

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ACTIVIDAD DE MIARNs”

Lic. Axel Giudicatti

Director de Tesis: Dr. Pablo A. Manavella

Laboratorio de Biología del ARN

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, UNL-CONICET)

-2025-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, institución donde en 2013 inicié este proceso de transformación como estudiante de grado de “Licenciatura en Biotecnología”, para luego de un largo y vasto camino culminar como Doctor en Ciencias Biológicas. La Universidad te forma, te transforma, te nutre y te brinda las herramientas necesarias para un mundo que demanda gente cada vez más idónea y preparada.

A cada uno de los docentes que participaron en las diferentes etapas a lo largo de todo este proceso de formación. Por dar lo mejor de sí en su respectiva área y velar siempre por el aprendizaje del alumno. Por garantizar y poner bien en lo alto la educación pública argentina día tras día. Por ser los verdaderos artífices de la excelencia académica en el país.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haber financiado mi proceso de formación a través de una Beca Doctoral y brindarme todas las herramientas necesarias para desempeñarme y desarrollarme plenamente durante todos estos años.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y su personal directivo, por cederme un espacio de trabajo y permitirme ser partícipe de esta comunidad científica. Por garantizar la infraestructura necesaria para que los experimentos sigan su curso normal.

Al Dr. Pablo A. Manavella por brindarme el espacio en su laboratorio y garantizar los recursos necesarios para llevar adelante los experimentos que este trabajo de tesis requirió. Pero más importante, por dejarme formar parte de su equipo de investigación, el *Small RNA Biology Lab*. Por su excepcional mentoría y liderazgo a lo largo de estos años. Por iluminar el camino en los momentos de mayor incertidumbre. Por su admirable capacidad para mantener el entusiasmo y la motivación cuando más se necesitaban. Por contagiarme su curiosidad infinita y su manera de vivir con pasión la ciencia. Por su inspiradora excelencia académica, pero, más importante, por su excelente calidad humana.

A cada uno de los integrantes del SBL, con los cuales compartí incontables hs dentro y fuera del laboratorio. Por el intercambio de conocimientos, ideas, protocolos, tips y pipetas. Por las discusiones científicas y las cervezas. En particular, al DAC por enseñarme a andar en bici sin rueditas cuando era apenas un niño en el laboratorio. Y también cuando crecí un poco.

A la Dra. Rosa Lozano-Durán por permitirme conocer y formar parte del Gemini Team, por su cálida recepción y acompañamiento durante mi estadía en Tübingen. A cada uno de los integrantes del GT, por su cálida recepción y excelente clima de trabajo. En especial, a Tan y Laura, por los conocimientos compartidos y la predisposición a ayudarme día a día durante mi estancia allí.

A mis padres, Carlos y Silvia, por garantizar siempre todo lo necesario para que mi única preocupación sea estudiar y desarrollarme personalmente. Por apoyarme de manera incondicional. Por ser los pilares

fundamentales para asentar las bases de lo que soy hoy como persona. Por inculcarme los valores del esfuerzo, sacrificio y honestidad. Por la paciencia y tolerancia ante mis equivocaciones y la solidaridad para ayudarme a enmendarlos.

A mi hermana, Ivón, por la complicidad y sinceridad. Por incentivarme siempre a mirar las situaciones desde otra perspectiva. Por ayudarme a no perder de vista lo importante. Por su actitud siempre conciliadora.

A Luisi, por acompañarme, entenderme y esperarme hasta tarde cada día del año. Por su permanente calidez. Por aportar siempre su perspectiva humana. Por ser ese lugar feliz cuando los experimentos no acompañaban o los días no eran lo suficientemente productivos. Por su paciencia y comprensión durante la redacción de esta tesis.

A Genaro, Giuliana y Jael, con quienes atravesé todo este proceso de formación desde el día cero. Por vivir juntos esta etapa y ver la transformación y diversificación del uno al otro conjuntamente. Por el continuo debate interdisciplinario. Por las eternas discusiones de ciencia con una copa de vino en la mano.

A The Company of Biologists por financiar a través de una beca mi estancia corta de investigación en Tübingen.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado por financiar a través de una beca de movilidad mi estancia corta de investigación en Málaga.

APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS

Gonzalo, L; **Giudicatti, A.J.**; Manavella, PA (2024) HYL1's multiverse: A journey through miRNA biogenesis and beyond canonical and non-canonical functions of HYL1. *Current Opinion in Plant Biology*. 80:102546.

Park, J.*; **Giudicatti, A.J.***; Badder, Z.*; Han M.*; Møller, C.; Arce, A.; Xu, Z.; Yang, SW.; Manavella, PA.; Yun, DJ. (2023) HOS15-HDA9 complex associates with HYL1 to modulate miRNA expression in response to ABA signaling. *The Plant Cell*. 35(8):2910-2928. **(Co-Primer autor)**

Manavella, PA.; Herz, MA.; Kornblihtt, AR.; Sorenson, R.; Sieburth, LR.; Nakaminami, K.; Seki, MI.; Ding, Y.; Sun, Q.; Kang, H.; Ariel, FD.; Crespi, M.; **Giudicatti, A.J.**; Cai, Q.; Jin, H.; Feng, X.; Qi, Y.; Pikaard, CS. (2023) Beyond transcription: compelling open questions in plant RNA biology. *The Plant Cell*. 35(6):1626–1653.

You, Y.; Koczyk, G.; Nuc, M.; Morbitzer, R.; Holmes, DR.; Von Renack-Lahaye, E.; Hou, SI.; **Giudicatti, A.J.**; Gris, C; Manavella, PA.; Noël, LD.; Krajewski, P.; Lahaye, T. (2023) The eINTACT system dissects bacterial exploitation of plant osmosignalling to enhance virulence. *Nat. Plants* 9:128–141

Giudicatti, A.J.; Tomassi, AH.; Manavella, PA.; Arce, AL. (2021) Extensive analysis of miRNA trimming and tailing indicates that AGO1 has a complex role in miRNA turnover. *Plants*. 10(2):267 **(Primer autor)**

Cambiagno, DA.; **Giudicatti, A.J.**; Arce, AL.; Gagliardi, D; Li, L; Yuan, W; Lundberg, DS.; Weigel, D; Manavella, PA. (2021) HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular Plant*. 14(3):426-439.

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

1.INDICE

AGRADECIMIENTOS	1
APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS	3
1.INDICE	4
2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	8
3. RESUMEN	13
3. ABSTRACT	14
4.INTRODUCCIÓN	15
4.1 <i>Biogénesis de miARNs en plantas</i>	16
4.1.1 <i>Los teloneros: Inicio de la transcripción y ensamblado del complejo de procesamiento</i> ...	19
4.1.2 <i>La orquesta en concierto: El procesamiento de los miARNs</i>	22
4.1.3 <i>La última sinfonía: Etapa efectora de la vía</i>	23
4.1.4 <i>miARNs móviles</i>	25
4.2 <i>Preguntas abiertas en el estudio de la biogénesis de miARNs</i>	26
4.2.1 <i>El rol de la temperatura en la eficiencia del procesamiento</i>	26
4.2.2 <i>El reclutamiento cotranscripcional del complejo de procesamiento</i>	27
4.2.3 <i>La relación entre procesamiento de miARNs y el splicing</i>	28
4.2.4 <i>Co-transcripcionalidad y miARN móviles</i>	28
5. OBJETIVOS	31
5.1 <i>Objetivos específicos</i>	31
6. CAPITULO 1	33
6.1 <i>Introducción</i>	33
6.1.1 <i>HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15 (HOS15)</i>	35
6.1.2 <i>El equilibrio HATs/HDACs y su impacto en la expresión génica</i>	36
6.2 <i>Capítulo 1: Objetivos</i>	38
6.3 <i>Capítulo 1: Materiales y métodos</i>	39
6.3.1 <i>Análisis de ADN</i>	39
6.3.1.1 <i>Plásmidos</i>	39
6.3.1.2 <i>Construcciones genéticas</i>	41
6.3.1.3 <i>Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)</i>	42
6.3.1.4 <i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	42

6.3.1.5 Purificación de fragmentos de ADN.....	43
6.3.1.6 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway.....	43
6.3.1.7 Recombinación Gateway en vectores de destino	43
6.3.1.8 Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	43
6.3.1.9 Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico.....	44
6.3.1.10 Minipreparación de ADN plasmídico	44
6.3.1.11 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	45
6.3.1.12 Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
6.3.1.13 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	45
6.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	46
6.3.2.1 Tratamientos farmacológicos	46
6.3.2.2 Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
6.3.2.3 Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
6.3.3 Análisis de ARN	48
6.3.3.1 Extracción de ARN total de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
6.3.3.2 Northern blot no radioactivo para la detección de ARNs pequeños (small-RNA blot)	49
6.3.3.4 Transcripción reversa (RT).....	50
6.3.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	50
6.3.3.6 Secuenciación de ARNs y ARNs pequeños.....	51
6.3.3.7 Análisis bioinformáticos	51
6.3.3.8 Ensayos de procesamiento in-vitro de pri-miARNs	52
6.3.4 Análisis de Proteínas	53
6.3.4.1 Extracción de proteínas totales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
6.3.4.2 Separación de proteínas y análisis por western blot	53
6.3.4.3 Fraccionamiento núcleo/citoplasma.....	54
6.3.4.4 Ensayos de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP) seguido de Western blot.	55
6.3.5 Ensayos en levaduras.....	55
6.3.5.1 Co-transformación de levaduras	55
6.3.5.2 Ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H).....	56
6.3.6 Análisis de fluorescencia	56
6.3.6.1 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	56
6.3.7 Cepas bacterianas y de levaduras empleadas	57
6.4 Capítulo 1: Resultados.....	58

6.4.1 Identificación de HOS15 como cofactor de la biogénesis de miARNs a partir de un screening genético directo	58
6.4.2 HOS15 es capaz de interactuar con la maquinaria de biogénesis de miARNs a través de HYL1	62
6.4.3 HYL1 es capaz de formar complejos multiproteicos de deacetilación de histonas	65
6.4.4 La unión de HYL1 a los pri-miARNs nacientes permite el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 al loci MIR	67
6.4.5 HOS15 y HDA9 suprimen la acumulación de miARNs de respuesta al ABA	73
6.4.6 La deficiencia de HOS15 y HDA9 provoca una insignificante alteración de los niveles de pri-miRNA	77
6.4.7 El procesamiento de los pri-miARNs se encuentra favorecido en mutantes de <i>hos15</i> y <i>hda9</i>	80
6.5 Capítulo 1: Discusión	83
7. CAPITULO 2.....	89
7.1 Introducción.....	89
7.1.1 La estructura proteica de HYL1.....	89
7.1.2 El multiverso funcional de HYL1	91
7.1.3 Enfoque experimental del estudio del C-terminal de HYL1.....	93
7.1.4 TurboID proximity labeling como herramienta biotecnológica en la búsqueda masiva de interactores	94
7.2 Capitulo 2: Objetivos.....	97
7.3 Capitulo 2: Materiales y métodos.....	98
7.3.1 Análisis de ADN.....	98
7.3.1.1 Plásmidos.....	98
7.3.1.2 Construcciones genéticas.....	100
7.3.1.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	100
7.3.1.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	100
7.3.1.5 Purificación de fragmentos de ADN	100
7.3.1.6 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway.....	100
7.3.1.7 Recombinación Gateway en vectores de destino	100
7.3.1.8 Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	100
7.3.1.9 Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico.....	100

7.3.1.10 Minipreparación de ADN plasmídico	101
7.3.1.11 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	101
7.3.1.12 Extracción de ADN genómico de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
7.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	101
7.3.2.1 Tratamientos farmacológicos	101
7.3.2.2 Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	101
7.3.2.3 Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	101
7.3.3 Análisis de Proteínas	102
7.3.3.1 Extracción de proteínas totales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	102
7.3.3.2 Separación de proteínas y análisis por western blot	102
7.3.3.3 Fraccionamiento núcleo/citoplasma.....	102
7.3.3.4 Ensayos de purificación de proteínas biotinizadas.	102
7.3.4 Ensayos en levaduras.....	102
7.3.4.1 Co-transformación de levaduras	102
7.3.4.2 Ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H).....	103
7.3.5 Análisis de fluorescencia	103
7.3.5.1 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	103
7.3.5.1 Ensayos de complementación de la fluorescencia (BiFC).....	103
7.3.6 Cepas bacterianas y de levaduras empleadas	103
7.4 Capítulo 2: Resultados.....	104
7.4.1 La eliminación del dominio C-terminal de HYL1 genera cambios en el patrón de localización subcelular de la proteína.....	104
7.4.2 La interacción entre HYL1 y SE no se ve alterada por la ausencia de repeticiones en el C-terminal ni por el estado de fosforilación de las mismas.....	107
7.4.3 Alteraciones en el dominio C-terminal de HYL1 afectan la interacción proteica con CARP9.....	110
7.4.4 La asociación entre AGO1 y HYL1 no depende del dominio C-terminal de HYL1.....	113
7.4.5 El dominio C-terminal de HYL1 promueve la interacción con otros factores proteicos para formar una red de interactores que favorecen la diversidad funcional de la proteína	115
7.5 Capítulo 2: Discusión	124
8. CONCLUSIONES.....	126
9. BIBLIOGRAFIA.....	128
10. ANEXO.....	148

2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

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

ABA: Ácido Abscísico

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

AD: Dominio de Activación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ADNss: Ácido desoxirribonucleico simple cadena

ADN-T: ADN de transferencia

amiR: Micro ARN artificial

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ATP: Adenosina trifosfato

BAR: *Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (<http://bar.utoronto.ca/#>)

BD: Dominio de unión

BiFC: Complementación bimolecular de la fluorescencia (Bimolecular Fluorescence complementation)

BSA: Albúmina de suero bovino

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

CDS: Secuencia codificante (Coding Sequence)

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina

Co-IP: Co-inmunoprecipitación

Col-0: Ecotipo Columbia

cm: Centímetros

CTD: Dominio C-terminal.

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

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

ds: Doble cadena (double stranded)

dsRBD: Dominio de unión a ARN doble cadena

DTT: Ditioneitol

OD: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético

EMS: Metanosulfonato de etileno o etilmetanosulfonato

F-Luc: *Firefly Luciferasa*

g: Gravedad o gramos

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

GFP: Proteína verde fluorescente

hs: Hora

HRP: *Horse radish peroxidase*

IgG: Inmunoglobulina G

L: Litro

LB: Luria-Bertani

LD: Día largo (long day)

M: Molar

m²: Metros cuadrados

mA: Miliamper/s

mg: Miligramo

MG132: Inhibidor de proteosoma (N-Benciloxycarbonilo-L-leucilo-L-leucilo -L-leucinal)

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

miARN: Micro ARN

min: Minuto/s

miliQ: Agua calidad miliQ

mL: Mililitro

mM: Milimolar (milimoles/litro)

mm: Milímetros

mmol: Milimoles

MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico

MS: Medio de cultivo Murashige-Skoog

NLS: Señal de localización nuclear (nuclear localization signal)

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

nmol: Nanomoles

nM: Nanomolar

nt: Nucleótido

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo

Pol II: Complejo transcripcional de la ARN Polimerasa II

pre-miARN: Precursor de micro ARN

pri-miARN: Transcripto primario de micro ARN

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

PVDF: Polifluoruro de polivinilideno

p/V: Gramos de soluto en 100 mL de solución

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

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

RT: Retrotranscripción

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

s: Segundo/s

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

sARNs: ARNs pequeños

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

SMC: Sitio de múltiple clonado

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

TAE: Tris Acético EDTA

TBE: Tris Boro EDTA

tasiARNs: Trans-acting siRNAs

TEMED: -tetrametilendiamina

TGS: Silenciamiento génico transcripcional (*Transcriptional Gene Silencing*)

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

Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano

U: Unidad/es

UV: Ultravioleta

V/V: mL de soluto en 100 mL de solución

μM: Micromolar

μmoles: Micromoles

μL: Microlitros

V: Volts

WT: Ecotipo salvaje (*Wild Type*)

Nomenclatura

Nomenclatura de genes: *HOS15*, gen que codifica la proteína HOS15.

Nomenclatura de proteínas: HOS15, proteína HOS15.

Nomenclatura de mutantes: *hos15-3*, mutante en el gen *HOS15*, alelo 3.

Nomenclatura de promotores: Prom_{HOS15}, promotor del gen HOS15.

Nomenclatura de construcciones: Prom_{35S}::eGFP:HOS15, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor dirigiendo la expresión de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (eGFP) fusionada a la secuencia codificante de la proteína HOS15.

3. RESUMEN

El silenciamiento génico mediado por miARNs constituye uno de los mecanismos principales a la hora de mantener una expresión armónica de los genes que modulan el desarrollo y la homeostasis de muchos seres vivos. El mantenimiento de este delicado equilibrio transcripcional mediante estas pequeñas moléculas requiere a su vez mecanismos dinámicos de regulación de la biogénesis de miARNs que permitan responder eficientemente ante diferentes condiciones ambientales. En ese sentido, numerosos mecanismos y factores son capaces de regular distintas etapas y componentes de la biogénesis de miARNs. Recientemente, la interacción entre el complejo RNA polymerase II (Pol II) y la maquinaria de procesamiento de miARNs ha surgido como un nodo central para el control de la producción de miARNs en un proceso acoplado a la transcripción. Sin embargo, estos descubrimientos abrieron una nueva interrogante acerca de cómo la maquinaria de biogénesis de miARNs y sus reguladores transcripcionales específicos reconocen los locus de *MIRNA*. Durante el desarrollo de esta tesis buscamos comprender con mayor profundidad las bases de este proceso de reconocimiento, en particular en un contexto asociado a mecanismos de remodelación de la cromatina.

A lo largo del primer capítulo de esta tesis caracterizamos al complejo HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE15 (*HOS15*)–HISTONE DEACETYLASE9 (*HDA9*) de *Arabidopsis thaliana*, que actúa como un supresor condicional de la biogénesis de miARNs, en particular en respuestas a la hormona ABA. En respuesta a los tratamientos con ABA, las plantas mutantes *hos15/hda9* exhiben un aumento en la actividad transcripcional de los locus de genes *MIRNA* acompañada de un incremento en la tasa de procesamiento de miARN dando como resultado una sobreacumulación de un subconjunto de miARN maduros. Sumado a ello, nuestros resultados muestran que *HYL1*, a través del reconocimiento de pri-miARNs nacientes, dirige el reclutamiento del complejo *HOS15-HDA9* a los loci de genes de *MIRNA*, dando la especificidad al sistema. Estos hallazgos sugieren que los pri-miARN nacientes pueden funcionar como faros permitiendo el reclutamiento de reguladores transcripcionales a la cromatina, y específicamente a los loci de genes *MIRNA*. El reclutamiento mediado por *HYL1* de remodeladores de la cromatina a los loci de *MIRNA* modula a su vez la actividad transcripcional de estos, generando una regulación recíproca que actúa como amortiguador para mantener estables los niveles de miARNs generados.

En una segunda etapa de este trabajo de tesis, nos enfocamos en la caracterización funcional y regulatoria del dominio C-terminal de *HYL1*. El estudio de esta región permitió establecer su rol en el patrón de localización de la proteína, así como también la identidad de las proteínas que interactúan específicamente con esta región de la proteína. Finalmente, al realizar las asociaciones funcionales típicas para cada uno de estos subconjuntos de interactores, logramos encontrar nuevas funcionalidades de *HYL1* potencialmente relacionadas a su dominio C-terminal.

3. ABSTRACT

miRNA-mediated gene silencing is one of the key mechanisms for maintaining balanced gene expression, which is essential for development and homeostasis in many living organisms. Maintaining this delicate transcriptional balance requires dynamic regulatory mechanisms of miRNA biogenesis that allow plants to efficiently respond to changing environmental conditions. Consequently, multiple mechanisms and factors regulate distinct stages and components of miRNA biogenesis. Recently, the interplay between the RNA polymerase II (Pol II) complex and the miRNA processing machinery has emerged as a central node in controlling miRNA production in a transcription-coupled process. However, a key question remains unanswered: how do the miRNA biogenesis machinery and transcriptional regulators specifically recognize *MIRNA* loci?

Here, we show that the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE15 (HOS15)–HISTONE DEACETYLASE9 (HDA9) complex acts as a conditional suppressor of miRNA biogenesis, particularly in response to abscisic acid (ABA). When treated with ABA, *hos15/hda9* mutants exhibit increased transcription of *MIRNA* loci, accompanied by higher pri-miRNA processing rates, resulting in the overaccumulation of a subset of mature miRNAs. Furthermore, our findings indicate that HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) recognizes nascent pri-miRNAs and guides the recruitment of the HOS15–HDA9 complex to *MIRNA* loci, providing specificity to the regulatory system. These results suggest that nascent pri-miRNAs function as scaffolds to recruit transcriptional regulators specifically to *MIRNA* loci. This HYL1-mediated recruitment of chromatin remodelers to *MIRNA* loci modulates transcriptional activity, creating a feedback loop that buffers miRNA levels to maintain transcriptional homeostasis.

In addition to uncovering the role of the HOS15–HDA9 complex, we explored the functional and regulatory role of the HYL1 C-terminal domain. This analysis revealed its involvement in determining the protein's subcellular localization and its interaction with specific protein subsets. Functional association studies of these interactors identified new potential roles for HYL1, likely linked to its C-terminal domain, expanding our understanding of its functions in miRNA biogenesis and regulation.

4. INTRODUCCIÓN

En un entorno continuamente cambiante, la viabilidad y el correcto desarrollo de todo ser vivo dependen de la precisa coordinación de un sinnúmero de procesos biológicos interrelacionados. En ese sentido, la correcta expresión tanto espacial como temporal de los genes involucrados en dichos procesos se transforma en un elemento crucial cuya sincronización sólo es posible gracias al delicado equilibrio entre los diferentes mecanismos involucrados en la activación y el silenciamiento de la transcripción génica.

Para el caso particular de las plantas, esta situación es drástica ya que, como organismos sésiles están continuamente expuestas a condiciones de estrés y cambios medioambientales agresivos que amenazan constantemente este delicado equilibrio, poniendo a prueba su capacidad de respuesta y adaptación (G. Li et al., 2021; Mizutani & Kanaoka, 2018; Tsukaya & Tsuge, 2001). En este contexto, el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés de *Post-Transcriptional Gene Silencing*) juega un papel vital en alcanzar dicha adaptación, modulando los niveles de expresión de ARN mensajeros (ARNm) blancos. En el corazón de este mecanismo regulatorio, y de su complejo efector RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*), se encuentran los pequeños ARN (sRNAs, del inglés *small RNAs*), pequeñas moléculas de ARN de 20-24 nt de largo que dan especificidad al sistema.

Existe una gran variedad de ARNs pequeños en las células eucariotas. En líneas generales estos se clasifican en subfamilias según sus orígenes, mecanismos de acción y en la forma que ocurre su biogénesis. Sin embargo, todos ellos tienen como punto en común que se originan a partir de un precursor de ARN doble hebra (Axtell, 2013). Estos precursores son reconocidos y procesados, según su naturaleza y estructura, por alguna de las proteínas de la familia DICER-LIKE (DCL) para dar origen a un ARN pequeño, también doble hebra. Este ARN pequeño es posteriormente cargado en una proteína AGO para conformar el complejo RISC que finalmente es dirigido hacia el ARNm target, uniéndose al mismo para desencadenar su degradación, promover el clivaje sitio-específico, inhibir su traducción o dirigir la metilación del ADN (Ameres & Zamore, 2013; Axtell, 2013; Bologna & Voinnet, 2014)(Matzke & Moshier, 2014).

En plantas existen dos grandes grupos de ARNs pequeños, los ARNs pequeños de interferencia (siRNAs, del inglés *small interfering RNAs*), producidos de a partir de ARNs doble cadena de complementariedad casi perfecta; y los micro ARNs (miARNs), que se originan de una única molécula de ARN plegada sobre sí misma para formar una particular estructura de tallo y bucle (Axtell, 2013).

A lo largo de este trabajo de tesis nos enfocaremos exclusivamente en los miARNs, con especial énfasis en su biogénesis y los mecanismos involucrados en la regulación de su procesamiento. Con el pasar de los años la vía de biogénesis de miARNs, que solía describirse como un proceso por etapas bien delimitadas ha evolucionado a una visión mucho más compleja con una progresión dinámica e

interconectada entre etapas. A través de esta tesis, exploraremos profundamente los mecanismos asociados al mantenimiento de este delicado dinamismo en la biogénesis de miARNs, focalizando nuestra atención en la búsqueda de nuevos cofactores involucrados la modulación de la misma en particular en sus etapas más tempranas.

4.1 Biogénesis de miARNs en plantas

En plantas, la biogénesis de miARNs es un proceso altamente regulado y bien descrito desde hace ya muchos años (X. Chen, 2005). Sin embargo, en la última década el descubrimiento de nuevos factores y niveles de regulación, así como ciertos cambios de paradigma en esta vía han cambiado por completo nuestra interpretación de cómo se producen los miARNs en plantas (Mencia et al., 2023; Meyers & Axtell, 2019). Como en todo proceso biológico recién descubierto, los primeros modelos de biogénesis de miARNs en plantas estaban dominados por paralelismos a su homólogo de animales. A pesar de que esto permitió rápidamente esbozar un diagrama de cómo se producían estas moléculas en el reino vegetal, con el paso del tiempo numerosos descubrimientos rompieron estos paradigmas e hicieron que el modelo diverja de su contraparte en metazoos. En ese sentido, pasamos de un modelo donde la biogénesis de miARNs era descrita como un proceso paso por paso de estilo fabril, donde cada una de las etapas se encuentra bien definida e independiente de las demás, a la concepción de un mecanismo mucho más coordinado y dinámico donde cada paso del proceso está interconectado regulatoriamente con los otros (Mencia et al., 2023). Este proceso de transición nos codujo al planteo actual de un modelo único de plantas, mucho más dinámico y flexible ante un entorno cambiante.

De forma resumida, la biogénesis de un miARN inicia con la transcripción de un gen *MIRNA* por parte de la ARN Polimerasa II (Pol II) para dar origen a un transcripto primario conocido como pri-miRNA (del inglés, *primary-miARN*). Este transcripto se pliega sobre sí mismo para adquirir una particular estructura de tallo y bucle gracias a que su secuencia contiene dos regiones complementarias suficientemente largas para formar una doble hebra. Esta particular estructura, conocida como *hairpin*, es reconocida por el complejo de procesamiento de miARNs y procesada hasta transformarla en un miARN maduro doble hebra. El complejo de procesamiento de miARNs tiene entre sus principales componentes a: la proteína de unión a ARN doble cadena HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), la endonucleasa de ARN tipo III DICER LIKE-PROTEIN 1 (DCL1) y la proteína del tipo *Zinc-finger* SERRATE (SE). Este tridente proteico corresponde a los primeros componentes de la vía en ser identificados y, a partir de los cuales, se empezaron a construir los primeros modelos (Han et al., 2004; Rogers & Chen, 2013; Vazquez et al., 2004; Wu et al., 2007; L. Yang et al., 2006). Con el correr de los años y el descubrimiento de nuevos cofactores involucrados, el nivel de sofisticación del complejo fue creciendo de manera exponencial (Achkar et al., 2016). No obstante, el núcleo central del procesamiento sigue siendo descripto comúnmente por DCL1, HYL1 y SE.

En cualquier caso, el miARN doble hebra maduro generado permanece dentro del núcleo hasta ser metilado en ambos extremos 3' por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1) y luego cargado en una proteína AGO1, para finalmente ser exportado hacia el citoplasma donde cumple su rol regulatorio mediante el silenciamiento de ARNm blancos (Bologna et al., 2018; J. Li et al., 2005; W. Park et al., 2002; Z. Yang et al., 2006).

A continuación, discutiremos con mayor profundidad los detalles del modelo actual de la vía de biogénesis de miARNs, contemplando los últimos avances y cofactores descubiertos recientemente. En ese sentido, y con el objetivo de facilitar la comprensión del modelo actual, plantaremos una división del proceso global en tres etapas: El inicio de la transcripción y ensamblado del complejo de procesamiento, el procesamiento de los miARNs y la etapa efectora. Siguiendo esta línea, la figura 1 ofrece una visión completa e integral de la biogénesis de miARNs, donde se pueden observar las características generales de cada una de las etapas mencionadas anteriormente, así como su interconectividad y dinamismo.

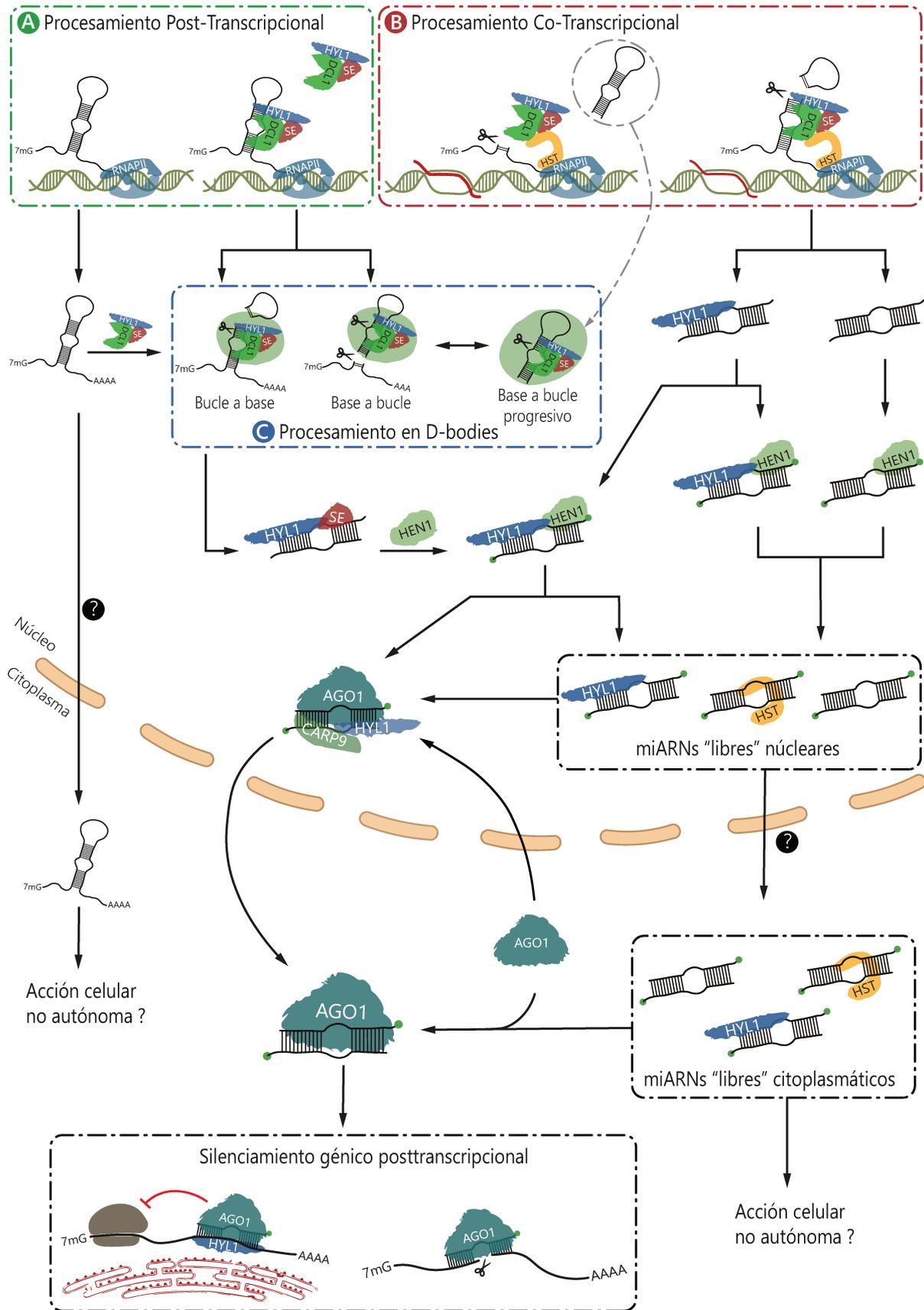


Figura 1. Representación esquemática de la maquinaria de biogénesis de miARNs. El Procesamiento de miARNs puede ocurrir tanto de manera post-transcripcional (A) como co-transcripcional (B). (B) El procesamiento co-transcripcional de los miARN y posiblemente el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento es promovido por la presencia de *R-loops* ubicados

cerca del sitio de inicio de la transcripción de los genes *MIRNA*. (C) El procesamiento del pri-miARN puede ocurrir desde la base al bucle o desde el bucle a la base, dependiendo de la naturaleza estructural del precursor. Algunos precursores que escapan a la biogénesis podrían abandonar el núcleo para ser exportados a otras células. Una vez procesado, los *dúplex* de miARN son metilados en ambos extremos 3' por HEN1, protegiéndolos de la degradación. Estos miARNs maduros pueden ser transferidos de HYL1 a AGO1 por CARP9 en el interior del núcleo. Los miARNs asociados a AGO1 abandonan el núcleo para llevar adelante el silenciamiento celular autónomo. Alternativamente, los miARNs maduros que puede salir del núcleo libres para asociarse a AGO1 en el citoplasma o abandonar la célula para cumplir funciones celulares no autónomas. Los miARNs que son cargados en AGO1 pueden desencadenar el clivaje del ARNm diana o bien inhibir la traducción de los mismos en el retículo endoplasmático en colaboración con HYL1. Figura adaptada de Mencia et al (Mencia et al., 2023).

4.1.1 Los teloneros: Inicio de la transcripción y ensamblado del complejo de procesamiento

En plantas, la mayoría de los genes *MIRNA* son unidades transcripcionales independientes. Es decir, cada locus contiene su propio promotor y terminador, sus propias regiones reguladoras y, en algunos casos, intrones (J. Wang et al., 2019). Estas características hacen que la transcripción de genes *MIRNAS* ocurra del mismo modo que para cualquier gen codificante. En ese sentido, la transcripción de un gen *MIRNA* inicia con el reclutamiento del complejo transcripcional Pol II asistido por el complejo co-activador general de la transcripción MEDIATOR (Y. J. Kim et al., 2011). Luego, el CTD (del inglés, *C-terminal domain*) de la Pol II es fosforilado por CDK;F1 y CDKD y la elongación del transcrito comienza para finalmente dar lugar a un pri-miARN (Hajheidari et al., 2012). Emulando lo que ocurre con los pre-ARNm, los pri-miARNs sufren el agregado de una caperuza protectora en su extremo 5' (5'CAP) y la poliadenilación en su extremo 3'. Además, aquellos que contengan intrones son sometidos al correspondiente proceso de *splicing* (Z. Xie et al., 2005). A pesar de que la transcripción de genes *MIRNA* recuerda la de ARN mensajeros (ARNm), en los últimos años se han identificado un importante número de cofactores proteicos que parecen regular de forma específica la transcripción de miARNs. Así, se ha descrito a NEGATIVE ON TATA LESS2 (NOT2) y CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5) actuando como reguladores generales de la transcripción de genes *MIRNA*, al interactuar con la Pol II en locus de *MIRNA* y promover su transcripción (L. Wang et al., 2013; S. Zhang et al., 2013). Además, CDC5 es también capaz de interactuar con PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) y actuar de manera sinérgica para favorecer la estabilidad de los pri-miARN y la actividad de DCL1 (S. Zhang et al., 2013, 2014).

Estos hallazgos ponen en evidencia que la maquinaria de procesamiento de miARNs es mucho más compleja que lo pensado hasta hace no muchos años. Pero más allá de eso, también abre las puertas a la idea de un reclutamiento co-transcripcional de la maquinaria de procesamiento hacia los locus de genes *MIRNA*. En ese sentido, quizás la evidencia más clara en favor de este mecanismo fue aportada por el laboratorio de Yijun Qi (X. Fang et al., 2015). En este trabajo, los autores describen una interacción directa entre el complejo ELONGATOR, típicamente asociado a los mecanismos generales de la transcripción, y el núcleo central de la maquinaria de procesamiento de miARNs (HYL1, SE y

DCL1), la cual tendría un papel clave en el reclutamiento de DCL1 a la cromatina de genes *MIRNA* (X. Fang et al., 2015). Aun cuando este reporte mostró de forma contundente que la maquinaria de procesamientos de miARNs interactúa con los loci que codifican a estas moléculas, existía evidencia previa que ya sugería esta comunión. Por ejemplo, las proteínas C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 y C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 2 (CPL1 y CPL2), interaccionan tanto con Pol II como con la maquinaria de biogénesis de miARNs regulando la transcripción a través de la desfosforilación del CTD de la Pol II y la biogénesis de miARNs modulando estabilidad de HYL1 (Koiwa et al., 2004; Manavella et al., 2012). Algo similar ocurre con THOUGH (TGH), proteína originalmente asociada a las PROTEÍNAS DE UNIÓN A TATA y que más tarde se demostró que es capaz de interaccionar no solo con pri-miARNs sino también con las proteínas HYL1, SE y DCL1 (Calderon-Villalobos et al., 2005; Ren et al., 2012). TGH es capaz de modular tanto la interacción de pri-miARNs con complejos de DCL1 así como la actividad de las proteínas DCL (Ren et al., 2012). Pero quizás la evidencia más antigua de la relación entre la maquinaria de transcripción y procesamiento recae en el rol del NUCLEAR CAP-BINDING COMPLEX (CBC) y su capacidad para unirse al 5'CAP de los pri-miARNs nacientes, promoviendo el correcto procesamiento de los mismos (Gregory et al., 2008; S. Kim et al., 2008; Laubinger et al., 2008). En este contexto, tanto CBP20 como CBP80 pueden interactuar con SE, y, adicionalmente, CBP20 es capaz de hacerlo con NOT2b.

De forma similar, la participación de proteínas regulatorias del *splicing* de ARNm en la biogénesis de miARNs deja en evidencia la interrelación entre estos dos procesos (Stepien et al., 2017). Dentro de los actores compartidos entre ambas vías se destacan SICKLE (SIC), STABILIZED1 (STA1), el complejo THO/TREX, REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 3 (RCF3), GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7 (GRP7) y JANUS (Ben Chaabane et al., 2013; T. Chen et al., 2013, 2015; Francisco-Mangilet et al., 2015; Furumizu et al., 2010; Karlsson et al., 2015a; Köster et al., 2014; Streitner et al., 2012; Zhan et al., 2012; Zhou et al., 2024). SIC es una proteína rica en prolina poco estudiada que participa en la degradación de intrones escindidos y favorece la acumulación de miARN, pero los mecanismos involucrados en tales procesos son completamente desconocidos (Zhan et al., 2012). STA1, un homólogo del FACTOR DE PROCESAMIENTO DE pre-ARNm 6 favorece la producción de miARNs, promoviendo el correcto *splicing* de los pri-miARNs y modulando los niveles del mensajero de DCL1 (Ben Chaabane et al., 2013). Los miembros del complejo THO/TREX, THO2 y EMU, son capaces de regular la producción de miARNs y el *splicing*, en un mecanismo poco entendido actualmente pero que probablemente dependan de sus funciones en la regulación de la estabilidad y el transporte de ARN (Francisco-Mangilet et al., 2015; Furumizu et al., 2010). RCF3 es capaz de interaccionar de manera directa con las proteínas RS40 y RS41 y modular el *splicing* de intrones mientras que por otro lado también es capaz de interaccionar con CPL1 y CPL2 en tejidos jóvenes para modular el estado de fosforilación de HYL1 y con ello su estabilidad y actividad (T. Chen et al., 2013; Karlsson et al., 2015a). Sumado a ello RCF3 es capaz de colocalizar con HYL1 y SE en

corpúsculos nucleares y unir pri-miARN promoviendo la biogénesis de un subconjunto de miARNs (T. Chen et al., 2015; Karlsson et al., 2015a). GRP7, por su parte, es capaz de interactuar de manera directa con ARN y pri-miARNs para modular el *splicing* alternativo y reprimir su procesamiento, respectivamente (Köster et al., 2014; Streitner et al., 2012). Por último, JANUS, un miembro del *spliceosoma*, es capaz de interactuar con SE y DCL1 para promover el ensamblado del complejo de procesamiento y la producción de miARNs. Curiosamente, también es capaz de unirse a pri-miARNs para promover la interacción de HYL1 con estos últimos.

La evidente interacción entre factores de *splicing*, reguladores de la transcripción y la maquinaria de biogénesis de miARNs son compatibles con la idea de que el procesamiento de miARNs puede ser un evento co-transcripcional. El concepto de procesamiento co-transcripcional es un tópico que discutiremos más adelante durante el desarrollo de esta tesis.

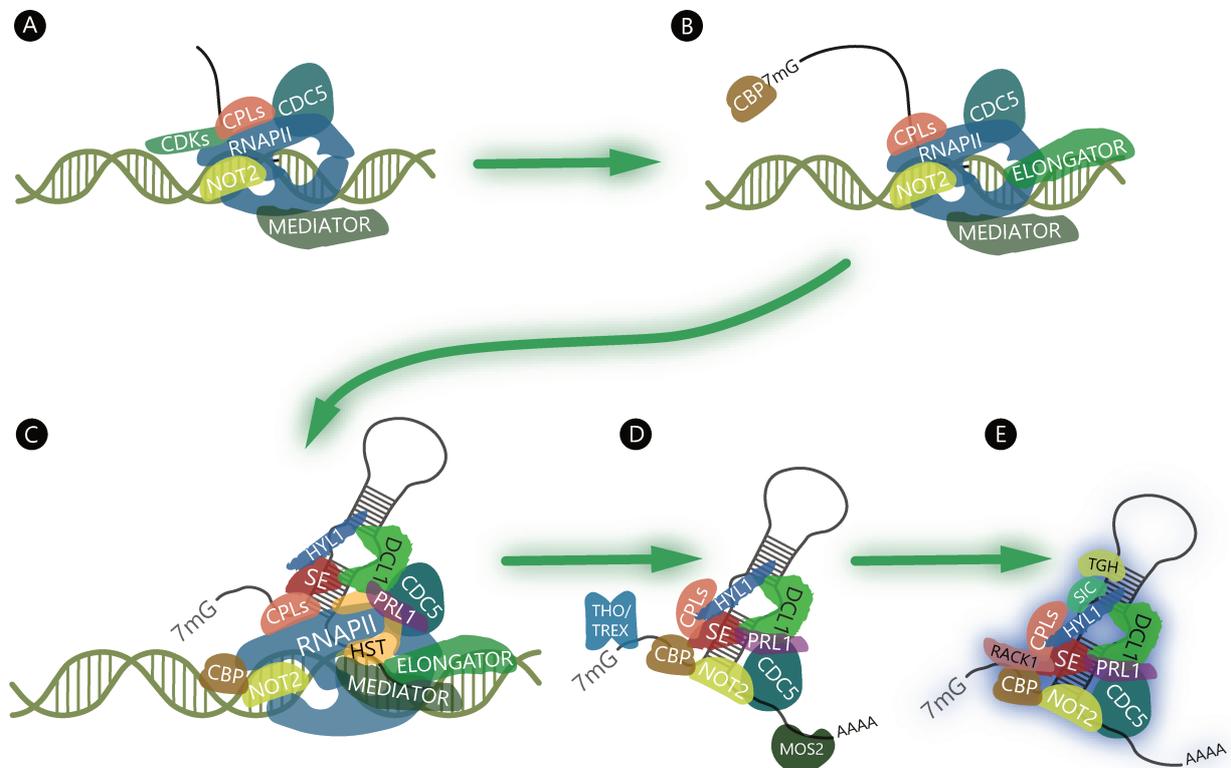


Figura 2. Representación esquemática del reclutamiento co-transcripcional de la maquinaria de biogénesis de miARNs. (A) NOT2, CDC5 y el complejo MEDIATOR son necesarios para el reclutamiento de Pol II a loci de MIRNA. Las proteínas CDKs y CPLs modulan el estado de fosforilación del CTD de la Pol II para dar comienzo a la transcripción del pri-miARN. (B) El complejo ELONGATOR se une mediante su interacción con la Pol II mientras que CBP del CAP-BINDING COMPLEX (CBC) se une al 5'-CAP del pri-miARN naciente. (C) ELONGATOR, con la asistencia de PRL1, actúa como andamio para el reclutamiento de DCL1 y del complejo de procesamiento de miARNs a los loci *MIRNA*. (D) El pri-miARN íntegramente transcrito es estabilizado por DDL mientras que la desfosforilación de HYL1 por parte de las proteínas CPLs induce su actividad. MOS2 y el complejo THO/TREX favorecen el transporte de todo este complejo a los *D-bodies*. (E) Cofactores accesorios, como RACK1, SIC1 y TGH, se unen al complejo en los *D-bodies* e inicia el procesamiento del pri-miARN según el mecanismo canónico de biogénesis de miARNs. Ilustración adaptada de Achkar et al (Achkar et al., 2016).

4.1.2 La orquesta en concierto: El procesamiento de los miARNs

Uno de los desafíos más grandes que quizás encuentra la maquinaria de procesamiento de miARNs de plantas, en comparación a su contraparte de animales, es como reconocer y procesar precisamente los miARNs maduros dentro de los precursores de miARN que, en estos organismos, presentan una gran diversidad de tamaños y estructuras. Esta variabilidad hace que DCL1, la principal enzima encargada del procesamiento de pri-miARNs, comúnmente requiera proteínas accesorias para lograr liberar el miARN maduro de forma precisa. Durante este proceso, DCL1, en colaboración con HYL1 y SE, realizará clivajes sucesivos sobre el tallo del precursor liberando el bucle y un miARN doble hebra de ~21 nt de longitud (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006; Lobbes et al., 2006; Vazquez et al., 2004; L. Yang et al., 2006). La enzima DCL1 puede operar de diferentes formas, ya sea desplazándose y clivando el pri-miARN desde la base hacia el bucle o viceversa. El mecanismo por el cual lo hace depende en gran medida de la secuencia y la presencia de nucleótidos desapareados en el pri-miARNs. Además, en pri-miARNs con regiones de ARN doble cadena muy largas, DCL1 puede actuar realizando cortes sucesivos hasta liberar el miARN correcto. El número de cortes dependerá, en gran medida, del largo del precursor propiamente dicho (Bologna & Voinnet, 2014). Por otro lado, HYL1 actúa en forma de homodimero y es la encargada de indicar el sitio correcto de corte a DCL1 mientras que SE actúa como andamiaje. Para ello, HYL1 se une al precursor en la posición exacta donde ocurrirá el corte e interactúa con DCL1 ubicándola correctamente mientras SE ayuda a orientar de manera óptima al precursor de miARN hacia el sitio catalítico de la enzima (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006; Lobbes et al., 2006; MacHida et al., 2011; L. Yang et al., 2006; X. Yang et al., 2014).

