

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**“MECANISMOS DE CARGA, SELECCIÓN Y  
RETENCIÓN DE HEBRAS DE MICRO ARNs  
EN PLANTAS”**

Lic. Ariel H. Tomassi

Director de Tesis: Dr. Pablo A. Manavella

Co-directora de Tesis: Dra. Delfina A. Ré

Laboratorio de Biología del ARN

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

**- 2019 -**

# AGRADECIMIENTOS

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

A CONICET, por financiar este posgrado durante 5 años de forma integral, habiéndome otorgado una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado.

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

Al Dr. Pablo A. Manavella por brindarme la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo, por dirigirme en este trabajo de Tesis, por sus consejos, por compartir sus conocimientos, por su predisposición continua para discutir sobre ciencia, y por generar un excelente ambiente de trabajo durante estos 5 años en su laboratorio.

A la Dra. Delfina A. Ré, Delf, por co-dirigirme, guiarme y, por sobre todas las cosas, aguantarme en la mesada, en cada reunión, por las discusiones y análisis de resultados, por sacarme adelante en esos lapsos de pequeños estancamientos y tropezones a los que la ciencia nos enfrenta día a día.

A mis compañeros de laboratorio, Agus, Dac, Nati, Peque, Axel y Luci por la camaradería, por las ayudas y colaboraciones cuando las necesité sin compromiso alguno, por discutir dificultades y resultados en búsqueda de conclusiones a las que individualmente no es tan fácil llegar.

A los que están, a la Peña, a los Intensos. A Ale, Nata, Clari, Facu, Flor, Juan, Pablo, Regi, Santi, Sofi, Luci, Vicky, Virgi. Por compartir almuerzos, mates, infinitas peñas, cumpleaños, despedidas y muchas cervezas hablando o discutiendo por prácticamente todo. Por la motivación diaria, por escucharme en todo momento, por los chismes, por los consejos y por el aguante. Gracias a ellos, todo se vuelve más divertido y entretenido en el edificio en el que tanto tiempo compartimos, además de tantas juntadas y salidas.

A mi familia, por enseñarme, educarme, por hacerme ser quien soy. Por formarme, por llenarme de valores, por hacerme ver lo valioso de la vida, por estar siempre, en todo momento y para todo. A mis viejos, por darme la mejor herencia, la más valorable, la posibilidad de bancarme para que me forme en una carrera universitaria, por regalarme la vida y futuro. Por su sacrificio, que de pendejo no lo notaba, no lo veía, y hoy entiendo lo egoísta que por momentos fui con ellos. Por apoyarme en cada momento, por entenderme siempre, y por ser mis mejores ejemplos a seguir. A la Gise, mi hermana, por las charlas, por las peleas, por los consejos, por ser una gran persona, y por sobre todo, una excelente hermana.

A Victoria, Tori, mi verdadero amor. Mi mayor y más hermoso regalo de este doctorado, de estos años en el Instituto, conocer al amor de mi vida, y aprender realmente lo que es amar. Sin ella a mi lado, la escritura de esta Tesis hubiese sido eterna e interminable. Gracias a su apoyo, a sus empujones para levantarme, a su acompañamiento en todo momento, a su amor infinito y desinteresado, a sus infinitas colaboraciones en todo en lo que podía ayudarme para que siga, para que avance, para que termine. Por estar siempre conmigo, caminando juntos a la par, hoy y siempre.

A mis amigos, Jp, Zurdo, Negro, Paco, Juan, Lumi, Belén, Mansu, Eze, Vicky, Meli, Nacha. A todos que de alguna u otra forma estuvieron, están y estarán presentes en mi vida, cerca o a la distancia, demostrándome que una vida con amigos, siempre es una buena vida.

## PUBLICACIONES

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

DA Ré, DA Cambiagno, AL Arce, **AH Tomassi**, M Giustozzi, P Casati, FD Ariel, PA Manavella (2019) CURLY LEAF regulates micro RNA activity by controlling ARGONAUTE 1 degradation in plants. *Mol. Plant* S1674-2052 (19):30327–2.

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

# 1 ÍNDICE

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS .....                                                                                  | 1  |
| PUBLICACIONES .....                                                                                    | 3  |
| 1 ÍNDICE .....                                                                                         | 4  |
| 2 ABREVIATURAS y SÍMBOLOS .....                                                                        | 8  |
| 3 RESUMEN.....                                                                                         | 12 |
| 4 ABSTRACT.....                                                                                        | 14 |
| 5 INTRODUCCIÓN.....                                                                                    | 17 |
| 5.1 Los ARNs pequeños de plantas .....                                                                 | 17 |
| 5.1.1 Los ARNs pequeños de interferencia (siARNs) .....                                                | 19 |
| 5.1.2 Los ARNs horquilla (hpARNs).....                                                                 | 20 |
| 5.2 Los microARNs .....                                                                                | 21 |
| 5.3 Biogénesis de los microARNs .....                                                                  | 22 |
| 5.3.1 Transcripción de genes MIR .....                                                                 | 22 |
| 5.3.2 Procesamiento de pri-miARNs.....                                                                 | 23 |
| 5.3.3 Regulación de la maquinaria de procesamiento .....                                               | 24 |
| 5.4 Eventos post-procesamiento y ensamblado del complejo RISC .....                                    | 27 |
| 5.5 Proteínas ARGONAUTA .....                                                                          | 30 |
| 5.5.1 Las proteínas AGO en Arabidopsis thaliana .....                                                  | 31 |
| 5.6 ARGONAUTA1 (AGO1). Características, funciones y localización .....                                 | 32 |
| 5.7 Carga y selección de hebras del dúplex miARN/miARN* en proteínas AGO .....                         | 35 |
| 5.8 Mecanismos de acción de los miARNs.....                                                            | 36 |
| 6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES .....                                                                | 40 |
| 6.1 Objetivos específicos: .....                                                                       | 40 |
| 7 CAPÍTULO 1.....                                                                                      | 42 |
| OPTIMIZACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE <i>NORTHERN BLOT</i> PARA LA DETECCIÓN DE miARNs..... | 42 |
| 7.1 INTRODUCCIÓN .....                                                                                 | 42 |
| 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                        | 45 |
| 7.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                         | 46 |
| 7.3.1 Extracción de ARN total de plantas de Arabidopsis thaliana .....                                 | 46 |
| 7.3.2 Northern blot no radioactivo para la detección de ARNs pequeños (small RNA blot) .....           | 46 |
| 7.3.3 Marcación de Sondas .....                                                                        | 48 |
| 7.3.4 Stripping de la Membrana y Re-hibridación con otras sondas.....                                  | 48 |

