35), 21785–21795. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003733117>
- Bielewicz, D., Dolata, J., Bajczyk, M., Szewc, L., Gulanicz, T., Bhat, S. S., Karlik, A., Jozwiak, M., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2023). Hyponastic Leaves 1 Interacts with RNA Pol II to Ensure Proper Transcription of MicroRNA Genes. *Plant and Cell Physiology*, 64(6), 571–582. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad032>
- Bielewicz, D., Kalak, M., Kalyna, M., Windels, D., Barta, A., Vazquez, F., Szweykowska-Kulinska, Z., & Jarmolowski, A. (2013). Introns of plant pri-miRNAs enhance miRNA biogenesis. *EMBO Reports*, 14(7), 622–628. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.62>
- Bin Yu, Zhiyong Yang, Li, J., Svetlana Minakhina, Maocheng Yang, Richard W. Padgett, Ruth Steward, & Chen, X. (2005). Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis Bin. *Science*, 307(30), 932–935. <https://doi.org/10.1126/science.1107130.Methylation>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bollman, K. M., Aukerman, M. J., Park, M. Y., Hunter, C., Berardini, T. Z., & Scott Poethig, R. (2003). HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, 130(8), 1493–1504. <https://doi.org/10.1242/DEV.00362>
- Bologna, Nicolas G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., & Voinnet, O. (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of

- ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709–719.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.007>
- Bologna, Nicolás G., Mateos, J. L., Bresso, E. G., & Palatnik, J. F. (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO Journal*, 28(23), 3646–3656. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.292>
- Bologna, Nicolás G., & Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, 65(February), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>
- Boque-Sastre, R., Soler, M., Oliveira-Mateos, C., Portela, A., Moutinho, C., Sayols, S., Villanueva, A., Esteller, M., & Guil, S. (2015). Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5785–5790. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421197112>
- Braberg, H., Jin, H., Moehle, E. A., Chan, Y. A., Wang, S., Shales, M., Benschop, J. J., Morris, J. H., Qiu, C., Hu, F., Tang, L. K., Fraser, J. S., Holstege, F. C. P., Hieter, P., Guthrie, C., Kaplan, C. D., & Krogan, N. J. (2013). From structure to systems: High-resolution, quantitative genetic analysis of RNA polymerase II. *Cell*, 154(4), 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.033>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Crop Journal*, 5(5), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brioudes, F., Jay, F., Sarazin, A., Grentzinger, T., Devers, E. A., & Voinnet, O. (2021). HASTY, the Arabidopsis EXPORTIN5 ortholog, regulates cell-to-cell and vascular microRNA movement. *The EMBO Journal*, e107455(1), 1–22. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020107455>
- Cai, Q., Liang, C., Wang, S., Hou, Y., Gao, L., Liu, L., He, W., Ma, W., Mo, B., & Chen, X. (2018). The disease resistance protein SNC1 represses the biogenesis of microRNAs and phased siRNAs. *Nature Communications*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07516-z>
- Cambiagno, D. A., Giudicatti, A. J., Arce, A. L., Gagliardi, D., Li, L., Yuan, W., Lundberg, D. S., Weigel, D., & Manavella, P. A. (2021). HASTY modulates miRNA biogenesis by

- linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular Plant*, 14(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.019>
- Canto, T., Uhrig, J. F., Swanson, M., Wright, K. M., & MacFarlane, S. A. (2006). Translocation of Tomato Bushy Stunt Virus P19 Protein into the Nucleus by ALY Proteins Compromises Its Silencing Suppressor Activity. *Journal of Virology*, 80(18), 9064–9072. <https://doi.org/10.1128/jvi.00953-06>
- Castellano-Pozo, M., Santos-Pereira, J., Rondón, A. G., Barroso, S., Andújar, E., Pérez-Alegre, M., García-Muse, T., & Aguilera, A. (2013). R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation. *Molecular Cell*, 52(4), 583–590.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.006>
- Cerritelli, S. M., Sakhuja, K., & Crouch, R. J. (2022). RNase H1, the Gold Standard for R-Loop Detection. *Methods Mol Biol*, 2528(7), 91–114.
- Chaabane, S. B., Liu, R., Chinnusamy, V., Kwon, Y., Park, J., Kim, S. Y., Zhu, J.-K., Yang, S. W., & Lee, B. (2013). STA1, an Arabidopsis pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 41(3), 1984–1997. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1309>
- Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, 8(11), 884–896.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2179>
- Chédin, F. (2016). Nascent connections: R-loops and chromatin patterning. *Trends in Genetics*, 32(12), 828–838. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.10.002>. Nascent
- Chen, C., Wu, Y., Li, J., Wang, X., Zeng, Z., Xu, J., Liu, Y., Feng, J., Chen, H., He, Y., & Xia, R. (2023). TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 16(11), 1733–1742.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.09.010>
- Chen, Y. H., Shen, H. L., Chou, S. J., Sato, Y., & Cheng, W. H. (2022). Interference of Arabidopsis N-Acetylglucosamine-1-P Uridyltransferase Expression Impairs Protein N-Glycosylation and Induces ABA-Mediated Salt Sensitivity During Seed Germination and Early Seedling Development. *Frontiers in Plant Science*, 13(903272).  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.903272>