Históricamente se postuló que el procesamiento de los miARNs tenía lugar dentro de organelas nucleares sin membrana denominadas *Dicing bodies* (*D-bodies*) (Y. Fang & Spector, 2007; Q. Liu et al., 2012). Esta afirmación se fundamenta en el hecho que la mayoría de los componentes de la biogénesis de miARNs localizan dentro de estos corpúsculos (Achkar et al., 2016). En particular se postula que SE favorece la formación de estos elementos al producir la separación de fase líquido-líquido (*liquid droplets*) a partir de IDR (*Intrinsically disordered region*) presentes en su secuencia (D. Xie et al., 2021). Curiosamente, este trabajo también muestra a los miARN maduros asociados a HYL1 abandonando estos *droplets*, revelando la naturaleza dinámica de los *D-bodies* (D. Xie et al., 2021). Algo similar ocurre para el caso de las DEAD-BOX RNA HELICASES RH6, RH8 y RH12, que también poseen IDR capaces de promover la formación de *D-bodies* mediante la separación de fases líquido-líquido e interactúan con HYL1, SE y DCL1 dentro de los mismos (Q. Li et al., 2021). Sin embargo, en un contexto de infección viral RH6, RH8, RH12 son traslocadas desde el núcleo al citoplasma, disolviendo los *D-bodies*. No obstante, los niveles de miARN en estas plantas no se ven afectados, lo que sugiere que los *D-bodies* no son necesarios para la biogénesis de miARNs (Q. Li et al., 2021). Otro caso interesante de analizar viene dado por lo que sucede en las mutantes para PSR1-INTERACTING PROTEIN 1 (PINP1), donde se observa un aumento en el número de *D-bodies* que

contienen HYL1 y DCL1, pero, contrariamente a lo esperado, los niveles de miARN aparecen disminuidos (Qiao et al., 2015). Finalmente, podemos citar el caso de las mutantes en los cofactores de biogénesis de miARNs MOS4-ASSOCIATED COMPLEX 7 (MAC7), THP1 y REDUCTION IN BLEACHED VEIN AREA (RBV), las cuales presentan una disminución o la completa desaparición de *D-bodies* sin afectar la producción de miARNs (Jia et al., 2017; Liang et al., 2022; B. Zhang et al., 2020). Todos estos reportes parecen indicar que fuera de ser centros de procesamiento estos *D-bodies* podrían actuar como centros de reservas de proteínas inactivas.

Dada la pobre correlación entre *D-bodies* y el procesamiento de miARNs y el cumulo de evidencia apuntando a la interrelación entre la maquinaria de biogénesis de miARNs y el complejo transcripcional, una idea que empezó a tomar fuerza en los últimos años es la del procesamiento co-transcripcional de miARNs. Según este modelo, los pri-miARNs podrían ser procesados directamente sobre la cromatina mientras la Pol II aún se encuentra transcribiendo el pri-miARN. En ese sentido, un trabajo realizado en nuestro laboratorio demostró no solamente que esto efectivamente ocurre, sino que ambos procesos, el procesamiento co- y post-transcripcional, no son mutuamente excluyentes, es decir, la existencia de un tipo de procesamiento no restringe a la otra (Gonzalo et al., 2022). En este contexto, el procesamiento co-transcripcional se ve favorecido por la formación de *R-loops* (híbridos doble cadena entra ARN y ADN) en regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción del gen *MIRNA* (Gonzalo et al., 2022).

Estos hallazgos nos llevan a pensar en un modelo que contempla la coexistencia dinámica entre distintos modos de procesamiento en el interior de la célula, donde un mismo pri-miARN puede sufrir un tipo de procesamiento u otro dependiendo del entorno y contexto celular, situación metabólica o de estrés, etc. Sin embargo, estos descubrimientos también abren nuevas interrogantes (Manavella et al., 2023). Entre ellas se destacan el por qué existen distintos modos de procesamiento o cómo la maquinaria de biogénesis de miARNs reconoce loci de miARNs de entre todos los genes transcritos por la Pol II para asociarse a ellos específicamente. En el transcurso de esta tesis responderemos, al menos de forma parcial a esta segunda pregunta.

4.1.3 La última sinfonía: Etapa efectora de la vía

Independientemente de que los pri-miARNs sean procesados de manera cotranscripcional o postranscripcional, el resultado final es el mismo. En ambos se libera como producto final un miARN maduro doble cadena (miARN/miARN* dúplex) de 21 nucleótidos de longitud. En condiciones normales, este dúplex permanece unido a HYL1 formando un complejo binario hasta asociarse con la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1) para pasar a formar un complejo ternario y desencadenar la metilación del dúplex en ambos extremos 3' (Baranauske et al., 2015; J. Li et al., 2005; S. W. Yang et al., 2010a; Z. Yang et al., 2006; B. Yu et al., 2005).

HEN1 es posteriormente liberada del complejo y el dúplex de miARN maduro asociado a HYL1, quien con la asistencia de CONSTITUTIVE ALTERATIONS IN THE SMALL RNAs PATHWAYS 9 (CARP9), transfiere el dúplex a AGO1 que al migrar al citoplasma formará el complejo efector RISC para finalmente silenciar ARN mensajeros blanco (Tomassi et al., 2020; S. W. Yang et al., 2010a).

Durante muchos años se creyó que la carga del miARN en AGO1 y el consecutivo ensamblaje del complejo RISC ocurría exclusivamente en el citoplasma. En ese sentido, se señaló a la exportina HASTY (HST) como la proteína responsable del transporte del *dúplex* desde el núcleo al citoplasma, basándose casi exclusivamente en su homología con la EXPORTINA 5 (XPO5) de humanos y su rol en animales (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Mee et al., 2005; Yi et al., 2003). Esta idea, aunque comúnmente citada, encontró casi de inmediato detractores dado que mutantes en *HST* presentan niveles disminuidos de miARNs, pero la distribución entre núcleo y citoplasma de las poblaciones generales de miARNs no se ve afectada (Mee et al., 2005). Sumado a ello, nuevos trabajos surgieron mostrando que HYL1 es capaz de interactuar con AGO1 en el núcleo celular, sugiriendo el ensamblado del RISC podría ocurrir, o al menos iniciar, en dicho compartimento (Y. Fang & Spector, 2007). En línea con esto, se ha descrito que HYL1 podría estar involucrada en el proceso de selección del miARN guía una vez que dúplex miARN/miARN* ha sido cargado en AGO1 (Eamens et al., 2009; Manavella et al., 2012).

La evidencia más clara en contra del rol de HST en el transporte de miARNs proviene del hallazgo realizado por Bologna y colaboradores, donde se demuestra que la propia AGO1 es la proteína responsable de transportar el miARN maduro desde el núcleo al citoplasma (Bologna et al., 2018). Es decir, este trabajo no sólo demuestra que AGO1 es la encargada del transporte sino también que la primera etapa del ensamblado del RISC, el proceso de carga del miARN en AGO1, ocurre en el núcleo. Reforzando esta idea, se ha demostrado que HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) y SQUINT/CYCLOPHILIN 40 (SQN/CYP40) colaboran con dicho proceso al menos de manera parcialmente nuclear (Bologna et al., 2018; Earley & Poethig, 2011; Iki et al., 2012). Por su parte, TRN1 también es capaz de interactuar con AGO1 tanto en el núcleo como en el citoplasma, participando de manera sinérgica en este mismo proceso (Cui et al., 2016). Ya cargada, AGO1 abandona el núcleo hacia el citoplasma para completar el ensamblado del RISC y continuar con su acción efectora una vez hallado el ARNm *target* (Bologna et al., 2018). En línea con lo discutido hasta aquí, se ha identificado a THP1, componente del complejo TREX-2, formando parte del mecanismo de transporte de los miARN. THP1 interactúa con la nucleoporina NUP1 en la envoltura nuclear, favoreciendo el proceso de exportación al citoplasma de los complejos miARN:AGO1 (B. Zhang et al., 2020). Sin embargo, también se ha descrito la presencia de un reservorio de miARN no asociados a AGO1 en el citoplasma, sugiriendo la existencia de un mecanismo de exportación secundario que es independiente de AGO1 (Dalmadi et al., 2019).

En cuanto al rol de HASTY, a partir de un estudio proveniente de nuestro laboratorio fue posible demostrar que dicha proteína está involucrada en una etapa mucho más temprana de la biogénesis de miARN (Cambiagno et al., 2021a). HST funciona enlazando los procesos de transcripción y reclutamiento de la maquinaria de procesamiento, a través de su interacción con varias proteínas de la familia MEDIATOR y con la misma DCL1 (Cambiagno et al., 2021a). Este trabajo aporta más evidencia en contra de la asociación que previamente existía entre HASTY y el transporte nuclear de miARNs.

Sea cual sea el camino, una vez finalizado el proceso de ensamblado del RISC, AGO1 será la responsable de llevar adelante el silenciamiento de ARNm blanco. Para ello, existen dos mecanismos posibles: el clivaje sitio específico del ARNm blanco o la inhibición de su traducción (X. Chen, 2009; P. Li et al., 2011; Y. Yu et al., 2017). El principal determinante del tipo de mecanismo que se llevará adelante tiene que ver con la complementariedad de secuencia existente entre un miARN y su ARNm blanco. Un apareamiento casi perfecto dará lugar al clivaje del ARNm mientras que las imperfecciones en el apareamiento desplazan el equilibrio hacia la inhibición traduccional. Dado que en plantas, los miARN tienen a presentar una alta complementariedad de secuencia con sus respectivos ARNm blanco, el clivaje del mensajero es el mecanismo predominante (X. Chen, 2009; German et al., 2008; Jones-Rhoades et al., 2006). Esta complementariedad de secuencia es particularmente importante entre los nucleótidos 10 y 11 ya que es un requisito para la actividad catalítica como endonucleasa de las proteínas AGO (German et al., 2008; Llave et al., 2002), (Arribas-Hernández et al., 2016).

4.1.4 miARNs móviles

Los miARNs no sólo son capaces de desencadenar el silenciamiento génico postranscripcional en el interior de la célula que les dio origen. Estas pequeñas moléculas pueden ser exportadas y ejercer su función tanto en células próximas como lejanas. En el caso del movimiento proximal, los miARNs son capaces de desplazarse de una célula otra a través de los plasmodesmos, alcanzando un rango de aproximadamente 4-6 células (Skopelitis et al., 2018). Por otro lado, los mecanismos involucrados en el transporte de miARNs entre células o tejidos distantes aún están lejos de ser comprendidos. De hecho, aun desconocemos si los miARNs se mueven en su forma libre o si es necesaria su asociación con proteínas o complejos especializados. Tampoco conocemos la identidad exacta de la molécula involucrada en dicho movimiento; es decir, si se trata de un miARN maduro, un dúplex de miARN, o incluso un pri-miARN. En los últimos años, ciertos hallazgos han aportado evidencia interesante en este campo de estudio. En primer lugar, se ha descubierto que AGO1 es una proteína autónoma de la célula y que su unión a los miARNs provoca su retención en el interior celular, evitando así que actúen de forma móvil (Brioudes et al., 2021; Fan, Zhang, et al., 2022). En concordancia con esto, no se ha detectado la presencia de AGO1 ni de complejos RISC en el floema (Brioudes et al., 2021; Brosnan et al., 2019; Carella et al., 2016).

Estas observaciones, junto con el hallazgo mencionado anteriormente que señala la presencia de un subconjunto de miARNs no asociados a AGO1 en el citoplasma (Dalmadi et al., 2019), nos llevan a pensar en la existencia de dos subconjuntos de miARNs funcionalmente diferentes. Los miARNs unidos a AGO1, que permanecerán en la célula de origen para llevar adelante su actividad de silenciamiento; y los miARNs libres, que no son cargados en AGO1 y pueden salir de la célula para cumplir funciones distales. En ese sentido, también se ha observado que KATANIN (KTN1), proteína involucrada en el mantenimiento de la dinámica de los microtúbulos, actúa inhibiendo la carga de miARNs citoplasmáticos en AGO1 favoreciendo así su exportación (Fan, Zhang, et al., 2022). Por último, HST, proteína sobre la cual ya hemos discutido previamente, parece tener un rol crucial en el transporte de miARNs. La evidencia muestra que HST sería necesaria tanto para el movimiento de miARNs de célula a célula como para el movimiento de célula a floema, a pesar de no estar involucrada en transporte núcleo/citoplasma (Brioudes et al., 2021; Cambiagno et al., 2021a; Z. Zhang et al., 2017). Curiosamente, este proceso no involucra exportar a HST fuera de la célula y su actividad sería sólo requerida en las células donde el miARN móvil es producido (Brioudes et al., 2021).

4.2 Preguntas abiertas en el estudio de la biogénesis de miARNs

A lo largo de esta tesis, se ha destacado cómo el descubrimiento de nuevos cofactores en la biogénesis de miARNs ha cambiado nuestra visión del modelo canónico de procesamiento, llevándolo hacia uno de mayor dinamismo y complejidad. Si bien es cierto que DCL1, HYL1 y SE continúan siendo los actores centrales de este mecanismo, los hallazgos recientes han revelado la acción de una plétora de co-factores, de los cuales ignoramos en su mayoría sus mecanismos bioquímicos y moleculares de acción. Aun así, el estudio de estos nuevos cofactores evidenció la existencia de múltiples puntos de regulación, lo que sugiere que la biogénesis de miARNs puede ajustarse en respuesta al ambiente. Este cambio de perspectiva y los nuevos y excitantes descubrimientos de los últimos años ha dado lugar a nuevas preguntas en una vía que muchos consideraban completamente dilucidada:

4.2.1 El rol de la temperatura en la eficiencia del procesamiento

DCL1 se asocia de manera preferencial a pri-miARNs gracias al reconocimiento de su particular estructura de tallo y bucle imperfecta y utiliza diferentes características estructurales como guías para llevar adelante el procesamiento (Bologna et al., 2013; Manavella et al., 2019). En función de ello, no es de extrañar que las alteraciones en el plegamiento de los pri-miARNs tengan un marcado impacto en la eficiencia de su procesamiento (Z. Wang et al., 2018).

Si tenemos en cuenta la naturaleza no termogénica de las plantas, nos encontramos con que la temperatura ambiental podría actuar como un modulador de la estructura de los pri-miARN y, en consecuencia, de su procesamiento. A partir de ello, es posible pensar en la posibilidad de que ciertos pri-miARNs funcionen como termosensores, modificando su estructura en función de los cambios de temperatura y alterando así la eficiencia de su procesamiento, con el objetivo de modular respuestas moleculares a dicha condición térmica. Respaldando esta hipótesis, la evidencia parece mostrar que efectivamente ocurre un procesamiento diferencial de miARNs en respuesta a los cambios de temperatura (Re et al., 2024). No obstante, el mecanismo involucrado detrás de esta regulación está lejos de ser comprendido y se requieren nuevos esfuerzos en esa dirección con el objetivo de lograr comprender detalladamente dicho proceso.

Por otro lado, se sabe que los pri-miARNs pueden ser editados por diferentes enzimas, cambiando o modificando bases puntuales (Bhat et al., 2020; Mingardi et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento se desconocen los efectos de estas modificaciones en el procesamiento y si las mismas podrían funcionar como un mecanismo regulatorio en particular haciendo a los pri-miARNs, más o menos plásticos a cambios en la temperatura.

4.2.2 El reclutamiento cotranscripcional del complejo de procesamiento

Mucho se ha discutido hasta aquí acerca del reclutamiento co-transcripcional de la maquinaria de procesamiento a los locus de genes *MIRNA*. Aunque este proceso ha sido descrito en trabajos previos (Cambiagno et al., 2021b; X. Fang et al., 2015), existen grandes interrogantes acerca de cómo la maquinaria de procesamiento es capaz de reconocer específicamente estos loci por sobre cualquier otra región transcrita por Pol II. Se ha demostrado previamente que la presencia de un pri-miARN es necesaria para el reclutamiento de la maquinaria en el locus correspondiente (X. Fang et al., 2015), sugiriendo que la estructura de tallo y bucle presente en el transcripto pri-miARN naciente podría actuar como el rasgo distintivo que le da la especificidad a este reclutamiento. Por otro lado, la evidencia muestra que el procesamiento co-transcripcional de miARNs parecería estar favorecido en aquellos loci donde se forman *R-loops* antisentido (Gonzalo et al., 2022). Este hecho da lugar a una segunda hipótesis, la cual plantea la posibilidad de que sea esta estructura híbrida la responsable de desencadenar el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento a la cromatina. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia concluyente que respalde esta idea ni el orden jerárquico que define como se ensambla el complejo sobre loci *MIRNA*. Identificar si alguna de las proteínas accesorias, o principales, del complejo de procesamiento tiene afinidad por los *R-loops* es un hito a lograr en los próximos años a fin de comenzar a responder esta interrogante.

Otra pregunta fascinante es si el reclutamiento cotranscripcional de la maquinaria de procesamiento podría ejercer un control transcripcional sobre los loci *MIRNA*. Una hipótesis que se puede plantear es si la sobreacumulación de uno o más factores de procesamiento en la cromatina como resultado de la sobreproducción de pri-miARNs podría modular de manera indirecta la actividad transcripcional del mismo actuando como un sistema tampón para limitar la producción de miARNs. En ese sentido, sería crucial determinar si algún componente de la maquinaria de procesamiento es capaz de reclutar factores de transcripción o remodeladores de la cromatina a los locus *MIRNA*.

4.2.3 La relación entre procesamiento de miARNs y el *splicing*

La interconexión entre el *splicing* y el procesamiento de miARNs ha sido evidenciada en numerosos estudios a lo largo de los años (Görnemann et al., 2005; S. Kim et al., 2008; Laubinger et al., 2008; Raczynska et al., 2014; Stepien et al., 2017). Al margen de la regulación existente sobre aquellos miARNs intrónicos o pri-miARNs que contienen intrones, se han identificado algunos casos en que la maquinaria de *splicing* regula la biogénesis de miARNs. Un ejemplo notable es RNA DEBRANCHING ENZYME1 (DBR1), una proteína típicamente asociada al *splicing*. En *A. thaliana* las mutantes nulas para este gen son letales; mientras que los alelos mutantes débiles muestran una acumulación de lazos de intrones, acompañada de una localización incorrecta de las proteínas DCL1 y HYL1 causada por un secuestro de estas proteínas por el exceso de lazos sin procesar (Z. Li et al., 2016). Otro caso relevante es el del factor de *splicing* AAR2, que puede asociarse con el complejo de procesamiento de miARNs (HYL1, DCL1 y SE) y modular su actividad mediante la desfosforilación y degradación de HYL1 en el citoplasma (Fan, Gao, et al., 2022). Aunque estos ejemplos sugieren interacción entre ambas vías también es posible que sean funciones disociadas de estas proteínas. El descubrimiento reciente del procesamiento co-transcripcional de miARNs vuelve a poner a la interacción el splisiosoma y el complejo de procesamiento de miARNs en primera plana. En particular porque este descubrimiento ubica a ambas maquinarias espacialmente en el mismo sitio. Esto abre la pregunta si la interacción entre vías es una asociación de cooperativa y de retroalimentación positiva, o, por el contrario, se trata de una competencia entrópica entre ambos complejos por la unión al pri-miARN naciente.

4.2.4 Co-transcripcionalidad y miARN móviles

Comprender como se mueven los miARNs de una célula a otra ha sido el “santo grial” del campo de estudio. A pesar de los esfuerzos aun desconocemos como lo hacen, la naturaleza de las moléculas móviles y porque solo algunos miARNs parece moverse. Hasta la fecha las únicas proteínas que parecen críticas para el movimiento de miARNs son HST y KTN1 (Brioudes et al., 2021; Fan, Zhang, et al., 2022). HST interviene en etapas muy tempranas del procesamiento, favoreciendo el reclutamiento de

la maquinaria de procesamiento a los loci *MIRNA* y, potencialmente, promoviendo el procesamiento co-transcripcional (Cambiagno et al., 2021a; Gonzalo et al., 2022). KTN1 mantiene la dinámica de los microtúbulos e inhibe la carga de miARNs en AGO1 y favoreciendo su proceso de exportación (Fan, Zhang, et al., 2022). Sin embargo, en ambos casos el mecanismo asociado a su rol en el movimiento de miARNs es desconocido. Un aspecto que parece crítico para el movimiento de miARNs es su asociación con AGO1 ya que ha sido postulado que una vez cargados en estas moléculas se tornan incapaces de salir de la célula (Voinnet, 2022a).

Llamativamente, se ha visto que los pri-miARNs que tienen una alta proporción de procesamiento co-transcripcional suelen dar origen a miARNs móviles y que tienden a ser poco cargados en AGO1 (Gonzalo et al., 2022). Esta observación da lugar a la hipótesis de que aquellos miARNs procesados co-transcripcionalmente podrían evadir el proceso de carga en AGO1 y serían exportados hacia el citoplasma por una vía alternativa. Una vez allí, conformarían el subconjunto de miARNs libres capaces de moverse de una célula a otra. En principio, esto podría explicar el impacto positivo que tiene HST en el movimiento de miARNs, considerando que su función es la de promover el procesamiento co-transcripcional.

Sumado a ello, HST también tiene capacidad para unir miARNs maduros (Cambiagno et al., 2021a). Esta característica permite plantear una segunda posibilidad en la que un subconjunto de miARNs podría abandonar el núcleo unido a HST para luego conformar la porción de miARNs citoplasmáticos capaces de moverse de una célula a otra.

Durante el desarrollo de esta tesis, abordaremos, al menos de manera parcial, algunas de estas interesantes preguntas. En particular, nos enfocaremos en dilucidar cómo la maquinaria de procesamiento de miARNs logra reconocer los loci *MIRNA* por encima de otros, y cómo, a partir de este reconocimiento, es capaz de interactuar con otros complejos proteicos y reclutarlos para modular la actividad transcripcional de estos loci, especialmente en respuesta a situaciones de estrés.

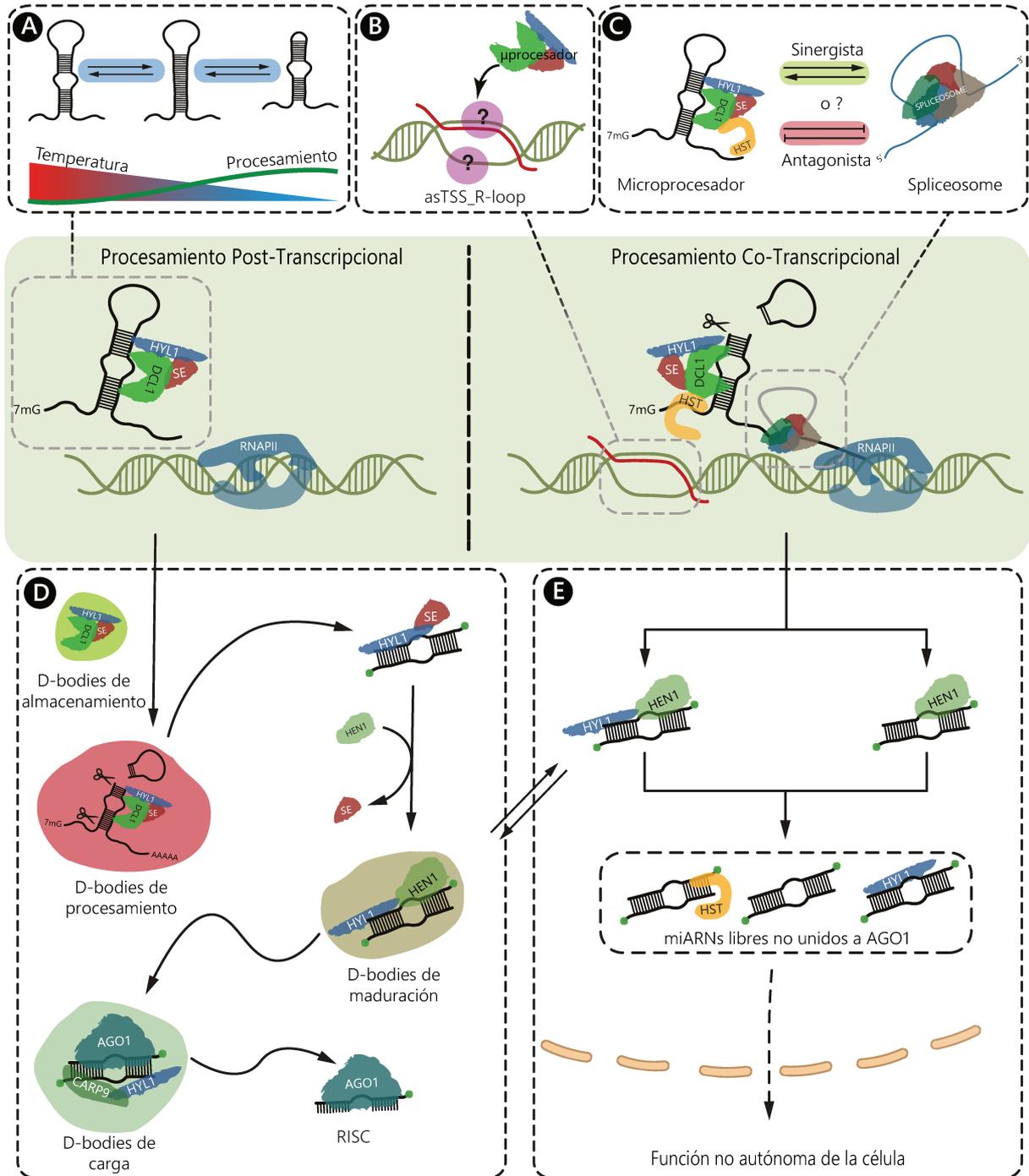


Figura 3. Preguntas aún no resueltas acerca de la vía de biogénesis de los miARNs. (A) ¿Pueden los cambios en la eficiencia de procesamiento causados por el refolding de los pri-miARNs en respuesta a la temperatura actuar como termosensores en la respuesta de la planta al calor? (B) ¿Existen proteínas capaces de unirse específicamente a los ssDNA o *R-loops* y actuar como andamio en el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento al loci de MIRNA? (C) ¿Como interactúan entre sí el spliceosoma y el complejo de procesamiento de miARNs? (D) ¿Es posible definir diferentes tipos de D-bodies? De ser así, ¿Podemos definir de manera precisa la bioquímica dentro de los mismo durante su proceso de maduración? (E) ¿Existe una diferencia funcional entre los miARNs procesados de manera co-transcripcional y los procesados post-transcripcionalmente? ¿Pueden los primero definirse como miARNs móviles? Figura adaptada de Manavella et al (Manavella et al., 2023).

5. OBJETIVOS

La biogénesis de los miARNs es un proceso complejo y dinámico del cual hemos expandido considerablemente en nuestra comprensión en los últimos años, gracias a la caracterización de nuevos cofactores. El vínculo entre esta maquinaria con la regulación de la transcripción y el complejo de procesamiento, emergieron como uno de los aspectos más intrigantes en los últimos años. En particular como el complejo de procesamiento reconocer loci *MIRNA* y si cumple algún efecto regulatorio sobre la transcripción son aspectos fascinantes de la vía aun no resueltos.

En este contexto, esta tesis tiene como objetivo general abordar estas preguntas fundamentales, con especial atención en tres aspectos clave: (1) cómo la maquinaria de biogénesis de miARNs puede actuar como modulador directo de la transcripción, (2) los mecanismos que median el reclutamiento de esta maquinaria a regiones específicas de la cromatina, y (3) el papel específico de HYL1 en estos procesos. A través de esta línea de investigación, buscamos no solo aportar un mayor entendimiento de los mecanismos que gobiernan la biogénesis de los miARNs, sino también identificar nuevos niveles de regulación que conecten este proceso con respuestas epigenéticas y transcripcionales frente a estímulos internos y externos.

5.1 Objetivos específicos

- Estudiar los efectos que la acetilación de histonas, mediada por proteínas identificadas en un *screening* genético, producen sobre la vía de miARNs en plantas, tanto a nivel transcripcional como en su procesamiento.
- Determinar si existe una interacción directa entre alguno de los componentes del complejo de procesamiento y la maquinaria de remodelación de la cromatina.
- Evaluar si el dominio C-terminal de HYL1 podría actuar como un modulador de la actividad de la proteína, tanto en sus roles canónicos como no canónicos.
- Analizar la relevancia funcional del dominio C-terminal de HYL1, evaluando si su presencia le permite a HYL1 interactuar diferencialmente con otras proteínas para cumplir funciones actualmente desconocidas.

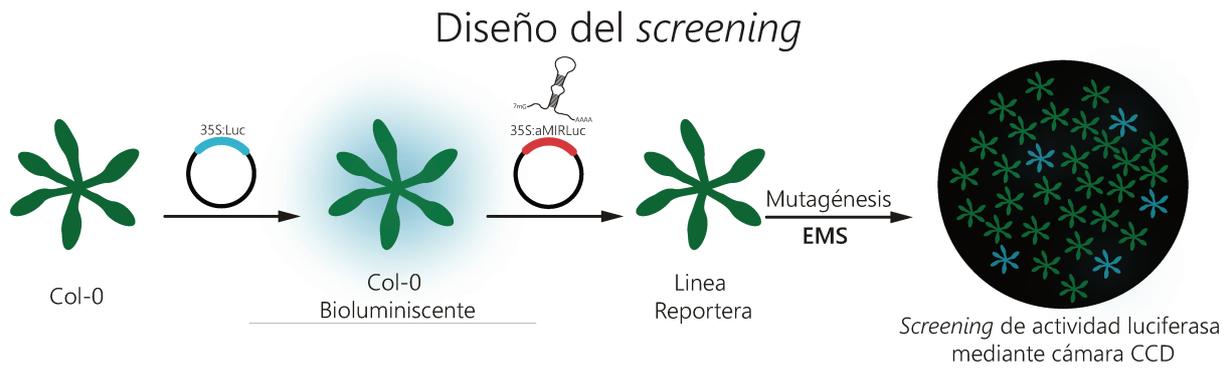
CAPÍTULO 1

***“EL COMPLEJO HOS15-HDA9 SE ASOCIA A HYL1
PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE miARNs EN
RESPUESTA A LA SEÑALIZACIÓN POR LA
HORMONA ABA”***

6. CAPITULO 1

6.1 Introducción

La avalancha de nuevos cofactores de la biogénesis de miARNs identificados en plantas en los últimos años es el resultado *screenings* genéticos basados en diferentes sistemas reporteros realizados en paralelo en distintos laboratorios (Fan, Zhang, et al., 2022; Francisco-Mangilet et al., 2015; Karlsson et al., 2015b; Liang et al., 2022; Manavella et al., 2012; J. Park et al., 2023; Ré et al., 2019; Tomassi et al., 2020). Entre ellos, el Dr. Pablo Manavella, director de esta tesis, desarrolló un sistema reportero en el que la expresión constitutiva del gen que codifica la enzima Firefly Luciferase está siendo continuamente silenciada post-transcripcionalmente por un miARN artificial (amiRLuc) especialmente diseñado para este propósito (Manavella et al., 2012). Plantas transgénicas expresando este sistema fueron sometidas a un proceso de mutagénesis química al azar por EMS y se identificaron como mutantes deficientes en actividad de miRNA a aquellas que presentaron una recuperación de la actividad de bioluminiscencia. Esta recuperación en la bioluminiscencia actúa como un indicador de que la biogénesis y/o actividad de los miARNs está fallando, permitiendo potencialmente identificar nuevos factores en la vía. Los polimorfismos causantes de la pérdida de actividad de miARNs fueron aislados e identificados por secuenciación de genomas completos seguido de mapeo *SHORE* (Schneeberger et al., 2009). A partir de las mutantes generadas en este screening se han logrado identificar y caracterizar por nuestro laboratorio numerosos factores involucrados en la biogénesis de miARNs (Francisco-Mangilet et al., 2015; Karlsson et al., 2015b; Manavella et al., 2012; J. Park et al., 2023; Ré et al., 2020; Tomassi et al., 2020). A lo largo del primer capítulo de este trabajo de tesis, discutiremos los resultados y hallazgos obtenidos a partir de la caracterización de una de esas mutantes. Específicamente, discutiremos la identificación y caracterización del rol de HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15 (HOS15) en la biogénesis de miARNs.



Selección y mapeo de las candidatas seleccionadas

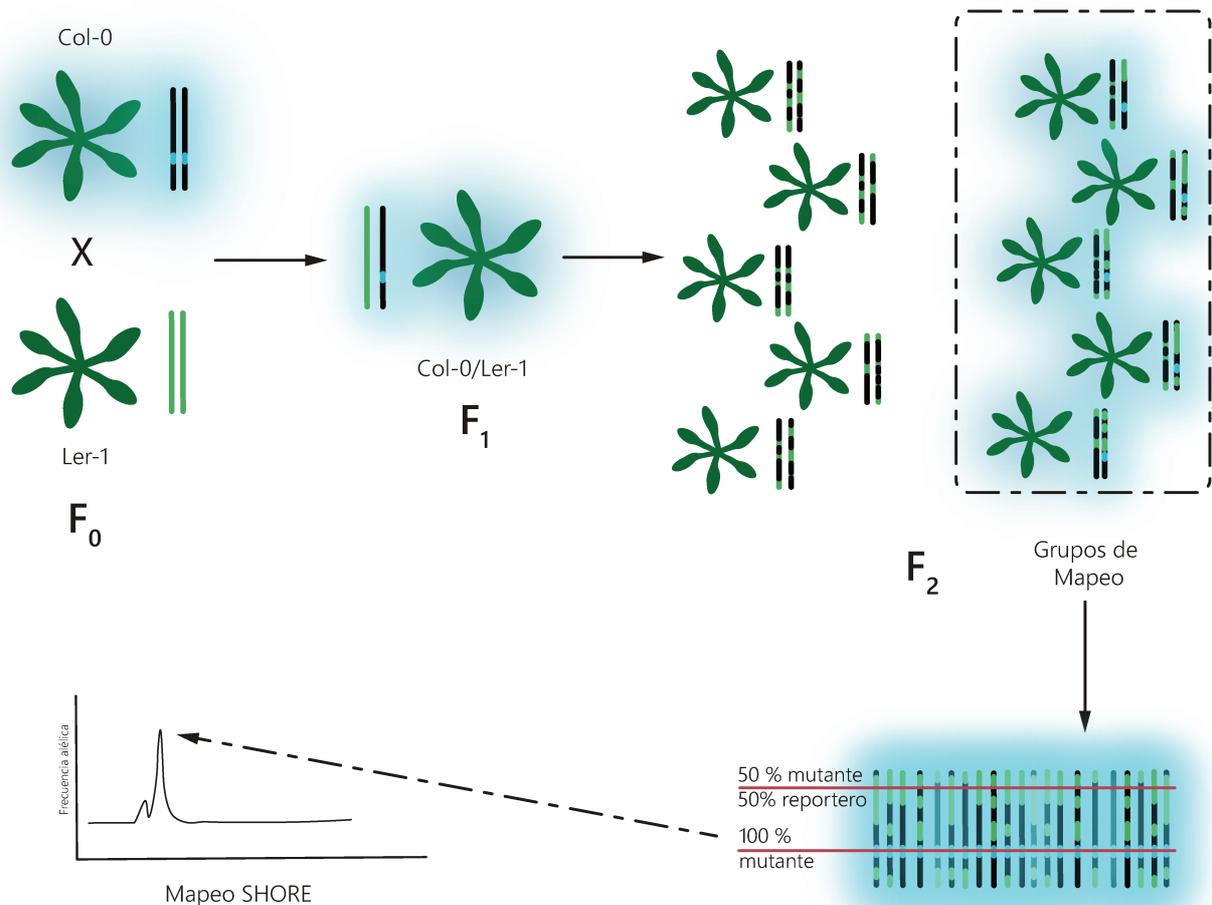


Figura 4. Esquema representativo del proceso de mutagénesis y *screening* para la obtención de alelos mutantes en la biogénesis de miARNs. Plantas salvajes de ecotipo Col-0 fueron transformadas secuencialmente con construcciones 35S:Luciferasa y 35S:amiRLuc, que le permitieron sobreexpresar de manera constitutiva la enzima Luciferasa y un miARN artificial capaz de silenciarla. Aquellas plantas cuyo silenciamiento de la Luciferasa resultó exitoso y perdieron la bioluminiscencia fueron seleccionadas y sometidas a un proceso de mutagénesis química por EMS. De las mutantes obtenidas, se monitorearon y seleccionaron aquellas con bioluminiscencia restaurada. Estas líneas mutantes fueron cruzadas con un ecotipo Ler-1, diferente al de sus progenitoras, a fin de eliminar mutaciones secundarias y polimorfismos asociados al mismo. La progenie obtenida se monitoreó y se seleccionaron líneas homocigotas en función de su capacidad de bioluminiscencia para su posterior secuenciación de genoma completo y mapeo de mutaciones mediante SHOREmapping (Schneeberger et al., 2009).

6.1.1 HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15 (*HOS15*)

HOS15 fue descrito por primera vez en el año 2008 como un ortólogo del TRANSDUCIN-BETA-LIKE1 (TBL1) de humanos, un componente del complejo NUCLEAR RECEPTOR CO-REPRESSOR 1/SILENCING MEDIATOR OF RETINOIC ACID AND THYROID HORMONE RECEPTOR (NCoR1/SMRT) que actúa como un módulo de regulación negativa para la transcripción de genes de diferentes vías (J. Zhu et al., 2008). En este trabajo, se describe a *HOS15* como un regulador negativo de los genes de respuesta al estrés por frío en plantas, modulando los niveles de acetilación de la cromatina y en particular de las histonas H4 (J. Zhu et al., 2008). Estructuralmente, *HOS15* es una proteína de 613 aminoácidos compuesta por un motivo LisH en su extremo N-terminal y 8 repeticiones WD40 en su C-terminal. Para el motivo LisH se predice una estructura de dos α -hélices y está usualmente asociado a procesos de unión entre proteínas y principalmente dimerizaciones (Gerlitz et al., 2005; M. H. Kim et al., 2004; Mateja et al., 2006). Por otro lado, para las repeticiones en tándem WD40 suelen estar involucradas en procesos de transducción de señales, interacciones proteína-proteína, formación de grandes complejos proteicos, dentro de los cuales resultan particularmente interesantes los de actividad E3-ubiquitin ligasa (D. Li & Roberts, 2001; Smith et al., 1999; van Nocker & Ludwig, 2003).

Posteriormente, se descubrió que *HOS15* facilita el reclutamiento de deacetilasas de histonas a los promotores de genes involucrados en una gran variedad de rutas biológicas como la proliferación celular, la inmunidad, la floración y la senescencia de hojas (Lim et al., 2020; H. J. Park et al., 2019a; Shen et al., 2020). Además, *HOS15* puede actuar como un receptor de sustratos del complejo E3-UBIQUITIN LIGASE en respuesta a estrés como sequía y frío para desencadenar la degradación de OPEN STOMATA 1 (OST1) y HISTONE DEACETYLASE2C (HD2C), respectivamente (Ali et al., 2019; J. Park, Lim, Shen, et al., 2018). Esta interacción se ve debilitada en presencia de la hormona ABA (Ali et al., 2019).

Esta doble funcionalidad de *HOS15* se hace evidente en los mecanismos de respuesta a estrés por frío, en los cuales *HOS15* promueve la modificación de la compactación de la cromatina desde un estado represivo hacia uno más permisivo. En condiciones normales, el complejo represor formado por POWERDRESS (PWR), *HOS15* y HD2C promueve la deacetilación de histonas y la compactación de la cromatina, regulando negativamente la expresión de múltiples genes COLD-REGULATED (COR). Sin embargo, en respuesta a estrés por frío *HOS15* promueve la degradación mediada por proteasoma de HD2C. Esto favorece el reclutamiento de ACETILTRANSFERASAS DE HISTONAS (HATs) al locus de los genes COR para promover la acetilación de histonas, relajando la cromatina y favoreciendo la activación transcripcional de los genes COR (Lim et al., 2020; J. Park, Lim, Shen, et al., 2018).

Al igual que HYL1, *HOS15* es capaz de interactuar con el factor de *splicing* RS40, que vincula al spliceosoma y la cromatina (J. Park, Lim, Khan, et al., 2018). Sumado a ello, experimentos de

inmunoprecipitación asociada a espectrometría de masa (IP-MS) mostraron que el complejo HOS15/HDA9/PWR es capaz de interactuar con otras proteínas de unión al ARN como RS41, RNAPII e incluso HYL1 (Mayer et al., 2019). Esto sugiere una posible interconexión entre la transcripción y el procesamiento de pri-miARNs. En concordancia con esto, análisis de transcriptómica realizados en las mutantes *hos15-2* y *hda9-1* muestran una marcada alteración en los niveles de transcriptos involucrados en el silenciamiento génico mediado por miARNs y el *splicing* (Mayer et al., 2019).

6.1.2 El equilibrio HATs/HDACs y su impacto en la expresión génica

La accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN constituye un aspecto fundamental a la hora de activar la expresión génica y se encuentra fuertemente influenciada por el nivel de compactación de la cromatina (Luo et al., 2013). Mientras que una cromatina altamente compactada ofrece una baja accesibilidad y un impedimento para la transcripción, un bajo nivel de compactación favorece el acceso de la maquinaria y el desarrollo del proceso transcripcional (Berger, 2007; Marmorstein & Roth, 2001). Por su parte, este proceso se encuentra fuertemente regulado por el equilibrio entre distintos mecanismos de remodelación de la cromatina dentro de los cuales se destacan la metilación y acetilación de histonas, siendo este último de particular interés para el desarrollo de este capítulo de tesis (Lee & Grant, 2018).

El nivel de acetilación de una histona es el resultado de un delicado balance entre la actividad de las HATs y las HDACs (Lee & Grant, 2018). Las primeras se encargan de acetilar histonas, lo que conduce a una neutralización de la carga positiva intrínseca de estas proteínas y la consecuente desestabilización de la interacción histona-ADN (Fransz & De Jong, 2002; Roth et al., 2001). Esta menor interacción, da como resultado una cromatina más accesible y un ADN más expuesto a la interacción con los diferentes factores de transcripción (Fransz & De Jong, 2002; Lee & Grant, 2018). Por otro lado, las HDACs promueven la desacetilación de histonas, favoreciendo la interacción histona-ADN y volviéndolo menos accesible a la transcripción. En términos generales, es posible concebir a las HATs como promotoras de la transcripción y a las HDACs como represoras de dicho proceso. No obstante, debemos ser cuidadosos y tener en cuenta que no se trata de dos procesos meramente excluyentes sino de una dinámica de coexistencia entre ambos (Lee & Grant, 2018).

Hasta aquí hemos descrito el rol que las HAT y HDACs tienen en la regulación de la transcripción génica en general y también como HOS15 es capaz de interactuar con algunas de las HDACs para modular de manera específica la transcripción de ciertos genes en respuesta a estrés por frío. Sin embargo, no existe evidencia clara que establezca una relación entre estos procesos y la biogénesis de miARNs. De hecho, no existía evidencia que indique una interacción entre la maquinaria de

procesamiento de miARNs y los remodeladores de la cromatina haciendo que la identificación de HOS15 en nuestro *suppressor screening* sea sumamente relevante. Durante el transcurso de este capítulo de tesis, expondremos el fascinante hallazgo de como estas dos vías de regulación son capaces de interconectarse entre sí para modular a nivel transcripcional la vía de biogénesis de miARNs.

6.2 Capítulo 1: Objetivos

A partir de la colección de mutantes disponible en nuestro laboratorio seleccionamos un nuevo alelo mutante de *HOS15*, *hos15-3*, con el objetivo de llevar adelante su caracterización en el contexto de la biogénesis de miARNs. En ese sentido, nos proponemos la caracterización fenotípica y molecular de esta mutante e investigar el mecanismo molecular involucrado en la regulación de miARNs por esta proteína.

6.3 Capítulo 1: Materiales y métodos

6.3.1 Análisis de ADN

6.3.1.1 Plásmidos

pENTR™/D-TOPO®: vector de entrada (Life Technologies) que permite el clonado direccional de productos provenientes de reacciones de amplificación en cadena (PCR) con extremos romos. Para tal fin, es necesario agregar la secuencia de 4 nucleótidos CACC, en el extremo 5' del cebador sentido, complementario al extremo sobresaliente GTGG del vector, permitiendo una única orientación de clonado. El vector lineal contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. El sitio de clonado direccional TOPO® está flanqueado por las regiones de homología attL1 y attL2 para permitir la recombinación LR en vectores Gateway de destino. Este vector posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *E. coli*.

pEn-Sa-Chimera: vector de entrada conteniendo la secuencia de la estructura de ARN *scaffold* que permite el clonado de las guías de CRISPR correspondientes a la región del genoma que se desea mutagenizar, bajo el control del promotor U6 de *Arabidopsis thaliana*. El vector se corta con la enzima de restricción BbsI y los extremos cohesivos generados son complementarios a las secuencias flanqueantes de las guías a clonar previamente diseñadas con ese objetivo. El sitio de clonado direccional está flanqueado por las regiones de homología attL1 y attL2 para permitir la recombinación LR en vectores Gateway de destino. Este vector posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *E. coli*. El vector fue amablemente cedido por el laboratorio del Dr. Holger Puchta (Puchta, 2017).

pDe-Sa-CAS9: Vector de destino conteniendo la secuencia de la CAS9 de *Staphylococcus aureus* bajo el control del promotor de Ubi4-2. Se utiliza para la transformación y expresión en plantas de dicha enzima y su correspondiente guía, la que se inserta en un segundo sitio dentro del mismo vector mediante la recombinación LR. El vector fue amablemente donado por el laboratorio del Dr. Holger Puchta (Puchta, 2017).

pTop V2: vector de entrada (Enzymomics, Daejeon, Korea) que permite el clonado directo de los productos de PCR gracias a que es un vector lineal con extremos T protuberantes. El vector lineal contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. Este vector posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *E. coli*.

pFK209: Es un vector de destino Gateway de la serie pFK derivado del plásmido pGREEN-11S (Hellens et al., 2000) en el cual se reemplazó el gen de resistencia a kanamicina por el de

espectinomicina. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Parte de las secuencias necesarias para la replicación, como el gen de la replicasa RepA, se encuentran en el plásmido pSoup, que provee la funcionalidad necesaria para la replicación del vector pGREEN-11 en *A. tumefaciens*, para lo que se debe co-transformar con ambos vectores. Este vector posee el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV y confiere resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

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

pFK241: vector de destino Gateway de la serie pFK derivado del plásmido pGREEN-IIS (Hellens et al., 2000) en el cual se reemplazó el gen de resistencia a kanamicina por el de espectinomicina. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Parte de las secuencias necesarias para la replicación, como el gen de la replicasa RepA, se encuentran en el plásmido pSoup, que provee la funcionalidad necesaria para la replicación del vector pGREEN-II en *A. tumefaciens*, por lo que se debe co-transformar con ambos vectores. Este vector posee el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV, seguido de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP, del inglés enhanced Green Fluorescent Protein), y confiere resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

pJV117: Es un vector de destino Gateway de la serie pJV derivado del plásmido pGREEN-11S (Hellens et al., 2000). Este vector posee un promotor 35S CaMV, seguido de la secuencia que codifica para la proteína mCherry.