|        |                                                                                                                           |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.4    | RESULTADOS.....                                                                                                           | 50 |
| 7.4.1  | Geles de Poliacrilamida y Transferencia.....                                                                              | 50 |
| 7.4.2  | Sondas y Marcación con Digoxigenina .....                                                                                 | 51 |
| 7.4.3  | Hibridización de los ARNs pequeños.....                                                                                   | 53 |
| 7.4.4  | Detección No-Radioactiva de ARNs pequeños.....                                                                            | 53 |
| 7.4.5  | Stripping de la Membrana y Re-hibridación con otras sondas.....                                                           | 54 |
| 7.5    | DISCUSIÓN .....                                                                                                           | 56 |
| 8      | CAPÍTULO 2.....                                                                                                           | 58 |
|        | LA PROTEÍNA INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA CARP9 INTERACCIONA CON HYL1<br>PARA PROMOVER LA CARGA DE LOS miARNs EN AGO1 ..... | 58 |
| 8.1    | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                        | 58 |
| 8.1.1  | El miARN maduro y el ensamblado del complejo RISC .....                                                                   | 58 |
| 8.1.2  | Identificación de nuevos cofactores de la vía de miARNs mediante un Screening<br>genético .....                           | 59 |
| 8.2    | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                               | 61 |
| 8.3    | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                | 62 |
| 8.3.1  | Plásmidos.....                                                                                                            | 62 |
| 8.3.2  | Cepas bacterianas y de levaduras utilizadas .....                                                                         | 64 |
| 8.3.3  | Material vegetal y condiciones de cultivo .....                                                                           | 64 |
| 8.3.4  | Construcciones genéticas y generación de líneas transgénicas en Arabidopsis<br>thaliana y Nicotiana benthamiana.....      | 65 |
| 8.3.5  | Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la<br>Polimerasa) .....                            | 66 |
| 8.3.6  | Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....                                                                            | 67 |
| 8.3.7  | Clonados .....                                                                                                            | 67 |
| 8.3.8  | Minipreparación de ADN plasmídico .....                                                                                   | 69 |
| 8.3.9  | Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....                                                                    | 70 |
| 8.3.10 | Transformación estable de plantas de Arabidopsis thaliana .....                                                           | 70 |
| 8.3.11 | Transformación transitoria de plantas de Nicotiana benthamiana.....                                                       | 71 |
| 8.3.12 | Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis thaliana .....                                                       | 72 |
| 8.3.13 | Análisis de ARN.....                                                                                                      | 72 |
| 8.3.14 | Análisis de proteínas .....                                                                                               | 73 |
| 8.3.15 | Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) .....                                                                        | 75 |
| 8.3.16 | Tratamientos con MG132 .....                                                                                              | 75 |
| 8.3.17 | Fraccionamiento núcleo/citoplasma.....                                                                                    | 76 |
| 8.3.18 | Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) .....                                                                           | 77 |
| 8.3.19 | Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....                                                               | 77 |

|        |                                                                                                                             |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.3.20 | Ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP) .....                                                                           | 77  |
| 8.3.21 | Ensayos en levaduras .....                                                                                                  | 78  |
| 8.3.22 | Análisis bioinformáticos .....                                                                                              | 79  |
| 8.4    | RESULTADOS.....                                                                                                             | 80  |
| 8.4.1  | Identificación de CARP9 a partir de un screening de actividad de miARNs .....                                               | 80  |
| 8.4.2  | CARP9 codifica una proteína intrínsecamente desordenada de función desconocida conservada en plantas terrestres .....       | 85  |
| 8.4.3  | CARP9 no actúa como un factor de elongación en loci de MIARNs .....                                                         | 87  |
| 8.4.4  | CARP9 interacciona con HYL1, pero no con otros factores del procesamiento de los pri-miARNs.....                            | 88  |
| 8.4.5  | El complejo CARP9-HYL1 se forma en una etapa posterior al procesamiento de los pri-miARNs.....                              | 90  |
| 8.4.6  | CARP9 interacciona con AGO1 en el núcleo y modula la carga de miARNs .....                                                  | 91  |
| 8.4.7  | Los niveles proteicos de AGO1 están disminuídos en mutantes carp9.....                                                      | 93  |
| 8.5    | DISCUSIÓN .....                                                                                                             | 96  |
| 9      | CAPÍTULO 3.....                                                                                                             | 100 |
|        | “SCREENING GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE SELECCIÓN DE HEBRAS DE miARNs” ..... | 100 |
| 9.1    | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                          | 100 |
| 9.2    | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                 | 101 |
| 9.3    | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                  | 102 |
| 9.3.1  | Plásmidos .....                                                                                                             | 102 |
| 9.3.2  | Cepas bacterianas y de levaduras utilizadas .....                                                                           | 102 |
| 9.3.3  | Material vegetal y condiciones de cultivo .....                                                                             | 102 |
| 9.3.4  | Construcciones genéticas y generación de líneas transgénicas en Arabidopsis thaliana y Nicotiana benthamiana .....          | 102 |
| 9.3.5  | Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....                                 | 103 |
| 9.3.6  | Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....                                                                              | 103 |
| 9.3.7  | Clonados .....                                                                                                              | 103 |
| 9.3.8  | Minipreparación de ADN plasmídico .....                                                                                     | 103 |
| 9.3.9  | Determinación de la secuencia de moléculas de ADN .....                                                                     | 103 |
| 9.3.10 | Transformación estable de plantas de Arabidopsis thaliana .....                                                             | 103 |
| 9.3.11 | Transformación transitoria de plantas de Nicotiana benthamiana .....                                                        | 104 |
| 9.3.12 | Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis thaliana .....                                                         | 104 |
| 9.3.13 | Análisis de ARN.....                                                                                                        | 104 |
| 9.3.14 | Ensayos de cuantificación de la actividad Luciferasa.....                                                                   | 105 |

|        |                                                                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 9.3.15 | Mutagénesis en semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con etilmetanosulfonato (EMS).<br>.....                      | 105 |
| 9.3.16 | Screening de genética directa por mutagénesis con EMS utilizando un sistema<br>reportero de doble gatillo .....     | 106 |
| 9.3.17 | Generación de los grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo ....                                           | 106 |
| 9.3.18 | Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación .....                                                   | 107 |
| 9.4    | RESULTADOS .....                                                                                                    | 109 |
| 9.4.1  | Sistema Reportero de Doble Gatillo .....                                                                            | 109 |
| 9.4.2  | Evaluación del correcto funcionamiento del Sistema Reportero en plantas de<br><i>Arabidopsis</i> transgénicas ..... | 113 |
| 9.4.3  | Screening para la identificación de mutantes de interés .....                                                       | 116 |
| 9.4.4  | Obtención de grupos de mapeo e identificación de mutaciones causales del<br>fenotipo observado .....                | 120 |
| 9.4.5  | Caracterización preliminar de las mutantes identificadas .....                                                      | 121 |
| 9.5    | DISCUSIÓN .....                                                                                                     | 126 |
| 10     | CONCLUSIONES GENERALES .....                                                                                        | 130 |
| 11     | BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                                  | 133 |