- Chiou, T.-J., Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Chiang, S.-F., & Su, C.-L. (2006). Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *18*(1), 412–421. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038943>
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T. S., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. P. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes and Development*, *23*(5), 549–554. <https://doi.org/10.1101/gad.1770009>
- Choi, K., Kim, J., Müller, S. Y., Oh, M., Underwood, C., Henderson, I., & Lee, I. (2016). Regulation of microRNA-mediated developmental changes by the SWR1 chromatin remodeling complex. *Plant Physiology*, *171*(2), 1128–1143. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00332>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *16*(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., & Dean, C. (2014). Antisense COOLAIR mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *PNAS*, *111*(45), 16160–16165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>
- Cui, X., Xu, S. M., Mu, D. S., & Yang, Z. M. (2009). Genomic analysis of rice microRNA promoters and clusters. *Gene*, *431*(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.016>
- Cui, Y., Fang, X., & Qi, Y. (2016). *TRANSPORTIN1 Promotes the Association of MicroRNA with ARGONAUTE1 in Arabidopsis*. *28*(1), 2576–2585. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00384>
- D'Angelo, Maximiliano A. Gomez-Cavazos, S., Mei, A., Lackner, D. H., & Hetzer, M. W. (2017). A Change In Nuclear Pore Complex Composition Regulates Cell Differentiation. *Dev Cell*, *22*(2), 446–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.021.A>

- D'Angelo, M. A., & Hetzer, M. W. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.*, *18*(10), 456–466.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.009>.Structure
- Dalmadi, Á., Gyula, P., Bálint, J., Szittyá, G., & Havelda, Z. (2019). AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic Acids Research*, *47*(18), 9803–9817.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz690>
- de Felippes, F. F., Ott, F., & Weigel, D. (2011). Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, *39*(7), 2880–2889. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1240>
- De La Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., & Kornblihtt, A. R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell*, *12*(2), 525–532.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>
- DeFraia, C. T., & Mou, Z. (2011). The role of the Elongator complex in plants. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(1), 19–22. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14040>
- Derti, A., Garrett-Engle, P., Maclsaac, K. D., Stevens, R. C., Sriram, S., Chen, R., Rohl, C. A., Johnson, J. M., & Babak, T. (2012). A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. *Genome Research*, *22*(6), 1173–1183.  
<https://doi.org/10.1101/gr.132563.111>
- Dominski, Z., Yang, X. C., Kaygun, H., Dadlez, M., & Marzluff, W. F. (2003). A 3' exonuclease that specifically interacts with the 3' end of histone mRNA. *Molecular Cell*, *12*(2), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00278-8)
- Dong, Q., Hu, B., & Zhang, C. (2022). microRNAs and Their Roles in Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, *13*(1). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824240>
- Dong, Z., Han, M. H., & Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS*, *105*(29), 9970–9975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803356105>
- Earley, K. W., & Poethig, R. S. (2011). Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*. *Journal of Biological*



*Chemistry*, 286(44), 38184–38189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290130>

- Ebhardt, H. A., Tsang, H. H., Dai, D. C., Liu, Y., Bostan, B., & Fahlman, R. P. (2009). Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications. *Nucleic Acids Research*, 37(8), 2461. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP093>
- Ellisdon, A. M., Jani, D., Köhler, A., Hurt, E., & Stewart, M. (2010). Structural basis for the interaction between yeast Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) complex components Sgf11 and Sus1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3850–3856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070839>
- Engelhardt, P., & Pusa, K. (1972). Nuclear Pore Complex: “Press-Stud” Elements of Chromosomes in Pairing and Control. *Nature New Biology*, 240(1), 163–166.
- Fan, L., Zhang, C., Gao, B., Zhang, Y., Stewart, E., Jez, J., Nakajima, K., & Chen, X. (2022). Microtubules promote the non-cell autonomous action of microRNAs by inhibiting their cytoplasmic loading onto ARGONAUTE1 in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 57(8), 995–1008. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.015>
- Fang, X., Cui, Y., Li, Y., & Qi, Y. (2015). Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. *Nature Plants*, 1(6), 1–9. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.75>
- Fang, Y., & Spector, D. L. (2007). Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. *Current Biology*, 17(9), 818–823. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.005>
- Florence, J. A. Y., Vitel, M., Brioudes, F., Louis, M., Knobloch, T., & Voinnet, O. (2019). Chemical enhancers of posttranscriptional gene silencing in Arabidopsis. *RNA*, 25(9), 1078–1090. <https://doi.org/10.1261/rna.068627.118>
- Fong, N., Saldi, T., Sheridan, R. M., Cortazar, M. A., & Bentley, D. L. (2017). RNA Pol II Dynamics Modulate Co-transcriptional Chromatin Modification, CTD Phosphorylation, and Transcriptional Direction. *Molecular Cell*, 66(4), 546-557.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.016>
- Francisco-Mangilet, A. G., Karlsson, P., Kim, M. H., Eo, H. J., Oh, S. A., Kim, J. H., Kulcheski, F. R., Park, S. K., & Manavella, P. A. (2015). THO2, a core member of the