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

pDESTTM22: Es un vector de destino Gateway (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de activación de la proteína GAI4 (GAI4AD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores pUC, y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia ARS4/CEN6 de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen TRP1 como marcador de selección en medios carentes de triptofano para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAI4AD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH1). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

pDESTTM32: 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 IEU2 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 pDEST22TM 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 pDEST32TM 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.

6.3.1.2 Construcciones genéticas

Para el ensayo de complementación de fenotipo de las mutantes *hos15-2* y *hos15-3*, se amplificaron la región codificante de HOS15 mediante RT-PCR de ARN de plantas de *A. thaliana* y la versión genómica conteniendo la región promotora (3000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción) mediante PCR de ADN genómico y se clonaron en el vector pENTRTM/D-TOPO[®]. Luego se realizó la recombinación de dichas construcciones en los vectores destino pFK205 y pFK209, según corresponda. Además, la versión codificante de HOS15 fue recombinada en los vectores pFK241, pJV117, pDEST22 y pDEST32, en función de las diferentes necesidades experimentales.

Para la generación de las mutantes mediante la técnica de CRISPR/Cas9 las guías fueron ordenadas en forma de oligonucleótidos y clonadas, mediante la técnica de cortes con enzima de restricción y posterior ligado, en el vector de entrada pEn-Sa-Chimera. El clonado resultante fue recombinado finalmente en el vector destino pDe-Sa-CAS9 para la posterior transformación en plantas.

Todos los oligonucleótidos y guías necesarias para los clonados mencionado se encuentran detallados en el anexo 2.

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

La amplificación de fragmentos de ADN para clonados, análisis de líneas transgénicas, y chequeo de construcciones obtenidas ya sea directamente sobre colonias de bacterias transformadas o sobre ADN plasmídico, se llevó a cabo mediante PCR. En cada reacción se utilizó solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, dNTP 0,2 mM y 0,4 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y luego se le agregó 0,3 U de enzima Taq ADN polimerasa (AP Biotech) para reacciones de chequeo, o Pfu ADN polimerasa (Thermo Scientific) para amplificaciones de fragmentos a ser clonados, por cada 10 μL de volumen de reacción. Los volúmenes finales de reacción fueron de 20 μL para chequeos o 50 μL para amplificaciones de fragmentos a clonar. Finalmente se procedió con la reacción de amplificación según los objetivos del experimento. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: [30 segundos 94° C, 30 segundos (T_m - 5) ° C, t a 72° C] x 35 ciclos + 7 min a 72° C, donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados [T_m = 2(A+T) + 4(G+C)], y el tiempo (t) de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. Para las reacciones con Taq ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar, mientras que para Pfu ADN polimerasa el tiempo estimado fue de 2 min por cada 1000 pb. Los productos de amplificación fueron resueltos y visualizados en geles de agarosa de concentración variable según el tamaño del fragmento de ADN y usando el marcador de peso molecular Trans2k Plus II (AP Biotech) como referencia como se detalla en el punto 6.3.1.4. La combinación de oligonucleótidos empleada en cada caso se detalla en el anexo 2.

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

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

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

6.3.1.5 Purificación de fragmentos de ADN

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

6.3.1.6 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway

En los casos en los que se utilizó como vector de clonado el plásmido de entrada pENTR™/D-TOPO®, se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, se mezclaron 2.3 µL del producto de PCR purificado, 0.2 µL del vector comercial y 0.5 µL de solución salina provista con el vector. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min a 2 h, y se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes inmediatamente.

6.3.1.7 Recombinación Gateway en vectores de destino

Los clonados por recombinación Gateway en los vectores de la serie pGREEN IIS, pDEST™ (Invitrogen), pAS017 y pProExHta-IR-phi (Invitrogen) utilizando la enzima LR Clonase™ (Invitrogen) se realizaron según las instrucciones del fabricante de la enzima. Brevemente, se mezclaron 150 ng del vector de entrada con el fragmento a recombinar, 100 ng del vector destino, 0.5 µL de LR Clonase™ y se llevaron a un volumen final de 3 µL con solución amortiguadora TE 1x. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 a 4 h, y se procedió a la transformación de bacterias.

TE IX: Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L.

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

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

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

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación descrito para *E. coli* (MicroPulser™, Bio-Rad Laboratories inc., USA). A las células competentes se les adicionó 1 µL del plásmido de interés y 0.3 del plásmido pSoup. Inmediatamente luego del pulso eléctrico en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad), las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB y se incubaron durante 2 hs a 28 °C. A continuación, se centrifugaron a 1500 g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en 100 µL de medio LB. Se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con gentamicina (5 µg/mL) y rifampicina (50 µg/mL), por la resistencia cromosómica de las bacterias, tetraciclina (50 µg/mL) para el plásmido pSoup, y el antibiótico correspondiente al plásmido de interés con el que se transformó. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (48-72h). Para la identificación de las bacterias transformadas se realizó PCR en colonia siguiendo la misma metodología explicada para *E. coli*.

6.3.1.10 Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina (Bimboim & Doly, 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 µL solución 1 de minipreparación. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µL de solución 2 de minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µL de solución 3 y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 min antes de ser centrifugada a 13000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le realizó una extracción con 1 volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó por 10 min a 10000 g y a temperatura ambiente, y el ADN plasmídico presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol frío. La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13000 g por 10 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. Para los casos en que fue necesario eliminar el ARN, las minipreparaciones se trataron con ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0.5 µg/µL a 37 °C por 1 h.

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

6.3.1.11 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 ABI3730X1. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron provistos en forma electrónica y analizados usando el software Snapgene.

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

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

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

6.3.1.13 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para los ensayos de ChIP se realizó un paso previo de enriquecimiento de núcleos de muestras obtenidas de 3 g de plántulas siguiendo el protocolo de fraccionamiento núcleo/citoplasma descrito en 6.3.4.3. Los núcleos extraídos se resuspendieron en 500 µL de solución de lisis nuclear. La cromatina se fragmentó utilizando un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (10 ciclos de 30 s de pulsos a alta intensidad/30 s sin pulsos). Los residuos nucleares se sedimentaron y el sobrenadante se diluyó diez veces con solución de dilución de ChIP. La inmunoprecipitación se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche con 100 µL de *beads* magnéticas lavadas, Sure Beads™ Protein-A (Bio-Rad) y la cantidad recomendada de anticuerpo. Después de lavar cinco veces con solución de dilución de ChIP, las *beads* se resuspendieron en 100 µL de TE 1X y se agregó 1 µL de proteinasa K 20 mg/L (Qiagen). Las muestras se incubaron a 43 °C durante 1 hs y la proteinasa K se inactivó mediante una incubación a 95 °C durante 10 min. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a máxima velocidad, y finalmente se utilizaron 1,5 µl para las reacciones de qPCR. Se realizaron controles negativos con muestras en las que no se incluyeron anticuerpos específicos. La combinación de oligonucleótidos empleada en cada caso se detalla en el anexo 2.

Solución de lisis nuclear: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS 1% (p/V), PMSF 1 mM, inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail 1% (p/V) (Roche).

Solución de dilución de ChIP: Triton X-100 1,1% (V/V), EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8,0, NaCl 167 mM.

TE IX: Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L.

6.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron compradas a lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las líneas mutantes insercionales *hyl1-2* (SALK_064863), *hos15-2* (GABI_785B10), *hda9-1* (SALK_007123) fueron adquiridas del *Arabidopsis Biological Resource Centre* (ABRC), Ohio State University, OH, USA. La mutante *hos15-3* pertenece a una colección de mutantes obtenidas por un proceso de mutagénesis por EMS durante un screening de mutantes deficientes en la actividad de miARNs (Manavella et al., 2012) y fue caracterizada a lo largo de esta tesis y en su publicación asociada (J. Park et al., 2023).

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

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

6.3.2.1 Tratamientos farmacológicos

Para los experimentos de secuenciación de miARNs y ARN mensajeros, plántulas de 12 días fueron rociadas con ácido abscísico (ABA) 50 μM 3 hs antes de la toma de muestra.

Para los tratamientos hormonales, plántulas de 10 días se colocaron durante en medio MS con ácido abscísico (ABA) 100 μM . La combinación de tiempo de tratamiento y concentración de la hormona fue especificada particularmente en cada experimento.

Para los experimentos con α -amanitina, plántulas de 14 días fueron desplantadas y sumergidas en placa de ½ MS líquido en presencia y ausencia de α -amanitina (Sigma-Aldrich) 10 μ M. Las muestras fueron tomadas luego de 3 hs de tratamiento.

6.3.2.2 Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para la transformación estable de plantas de *Arabidopsis*, se utilizó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* previamente transformada con las construcciones de interés, utilizando el método de inmersión floral (*floral dip*) (Clough & Bent, 1998). Las plantas se crecieron hasta floración en las condiciones descritas anteriormente. Cuando el número de inflorescencias y la calidad de las flores fue el adecuado, se procedió a la transformación. Para preparar la suspensión de transformación, las células de *A. tumefaciens* se cultivaron durante 16 hs en agitación a 28 °C en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se utilizó para inocular un Erlenmeyer que contenía 200 mL del mismo medio suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 hs en agitación a 28 °C). Luego se precipitaron por centrifugación a 2000 g durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 5% (p/V) que contenía 40 μ L del detergente Silwet L77 (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron de 30 a 60 segundos, evitando que la solución de transformación entre en contacto con la roseta de las plantas y la tierra. Luego, las macetas fueron ubicadas en posición horizontal en una bandeja, se taparon con film autoadherente y se llevaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el film adherente, se colocaron en posición vertical y se crecieron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra). Cuando las vainas alcanzaron la maduración y se secaron, se cosecharon las semillas y se guardaron en cámara fría (4°C) para su posterior selección. Las semillas transgénicas fueron seleccionadas en placas de Petri con 50 mg/L de kanamicina y posteriormente trasplantadas a tierra, o directamente seleccionadas en tierra con una dilución 1/1000 (V/V) del herbicida Basta® (Bayer) cuando el agente de selección era glufosinato de amonio. Se utilizaron 10 líneas transgénicas con eventos de inserción independientes para continuar con los ensayos que fueron necesarios.

6.3.2.3 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito por de Felipe y Weigel (Felipe & Weigel, 2010). Para ello, se crecieron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés por 16 hs en agitación a 28 °C. En todas las transformaciones transitorias que se realizaron, se incluyó una construcción que expresa la proteína viral p19, la cual actúa suprimiendo el silenciamiento mediado por ARNs pequeños mediante la captura de sARNs de 21-25 nucleótidos (Canto et al., 2006; Westhof, 2004). Los cultivos fueron centrifugados a 2000 g por 5 min a 4 °C, los pellets celulares fueron resuspendidos en solución amortiguadora de infiltración e incubados por 3-4 hs en agitación suave. Pasado ese tiempo, se llevaron

todos los cultivos a una $DO_{600}=0,5$ y se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 4:1 (Construcción de interés: p19) para los ensayos de localización celular. Finalmente, se infiltró con cada combinación la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 días de *Nicotiana benthamiana* con jeringas de 1 mL sin aguja.

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

6.3.3 Análisis de ARN

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

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

TRIZOL casero:

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

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

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

Para la preparación de dos geles desnaturalizantes de poliacrilamida (PAA) al 17% (m/v) se siguió la siguiente receta: en un tubo falcon de 50 mL agregar 6,375 mL de acrilamida/bis-acrilamida 40% (37,5:1), 6,3 g de urea, 3 mL de 5X TBE, y llevar a 15 mL volumen final con agua miliQ estéril. Se calentó la mezcla a 50° C hasta que la urea se disolvió y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 20 µL de APS 25% y 7.5 µL de TEMED. Armados los geles en sus respectivos soportes, se los dejó polimerizar por 60 min y luego se los pre-corrió a 180V en 1X TBE durante 60 min. Durante la pre-corrída, se realizó la preparación de las muestras de ARN mezclando 1 volumen de solución de siembra de ARN 2X con 1 volumen de muestra conteniendo 2 µg de ARN total, se calentaron por 5 min a 95 °C, se enfriaron rápidamente en hielo, se las mezcló en vortex durante 5 segundos y finalmente se les realizó una centrifugación rápida a 4 °C. Terminada la pre-corrída, se sembraron las muestras en el gel, previa limpieza de los pocillos del gel con una jeringa con aguja para eliminar restos de PAA no polimerizada y de urea no disuelta. Se corrió el gel a 180V en 1X TBE hasta que el marcador del frente de corrída azul de bromofenol salió del gel, aproximadamente unos 90 min. Finalizada la corrída electroforética, se realizó la transferencia del ARN a una membrana de nylon cargada negativamente (Amersham Hybond-N+), utilizando el sistema de transferencia semi-seco *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), durante 1 hora a 10 V y 400 mA. Luego, se secaron las membranas y se fijó covalentemente el ARN con luz UV a 12000 µJ/cm³ en un UV Crosslinker (Stratagen).

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

Para la detección de los ARNs pequeños con las sondas marcadas con digoxigenina, primero se incubaron las membranas con solución de bloqueo por 30 min en agitación lenta para bloquear las membranas. Luego, se incubaron por 1 hora con la solución de anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo. Previo a la detección, se lavaron las membranas 4 veces con solución de lavado en agitación fuerte por 10 min y posteriormente se equilibraron las membranas por 5 min en solución de detección. Las membranas ya equilibradas se colocaron en un folio, se aplicó solución *CSPD ready-to-use* (Roche) en la superficie de cada membrana, y se incubó 10 min a 37°C en oscuridad para activar el reactivo. Se eliminaron los excesos de líquido, se selló el folio y se expuso a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas *ECL Hyperfilm* (Amersham) según la intensidad de la señal esperada. Finalmente, las películas radiográficas fueron reveladas con

soluciones reveladora y fijadora (AGFA). La secuencia de las sondas empleadas en cada caso se detalla plenamente en el anexo 2.

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

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

Solución de bloqueo: 1% p/p Blocking Reagent (Roche) en solución de ácido maleico Solución de anticuerpo: 1:20.000 anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo.

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

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

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

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

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

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

6.3.3.4 Transcripción reversa (RT)

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

6.3.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las RT-qPCRs (del inglés RetroTranscribed quantitative PCRs) se realizaron en un termociclador Mx300SP (Stratagene, La Jolla, CA, USA), en un volumen final de reacción de 20 µL conteniendo 1X solución amortiguadora para Taq ADN polimerasa (Transgen Biotech), 0,2 µM de cada oligonucleótido específico (especificados en la Tabla 2), dNTPs 0,2 mM, 1/40 EvaGreen® (Biotium), 1/40 de la

reacción de retrotranscripción, y 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Transgen Biotech). La fluorescencia fue medida a 72 °C durante 40 ciclos de PCR. Para todas las medidas se utilizaron tres réplicas biológicas independientes de conjuntos de plántulas. Como genes de referencia fueron utilizados ACTINA2 (At3g18780) y ACTINA8 (At1g49240) (Charrier et al., 2002) para la normalización de los niveles de expresión de los transcritos analizados. Los promedios de triplicados biológicos y EEM se calcularon a partir de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y el error se mostró como dos veces EEM. Cada réplica se trató como muestras independientes para el análisis estadístico. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante un análisis de test T no pareado y se corrigieron con el método de Holm-Sidak para comparaciones de varios pares. Aquellos p-valores menores que 0.05 fueron marcados en las figuras como **, mientras que los valores inferiores a 0.01 como *. La combinación de oligonucleótidos empleada en cada caso se detalla plenamente en el anexo 2.

6.3.3.6 Secuenciación de ARNs y ARNs pequeños

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

6.3.3.7 Análisis bioinformáticos

Primero se procesaron las lecturas de sARNs para remover los adaptadores del extremo 3' usando Trim_galore! con la opción small_rna (versión 0.4.2). El mapeo se realizó con STAR (version 2.5.2b) con los siguientes parámetros: outFilterScoreMinOverLread 0; outFilterMatchNmin16; outFilterMatchNminOverLread 0; outFilterMismatchNoverLmax 0.05; seedSearchStartLmax 30; alignIntronMax 1 alignEndsType Local. Se usó como referencia de precursores y miARNs maduros de *A. thaliana* la base de datos de miRBase (release 21). Los miARNs producidos por distintos miembros de una familia y con secuencias idénticas fueron colapsados bajo un único identificador de miARN. Adicionalmente, las lecturas fueron mapeadas al genoma de *A. thaliana* y a los precursores de miARNs de miRBase, también con el programa STAR. Para el análisis de expresión diferencial de miARNs, solo se consideraron las lecturas que mapeaban a los miARNs maduros con una longitud de 24 nt o menos, y se contaron los alineamientos primarios de lecturas que mapeaban a la hebra sentido (filtrado con “samtools view-F 272”). Los recuentos por miARN se usaron como input para DESeq. Se descartaron

los miARNs con niveles bajos de expresión (menos de 10 recuentos en todas las muestras) y se establecieron los factores de tamaño de acuerdo con el número total de lecturas mapeadas al genoma para cada muestra.

Las lecturas de ARNm primero se filtraron mapeándolas al ARN ribosomal 18s con Bowtie2 (versión 2.2.6). Las lecturas no mapeadas luego se alinearon al genoma de *A. thaliana* (versión TAIR9) usando Tophat2 (versión 2.1.0) con la anotación de genoma TAIR10 y los siguientes parámetros: no-novel-juncs, read-edit-dist 1, read-gap-length 0, max-multihits 1. Finalmente, los genes diferencialmente expresados fueron encontrados con cuffdiff (versión 2.2.1) usando los parámetros predeterminados por el programa.

6.3.3.8 Ensayos de procesamiento in-vitro de pri-miARNs

Las secuencias de pri-miRNA se obtuvieron de miREX2.0 (Zielezinski et al., 2015). Las secuencias de pri-miRNA fusionadas con la secuencia promotora T7 en el extremo 5' se amplificaron mediante PCR y se clonaron en pTop V2 (Enzynomics, Daejeon, Corea). Los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas y se purificaron en gel de agarosa para la transcripción in vitro, la cual se realizó utilizando el kit de transcripción MEGAscript T7 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transcritos se etiquetaron internamente con [α - ^{32}P]UTP (PerkinElmer) durante la transcripción in vitro. El ARN transcrito in vitro se purificó utilizando el Xenopure Nucleotide Removal Kit (Xenohelix) y luego se utilizó para el ensayo de procesamiento de pri-miRNA in vitro, realizado como se describió previamente (H. Zhu et al., 2013) con algunas modificaciones. El pri-miRNA transcrito in vitro se plegó calentándolo durante 2 min a 95 °C y enfriándolo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los ensayos de procesamiento de pri-miRNA in vitro se realizaron en un volumen total de 20 μL con un tampón de procesamiento de pri-miRNA, que incluía los transcritos de pri-miRNA etiquetados con [α - ^{32}P]UTP (20,000 cpm). La fracción nuclear se mezcló con la mezcla de reacción y se incubó a 37 °C durante 2 h. Los productos de ARN procesados se purificaron utilizando el Xenopure Nucleotide Removal Kit (Xenohelix) y se separaron en un gel de urea-PAGE desnaturante al 13%. El gel se secó utilizando un secador de gel (GD 2000 Vacuum Gel-Drying System; Hoefer, Holiston, MA, EE.UU.) a 60 °C durante 1.5 h. Las señales de ^{32}P se detectaron utilizando un escáner de imágenes por fósforo (Amersham, Cytiva).

Tampón de procesamiento: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 53 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 7.5 mM ATP y 1 mM GTP

6.3.4 Análisis de Proteínas

6.3.4.1 Extracción de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*

Para el análisis de muestras por *Western Blot*, se extrajeron proteínas de *pools* de plantas que variaron según el experimento. Se agregaron 100 μ L de solución de extracción de proteínas por cada 100 mg de tejido molido. Luego se centrifugó durante 20 min a 16000 g y 4 °C, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL, teniendo así los extractos proteicos listos para continuar con el *Western Blot*. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Invitrogen). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

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

6.3.4.2 Separación de proteínas y análisis por western blot

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales según lo descrito por Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida del 8 o 14% (p/V), con geles superiores de concentración del 6% (p/V). Los extractos proteicos a sembrar fueron mezclados con solución de siembra Laemmli 5X en una relación 4:1, respectivamente, y luego incubados por 10 min a 105 °C con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética en solución de corrida 1X. A continuación, se equilibraron los geles incubándolos 10 min en solución de transferencia 1X y se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Amersham) pre-activada con metanol 100%, por el método estándar de transferencia húmeda en tanque, con solución de transferencia 1X. Para determinar el peso molecular de las bandas y para confirmar la eficiencia de transferencia se utilizó el marcador de peso molecular pre-teñido *PageRuler Prestained Protein ladder* (Thermo Scientific). Terminada la transferencia, se dejó incubando toda la noche la membrana en solución de bloqueo a 4 °C y agitación suave. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a visualizar en solución de bloqueo, durante 2 hs a temperatura ambiente y en agitación suave constante. Después de 3 lavados por 10 min con solución TBS-T 1X, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario IgG policlonal conjugada con HRP (Agrisera AS09602; dilución 1: 20.000) para detectar anticuerpos primarios, por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 min con solución TBS-T 1X, se transfirió la membrana a un folio de plástico transparente, se le agregó por arriba 1 mL del sustrato *ECLTM Prime Western Blotting System* (GE Healthcare), se eliminaron los excesos de líquido,

y finalmente se realizó la exposición a temperatura ambiente durante tiempos variables en películas radiográficas *ECL Hyperfilm* (Amersham) según la intensidad de la señal deseada. HYL1 y SE se detectaron usando un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína endógena de *Arabidopsis* (Agrisera AS06136 y AS09532; dilución 1:10000 en ambos casos). Como controles de carga en diferentes experimentos se utilizaron ACTINA 8 (Agrisera AS132640; dilución 1:10.000), HISTONA 3 (Agrisera AS10710; dilución 1:10.000), o tinción con rojo Ponceau S.

Solución de siembra laemmlí 5X: 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol 50% (V/V), SDS 10% (p/V); azul de bromofenol 0.05 % (p/V); β -mercaptoetanol 25% (V/V).

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

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

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

Solución de bloqueo: leche en polvo 5% (p/V) en TBS-T 1X o BSA 3% (p/V) en TBS-T 1 X.

6.3.4.3 Fraccionamiento núcleo/citoplasma

El fraccionamiento núcleo/citoplasma se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por Wang y col. (W. Wang et al., 2011). Brevemente, se pulverizaron en mortero muestras de plantas (2,5 g) en hielo con 2 mL/g de solución de lisis suplementado con PMSF 200 μ M (solo para fraccionamiento de proteínas). El homogenato se filtró a través de una capa de Miracloth, y la fase acuosa se centrifugó a 1500 g durante 10 min. El sobrenadante (fracción citoplasmática) se centrifugó a 10000 g y 4°C durante 10 min para eliminar restos de sedimentos, y el sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo Eppendorf y congelado inmediatamente. El sedimento se lavó de 3 a 5 veces con 5 mL de solución NRBT y luego se resuspendió en 500 μ L de solución NRB2 suplementado con el inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, solo para los fraccionamientos de proteínas). La resuspensión se pipeteó cuidadosamente sobre 700 μ L de solución NRB3 complementado con el inhibidor de proteasas Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, solo para los fraccionamientos de proteínas). El gradiente de sacarosa obtenido se centrifugó a 16000g y 4 °C durante 1 a 3 min, dependiendo de la cantidad de núcleos purificados. Para la extracción de proteínas, el sedimento se resuspendió en 100 μ L de solución de lisis y se sonicó en un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (10 ciclos de 30 segundos de pulsos a alta intensidad/30 segundos sin pulsos). A continuación, se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se recolectó como la fracción proteica nuclear. Como controles de calidad y carga del fraccionamiento, se utilizaron un anticuerpo anti-ACTINA8 como marcador citoplasmático e Histona H3 como marcador nuclear.

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

Solución NRB1: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, glicerol al 25%, MgCl₂ 2,5 mM, Triton X-100 0,2% (V/V).

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

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

6.3.4.4 Ensayos de Co-Immunoprecipitación (Co-IP) seguido de Western blot.

Para los ensayos de Co-IP se emplearon muestras obtenidas de plántulas transgénicas de *Arabidopsis* co-transformadas con las construcciones correspondientes y hojas de *N. benthamiana* transformadas de manera transitoria según lo descrito en 6.3.2.3.

Tres gramos de material vegetal fue sometido a un proceso de crosslinking con formaldehído 37% e infiltrado al 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, según lo detallado en 6.3.4.2. Luego de sonicar las muestras, 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) y al anticuerpo específico correspondiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Culminada la incubación con las beads magnéticas, se realizaron lavados con *ChIP dilution buffer* y se incubaron las muestras durante 1 hs a 65°C, para revertir el *crosslinking*. Luego, se agregaron 200µL de buffer Laemmli conteniendo Urea (0.24 g/mL) y se incubó durante 10 min a 95 °C. Posteriormente, se detectaron las proteínas de interés en la fracción de IP mediante *Western blot* usando el anticuerpo correspondiente en cada determinación, que se detalla en cada uno de los paneles.

ChIP dilution buffer: 1,1% Triton X100; 1,2 EDTA; 16,7 mM Tris-HCl pH8.0; 120 mM NaCl.

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).

6.3.5 Ensayos en levaduras

6.3.5.1 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 bien crecidas 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 cultivo se usó para inocular a 100 mL de YPDA, y se creció 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 minutos a 4°C y el pellet se lavó con 100 mL de agua bidestilada estéril fría. Nuevamente se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a 4°C y se repitió el proceso de lavado reduciendo el volumen a 50 mL de agua bidestilada estéril fría. A continuación, se realizó una última centrifugación idéntica y luego de extraer el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en el agua remanente del volcado, que luego fueron traspasados a tubos de 2 mL y centrifugados durante 5 minutos a 4000 g a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M, se centrifugó 5 minutos a 4000 g a 4°C y se descartó nuevamente el sobrenadante para finalmente resuspender el precipitado en un volumen de 100-200 µL de sorbitol 1 M. Se alicuotaron las levaduras en distintos tubos para proceder con la transformación. Para esto último, se tomaron 60-80 µL de células competentes, y se agregó 1 µg de ADN de cada construcción. La mezcla de las células con los plásmidos de interés se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad). El pulso eléctrico se realizó ajustando las variables de electroporación según las recomendaciones del fabricante (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Inmediatamente luego del choque eléctrico, las células de *S. cerevisiae* se recuperaron en 1 mL de sorbitol 1 M. Consecutivamente, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente luego de lo cual se plaquearon en medio YNB selectivo -LT (*Yeast Nitrogen Base* [YNB] 7,6 g/L, glucosa 20 g/L, suplemento DO -leu -trp (Clontech) 0,64 g/L, agar 15 g/L) en todos los casos suplementado con sorbitol 1 M.

6.3.5.2 Ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H)

Los ensayos de doble híbrido en levaduras (Fields, 1993) se realizaron siguiendo las instrucciones descriptas 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 OD₆₀₀ = 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.

6.3.6 Análisis de fluorescencia

6.3.6.1 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Para los ensayos de localización subcelular, se transformaron de manera transitoria hojas de *N. benthamiana*. Pasadas 72 hs de la infiltración, se llevó a cabo la visualización y captura de imágenes con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Solms, Alemania). Para tal fin, las capturas se

realizaron con un lente 40x o 60x, excitando las muestras con los láseres de 488 nm y 552 nm, y recolectando la emisión a 500-530 nm y 600-630 nm para eGFP y mCherry respectivamente, agregando una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. Se utilizó una apertura del *pinhole* de 1, una ganancia con valores de 700-850, y una potencia de láser que varió en un rango entre 0,5% y 20% según la proteína a visualizar. El procesamiento de las imágenes se realizó en el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

6.3.7 Cepas bacterianas y de levaduras empleadas

Escherichia coli, DH5 α [F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1] (Hanahan, 1983).

Agrobacterium tumefaciens, GV3101 [C58 (rif r) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentr) Nopaline]. Esta cepa contiene el plásmido Ti tipo nopalina pMP90 (pTiC58DT-DNA) sin la función propia de transporte, pero el ADN-T del vector binario puede transferirse correctamente. El plásmido pTiC58DT-DNA contiene los genes VIR y resistencia a gentamicina. La cepa presenta resistencia cromosomal a rifampicina (Koncz & Schell, 1986).

Saccharomyces cerevisiae, MaV203 [MAT α ; leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ 200; ade2-101; cyh2^R; can1^R; gal4 Δ ; gal80 Δ ; GAL1::lacZ; HIS3_{UASGAL1}::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3] (Leanna & Hannink, 1996)

6.4 Capítulo 1: Resultados

Muchos de los resultados expuestos a lo largo de este capítulo fueron obtenidos de manera conjunta en colaboración con los grupos de investigación del Dr. Dae-Jin Yun (*Department of Biomedical Science and Engineering, Konkuk University, Seoul, South Korea*) y del Dr. Seong Wook Yang (*Department of Systems Biology, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, Korea*).

6.4.1 Identificación de HOS15 como cofactor de la biogénesis de miARNs a partir de un screening genético directo

A partir del *screening* genético realizado por el Dr. Manavella (Manavella et al., 2012) se ha logrado aislar una colección de plantas mutantes deficientes en biogénesis de miARNs. Para el desarrollo de este trabajo de tesis, nos enfocamos en la caracterización de una de estas líneas mutantes que presenta mutaciones en las secuencias codificantes de ocho genes localizados en el cromosoma 5. Cada uno de estos alelos se presenta como un posible candidato a ser responsable del déficit en la actividad de miARNs y del fenotipo aberrante de estas plantas. Si bien es cierto que todos ellos presentan su región codificante afectada, resultan de particular interés aquellos candidatos en los que se produjo una mutación sin sentido, es decir, la generación de un *stop* prematuro en la proteína codificada. Sólo 2 candidatos cumplen con esta condición: *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 15 (HOS15)* y *DREB AND EAR MOTIF PROTEIN 2 (DEAR2)*.

Tabla 1. Listado de genes afectados en la mutante *hos15-3* obtenida a partir del screening previamente realizado en Manavella et al (Manavella et al., 2012).

NOMBRE	GEN	CODON PREVIO	NUEVO CODON	CAMBIO
ACX2	AT5G65110	CCA	CAA	P>L
<i>LMBR1</i>	AT5G65290	GCT	GTT	A>V
SUPERFAMILIA <i>ENTH/ANTH/VHS</i>	AT5G65370	CTC	TTC	L>F
Transportador de aminoácidos	AT5G65990	CCA	TCA	P>S
Proteína de Unión al ARN	AT5G66470	GCA	TCA	A>T
Proteína de dominio F-box	AT5G66830	CAC	TAC	H>Y
<i>DEAR2</i>	AT5G67190	TGG	TGA	W>*
<i>HOS15</i>	AT5G67320	CGA	TGA	R>*
<i>SH3-LIKE PROTEIN</i>	AT5G67510	GTG	GTG	V>M

Con el objetivo de confirmar la asociación entre genotipo y fenotipo, amplificamos y clonamos el fragmento genómico salvaje de cada uno de estos genes, con el agregado de unos 2000 pares de bases aguas arriba del inicio de la transcripción para incluir el promotor endógeno, y con ello transformamos las mutantes *hos15-3* generadas en este screening buscando una reversión del fenotipo mutante. Las plantas transformadas con una copia salvaje de *HOS15* lograron revertir completamente el fenotipo aberrante de las mutantes, evidenciando que la ausencia de *HOS15* es la causante del fenotipo (Fig. 5A). La sobreexpresión de *HOS15* usando el promotor viral 35S (CaMV35S, *Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter*), que permite la expresión de manera ectópica y constitutiva en *A. thaliana*, en las mutantes *hos15-2* y *hos15-3* también fueron capaces de revertir el fenotipo mutante. De hecho, estas plantas son indistinguibles de plantas salvajes evidenciando que su desregulación no ocasiona anomalías morfológicas (Fig. 5A).

Una vez identificada la mutación causante del fenotipo, continuamos con la caracterización fenotípica y molecular de la mutante *hos15-3*. En primer lugar, analizamos los datos de secuenciación generados durante la etapa de mapeo y hallamos que el polimorfismo asociado a *HOS15* en *hos15-3* es un cambio de C > T, modificación típicamente inducida por EMS, que da como resultado una mutación sin sentido de la arginina 43 (R43X) (Fig. 5, B y C). En ese sentido, considerando que la longitud total de *HOS15* es de 613 aminoácidos, es razonable pensar que un fragmento peptídico de tan sólo 42 aminoácidos sea completamente inactivo y el alelo asociado se comporte como uno nulo. Por otro lado, las mutantes *hos15-3* no solo presentaron un aumento en la actividad luciferasa del reportero, sino que también dicha actividad pareció acumularse en las zonas meristemáticas, una región donde el silenciamiento génico por miARNs desempeña un papel crucial (Fig. 5, D y E).

En cuanto a sus características morfológicas, la comparación entre plantas salvajes Col-0 y la mutante *hos15-3* mostró que estas últimas presentan un fenotipo aberrante de estatura reducida, floración retrasada y tallos cortos o prácticamente nulos con silicuas empaquetadas (Fig. 5, A y F). Curiosamente, este fenotipo no fue replicado en las mutantes *hos15-2*, que solo presentan una ligera reducción en su estatura y una floración retrasada (Fig. 5, A y F). Este fenómeno puede explicarse por una naturaleza hipomórfica del alelo, ya que se trata de una mutante de inserción por T-DNA en una región intrónica muy cercana al sitio final de la transcripción.

A fin de confirmar si la diferencia de fenotipos efectivamente se debía a la actividad de cada alelo, nos propusimos generar una nueva línea mutante para *HOS15* utilizando la técnica de edición génica por CRISPR/Cas9. Para ello, diseñamos guías específicas dirigidas a una región próxima al 5' del gen, empleando el software informático CRISPR-P. Posteriormente, las guías se clonaron en un vector de entrada que contenía el ARN *scaffold* y luego se recombinaron en un vector destino conteniendo la enzima Cas9 y todos los elementos necesarios para la expresión de la enzima y sus respectivas guías en plantas. Ambos vectores fueron provistos por el laboratorio de Holger Puchta (Karlsruhe Institute of

Technology) (Puchta, 2016, 2017; Schiml & Puchta, 2016). A continuación, se transformaron plantas salvajes Col-0 con la construcción descrita anteriormente y se monitorearon las siguientes generaciones mediante inspección visual del fenotipo. De este modo, se lograron obtener las mutantes *hos15*^{CRISPR} cuyo fenotipo morfológico resultó prácticamente idéntico al observado para *hos15-3* (Fig. 5F). Es decir, las plantas mutantes presentaron una estatura reducida, floración retrasada, tallos cortos y silicuas empaquetadas (Fig. 5F). El alelo mutante generado fue confirmado mediante amplificación y secuenciación del locus, observándose una inserción en el sitio esperado que genera un cambio en el marco de lectura de la proteína. Estos resultados proporcionan una nueva evidencia respaldatoria de la asociación entre fenotipo y genotipo previamente planteada, reforzando también la hipótesis del hipomorfismo asociado al alelo *hos15-2*.

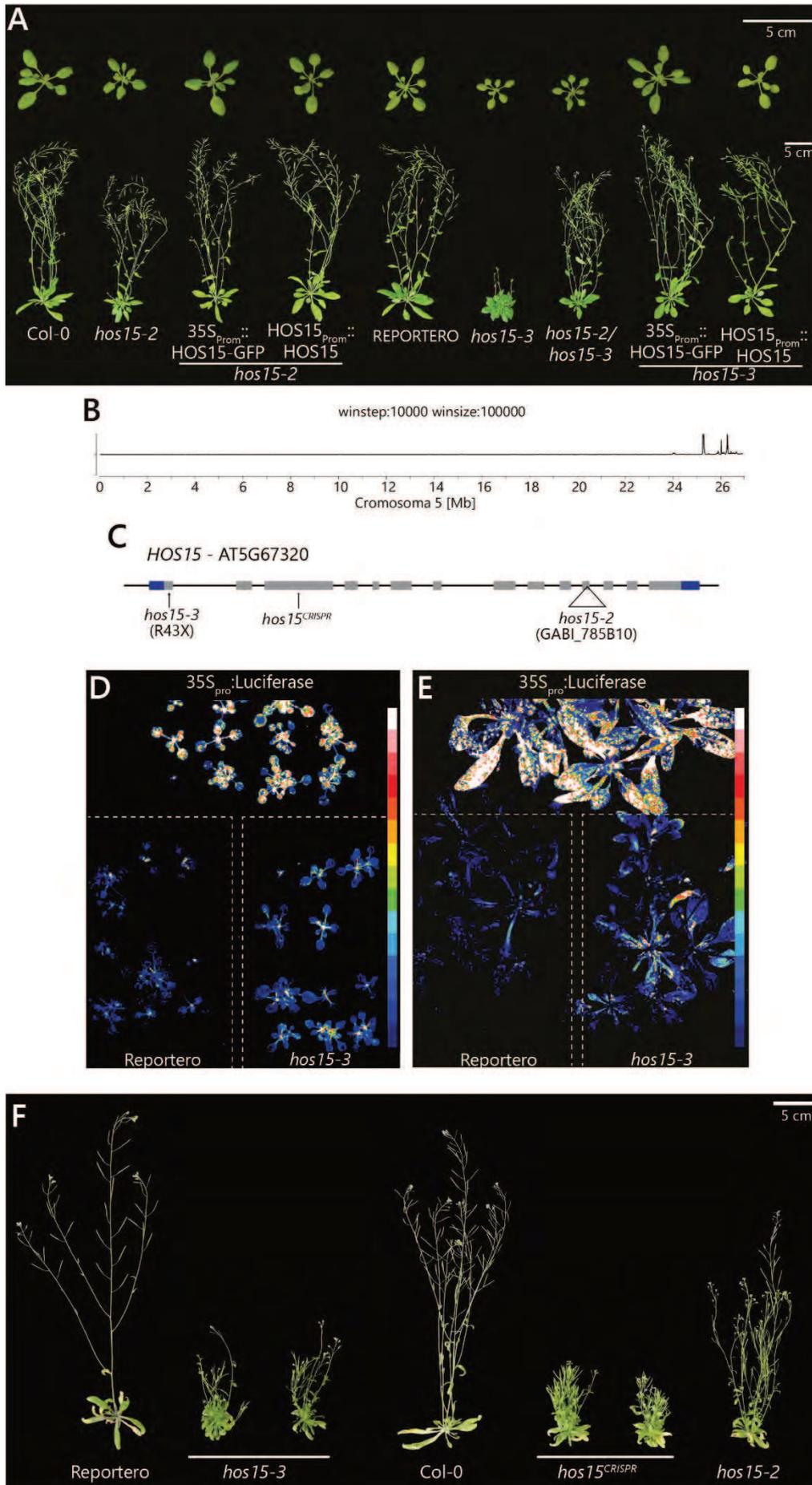


Figura 5. Caracterización de la mutante *hos15*. (A) Caracterización fenotípica de las líneas control (Col-0, Reportero), mutantes en *hos15* (*hos15-2* y *hos15-3*), cruza *hos15-2/hos15-3*, mutantes complementadas ($HOS15_{Prom::HOS15-GFP/hos15-2}$, $HOS15_{Prom::HOS15-GFP/hos15-3}$) y sobreexpresantes de *HOS15* ($35S::HOS15-GFP/hos15-2$, $35S::HOS15-GFP/hos15-3$). Las plantas fueron analizadas a los 18 y 35 días después de la germinación. (B) Resultados obtenidos a partir del mapeo SHORE mostrando un pico en el cromosoma 5 que representa la mutación *hos15-3* inducida por EMS. (C) Estructura genómica del locus de *HOS15* (gHOS15) mostrando el sitio de inserción del T-DNA en *hos15-2*, una mutación sin sentido en la arginina 43 (R) en *hos15-3* y la región target para la mutante generada mediante CRISPR. Cajas grises, exones; líneas negra, intrones; cajas azules flanqueantes, extremos 5' y 3' UTR. (D, E) Actividad de bioluminiscencia medida a través de una cámara CCD en plantas mutantes (*hos15-3*), reporteras y control ($35S_{Prom::Luciferasa}$) de (D) 14 días de edad y (E) 25 días de edad. El rango de colores desde bajo (azul) a alto (blanco) representa la intensidad de luminiscencia. (F) Caracterización fenotípica de las líneas control (Col-0, Reportero) y mutantes en *hos15* (*hos15-2*, *hos15-3* y *hos15^{CRISPR}*) con sus silicuas totalmente expandidas.

6.4.2 *HOS15* es capaz de interactuar con la maquinaria de biogénesis de miARNs a través de HYL1

Hasta aquí hemos expuesto que las mutantes en *HOS15* presentan una disminución en la actividad de miARNs acompañadas de un fenotipo fuertemente pleiotrópico (Fig. 5, A, D y F). A fin de comprender como *HOS15* es capaz de interactuar con la vía de silenciamiento mediado por miARNs y modular su actividad, decidimos comenzar evaluando tanto su localización sub-celular así como la eventual colocalización con los principales factores del procesamiento de miARNs. Para ello, fusionamos la región codificante de cada una de estas proteínas a la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína *Cherry* (*mCherry*) y las clonamos en un vector bajo el control del promotor viral 35S. A partir de ello, agroinfiltramos hojas de *N. benthamiana* con dichas construcciones genéticas y evaluamos los diferentes patrones de localización mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados obtenidos revelan una clara localización nuclear para *HOS15*, lo cual es coherente con lo reportado anteriormente (J. Zhu et al., 2008) (Fig. 6, A y B). Dentro del núcleo, *HOS15* colocaliza con los componentes principales de procesamiento HYL1, SE y DCL1 (Fig. 6 A). Sin embargo, esta colocalización no ocurre en los denominados *D-bodies*, putativos centros de procesamiento de miARNs (Y. Fang & Spector, 2007; Q. Liu et al., 2012) (Fig. 6 B), lo que sugiere que *HOS15* podría afectar la biogénesis de miARNs sin participar directamente en su procesamiento.

Dado que la colocalización de dos proteínas no necesariamente implica la interacción entre ambas, nos propusimos evaluar si *HOS15* es capaz de interactuar de manera directa con alguno de los factores de biogénesis de miARNs. Para ello, llevamos adelante un ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H, *Yeast Two-Hybrid*) usando a *HOS15* como cebo, enfrentándolo a varias de las proteínas relacionadas a la biogénesis de miARNs como presas. En sintonía con un posible efecto independiente del procesamiento, los resultados mostraron que la mayoría de las interacciones evaluadas fueron negativas, con excepción de HYL1 y el control positivo del ensayo, HD2C (Fig 6, C y D). Estas observaciones fueron posteriormente validadas mediante la técnica de co-inmunoprecipitación (Co-IP), para lo cual generamos versiones etiquetadas de las proteínas y transformamos de manera transitoria plantas de *N.*

benthamiana. Posteriormente, inmunoprecipitamos a HOS15 usando anticuerpos específicos contra la etiqueta y analizamos la detección mediante técnicas de *Western blot* de la proteína cuya interacción se está evaluando. Los resultados obtenidos confirman que HOS15 solo interacciona con HYL1 y no con SE, DDL1, HEN1 ni DCL1 (Fig. 6, E-H).

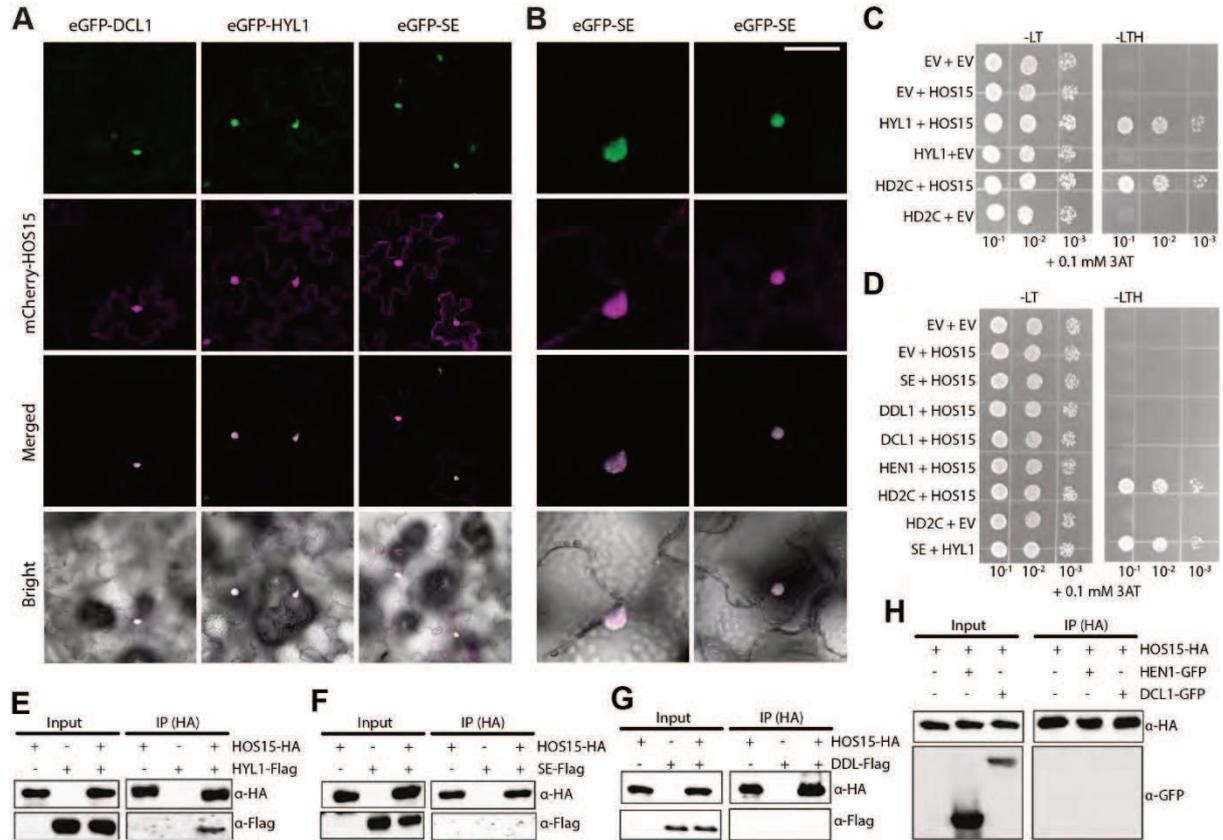


Figura 6. HYL1 se asocia con HOS15 en el núcleo, pero HOS15 no interacciona con DCL1, SE, HEN1 ni DDL. (A, B) Imágenes de microscopía confocal mostrando la localización nuclear de versiones de HOS15 etiquetadas con mCherry y diferentes proteínas de la biogénesis de miARNs etiquetadas con eGFP que fueron transformadas de manera transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes corresponden a (A) HOS15 con DCL1, SE y HYL1 y (B) HOS15 con SE. Barras = 5 μ m. (C) Interacción entre HOS15 y HYL1 en ensayos de doble híbrido en levaduras. El ensayo fue realizado utilizando HYL1 como presa y HOS15 como carnada. Una construcción EV (Vector vacío) fue empleada como control negativo. La combinación de HOS15 como carnada y HD2C como presa fue empleada como control positivo. Las levaduras fueron crecidas en medios basales selectivos en ausencia de los aminoácidos específicos -LT, -LTH, -LTH + 0.1 mM 3 AT durante 5 días antes de capturar las imágenes. (D) Ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando SE, DDL1, DCL1 o HEN1 como presa y HOS15 como carnada para evaluar dichas interacciones. Una construcción EV (Vector vacío) fue empleada como control negativo. La combinación de HOS15 como carnada y HD2C como presa fue empleada como control positivo. Las levaduras fueron crecidas en medios basales selectivos en ausencia de los aminoácidos específicos -LT, -LTH, -LTH + 0.1 mM 3 AT durante 5 días antes de capturar las imágenes. (E) HOS15 interactúa con HYL1 *in vivo* con HOS15. Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium thumefaciens* conteniendo las construcciones 35S_{pro}:HOS15-HA y 35S_{pro}:HYL1-FLAG para su expresión transitoria. Los extractos de proteínas totales (INPUT) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-HA y los resultados analizados por SDS-PAGE, usando los anticuerpos descriptos en cada *blot*. (F-H) Co-inmunoprecipitación *in vivo* de HOS15 con SE, DDL1, HEN1 y DCL1 (F) HOS15-HA y SE-FLAG, (G) HOS15-HA y DDL-FLAG, y (H) HOS15-HA, HEN1-GFP, y DCL1-GFP. Las proteínas fueron expresadas de manera transitoria en *N. benthamiana* y los extractos de

proteínas totales (INPUT) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA y analizados mediante SDS-PAGE. Los anticuerpos usados en la detección están detallados a la derecha de cada *blot*.