## 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

**CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

**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:** Ditiotreitól

**DO:** 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

**h:** Hora

**HRP:** *Horseradish peroxidase*

**IgG:** Inmunoglobulina G

**L:** Litro

**LB:** Luria-Bertani

**LD:** Día largo (*long day*)

**M:** Molar

**m<sup>2</sup>:** 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

**miliQ:** Agua calidad miliQ

**ml:** Mililitro

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

**mm:** Milímetros

**mmol:** Milimoles

**MOPS:** Ácido3-(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

- 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
- RIP:** Inmunoprecipitación de ARN (*RNA immunoprecipitation*)
- RIP-qPCR:** Inmunoprecipitación de ARN seguido de 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.
- seg:** Segundo
- 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:** N,N,N',N',-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:** Mililitros de soluto en 100 ml de solución
- μM:** Micromolar
- μmoles:** Micromoles
- μL:** Microlitros
- V:** Volts
- WT:** Ecotipo salvaje (*Wild Type*)

## Nomenclatura

**Nomenclatura de genes:** *CARP9*, gen *CARP9*.

**Nomenclatura de proteínas:** CARP9, proteína CARP9.

**Nomenclatura de mutantes:** *carp9-2*, mutante en el gen *CARP9*, alelo 2.

**Nomenclatura de promotores:** *Prom<sub>CARP9</sub>*, promotor del gen *CARP9*.

**Nomenclatura de construcciones:** *Prom<sub>35S</sub>::eGFP:CARP9*, promotor del virus del mosaico de la coliflor fusionado a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (eGFP) y a la secuencia codificante de la proteína CARP9.

### 3 RESUMEN

En plantas, los ARN pequeños (sARN) controlan múltiples aspectos de la fisiología de estos organismos, desde la defensa contra virus hasta la estabilidad y topología de los genomas. En particular, los micro ARNs (miARNs), una de las clases más abundantes de sARN endógenos, regulan numerosos procesos durante el desarrollo y la adaptación de las plantas al ambiente. Para cumplir sus funciones, los sARNs se asocian a proteínas ARGONAUTA (AGO). En el caso de los miARNs, AGO1 es el principal efector de la vía, cargando dúplex de miARN maduros y reteniendo sólo una de las hebras, la cual usa como guía para reconocer y silenciar genes blanco. Recientemente, se descubrió que la carga de miARNs en AGO1 ocurre, al menos en parte, en el núcleo de la célula permitiendo exportar hacia el citoplasma los miARNs ya asociados al complejo efector RISC. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo preciso de carga de miARNs en AGO1 dentro del núcleo, y cómo esta proteína elige cuál hebra del dúplex de miARN retener y cuál descartar. En esta Tesis buscamos comprender estos dos aspectos de la biología de la proteína AGO1, en el contexto de la regulación génica mediada por miARNs.

En una primera etapa de este trabajo, y a fin de generar las herramientas necesarias para responder a las preguntas planteadas, desarrollamos un protocolo de detección de miARNs no radiactivo que permitiera la cuantificación, de manera sensible, de ambas hebras de un miARN. Además, el protocolo permite la re-hibridación de las membranas, práctica común en protocolos de detección radioactiva pero inexistente en técnicas no-radioactivas. Mediante el uso de esta herramienta que nos permitió observar cambios en los niveles de miARNs de plantas mutantes identificadas en nuestro laboratorio y disponibles para su estudio, logramos identificar a CARP9, una proteína intrínsecamente desordenada de localización nuclear, como un factor que promueve la carga de miARNs en AGO1 en el núcleo. Mutaciones en el gen que codifica CARP9 llevan a una alteración en la acumulación de miARNs y en el silenciamiento génico, y causan defectos morfológicos notables. Curiosamente, encontramos que CARP9 es capaz de interactuar con HYL1, pero no con otras proteínas de la maquinaria de biogénesis de miARNs. De la misma manera, CARP9 interacciona con miARNs maduros, pero no con sus precursores, posicionando a esta proteína en un paso posterior al procesamiento de los pri-miARNs. También encontramos que CARP9 es capaz de interactuar con AGO1 promoviendo su carga con miARNs. Las plantas deficientes en CARP9 presentan niveles reducidos de miARNs cargados en AGO1, retención parcial de miARNs en el núcleo, y niveles proteicos reducidos de AGO1. En conjunto, nuestros resultados sugieren que CARP9 modula la comunicación HYL1-AGO1 actuando como una proteína de anclaje para permitir la carga adecuada de los miARNs en

el complejo efector RISC. A su vez, estos resultados permiten posicionar a HYL1 como el potencial “dador” de miARNs a AGO1 durante su proceso de carga nuclear.

Por último, en esta Tesis diseñamos un sistema reportero de doble gatillo que permite discernir qué hebra se carga en AGO1, a fin de estudiar los mecanismos que rigen el proceso de retención de la hebra guía en el complejo efector AGO1-miARN. El sistema reportero consta de un miARN artificial diseñado para que su hebra guía (amiR:BASTA) silencie al gen de resistencia al herbicida BASTA, mientras que su hebra pasajera (amiR:BASTA\*) silencia una versión modificada de la proteína bioluminiscente Firefly Luciferasa (F-Luc). El sistema reportero fue introducido en plantas de *Arabidopsis thaliana* y se evaluó su funcionamiento midiendo los niveles de amiR:BASTA, amiR:BASTA\*, bioluminiscencia basal, fenotipo y resistencia a distintas concentraciones del herbicida. De la misma manera, se estableció la concentración de trabajo del herbicida. Una vez identificada una línea de plantas homocigotas para el sistema reportero con características óptimas, las mismas se sometieron a mutagénesis al azar y posterior identificación de mutantes de interés. Los genomas completos de estas mutantes fueron secuenciados, y se determinó bioinformáticamente los potenciales genes vinculados a los fenotipos observados. De esta manera, se generó una colección de mutantes, cuyos análisis preliminares de algunas de ellas se describen en esta Tesis, que nos permitirá estudiar los procesos que dictan la selección de la hebra guía de miARNs por AGO1.