- THO/TREX complex, is required for microRNA production in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *82*(6), 1018–1029. <https://doi.org/10.1111/tpj.12874>
- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K., & Zhu, J.-K. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *15*(22), 2038–2043. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.016>
- Furumizu, C., Tsukaya, H., & Komeda, Y. (2010). Characterization of EMU, the *Arabidopsis* homolog of the yeast THO complex member HPR1. *RNA*, *16*(9), 1809–1817. <https://doi.org/10.1261/rna.2265710>
- García-Muse, T., & Aguilera, A. (2019). R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell*, *179*(3), 604–618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.055>
- Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I., & Chédin, F. (2008). R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.017>.R-loop
- Golden, R. J., Chen, B., Li, T., Braun, J., Manjunath, H., Chen, X., Wu, J., Schmid, V., Chang, T.-C., Kopp, F., Ramirez-Martinez, A., Tagliabracci, V. S., Chen, Z. J., Xie, Y., & Mendell, J. T. (2017). An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature*, *542*(7640), 197–202. <https://doi.org/10.1081/e-epcs-120010637>
- González-Carranza, Z. H., Rompa, U., Peters, J. L., Bhatt, A. M., Wagstaff, C., Stead, A. D., & Roberts, J. A. (2007). Hawaiian skirt: An F-box gene that regulates organ fusion and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *144*(3), 1370–1382. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092288>
- González-Carranza, Z. H., Zhang, X., Peters, J. L., Boltz, V., Szecsi, J., Bendahmane, M., & Roberts, J. A. (2017). HAWAIIAN SKIRT controls size and floral organ number by modulating CUC1 and CUC2 expression. *PLoS ONE*, *12*(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185106>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

- Hacquard, T., Clavel, M., Baldrich, P., Lechner, E., Pérez-Salamó, I., Schepetilnikov, M., Derrien, B., Dubois, M., Hammann, P., Kuhn, L., Brun, D., Bouteiller, N., Baumberger, N., Vaucheret, H., Meyers, B. C., & Genschik, P. (2022). The Arabidopsis F-box protein FBW2 targets AGO1 for degradation to prevent spurious loading of illegitimate small RNA. *Cell Reports*, *39*(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110671>
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., & Koncz, C. (2012). CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-Terminal domain of arabidopsis RNA polymerase II. *Plant Cell*, *24*(4), 1626–1642. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096834>
- Han, M. H., Goud, S., Song, L., & Fedoroff, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *PNAS*, *101*(4), 1093–1098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307969100>
- He, P. C., & He, C. (2021). m6A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential. *The EMBO Journal*, *40*(3), 1–15. <https://doi.org/10.15252/emj.2020105977>
- Hirata, R., Makabe, T., Mishiba, K. ichiro, Koizumi, N., Hamdan, S. M., & Iwata, Y. (2022). Unpaired nucleotides on the stem of microRNA precursor are important for precise cleavage by Dicer-like 1 in Arabidopsis. *Genes to Cells*, *27*(4), 280–292. <https://doi.org/10.1111/gtc.12927>
- Howe, K. J., Kane, C. M., & Ares, M. J. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, *9*(8), 993–1006. <https://doi.org/10.1261/rna.5390803>
- Huang, P., Zhang, X., Cheng, Z., Wang, X., Miao, Y., Huang, G., Fu, Y.-F., & Feng, X. (2023). The nuclear pore Y-complex functions as a platform for transcriptional regulation of FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *36*(2), 346–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/plcell/koad271>
- Hunt, A. G. (2022). Review: Mechanisms underlying alternative polyadenylation in plants – looking in the right places. *Plant Science*, *324*(111430). <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111430>
- Hyjek, M., Figiel, M., & Nowotny, M. (2019). RNases H: Structure and mechanism. *DNA Repair*, *84*(102672). <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102672>