Trabajos publicados anteriormente muestran a HYL1 interaccionando con TOPLESS (TPL) y TOPLESS-RELATED (TPR1 and TPR2), dos proteínas del tipo Lish-WD40 que, al igual que HOS15, cumplen funciones en la remodelación de la cromatina (Bielewicz et al., 2023). Esta conexión sugiere una aparente tendencia por parte de HYL1 a interaccionar con este tipo de factores, posiblemente a nivel de la cromatina. Dada la dual función de HOS15 como miembro del complejo E3 y represor transcripcional (J. Park, Lim, Shen, et al., 2018), es posible que HOS15 actúe en la vía de miARNs modulando la estabilidad proteica de algún componente de la vía, como HYL1, o bien, afectando directamente la expresión de los pri-miARNs a nivel transcripcional. El primer escenario luce improbable, teniendo en cuenta que la degradación de HYL1 parece ser independiente de la ubiquitinación (Cho et al., 2014; Jung et al., 2022). De hecho, cuando analizamos los niveles proteicos de HYL1 utilizando técnicas de *Western blot* observamos un efecto inverso con una reducción de la proteína en mutantes *hos15-2*, sugiriendo que la actividad E3 ligasa de HOS15 es irrelevante para la degradación de HYL1. Llamativamente esta disminución de HYL1 en mutantes de *hos15* desaparece en plantas tratadas con ABA (Fig. 7).

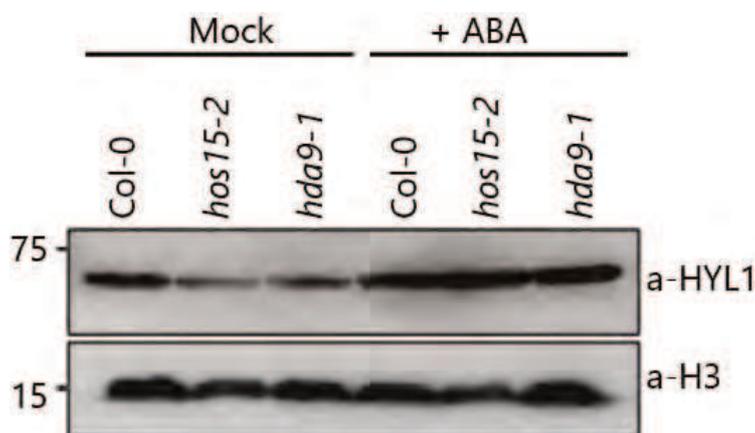


Figura 7. La actividad E3 ligasa de HOS15 es irrelevante para la estabilidad proteica de HYL1. Ensayo de *Western blot* mostrando los niveles proteicos de HYL1 en mutantes *hos15-2* y *hda9-1* tanto en presencia como ausencia de la hormona ABA.

Hasta este punto, todos los resultados obtenidos muestran que HOS15 solo es capaz de interaccionar con HYL1 entre todas las proteínas de biogénesis de miARNs analizadas, pero que esta interacción no ocurre en los centros de procesamiento de miARNs. Estas observaciones sugieren que aquella fracción de HYL1 no asociada al procesamiento de miARNs es la que se une al complejo HOS15-HDA9.

6.4.3 HYL1 es capaz de formar complejos multiproteicos de deacetilación de histonas

Habiendo descartado la hipótesis de una regulación en la estabilidad a nivel proteico de HYL1, decidimos explorar la posibilidad de una regulación transcripcional sobre la expresión de los miARNs. Para ello, evaluamos la interacción de HYL1 con deacetilasas de histonas que son conocidas por interaccionar con HOS15 (Lim et al., 2020; Mayer et al., 2019; H. J. Park et al., 2019b). Usando técnicas de Y2H y Co-IP fue posible observar que HYL1 es capaz de interaccionar de manera directa con HDA9 y HDA19, además de la ya mencionada interacción con HOS15 (Fig. 8, A y B). Por otra parte, se sabe que la formación del complejo HOS15-HDA9 se encuentra altamente influenciada por las respuestas a estrés por sequía y por la hormona ABA (Ali et al., 2019; Baek et al., 2020; Khan et al., 2020; Lim et al., 2020; J. Park, Lim, Shen, et al., 2018; Shen et al., 2020; J. Zhu et al., 2008). En función de ello, nos propusimos comprobar si esto también es válido para el complejo HOS15-HYL1, evaluando nuevamente la interacción entre estas proteínas mediante técnicas de Co-IP en presencia y ausencia de ABA. Los resultados obtenidos muestran una mayor intensidad en la interacción HOS15-HYL1 en presencia de la hormona ABA (Fig. 8 C). Analizados en conjunto, estos resultados no solo evidencian la capacidad de HYL1 para formar un complejo multiproteico con HOS15 y HDA9/HDA19 sino también que la formación del mismo está fuertemente promovida por la hormona ABA. Sin embargo, aún no sabemos con certeza si la formación de este complejo tiene algún impacto sobre los niveles de acetilación de la cromatina, y particularmente, sobre la histona 3 (H3). Para ello, decidimos evaluar mediante *Western blot* los niveles de acetilación de H3 en plantas salvajes Col-0 y mutantes *hyl1-2*, *hos15-2* y *hda9-1*, tanto en condiciones de presencia como de ausencia de ABA. Los resultados obtenidos muestran un aumento en los niveles de H3 acetilada (AcH3) para todas las mutantes estudiadas en condiciones control, que se magnifica cuando las plantas son tratadas con ABA (Fig. 8 D).

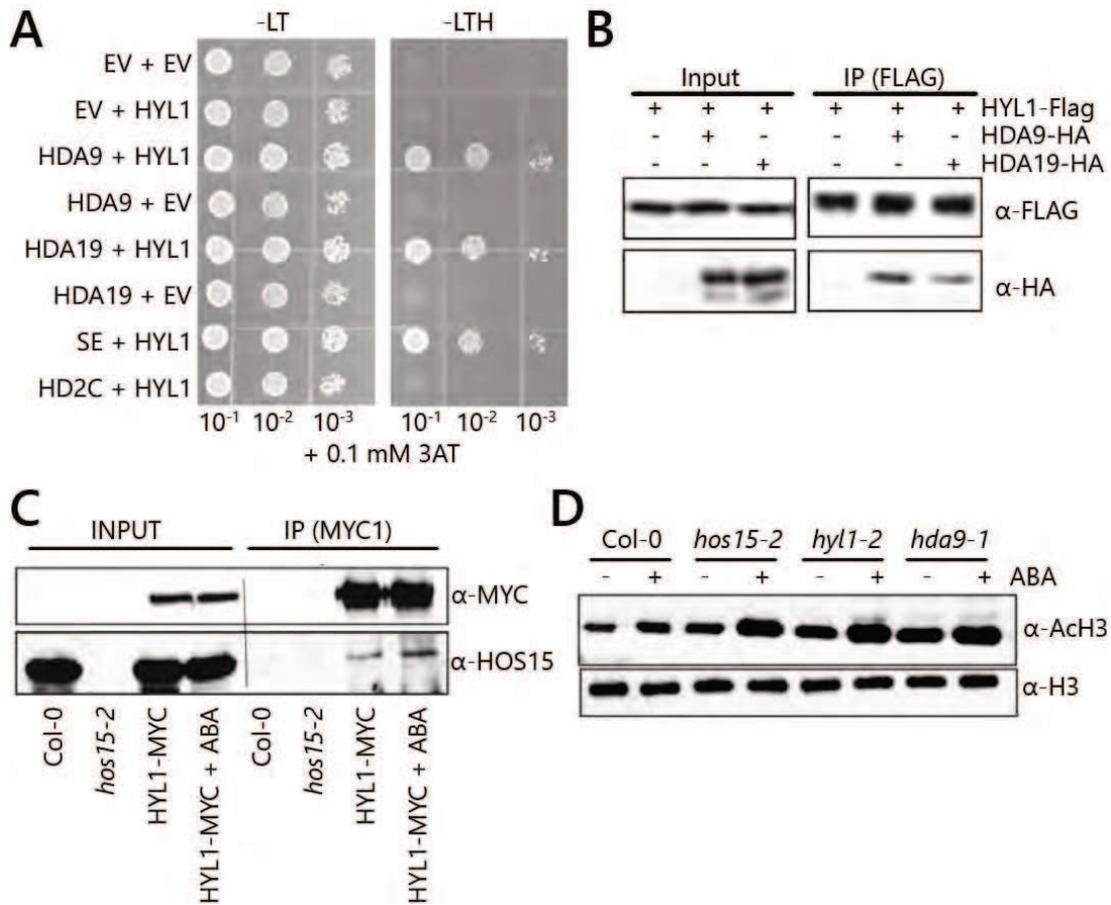


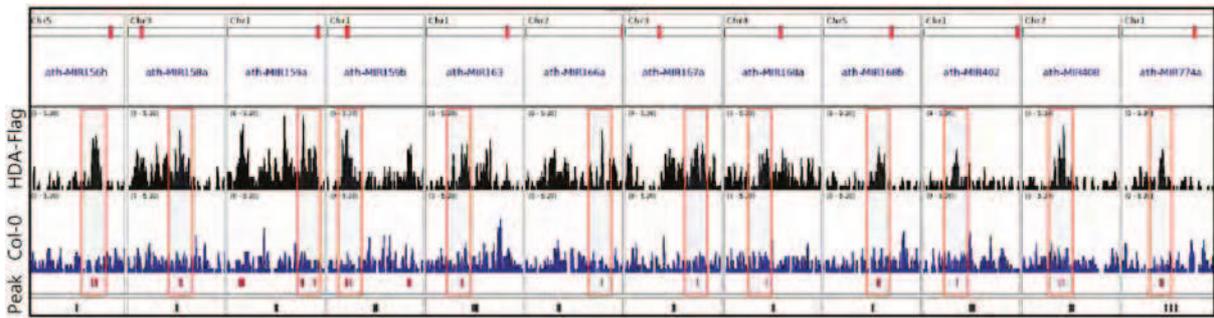
Figura 8. HYL1 forma un complejo con la familia de las deacetilasas de histonas RPD3. (A) Ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando HDA9, HDA19 y HD2C como presa y HOS15 como carnada para evaluar dichas interacciones. Una construcción EV (Vector vacío) fue empleada como control negativo. La combinación de HYL1 como carnada y SE como presa fue empleada como control positivo. Las levaduras fueron crecidas en medios basales selectivos en ausencia de los aminoácidos específicos -LT, -LTH, -LTH + 0.1 mM 3 AT durante 5 días antes de capturar las imágenes. (B) Co-immunoprecipitación *in vivo* de HOS15 con HDA9 y HDA19. HYL1-FLAG, HDA9-HA, y HDA19-HA fueron expresadas de manera transiente en *N. benthamiana* y los extractos de proteínas totales (INPUT) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-FLAG y analizados mediante SDS-PAGE. Los anticuerpos usados en la detección están detallados a la derecha de cada *blot*. (C) Los extractos de proteínas totales (INPUT) indicados fueron inmunoprecipitados usando anti-MYC y analizados mediante SDS-PAGE. Los anticuerpos usados en la detección están detallados a la derecha de cada *blot*. (D) Ensayo de *Western blot* mostrando los niveles de acetilación de histonas usando un anticuerpo específico para AcH3 en plántulas de 1 semana de edad de los genotipos Col-0, *hos15-2*, *hyl1-2*, *hda9-1*. Las plantas fueron tratadas durante 3 hs con 50 μ M ABA. El anticuerpo anti-H3 fue usado como control de carga.

6.4.4 La unión de HYL1 a los pri-miARNs nacientes permite el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 al loci MIR

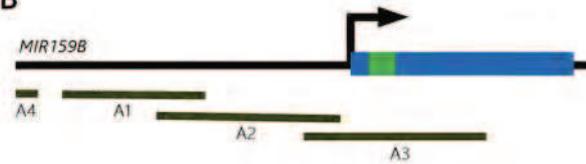
Hemos demostrado que HOS15 es capaz de interactuar con HYL1 y HDA9/HDA19, formando complejos de deacetilación de histonas que modulan los niveles globales de AcH3. Sin embargo, a partir de la evidencia presentada hasta el momento, no podemos afirmar con certeza que este proceso afecte la expresión de genes *MIRNA* y, en caso de hacerlo, no podríamos explicar la naturaleza de la especificidad por estos loci en particular. Ni siquiera hemos demostrado que la modificación de histonas mediada por HOS15 afecte directamente la biogénesis de miARNs. Para explorar esta posibilidad, analizamos conjuntos de datos de secuenciación de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a HDA9 (HDA9 ChIP-seq). Para las muestras inmunoprecipitadas, observamos un claro enriquecimiento de algunas secuencias correspondientes a loci de genes *MIRNA* (Fig. 9 A), lo que sugiere que HDA9 estaría asociada a esos loci. A partir de esta información, decidimos evaluar si algo similar ocurre para el caso de HOS15 y HYL1. Así, llevamos adelante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina asociada a HOS15 (HOS15 ChIP) y HYL (HYL1 ChIP) y cuantificamos los niveles de loci de interés asociados a las mismas, mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para ello, diseñamos oligonucleótidos que nos permitan amplificar 4 diferentes regiones situadas en las cercanías del loci del *MIR159B*, de los cuales uno de ellos abarca la región codificante (Fig. 9 B). Los resultados obtenidos a partir de ambas determinaciones muestran que tanto HYL1 como HOS15 son capaces de asociarse a los loci de genes *MIRNA*, en la porción inmediata al inicio de la región codificante (Fig. 9 C).

Estos hallazgos nos permiten considerar un mecanismo de regulación transcripcional específico sobre los pri-miARNs, mediado por el complejo formado entre HOS15-HYL1-HDA9. No obstante, es difícil identificar un elemento en común, como una secuencia específica o una distancia particular en su posicionamiento, que explique la asociación selectiva de estas proteínas a los loci de genes *MIRNA*. De hecho, ninguna de estas proteínas se caracteriza por ser típicamente una proteína de unión al ADN, lo que sugiere que se necesita una característica adicional, o una proteína andamio, para que HOS15 sea específicamente reclutado a los genes *MIRNA*. Esto plantea la intrigante pregunta de ¿Cómo reconoce el complejo HOS15-HDA9 de manera específica los loci de genes MIR siendo que estos no presentan características regulatorias distintivas a otros genes?

A



B



C

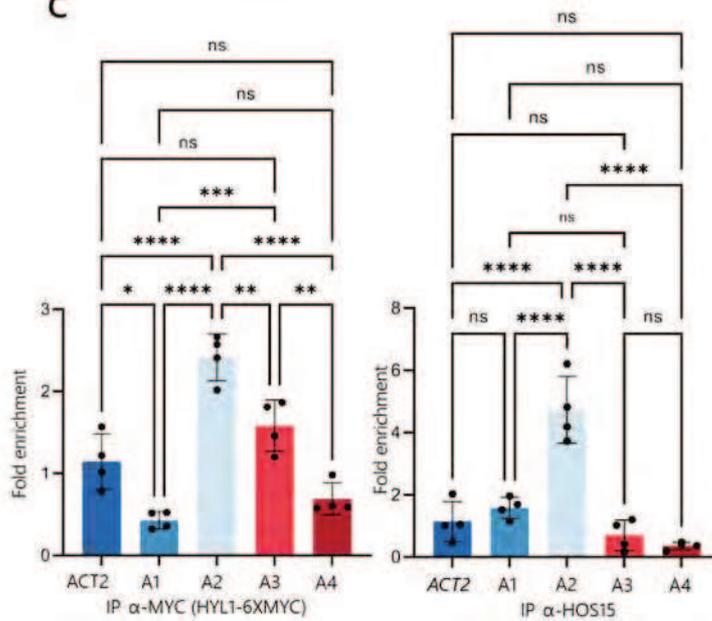


Figura 9. HYL1, HOS15 y HDA9 se asocian a los loci de genes MIR. (A) Representación de IGV mostrando los niveles de ocupación de HDA9 en diferentes loci de genes *MIRNA*, en plantas HDA9-Flag y Col-0. (B) Representación esquemática mostrando el loci genómico del *MIR159B*. Las líneas negras representan los diferentes amplicones de A1 a A4, las regiones codificantes del pri-miARN se muestran en azul y el miR159b maduro se representa en verde. (C) Asociación de HYL (izquierda) y HOS15 (derecha) con las diferentes regiones amplicones (A1 a A4) del locus del miR159b. La inmunoprecipitación se llevó adelante utilizando anticuerpos ant-MYC y anti-HOS15 y la cuantificación mediante técnicas de qPCR. Los datos representan las medias \pm SD de cuatro replicas biológicas independientes. Los asteriscos denotan la significancia del experimento determinada por un t-test de dos colas para muestras no-pareadas aplicando la corrección de Holm-Sidak. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$, ns no significativo.

A lo largo de la introducción de este trabajo de tesis hemos discutido acerca de la importancia trascendental que tiene la interconexión entre transcripción y procesamiento para la biogénesis de miARNs (Gonzalo et al., 2022; Stepien et al., 2022). En particular, en este punto resulta interesante la evidencia de que HYL1 es capaz de asociarse a los loci de genes *MIRNA* durante el procesamiento cotranscripcional de pri-miARNs (Bhat et al., 2020). Este hecho nos llevó a pensar en la idea de que HYL1 pueda actuar como proteína de anclaje, interaccionando de manera directa con los loci de genes *MIR* y atraiga al complejo HOS15-HDA9 hacia estos. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis, realizamos experimentos de CHIP-qPCR a fin de evaluar el reclutamiento de HOS15 y HYL1 a los locus de genes *MIRNA* en plantas mutantes *hyl1-2*, *hos15-2* y *hos15-3*, analizando la interdependencia entre ambos cofactores. Los resultados obtenidos muestran que HOS15 se asocia a los locus de los genes *MIRNA* como el *MIR156*, *MIR167* y *MIR171* en plantas salvajes y que dicha asociación se pierde en ausencia de HYL1 (Fig. 10, A y E). Por otro lado, la interacción de HYL1 con los locus seleccionados no se ve afectada en las mutantes *hos15-2*, *hos15-3* y *hda9-1*, sugiriendo que este proceso ocurre de manera independiente al complejo HOS15/HDA9 pero que la unión del complejo HOS15/HDA9 a locus de *MIRNA* depende de HYL1 (Fig. 10, A-D). La incorporación de un tratamiento con ABA a estos experimentos nos dio como resultado una mayor asociación del complejo HYL1/HOS15 a los locus de genes *MIRNA* (Fig. 10, B y E), en concordancia con el incremento en la interacción entre HOS15-HDA9 y HYL1 observado anteriormente en presencia de ABA (Fig. 8 C). No obstante, la presencia de HYL1 sigue siendo un factor crucial para este reclutamiento (Fig. 10 E).

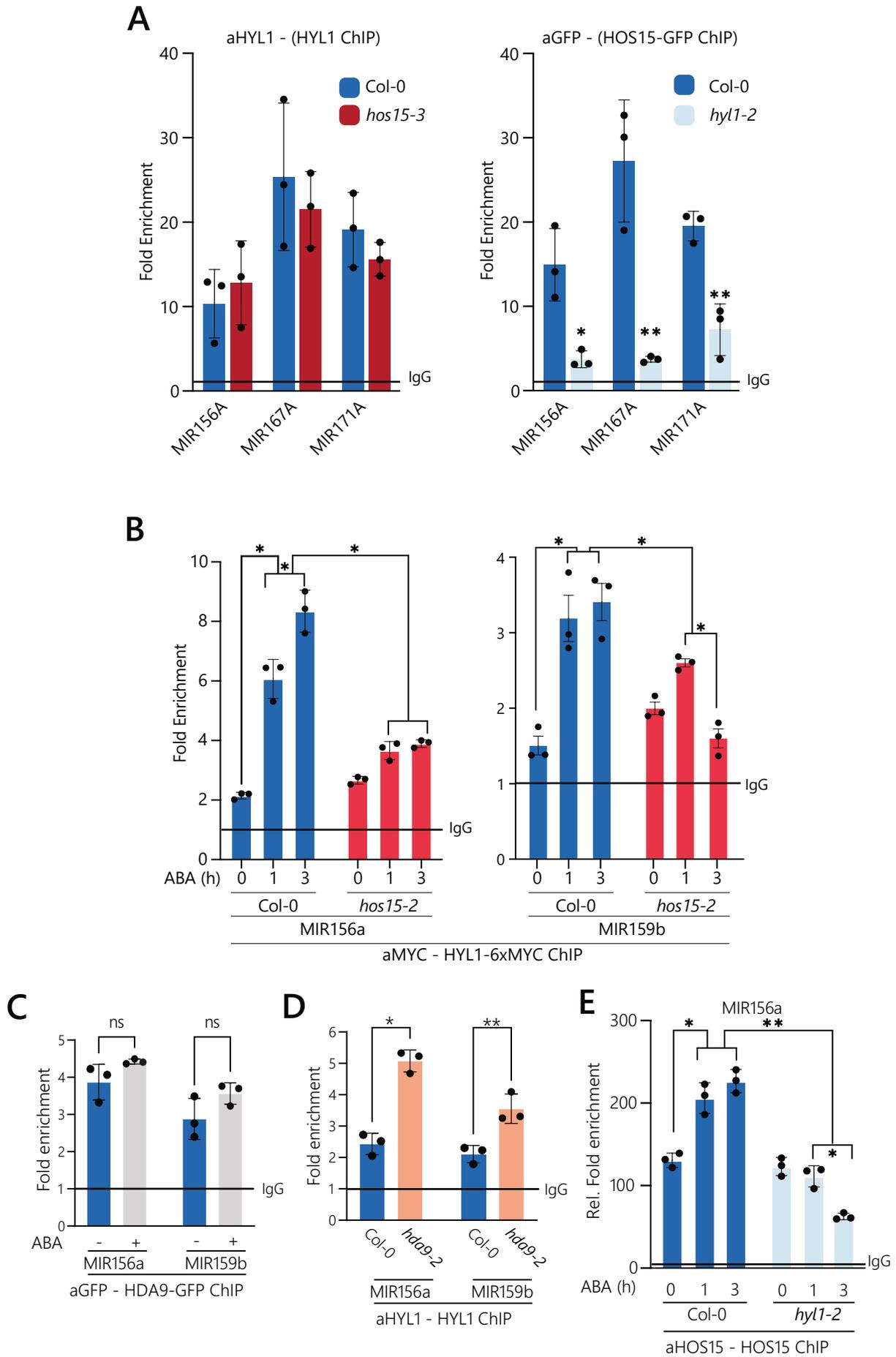


Figura 10. HYL1 es necesario para el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 a los loci de genes MIR. (A) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina para analizar la asociación de HOS15 y HYL1 a los loci de 3 genes *MIRNA*. La inmunoprecipitación fue realizada usando anti-GFP (panel derecho) y anti-HYL1 (panel izquierdo) en *hyl1-2* y *hos15-3*, respectivamente. Los niveles relativos fueron determinados en comparación con Col-0 para cada caso. La inmunoprecipitación con IgG fue usada como control negativo. (B) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina usando anti-MYC para detectar la asociación de HYL1-6xMYC con los loci de genes *MIRNA* en plantas Col-0 y *hos15-2* incubadas durante diferentes períodos de tiempo con la hormona ABA o una solución *Mock*. (C) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina de los loci de *MIRNA156a* y *MIRNA159b* usando anti-GFP en plantas expresando la fusión HDA9-GFP tratadas durante 3 hs con 50 μ M ABA (+) en comparación con plantas no tratadas (-). (D) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina de los loci de *MIRNA156a* y *MIRNA159b* usando anti-HYL1 en mutantes *hda9-2* comparadas con la planta control Col-0. (E) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina de los loci de *MIRNA156a* y *MIRNA159b* usando anti-HOS15 en mutantes *hyl1-2* y plantas control Col-0, a diferentes puntos temporales de tratamiento con ABA. En todos los casos, la cantidad de ADN en la inmunoprecipitación fue determinada por qPCR y es presentada como *fold enrichment* después de la normalización. Los valores de las muestras anti-GFP y anti-HYL1 fueron normalizados con el INPUT y expresados de manera relativa a la señal obtenida por la inmunoprecipitación con anti-rabbit IgG (graficada como línea IgG). Los datos representan la media \pm SD de 3 replicados biológicos con 3 réplicas técnicas. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un t-test no pareado de 2 colas. *P < 0.05, ** P < 0.001, ns no significativo.

El conjunto de resultados obtenidos pone en evidencia a HYL1 como la responsable del reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 a los loci de genes *MIRNA* en un proceso facilitado por la hormona ABA. Sin embargo, estos resultados no explican como HYL1 es capaz de reconocer específicamente los loci de genes *MIRNA* y reclutar a otros cofactores.

Una posibilidad es que el propio pri-miARN naciente actúe como el elemento distintivo que otorga especificidad a este proceso de reclutamiento. En ese sentido, HYL1 podría reconocer la particular estructura de tallo y bucle del pri-miARN naciente durante su transcripción, y unirse directamente a él, formando un complejo que se asocia de manera indirecta con la cromatina. Esta hipótesis es particularmente factible dada la naturaleza de HYL1 como una proteína de unión a ARN doble cadena. A partir de esta interacción, HYL1 podría reclutar otros cofactores al sitio, como el complejo HOS15-HDA9, modulando la expresión y procesamiento de los pri-miARNs.

Con el objetivo de poner a prueba el modelo propuesto, nos planteamos repetir los experimentos anteriores en ausencia de ARN. Para ello, tratamos a las plantas con α -amanitina, un inhibidor de la transcripción, y a las muestras obtenidas con RNaseA, enzima que degrada ARN en general. De este modo, eliminamos la presencia de pri-miARN nacientes. Si nuestra hipótesis es correcta HYL1 debería ser incapaz de identificar los loci de genes *MIRNA* y, por ende, el reclutamiento de HOS15/HDA9 a estos loci debería disminuir. Los resultados obtenidos no sólo muestran que efectivamente la asociación de HYL1 a los loci de genes *MIRNA* se pierde en ausencia del pri-miARN sino también que la presencia de ABA es insuficiente para contrarrestar este efecto (Fig. 11).

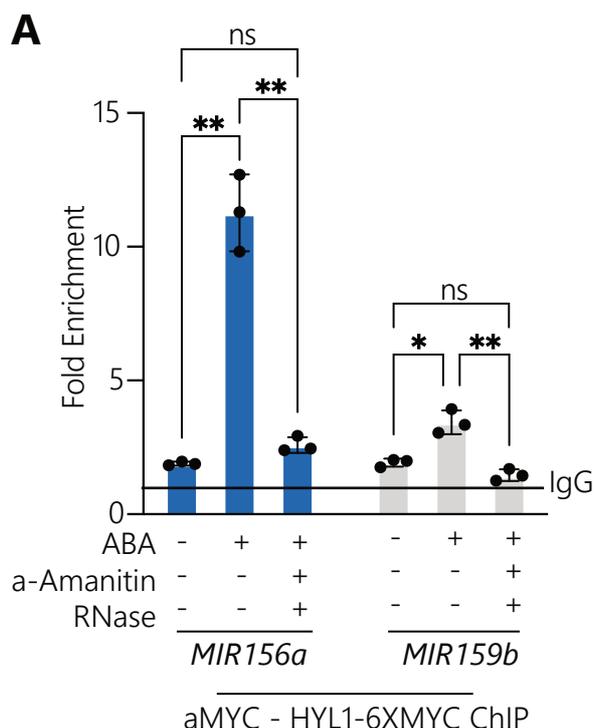


Figura 11. La unión de HYL1 a un pri-miARN naciente permite el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 a los loci de genes MIR. (A) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina para líneas expresando HYL1-6xMYC pretratadas con RNase y α -amanitina e inmunoprecipitados usando un anticuerpo anti-MYC comparas con plantas no pretratadas, con o sin tratamiento con ABA. En todos los casos, la cantidad de ADN en la inmunoprecipitación fue determinada por qPCR y es presentada como *fold enrichment* después de la normalización. Los datos representan la media \pm SD de 3 replicados biológicos con 3 réplicas técnicas. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un t-test no pareado de 2 colas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, ns no significativo.

De todos los resultados presentados hasta aquí, probablemente este último sea el más interesante. No solo demuestra que el reclutamiento de HYL1 a los loci de genes *MIRNA* es dependiente de la presencia de un pri-miARN naciente, sino que también el complejo HYL1/pri-miARN es capaz de interactuar con otros complejos proteicos y reclutarlos específicamente a los loci de genes MIR. En ese contexto HYL1 actuaría como una proteína *scaffold* que permitiría la interacción y reclutamiento de factores de remodelación de la cromatina específicamente a loci de MIRNA, permitiendo diferenciar estos de cualquier otro gen codificante. De este modo, estos hallazgos revelan una funcionalidad de HYL1 totalmente impensada hasta este momento, ejerciendo un control transcripcional sobre la expresión de los miARNs. Por otro lado, estos resultados también dejan entrever otro mecanismo inesperado: el reconocimiento diferencial de los loci de genes MIR sobre el resto de los genes codificantes a partir de la particular estructura del pri-miARN naciente.

6.4.5 HOS15 y HDA9 suprimen la acumulación de miARNs de respuesta al ABA

Los resultados hasta aquí expuestos muestran que la asociación de HYL1 a un pri-miARN naciente es capaz de reclutar al complejo remodelador de la cromatina HOS15-HDA9 a los loci de genes *MIRNA*, para promover la deacetilación de histonas y la reprogramación transcripcional del loci del gen *MIRNA*. Este proceso estaría favorecido por la presencia de ABA, hormona que favorece la actividad del complejo HOS15-HDA9. Sin embargo, estos resultados no nos dicen nada acerca de la relevancia del complejo HOS15-HDA9 en la modulación del procesamiento de pri-miARNs. Una anomalía en el procesamiento de los pri-miARNs típicamente trae asociada una disminución en los niveles de miARNs maduros acompañada de un incremento en los niveles de pri-miARNs. A su vez, la disminución en los niveles de miARNs genera un desacople con la etapa efectora de la vía, conduciendo a una acumulación de ARN mensajeros que típicamente son blancos de silenciamiento por miARNs.

A raíz de ello, decidimos explorar la importancia de HOS15-HDA9 en el procesamiento mediante diferentes enfoques. En primer lugar, evaluamos los niveles relativos de miARNs maduros y ARNm blanco de la vía en plantas mutantes para los componentes del complejo mediante técnicas de RT-qPCR y secuenciación masiva de ARN. Lejos de tratarse de un efecto global, nuestros resultados mostraron que solo un pequeño subconjunto de ARNm blanco estaban acumulados en las mutantes *hos15-2* y *hos15-3* (Fig. 12, A y B), sugiriendo que en estas condiciones el procesamiento de miARNs no estaría siendo afectado de manera general. En contraparte a esto, las mutantes *hyl1-2* presentan una clara acumulación general de ARNm blancos (Fig. 12 B). Esta observación fue posteriormente validada a partir del análisis de los niveles de miARNs maduros en mutantes *hos15-2* y *hos15-3* usando datos de secuenciación masiva de ARN pequeños. Los resultados obtenidos muestran un efecto menor y puntual en la acumulación de miARNs (Fig. 12, C y D), en comparación con lo que ocurre en mutantes de *hyl1-2* donde se observó un marcado descenso de los mismos (Fig. 12 B). En concordancia, nuestra mutante *hos15^{CRISPR}* también mostró efectos menores en la acumulación de miARNs maduros, cuantificados mediante técnicas de *Northern Blot* (Fig. 12 E). Estas observaciones resultan coherentes con el ligero aumento observado en la actividad del reportero de luciferasa para las mutantes *hos15-3* (Fig. 5, D y E), sugiriendo que el impacto de HOS15 en el procesamiento de miARNs es prácticamente acotado.

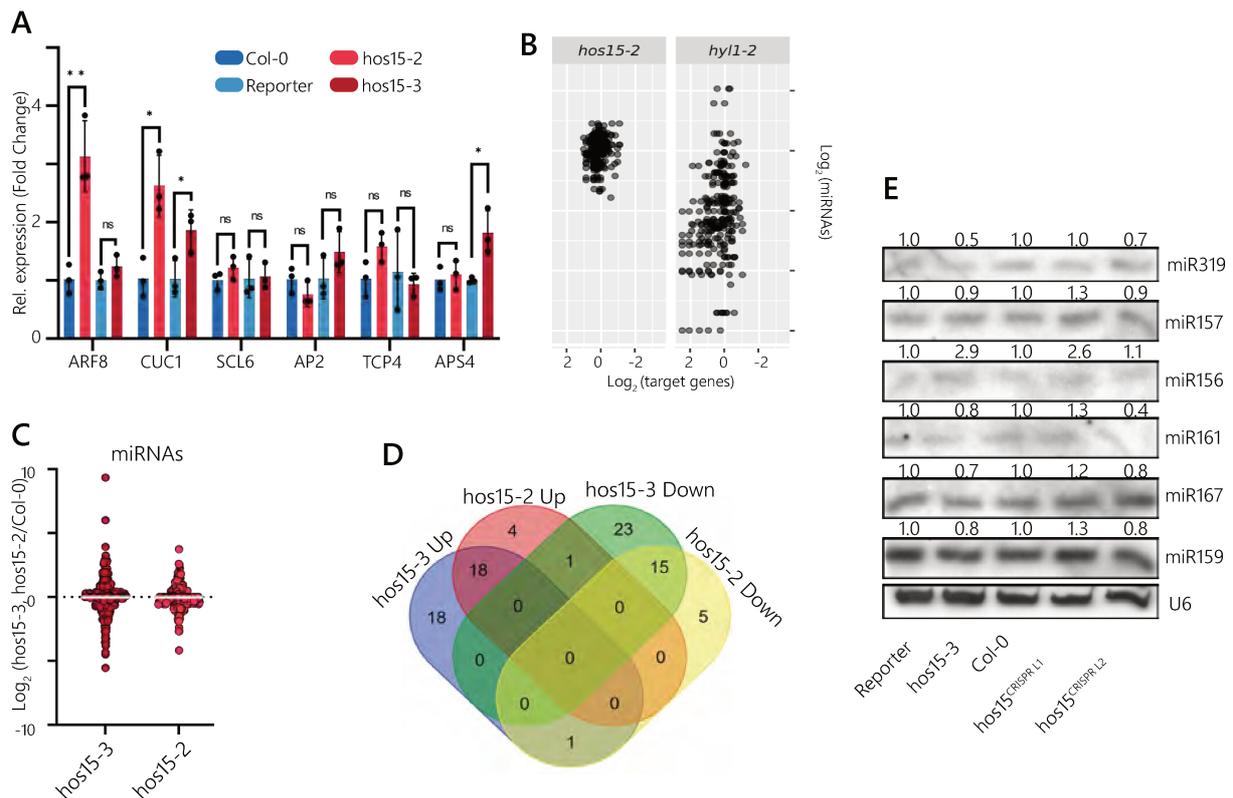


Figura 12. El complejo HOS15-HDA9 tiene un efecto sutil sobre la expresión de los miARNs en condiciones control.

(A) Niveles de expresión de ARNm *target* de miARNs en plantas control (Reportero y Col-0) y mutantes (*hos15-2* y *hos15-3*) crecidas en condiciones control, cuantificados mediante RT-qPCR. Los datos representan las medias \pm SD de cuatro replicas biológicas independientes. Los asteriscos denotan la significancia del experimento determinada por un t-test de dos colas para muestras no-pareadas aplicando la corrección de Holm-Sidak. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns no significativo. (B) Gráfico de dispersión de niveles de expresión de miARNs y sus genes *target* en plantas mutantes *hos15-2* y *hyl1-2*. Cada punto representa el *fold change* (\log_2) relativo a las plantas WT. (C) Análisis de secuenciación de ARN pequeños. Niveles de expresión medios de miARNs individuales mostrando los incrementos y disminuciones relativos en mutantes *hos15-3* y *hos15-2* frente a Col-0. Las líneas negras representan la mediana de los niveles de expresión. Cada círculo corresponde a un miARN singular o a una familia de miARNs colapsada. (D) Diagrama de Venn de los miARN diferencialmente expresados en líneas mutantes (*hos15-2* y *hos15-3*) representado la superposición entre muestras. *Up*: Niveles de expresión aumentado, *Down*: Niveles de expresión disminuidos. (E) *Small RNA blot* para la detección de niveles endógenos de miARNs cuantificados mediante RT-qPCR en mutantes (*hos15-3*, *hos15^{CRISPR L1}*, *hos15^{CRISPR L2}*) y líneas control (Col-0, Reportero). Los miARNs detectados están indicados a la derecha de cada panel, y la abundancia relativa de cada miARN está indicada por encima de cada banda. La abundancia relativa se calculó cuantificando la intensidad relativa de banda usando el software ImageJ y normalizando con la planta control correspondiente, utilizando U6 como control de carga.

El sutil efecto observado en condiciones control no resulta sorprendente si consideramos que el complejo HOS15-HDA9 está típicamente asociado a respuestas al estrés por sequía y a la vía del ABA (Ali et al., 2019; Baek et al., 2020; Khan et al., 2020; Lim et al., 2020; J. Park, Jin, et al., 2018; Shen et al., 2020; J. Zhu et al., 2008). De hecho, durante el desarrollo de esta tesis descubrimos que los tratamientos con ABA favorecen la interacción de HOS15-HDA9 con HYL1 (Fig. 8 C) y los loci de genes MIR. Sumado a ello, las plantas mutantes *hyl1-2* exhiben una hipersensibilidad a los tratamientos

con ABA, lo que sugiere un efecto regulador por parte de la hormona sobre HYL1 (Lu & Fedoroff, 2000). En función de ello, resulta lógico pensar que el complejo HOS15-HDA9-HYL1 actúe en la biogénesis de miARNs, modulando su expresión en respuesta a la hormona ABA.

Para poner a prueba esta idea, llevamos a cabo una nueva secuenciación masiva de ARN pequeños en plantas mutantes *hyl1-2*, *hos15-2* y *hda9-1* tratadas con ABA. En primer lugar, analizamos un conjunto de datos de secuenciación de acceso público (GSE145208) que refleja la cinética de respuesta de los miARNs en plantas tratadas con ABA, con el objetivo de determinar los tiempos óptimos de tratamiento. Así, logramos identificar un notable aumento en los niveles de los miARNs: miR159, miR162, miR166, miR169 y miR395 al cabo de 3 hs de iniciado el tratamiento, que luego se pierde gradualmente entre las 6-24 hs de iniciado el tratamiento (Fig. 13 A). Curiosamente, este hallazgo coincide con el tiempo de tratamiento en el cual se da pico de señalización en la respuesta ABA antes de la desensibilización (Ali et al., 2019, 2020). Esta información nos sirvió de base en la elección de este punto temporal del tratamiento para llevar adelante nuestros experimentos de secuenciación masiva de ARN.

Nuestros resultados muestran que las mutantes *hyl-2* presentaron una significativa reducción en los niveles de miARNs independientemente del tratamiento con ABA, lo cual es coherente con el rol crucial de esta proteína en la biogénesis de miARNs (Fig. 13, B-D). Por su parte, *hos15-2* y *hda9-1* exhibieron un incremento moderado en los niveles de abundancia de un conjunto de miARNs (con un aumento logarítmico medio de ~0.6 y ~0.7, respectivamente) en respuesta al tratamiento con ABA (Fig. 13, B y C). En línea con lo esperado, los miARNs asociados a la respuesta a ABA tales como miR159, miR160, miR162, miR166, miR172, miR395, miR397, miR399, mir403, y miR869, presentaron mayores niveles de acumulación en ambos genotipos mutantes en comparación con otros miARNs. Estos resultados fueron posteriormente confirmados utilizando la técnica de *Northern blot* para evaluar los niveles de miARNs sensibles a ABA en las plantas mutantes *hos15-2* y *hda9-1* tratadas con esta hormona. Nuevamente, se observó un aumento en los niveles de abundancia de los miARNs en respuesta a ABA (Fig. 13 D). Sumado a ello, también observamos que la sobreexpresión de HDA9 no genera un aumento en los niveles de miARNs de respuesta a ABA (Fig. 13 D). Este conjunto de resultados sugiere que el complejo HOS15-HDA9 es capaz de reprimir específicamente la acumulación de miARNs en respuesta a ABA. Además, demuestran que las alteraciones en la vía biogénesis de miARNs asociadas a las mutaciones en *hos15* y *hda9* no son de carácter general, sino que actúan de manera condicional.

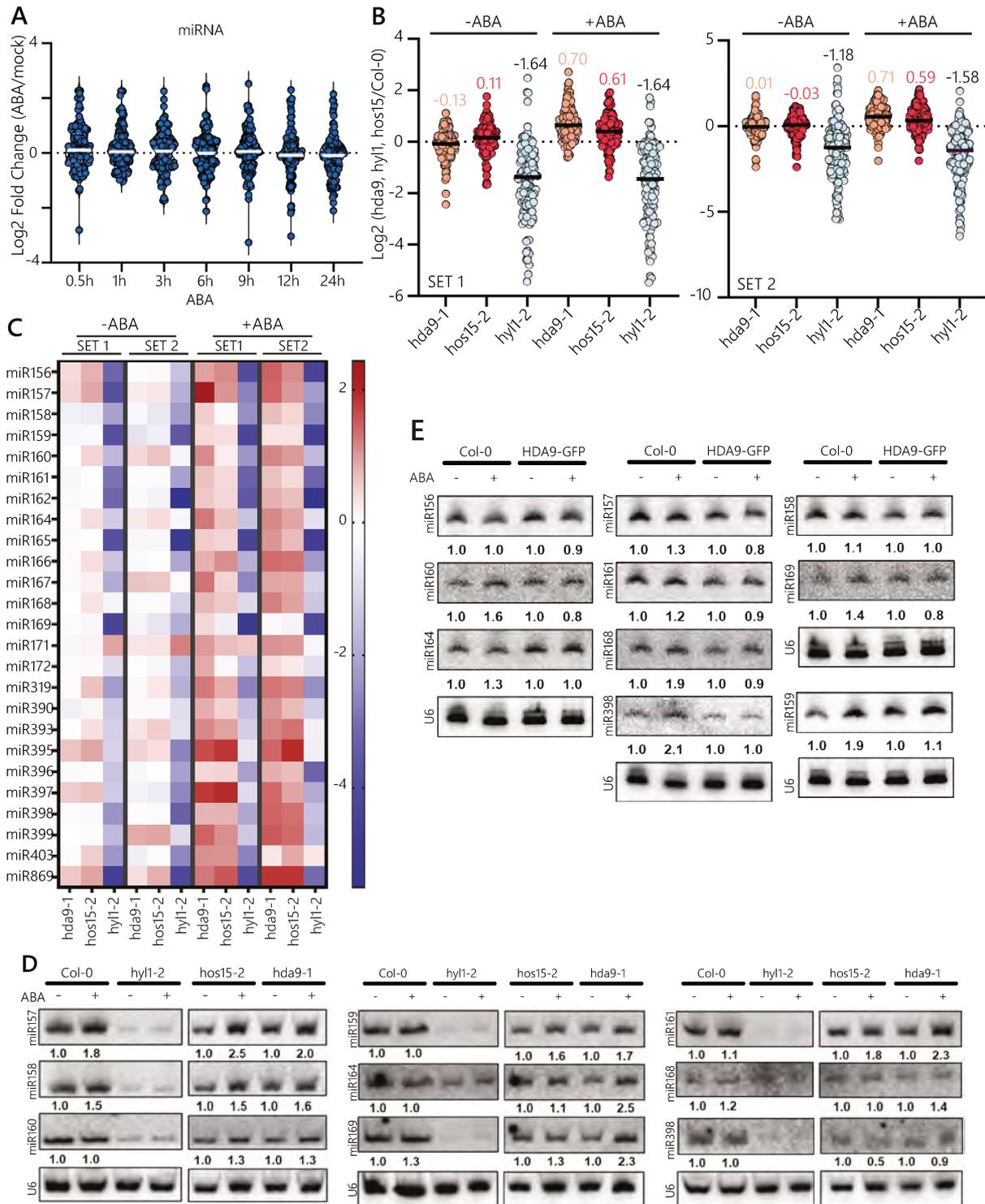


Figura 13. El complejo HOS15-HDA9 suprime la expresión de los miARNs en condiciones de tratamiento con ABA. (A) Análisis de secuenciación de ARN pequeños de plantas tratadas con ABA durante diferentes períodos de tiempo y comparadas con las plantas tratadas con el mock. Las líneas negras representan la mediana de los niveles de expresión. Cada círculo corresponde a un miARN singular o a una familia de miARNs colapsada. (B) Análisis de secuenciación de ARN pequeños mostrando la expresión media de miARNs individuales en plantas *hda9-1*, *hos15-2* y *hyl1-2* comparadas con plantas WT tratadas y no tratadas con ABA. Los paneles izquierdo (SET 1) y derecho (SET 2) corresponden a dos experimentos independientes. La línea negra representa los niveles de expresión media. (C) Mapa de calor mostrando los miARNs expresados diferencialmente proveniente de dos experimentos independientes de secuenciación de ARN pequeños (SET 1 Y

SET2) en plantas *hda9-1*, *hos15-2* y *hyl1-2* comparadas con plantas WT tratadas y no tratadas con ABA. La barra de colores representa los niveles de expresión de los miARN (rojo, niveles de expresión aumentado; azul niveles de expresión disminuidos; blanco, sin cambios). **(D, E)** *Small RNA blot* para la detección de niveles endógenos de miARNs en líneas mutantes (*hyl1-2*, *hos15-2*, *hda9-1*), sobreexpresantes de HDA9-GFP y control (Col-0) tratadas y no tratadas con ABA. **(D)** Niveles relativos de expresión en las mutantes *hyl1-2*, *hos15-2* y *hda9-1*. **(E)** Niveles relativos de expresión en las sobreexpresantes HDA9-GFP. Los miARNs detectados están indicados a la derecha de cada panel, y la abundancia relativa de cada miARN está indicada por encima de cada banda. La abundancia relativa se calculó cuantificando la intensidad relativa de banda usando el software ImageJ y normalizando con la planta control correspondiente, utilizando U6 como control de carga.