Como resultado de este trabajo de Tesis, hemos logrado generar un avance significativo en la comprensión de la biología de la proteína AGO1 en las vías de silenciamiento génico mediado por miARNs. En especial, esta Tesis aporta nuevas evidencias que permiten comprender mejor cómo es el proceso nuclear de carga de miARNs en AGO1 al haber identificado la proteína, CARP9, que actúa en la interfase entre la maquinaria de procesamiento de miARNs y el complejo efector RISC. Además, logramos identificar potenciales mutantes con alteración en la selección de hebras de miARNs por AGO1, lo que permitirá comprender los mecanismos por los cuales este proceso tiene lugar en la célula vegetal.

## 4 ABSTRACT

In plants, small RNAs (sRNAs) control multiple aspects of the physiology of these organisms, from defense against viruses to the stabilization of genomes topologies. In particular, microRNAs (miRNAs), one of the most abundant classes of endogenous sRNAs, regulate numerous processes during plant development and adaptation to the environment. To fulfill their regulatory functions, the sRNAs are associated with ARGONAUTE (AGO) proteins. In the case of miRNAs, AGO1 is the main effector of the pathway, loading mature miRNA duplexes and retaining only one of the strands, which it uses as a guide to recognize and silence target genes. Recently, it was discovered that the loading of miRNAs in AGO1 takes place, at least in part, in the cell nucleus allowing the nuclear export of miRNAs already associated with the RISC effector complex. However, the precise mechanism of loading miRNAs into AGO1 within the nucleus, and how this protein subsequently selects which strand of the miRNA has to retain and which one has to discard, is remain unknown. In this thesis we seek to understand these two aspects of the biology of the AGO1 protein, in the context of miRNA-mediated gene regulation.

In the first stage of this work, and in order to generate the necessary tools to answer the questions raised, we developed a non-radioactive miRNA detection protocol that would allow the quantification, in a sensitive way, of both strands of a miRNA duplex. In addition, the protocol allows the re-hybridization of the membranes, a common practice in radioactive detection protocols but nonexistent in non-radioactive techniques. By using this tool, we were able to identify CARP9, a nuclear intrinsically disordered protein, as a factor that promotes loading of miRNAs into AGO1 in the nucleus. Mutations in the gene encoding CARP9 lead to an alteration in the accumulation of miRNAs and gene silencing, and cause notable morphological defects. Interestingly, we found that CARP9 is able to interact with HYL1, but not with other proteins in the miRNA biogenesis machinery. In the same way, CARP9 interacts with mature miRNAs, but not with its precursors, positioning it after pri-miRNA processing in the miRNA pathway. We also found that CARP9 is able to interact with AGO1 promoting the miRNA loading. Plants deficient in CARP9 displayed reduced levels of AGO1-loaded miRNAs, partial retention of miRNAs in the nucleus, and reduced protein levels of AGO1. Collectively, our results suggest that CARP9 modulates HYL1-AGO1 communication by acting as a scaffold protein to allow the proper loading of miRNAs in the RISC effector complex. Concurrently, these results allow HYL1 to be positioned as the potential “donor” of miRNAs to AGO1 during its nuclear loading process.

Finally, in this thesis we designed a double trigger reporter system that allows us to discern which strand is loaded into AGO1, in order to study the mechanisms that govern the

miRNA-duplex strand selection by AGO1. The reporter system consists of an artificial miRNA designed so that its guide strand (amiR:BASTA) silences the herbicide resistance gene BASTA, while its transient strand (amiR:BASTA\*) silences a modified version of the Firefly Luciferase bioluminescent protein (F-Luc). The reporter system was introduced in *Arabidopsis thaliana* plants and its performance was evaluated by measuring the levels of amiR:BASTA, amiR:BASTA\*, basal bioluminescence, phenotype and resistance to different concentrations of the herbicide. In the same way, we established the herbicide working concentration. Once a homozygous line of the reporter plants, which presented optimal features, was identified, we proceeded to randomly mutagenize them and identify mutants of interest. Later on, whole-genome re-sequencing allowed us to identify the potential genes linked to the observed phenotypes. In this way, a collection of mutants was generated that will allow to understand the processes that dictate the miRNA strand selection by AGO1.

The results of this thesis allowed us to better understand the processes controlling the association of miRNAs with AGO1. On the one hand, identifying a new actor that facilitates the process of nuclear loading of miRNAs in AGO1, and on the other hand, generating an invaluable collection of defective mutants in the loading, selection and retention of miRNAs strands by AGO1, which will allow a greater knowledge of how this protein manages to discern between two RNA strands with similar characteristics.

# **INTRODUCCIÓN**

## 5 INTRODUCCIÓN

La morfología de las plantas está determinada por diversos procesos que regulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos. El tamaño y la forma de estos órganos, a su vez, depende del número, tamaño y tipo de células que los componen [1]. Los órganos se desarrollan a partir de grupos de células indiferenciadas y totipotentes que constituyen los meristemas. Estas células son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, y dada la naturaleza sésil de las plantas, esta característica les permite adaptarse a los constantes cambios en los factores ambientales a las cuales se encuentran expuestas, asegurando su supervivencia [2]. Los complejos patrones de crecimiento, división y diferenciación celular que definen los distintos pasos del desarrollo de las plantas, deben estar finamente regulados temporal y espacialmente. Esta regulación ocurre, en gran parte, modulando positiva o negativamente, la abundancia de los transcriptos de muchos genes en las células de cada tejido.