- Iida, K., Jin, H., & Zhu, J. K. (2009). Bioinformatics analysis suggests base modifications of tRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, *10*(C), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-155>
- Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2012). Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO Journal*, *31*(2), 267–278.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.395>
- Jacob, Y., Mongkolsiriwatana, C., Veley, K. M., Sang, Y. K., & Michaels, S. D. (2007). The nuclear pore protein AtTPR is required for rna homeostasis, flowering time, and auxin signaling. *Plant Physiology*, *144*(3), 1383–1390.  
<https://doi.org/10.1104/pp.107.100735>
- Jauvion, V., Elmayan, T., & Vaucheret, H. (2010). The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *22*(8), 2697–2709.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.076638>
- Jonkers, I., Kwak, H., & Lis, J. T. (2014). Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing, chromatin, and exons. *ELife*, *3*(e02407), 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.02407>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kim, A., & Wang, G. G. (2021). R-loop and its functions at the regulatory interfaces between transcription and (epi)genome. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1864*(11–12), 1–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2021.194750>
- Kim, S., Yang, J. Y., Xu, J., Jang, I. C., Prigge, M. J., & Chua, N. H. (2008). Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant and Cell Physiology*, *49*(11), 1634–1644. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn146>
- Kim, Y. J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S. Y., Mo, B., & Chen, X. (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal*, *30*(5), 814–822. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.3>

- Kindgren, P., Ivanov, M., & Marquardt, S. (2020). Native elongation transcript sequencing reveals temperature dependent dynamics of nascent RNAPII transcription in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 48(5), 2332–2347. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1189>
- Knuckles, P., & Bühler, M. (2018). Adenosine methylation as a molecular imprint defining the fate of RNA. *FEBS Letters*, 592(17), 2845–2859. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13107>
- Kolaj-Robin, O., & Séraphin, B. (2017). Structures and Activities of the Elongator Complex and Its Cofactors. In *Enzymes* (1st ed., Vol. 41). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.03.001>
- Krull, S., Dörries, J., Boysen, B., Reidenbach, S., Magnius, L., Norder, H., Thyberg, J., & Cordes, V. C. (2010). Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *EMBO Journal*, 29(10), 1659–1673. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.54>
- Kurihara, Y., Takashi, Y., & Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, 12(2), 206–212. <https://doi.org/10.1261/rna.2146906>
- Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K., & Matsui, M. (2002). Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes. *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1073–1085. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf151>
- Kurshakova, M. M., Krasnov, A. N., Kopytova, D. V., Shidlovskii, Y. V., Nikolenko, J. V., Nabirochkina, E. N., Spehner, D., Schultz, P., Tora, L., & Georgieva, S. G. (2007). SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO Journal*, 26(24), 4956–4965. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601901>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
- Lang, P. L. M., Christie, M. D., Dogan, E. S., Schwa, R., Hagmann, J., Van De Weyer, A. L., Scacchi, E., & Weigel, D. (2018). A role for the F-box protein HAWAIIAN SKIRT in

- plant microRNA function. *Plant Physiology*, 176(1), 730–741.  
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01313>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J. U., Ratsch, G., & Weigel, D. (2008). Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 105(25), 8795–8800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802493105>
- Lauressergues, D., Couzigou, J. M., San Clemente, H., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., & Combier, J. P. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520(7545), 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature14346>
- Lei, K. J., Lin, Y. M., Ren, J., Bai, L., Miao, Y. C., An, G. Y., & Song, C. P. (2016). Modulation of the phosphate-deficient responses by MicroRNA156 and its targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 192–203. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv197>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: New generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260–W265.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Leng, X., Ivanov, M., Kindgren, P., Malik, I., Thieffry, A., Brodersen, P., Sandelin, A., Kaplan, C. D., & Marquardt, S. (2020). Organismal benefits of transcription speed control at gene boundaries. *EMBO Reports*, 21(4), 1–16.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201949315>
- Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I. B., Kromann, H., & Nerup, J. (1979). Possible toxic effects of normal and diabetic patient serum on pancreatic B-cells. *Nucleic Acids Research*, 7(1), 25–31. <https://doi.org/10.1007/BF00429704>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, M., & Yu, B. (2021). Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis.

- RNA Biology*, 18(12), 2087–2096. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1899491>
- Li, S., Xu, R., Li, A., Liu, K., Gu, L., Li, M., Zhang, H., Zhang, Y., Zhuang, S., Wang, Q., Gao, G., Li, N., Zhang, C., Li, Y., & Yu, B. (2018). SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9148–9159. <https://doi.org/10.1093/nar/gky591>
- Lin, D., Cao, L., Zhou, Z., Zhu, L., Ehrhardt, D., Yang, Z., & Fu, Y. (2013). Rho GTPase signaling activates microtubule severing to promote microtubule ordering in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 23(4), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.022>
- Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., & Dean, C. (2010). Targeted 3' Processing of Antisense Transcripts Triggers *Arabidopsis* FLC Chromatin Silencing Fuquan. *Science*, 327(5961), 94–98. <https://doi.org/10.1126/science.1180278>
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C., & Clarke, J. (2006). SERRATE: A new player on the plant microRNA scene. *EMBO Reports*, 7(10), 1052–1058. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400806>
- Lunardon, A., Kariuki, S. M., & Axtell, M. J. (2021). Expression and processing of polycistronic artificial microRNAs and trans-acting siRNAs from transiently introduced transgenes in *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, 106(4), 1087–1104. <https://doi.org/10.1111/tpj.15221>
- MacGregor, D. R., Gould, P., Foreman, J., Griffiths, J., Bird, S., Page, R., Stewart, K., Steel, G., Young, J., Paszkiewicz, K., Millar, A. J., Halliday, K. J., Hall, A. J., & Penfield, S. (2013). HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 is required for circadian periodicity through the promotion of nucleocytoplasmic mRNA export in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(11), 4391–4404. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114959>
- MacHida, S., Chen, H. Y., & Adam Yuan, Y. (2011). Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Research*, 39(17), 7828–7836. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr428>
- Manavella, P. A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., MacEk, B., & Weigel, D. (2012). Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell*, 151(4), 859–870.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.039>