6.4.6 La deficiencia de HOS15 y HDA9 provoca una insignificante alteración de los niveles de pri-miRNA

Los resultados hasta aquí mostrados revelan que la interacción del complejo HOS15-HDA9 con HYL1 efectivamente es capaz de afectar la vía de los miARNs. Si bien es cierto que en condiciones control este complejo no parecería tener un impacto significativo sobre la vía de miARNs, no debemos olvidar que la actividad de HOS15-HDA9 está típicamente asociada a respuestas moleculares frente al estrés y es en ese contexto donde este complejo podría adquirir una mayor relevancia para la biogénesis de miARNs. De hecho, la presencia de ABA favorece la interacción entre el complejo HOS15-HDA9 y HYL1, que finalmente promueve la regulación negativa sobre los niveles de acumulación de miARNs. En ese sentido, teniendo en cuenta la naturaleza funcional del complejo HOS15-HDA9 como represor transcripcional y su capacidad de interactuar con HYL1 en presencia de ABA, especulamos con la idea de que el complejo HOS15-HDA9-HYL1 pueda actuar reprimiendo a nivel transcripcional la expresión de los genes MIR. Este mecanismo podría explicar los niveles elevados de miARNs observados en las mutantes *hos15-2* y *hos15-3* luego de los tratamientos con ABA, asumiendo que en ausencia del complejo represor la transcripción de estos loci se vería incrementada. Para poner a prueba esta hipótesis, decidimos llevar adelante un análisis de transcriptómica evaluando los niveles de pri-miARN en plantas mutantes *hos15-2*, *hyl1-2* y *hda9-1* tanto tratadas como no tratadas con la hormona ABA. En línea con lo reportado anteriormente para mutantes deficientes en el procesamiento de miARNs, las plantas *hyl1-2* mostraron un claro patrón de sobreacumulación de pri-miARNs sin procesar tanto en presencia como en ausencia de ABA (Fig. 14 A). Por su parte, para el caso de las mutantes *hos15-2* y *hda9-1* no se observaron mayores diferencias en el patrón de acumulación de pri-miARNs en comparación con las plantas salvajes, en ninguna de las dos condiciones experimentales analizadas (Fig. 14 A).

Curiosamente, la comparación entre los datos obtenidos del análisis del transcriptoma y los obtenidos a partir de la secuenciación de ARN pequeños reveló que no existe una correlación directa entre los niveles de expresión de los genes *MIRNA* y los niveles de miARN maduros en las mutantes analizadas, salvo en algunos casos específicos como *MIR3932b*, *MIR825* y *MIR5026* (Fig. 14 C). De hecho, en las

mutantes *hyl1-2*, estos dos conjuntos de datos muestran una correlación inversa (Fig. 14 B). Estos resultados sugieren una aparente falta de respuesta transcripcional en las mutantes estudiadas. No obstante, es importante ser cautelosos a la hora de interpretar estos datos ya que se trata de cuantificaciones de niveles estáticos de transcritos y pueden conllevar observaciones artefactuales.

En este sentido, y en un contexto dinámico donde los pri-miARNs están siendo continuamente transcritos y procesados de una manera muy eficiente, evaluar la actividad transcripcional midiendo los niveles estáticos de transcritos resulta extremadamente complejo y rara vez se observa una correlación directa entre la acumulación de miARNs maduros y niveles elevados de pri-miARNs. Generalmente, una acumulación de pri-miARNs resulta evidente solo cuando el procesamiento de los mismos está afectado, como en el caso de mutantes en *HYL1*, *SE* y *DCL1*, pero no es típico en plantas mutantes en cofactores indirectamente asociados a mecanismos de regulación del procesamiento.

Teniendo en cuenta lo detallado anteriormente, decidimos abordar nuestra pregunta acerca de si HOS15-HDA9 está involucrado en la regulación transcripcional de los genes *MIRNA* desde un enfoque experimental más adecuado y tratando de independizarnos del procesamiento de los mismos. Para ello, llevamos a cabo ensayos de ocupación de la Pol II en plantas mutantes tratadas y no tratadas con la hormona ABA. A diferencia del experimento anterior, esta técnica se centra en la cuantificación de la cantidad de complejo transcripcional situado en un loci de particular interés, lo que permite medir la actividad transcripcional independientemente de la estabilidad del ARN resultante. Para este experimento, seleccionamos 3 loci de particular interés basándonos en 3 características principales: primero, sabemos que el complejo de procesamiento de miARNs se asocia a cada uno de esos loci (Cambiagno et al., 2021a); segundo que estos miARNs se procesan de manera co-transcripcional (Gonzalo et al., 2022); y tercero, que, de acuerdo a resultados expuestos previamente, sus niveles aumentan en respuesta al ABA. Estas características, hacen que cada uno de estos loci representen un excelente candidato dada su asociación a *HYL1*, lo que favorece el reclutamiento de HOS15.

Los resultados obtenidos muestran una sobreacumulación de Pol II en los 3 loci seleccionados en plantas mutantes *hos15-2* y *hos15-3*, tanto en condiciones control como en aquellas tratadas con ABA (Fig. 14, D y E). Es decir, los loci analizados presentan una mayor actividad transcripcional como resultado de la ausencia de HOS15, a pesar de no presentar niveles aumentados de pri-miARNs. Esto confirma el papel del complejo HOS15-HDA9 en la represión de la transcripción de los genes *MIRNA*.

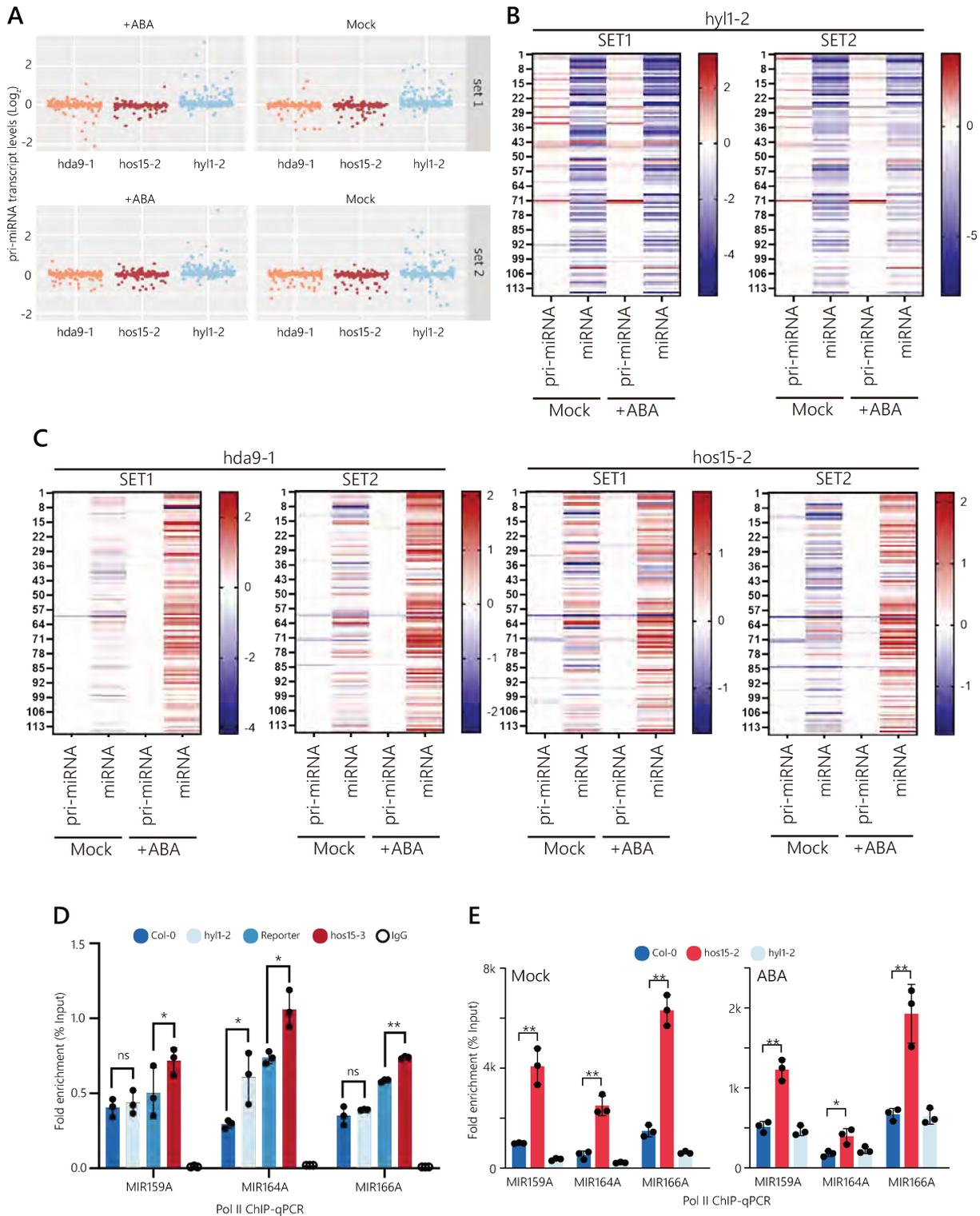


Figura 14. La transcripción de pri-miARNs se encuentra aumentada en mutante *hos15* y *hda9* a pesar de que los niveles estáticos de pri-miARN permanecen estables. (A) Gráfico de dispersión mostrando los niveles estáticos de pri-miARNs en mutantes *hda9-1*, *hos15-2* y *hyl1-2* tratadas y no tratadas (Mock) con 50 μ M ABA. Los niveles fueron determinados a partir del análisis de la secuenciación de ARN pequeños. El eje y muestra los niveles relativos de pri-miARN en base log₂ entre las mutantes y Col-0. Cada punto representa un pri-miARN individual. (B, C) Mapa de calor mostrando los niveles de pri-miARNs y miARNs maduros en plantas mutantes *hda9-1*, *hos15-2* y *hyl1-2* comparadas con plantas WT tratadas y no tratadas con ABA. La barra de colores representa los niveles de expresión de los miARN (rojo, niveles de expresión aumentado; azul niveles de expresión disminuidos; blanco, sin cambios). (D, E) Ensayo de ocupación de la Pol II en los loci de genes *MIRNA*

MIR159a, *MIR164a* y *MIR166a* en plantas Col-0, *hyl1-2*, *hos15-2* (D) y *hos15-3* (E) con o sin tratamiento (Mock) con 100 μ m ABA usando un anticuerpo anti-PolIII. Muestras tratadas con Anti-IgG fueron usadas como control. Los resultados muestran el enriquecimiento relativo frente al INPUT. Los datos representan la media \pm SD de 3 replicados biológicos con 3 réplicas técnicas. Las diferencias significativas fueron determinadas usando un t-test no pareado de 2 colas. *P < 0.05, ** P < 0.001, ns no significativo.

6.4.7 El procesamiento de los pri-miARNs se encuentra favorecido en mutantes de *hos15* y *hda9*

La observación de que las mutantes *hda9-1* y *hos15-2* no presentan diferencias en los niveles de acumulación de pri-miARNs parece inconsistente con el aumento en la transcripción de los genes *MIRNA* y la sobreacumulación de miARNs maduros en respuesta al ABA. Una posible explicación para esta aparente contradicción es que las mutantes analizadas también tengan una mayor actividad en el procesamiento de pri-miARNs. En este contexto, es plausible pensar que una mayor actividad transcripcional de los genes *MIRNA*, acompañada de una mayor tasa de procesamiento de pri-miARNs, podría resultar en un aumento en los niveles de acumulación de miARNs maduros, mientras se mantienen niveles normales de pri-miARNs.

Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis decidimos investigar si la actividad de procesamiento de los miARNs se encuentra afectada en plantas mutantes *hos15* y *hda9*. Para ello, diseñamos ensayos de procesamiento de pri-miARNs *in vitro*, buscando evaluar las diferencias entre los distintos genotipos mutantes. En primer lugar, aislamos fracciones nucleares de plantas Col-0, *hos15-2* y *hda9-1* (Fig. 15 B) y las incubamos con los pri-miARNs pri-miR172c y pri-miR159b, conteniendo la base UTP marcada radiactivamente, para monitorear la actividad de procesamiento en ausencia de HOS15 y HDA9.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el procesamiento de ambos pri-miARNs en las plantas mutantes *hda9-1*, en comparación con las plantas salvajes, mientras que en las mutantes *hos15-2* el aumento fue más sutil pero constante (Fig. 15 A). En adición a estos ensayos, expresamos y purificamos una versión recombinante de la proteína DCL1 para realizar un nuevo ensayo de procesamiento *in-vitro* del pri-miR172c, con el fin de validar que los fragmentos observados en los ensayos previos correspondieran efectivamente a productos del procesamiento. El patrón de clivaje del pri-miR172c obtenido fue prácticamente idéntico al observado previamente, confirmando la eficiencia del ensayo (Fig. 15 C).

Siguiendo la línea de los hallazgos presentados hasta aquí decidimos evaluar como impacta la hormona ABA en este procesamiento. Para ello, aislamos las fracciones nucleares de plantas Col-0, *hos15-2* y *hda9-1* tratadas y no-tratadas con la hormona ABA y repetimos los ensayos de procesamiento anteriores, esta vez incluyendo además el pri-miR398a en el análisis. Una vez más, los resultados muestran que los efectos se acentúan en presencia de la hormona ABA. En este caso, observamos un

aumento en la velocidad de procesamiento de los pri-miARNs analizados, para las mutantes *hos15-2* y *hda9-1* tratadas con ABA frente a las no tratadas (Fig. 15 D).

Un aumento en la actividad o velocidad en el procesamiento de los pri-miARNs podría resultar en una mayor acumulación de miARNs procesados incorrectamente. Para evaluar si algo similar estaba ocurriendo en nuestras mutantes, decidimos analizar nuestros datos de secuenciación de ARN pequeños en busca de miARNs mal procesados.

La mutante *hyl1-2*, usada como control positivo en nuestro análisis, exhibe un perfil típico de miARNs erróneamente procesados (C. Liu et al., 2012) (Fig. 15 E). Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para las mutantes *hos15-2* y *hda9-1* con los obtenidos para *hyl1-2* no se observaron similitudes entre los patrones de procesamiento obtenidos, indicando que el aumento en la actividad de procesamiento de pri-miARNs en estas mutantes no resulta en un miARN aberrante (Fig. 15 E). Estos resultados apoyan un escenario en el cual la ausencia de HOS15 y HDA9 conduce a un incremento en el procesamiento de pri-miRNAs para compensar la mayor transcripción de genes *MIRNA* provocada por la mutación. Este mecanismo mantendría niveles estables de pri-miARNs, en coexistencia con niveles aumentados de miARNs maduros. En conjunto, nuestros datos sugieren que el complejo HOS15-HDA9 es un supresor condicional del procesamiento de pri-miARNs sensibles a ABA.

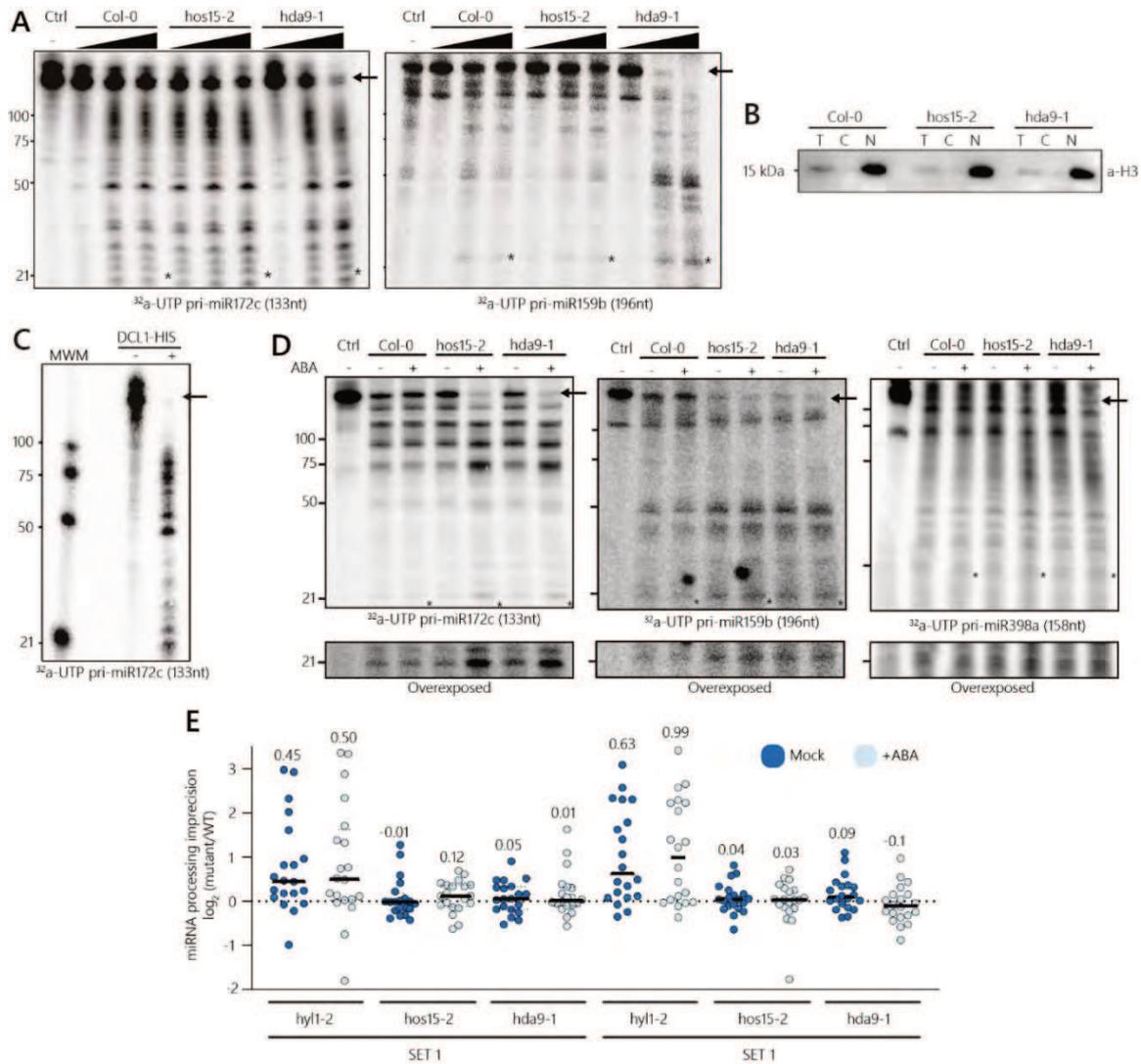


Figura 15. El tratamiento con ABA causa un aumento en el procesamiento de pri-miARNs en plantas mutantes *hos15* y *hda9*. (A) Ensayo de procesamiento de pri-miARN *in vitro* realizados con concentraciones relativas crecientes (1x, 2x, 4x, etc.) de extractos nucleares totales de plantas *hos15-2*, *hyl1-2* y *hda9-1*. Los números a la izquierda muestran los tamaños moleculares en bases. Las flechas negras señalan pri-miARN sin procesar y los asteriscos negros muestran los miARN maduros miR172c y miR159b. (B) Fraccionamiento subcelular seguido de análisis por inmunoblot en plantas mutantes (*hos15-2* y *hda9-1*) y control (Col-0). Las fracciones correspondientes son: T (Extracto total), C (citoplasmático), N (núcleos aislados). La fracción nuclear fue empleada para los ensayos de procesamiento *in-vitro*. (C) Procesamiento *in-vitro* del pri-miR172c usando la proteína recombinante 6xHis-DCL1. La flecha indica el pri-miR172c sin procesar. (D) Ensayo de procesamiento de pri-miARN *in vitro* realizados con extractos nucleares totales de plantas *hos15-2*, *hyl1-2* y *hda9-1* tratadas y no tratadas (Mock) con 50 μ M ABA. Los números a la izquierda muestran los tamaños moleculares en bases. Las flechas negras señalan pri-miARN sin procesar y los asteriscos negros muestran los miARN maduros miR172c y miR159b. Gráfico de dispersión mostrando los niveles estáticos de pri-miARNs en mutantes *hda9-1*, *hos15-2* y *hyl1-2* tratadas y no tratadas (Mock) con 50 μ M ABA. Los niveles fueron determinados a partir del análisis de la secuenciación de ARN pequeños. El eje y muestra los niveles relativos de pri-miARN en base log₂ entre las mutantes y Col-0. Cada punto representa un pri-miARN individual. (E) La precisión en el procesamiento de miARNs es representada como el cociente en base log₂ entre la imprecisión en el procesamiento en mutantes y la imprecisión en las plantas salvajes para cada pri-miARN de los siguientes pares mutante/salvaje; *hyl1-2*, *hos15-2*, *hda9-1* en presencia o ausencia de ABA. Cada punto representa un miARN individual.

6.5 Capítulo 1: Discusión

Así como a lo largo de estos últimos años la vía de biogénesis de miARNs ha ido evolucionando hasta llegar al modelo dinámico actualmente planteado, las funcionalidades centrales de HYL1 y su relevancia en este proceso han sido vastamente caracterizadas también.

HYL1 fue inicialmente descrita como una proteína de unión al ARN doble cadena (*dsRNA-binding protein*) encargada de regular la transcripción y estabilidad de los miARNs (Han et al., 2004). Más adelante, nuevas investigaciones usando mutantes nulas de HYL1 revelaron nuevos aspectos biológicos de esta proteína que la posicionan como uno de los componentes más importantes de la biogénesis de miARNs en plantas. Sumado a ello, estudios recientes sugieren la participación de HYL1 fuera de la biogénesis de miARNs, modulando la inhibición traduccional mediada por miARNs y la transcripción de genes *MIRNA* (Bielewicz et al., 2023; X. Yang et al., 2021). Además, se ha reportado la interacción de HYL1 con las proteínas TPL1, TPR1, TPR2 y TPR4, las cuales son proteínas LisH-WD40 típicamente asociadas a la represión transcripcional (Bielewicz et al., 2023), evidenciando la existencia de una conexión entre la transcripción y la maquinaria de procesamiento de miARNs. Sin embargo, no está claro si HYL1 es capaz de ejercer de manera directa una modulación transcripcional o si solo promueve el reclutamiento de reguladores transcripcionales al sitio.

Con la evidencia cada vez mayor de un reclutamiento temprano de la maquinaria de procesamiento al loci de gen *MIRNA* y de un procesamiento co-transcripcional del pri-miARN naciente, cabe tanto la posibilidad de que la maquinaria de procesamiento reclute a HYL1 a los loci de genes *MIRNA* activos como la de que sea HYL1 quien reclute a la maquinaria a estos loci. En este trabajo demostramos que HYL1 es capaz de reclutar a HOS15, otra proteína LisH-WD40, para modular la transcripción de un subconjunto de miARNs. HYL1 también es capaz de interactuar con HDA9 y HDA19, las cuales por su parte interactúan con HOS15 y los complejos TPL-TPR, formando una red de interacciones que sugiere que ciertos loci de genes *MIRNA* podrían estar siendo específicamente regulados por estos complejos de remodelación de la cromatina. En este trabajo demostramos que la asociación de HYL1 a la cromatina depende estrictamente de la presencia de un pri-miARN naciente y que dicha asociación a su vez permite el reclutamiento del complejo de remodelación de la cromatina HOS15-HDA9 a los loci de genes *MIRNA*, especialmente en un contexto de tratamiento con ABA.

Curiosamente, nuestros resultados sugieren que muchas de las funciones de HYL1 asociadas a la regulación de la transcripción reflejan su capacidad de promover el reclutamiento de reguladores transcripcionales a los loci de genes *MIRNA*, interaccionando tanto con ellos como con la región doble cadena de la horquilla de pri-miARN naciente. En ese contexto, como HYL1 se une a los pri-miARNs nacientes al nivel de la cromatina, solo aquellos pri-miARNs procesados de manera cotranscripcional serían propensos a la acción del complejo HOS15-HDA9. Además, dado que la relación entre procesamiento co-transcripcional y procesamiento post-transcripcional varía entre diferentes pri-

miARNs y condiciones celulares (Gonzalo et al., 2022), el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9, dependiente de HYL1, a los loci de genes *MIRNA* puede estar sujeto también a estas variaciones. La estructura de tallo y bucle de los pri-miARNs parecería ser la marca distintiva reconocida por HYL1 en los loci *MIRNA*, pero es posible que otras proteínas del complejo de procesamiento reclutadas por el complejo *elongator/mediator*, como DCL1 y HST (Cambiagno et al., 2021a; X. Fang et al., 2015) actúen como andamiaje para reclutar a HYL1 a los loci de genes *MIRNA*. Estos hallazgos sugieren no solo que la maquinaria transcripcional podría promover la biogénesis de miARNs mediante el reclutamiento del complejo de procesamiento a la cromatina sino también que la maquinaria de procesamiento en sí misma sería capaz de reclutar y estabilizar reguladores transcripcionales. Esto establece una inesperada regulación cruzada bidireccional entre ambos procesos, como se sugiere en el caso de PRP40 (Stepien et al., 2022).

El aumento en la asociación de HYL1 y HOS15 con los loci de genes *MIRNA* en respuesta al tratamiento con ABA sugiere que una señal hormonal es necesaria para la transición desde un estado transcripcionalmente activo a uno reprimido para algunos loci de genes *MIRNA*. Considerando que, en presencia de ABA, HDA9 interactúa con factores de transcripción de respuesta al ABA como ABI4 a nivel de la cromatina, estos factores de transcripción podrían unirse a los loci de genes *MIRNA* de respuesta al ABA y promover el entrecruzamiento entre el complejo HOS15-HDA9 y el pri-miARN naciente asociado a HYL1 en un contexto de respuesta al ABA. Curiosamente, incluso en respuesta al tratamiento con ABA, solo un subconjunto de miARNs parecen ser afectados por el complejo HOS15-HDA9, explicar la naturaleza de esta selectividad no es una tarea trivial.

La evidencia sugiere que quizás ni siquiera existe un mecanismo específico, sino que el conjunto de miARNs que está siendo regulado por HOS15-HDA9 puede ser meramente circunstancial y cambiar continuamente dependiendo del tejido o condición celular reinante. También sería de esperar que HOS15-HDA9 tenga un efecto regulador solo sobre un subconjunto de miARNs que están en la intersección de varias condiciones cruciales: a- como HOS15-HDA9 necesita de HYL1 para reconocer los loci de genes *MIRNA*, sólo aquellos tejidos o condiciones en las cuales las 3 proteínas se estén expresando en simultaneo son adecuados para dicha regulación, como en el caso del tratamiento con ABA. b- HOS15-HDA9 es reclutado por HYL1, con lo cual, solo aquellos miARNs que dependen de HYL1 para su procesamiento (Ré et al., 2019) pueden ser alcanzados por el complejo HOS15-HDA9. c- De manera similar, como el reclutamiento de HYL1, y en consecuencia el de HOS15-HDA9, depende del pri-miARN naciente, solo aquellos loci de genes *MIRNA* transcripcionalmente activos pueden ser blancos de esta regulación. d- En este mismo sentido, como HYL1 debe asociarse a pri-miARNs nacientes para reclutar a HOS15-HDA9 a la cromatina, todos aquellos miARNs que sean procesados exclusivamente a nivel post-transcripcional (Gonzalo et al., 2022) escaparán a la regulación por HOS15-HDA9. Dado que en muchas oportunidades, el procesamiento co-transcripcional o no co-transcripcional de un miARN depende de las condiciones ambientales (Gonzalo et al., 2022), un locus

que potencialmente recluta a HYL1-HOS15-HDA9 en condiciones de tratamiento con ABA, podría no hacerlo en otras condiciones. e- Finalmente, el complejo HOS15-HDA9 actúa modulando los niveles de compactación de la cromatina, cambiando la acetilación de las mismas. Y en ese contexto, no todos los loci de genes *MIRNA* poseen un perfil de histonas adecuada para su regulación por HOS15-HDA9, incluso si dicho complejo es reclutado. Teniendo en cuenta cuan pequeño es el conjunto de miARNs capaz de cumplir con estos requerimientos no es de sorprender que muchos factores de la biogénesis de miARNs modulen solo un subconjunto de los mismos y no veamos un efecto a nivel general en condiciones control. Aun así, el mecanismo hasta aquí expuesto del complejo HOS15-HDA9-HYL1 en la supresión del procesamiento de pri-miARNs en respuesta a ABA debe ser investigado adicionalmente en conexión con la proteostasis del complejo de procesamiento.

Curiosamente, nuestros hallazgos muestran que las mutantes en *hos15* y *hda9* acumulan mayores niveles de miARNs maduros en condiciones de tratamiento con ABA incluso cuando los niveles de la mayoría de los pri-miARNs permanecen inalterados. No obstante, la cuantificación de los niveles estáticos de pri-miARNs no necesariamente refleja de manera precisa la actividad transcripcional de los pri-miARNs porque cualquier fluctuación en la actividad puede ser fácilmente enmascarada por la alta eficiencia del complejo de procesamiento, que remueve cualquier exceso de pri-miARNs, manteniendo inalterados los niveles de pri-miARNs sin procesar en la mayoría de las plantas, salvo aquellas mutantes en proteínas del núcleo central de procesamiento. Nuestros resultados muestran que una deficiencia en el complejo HOS15-HDA9 aumenta la actividad transcripcional de los loci de genes *MIRNA* manteniendo constante los niveles de pri-miARNs mediante una mayor producción de miARNs maduros. Este proceso parecería diferir de la función previamente reportada para el remodelador de la cromatina BRAHMA, que desarma la estructura secundaria del pri-miARNs suprimiendo la biogénesis (Z. Wang et al., 2018) y de FORKHEAD-ASSOCIATED DOMAIN 2 (FHA2), que directamente interactúa con DCL1 y HYL1 para suprimir el procesamiento de miARNs (S. J. Park et al., 2021).

Analizados conjuntamente, nuestros resultados muestran que HOS15-HDA9 puede regular un subconjunto de genes *MIRNA* tanto a nivel transcripcional como en su procesamiento, a partir de su interacción con HYL1 en la cromatina. Sin embargo, la relevancia fisiológica de la interacción de HYL1 con HOS15 y HDA9 y su subsecuente impacto en la acumulación de miARNs permanece desconocido. Muchos de los miARNs regulados en una condición experimental determinada podrían no tener un profundo impacto en la homeostasis de la planta. Sin embargo, el mecanismo de reclutamiento y regulación que identificamos es potencialmente más eficiente en genes transcripcionalmente activos. Entonces, en condiciones de tratamiento con ABA, podría ocurrir que todos los miARNs que responden a esta hormona con un aumento en la transcripción sean activamente alcanzados por HYL1. Esta asociación, crítica para el procesamiento de miARNs, conducirá en última instancia al reclutamiento específico del complejo HOS15-HDA9 desencadenando la represión de los genes y retornando la homeostasis en los niveles de miARNs luego del estímulo. Resulta interesante conocer si el

reclutamiento del complejo represor es homogéneo o si es necesario alcanzar un umbral transcripcional previo al reclutamiento. En este sentido, una alta tasa de transcripción acompañada con un procesamiento co-transcripcional de los pri-miARNs puede aumentar los niveles de HYL1 en loci de gen *MIRNA* particular, aumentando las posibilidades de que HOS15-HDA9 reconozca y disminuya su expresión en un mecanismo de compensación. La observación de que tanto la velocidad de transcripción y la frecuencia de procesamiento co-transcripcional cambien bajo condiciones de estrés podría causar un escenario más favorable para la asociación de HYL1 a los loci de genes *MIRNA*, lo cual explicaría nuestros resultados observados en un contexto de tratamiento con ABA.

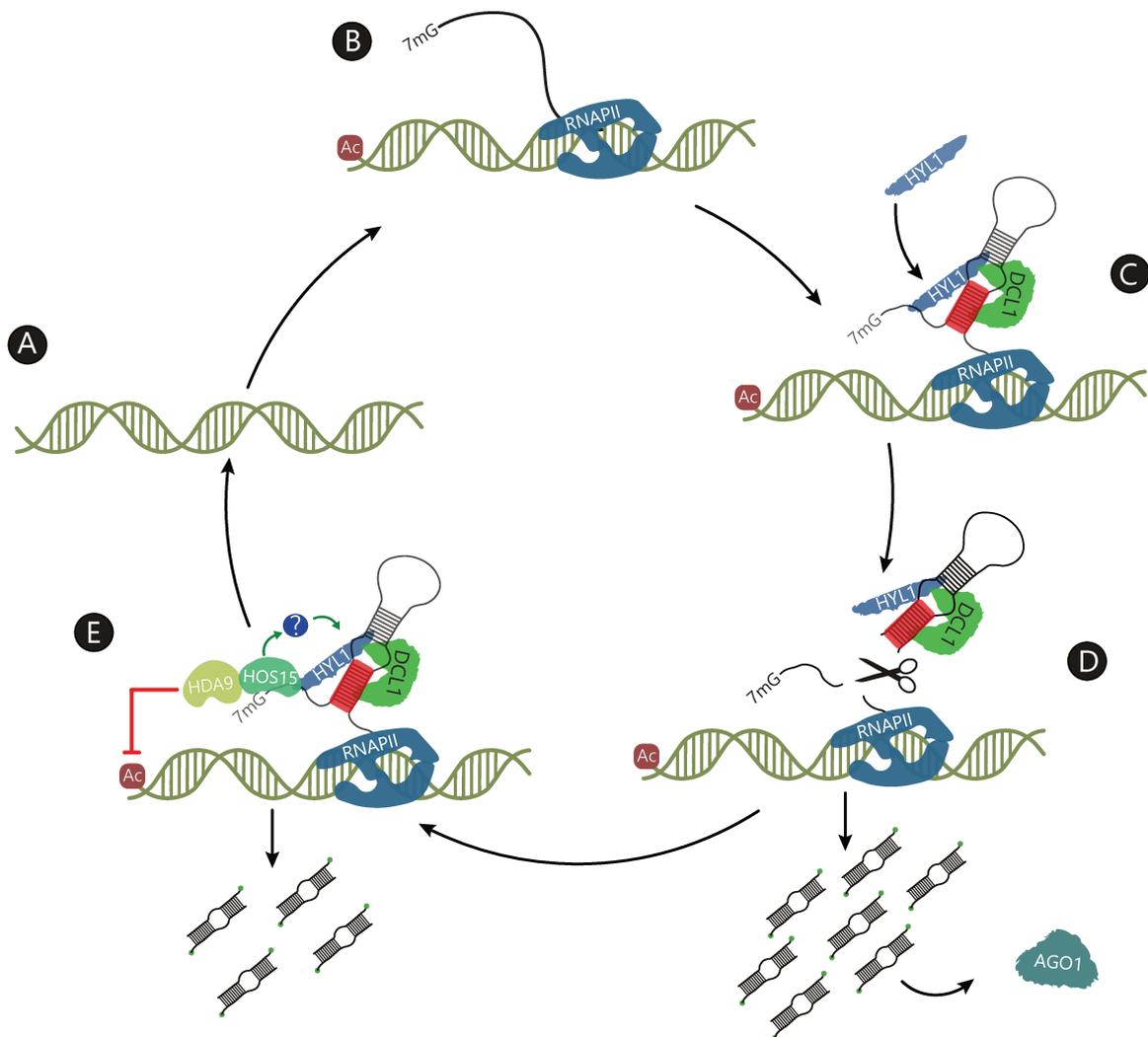


Figura 16. HYL1 recluta al complejo remodelador de la cromatina HOS15-HDA9 HYL1 a los loci de genes *MIRNA* para modular su expresión. Un modelo mostrando como un loci transcripcionalmente inactivo de *MIRNA* (A) puede ser transcrita por la Pol II (B) para dar lugar a un pri-miARN que se pliega dando lugar a la particular estructura de tallo y bucle (C). El tallo doble cadena del pri-miARN es reconocido por HYL1 y el complejo de procesamiento conteniendo a DCL1 (C). La asociación del complejo al pri-miARN naciente dispara el procesamiento y la consecuente producción de miRNAs maduro que serán cargados en AGO1 (D). En algunos loci, y específicamente en condiciones de tratamiento con ABA, HYL1 actúa como andamio para reclutar a HOS15 y HDA9 a los loci de genes MIR (E). La interacción permite el reconocimiento del loci MIR por el complejo remodelador de la cromatina HOS15-HDA9, que eventualmente cambiará el perfil de acetilación de

histonas (**E**). Este proceso conduce a la represión de la transcripción del gen *MIRNA*, volviéndolo a un estado represivo (**A**).
Queda por explorar si el complejo HOS15-HDA9 podría además modular la proteostasis de HYL1 (**E**).

CAPÍTULO 2

“EL MULTIVERSO DE FUNCIONALIDADES DE HYL1: EL DOMINIO C-TERMINAL ACTUA COMO INTERACTOR ESPECIFICO PARA MODULAR FUNCIONALIDADES NO CANONICAS DE LA PROTEINA”

7. CAPITULO 2

7.1 Introducción

Hasta aquí hemos realizado una exposición de los resultados experimentales obtenidos a partir de la caracterización de un nuevo cofactor en la biogénesis de miARNs, HOS15. Sin embargo, estos hallazgos no solo evidencian el rol de HOS15 en dicha vía, sino que también proponen un fascinante mecanismo previamente desconocido que asocia la regulación epigenética y la actividad de miARNs. En ese sentido, el modelo propuesto durante el desarrollo del primer capítulo de esta tesis aprovecha la especificidad de la unión de HYL1 con los pri-miARNs y su capacidad de interacción con componentes claves de otras vías para establecer nuevos mecanismos de regulación específicos sobre la biogénesis de miARNs. En consecuencia, este modelo posiciona a HYL1 como un nodo central en el que confluyen distintos mecanismos moleculares.

En ese sentido, el rol de HYL1 orquestando todo este proceso y confiriéndole la especificidad correspondiente al complejo remodelador de la cromatina sobre la actividad de miARNs propone una nueva capa de funcionalidad en el amplio repertorio de roles que parece cumplir HYL1. Estas observaciones, ponen a HYL1 en un plano central tanto de la regulación de la biogénesis de miARNs, donde por un lado es capaz de interaccionar directamente con los pri-miARNs y miARNs para llevar adelante sus funciones típicamente asociadas a la biogénesis y procesamiento de miARNs, mientras que por otro lado esa misma capacidad de unirse ARN promueve el reclutamiento e interacción con los componentes de otras vías de regulación, para finalmente modular la actividad de biogénesis de miARNs de manera indirecta.

A partir del hallazgo de esta nueva actividad no canónica de HYL1 fue que decidimos continuar este trabajo estudiando nuevas funciones asociadas a la proteína HYL1, tomando como punto de partida las diferentes características estructurales de la proteína y particularmente sus dominios desconocidos.

7.1.1 La estructura proteica de HYL1

Estructuralmente, HYL1 está formada por 279 aminoácidos y puede ser dividida en 3 porciones bien definidas tanto desde una perspectiva estructural como funcional. Partiendo desde su región N-terminal y abarcando una longitud total de ~170 aminoácidos encontramos dos dominios de unión al ARN doble cadena (dsRBD, *double-stranded RNA-binding domains*), dsRBD1 y dsRBD2, una señal de localización nuclear en la porción intermedia (Wu et al., 2007) y ya cerca del extremo C-terminal, una región intrínsecamente desordenada compuesta por una serie de 6 repeticiones casi idénticas de 28 aminoácidos cada una (Fig. 17A).

Los dominios dsRBD, cruciales para la interacción con ARN, adoptan una estructura del tipo $\alpha\beta\beta\alpha$ (Rasia et al., 2010; S. W. Yang et al., 2010a) y la proteína exhibe una afinidad similar para los pri-miARNs, pre-miARNs y dúplex de miARNs, lo que sugiere que HYL1 permanece asociada a la región que codifica para el miARN durante la mayor parte del ciclo de vida del miARN (S. W. Yang et al., 2010a). Al comparar la naturaleza de cada uno de estos dominios, es posible ver que dsRBD1 exhibe una mayor afinidad por el ARN doble cadena que dsRBD2 (Rasia et al., 2010; S. W. Yang et al., 2010a). Dentro del dsRBD1 se han identificado aminoácidos específicos que resultan esenciales para la unión al dsRNA (Rasia et al., 2010) y el comportamiento electrostático del mismo (Burdisso et al., 2014). Sin embargo, la presencia de dsRBD2 es crítica para la asociación estable y precisa de dsRBD1 con el ARN doble cadena. A diferencia del dsRBD1, dsRBD2 exhibe diferencias notables en su forma con respecto a los dsRBD canónicos y su función principal es la de interactuar con otras proteínas (S. W. Yang et al., 2010a).

Por otro lado, cada uno de estos dsRBD cumple funciones reguladoras cruciales en la estabilidad y actividad de la proteína. En este sentido, la fosforilación de los residuos S42 y S159 de la proteína, ubicados en el dsRBD1 y dsRBD2, respectivamente, son un elemento clave que controla tanto su estabilidad como su actividad (Manavella et al., 2012) (Fig. 17A). Las variantes fosforiladas de estos residuos confieren estabilidad a la proteína, especialmente protegiéndola de la degradación que normalmente sufre en oscuridad, a costa de ser inactiva en la biogénesis de miARNs. Por el contrario, las versiones defosforiladas se corresponden con una proteína activa pero más inestable (Achkar et al., 2018; Manavella et al., 2012).

Más precisamente, en un contexto de exposición prolongada a la oscuridad, HYL1 es degradada activamente por la proteasa HYL1-CLEAVAGE SUBTILASE 1 (HCS1) en el citoplasma mientras una fracción de proteína fosforilada inactiva es mantenida en el núcleo, protegiéndola de la degradación (Achkar et al., 2018; Jung et al., 2022). En presencia de luz, HYL1 es defosforilada rápidamente, volviéndose activa mientras que la E3-ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) es exportada hacia el citoplasma para reprimir activamente la actividad de HCS1, evitando la degradación de HYL1 (Achkar et al., 2018; Cho et al., 2014; Jung et al., 2022).

Hace años se propuso que la presencia del dominio C-terminal es prescindible para la actividad de HYL1 durante la biogénesis de miARNs (Wu et al., 2007). Estos resultados han sido recientemente validados en nuestro laboratorio y reportados en el trabajo de tesis doctoral de Natalia Achkar (Achkar, 2021). Sin embargo, un estudio reciente propone que sería indispensable para la homodimerización de HYL1 (Wieczorek et al., 2023). Otros resultados obtenidos mediante espectrometría de masas sugieren que la serina en el péptido EAAFSGSVETEK, presente en cada una de las 6 repeticiones del dominio C-terminal, puede ser fosforilada (Manavella et al., 2012) (Fig. 17B). Curiosamente, este dominio C-terminal repetitivo muestra un alto grado de conservación en la identidad de los aminoácidos entre

ecotipos o distintas especies vegetales pero el número de estas repeticiones es variable (Manavella et al., 2012; Nasrallah et al., 2000; Parkin et al., 2005) (Fig. 17B).

La alta conservación observada para los aminoácidos entre repeticiones, a pesar de la variabilidad en el número de repeticiones entre diferentes especies de plantas (Manavella et al., 2012), y la posibilidad de fosforilación de esta región (Manavella et al., 2012) sugieren una potencial funcionalidad, aunque su rol específico sigue siendo desconocido. En ese sentido, es posible que la homodimerización de HYL1 a través del C-terminal o la interacción con otras proteínas, procesos que potencialmente pueden ser regulados por fosforilación, controlen algunas de las funciones de HYL1 no asociadas a la biogénesis de miARNs. Estas observaciones nos motivaron a caracterizar y estudiar la funcionalidad de este dominio de HYL1.