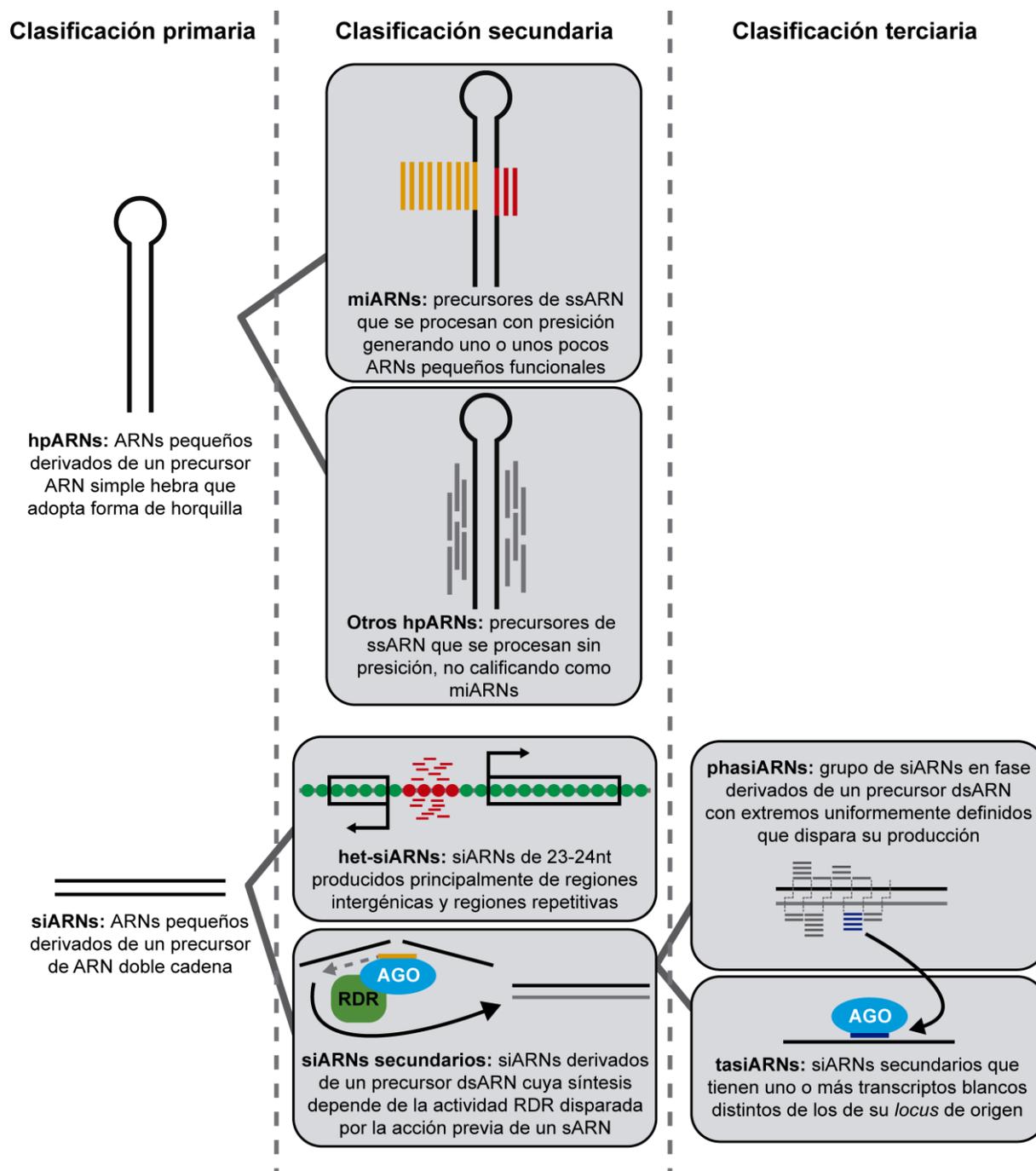
Dado que todas las células somáticas poseen la misma información genética, la clave para conseguir la especialización estructural y funcional de las células es la expresión diferencial de ciertos genes. A su vez, los niveles de los productos de estos genes, y su distribución espacial, dependen en gran parte del contexto celular, de desarrollo y ambiental [2]. Así, es necesaria una fina y sincronizada regulación de la expresión génica, llevada a cabo a distintos niveles, desde el remodelado de la cromatina hasta modificaciones post-traduccionales sobre las proteínas, de manera de tener un correcto balance entre la expresión de un gen y los niveles de proteína funcional derivada de dicho gen.

La abundancia de los transcriptos de muchos genes está regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional por ARNs pequeños de unos 20 a 24 nucleótidos (sARNs del inglés *small RNAs*). Éstos, actúan uniéndose a sus transcriptos blancos por complementariedad de bases, desencadenando el silenciamiento génico ya sea por modificaciones de la cromatina, la degradación por corte de ARN mensajeros (ARNm), o la inhibición de la traducción mediada por los ribosomas [3], [4].

### 5.1 Los ARNs pequeños de plantas

En plantas, los ARNs pequeños cumplen diversas funciones controlando tanto el desarrollo como las respuestas a estrés, contribuyendo a la plasticidad fenotípica y regulando la estabilidad y compactación de la cromatina. A comienzos del siglo XXI aparecieron los primeros reportes sobre el descubrimiento y la descripción de los ARNs pequeños en plantas [5]–[8], algunos años después de la primera aparición en escena de los sARNs en animales [9], [10]. De hecho, fue en plantas donde primero se asoció a los sARNs

con el silenciamiento génico [5]. Dos décadas después se han logrado identificar una gran cantidad de sARNs con funciones muy diversas. Los ARNs pequeños han sido clasificados en subfamilias basados en sus orígenes, mecanismos de biogénesis y proteínas involucradas, y en sus modos de acción [3]. Como condición *sine qua non*, todos los ARNs pequeños de plantas se producen a partir de precursores de ARNs doble cadena los cuales son reconocidos y procesados por distintas proteínas del tipo DICER-LIKE (DCL). Una vez generado un sARN, el cual mantiene su condición de ARN doble cadena, se asocia a alguna de las proteínas ARGONAUTA (AGO) codificadas en el genoma de plantas para cumplir su función. El complejo AGO-sARN, conocido como RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*), es capaz de unirse a ARNs blancos por complementariedad de bases, desencadenando el silenciamiento génico ya sea a nivel transcripcional por modificaciones de la cromatina, o a nivel post-transcripcional por desestabilización del ARNm y/o bloqueo de su traducción. Dentro de la gran familia de sARNs de plantas, podemos definir dos grandes grupos; aquellos que se producen a partir de precursores de ARN doble cadena con apareamiento perfecto entre las hebras, conocidos como ARNs pequeños de interferencia (siARNs del inglés *small interfering RNAs*), y aquellos que derivan de moléculas de ARN simple cadena que se pliegan sobre sí mismas formando estructuras de ARN doble cadena, generalmente de apareamiento imperfecto, conocidos como micro ARNs (miARNs) [3]. Estas dos grandes clases de ARNs pequeños a su vez pueden dividirse en distintos subgrupos de sARNs (Figura 1) en función de los mecanismos de biogénesis involucrados, como así también el tamaño y la función de cada sARN [3].