- Manavella, P. A., Yang, S. W., & Palatnik, J. (2019). Keep calm and carry on: miRNA biogenesis under stress. *Plant Journal*, *99*(5), 832–843.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14369>
- Marzluff, W. F., & Koreski, K. P. (2017). Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends in Genetics*, *33*(10), 745–759. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.014>
- Mateos, J. L., Bologna, N. G., Chorostecki, U., & Palatnik, J. F. (2010). Identification of MicroRNA Processing Determinants by Random Mutagenesis of Arabidopsis MIR172a Precursor. *Current Biology*, *20*(1), 49–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.072>
- Mencia, R., Gonzalo, L., Tossolini, I., & Manavella, P. A. (2022). Keeping up with the miRNAs: current paradigms of the biogenesis pathway. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac322>
- Meng, Y., Chen, D., Jin, Y., Mao, C., Wu, P., & Chen, M. (2010). RNA editing of nuclear transcripts in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics*, *11*(4), 1–7.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-S4-S12>
- Meng, Y., & Shao, C. (2012). Large-scale identification of mirtrons in Arabidopsis and rice. *PLoS ONE*, *7*(2), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031163>
- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T., & Nakajima, K. (2011). Non-cell-autonomous microRNA 165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root. *Development*, *138*(11), 2303–2313.  
<https://doi.org/10.1242/dev.060491>
- Moraga, F., & Aquea, F. (2015). Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00865>
- Moro, B., Chorostecki, U., Arikiti, S., Suarez, I. P., Hobartner, C., Rasia, R. M., Meyers, B. C., & Palatnik, J. F. (2018). Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Research*, *46*(20), 10709–10723.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky853>
- Muniz, L., Deb, M. K., Aguirrebengoa, M., Lazorthes, S., Trouche, D., & Nicolas, E. (2017).



- Control of Gene Expression in Senescence through Transcriptional Read-Through of Convergent Protein-Coding Genes. *Cell Reports*, 21(9), 2433–2446.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.006>
- Nakama, M., Kawakami, K., Kajitani, T., Urano, T., & Murakami, Y. (2012). DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. *Genes to Cells*, 17(3), 218–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01583.x>
- Narjala, A., Nair, A., Tirumalai, V., Vivek Hari Sundar, G., & Shivaprasad, P. V. (2020). A conserved sequence signature is essential for robust plant miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 48(6), 3103–3118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa077>
- Niehrs, C., & Luke, B. (2020). Regulatory R-loops as effectors of gene expression and genome stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 21(3), 167–178.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0206-3>.Regulatory
- Niemann, M. C. E., Bartrina, I., Ashikov, A., Weber, H., Novák, O., Spíchal, L., Strnad, M., Strasser, R., Bakker, H., Schmülling, T., & Werner, T. (2015). Arabidopsis ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity. *PNAS*, 112(1), 291–296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419050112>
- Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A. R. F., Kimura, H., Dye, M. J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., & Proudfoot, N. J. (2015). Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing. *Cell*, 161(3), 526–540.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.027>
- Park, J., Giudicatti, A. J., Bader, Z. E., Han, M. K., Møller, C., Arce, A. L., Xu, Z. Y., Yang, S. W., Manavella, P. A., & Yun, D. J. (2023). The HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE15–HISTONE DEACETYLASE9 complex associates with HYPONASTIC LEAVES 1 to modulate microRNA expression in response to abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 35(8), 2910–2928.  
<https://doi.org/10.1093/plcell/koad132>
- Park, M., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., & Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *PNAS*, 102(10), 3691–3696.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0405570102>
- Park, W., Li, J., Song, R., Massing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in Arabidopsis