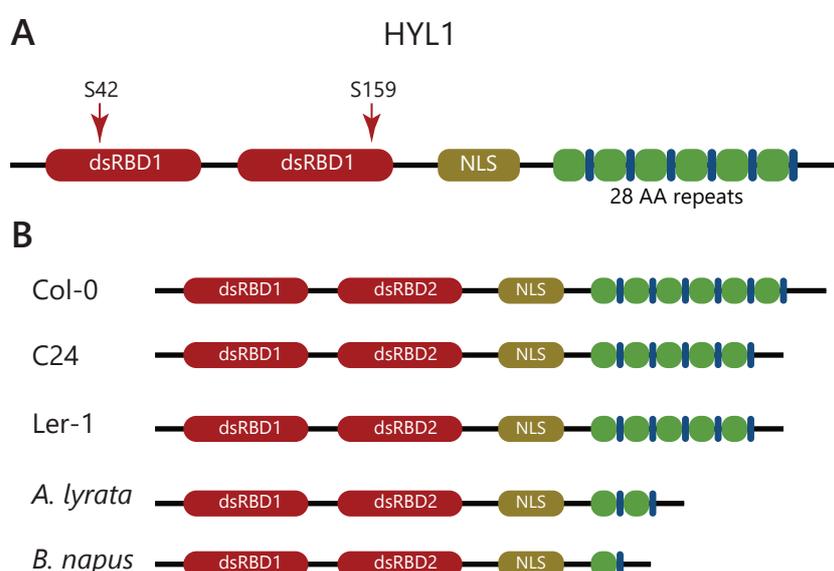


Figura 17. Estructura proteica de HYL1 y conservación de su dominio C-terminal. (A) Representación gráfica mostrando la estructura proteica de HYL1 con sus respectivos dsRBD1 y dsRBD2, su NLS y la serie de 6 repeticiones de 28 aa. La fosforilación de las S42 y S159 marcadas tienen un papel crucial en la estabilidad y funcionalidad de la proteína. (B) Variabilidad entre el número de repeticiones entre los diferentes ecotipos de *A. thaliana* y las diferentes especies vegetales. No obstante, la secuencia proteica y nucleotídica presente en cada repetición contiene un alto porcentaje de identidad entre las diferentes especies y ecotipos. Los bloques rojos representan a dsRBD1 y dsRBD2 debidamente señalados, el bloque amarillo es el NLS mientras que los bloques verdes representa la serie de repeticiones. Ilustración adaptada de Manavella et al (Manavella et al., 2012).

7.1.2 El multiverso funcional de HYL1

Estudios bioquímicos mostraron que HYL1 es capaz de promover el procesamiento eficiente de miARNs a través de su interacción con DCL1 lo que afecta también la selección de la hebra correcta del dúplex en AGO1 (Dong et al., 2008; Eamens et al., 2009; Kurihara et al., 2006; Manavella et al., 2012). Estudios posteriores mostraron que el procesamiento de miARNs mediado por DCL1 puede ocurrir de manera eficiente aun en ausencia de HYL1, solo en condiciones de baja temperatura, mientras

que un puñado parecen ser procesados naturalmente de manera independiente de HYL1 (Re et al., 2024; Szarzynska et al., 2009). Estas observaciones, se suman al hallazgo de una mutación puntual en DCL1 que le confiere la capacidad de llevar adelante el procesamiento de manera independiente de HYL1 (Tagami et al., 2009), sugiriendo que HYL1 podría actuar modulando la estructura de DCL1, dando lugar al correcto procesamiento del pri-miARN.

No obstante, la función de HYL1 en la biogénesis de miARNs no solo se restringe a la modulación de la estructura de DCL1, sino que también actúa en otros niveles. Un estudio reciente sugiere que HYL1 podría asociarse a Pol II de manera independiente de DCL1 y SE, controlando la iniciación de la transcripción y la elongación de los genes *MIRNA* (Bielewicz et al., 2023). En ese sentido, HYL1 podría estar asociada al loci de gen *MIRNA* durante la transcripción del pri-miARN y ayudar al ensamblado del complejo de procesamiento alrededor del pri-miARN naciente tan pronto como la estructura de tallo y bucle se forme. Este proceso podría explicar la eficiencia del procesamiento co-transcripcional de muchos miARNs (Gonzalo et al., 2022). En línea con estos hallazgos, en este trabajo de tesis hemos demostrado la capacidad de HYL1 de asociarse a los loci de genes *MIRNA* a partir del reconocimiento y unión a los pri-miARN nacentes (J. Park et al., 2023). A partir de allí, HYL1 es capaz de reclutar al complejo remodelador de la cromatina HOS15-HDA9 para modular transcripcionalmente la actividad de los miARNs. Sumado a ello, la unión de HYL1 a los pri-miARNs, dependiente de su homodimerización, los protege de la degradación mediada por el exosoma nuclear (Fan, Gao, et al., 2022; Gao et al., 2020). Sin embargo, en ausencia de AAR2, HYL1 es capaz de desencadenar la degradación de los pri-miARNs aunque no hay evidencia acerca del mecanismo involucrado (Fan, Gao, et al., 2022). Estos resultados opuestos ponen en evidencia que el rol de HYL1 se extiende más allá de solo controlar la eficiencia del procesamiento por DCL1, llegando a modular directamente la homeostasis y estabilidad de los pri-miARNs.

HYL1 también es un factor clave en el procesamiento post-transcripcional de miARNs. En *D-bodies*, HYL1 participa en el procesamiento de pri-miARNs y posteriormente permite su salida de estos corpúsculos (D. Xie et al., 2021). En ese sentido, las helicasas de ARN RCF1, RH6, RH8 y el complejo THO/TREX aumentan la afinidad de HYL1 por los pri-miARNs y promueven la formación de *D-bodies* (Francisco-Mangilet et al., 2015; Q. Li et al., 2021; S. J. Park et al., 2021; Xu et al., 2023).

Una vez finalizada la biogénesis del dúplex miARN/miARN* este es liberado de los *D-bodies* y, aun unido a HYL1, es metilado en ambos extremos 3' por la enzima HEN1 protegiéndolos de la degradación (Baranauske et al., 2015; J. Li et al., 2005; D. Xie et al., 2021; B. Yu et al., 2005). El dúplex metilado, aun unido a HYL1, es transferido a AGO1, proceso facilitado por CARP9, para finalmente abandonar el núcleo hacia el citoplasma donde cumple su función regulatoria (Bologna et al., 2018; Tomassi et al., 2020). Llamativamente, los miARNs que abandonan el núcleo unidos a AGO1 parecen incapaces de moverse fuera de la célula, mientras que un pool citoplasmático de miARNs libres serían los que logran

migrar (Brioudes et al., 2021; Liang et al., 2022; Voinnet, 2022b), (Dalmadi et al., 2019). Dada la naturaleza de HYL1 y su localización dual, es posible especular que el pool de miARNs citoplasmático libre este mediado por HYL1. No obstante, hasta el momento no existe evidencia que respalde esta hipótesis.

Otro estudio sugiere que, en un contexto de respuesta a la oscuridad, HYL1 podría modular tanto la actividad como la estabilidad de HY5, impactando en el crecimiento y desarrollo de los hipocótilos en plántulas, en una manera independiente a la actividad de miARNs (Sacnun et al., 2020). No obstante, el mecanismo asociado a dicha regulación sigue siendo poco comprendido.

Finalmente, un trabajo publicado recientemente propone que la versión citoplasmática HYL1 podría además estar involucrada en el silenciamiento génico a través del mecanismo de inhibición traduccional de los mensajeros blanco (X. Yang et al., 2021). El mecanismo de inhibición traduccional es un proceso poco comprendido actualmente, en gran parte debido a que su estudio ha sido prácticamente ignorado durante todo este tiempo. Los primeros cofactores involucrados en este mecanismo fueron KATANIN 1 (KTN1), VARICOSE (VCS) y la proteína GW-repeat SUO (Brodersen et al., 2008a; L. Yang et al., 2012). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares involucrados. En esta publicación los autores proponen que la fracción citoplasmática de HYL1, podría tener un rol independiente al de su contraparte nuclear en la biogénesis de miARNs, interaccionando con AGO1 y ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) en el retículo endoplasmático para favorecer la formación de polisomas, y potencialmente desencadenar la inhibición traduccional sobre un subconjunto de mRNA *targets* (X. Yang et al., 2021).

Aquí surge una pregunta interesante acerca de si HYL1 logra esta función de manera indirecta asistiendo a AGO1 o bien, directamente a través de la asociación de HYL1 a los miARNs. En este último caso, la asociación nuclear de HYL1 con el dúplex de miARN maduro adquiere una mayor relevancia en el citoplasma.

7.1.3 Enfoque experimental del estudio del C-terminal de HYL1

Para el desarrollo de este segundo capítulo de tesis nos propusimos explorar las características funcionales y regulatorias del dominio C-terminal de HYL1, un aspecto de la proteína muy poco comprendido hasta el momento.

Para ello, desarrollamos una colección de construcciones genéticas basadas en la secuencia codificante de HYL1 conteniendo un número variable de repeticiones en su C-terminal, desde 0 hasta 6. Además, generamos versiones que imitan tanto un estado fosforilado como no fosforilado de dicha región. Estas construcciones fueron posteriormente utilizadas en una batería de experimentos específicamente

diseñados para la caracterización de este C-terminal y, en función de las necesidades experimentales, cada una de las variantes fue fusionada a diferentes promotores o proteínas específicas.

Por otro lado, planteamos una búsqueda masiva de interactores diferenciales para cada una de las versiones de HYL1, basándonos en la técnica de *TurboID proximity labeling* (X. Li et al., 2023; Mair et al., 2019; Wallner et al., 2024; T. Wang et al., 2023). Luego, a partir de la identificación de los interactores buscamos generar asociaciones funcionales específicas para cada una de las versiones, que nos permitan inferir una actividad diferencial para el dominio C-terminal.

7.1.4 TurboID proximity labeling como herramienta biotecnológica en la búsqueda masiva de interactores

TurboID proximity labeling ha emergido recientemente como una poderosa herramienta en proteómica para el estudio de interacciones proteína-proteína y microambientes subcelulares en sistemas vivos (Branon et al., 2018; X. Li et al., 2023; Mair et al., 2019; T. Wang et al., 2023). Este enfoque se basa en la actividad ligasa de biotina de la enzima TurboID, que permite biotinilar proteínas cercanas de manera no específica, aunque dependiente de la proximidad. Para su aplicación, es posible generar construcciones genéticas que permitan expresar fusiones proteicas entre una proteína de interés y TurboID en sistemas vivos. De este modo, la proteína de interés dirige a la enzima hacia su entorno celular natural. Al añadir biotina exógena al medio, se favorece la actividad enzimática de la TurboID, que biotinila específicamente residuos de lisina en las proteínas cercanas y genera una “nube” de proteínas biotiniladas, cuya extensión depende, entre otros factores, de la concentración de biotina suministrada y del tiempo de tratamiento efectuado. De este modo, es posible etiquetar proteínas presentes en el mismo entorno celular que la proteína de interés.

Posteriormente, las proteínas biotiniladas pueden ser purificadas utilizando beads recubiertas con estreptavidina, aprovechando la interacción extremadamente fuerte entre esta última y la biotina. Finalmente, las proteínas enriquecidas son identificadas a través de análisis mediante espectrometría de masas, obteniéndose una colección de posibles interactores de nuestra proteína de interés.

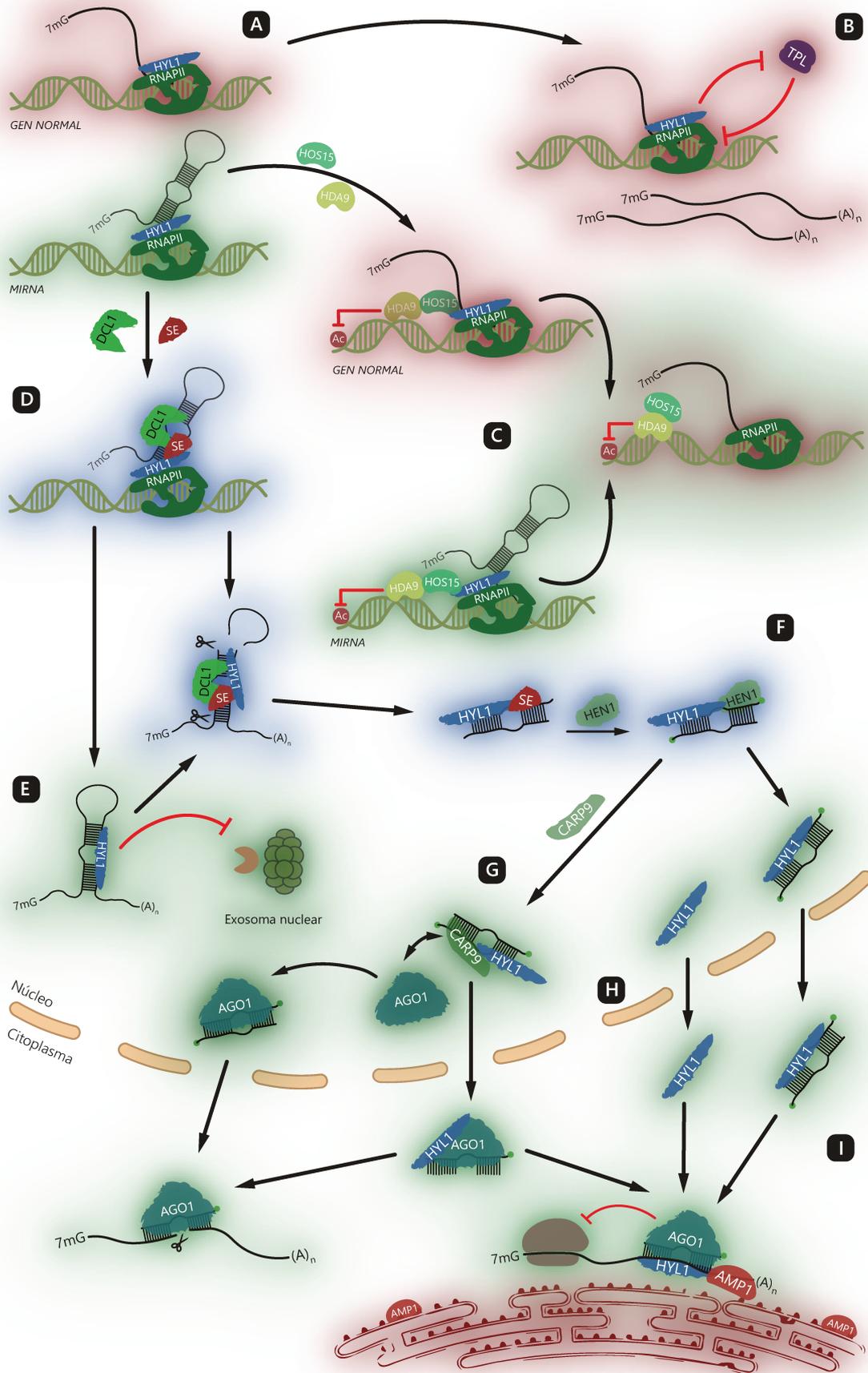


Figura 18. Funcionalidades de HYL1 en el interior celular. (A) HYL1 es capaz de asociarse a RNAPII para modular la transcripción tanto de los genes *MIRNA* como de genes codificantes. (B) Mediante esta interacción, HYL1 inhibe la acción represora de TPL, favoreciendo la transcripción de genes codificantes. (C) En respuesta al tratamiento con ABA, la interacción

HYL-RNAPII actúa como andamio para el reclutamiento del complejo HOS15-HDA9 a los locus de genes *MIRNA* asociados, desencadenando la deacetilación de histonas e inhibiendo la transcripción del mismo. **(D)** La unión de HYL1 al pri-miARN naciente promueve el ensamblado del complejo de procesamiento y facilita el procesamiento co-transcripcional de los miARNs a través de la interacción con DCL1 y SE, aumentando la eficiencia del mismo. **(E)** Alternativamente, la unión de HYL1 a los pri-miARNs los protege de la degradación mediada por el exosoma nuclear de ARN. **(F)** Dentro de los *D-bodies*, los *duplex* miARN/miARN* permanecen Unidos a HYL1 y SE después del procesamiento, y abandonan los mismos unidos a HYL1 para luego interactuar con HEN1 y desencadenar la metilación de los extremos 3'. **(G)** Los miARNs maduros asociados a HYL1 interactúan con CARP9 para favorecer el proceso de carga en AGO1, que selecciona la hebra guía y abandona el núcleo cargada con el miARN para finalmente encontrar su ARNm *target* y desencadenar el silenciamiento génico. **(H)** HYL1 es capaz de transportarse al citoplasma. No obstante, no está claro si lo hace de manera libre, unida a un *duplex* de miARN maduro o unida a AGO1. **(I)** En cualquier caso, la versión citoplasmática de HYL1 puede interactuar con AGO1 y AMP1 para promover la inhibición traduccional de mediada por miARNs mediante la alteración de la distribución de AGO1 en polisomas. Las áreas sombreadas en azul corresponden a funciones de HYL1 estrictamente relacionadas al procesamiento de miARNs mediado por DCL1; las áreas sombreadas verdes representan funciones relacionadas a la vía de los miARNs pero no necesariamente a la biogénesis de miARNs; mientras que las áreas sombreadas en rojo corresponden funciones potenciales de HYL1 fuera de la biogénesis de miARNs. Ilustración adaptada de Gonzalo et al (Gonzalo et al., 2024)

7.2 Capítulo 2: Objetivos

Los hallazgos presentados durante el desarrollo del capítulo anterior no solo conducen a la exitosa caracterización del rol de HOS15 en la biogénesis de los miARNs sino que también revelan una estrecha relación con HYL1, que actúa como nexo entre la biogénesis de miARNs y la regulación epigenética de la transcripción de los mismos. Si bien la participación de HYL1 en este mecanismo es independiente de su rol en el procesamiento de miARNs, la misma no resulta sorprendente al considerar la diversidad funcional descrita previamente para dicha proteína. No obstante, la escasa información funcional sobre el dominio C-terminal de HYL1 resulta, cuando menos, intrigante. En función de ello, nos propusimos como objetivo poner a prueba la relevancia funcional del dominio C-terminal de HYL1, evaluando principalmente sus efectos sobre la capacidad de interactuar con diferentes proteínas.

7.3 Capítulo 2: Materiales y métodos

7.3.1 Análisis de ADN

7.3.1.1 Plásmidos

pENTR™/D-TOPO®: vector de entrada (life Technologies) que permite el clonado direccional de productos provenientes de reacciones de amplificación en cadena (PCR) con extremos romos. Para tal fin, es necesario agregar la secuencia de 4 nucleótidos CACC, en el extremo 5' del cebador sentido, complementario al extremo sobresaliente GTGG del vector, permitiendo una única orientación de clonado. El vector lineal contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. El sitio de clonado direccional TOPO® está flanqueado por las regiones de homología attL1 y attL2 para permitir la recombinación LR en vectores Gateway de destino. Este vector posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *E. coli*.

pGW-TurboID-inNter: Es un vector de destino Gateway que permite la expresión en plantas de la enzima TurboID fusionada al N-terminal de la proteína de interés. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Confiere resistencia a higromicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

pGW502-TurboID: Es un vector cerrado que permite la expresión de la enzima TurboID. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Confiere resistencia a higromicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

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

pFK209: Es un vector de destino Gateway de la serie pFK derivado del plásmido pGREEN-11S (Hellens et al., 2000) en el cual se reemplazó el gen de resistencia a kanamicina por el de espectinomomicina. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Parte de las secuencias necesarias para la replicación, como el gen de la replicasa RepA, se encuentran en el plásmido pSoup, que provee la funcionalidad necesaria para la replicación del vector pGREEN-11 en *A. tumefaciens*, para lo que se debe co-transformar con ambos vectores. Este vector posee el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV y confiere resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

pFK210: Es un vector pGREEN-IIS (Hellens et al., 2000) que se utilizó como vector de destino. Posee el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S CaMV (35S), el cual dirige la expresión constitutiva y ectópica del gen en estudio y un terminador *RBSC*. Confiere resistencia al herbicida BASTA a las plantas que fueron transformadas eficientemente.

pFK247: vector de destino Gateway de la serie pFK derivado del plásmido pGREEN-IIS (Hellens et al., 2000) en el cual se reemplazó el gen de resistencia a kanamicina por el de espectinomicina. Posee dos orígenes de replicación, uno para *E. coli*, y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, organismo con el cual se transformaron las plantas. Parte de las secuencias necesarias para la replicación, como el gen de la replicasa RepA, se encuentran en el plásmido pSoup, que provee la funcionalidad necesaria para la replicación del vector pGREEN-II en *A. tumefaciens*, por lo que se debe co-transformar con ambos vectores. Este vector posee el promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor 35S CaMV, seguido de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP, del inglés enhanced Green Fluorescent Protein), y confiere resistencia a glufosinato de amonio para la selección de plantas transformadas eficientemente.

pJV117: Es un vector de destino Gateway de la serie pJV derivado del plásmido pGREEN-11S (Hellens et al., 2000). Este vector posee un promotor 35S CaMV, seguido de la secuencia que codifica para la proteína mCherry

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

pDESTTM22: Es un vector de destino Gateway (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de activación de la proteína GAI4 (GAI4AD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores pUC, y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia ARS4/CEN6 de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen TRP1 como marcador de selección en medios carentes de triptofano para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAI4AD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH1). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

pDESTTM32: Es un vector de destino Gateway (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de unión a ADN de la proteína GAI4 (GAI4BD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores pUC, y el gen de resistencia a gentamicina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia ARS4/CEN6 de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen IEU2 como marcador de selección en medios carentes de leucina para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAI4BD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (ADH1). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

pEXP-AD502: Este vector tiene las mismas características que el pDEST22TM 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 pDEST32TM 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.

7.3.1.2 Construcciones genéticas

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

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.1.3**.

7.3.1.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.1.4**.

7.3.1.5 Purificación de fragmentos de ADN

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.1.5**.

7.3.1.6 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway

El protocolo fue descrito previamente en **6.3.1.6**.

7.3.1.7 Recombinación Gateway en vectores de destino

El protocolo fue descrito previamente en **6.3.1.7**.

7.3.1.8 Transformación de bacterias de E. coli con ADN plasmídico

El protocolo fue descrito previamente en **6.3.1.8**.

7.3.1.9 Transformación de bacterias de A. tumefaciens con ADN plasmídico

El protocolo fue descrito previamente en **6.3.1.9**.

7.3.1.10 Minipreparación de ADN plasmídico

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.1.10**.

7.3.1.11 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Detallado en **6.3.1.11**.

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

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.1.12**.

7.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron compradas a lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las líneas mutantes insercionales *hyl1-2* (SALK_064863) fueron adquiridas del *Arabidopsis Biological Resource Centre* (ABRC), Ohio State University, OH, USA.

Las condiciones de crecimiento son idénticas a las detalladas en **6.3.2**.

7.3.2.1 Tratamientos farmacológicos

Para los experimentos correspondientes al protocolo de *TurboID proximity labeling* (Mair et al., 2019), plántulas de *Arabidopsis thaliana* 10 días fueron desplantadas y sumergidas en placa de ½ MS líquido en presencia y ausencia de Biotina (Sigma-Aldrich) 50 µM e incubadas durante 3 hs en agitación y condiciones normales de crecimiento. Las muestras fueron tomadas luego de una incubación de 3 hs de tratamiento.

Alternativamente se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con las construcciones correspondiente utilizando el protocolo descrito en **6.3.2.3**. Al cabo de 72 hs, las plantas fueron infiltradas nuevamente con la solución de biotina 50 µM y luego sometidas a condiciones normales de cultivo durante 3 hs previas a la toma de muestra.

En todos los casos, luego del tratamiento las plantas fueron enjuagadas 3 veces con agua fría para detener la biotinilación y eliminar la biotina libre presente en la superficie de las mismas.

7.3.2.2 Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.2.2**.

7.3.2.3 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.2.3**.

7.3.3 Análisis de Proteínas

7.3.3.1 Extracción de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.4.1**.

7.3.3.2 Separación de proteínas y análisis por western blot

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.4.2**.

7.3.3.3 Fraccionamiento núcleo/citoplasma

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.4.3**.

7.3.3.4 Ensayos de purificación de proteínas biotiniladas.

Se emplearon 2 g de material vegetal por cada replica biológica a analizar. En primer lugar, se llevó a cabo una extracción de proteínas totales siguiendo los pasos detallados en 6.3.4.1. El extracto proteico obtenido fue filtrado a través de una columna de desalinización (PD10, Cytiva 17-0851-01) previamente equilibrada siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante, para eliminar la biotina libre. El extracto libre de biotina obtenido fue incubado durante 3-4 hs a 4 °C con 80 µL de *beads* magnéticas unidas covalentemente a estreptavidina (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, Invitrogen), previamente lavadas con el buffer de extracción de proteínas. Culminada la incubación con las *beads* magnéticas, se realizaron lavados sucesivos con 1.7 mL de *wash buffer I*, 1.7 mL de *wash buffer II*, 1.7 mL de *wash buffer III*, 1.7 mL de 50 mM Tris-HCl (pH = 7.5) y 3 lavados con 1.7 mL de PBS 1X. Las muestras fueron posteriormente enviadas para su análisis mediante espectrometría de masas por una plataforma de servicios a terceros.

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

Wash buffer I: 0.5 % SDS

Wash buffer II: 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0.5% Na-deoxycholate

Wash buffer III: 10 mM Tris pH = 7.5, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 % Na-deoxycholate

7.3.4 Ensayos en levaduras

7.3.4.1 Co-transformación de levaduras

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.5.1**.

7.3.4.2 Ensayos de doble híbrido en levaduras (Y2H)

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.5.2**.

7.3.5 Análisis de fluorescencia

7.3.5.1 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Se llevó adelante según lo descrito en **6.3.6.1**.

7.3.5.1 Ensayos de complementación de la fluorescencia (BiFC)

Para los ensayos de *BiFC*, se cotransformaron hojas de *N. benthamina* con la fusión de CARP9 o CPL1 al fragmento N-terminal de la proteína fluorescente mCitrine, y las fusiones de las diferentes versiones de HYL1 al fragmento C-terminal de la proteína mCitrina. Luego de cumplidas las 72 hs post infiltración, se procedió de la misma manera que para las localizaciones y co-localizaciones previamente descriptas, utilizando esta vez el láser de 514 nm para excitar las muestras, y recolectando la emisión en un rango de 525-560 nm para la mCitrina. Se realizaron las capturas correspondientes para cada BiFC, y las imágenes se procesaron nuevamente en el software Fiji (Schindelin et al., 2012).

7.3.6 Cepas bacterianas y de levaduras empleadas

Escherichia coli, DH5 α [F⁺ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1] (Hanahan, 1983).

Agrobacterium tumefaciens, GV3101 [C58 (rif r) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent r) Nopaline]. Esta cepa contiene el plásmido Ti tipo nopalina pMP90 (pTiC58DT-DNA) sin la función propia de transporte, pero el ADN-T del vector binario puede transferirse correctamente. El plásmido pTiC58DT-DNA contiene los genes VIR y resistencia a gentamicina. La cepa presenta resistencia cromosomal a rifampicina (Koncz & Schell, 1986).

Saccharomyces cerevisiae, MaV203 [MAT α ; leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ 200; ade2-101; cyh2^R; can1^R; gal4 Δ ; gal80 Δ ; GAL1::lacZ; HIS3_{UASGAL1}::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3] (Leanna & Hannink, 1996)

7.4 Capítulo 2: Resultados

7.4.1 La eliminación del dominio C-terminal de HYL1 genera cambios en el patrón de localización subcelular de la proteína

Tal como lo hemos mencionado anteriormente, desde hace tiempo se ha especulado, en base a evidencia publicada, que el dominio C-terminal de HYL1 es dispensable para la biogénesis de miARNs y que la transformación de plantas mutantes *hyl1* con versiones de la proteína que solo contengan los dsRBD es suficiente para revertir mayoritariamente el fenotipo mutante (Wu et al., 2007). De hecho, estos resultados fueron validados en nuestro laboratorio en el marco de un trabajo de tesis anterior (Achkar, 2021). Sumado a ello, en ese mismo trabajo de tesis se demostró que la transformación de plantas mutantes con versiones de HYL1 con diferente número de repeticiones en el C-terminal (Primeras 6 construcciones, Figura 19A) no genera alteraciones en el fenotipo, sino por el contrario, son capaces de complementar con éxito el típico fenotipo mutante de *hyl1-2* (Achkar, 2021). Esta observación resultó válida tanto para la expresión de cada una de las versiones usando un promotor nativo de HYL1 como para la sobreexpresión usando el promotor viral CaMV35S. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, la altísima conservación de secuencia de este dominio en distintas especies vegetales hacen dudar de la premisa que esta región es completamente prescindible para la función de la proteína. De hecho, fuera del efecto sobre la biogénesis de miARNs, y sobre el fenotipo de la planta, poco se conoce a nivel molecular o celular acerca del efecto que este dominio tiene sobre la célula o la proteína en sí misma.

El análisis estructural de este dominio C-terminal sugiere que se trata de una región intrínsecamente desordenada (IDR), aunque hasta el momento no ha sido probado por técnicas biofísicas. Un trabajo reciente no sólo muestra que existe cierto grado de desorden en esta región de la proteína, sino también que dicho dominio es esencial para la formación de dímeros en solución acuosa (Wieczorek et al., 2023). Típicamente, las IDR se asocian a la formación de separaciones de fase líquido-líquido, interacciones proteicas y cambios en la localización subcelular (Bondos et al., 2021; Borchers et al., 2021; Bremer et al., 2021; Dignon et al., 2020), lo que podría explicar su relevancia en la formación de los *dicing bodies* (D. Xie et al., 2021). Teniendo en cuenta esto, decidimos evaluar mediante microscopía confocal de fluorescencia si el dominio C-terminal de HYL1 es capaz de modular la localización subcelular de la proteína. Para ello, fusionamos cada una de las versiones de la proteína mencionadas anteriormente a la proteína verde fluorescente (eGFP) bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S y transformamos de manera transitoria plantas de *Nicotiana benthamiana* con cada una de estas proteínas de fusión (Fig. 19 A). Luego de 3 días de incubación, observamos y analizamos la fluorescencia en las hojas de las plantas infiltradas.

Los resultados obtenidos revelaron que la longitud, y fosforilación, del dominio C-terminal, características variables entre especies naturales, parecen afectar el patrón de localización de HYL1. Se observó que la versión WT de HYL1 exhibe un patrón de localización dual entre núcleo y citoplasma, mientras que la variante carente de repeticiones se localiza exclusivamente en el núcleo con una marcada acumulación en el nucleolo, que se diluye paulatinamente con el agregado de repeticiones a la proteína (Fig. 19 B). Además, la localización citoplasmática de HYL1 se correlaciona con el número de repeticiones en su dominio C-terminal, ya que a medida que aumenta el número de repeticiones, también incrementa su presencia en el citoplasma. Finalmente, la formación de *dicing bodies* también parece responder a los cambios en la composición del dominio siguiendo una correlación indirecta, dado que al aumentar el número de repeticiones se observa una disminución en la cantidad y tamaño de los *dicing bodies* formados (Fig. 19 B). Se ha demostrado anteriormente que la fosforilación de las serinas S42 y S159, ubicadas en el dsRBD1 y dsRBD2, respectivamente, inhibe la formación de *dicing bodies* conteniendo HYL1 y también que las repeticiones en el C-Terminal pueden estar fosforiladas (Manavella et al., 2012). Dada esta particularidad, creamos versiones fosfo-miméticas de HYL1 (Fig. 19A) y analizamos su localización. Las imágenes no revelaron diferencias entre los patrones de localización y formación de *dicing bodies* entre ellas, ni tampoco en comparación con la versión salvaje de la proteína (Fig. 19 B). En este contexto, resulta particularmente interesante que no se hayan observado diferencias entre las versiones fosforilada y no fosforilada de la proteína, lo que sugiere que un mecanismo regulatorio similar al descrito para las S42 y S159 no parecen ser aplicable al dominio C-terminal. Sin embargo, un estudio reciente de nuestro laboratorio sugiere la existencia de dos tipos diferentes de *dicing bodies* conteniendo HYL1 (Tomassi et al., 2020), los cuales tendrían funciones diferenciadas según su composición. En primer lugar, tenemos a aquellos que contienen tanto a HYL1 como a CPL1 en su interior y están típicamente asociados al procesamiento de miARNs, mientras que por otro lado también existe un subconjunto de *dicing bodies* que contienen a HYL1 y a CARP9, y participan en la transferencia del miARN maduro a AGO1, favoreciendo la selección precisa de la hebra guía como paso previo a la formación del complejo RISC. En ese sentido, la idea de que el estado de fosforilación del dominio C-terminal de HYL1 influya en el tipo de *D-bodies* es sumamente atractiva. Una manera de abordar esta hipótesis podría ser la de evaluar la interacción diferencial de cada una de las distintas variantes de HYL1 con otros cofactores de la biogénesis de miARNs que están típicamente asociadas a uno u otro tipo de *D-bodies*. Siguiendo esta línea, la típica interacción de HYL1 y SE podría analizarse como modelo de cuerpos de procesamiento y la interacción de HYL1 con CARP9 como cuerpos asociados a la transferencia del miARN. De este modo, evaluando las diferencias entre las interacciones de cada una de nuestras versiones de HYL1 con SE o CARP9, sería posible inferir la preferencia de una u otra versión hacia la formación de cierto tipo de *D-bodies*.

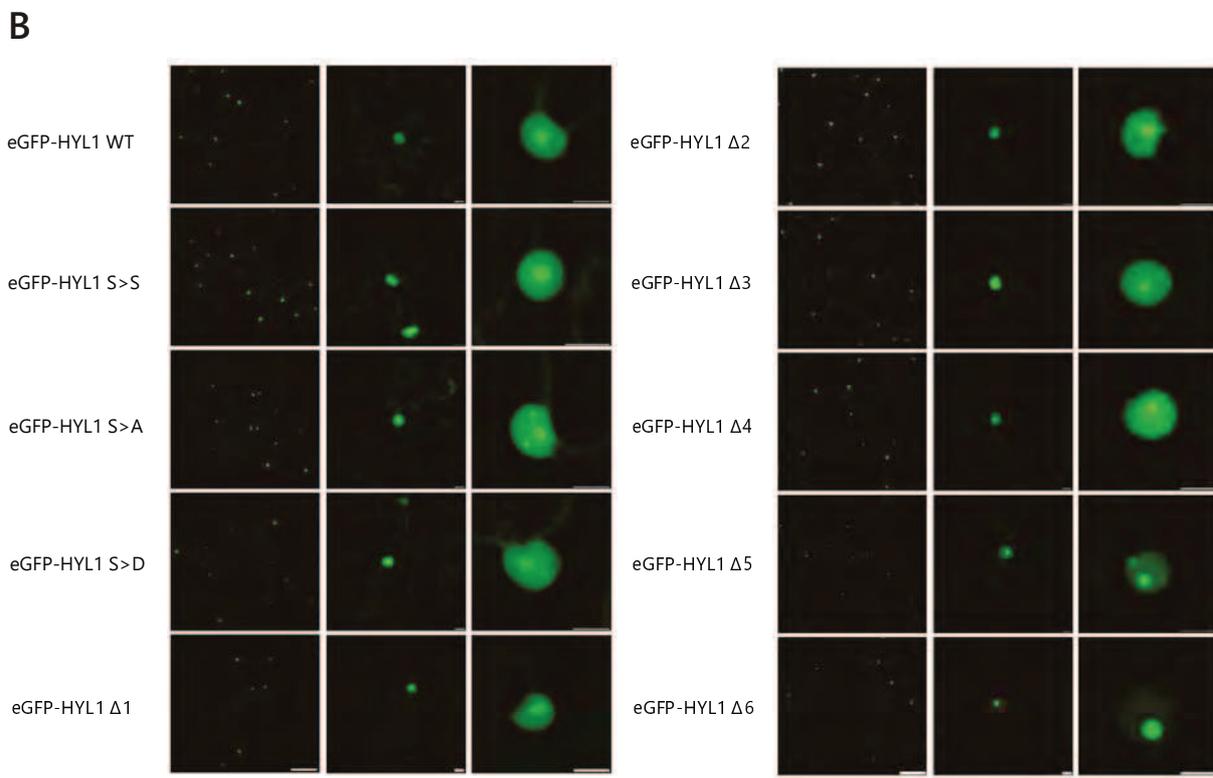
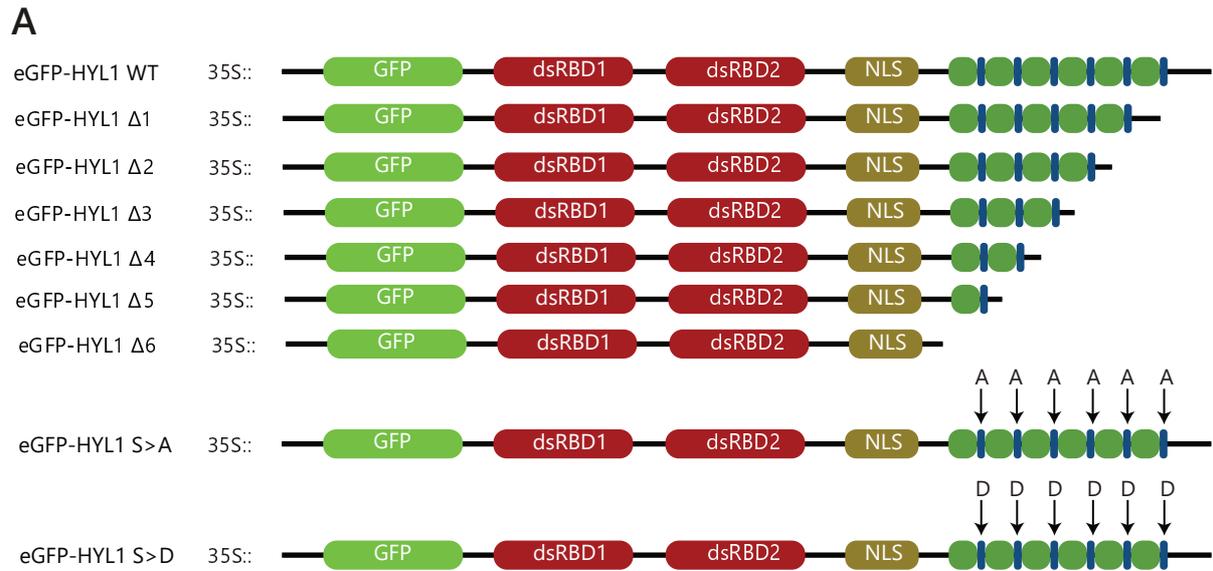


Figura 19. Alteraciones en el número de repeticiones del C-terminal de HYL1 modulan la localización celular de la proteína. (A) Representación gráfica mostrando las diferentes construcciones generadas mediante ingeniería genética y conteniendo diferentes números de repeticiones en el C-terminal de HYL1. Además, se incluyen las versiones que emulan las variantes fosforilada y no fosforilada de dicho dominio. **(B)** Imágenes de microscopía confocal mostrando la localización subcelular variable entre las diferentes versiones de HYL1 etiquetadas con eGFP, que fueron transformadas de manera transiente en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes expuestas en **(B)** fueron extraídas del trabajo de Tesis doctoral de Achkar (Achkar, 2021).

7.4.2 La interacción entre HYL1 y SE no se ve alterada por la ausencia de repeticiones en el C-terminal ni por el estado de fosforilación de las mismas

En virtud de lo expuesto hasta aquí, nuestro siguiente paso en la caracterización de este dominio C-terminal fue la evaluación de la interacción de cada una de nuestras versiones de HYL1 con su principal socio funcional, SE. En primer lugar, decidimos explorar el patrón de colocalización entre cada una de las variantes de HYL1 y SE, teniendo en cuenta nuestros hallazgos anteriores acerca de la influencia del dominio C-terminal en la localización subcelular de HYL1. Para ello, utilizamos las fusiones a GFP previamente descritas (Fig. 19A) en combinación con versiones de SE fusionadas a mCherry. Los resultados obtenidos muestran que la ausencia total o parcial del dominio C-terminal no tiene efecto sobre la capacidad de colocalización entre ambas proteínas a pesar de exhibir un patrón diferencial entre las diferentes versiones (Fig. 20 A). En ese sentido, los patrones de colocalización entre las variantes de HYL1 y SE emulan lo observado para cada una de las variantes de HYL1 analizadas individualmente, donde las versiones con bajo número de repeticiones tienden a perder la distribución uniforme en el núcleo y citoplasmática para mostrar una fuerte acumulación nucleolar. Estos resultados sugieren que el dominio C-terminal de HYL1 es responsable de la localización subcelular de la proteína misma, sino que también es capaz de modular la de otras proteínas funcionalmente asociadas. Sin embargo, aún desconocemos la relevancia funcional o regulatoria de esta localización diferencial, así como también si dicho cambio en la localización de SE es estrictamente pergeñado por HYL1 mediante la interacción directa.

Para poner a prueba esto último, evaluamos la capacidad de interacción de cada variante de HYL1 con SE mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando las diferentes versiones de HYL1 como cebo y SE como diana. Los resultados obtenidos mostraron que, excepto en el caso de la variante que imita el estado no fosforilado, todas las versiones de HYL1 interactúan con SE de manera similar a la versión salvaje (Fig. 20 B). La ausencia de interacción en la variante no fosforilada es particularmente interesante, ya que sugiere un posible mecanismo de regulación funcional mediado por el estado de fosforilación del dominio C-terminal (Fig. 20 B). No obstante, debemos ser cautelosos ya que ninguna de las versiones de HYL1 debería estar fosforilada en levaduras. En ese contexto, no deberían existir diferencias entre los estados de fosforilación del mímico no fosforilado y la versión salvaje de HYL1. Por lo tanto, atribuir la pérdida de interacción a la falta de fosforilación en el C-terminal podría ser incorrecto y conducir a conclusiones erróneas. Una posible explicación para este resultado es que la sustitución de las serinas por alaninas en el C-terminal de HYL1 cause un plegamiento anómalo o un cambio estructural significativo en la proteína, lo que afectaría al dominio dsRBD2 y, en consecuencia, impactaría en la interacción de HYL1 con SE (S. W. Yang et al., 2010b; X. Yang et al., 2014). Sin embargo, esta teoría no sería coherente con la reversión del fenotipo observada para las plantas mutantes *hyl1-2* transformadas con la versión mímica no fosforilada de

HYL1 (Achkar, 2021). En consecuencia, los resultados obtenidos a partir de este ensayo terminan siendo inconclusos y posiblemente requieran una segunda validación aplicando diferentes técnicas e incluso utilizando métodos *in-planta*.

La normal interacción de SE con todas las versiones de HYL1 no resulta sorprendente, ya que esta interacción depende del dominio dsRBD2, presente en todas las variantes analizadas. Además, dada la jerarquía funcional del complejo HYL1-SE, la capacidad de todas las versiones de HYL1 para complementar el fenotipo ya sugería que dicha interacción permanecía intacta. En ese sentido, una alteración en la capacidad de interacción entre ambas proteínas muy probablemente tenga como consecuencia directa un fenotipo visual aberrante muy marcado, cosa que no observamos.

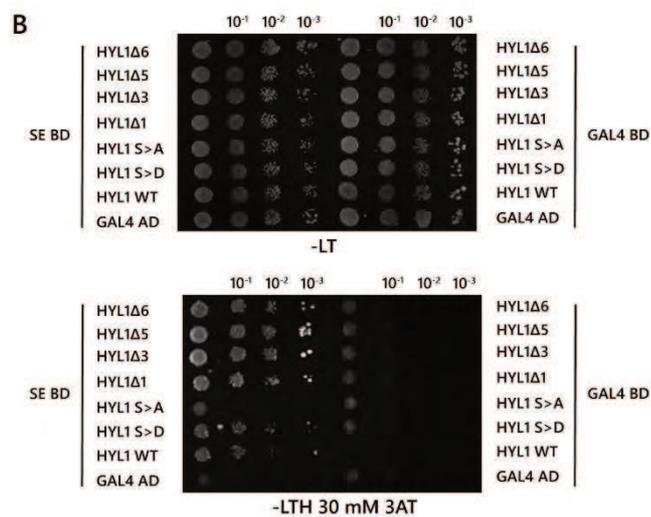
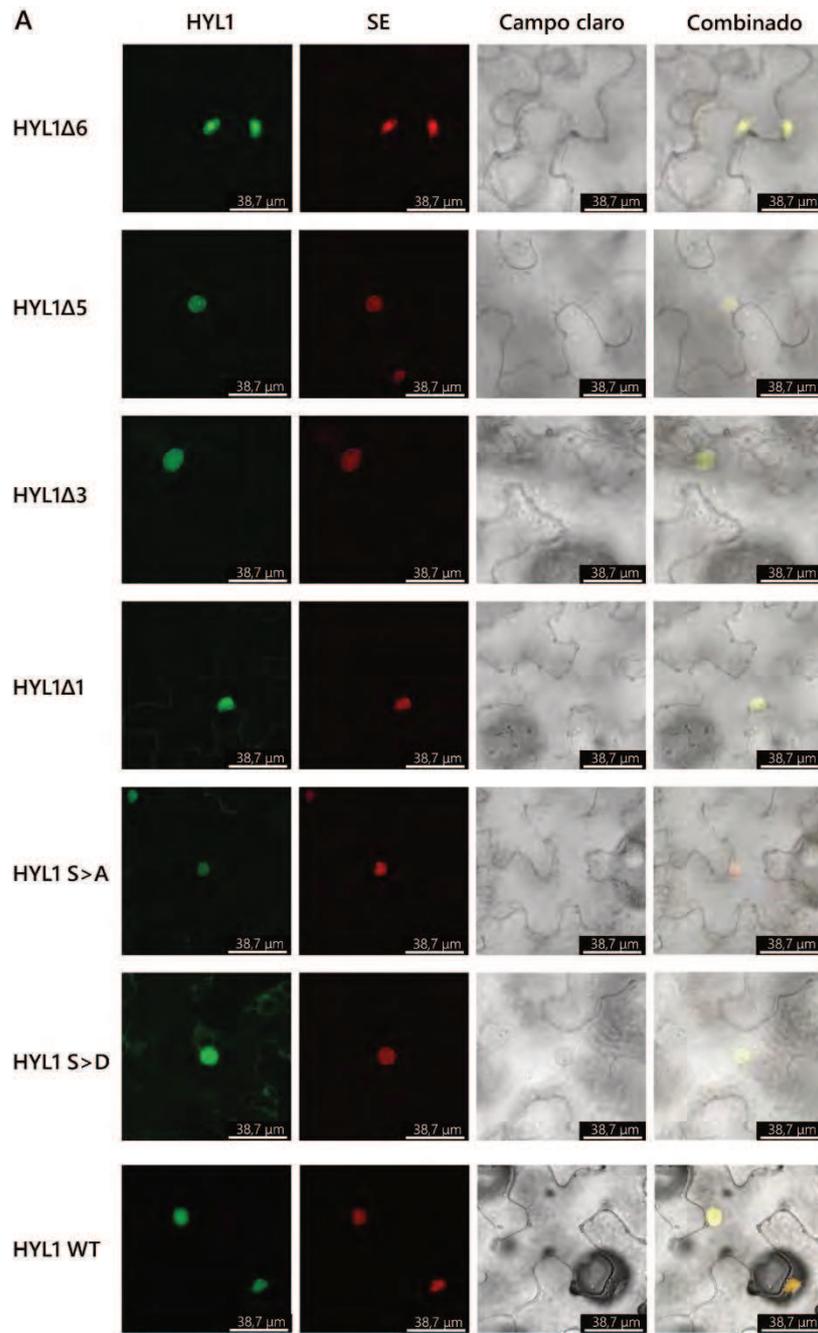


Figura 20. Alteraciones en el número de repeticiones del C-terminal de HYL1 modulan la localización celular del complejo HYL-SE sin afectar la interacción. (A) Imágenes de microscopía confocal mostrando la co-localización nuclear de SE etiquetada con mCherry y las diferentes variantes de HYL1 etiquetadas con eGFP que fueron transformadas de manera transiente en hojas de *N. benthamiana*. Barras = 38.7 μm . (B) Interacción entre las diferentes versiones de HYL1 y SE en ensayos de doble híbrido en levaduras. El ensayo fue realizado utilizando HYL1 como presa y SE como carnada. Una construcción EV (Vector vacío) fue empleada como control negativo. La combinación de SE como carnada y HYL1 WT como presa fue empleada como control positivo. Las levaduras fueron crecidas en medios basales selectivos en ausencia de los aminoácidos específicos -LT, -LTH, -LTH + 30 mM 3 AT durante 5 días antes de capturar las imágenes.