**Figura 1.** Clasificación de los ARNs pequeños (figura modificada de Axtell, 2013 [3]).

### 5.1.1 Los ARNs pequeños de interferencia (siARNs)

Todos los siARNs comparten como característica provenir de precursores de ARN de doble cadena, sin embargo, cada subclase de siARNs se genera y actúa por mecanismos distintos. El tipo de sARN más abundante en las células vegetales son los siRNAs provenientes de regiones heterocromáticas, siARNs heterocromáticos (het-siARNs). Estos siARNs, que normalmente tienen una longitud de ~24 nt, se generan en regiones genómicas

repetitivas y ricas en transposones. Su principal función es mantener silenciados los innumerables transposones de plantas a través del silenciamiento transcripcional de genes (TGS del inglés *Transcriptional Gene Silencing*). Estos siARNs se producen a partir de transcritos generados por la ARN Polimerasa dependiente de ADN IV (Pol IV) la cual actúa mayormente sobre transposones y otras regiones repetitivas [11]. La ARN Polimerasa dependiente de ARN 2 (RDR2) interactúa con la Pol IV generando una segunda hebra del transcripto naciente [12]–[14]. Este ARN doble cadena es luego procesado por la endonucleasa DCL3 en sARNs de 24 nt [12]. Estos siARNs, cargados mayormente en la proteína AGO4 [15], reconoce transcritos generados en la misma región por la ARN Polimerasa dependiente de ADN V (Pol V) [16]–[18], disparando la metilación del *locus* y, por ende, su silenciamiento, en un mecanismo conocido como metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM del inglés *RNA-directed DNA methylation*) [19].

El segundo tipo de siRNA más común en una célula vegetal, es el grupo de los siARNs de 21-22 nt que desencadenan el silenciamiento post-transcripcional (PTGS del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*) de transcritos aberrantes, ARNs virales y transgenes [20]–[22]. Estos transcritos anómalos son blanco de la ARN Polimerasa dependiente de ARN 6 (RDR6) que genera la hebra complementaria produciendo dsARNs [22], los cuales son procesados por las endonucleasas DCL4 y DCL2 en dúplex de siARN de 21 y 22 nt respectivamente [23]. Posteriormente, estos siARNs son cargados en distintas proteínas AGO (mayormente AGO1), para disparar el silenciamiento por clivaje de sus ARNs blanco [24]–[26]. En algunos casos el PTGS puede amplificarse disparando la producción de siARNs secundarios, llamados así dado que se generan en un paso posterior a la acción de algún siARN o miARN cargado en alguna proteína AGO. La producción de siARNs secundarios depende de varios factores como el mal procesamiento de ciertos transcritos [27], el número de sitios blanco de miARNs que tiene el transcripto, el tamaño del sARN que lo dispara, la estructura del dúplex del cual proviene [28]–[32], y la proteína AGO en la que se carga para dirigir el corte [32], [33]. Muchos de estos siARNs secundarios se encuentran en fase debido al corte secuencial de las proteínas DCLs, dando lugar a los siARNs secundarios en fase (phasiARNs del inglés *phased siRNAs*) [29], [34]. Algunos siARNs secundarios pueden actuar en *trans* reprimiendo a distintos ARNm blancos, lo que les dio el nombre de *trans-acting siRNAs* o tasiARNs [28], [29], [35].

### **5.1.2 Los ARNs horquilla (hpARNs)**

Muchos *loci* en los genomas de plantas, derivados de repeticiones invertidas (IR del inglés *inverted repeats*), producen ARNs simple hebra que se pliegan sobre sí mismos formando una estructura de horquilla. Estas estructuras de ARN doble cadena normalmente

son reconocidas y procesadas por proteínas DCL para producir sARNs. En líneas generales, las proteínas DCL2, DCL3 y DCL4 reconocen horquillas con alto nivel de apareamiento entre los brazos del dsARN generando sARNs de 22, 24 y 21 nt respectivamente [36], [37]. Recientemente en nuestro laboratorio, encontramos en la región promotora del factor de transcripción *HaWRKY6* de girasol, un elemento IR derivado de un elemento transponible (MITE, del inglés *Miniature IR Transposable Element*), capaz de transcribirse y ser procesado por la proteína DCL3, generando het-siARNs que regulan su propio *locus* en un mecanismo complejo y dinámico que involucra metilación y remodelamiento de la cromatina mediante la formación de *loops* activadores y represores de la transcripción [38].

Aquellas horquillas con apareamiento imperfecto en su región dsARN son normalmente reconocidas por DCL1 para generar miARNs. Este tipo de sARN es el segundo en abundancia dentro de la población de ARNs pequeños, siendo los factores más importantes en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, tanto en plantas como en animales. Debido a que los objetivos de esta Tesis abordan cuestiones relacionadas principalmente con la maquinaria de acción de esta clase de sARNs, a continuación, se hará foco en los mecanismos de biogénesis y acción de los miARNs, como así también en las proteínas que participan de estas vías.

## 5.2 Los microARNs

Después de los het-siARNs, la segunda familia de ARNs pequeños más abundantes en plantas son los miARNs, representando aproximadamente un 20% de la población total de sARNs de la célula. Los miARNs, todos codificados en el genoma de la planta, tienen un rol esencial en el silenciamiento de la expresión génica al igual que en la gran mayoría de los organismos eucariotas. Si bien las vías de biogénesis y acción de los miARNs en plantas difieren significativamente de las vías en animales, estos sARNs actúan de manera similar en ambos reinos, inactivando ARNm blanco a nivel post-transcripcional (PTGS del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*), controlando distintos procesos de desarrollo, defensa y adaptación [39]. En plantas, estos sARNs endógenos de 20-22 nt regulan los niveles de transcritos de genes que codifican mayoritariamente para factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés, y proteínas que regulan el desarrollo de las plantas [40].