- thaliana. *Curr Biol.*, 12(17), 1484–1495.
- Prathap, V., Kumar, A., Chirag Maheshwari, ., & Tyagi, A. (2022). Phosphorus homeostasis: acquisition, sensing, and long-distance signaling in plants. *Molecular Biology Reports*, 49, 8071–8086. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07354-9>
- Prathap, V., Kumar, A., Maheshwari, C., & Tyagi, A. (2022). Phosphorus homeostasis: acquisition, sensing, and long-distance signaling in plants. *Molecular Biology Reports*, 49(8), 8071–8086. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07354-9>
- Pyott, D. E., & Molnar, A. (2015). Going mobile: Non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 306–318. <https://doi.org/10.1111/pbi.12353>
- Quévillon Huberdeau, M., Zeitler, D. M., Hauptmann, J., Bruckmann, A., Fressigné, L., Danner, J., Piquet, S., Strieder, N., Engelmann, J. C., Jannot, G., Deutzmann, R., Simard, M. J., & Meister, G. (2017). Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for micro RNA -guided gene silencing in vivo . *The EMBO Journal*, 36(14), 2088–2106. <https://doi.org/10.15252/embj.201696386>
- Raices, M., & D'Angelo, M. A. (2012). Nuclear pore complex composition: A new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(11), 687–699. <https://doi.org/10.1038/nrm3461>
- Ren, G., Xie, M., Dou, Y., Zhang, S., Zhang, C., & Yu, B. (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12817–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204915109>
- Risseuw, E. P., Daskalchuk, T. E., Banks, T. W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D. E., & Crosby, W. L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *The Plant Journal*, 34(6), 753–767. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01768.x>
- Rojas, A. M. L., Drusin, S. I., Chorostecki, U., Mateos, J. L., Moro, B., Bologna, N. G., Bresso, E. G., Schapire, A., Rasia, R. M., Moreno, D. M., & Palatnik, J. F. (2020). Identification of key sequence features required for microRNA biogenesis in plants. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19129-6>

- Rondón, A. G., & Aguilera, A. (2019). R-Loops as Promoters of Antisense Transcription. *Molecular Cell*, *76*(4), 529–530. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.001>
- Rose, A., & Meier, I. (2001). A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim. *PNAS*, *98*(26), 15377–15382. <https://doi.org/10.1073/pnas.261459698>
- Rougemaille, M., Dieppois, G., Kisseleva-Romanova, E., Gudipati, R. K., Lemoine, S., Blugeon, C., Boulay, J., Jensen, T. H., Stutz, F., Devaux, F., & Libri, D. (2008). THO/Sub2p Functions to Coordinate 3'-End Processing with Gene-Nuclear Pore Association. *Cell*, *135*(2), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.005>
- Saldi, T., Fong, N., & Bentley, D. L. (2018). Transcription elongation rate affects nascent histone pre-mRNA folding and 3' end processing. *Genes and Development*, *32*(3–4), 297–308. <https://doi.org/10.1101/gad.310896.117>
- Santos-Pereira, J. M., & Aguilera, A. (2015). R loops: New modulators of genome dynamics and function. *Nature Reviews Genetics*, *16*(10), 583–597. <https://doi.org/10.1038/nrg3961>
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K., & Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology*, *136*(1), 2483–2499. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047019>
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J. W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., & Albert, C. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, *9*(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A. H., Nielsen, K. L., Jørgensen, J. E., Weigel, D., & Andersen, S. U. (2009). SHOREmap: Simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods*, *6*(8), 550–551. <https://doi.org/10.1038/nmeth0809-550>
- Sikorskaite, S., Rajamäki, M. L., Baniulis, D., Stanys, V., & Valkonen, J. P. T. (2013). Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the

- Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*, 9(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-31>
- Skourti-Stathaki, K., Kamieniarz-Gdula, K., & Proudfoot, N. J. (2014). R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature*, 516(7531), 436–439. <https://doi.org/10.1038/nature13787>
- Skourti-Stathaki, K., & Proudfoot, N. J. (1984). A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Baker and Kornberg*, 1384–1396. <https://doi.org/10.1101/gad.242990.114.Freely>
- Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieling, J. A. F. O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., & Agami, R. (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell*, 169(2), 326-337.e12.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.031>
- Soares, L. M., He, P. C., Chun, Y., Suh, H., Kim, T. S., & Buratowski, S. (2017). Determinants of Histone H3K4 Methylation Patterns. *Molecular Cell*, 68(4), 773-785.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.013>
- Sollier, J., & Cimprich, K. A. (2015). Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends in Cell Biology*, 25(9), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.003>
- Song, L., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2010). RNA Secondary Structural Determinants of miRNA Precursor Processing in Arabidopsis. *Current Biology*, 20(1), 37–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.076>
- Speth, C., Willing, E. M., Rausch, S., Schneeberger, K., & Laubinger, S. (2013). RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 76(3), 433–445. <https://doi.org/10.1111/tpj.12308>
- Su, C., Li, Z., Cheng, J., Li, L., Zhong, S., Liu, L., Zheng, Y., & Zheng, B. (2017). The Protein Phosphatase 4 and SMEK1 Complex Dephosphorylates HYL1 to Promote miRNA Biogenesis by Antagonizing the MAPK Cascade in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 41(5), 527-539.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.008>
- Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N. J., & Dean, C. (2013). R-Loop Stabilization Represses Antisense Transcription at the Arabidopsis FLC Locus. *Science*, 340(6132), 619–621. <https://doi.org/10.1126/science.1234848.R-Loop>