7.4.3 Alteraciones en el dominio C-terminal de HYL1 afectan la interacción proteica con CARP9

Los resultados presentados en la sección anterior muestran que las alteraciones en el C-terminal de HYL1 no tienen impacto alguno sobre la capacidad de interactuar con SE, su principal socia. Además, cada una de las variantes de HYL1 estudiadas es capaz de complementar el fenotipo mutante de las plantas *hyl1-2* transformadas (Achkar, 2021). Estas observaciones sugieren la idea de que el procesamiento de miARNs podría llevarse a cabo sin alteraciones, independientemente de la configuración del dominio C-terminal de HYL1. Estudios anteriores llevados adelante en nuestro laboratorio proponen que una vez finalizado el procesamiento de los miARNs, CARP9, una proteína intrínsecamente desordenada (IDP, del inglés *Intrinsically Disordered Protein*), interactúa con HYL1, para facilitar la transferencia del miARN maduro a AGO1, promoviendo la correcta selección de la hebra guía y el ensamblaje posterior del complejo RISC (Tomassi et al., 2020). Además, CARP9 actuaría como andamio, favoreciendo la interacción entre HYL1 y AGO1 (Tomassi et al., 2020). A raíz de ello, nos propusimos evaluar cómo afectan las modificaciones del C-terminal de HYL1 al proceso de carga del miARN en AGO1 asistido por CARP9. Para ello, nuestro primer paso fue evaluar la colocalización de cada una de las variantes de HYL1 con CARP9 mediante microscopía confocal de fluorescencia. Replicamos el diseño experimental utilizado previamente con las diferentes variantes de HYL1 fusionadas a GFP y CARP9 fusionada a mCherry. Se transformaron de manera transitoria hojas de *Nicotiana benthamiana* con las respectivas combinaciones y se evaluaron los resultados.

A partir de ello fue posible observar que las modificaciones en el dominio C-terminal no afectan la capacidad de colocalización entre HYL1 y CARP9, en concordancia con lo reportado anteriormente para el caso de SE (Fig. 21 A). Además, HYL1 se mantiene como el factor determinante del sitio de colocalización, ya que las combinaciones que incluyen versiones de HYL1 con un bajo número de repeticiones presentaron una fuerte acumulación nucleolar (Fig. 21 A). Por el contrario, al aumentar el número de repeticiones, ambas proteínas se distribuyen uniformemente en el interior del núcleo (Fig. 21 A).

Curiosamente, al analizar la interacción proteica entre cada uno de los pares de proteínas analizadas mediante técnicas de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC), encontramos que solo la versión salvaje de HYL1 es capaz de interactuar con CARP9 (Fig. 21 B). Este resultado plantea nuevas interrogantes acerca de cómo las otras versiones de HYL1 pueden modular el perfil de localización de CARP9, siendo que no parecen interactuar directamente. La hipótesis más probable es que ambas proteínas formen parte de un complejo proteico mayor, lo que implicaría que no es necesaria una interacción directa para que ambas proteínas puedan colocalizar. En este contexto, los resultados sugieren que la localización subcelular de todo el complejo estaría siendo regulada por HYL1.

Por otro lado, los hallazgos presentados hasta el momento no proporcionan información clara sobre la relevancia funcional de esta pérdida de interacción, ni tampoco si el proceso de carga del miARN en AGO1 se ve afectado. Sin embargo, la reversión del fenotipo mutante observada en las plantas *hyl1-2* transformadas con cada una de las versiones de HYL1 (Achkar, 2021) sugiere que al menos los aspectos más críticos de la biogénesis de miARNs, como el proceso de carga en AGO1, no estarían comprometidos. Para explicar esto es posible plantear dos alternativas: La primera, y más sencilla, plantea que la interacción entre HYL1 y CARP9 no sería indispensable para que el proceso de carga del miARN en AGO1 se lleve a cabo de manera exitosa, lo cual es razonable si consideramos que AGO1 puede interactuar directamente con ambas proteínas (Tomassi et al., 2020). La segunda posibilidad es que la pérdida de interacción entre HYL1 y CARP9 sea compensada por otra de las proteínas presentes en el complejo durante el proceso de carga del miARN en AGO1. Sin embargo, para validar esta segunda hipótesis, es necesario profundizar en la comprensión de la composición específica de este complejo. Además, ensayos de análisis carga de miARNs en AGO1 a realizar en un futuro mediante RIP-qPCR o RIP-seq podrían aportar valiosa información para responder a estas preguntas.

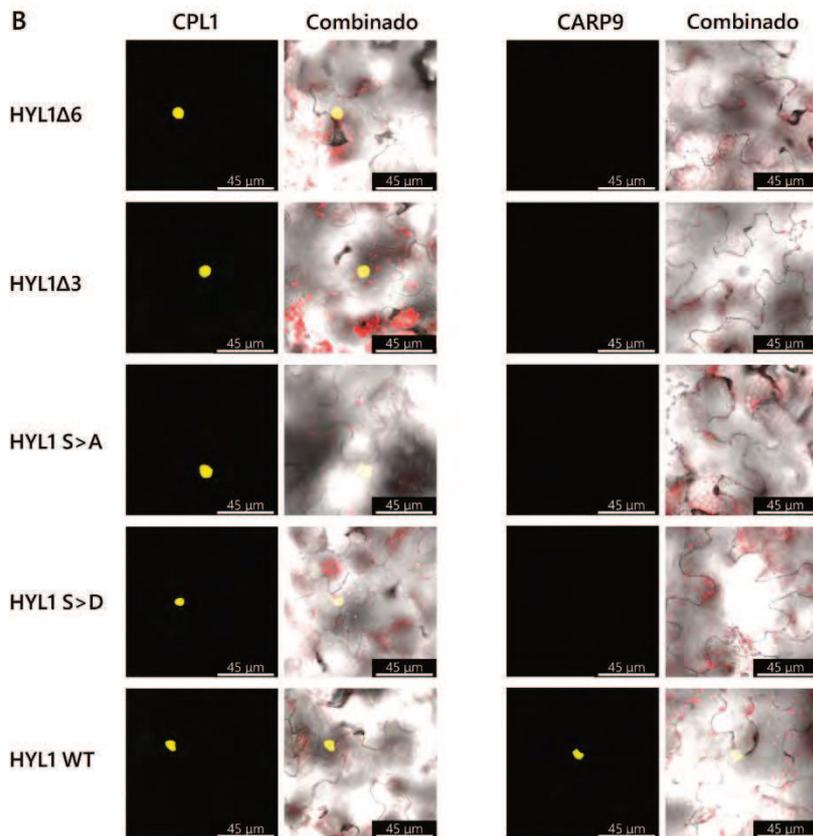
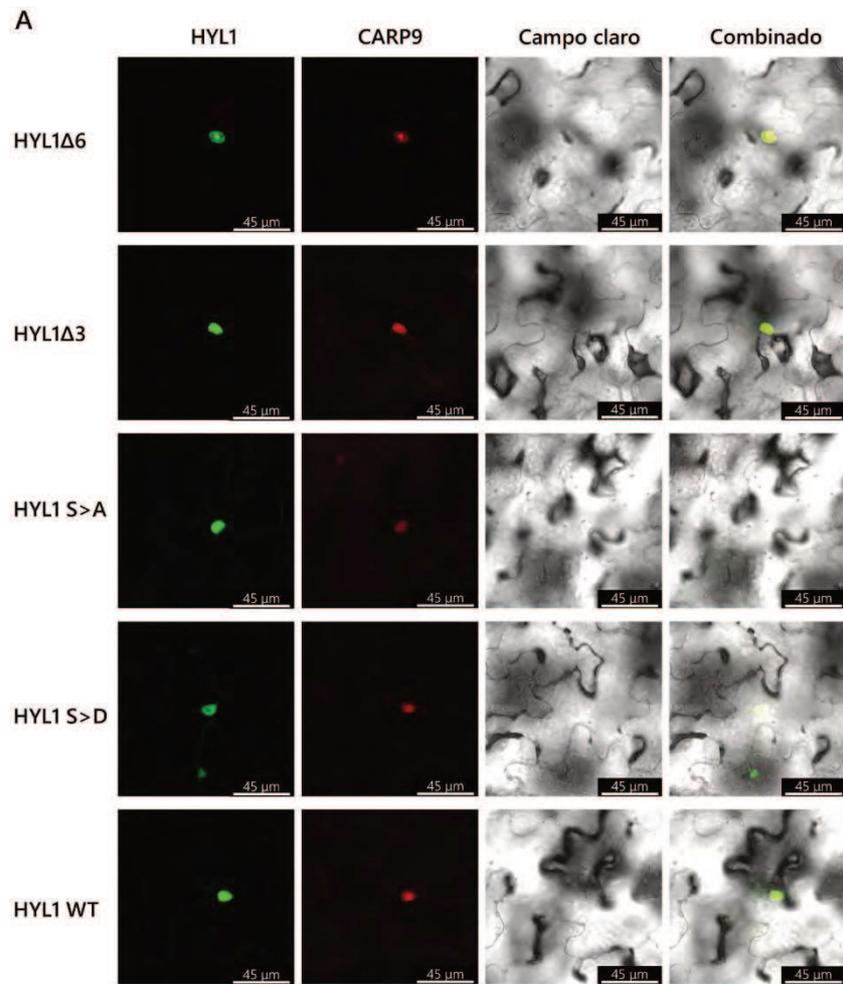


Figura 21. Alteraciones en el número de repeticiones del C-terminal de HYL1 modulan tanto la localización celular del complejo HYL1-CARP9 así como también la interacción directa entre ambas proteínas. (A) Imágenes de microscopía confocal mostrando la co-localización nuclear de CARP9 etiquetada con mCherry y las diferentes variantes de HYL1 etiquetadas con eGFP que fueron transformadas de manera transiente en hojas de *N. benthamiana*. Barras = 45 μ m. (B) Interacción entre las diferentes versiones de HYL1 y CARP9 en ensayos de complementación de la fluorescencia bimolecular (BiFC). El ensayo fue realizado utilizando las diferentes versiones de HYL1 fusionadas a C-mCitrine y CARP9 fusionada a N-mCitrine transformadas de manera transiente en hojas de *N. benthamiana*. Barras = 45 μ m

7.4.4 La asociación entre AGO1 y HYL1 no depende del dominio C-terminal de HYL1

Una de las observaciones más interesantes que hemos realizado es la aparente pérdida de localización citoplasmática de las versiones más cortas de HYL1. Hace pocos años, se propuso una función estrictamente asociada a la localización citoplasmática de HYL1, modulando la distribución de AGO1 en polisomas para favorecer la inhibición traduccional de un subconjunto de ARNm target de la maquinaria (X. Yang et al., 2021). En este estudio, los autores muestran que cuando se restringe la localización de HYL1 exclusivamente al compartimento nuclear, se produce una disminución en las proporciones de AGO1 asociada a polisomas, alterando el mecanismo de silenciamiento génico por inhibición traduccional. En concordancia con esto, los autores demostraron que la versión WT de HYL1 es capaz de unir ARNm diana de miARNs en el citoplasma.

Así, en función de estas observaciones y los cambios en los patrones de localización descritos en este trabajo para las diferentes variantes de HYL1, nos propusimos evaluar si el dominio C-terminal de esta proteína podría estar involucrado en el mecanismo de inhibición traduccional modulando la asociación entre HYL1 y AGO1 en el citoplasma. Para ello, evaluamos la capacidad de interacción de cada una de estas variantes de HYL1 con AGO1 mediante ensayos de doble híbrido en levaduras utilizando las diferentes versiones de HYL1 como cebo y AGO1 como presa. Nuevamente, los resultados obtenidos muestran que las variaciones en el dominio C-terminal de HYL1 no afectan la capacidad de interacción de AGO1 (Fig. 22 A). Por otro lado, si bien es cierto que todas las versiones de HYL1 parecen interactuar en igual medida con AGO1, es posible ver que la interacción HYL1-AGO1 no es tan intensa como la existente entre HYL1-SE, usada como control positivo en este ensayo, e incluso la versión sin repeticiones parece interactuar particularmente mal con AGO1.

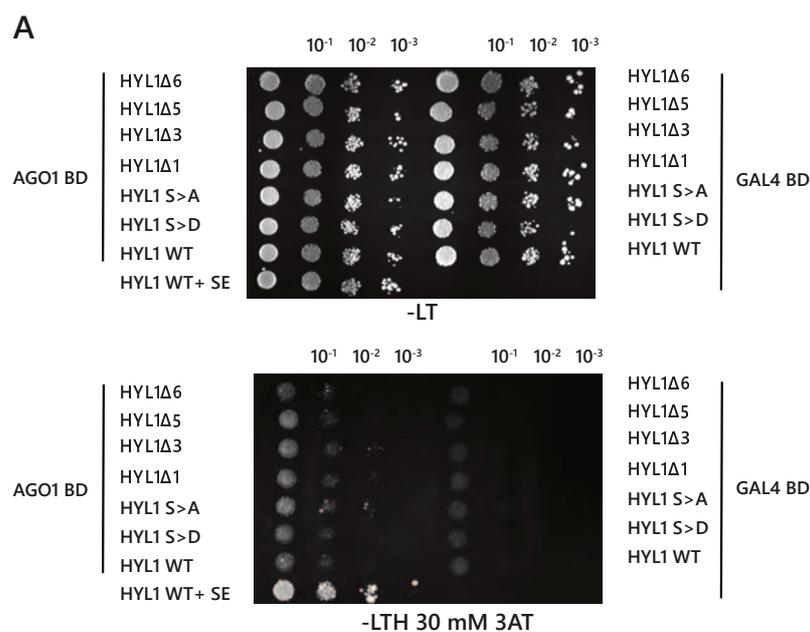


Figura 22. Alteraciones en el número de repeticiones del C-terminal de HYL1 no afectan la capacidad de interacción con AGO1. (A) Interacción entre las diferentes versiones de HYL1 y AGO1 en ensayos de doble híbrido en levaduras. El ensayo fue realizado utilizando HYL1 como presa y AGO1 como carnada. Una construcción EV (Vector vacío) fue empleada como control negativo. La combinación de SE como carnada y HYL1 WT como presa fue empleada como control positivo. Las levaduras fueron crecidas en medios basales selectivos en ausencia de los aminoácidos específicos -LT, -LTH, -LTH + 30 mM 3 AT durante 5 días antes de capturar las imágenes.

No obstante, la observación de que la interacción entre HYL1 y AGO1 no se ve alterada entre las diferentes variantes de HYL1 analizadas no necesariamente implica que la inhibición traduccional de ARNm transcurra normalmente en estas circunstancias. En primer lugar, porque para que dicho proceso ocurra es necesario que la interacción AGO1-HYL1 se de en el citoplasma, donde la versión carente de repeticiones aparece ausente o, al menos, menos enriquecida. En segundo lugar, es importante considerar que la maquinaria involucrada en la inhibición traduccional de ARNm no se limita sólo al complejo HYL1-AGO1, sino que abarca un conjunto más amplio de proteínas, muchas de las cuales no están estrictamente asociadas a la biogénesis de miARNs, como es el caso de AMP1, KTN1, VCS y SUO (Brodersen et al., 2008b; S. Li et al., 2013; L. Yang et al., 2012). En particular, AMP1 es una proteína asociada a las membranas del retículo endoplasmático capaz de interactuar y formar un complejo multiproteico con AGO1 y HYL1 (X. Yang et al., 2021). Una alternativa para evaluar si existe una diversidad funcional asociada a la interacción del dominio C-terminal de HYL1 con otras proteínas sería la de analizar de manera global los subconjuntos individuales de interactores correspondientes a cada una de las diferentes versiones de HYL1.

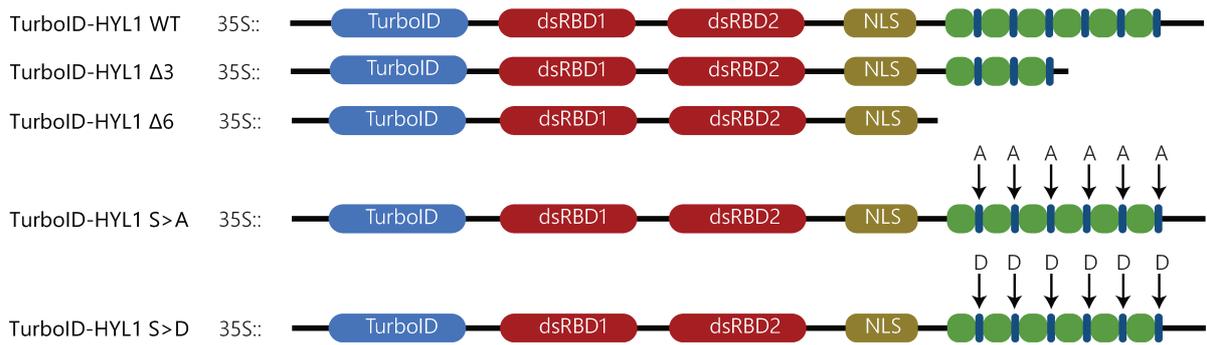
7.4.5 El dominio C-terminal de HYL1 promueve la interacción con otros factores proteicos para formar una red de interactores que favorecen la diversidad funcional de la proteína

Teniendo en cuenta esta idea de que la asociación entre proteínas para formar grandes complejos proteicos puede dar lugar a nuevas funcionalidades asociadas a cada una de estas proteínas, decidimos evaluar de manera global si el dominio C-terminal de HYL1 tiene alguna implicancia sobre su red de interactores. Para ello, llevamos a cabo experimentos de *TurboID proximity labeling* (X. Li et al., 2023; Mair et al., 2019) realizando una búsqueda masiva de interactores específicos para las variantes HYL1 Δ 6, HYL1 Δ 3, HYL1WT, HYL1S<A y HYL1S<D. Posteriormente, realizamos las asociaciones funcionales correspondientes para cada conjunto de interactores identificados, con el objetivo de inferir una funcionalidad diferencial asociada al dominio C-terminal de HYL1.

En primer lugar, diseñamos las construcciones genéticas que nos permitan expresar en plantas la fusión de cada una de las variantes de HYL1 mencionadas a la proteína TurboID bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Fig. 23 A). Una vez obtenidas, generamos plantas transgénicas capaces de expresar dicha fusión utilizando como *background* genético de transformación plantas mutantes *hyl1-2*, con la idea de evitar la producción endógena de la proteína HYL1. Todas las plantas transgénicas obtenidas muestran un fenotipo WT, poniendo en evidencia que las distintas proteínas de fusión son activas (Fig. 23 B). Por otro lado, la sobreexpresión de TurboID en plantas salvajes Col-0 no genera anomalías en el fenotipo de las plantas transgénicas analizadas. A partir de este resultado, decidimos emplear esta colección de plantas como control negativo en nuestro posterior análisis de interactores.

La elección de un *background* genético Col-0 para la sobreexpresión de la enzima TurboID sola, usada como control, se fundamentó en la premisa de que si transformamos mutantes *hyl1-2*, como en el caso de las otras construcciones, esta fallará en completar el fenotipo mutante de *hyl1-2*, al no aportar otra copia del gen, y la enorme diferencia en fenotipos y estados de desarrollo entre las plantas podría complicar el análisis de los resultados.

A



B



Figura 23. La fusión de la enzima TurboID a las diferentes versiones de HYL1 no altera el rol biológico de HYL1. (A) Representación gráfica mostrando las diferentes construcciones generadas mediante ingeniería genética y conteniendo la fusión entre la proteína TurboID y las diferentes versiones de HYL1 discutidas previamente. (B) Caracterización fenotípica de las líneas control (Col-0), mutantes en HYL1 (*hyl1-2*), sobreexpresantes de la enzima TurboID y mutantes *hyl1-2* transformadas con diferentes construcciones que permiten la sobreexpresión de las fusiones de TurboID a las diferentes variantes de HYL1. Las plantas fueron analizadas a los 18 días después de la germinación.

Aun cuando los resultados muestran que las construcciones de fusión son capaces de complementar el fenotipo mutante, indicando que son funcionales, no podemos afirmar que las proteínas de fusión se están expresando de manera íntegra ni tampoco que la actividad biotina-ligasa, correspondiente a la TurboID, está activa. Para validar estos aspectos, nos propusimos evaluar la correcta expresión de la proteína de fusión mediante técnicas de *western blot*, analizando los tamaños de banda observados y comparándolos con los esperados. Para ello, aprovecharemos la ventaja de que la construcción genética empleada contiene la secuencia para expresar una etiqueta de 3xHA incluida en la proteína de fusión. Por otro lado, para la evaluación de la actividad biotina-ligasa de la enzima, sometimos a las plantas a un tratamiento de biotina durante 3 hs usando condiciones normales de cámara y un medio líquido suplementado con 50 μ M de biotina, y evaluamos el patrón de biotilación de proteínas mediante técnicas de *western blot*, empleando *Streptavidin-HRP* para su detección. Las validaciones fueron realizadas tanto mediante expresión transitoria por agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana* como a través de la expresión estable en las plantas de *Arabidopsis thaliana* previamente detalladas. Para la expresión transitoria, se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las proteínas de interés 72 hs antes de la infiltración de esas mismas hojas con una solución 50 μ M de biotina. En cuanto a la expresión estable, las respectivas plantas transgénicas de *Arabidopsis* fueron crecidas durante 10 días en placas de ½ MS-Agar para luego ser incubadas en la solución 50 μ M de biotina durante 3 hs.

En ambos casos, los resultados obtenidos muestran la correcta expresión de las proteínas de fusión en el tamaño esperado (TurboID::HYL1WT: 120 kDa, TurboID::HYL1S>A: 120 kDa, TurboID::HYL1S>D: 120 kDa, TurboID: 35-40 kDa, TurboID::HYL1 Δ 6: 70 kDa, TurboID::HYL1 Δ 3: 70 kDa), tanto en condiciones de MOCK como de tratamiento (Fig. 24, A y B). No obstante, para el caso de las muestras de *Arabidopsis thaliana* se observó adicionalmente la aparición de un patrón de bandas constante en todas las muestras analizadas (100 kDa), posiblemente correspondiente a una inespecificidad del anticuerpo (Fig. 24 B). Por otro lado, todas las muestras tratadas con 50 μ M de biotina mostraron un claro incremento en la señal de los experimentos de *western blot* realizados utilizando *Streptavidin-HRP* para la detección de las mismas (Fig. 24, A y B), indicando la presencia de una mayor acumulación de proteínas biotiladas en comparación con el tratamiento MOCK. Estos resultados ponen en evidencia que la estructura de la enzima TurboID no se ve afectada tras su fusión a las diferentes variantes de HYL1 y que cada una de las proteínas de fusión generadas se expresan de manera íntegra y son capaces de cumplir exitosamente con la actividad enzimática de TurboID.

Por otro lado, comparando las intensidades de banda obtenidas para cada una de las fusiones expresadas en *Arabidopsis thaliana* es posible observar que las versiones fusionadas a HYL1 Δ 6 y HYL1S>D presentaron niveles de expresión considerablemente mayores que las demás (Fig. 24 B, α -HA), que posteriormente se vieron reflejados en mayores niveles globales de proteínas biotiladas (Fig. 24 B, *Streptavidin-HRP*).

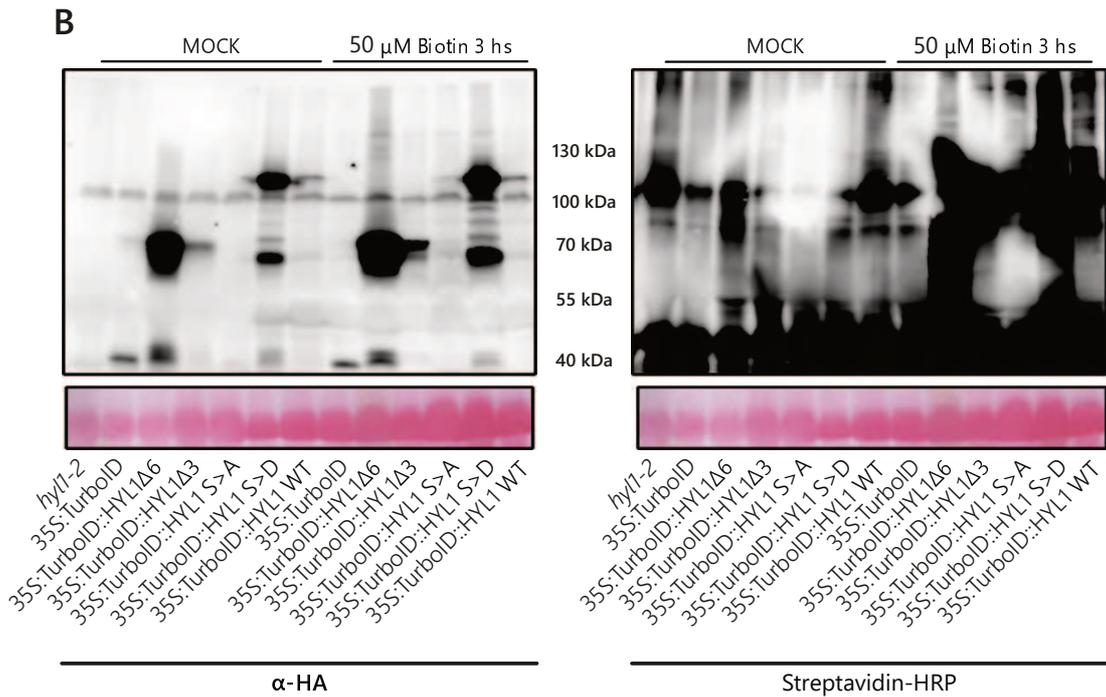
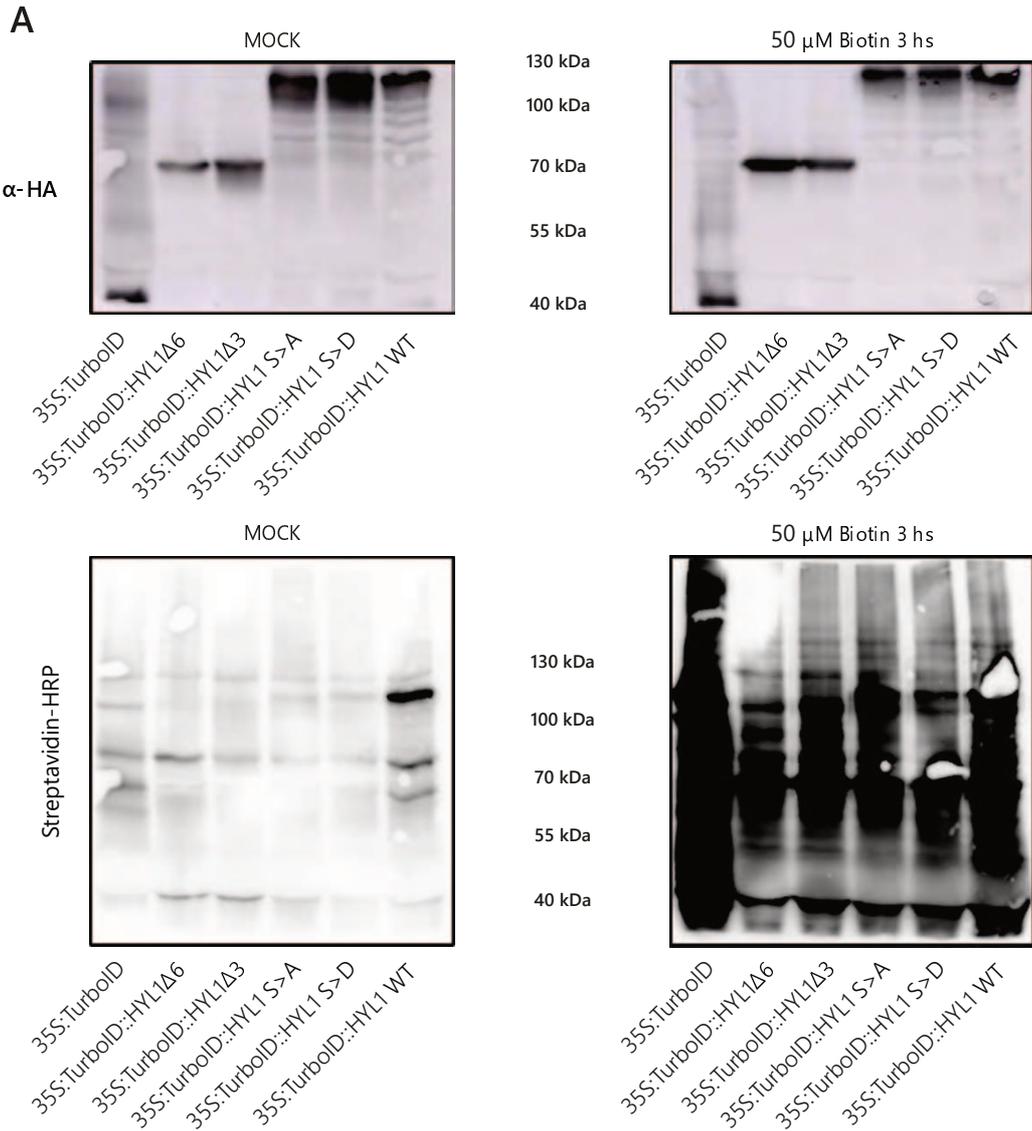


Figura 24. La fusión de HYL1 a TurboID no afecta su actividad enzimática. Ensayo de *Western blot* mostrando los niveles proteicos de las fusiones de TurboID a las diferentes versiones de HYL1 expresadas de manera transiente en (A) *Nicotiana benthamiana* y en (B) plantas mutantes *hyl1-2* transformadas de forma estable. Se muestran también los niveles de proteínas biotiniladas en plantas sometidas a un tratamiento de 50 μM de biotina durante 3 hs en comparación con el tratamiento MOCK. Los paneles rotulados como α -HA corresponden a la detección de las fusiones de TurboID-HYL1 mientras que los rotulados como Streptavidin-HRP corresponden a la detección de proteínas biotiniladas.

En los resultados expuestos anteriormente hemos validado dos aspectos críticos previos a la búsqueda de interactores mediante *TurboID-labeling* (X. Li et al., 2023; Mair et al., 2019; T. Wang et al., 2023). En primer lugar, demostramos que la fusión de cada una de las variantes de HYL1 al extremo C-terminal de la enzima TurboID mantiene su actividad biológica en el entorno celular, logrando así revertir el fenotipo mutante en las plantas de genotipo *hyl1-2* transformadas. Por otro lado, confirmamos que ninguna de las fusiones generadas afecta la actividad ligasa de biotina de TurboID, la cual es estrictamente necesaria para el etiquetado de todas las proteínas asociadas a HYL1, antes del proceso de purificación e identificación.

A partir de ello, decidimos llevar adelante el experimento de *TurboID-labeling* (X. Li et al., 2023; Mair et al., 2019; T. Wang et al., 2023) para cada una de las versiones de HYL1 generadas, con el objetivo de evaluar los diferentes subconjuntos de interactores específicamente asociados a cada una de las versiones mencionadas. Es decir, nos enfocaremos principalmente en el análisis e identificación de aquellos interactores que sólo sean capaces de interactuar específicamente con una de las variantes de HYL1 y no con el resto. A partir de ello, evaluaremos la naturaleza y función correspondiente a cada interactor diferencial para intentar establecer una relación entre dicha función o proceso y la versión de HYL1 asociada al mismo.

Para ello, crecimos una cantidad suficiente de plantas para obtener 2 g de tejido fresco por cada réplica de muestra y las sometimos a un tratamiento de 3 hs con 50 μM de biotina o con la solución control (MOCK), para finalmente realizar una extracción de proteínas totales sobre las mismas. Los extractos obtenidos fueron filtrados usando una columna de desalinización (PD10, Cytiva 17-0851-01), buscando eliminar la biotina libre, y finalmente se purificaron las proteínas biotiniladas usando *beads* magnéticas fusionadas a estreptavidina (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, Invitrogen). Finalmente, avanzamos con la identificación de las proteínas biotiniladas mediante espectrometría de masas. Como paso previo, realizamos la validación del proceso de purificación por *beads*, evaluando los niveles relativos de proteínas totales biotiniladas en cada una de las muestras antes y después de dicho proceso, mediante técnicas de *Western blot*.

Los resultados obtenidos muestran un claro enriquecimiento en las cantidades relativas de proteínas biotiniladas luego de la purificación por *beads* (Fig. 25 A). Si bien es cierto que la señal obtenida para los niveles globales de proteínas biotiniladas luego del proceso de purificación es menor que en el paso

previo, también se observa una clara reducción en los niveles de carga del *Western blot*, elevando así las cantidades relativas de proteínas biotiniladas en cada una de las muestras.

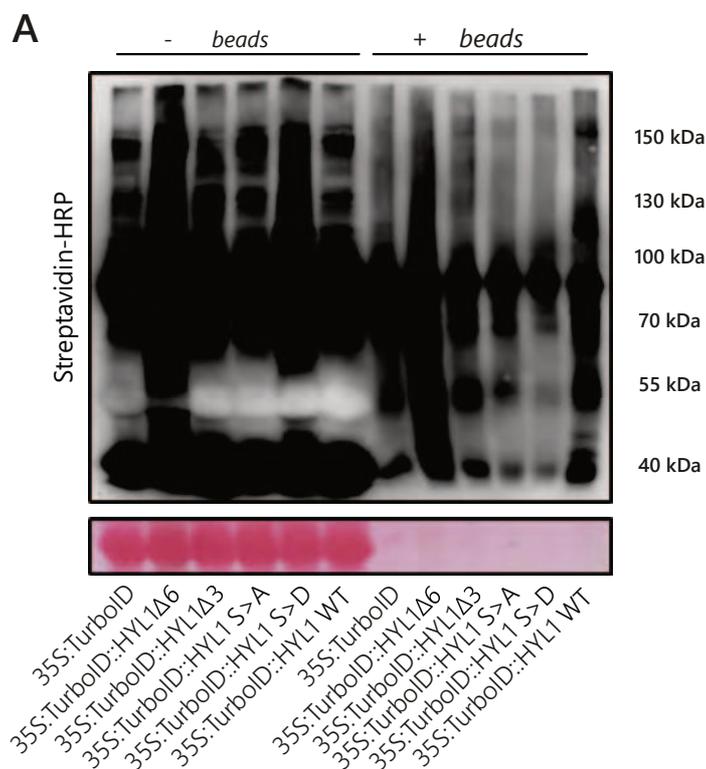


Figura 25. Validación del proceso de enriquecimiento de proteínas biotiniladas usando *beads* magnéticas fusionadas a estreptavidina. Ensayo de *Western blot* mostrando los niveles de proteínas biotiniladas en plantas transgénicas expresando las diferentes variantes de HYL1 fusionada a TurboID o sólo TurboID sometidas a un tratamiento de 50 μ M de biotina durante 3 h.

Una vez validado el proceso de purificación por *beads* decidimos llevar adelante el análisis e identificación de interactores mediante espectrometría de masas usando triplicados biológicos para cada una de las muestras a analizar. Se identificaron un total de 312 interactores de los cuales 109 están en presentes en cada uno de los replicados de TurboID, 113 en la versión TurboID::HYL1WT, 149 en TurboID::HYL1Δ3, 275 en TurboID::HYL1Δ6, 98 en TurboID::HYL1 S>A y 163 en TurboID::HYL1 S>D (Fig. 26 A). Estos resultados no sólo demuestran la existencia de una alta superposición entre los interactores obtenidos para cada muestra sino también que los mayores niveles de expresión y actividad de biotinilación observados para las versiones HYL1Δ6 y HYL1S>D (Fig. 24 B α -HA y Fig. 24 B *Streptavidin-HRP*) generaron un desbalance en la distribución de los interactores identificados.

A raíz de ello, para evitar la atomización de los resultados y simplificar el análisis de los mismos decidimos resumir las comparaciones en dos grupos diferentes. Como paso previo, todos aquellos interactores que hayan sido identificados en alguno de los 3 replicados del control negativo, TurboID, fueron eliminados de cada uno de los subconjuntos de interactores a comparar. En nuestro primer análisis, decidimos comparar aquellos interactores presentes en las 3 réplicas del genotipo

TurboID::HYL1 Δ 6 con aquellos presentes en la 3 réplicas de TurboID::HYL1WT. Los resultados nos muestran que de un total de 191 interactores, 169 están estrictamente asociados a la versión TurboID::HYL1 Δ 6, 15 son capaces de asociarse a ambas versiones y sólo 7 se asocian exclusivamente a TurboID::HYL1WT (Fig. 26 B). Si bien estos números parecen desalentadores ya que el resultado más esperable hubiese sido encontrar un mayor número de interactores estrictamente asociados a la versión completa de HYL1, no debemos perder de vista la diferencia entre la cantidad de interactores obtenidos inicialmente para cada una de las variantes analizadas. El análisis de la ontología genética de los resultados obtenidos sugiere que los interactores estrictamente asociados a HYL1 Δ 6 se corresponden con funciones del tipo: unión a la cromatina, helicasas de ARN, unión a nucleosomas y unión a la maquinaria de RNAPII; mientras que para HYL1WT tenemos: componentes estructurales del ribosoma, factores de elongación de la traducción, factores activadores de la traducción, reguladores de la actividad traduccional; y por último los interactores en común se corresponden con: HYL1 y proteínas de unión a ARN pequeños nucleares.

Los resultados previamente obtenidos son bastante coherentes con el trabajo publicado por Yang y colaboradores (X. Yang et al., 2021), que sugieren que la versión citoplasmática de HYL1 participaría en la inhibición traduccional mediada por miARNs. En ese sentido, nuestros resultados sugieren que la versión WT de HYL1, presente en el citoplasma, sería capaz de asociarse de manera diferencial a proteínas relacionadas a la maquinaria traduccional mientras que la versión sin repeticiones, más confinada en el núcleo, estaría más asociada a la maquinaria nuclear de procesamiento. Esta asociación a la maquinaria ribosomal podría potencialmente estar relacionada al silenciamiento génico mediado por inhibición traduccional. En consecuencia, la versión de HYL1 Δ 6 sería capaz de complementar los aspectos más críticos de la biogénesis de miARNs pero, a diferencia de la versión WT, no participaría en el mecanismo de inhibición traduccional.

En un segundo grupo de análisis, decidimos comparar los interactores diferencialmente asociados entre HYL1S>A, HYL1S>D y HYL1, con el objetivo de evaluar las diferencias que un hipotético cambio de fosforilación podría tener sobre la capacidad de interacción sobre el C-terminal y como se relacionaría dicho cambio con respecto a la versión WT del dominio. Repitiendo lo realizado en el análisis anterior se obtuvieron un total de 73 interactores: 45 para la versión HYL1S>D; 9 interactores en común entre HYL1S>D, HYL1S>A y HYL1WT; 7 comunes entre HYL1S>D y HYL1WT; 4 asociados a HYL1WT; 4 en HYL1S>D y HYL1S>A; 2 en HYL1S>A y 2 en común entre HYL1S>A y HYL1WT (Fig. 26 C). Nuevamente se observó un desplazamiento hacia la versión HYL1S>D como resultado de sus mayores niveles de expresión y actividad de biotilación. No obstante, los resultados obtenidos lucen mucho más homogéneos que los discutidos anteriormente, dejando entrever un comportamiento más constante entre las diferentes versiones analizadas en este ensayo. Estos resultados resultan coherentes con los patrones de localización observados para las versiones analizadas, donde no se observó diferencia alguna entre ellas. En adición a esto, los resultados obtenidos para el análisis de ontología genética

también mostraron un comportamiento homogéneo con funcionalidades como: Subunidades ribosomales, procesamiento de ARN no codificante, procesamiento de ARN pequeños nucleares, formación de complejos de ribonucleoproteínas, elongación de la traducción. Estas observaciones sugieren que las versiones analizadas HYL1S>D, HYL1S>A y HYL1WT tienen un comportamiento celular similar, lo que nos lleva a descartar la idea de una regulación funcional mediada por la fosforilación del dominio C-terminal. Sin embargo, desconocemos los efectos de dicha modificación en la estabilidad de la proteína, un aspecto que escapa al trabajo realizado en esta tesis y deberá ser evaluado a futuro.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta aquí sugieren que el dominio C-terminal de HYL1 parecería tener un efecto modulador en el patrón de localización subcelular de la misma. Nuestras observaciones muestran que la ausencia de dicho dominio genera una acumulación nucleolar de la proteína que le permite interactuar con los principales factores asociados a la biogénesis de miARNs y cumplir con los aspectos más críticos de la misma, complementado el fenotipo de las mutantes *hyl1-2* transformadas. No obstante, dicha versión parecería incapaz de interactuar con maquinaria traduccional. Por otro lado, la versión WT de la proteína presenta una distribución homogénea dentro del núcleo sumado a una presencia en el citoplasma donde es capaz de interactuar con la maquinaria ribosomal para potencialmente participar en el mecanismo de inhibición traduccional.

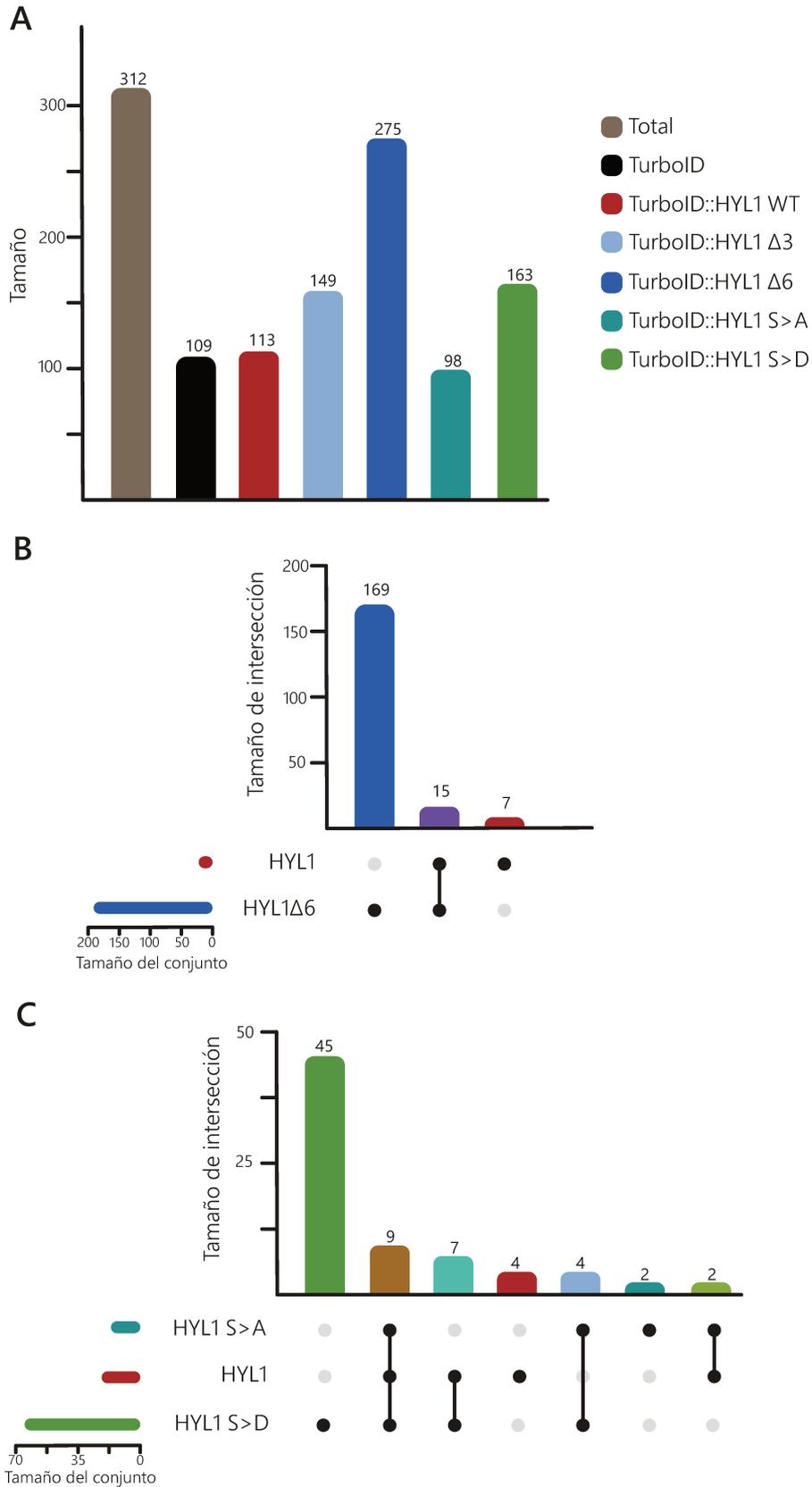


Figura 26. Categorización del total de interactores identificados en el experimento de TurboID proximity labeling. (A) Cantidades de interactores identificados en total y asociados a cada uno de los genotipos analizados. **(B)** Comparación entre los interactores estrictamente asociados a HYL1WT, HYL1Δ6 y la interacción entre ambos. **(C)** Comparación entre los interactores estrictamente asociados a HYL1WT, HYL1S>A, HYL1S>D y las intersecciones correspondientes.

7.5 Capítulo 2: Discusión

Años atrás, se demostró que el dominio C-terminal de HYL1 no es necesario para la complementación del fenotipo de las plantas mutantes *hyl1-2* ni para la producción de miARNs (Wu et al., 2007). Esto sugiere que la ausencia de dicho dominio no produciría grandes alteraciones en los aspectos más críticos de la biogénesis de miARNs. No obstante, estos resultados no nos dicen nada acerca de la posibilidad de un rol regulatorio sobre la actividad de la proteína, una idea que cobra bastante trascendencia si tenemos en cuenta tanto la relevancia de la fosforilación en la actividad/estabilidad de dicha proteína y la presencia de serinas fosforilables en cada una de las repeticiones (Achkar et al., 2018; Manavella et al., 2012).