Basados en las diferencias y similitudes entre las vías en plantas y animales, así como en la conservación de sus componentes esenciales, se sugiere que posiblemente estas vías han evolucionado a partir de un mecanismo de silenciamiento primordial por siARNs con un modo de acción basado en el clivaje de los transcritos blancos de silenciamiento de un ancestro común, y que en ambos casos, evolucionaron en paralelo como un sistema de defensa contra virus y transposones que finalmente se adaptó a la regulación post-

transcripcional de la expresión de genes [41]. Dentro del reino de las plantas, varias familias de miARNs se encuentran conservadas en muchas especies, incluso algunas de ellas están presentes en todos los linajes de plantas terrestres. Sin embargo, muchos otros miARNs han surgido y evolucionado en paralelo, siendo específicos inclusive entre especies relacionadas [42]–[44]. Así, los miARNs aparecen como un importante componente de la maquinaria de regulación de la expresión génica, con un fuerte rol a lo largo de la evolución en la adaptación de las plantas al ambiente.

### 5.3 Biogénesis de los microARNs

Los miARNs se producen a partir de transcriptos de miARN primarios (pri-miARN) que se pliegan sobre sí mismos formando estructuras secundarias del tipo “tallo-burbuja”, capaz de ser reconocidos y procesados por la endonucleasa del tipo RNase III DICER-LIKE1 (DCL1). Esta enzima genera miARNs maduros doble cadena (dúplex de miARNs) que, una vez cargados en ARGONAUTE1 (AGO1), cumplirán con sus funciones regulatorias silenciando ARNs blanco (Figura 2). Desde el descubrimiento de los primeros miARNs en plantas, se han identificado numerosas proteínas que participan y regulan la biogénesis y acción de los miARNs, convirtiendo a esta vía en una intrincada y compleja red compuesta por un gran número de actores y reguladores del silenciamiento [45]–[48]. A fin de comprender como se producen y actúan los miARNs en plantas, dividimos esta vía en etapas sucesivas discretas.

#### 5.3.1 Transcripción de genes *MIR*

Los miARNs están codificados en el genoma de las plantas, en numerosos genes *MIR* que son transcriptos por la ARN Polimerasa II (Pol II) [49]. Al igual que cualquier gen que codifica para proteínas, los genes *MIR* contienen en su región promotora secuencias reconocidas por la maquinaria de transcripción basal, y múltiples sitios de reconocimiento para factores de transcripción específicos [50]. La Pol II es reclutada a los *loci* de los genes *MIR* por el co-activador general de la transcripción Mediator [51], y su dominio C-terminal (CTD) es fosforilado por las enzimas CYCLIN-DEPENDENT KINASES F;1 y D (CDKF;1 y CDKD) activándola para la transcripción [52]. Las proteínas NEGATIVE ON TATA LESS2 (NOT2) y CELL DIVISION CYCLE 5 (CDC5) aparecen como factores de transcripción generales para todos los genes *MIR*, asociándose a sus promotores y promoviendo su transcripción [53], [54], en tanto que el complejo Elongator favorece la elongación transcripcional en estos *loci* [55]. Se han descrito varios otros factores asociados a la regulación de la transcripción de los genes *MIR*, tratados con mayor profundidad en

recientes revisiones [45], [47]. Los transcritos primarios nacientes (pri-miARNs) son protegidos por la adición de la caperuza (*CAP*) en su extremo 5', poliadenilados en su extremo 3', y en aquellos casos en los que los pri-miARNs contengan intrones, los mismos serán eliminados o usados alternativamente mediante *splicing* [49].

### 5.3.2 *Procesamiento de pri-miARNs*

Los pri-miARNs son procesados por la maquinaria de procesamiento o *dicing complex*, en los cuerpos nucleares conocidos como *dicing bodies* o *D-bodies* [56], [57]. El núcleo central de este complejo lo componen la enzima ARNasa nuclear tipo III DICER-LIKE1 (DCL1) que se encarga de realizar los cortes sobre el pri-miARN, acompañada de las proteínas accesorias HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) y SERRATE (SE), que mejoran la eficiencia y precisión de los cortes realizados por DCL1, dando lugar al dúplex de miARN/miARN\* maduro [8], [58], [59]. Muchas evidencias sugieren que el ensamblado de la maquinaria de procesamiento de precursores de miARNs ocurre co-transcripcionalmente [45], proceso en el cual participan numerosos cofactores que inicialmente fueron sólo asociados a la transcripción de genes.

A diferencia del mecanismo descrito en animales, en el que la escisión del dúplex de miARN se realiza en dos cortes sucesivos, catalizados primero por la endonucleasa DROSHA en el núcleo y segundo por DICER en el citoplasma [60], en plantas, el procesamiento de los pri-miARNs se produce completamente en el núcleo, y es DCL1 la única enzima encargada de realizar todos los cortes necesarios para la escisión del dúplex de miARN [8], [58]. Los precursores de miARNs en plantas tienen una gran variedad de tamaños y estructuras de plegamiento, sin embargo, la maquinaria de procesamiento logra generar de cada uno de ellos el correspondiente miARN biológicamente activo de manera precisa y eficiente. Esta eficiencia de corte se debe, entre otros factores, a ciertos determinantes estructurales presentes en los pri-miARNs. Se ha observado que DCL1 realiza el procesamiento de los pri-miARNs mediante 4 mecanismos distintos según la naturaleza del precursor, desde la base hacia la burbuja, o viceversa, y en 2 o más pasos de corte, según el tamaño y la estructura del precursor [4].