- Sun, Z., Guo, T., Liu, Y., Liu, Q., & Fang, Y. (2015). The Roles of Arabidopsis CDF2 in Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Primary MicroRNAs. *PLoS Genetics*, *11*(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005598>
- Svozil, J., Gruissem, W., & Baerenfaller, K. (2016). Meselect – A rapid and effective method for the separation of the main leaf tissue types. *Frontiers in Plant Science*, *7*(NOVEMBER2016), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01701>
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature*, *462*(7274), 799–802. <https://doi.org/10.1038/nature08618>
- Tamura, K. (2020). Nuclear pore complex-mediated gene expression in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research*, *133*(4), 449–455. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01177-0>
- Tan-Wong, S. M., Dhir, S., & Proudfoot, N. J. (2019). R-Loops Promote Antisense Transcription across the Mammalian Genome. *Molecular Cell*, *76*(4), 600-616.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.002>
- Telfer, A., & Scott, P. (1998). HASTY: a gene that regulates the timing of shoot maturation in Arabidopsis thaliana. *Development*, *125*(10), 1889–1896. <https://doi.org/10.2307/1002792>
- Tomassi, A. H., Gagliardi, D., & Cambiagno, Damian A Manavella, P. A. (2017). Nonradioactive Detection of Small RNAs Using Digoxigenin-Labeled Probes. *Methods in Molecular Biology*, *100*(July), 1–35. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7165-7>
- Tomassi, A. H., Re, D. A., Romani, F., Cambiagno, D. A., Gonzalo, L., Moreno, J. E., Arce, A. L., & Manavella, P. A. (2020). The Intrinsically Disordered Protein CARP9 Bridges HYL1 to AGO1 in the Nucleus to Promote MicroRNA Activity 1. *Plant Physiology*, *184*, 316–329. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00258>
- Vazquez, F., Gascioli, V., Cr  t  , P., & Vaucheret, H. (2004). The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. *Current Biology*, *14*(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.035>

- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>
- Wang, B., Duan, C.-G., Wang, X., Hou, Y.-J., Yan, J., Gao, C., Kim, J.-H., Zhang, H., & Zhu, J.-K. (2015). HOS1 Regulates Argonaute1 by Promoting the Transcription of the MicroRNA Gene MIR168b in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *81*(1), 861–870. <https://doi.org/10.1111/tpj.12772.HOS1>
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X., & Cao, X. (2013). NOT2 Proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple microRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, *25*(2), 715–727. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105882>
- Wang, S., Quan, L., Li, S., You, C., Zhang, Y., Gao, L., Zeng, L., Liu, L., Qi, Y., Mo, B., & Chen, X. (2019). The PROTEIN PHOSPHATASE4 Complex Promotes Transcription and Processing of Primary microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*, *31*(2), 486–501. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00556>
- Wang, W., Ye, R., Xin, Y., Fang, X., Li, C., Shi, H., Zhou, X., & Qi, Y. (2011). An importin  $\beta$  protein negatively regulates microRNA activity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *23*(10), 3565–3576. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091058>
- Wang, Z., Ma, Z., Castillo-González, C., Sun, D., Li, Y., Yu, B., Zhao, B., Li, P., & Zhang, X. (2018). SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature*, *557*(7706), 516–521. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0135-x>
- Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K., & Weigel, D. (2010). Structure Determinants for Accurate Processing of miR172a in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, *20*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.073>
- Westhof, E. (2004). How to silence silencing. *Chemistry and Biology*, *11*(2), 158–160. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.02.006>
- Williams, A. S., Ingledue, T. C., Kay, B. K., & Marzluff, W. F. (1994). Changes in the stem-loop at the 3' terminus of histone mRNA affects its nucleocytoplasmic transport and cytoplasmic regulation. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4660–4666. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4660>

- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation*, 2(3), 100141.  
<https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- Xianfeng, M. X., Rose, A., Muthuswamy, S., Sun, Y. J., Venkatakrishnan, S., Zhao, Q., & Meier, I. (2007). NUCLEAR PORE ANCHOR, the Arabidopsis homolog of Tpr/Mlp1/Mlp2/megator, is involved in mRNA export and SUMO homeostasis and affects diverse aspects of plant development. *The Plant Cell*, 19(5), 1537–1548.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.049239>
- Xie, D., Chen, M., Niu, J., Wang, L., Li, Y., Fang, X., Li, P., & Qi, Y. (2021). Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*, 23(1), 32–39.  
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-00606-5>
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology*, 138(4), 2145–2154.  
<https://doi.org/10.1104/pp.105.062943>
- Xu, W., Li, K., Li, S., Hou, Q., Zhang, Y., Liu, K., & Sun, Q. (2020). The R-loop atlas of Arabidopsis development and responses to environmental stimuli. *Plant Cell*, 32(4), 888–903. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00802>
- Xu, W., Xu, H., Li, K., Fan, Y., Liu, Y., Yang, X., & Sun, Q. (2017). The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome. *Nature Plants*, 3(9), 704–714.  
<https://doi.org/10.1038/s41477-017-0004-x>
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., & Huang, H. (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47(6), 841–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02835.x>
- Yang, S. W., Chen, H.-Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N.-H., & Yuan, Y. A. (2010). Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and Its Molecular Implications for miRNA Processing. *Structure*, 18(5), 594–605.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2010.02.006>
- Yang, X., Dong, W., Ren, W., Zhao, Q., Wu, F., & He, Y. (2021). Cytoplasmic HYL1 modulates miRNA-mediated translational repression. *The Plant Cell*, 33(6), 1980–