A lo largo de este trabajo no hemos encontrado diferencias respecto a los patrones de interacción con los principales componentes de la biogénesis de miARNs entre las versiones WT de HYL1 y aquellas que emulan un estado fosforilado o no fosforilado del dominio C-terminal. En adición, tampoco hemos hallado diferencias en cuanto su patrón de localización. Estos resultados sugieren que la fosforilación del C-terminal no tendría un efecto regulador sobre la funcionalidad de la proteína. No obstante, una posibilidad a evaluar sería el efecto de dichas modificaciones sobre la estabilidad de la proteína, particularmente en aquellas condiciones donde la proteína suele ser menos estable, como en el caso de la oscuridad.

Por otra parte, los cambios observados en el patrón de localización para las diferentes variantes en la cantidad de repeticiones sugieren que las repeticiones del C-terminal serían necesarias para evitar una compartimentalización o sobreacumulación nuclear de la proteína. No obstante, desconocemos si este patrón de acumulación se debe a diferencias estructurales de la proteína capaces de dificultar su salida hacia el citoplasma o favorecer su retención en el núcleo, o a la interacción con otros factores proteicos capaces de reclutarla a dicho sitio. De una u otra forma, el impacto de estas alteraciones sobre la biogénesis de miARNs parecería ser nulo. En ese sentido, es probable que la localización nuclear de HYL1 sea suficiente para cumplir con éxito la mayoría de los aspectos críticos de la biogénesis de miARNs.

En efecto, esta última observación se condice con los resultados obtenidos en la búsqueda de interactores diferenciales mediante TurboID. Los resultados demuestran que la versión de HYL1 carente de dominio C-terminal es capaz de interactuar con las proteínas necesarias para el procesamiento nuclear de los miARNs y, en consecuencia, desempeñar con éxito las funciones más canónicas asociadas a la proteína. No obstante, el dominio C-terminal sería estrictamente necesario para permitir la salida de la proteína al citoplasma y fomentar la interacción con los factores involucrados en el mecanismo de inhibición traduccional mediado por miARNs, del cual HYL1 participa (X. Yang et al., 2021).

Estos resultados son coherentes con la reversión del fenotipo mutante observado en mutantes *hyl1-2* transformadas con las versiones de HYL1 sin C-terminal, ya que, en plantas la mayor parte del silenciamiento génico mediado por miARNs ocurre mediante el mecanismo de clivaje del mensajero, del cual AGO1 es responsable. Sumado a esto el fenotipo característico de mutantes de HYL1, el cual es complementado por todas las versiones, se debe exclusivamente a la desregulación de un puñado de factores de transcripción que son silenciados por clivaje y no inhibición traduccional (Brioude et al., 2021). Siguiendo esta línea, es posible que los ARNm *target* de miARNs que sean silenciados a través del mecanismo de inhibición traduccional correspondan a aquellos cuya desregulación no genere alteraciones fenotípicas severas en la planta.

8. CONCLUSIONES

Como conclusiones generales podemos decir que, a lo largo del primer capítulo de este trabajo de tesis, hemos logrado la identificación y caracterización funcional y molecular de un nuevo cofactor de la biogénesis de miARNs, llegando incluso a proponer un mecanismo de acción para el mismo. En ese sentido, partiendo de una mutante previamente obtenida a partir de un screening genético diseñado por el Dr. Manavella (Manavella et al., 2012) para la búsqueda de nuevos cofactores involucrados en la biogénesis/acción de los miARNs, logramos identificar al alelo mutante *hos15-3* como el responsable de dicho déficit en la actividad. A partir de allí, caracterizamos bioquímica y funcionalmente a HOS15 hasta proponerlo como un nuevo cofactor de la biogénesis de miARN. Demostramos que HOS15 es capaz de interactuar directamente con HYL1 para modular la actividad transcripcional de los genes MIR asociados, estableciendo un vínculo entre la biogénesis de los miARNs y la regulación epigenética de la expresión génica. HOS15 actuaría guiando al complejo HOS15-HDA9 hacia el correspondiente locus de *MIRNA* asociado a HYL1 para desencadenar la deacetilación de histonas, aumentando la compactación de la cromatina y restringiendo el acceso de la Pol II, lo que conlleva a una disminución en la actividad transcripcional del gen. Además, el mecanismo anteriormente propuesto se basa estrictamente en la interacción con HYL1 para cumplir con su efecto regulador sobre la vía, convirtiéndola en un nexo crucial entre la vía de biogénesis de miARNs y la regulación epigenética. Finalmente, este mecanismo cobraría una mayor importancia en condiciones de respuesta a la presencia de la hormona ABA, confiriéndole mayor dinamismo y capacidad de respuesta a la biogénesis de miARNs.

Curiosamente, la única característica diferencial entre un locus de *MIRNA* y los demás genes es el ARN al cual dan origen. Así, el pri-miARN naciente se convierte en un elemento diferencial que podría actuar como *signature* para el reclutamiento de factores involucrados en su regulación transcripcional. En ese sentido, la afinidad de HYL1 hacia las estructuras de tipo *hairpin* y su capacidad de unirse a los pri-miARN nacentes y reclutar diferentes complejos proteicos podría significar un mecanismo de regulación específico sobre los locus de genes *MIRNA* permitiendo modular tanto la expresión como el procesamiento de los pri-miARNs nacentes, en respuesta a las diferentes condiciones de un entorno continuamente cambiante. Este fascinante mecanismo, propone un rol previamente desconocido para una molécula de ARN, añadiéndole un nivel más de versatilidad y complejidad a la misma.

A partir de la función no canónica descrita para HYL1 durante la caracterización de HOS15, decidimos avanzar en la búsqueda de nuevas funcionalidades y características regulatorias desconocidas para dicha proteína. Nos enfocamos en el estudio y la caracterización del dominio C-terminal de HYL1, de funcionalidades desconocidas hasta entonces. Nuestros hallazgos sugieren que la presencia de dicho dominio sería un actor crucial en la modulación de la localización de HYL1, favoreciendo la migración de la proteína hacia el citoplasma y evitando su concentración en el compartimento nucleolar. Esta

regulación locacional, le permite a la proteína formar parte de los complejos proteicos involucrados en el silenciamiento génico mediado por inhibición traduccional, proceso que típicamente ocurre en el citoplasma.

En términos generales, todos los hallazgos aquí presentados contribuyen en gran magnitud a nuestro entendimiento de la vía de biogénesis de miARN. En particular, este trabajo representa un gran aporte al entendimiento de los complejos mecanismos involucrados en la modulación de una vía dinámica y compleja, cuya capacidad de respuesta frente a condiciones cambiantes cobra una trascendencia crucial para el desarrollo y la homeostasis de los seres vivos.

9. BIBLIOGRAFIA

- Achkar, N. P. (2021). REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE LA PROTEÍNA HYL1 Y SU IMPACTO EN LA BIOGÉNESIS DE MICRO ARNs [TESIS DE DOCTORADO NO PUBLICADA]. *UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL*.
- 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>
- Achkar, N. P., Cho, S. K., Poulsen, C., Arce, A. L., Re, D. A., Giudicatti, A. J., Karayekov, E., Ryu, M. Y., Choi, S. W., Harholt, J., Casal, J. J., Yang, S. W., & Manavella, P. A. (2018). A Quick HYL1-Dependent Reactivation of MicroRNA Production Is Required for a Proper Developmental Response after Extended Periods of Light Deprivation. *Developmental Cell*, *46*(2), 236–247.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.014>
- Ali, A., Kim, J. K., Jan, M., Khan, H. A., Khan, I. U., Shen, M., Park, J., Lim, C. J., Hussain, S., Baek, D., Wang, K., Chung, W. S., Rubio, V., Lee, S. Y., Gong, Z., Kim, W. Y., Bressan, R. A., Pardo, J. M., & Yun, D. J. (2019). Rheostatic Control of ABA Signaling through HOS15-Mediated OST1 Degradation. *Molecular Plant*, *12*(11), 1447–1462.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.08.005>
- Ali, A., Pardo, J. M., & Yun, D. J. (2020). Desensitization of ABA-Signaling: The Swing From Activation to Degradation. *Frontiers in Plant Science*, *11*(April), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00379>
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(8), 475–488. <https://doi.org/10.1038/nrm3611>
- Arribas-Hernández, L., Kielbinski, L. J., & Brodersen, P. (2016). mRNA decay of most Arabidopsis miRNA targets requires slicer activity of AGO1. *Plant Physiology*, *171*(August), pp.00231.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00231>
- Axtell, M. J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(Volume 64, 2013), 137–159. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050312-120043/CITE/REFWORKS>
- Baek, D., Shin, G., Kim, M. C., Shen, M., Lee, S. Y., & Yun, D. J. (2020). Histone Deacetylase HDA9 With ABI4 Contributes to Abscisic Acid Homeostasis in Drought Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, *11*(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00143>
- Baranauskė, 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>
- Ben Chaabane, S., Liu, R., Chinnusamy, V., Kwon, Y., Park, J. H., Kim, S. Y., Zhu, J. K., Yang, S. W., & Lee, B. H. (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>
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* *2007* *447*:7143, *447*(7143), 407–412. <https://doi.org/10.1038/nature05915>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *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>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/NAR/7.6.1513>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, *10*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Bologna, N. 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, N. G., Schapire, A. L., Zhai, J., Chorostecki, U., Boisbouvier, J., Meyers, B. C., & Palatnik, J. F. (2013). Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Research*, *23*(10), 1675–1689. <https://doi.org/10.1101/gr.153387.112>
- Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(1), 473–503.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>

- Bondos, S. E., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2021). On the roles of intrinsically disordered proteins and regions in cell communication and signaling. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00774-3>
- Borcherds, W., Bremer, A., Borgia, M. B., & Mittag, T. (2021). How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid–liquid phase separation? *Current Opinion in Structural Biology*, *67*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.09.004>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, *36*(9), 880–898. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>
- Bremer, A., Farag, M., Borcherds, W. M., Peran, I., Martin, E. W., Pappu, R. V., & Mittag, T. (2021). Deciphering how naturally occurring sequence features impact the phase behaviours of disordered prion-like domains. *Nature Chemistry* *2021 14:2*, *14*(2), 196–207. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00840-w>
- Brioudes, F., Jay, F., Sarazin, A., Greutzinger, T., Devers, E. A., & Voinnet, O. (2021). HASTY , the Arabidopsis EXPORTIN5 ortholog, regulates cell-to-cell and vascular microRNA movement . *The EMBO Journal*, *40*(15), 1–22. <https://doi.org/10.15252/embj.2020107455>
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008a). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, *320*(5880), 1185–1190. <https://doi.org/10.1126/science.1159151>
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008b). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, *320*(5880), 1185–1190. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1159151/SUPPL_FILE/BRODERSEN.SOM.PDF
- Brosnan, C. A., Sarazin, A., Lim, P., Bologna, N. G., Hirsch-Hoffmann, M., & Voinnet, O. (2019). Genome-scale, single-cell-type resolution of micro RNA activities within a whole plant organ . *The EMBO Journal*, *38*(13), 1–19. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100754>
- Burdisso, P., Milia, F., Schapire, A. L., Bologna, N. G., Palatnik, J. F., & Rasia, R. M. (2014). Structural determinants of Arabidopsis thaliana Hyponastic Leaves 1 function in vivo. *PLoS*

- ONE*, 9(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113243>
- Calderon-Villalobos, L. I. A., Kuhnle, C., Dohmann, E. M. N., Li, H., Bevan, M., & Schwechheimer, C. (2005). The evolutionary conserved TOUGH protein is required for proper development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17(9), 2473–2485. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031302>
- Cambiagno, D. A., Giudicatti, A. J., Arce, A. L., Gagliardi, D., Li, L., Yuan, W., Lundberg, D. S., Weigel, D., & Manavella, P. A. (2021a). HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular Plant*, 14(3), 426–439. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.12.019>
- Cambiagno, D. A., Giudicatti, A. J., Arce, A. L., Gagliardi, D., Li, L., Yuan, W., Lundberg, D. S., Weigel, D., & Manavella, P. A. (2021b). HASTY modulates miRNA biogenesis by linking pri-miRNA transcription and processing. *Molecular Plant*. <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>
- Carella, P., Merl-Pham, J., Wilson, D. C., Dey, S., Hauck, S. M., Vlot, A. C., & Cameron, R. K. (2016). Comparative proteomics analysis of phloem exudates collected during the induction of systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 171(2), 1495–1510. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00269>
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression Profiling of the Whole *Arabidopsis* Shaggy-Like Kinase Multigene Family by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Plant Physiology*, 130(2), 577–590. <https://doi.org/10.1104/PP.009175>
- Chen, T., Cui, P., Chen, H., Ali, S., Zhang, S., & Xiong, L. (2013). A KH-Domain RNA-Binding Protein Interacts with FIERY2/CTD Phosphatase-Like 1 and Splicing Factors and Is Important for Pre-mRNA Splicing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 9(10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003875>
- Chen, T., Cui, P., & Xiong, L. (2015). The RNA-binding protein HOS5 and serine/arginine-rich proteins RS40 and RS41 participate in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 43(17), 8283–8298. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv751>
- Chen, X. (2005). microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5923–5931. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.071>

- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 21–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113417>
- Cho, S. K., Chaabane, S. Ben, Shah, P., Poulsen, C. P., & Yang, S. W. (2014). COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nature Communications*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms6867>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>
- Cui, Y., Fang, X., & Qi, Y. (2016). TRANSPORTIN1 promotes the association of microRNA with ARGONAUTE1 in arabidopsis. *Plant Cell*, 28(10), 2576–2585. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00384>
- Dalmadi, A., Gyula, P., Balint, 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>
- Dignon, G. L., Best, R. B., & Mittal, J. (2020). Biomolecular phase separation: From molecular driving forces to macroscopic properties. *Annual Review of Physical Chemistry*, 71, 53–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-071819-113553>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 9970–9975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803356105>
- Eamens, A. L., Smith, N. A., Curtin, S. J., Wang, M. B., & Waterhouse, P. M. (2009). The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *Rna*, 15(12), 2219–2235. <https://doi.org/10.1261/rna.1646909>
- 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>
- Fan, L., Gao, B., Xu, Y., Flynn, N., Le, B., You, C., Li, S., Achkar, N., Manavella, P. A., Yang, Z., & Chen, X. (2022). *Arabidopsis* AAR2, a conserved splicing factor in eukaryotes, acts in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.2208415119>
- 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.e5. <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). <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>
- Felippes, F. F. De, & Weigel, D. (2010). Chapter 017 Transient Assays for the Analysis of miRNA Processing and Function. *Plant MicroRNA Methods*, 592(8), 255–264. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60327-005-2>
- Fields, S. (1993). The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Methods*, 5(2), 116–124. <https://doi.org/10.1006/METH.1993.1016>
- 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. *Plant Journal*, 82(6), 1018–1029. <https://doi.org/10.1111/tpj.12874>
- Fransz, P. F., & De Jong, J. H. (2002). Chromatin dynamics in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 560–567. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00298-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00298-4)
- 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>
- Gao, S., Wang, J., Jiang, N., Zhang, S., Wang, Y., Zhang, J., Li, N., Fang, Y., Yang, L., Chen, S., Yan, B., Huang, T., Kuai, B., Wang, Y., Chang, F., & Ren, G. (2020). Hyponastic Leaves 1 protects pri-miRNAs from nuclear exosome attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29), 17429–17437. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007203117>
- Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B., & Reiner, O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(11), 1632–1640. <https://doi.org/10.4161/cc.4.11.2151>
- German, M. A., Pillay, M., Jeong, D. H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., Kannan, V.,

- Rymarquis, L. A., Nobuta, K., German, R., De Paoli, E., Lu, C., Schroth, G., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2008). Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnology* 2008 26:8, 26(8), 941–946. <https://doi.org/10.1038/nbt1417>
- Gonzalo, L., Giudicatti, A. J., & Manavella, P. A. (2024). HYL1’s multiverse: A journey through miRNA biogenesis and beyond canonical and non-canonical functions of HYL1. *Current Opinion in Plant Biology*, 80(May), 102546. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102546>
- Gonzalo, L., Tossolini, I., Gulanicz, T., Cambiagno, D. A., Kasprovicz-Maluski, A., Smolinski, D. J., Mammarella, M. F., Ariel, F. D., Marquardt, S., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., & Manavella, P. A. (2022). R-loops at microRNA encoding loci promote co-transcriptional processing of pri-miRNAs in plants. *Nature Plants*, 8(4), 402–418. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01125-x>
- Görnemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K., & Neugebauer, K. M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular Cell*, 19(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.007>
- Gregory, B. D., O’Malley, R. C., Lister, R., Urich, M. A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Developmental Cell*, 14(6), 854–866. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.005>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4), 1093–1098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307969100>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hellens, R. P., Anne Edwards, E., Leyland, N. R., Bean, S., & Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42(6), 819–832. <https://doi.org/10.1023/A:1006496308160/METRICS>
- 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>

- Jia, T., Zhang, B., You, C., Zhang, Y., Zeng, L., Li, S., Johnson, K. C. M., Yu, B., Li, X., & Chen, X. (2017). The arabidopsis MOS4-associated complex promotes microRNA biogenesis and precursor messenger RNA splicing. *Plant Cell*, *29*(10), 2626–2643. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00370>
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 19–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- Jung, H. J., Choi, S. W., Boo, K. H., Kim, J. E., Oh, Y. K., Han, M. K., Ryu, M. Y., Lee, C. W., Møller, C., Shah, P., Kim, G. M., Yang, W., Cho, S. K., & Yang, S. W. (2022). HYL1-CLEAVAGE SUBTILASE 1 (HCS1) suppresses miRNA biogenesis in response to light-to-dark transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2116757119>
- Karlsson, P., Christie, M. D., Seymour, D. K., Wang, H., Wang, X., Hagmann, J., Kulcheski, F., & Manavella, P. A. (2015a). KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(45), 14096–14101. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512865112>
- Karlsson, P., Christie, M. D., Seymour, D. K., Wang, H., Wang, X., Hagmann, J., Kulcheski, F., & Manavella, P. A. (2015b). KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(45), 14096–14101. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512865112>
- Khan, I. U., Ali, A., Khan, H. A., Baek, D., Park, J., Lim, C. J., Zareen, S., Jan, M., Lee, S. Y., Pardo, J. M., Kim, W. Y., & Yun, D. J. (2020). PWR/HDA9/ABI4 Complex Epigenetically Regulates ABA Dependent Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, *11*(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00623>
- Kim, M. H., Cooper, D. R., Oleksy, A., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Reiner, O., Otlewski, J., & Derewenda, Z. S. (2004). The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene Lis1 and its functional implications. *Structure*, *12*(6), 987–998. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.03.024>
- 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>

- Koiwa, H., Hausmann, S., Bang, W. Y., Ueda, A., Kondo, N., Hiraguri, A., Fukuhara, T., Bahk, J. D., Yun, D. J., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Shuman, S. (2004). Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403174101>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *MGG Molecular & General Genetics*, *204*(3), 383–396. <https://doi.org/10.1007/BF00331014/METRICS>
- Köster, T., Meyer, K., Weinholdt, C., Smith, L. M., Lummer, M., Speth, C., Grosse, I., Weigel, D., & Staiger, D. (2014). Regulation of pri-miRNA processing by the hnRNP-like protein AtGRP7 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *42*(15), 9925–9936. <https://doi.org/10.1093/nar/gku716>
- 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>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *1970* 227:5259, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(25), 8795–8800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802493105>
- Leanna, C. A., & Hannink, M. (1996). The Reverse Two-Hybrid System: A Genetic Scheme for Selection Against Specific Protein/Protein Interactions. *Nucleic Acids Research*, *24*(17), 3341–3347. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.17.3341>
- Lee, C. Y., & Grant, P. A. (2018). Role of histone acetylation and acetyltransferases in gene regulation. In *Toxicoepigenetics: Core Principles and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812433-8.00001-0>
- Li, D., & Roberts, R. (2001). Human Genome and Diseases: Review WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*, 2085–2097. <https://doi.org/10.1007/PL00000838>

- Li, G., Hu, S., Zhao, X., Kumar, S., Li, Y., Yang, J., & Hou, H. (2021). Mechanisms of the morphological plasticity induced by phytohormones and the environment in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22020765>
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology*, *15*(16), 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.029>
- Li, P., Ham, B. K., & Lucas, W. J. (2011). CmRBP50 protein phosphorylation is essential for assembly of a stable phloem-mobile high-affinity ribonucleoprotein complex. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 23142–23149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244129>
- Li, Q., Liu, N., Liu, Q., Zheng, X., Lu, L., Gao, W., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, S., Wang, Q., Pan, J., Chen, C., Mi, Y., Yang, M., Cheng, X., Ren, G., Yuan, Y. W., & Zhang, X. (2021). DEAD-box helicases modulate dicing body formation in Arabidopsis. *Science Advances*, *7*(18), 1–17. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc6266>
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., Zhang, F., Raikhel, N., Jiang, L., & Chen, X. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell*, *153*(3), 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.005>
- Li, X., Wei, Y., Fei, Q., Fu, G., Gan, Y., & Shi, C. (2023). TurboID-mediated proximity labeling for screening interacting proteins of FIP37 in Arabidopsis. *Plant Direct*, *7*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/pld3.555>
- Li, Z., Wang, S., Cheng, J., Su, C., Zhong, S., Liu, Q., Fang, Y., Yu, Y., Lv, H., Zheng, Y., & Zheng, B. (2016). Intron Lariat RNA Inhibits MicroRNA Biogenesis by Sequestering the Dicing Complex in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *12*(11), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006422>
- Liang, C., Cai, Q., Wang, F., Li, S., You, C., Xu, C., Gao, L., Cao, D., Lan, T., Zhang, B., Mo, B., & Chen, X. (2022). Arabidopsis RBV is a conserved WD40 repeat protein that promotes microRNA biogenesis and ARGONAUTE1 loading. *Nature Communications*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28872-x>
- Lim, C. J., Park, J., Shen, M., Park, H. J., Cheong, M. S., Park, K. S., Baek, D., Bae, M. J., Ali, A., Jan, M., Lee, S. Y., Lee, B. H., Kim, W. Y., Pardo, J. M., & Yun, D. J. (2020). The Histone-modifying complex PWR/HOS15/HD2C epigenetically regulates cold tolerance1[OPEN]. *Plant Physiology*, *184*(2), 1097–1111. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00439>
- Liu, C., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis

- Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during MicroRNA biogenesis. *Plant Physiology*, 159(2), 748–758. <https://doi.org/10.1104/pp.112.193508>
- Liu, Q., Shi, L., & Fang, Y. (2012). Dicing bodies. *Plant Physiology*, 158(1), 61–66. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186734>
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297(5589), 2053–2056. <https://doi.org/10.1126/science.1076311>
- Llobes, 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>
- Lu, C., & Fedoroff, N. (2000). A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *The Plant Cell*, 12(12), 2351–2365. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.12.2351>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090599/SUPPL_FILE/LUND_SOM.PDF
- Luo, C., Sidote, D. J., Zhang, Y., Kerstetter, R. A., Michael, T. P., & Lam, E. (2013). Integrative analysis of chromatin states in Arabidopsis identified potential regulatory mechanisms for natural antisense transcript production. 77–90. <https://doi.org/10.1111/tpj.12017>
- 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>
- Mair, A., Xu, S. L., Branon, T. C., Ting, A. Y., & Bergmann, D. C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell type specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47864>
- Manavella, P. A., Godoy Herz, M. A., Kornblihtt, A. R., Sorenson, R., Sieburth, L. E., Nakaminami, K., Seki, M., Ding, Y., Sun, Q., Kang, H., Ariel, F. D., Crespi, M., Giudicatti, A. J., Cai, Q., Jin, H., Feng, X., Qi, Y., & Pikaard, C. S. (2023). Beyond transcription: compelling open questions in plant RNA biology. *Plant Cell*, 35(6), 1626–1653. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac346>
- 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>
- Marmorstein, R., & Roth, S. Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Current Opinion in Genetics & Development*, *11*(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00173-8)
- Mateja, A., Cierpicki, T., Paduch, M., Derewenda, Z. S., & Otlewski, J. (2006). *The Dimerization Mechanism of LIS1 and its Implication for Proteins Containing the LisH Motif*. *86*, 621–631. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.002>
- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics 2014 15:6*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- Mayer, K. S., Chen, X., Sanders, D., Chen, J., Jiang, J., Nguyen, P., Scalf, M., Smith, L. M., & Zhong, X. (2019). Hda9-pwr-hos15 is a core histone deacetylase complex regulating transcription and development. *Plant Physiology*, *180*(1), 342–355. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01156>
- Mee, Y. P., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., & Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(10), 3691–3696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405570102>
- Mencia, R., Gonzalo, L., Tossolini, I., & Manavella, P. A. (2023). Keeping up with the miRNAs: current paradigms of the biogenesis pathway. *Journal of Experimental Botany*, *74*(7), 2213–2227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac322>
- Meyers, B. C., & Axtell, M. J. (2019). Micromas in plants: Key findings from the early years. *Plant Cell*, *31*(6), 1206–1207. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00310>
- Mingardi, J., Musazzi, L., De Petro, G., & Barbon, A. (2018). miRNA Editing: New Insights into the Fast Control of Gene Expression in Health and Disease. *Molecular Neurobiology*, *55*(10), 7717–7727. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0951-x>
- Mizutani, M., & Kanaoka, M. M. (2018). Environmental sensing and morphological plasticity in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *83*, 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.10.029>
- Nasrallah, M. E., Yogeewaran, K., Snyder, S., & Nasrallah, J. B. (2000). Arabidopsis species hybrids in the study of species differences and evolution of amphiploidy in plants. *Plant Physiology*, *124*(4), 1605–1614. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1605>

- Park, H. J., Baek, D., Cha, J.-Y., Liao, X., Kang, S.-H., McClung, R. C., Lee, S. Y., Yun, D. J., & Kim, W.-Y. (2019a). HOS15 interacts with the histone deacetylase HDA9 and the Evening Complex to epigenetically regulate the floral activator GIGANTEA. *The Plant Cell*, tpc.00721.2018. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00721>
- Park, H. J., Baek, D., Cha, J. Y., Liao, X., Kang, S. H., McClung, C. R., Lee, S. Y., Yun, D. J., & Kim, W. Y. (2019b). Hos15 interacts with the histone deacetylase hda9 and the evening complex to epigenetically regulate the floral activator gigantea. *Plant Cell*, 31(1), 37–51. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00721>
- 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 HOS15-HDA9 complex associates with HYL1 to modulate miRNA expression in response to ABA signaling. *The Plant Cell*, koad132. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad132>
- Park, J., Jin, C., Shen, M., Jin, H., Cha, J., Iniesto, E., & Rubio, V. (2018). *Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721241115>
- Park, J., Lim, C. J., Khan, I. U., Jan, M., Khan, H. A., Park, H. J., Guo, Y., & Yun, D.-J. (2018). Identification and Molecular Characterization of HOS15-interacting Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 61(5), 336–345. <https://doi.org/10.1007/s12374-018-0313-2>
- Park, J., Lim, C. J., Shen, M., Park, H. J., Cha, J.-Y., Iniesto, E., Rubio, V., Mengiste, T., Zhu, J.-K., Bressan, R. A., Lee, S. Y., Lee, B., Jin, J. B., Pardo, J. M., Kim, W.-Y., & Yun, D.-J. (2018). Epigenetic switch from repressive to permissive chromatin in response to cold stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), E5400–E5409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721241115>
- Park, S. J., Choi, S. W., Kim, G. M., Møller, C., Pai, H. S., & Yang, S. W. (2021). Light-stabilized FHA2 suppresses miRNA biogenesis through interactions with DCL1 and HYL1. *Molecular Plant*, 14(4), 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.020>
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17), 1484–1495. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01017-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01017-5)
- Parkin, I. A. P., Gulden, S. M., Sharpe, A. G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T. C., & Lydiate, D. J. (2005). Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 171(2), 765–781. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.042093>
- Puchta, H. (2016). Using CRISPR/Cas in three dimensions: towards synthetic plant genomes,

- transcriptomes and epigenomes. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 87(1), 5–15. <https://doi.org/10.1111/tpj.13100>
- Puchta, H. (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.011>
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., & Ma, W. (2015). Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5850–5855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421475112>
- Raczynska, K. D., Stepień, A., Kierzkowski, D., Kalak, M., Bajczyk, M., McNicol, J., Simpson, C. G., Szweykowska-Kulinska, Z., Brown, J. W. S., & Jarmolowski, A. (2014). The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 1224–1244. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt894>
- Rasia, R. M., Mateos, J., Bologna, N. G., Burdisso, P., Imbert, L., Palatnik, J. F., & Boisbouvier, J. (2010). Structure and RNA interactions of the plant MicroRNA processing-associated protein HYL1. *Biochemistry*, 49(38), 8237–8239. https://doi.org/10.1021/BI100672X/SUPPL_FILE/BI100672X_SI_001.PDF
- Ré, D. A., Cambiagno, D. A., Arce, A. L., Tomassi, A. H., Giustozzi, M., Casati, P., Ariel, F. D., & Manavella, P. A. (2019). CURLY LEAF regulates micro RNA activity by controlling ARGONAUTE 1 degradation in plants. *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.003>
- Ré, D. A., Cambiagno, D. A., Arce, A. L., Tomassi, A. H., Giustozzi, M., Casati, P., Ariel, F. D., & Manavella, P. A. (2020). CURLY LEAF Regulates MicroRNA Activity by Controlling ARGONAUTE 1 Degradation in Plants. *Molecular Plant*, 13(1), 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.003>
- Re, D. A., Lang, P. L. M., Yones, C., Arce, A. L., Stegmayer, G., Milone, D., & Manavella, P. A. (2024). Erratum: Alternative use of miRNA-biogenesis co-factors in plants at low temperatures (Development (Cambridge) (2019) 146 (dev172932) DOI: 10.1242/dev.172932). *Development (Cambridge)*, 151(13). <https://doi.org/10.1242/dev.203166>
- 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*, 109(31), 12817–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204915109>
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383–2399. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>

- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70(Volume 70, 2001), 81–120.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.70.1.81/CITE/REFWORKS>
- Sacnun, J. M., Crespo, R., Palatnik, J., Rasia, R., & González-Schain, N. (2020). Dual function of HYPONASTIC LEAVES 1 during early skotomorphogenic growth in Arabidopsis. *Plant Journal*, 102(5), 977–991. <https://doi.org/10.1111/tpj.14681>
- Schimpl, S., & Puchta, H. (2016). Revolutionizing plant biology: Multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0103-0>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- 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* 2009 6:8, 6(8), 550–551.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0809-550>
- Shen, M., Lim, C. J., Park, J., Kim, J. E., Baek, D., Nam, J., Lee, S. Y., Pardo, J. M., Kim, W. Y., Mackey, D., & Yun, D. J. (2020). HOS15 is a transcriptional corepressor of NPR1-mediated gene activation of plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(48), 30805–30815. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016049117>
- Skopelitis, D. S., Hill, K., Klesen, S., Marco, C. F., von Born, P., Chitwood, D. H., & Timmermans, M. C. P. (2018). Gating of miRNA movement at defined cell-cell interfaces governs their impact as positional signals. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05571-0>
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., & Neer, E. J. (1999). The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(5), 181–185.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01384-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01384-5)
- Stepien, A., Dolata, J., Gulanicz, T., Bielewicz, D., Bajczyk, M., Smolinski, D. J., Szweykowska-Kulinska, Z., & Jarmolowski, A. (2022). Chromatin-associated microprocessor assembly is regulated by the U1 snRNP auxiliary protein PRP40. *Plant Cell*, 34(12), 4920–4935.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac278>
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Posttranscriptional coordination of

- splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(3).
<https://doi.org/10.1002/wrna.1403>
- Streitner, C., Köster, T., Simpson, C. G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J. W. S., & Staiger, D. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11240–11255.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks873>
- Szarzynska, B., Sobkowiak, L., Pant, B. D., Balazadeh, S., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., Jarmolowski, A., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2009). Gene structures and processing of *Arabidopsis thaliana* HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 37(9), 3083–3093.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp189>
- Tagami, Y., Motose, H., & Watanabe, Y. (2009). A dominant mutation in DCL1 suppresses the hyl1 mutant phenotype by promoting the processing of miRNA. *Rna*, 15(3), 450–458.
<https://doi.org/10.1261/rna.1297109>
- 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. *Plant Physiology*, 184(1), 316–329.
<https://doi.org/10.1104/PP.20.00258>
- Tsukaya, H., & Tsuge, T. (2001). Morphological Adaptation of Inflorescences in Plants that Develop at Low Temperatures in Early Spring: The Convergent Evolution of “Downy Plants.” *Plant Biology*, 3(5), 536–543. <https://doi.org/10.1055/S-2001-17727>
- van Nocker, S., & Ludwig, P. (2003). The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: Conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-50>
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crété, 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. (2022a). Revisiting small RNA movement in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 23:3, 23(3), 163–164. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00455-0>
- Voinnet, O. (2022b). Revisiting small RNA movement in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 23:3, 23(3), 163–164. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00455-0>
- Wallner, E. S., Mair, A., Handler, D., McWhite, C., Xu, S. L., Dolan, L., & Bergmann, D. C. (2024).

- Spatially resolved proteomics of the Arabidopsis stomatal lineage identifies polarity complexes for cell divisions and stomatal pores. *Developmental Cell*, 59(9), 1096-1109.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2024.03.001>
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, 10(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- 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, T., Li, X., Liu, N., Yang, Y., & Gong, Q. (2023). TurboID-based proximity labelling reveals a connection between VPS34 and cellular homeostasis. *Journal of Plant Physiology*, 289(August), 154100. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.154100>
- Wang, W., Ye, R., Xin, Y., Fang, X., Li, C., Shi, H., Zhou, X., & Qi, Y. (2011). An importin β protein negatively regulates microRNA activity in Arabidopsis. *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>
- Westhof, E. (2004). How to silence silencing. *Chemistry and Biology*, 11(2), 158–160.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.02.006>
- Wieczorek, P., Jarmołowski, A., Szweykowska-Kulińska, Z., Kozak, M., & Taube, M. (2023). Solution structure and behaviour of the Arabidopsis thaliana HYL1 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1867(8). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130376>
- Wu, F., Yu, L., Cao, W., Mao, Y., Liu, Z., & Hea, Y. (2007). The N-terminal double-stranded RNA binding domains of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell*, 19(3), 914–925. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048637>
- 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, C., Zhang, Z., He, J., Bai, Y., Cui, J., Liu, L., Tang, J., Tang, G., Chen, X., & Mo, B. (2023). The DEAD-box helicase RCF1 plays roles in miRNA biogenesis and RNA splicing in Arabidopsis. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.16366>
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., & Huang, H. (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant Journal*, *47*(6), 841–850. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02835.x>
- Yang, L., Wu, G., & Poethig, R. S. (2012). Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(1), 315–320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114673109>
- Yang, S. W., Chen, H. Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N. H., & Yuan, Y. A. (2010a). 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, S. W., Chen, H. Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N. H., & Yuan, Y. A. (2010b). 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. *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, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, *34*(2), 667–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj474>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, *17*(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R., & Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, *307*(5711), 932–935. <https://doi.org/10.1126/science.1107130>
- Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytologist*,

- 216(4), 1002–1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>
- Zhan, X., Wang, B., Li, H., Liu, R., Kalia, R. K., Zhu, J. K., & Chinnusamy, V. (2012). Arabidopsis proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(44), 18198–18203. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216199109>
- 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., Liu, Y., & Yu, B. (2014). PRL1, an RNA-Binding Protein, Positively Regulates the Accumulation of miRNAs and siRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004841>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(43), 17588–17593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310644110>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(15), 4011–4016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619755114>
- Zhou, B., Yu, H., Xue, Y., Li, M., Zhang, C., & Yu, B. (2024). The spliceosome-associated protein CWC15 promotes miRNA biogenesis in Arabidopsis. *Nature Communications*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46676-z>
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y. T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M. J., Wang, X. J., & Zhang, X. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(9), 1106–1115. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2646>
- Zhu, J., Jeong, J. C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., Bohnert, H. J., Shi, H., Yun, D.-J., & Bressan, R. A. (2008). Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(12), 4945–4950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801029105>
- Zielezinski, A., Dolata, J., Alaba, S., Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Knop, K., Stepień, A., Bielewicz, D., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Sobkowiak, L., Lakomiak, A., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., & Karlowski, W. M. (2015). mirEX 2.0 - an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 144.

<https://doi.org/10.1186/S12870-015-0533-2>

10. ANEXO**Tabla A1. Construcciones utilizadas en esta Tesis.**

Nombre	Construcción	Descripción	Referencia
pAG02	HOS15 CDS	Región codificante de HOS15	Este trabajo
pAG04	Genómico HOS15	Región genómica de HOS15	Este trabajo
pAG11	pDe-Sa-CAS9	Vector destino conteniendo la secuencia de la CAS9 y el sitio para la incorporación de la guía	Este trabajo
pAG13	pEn-Sa-Chimera	Vector de entrada para el clonado de las guías CRISPR, conteniendo la secuencia de del ARN scaffold correspondiente	Este trabajo
pAG18	Pro _{35S} ::HOS15	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HOS15	Este trabajo
pAG19	Pro _{35S} ::eGFP:HOS15	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HOS15 fusionado a eGFP	Este trabajo
pAG21	Pro _{HOS15} ::HOS15	Pro _{HOS15} dirigiendo la expresión del gen HOS15	Este trabajo
pAG22	Pro _{35S} ::mCHERRY:HOS15	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de HOS15 fusionado a mCHERRY	Este trabajo
pAG24	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HOS15	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HOS15	Este trabajo
pAG26	Pro _{ADH1} ::GAL4BD:HOS15	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de unión de GAL4 fusionado a HOS15	Este trabajo
pAG28	SgRNA ₂ HOS15	Vector de entrada conteniendo la guía ARN CRISPR contra HOS15	Este trabajo
pAG29	Pro _{UBI4-2} ::CAS9 + Pro _{U6} ::SgRNA ₂ HOS15	Pro _{UBI4-2} dirigiendo la expresión de la enzima CAS9 y Pro _{U6} la expresión de la guía CRISPR	Este trabajo
pAG31	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 Δ 6	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 Δ 6	Este trabajo
pAG32	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 Δ 5	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 Δ 5	Este trabajo

pAG33	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 Δ4	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 Δ4	Este trabajo
pAG34	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 Δ3	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 Δ3	Este trabajo
pAG35	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 Δ1	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 Δ1	Este trabajo
pAG36	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 S>A	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 S>A	Este trabajo
pAG37	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 S>D	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 S>D	Este trabajo
pAG96	Pro _{35S} :TurboID:ccdB	Vector destino que permite expresar bajo el control del Pro _{35S} la enzima Turbo fusionada al N-terminal de la proteína de interés	Este trabajo
pAG100	Pro _{35S} ::TurboID	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de la enzima Turbo	Este trabajo
pAG101	Pro _{35S} ::HYL1 Δ6 rep:C- mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ6 fusionada a la porción C-terminal de mCitrine	Este trabajo
pAG102	Pro _{35S} ::HYL1 Δ3 rep:C- mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ3 fusionada a la porción C-terminal de mCitrine	Este trabajo
pAG103	Pro _{35S} ::HYL1 S>A rep:C- mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 S>A fusionada a la porción C-terminal de mCitrine	Este trabajo
pAG104	Pro _{35S} ::HYL1 S>D rep:C- mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 S>D fusionada a la porción C-terminal de mCitrine	Este trabajo
pAG105	Pro _{35S} ::TurboID:HYL1 Δ6	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de Turbo fusionada HYL1 Δ6 rep	Este trabajo
pAG106	Pro _{35S} ::TurboID:HYL1 Δ3	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de Turbo fusionada HYL1 Δ3 rep	Este trabajo
pAG107	Pro _{35S} ::TurboID:HYL1 S>A	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de Turbo fusionada HYL1 S>A	Este trabajo

pAG108	Pro _{35S} ::TurboID:HYL1 S>D	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de Turbo fusionada HYL1 S>D	Este trabajo
pAG109	Pro _{35S} ::TurboID:HYL1 WT	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de Turbo fusionada HYL1 WT	Este trabajo
pAT016	Pro _{35S} ::mCHERRY:CARP9	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de CARP9 fusionado a mCHERRY	Tomassi et al (2020)
pAT026	Pro _{35S} ::CARP9:N-mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de CARP9 fusionada a la porción N-terminal de mCitrine	Tomassi et al (2020)
pDC058	Pro _{ADH1} ::GAL4BD:AGO1	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a AGO1	Este trabajo
pNA35	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 WT	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 WT fusionada eGFP	Achkar et al (2018)
pNA89	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ6	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ6 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA90	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ5	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ5 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA91	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ4	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ4 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA92	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ3	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ3 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA93	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ2	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ2 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA94	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 Δ1	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 Δ1 fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA171	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 S>A	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 S>A fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA172	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 S>D	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 S>D fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pNA173	Pro _{35S} ::eGFP:HYL1 S>S	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 S>S fusionada a eGFP	Tesis Doctoral Natalia Achkar (2021)
pPM029	Pro _{35S} ::eGFP:SE	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de SE fusionado a eGFP	Manavella et al (2012)
pPM030	Pro _{35S} ::mCHERRY:SE	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de SE fusionado a mCHERRY	Manavella et al (2012)
pPM114	Pro _{35S} ::eGFP:DCL1	Pro _{35S} dirigiendo la expresión del ADNc de DCL1 fusionado a eGFP	Manavella et al (2012)

pPM273	Pro _{ADH1} ::GAL4AD:HYL1 WT	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de activación de GAL4 fusionado a HYL1 WT	Manavella et al (2012)
pPPM362	Pro _{35S} ::CPL1:N-mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de CPL1 fusionada a la porción N-terminal de mCitrine	Manavella et al (2012)
pPM363	Pro _{35S} ::HYL1:C-mCitrine	Pro _{35S} dirigiendo la expresión de HYL1 fusionada a la porción C-terminal de mCitrine	Manavella et al (2012)
pPPM399	Pro _{ADH1} ::GAL4BD:DCL1	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de unión de GAL4 fusionado a DCL1	Manavella et al (2012)
pPM400	Pro _{ADH1} ::GAL4BD:SE	Pro _{ADH1} dirigiendo la expresión del dominio de unión de GAL4 fusionado a SE	Manavella et al (2012)

Tabla A2. Sondas y oligonucleotidos utilizados en esta Tesis.

Gen sARN	Secuencia	Uso
miR156	GTGCTCACTCTCTTCTGTCA	sARN blot
miR157	GTGCTCTCTATCTTCTGTCA	sARN blot
miR159	TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA	sARN blot
miR161	CCCCGATGTAGTCACTTTCAA	sARN blot
miR164	TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA	sARN blot
miR167	TAGATCATGCTGGCAGCTTCA	sARN blot
miR168	TTCCCGACCTGCACCAAGCGA	sARN blot
miR319	GGGAGCTCCCTTCAGTCCAA	sARN blot
U6	GCTAATCTTCTCTGTATCGTTCC	sARN blot
TCP4	F: CAACCGATACAGGAAACGGAG R: CTGGTATGCGAAAACCCGAAG	qPCR
ARF8	F: CCACCACTGCCTTCTCCA R: TTCAGCAGCTACCACGAGCTG	qPCR
SCL6	F: CGTGAAAGCCTTCACTGGCG R: CAGCCGGAGATAGAGAAGCTG	qPCR
AP2	F: GGTGTCGAACAAACCCAAAT R: TACACGTAATTCGCCGACAA	qPCR
CUC1	F: ACTCTGCTGCTCATACCGATG R: GAAAGAACGCTGCTGCTGCTG	qPCR
APS4	F: CTCCGTGACAAAAAGCTTCCA R: CAAATCGATGCGACTCGACG	qPCR

ACTIN2/8	F: GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG R: GGAGATCCACATCTGCTGGAATG	qPCR
MIR156A	F: GTTAAAACTCAGATCTAACACAAAG R: GAGAACGAAGACAGGCCAAAG	ChIP
MIR167A	F: GAAGCTGCCAGCATGATCTA R: AGAAGGGTGCAGACAGTCAAC	ChIP
MIR171A	F: GATATTGGCCTGGTTCACCTCAG R: GATATTGGCGCGGCTCAATC	ChIP
MIR159A	F: GATCTGACGATGGAAGTAGAG R: TAAAGCTCCTGAGATATGCA	<i>PolIII occupancy assay</i>
MIR164A	F: TGCACGTACTTAACTTCTCCA R: ACACTTACATATATGAGAACT	<i>PolIII occupancy assay</i>
MIR166A	F: TCTTCGGACCAGGCTTCATTC R: CAAACAATCAATAACGCATGTA	<i>PolIII occupancy assay</i>
HOS15 _{pro} :HOS15	F: CACCGGTGGCGGATTCGTCGGAGG R: CTACATTCTGAAATCAAGAACGC	Clonado
HOS15 CDS	F: CACCATGTCTTCACTTACCTCCGTCG R: CTACATTCTGAAATCAAGAACGC	Clonado
HOS15 ^{CRISPR}	F: ATTGAGAAGCAGAAGGAACGAGAGAGG R: AAACCCTCTCTCGTTCCTTCTGCTTCT	Guías CRISPR
HOS15 CDS	F: CACCATGTCTTCACTTACCTCCGTCG R: CTACATTCTGAAATCAAGAACGC	Clonado

Tabla A3. Anticuerpos y diluciones utilizadas en esta Tesis.

Anticuerpo	Marca/Catálogo	Dilución/Uso
α -HA	Sigma-Aldrich H6908	1:10.000 WB
α -HA	Sigma-Aldrich H3663	1:5.000 WB
α -Flag	Sigma-Aldrich F1804	1:10.000 WB
α -GFP	Abcam ab290	1:10.000 WB/ChIP
α -HYL1	Agrisera AS06 136	1:10.000 WB/ChIP
α -HOS15	PRODUCCIÓN PROPIA	1:10.000 WB
α -H3	Agrisera AS10 710	1:20.000 WB
α -IgG	AS09 602	1:20.000 WB, 1:10.000 ChIP
α -PolIII	Abcam ab817	1:10.000 ChIP

Streptavidin-HRP	Invitrogen 43-4323	1:10.000 WB
α -Actin	Agrisera AS13 2640	1:10.000 WB
α -AcH3	Abcam ab47915	1:10.000 WB
α -MYC	Genscript A00 704	1:10.000 WB/ChIP/IP