1996. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab090>
- Yang, X., Ren, W., Zhao, Q., Zhang, P., Wu, F., & He, Y. (2014). Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Research*, *42*(19), 12224–12236. <https://doi.org/10.1093/nar/gku907>
- Yang, Y., La, H., Tang, K., Miki, D., Yang, L., Wang, B., Duan, C. G., Nie, W., Wang, X., Wang, S., Pan, Y., Tran, E. J., An, L., Zhang, H., & Zhu, J. K. (2017). SAC3B, a central component of the mRNA export complex TREX-2, is required for prevention of epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *45*(1), 181–197. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw850>
- Yelina, N. E., Smith, L. M., Jones, A. M. E., Patel, K., Kelly, K. A., & Baulcombe, D. C. (2010). Putative Arabidopsis THO/TREX mRNA export complex is involved in transgene and endogenous siRNA biosynthesis. *PNAS*, *107*(31), 13948–13953. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911341107>
- Zatreanu, D., Han, Z., Mitter, R., Tumini, E., Williams, H., Gregersen, L., Dirac-Svejstrup, A. B., Roma, S., Stewart, A., Aguilera, A., & Svejstrup, J. Q. (2019). Elongation Factor TFIIS Prevents Transcription Stress and R-Loop Accumulation to Maintain Genome Stability. *Molecular Cell*, *76*(1), 57-69.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.037>
- Zhan, J., & Meyers, B. C. (2023). Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. *Annual Review of Plant Biology*, *74*, 21–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070122-035226>
- Zhang, B., Karnik, R., Wang, Y., Wallmeroth, N., Blatt, M. R., & Grefen, C. (2015). The arabidopsis R-SNARE VAMP721 interacts with KAT1 and KC1 K<sup>+</sup> channels to moderate K<sup>+</sup> current at the plasma membrane. *The Plant Cell*, *27*(6), 1697–1717. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00305>
- Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant Journal*, *46*(2), 243–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02697.x>
- Zhang, B., You, C., Zhang, Y., Zeng, L., Hu, J., Zhao, M., & Chen, X. (2020). Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in Arabidopsis. *Nature Plants*, *6*(8), 957–969. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0726-z>



- Zhang, S., Xie, M., Ren, G., & Yu, B. (2013). CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *PNAS*, *110*(43), 17588–17593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310644110>
- Zhang, X., Jayaweera, D., Peters, J. L., Szecsi, J., Bendahmane, M., Roberts, J. A., & González-Carranza, Z. H. (2017). The Arabidopsis thaliana F-box gene HAWAIIAN SKIRT is a new player in the microRNA pathway. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189788>
- Zhang, Y., Chen, M., Siemiatkowska, B., Toleco, M. R., Jing, Y., Strotmann, V., Zhang, J., Stahl, Y., & Fernie, A. R. (2020). A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Communications*, *1*(5), 100028. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100028>
- Zhang, Y. F., Zhang, R., & Su, B. (2009). Diversity and evolution of MicroRNA gene clusters. *Science in China, Series C: Life Sciences*, *52*(3), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0032-5>
- Zhang, Z., Guo, X., Ge, C., Ma, Z., Jiang, M., Li, T., Koiwa, H., Yang, S. W., & Zhang, X. (2017). KETCH1 imports HYL1 to nucleus for miRNA biogenesis in Arabidopsis. *PNAS*, *114*(15), 4011–4016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619755114>
- Zhu, D., Mao, F., Tian, Y., Lin, X., Gu, L., Gu, H., Qu, L. jia, Wu, Y., & Wu, Z. (2020). The Features and Regulation of Co-transcriptional Splicing in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *13*(2), 278–294. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.11.004>
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-gonzález, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y., Duan, L., Li, Z., Axtell, M. J., Wang, X., & Zhang, X. (2013). Bi-directional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nat Struct Mol Biol*, *20*(9), 1106–1115. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2646>.Bi-directional
- Zhu, J., Li, Y., Lin, J., Wu, Y., Guo, H., Shao, Y., Wang, F., Wang, X., Mo, X., Zheng, S., Yu, H., & Mao, C. (2019). CRD1, an Xpo1 domain protein, regulates miRNA accumulation and crown root development in rice. *The Plant Journal*, *100*(2), 328–342. <https://doi.org/10.1111/tpj.14445>