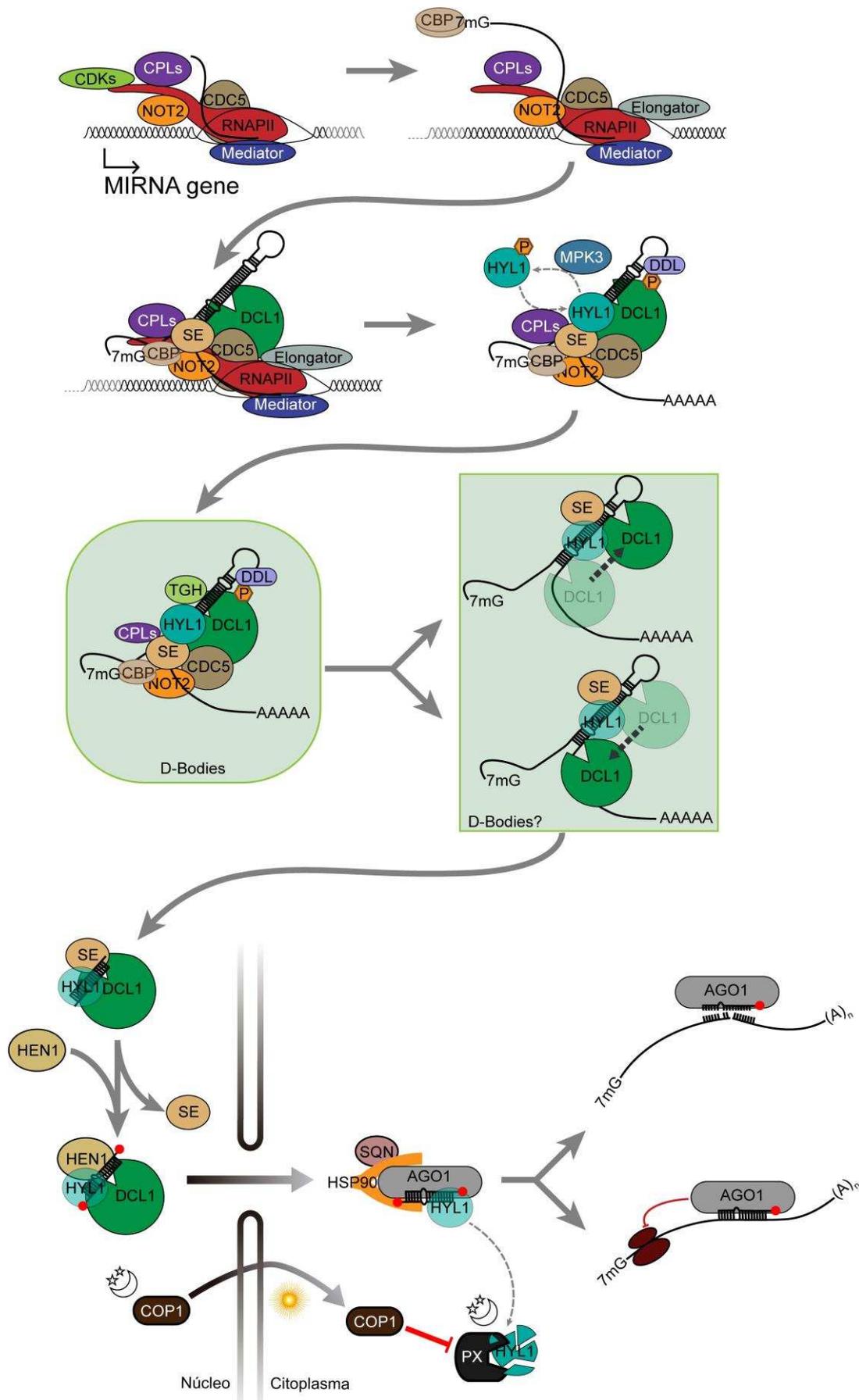
El núcleo central del complejo de procesamiento tiene como actor principal no sólo a DCL1, sino también a la proteína con dominio de unión a dsARN HYL1 y a la proteína con dedo de zinc SERRATE [61]–[63]. Numerosos estudios han determinado que tanto HYL1 como SE tienen un rol importante en asistir a DCL1 en el reconocimiento de los determinantes estructurales del precursor para que se posicione en los sitios correctos de corte y los realice en forma precisa y eficiente [59], [64], [65]. Sin embargo, estas proteínas no serían indispensables para el procesamiento [47]. Recientemente en nuestro laboratorio

hemos demostrado que plantas de *Arabidopsis* mutantes en *hyl1* y se crecidas en condiciones de baja temperatura, revierten parcialmente el fenotipo morfológico característico de estas plantas y recuperan los niveles de ciertos miARNs que en condiciones normales se encuentran bajos, sugiriendo que al menos a bajas temperaturas DCL1 no requiere de la asistencia de HYL1 y SE para procesar todos los precursores de miARN [66]. De todas formas, la ausencia o inactivación de estos cofactores genera una importante baja en los niveles de los miARNs maduros, y un procesamiento erróneo e impreciso de los pri-miARNs. HYL1 homodimeriza y se une a la región con estructura de tallo (dsARN) del pri-miARN a través de sus dominios de unión a ARN doble cadena (dsRBDs del inglés *double-strand RNA binding domains*) en su extremo N-terminal, y mediante su interacción con DCL1 la posiciona en los sitios correctos de corte [67]–[69]. Por su parte, SERRATE se une a los pri-miARNs en regiones de uniones dsARN-ssARN e interacciona con DCL1, actuando como anclaje para asistirle en su posicionamiento y promoviendo los cortes del precursor [62]–[64], [70], [71].

Entre los factores con mayor relevancia en el procesamiento de pri-miARNs, aparecen las proteínas CAP-BINDING PROTEIN 20 y 80 (CBP20 y CBP80) del complejo nuclear de unión al *cap-5'* (CBC del inglés *cap-binding complex*), que mediante su interacción con SE promueven el correcto procesamiento de los precursores de miARNs [72]–[74]. Otras proteínas involucradas en el proceso de *splicing*, también participan en el procesamiento de pri-miARNs, relacionando estrechamente ambos procesos [45]. Además, otras proteínas ajenas al *splicing*, como TOUGH (TGH) y DAWDLE (DLL), también son necesarias para el correcto y preciso funcionamiento de la maquinaria de procesamiento, mediante su interacción con los pri-miARNs y el complejo de proteínas DCL1, HYL1 y DCL1, estabilizándolo y modulando la actividad de DCL1 [75]–[78].

### **5.3.3 Regulación de la maquinaria de procesamiento**

Hasta hace algunos años se tenía la idea de que la maquinaria de biogénesis de miARNs era ubicua en toda la planta, y se mantenía invariable, siendo cada familia de genes *MIR* la que se regulaba a nivel transcripcional respondiendo a distintas condiciones ambientales o de desarrollo. Sin embargo, actualmente existe amplia evidencia de que esta vía se encuentra finamente regulada a distintos niveles. La proteína SE por ejemplo, bajo ciertas condiciones es regulada por el miR863-3p a nivel post-transcripcional [79], mientras que a nivel post-traducciona se ha reportado que es fosforilada por quinasas de la familia SnRK2, aunque se desconoce el rol molecular de dicha fosforilación [80].



**Figura 2.** Representación esquemática de la vía de biogénesis y acción de los miARNs, y su regulación (figura modificada de Achkar y col, 2016 [45]).

Por su parte, DCL1 se encuentra regulado de a nivel transcripcional de manera negativa por la histona acetiltransferasa GENERAL CONTROL NON-REPRESSED PROTEIN 5 (GCN5), y de manera positiva por la proteína nuclear XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER (XCT/CMA33) [81], [82]. Además, SMALL1 (SMA1) promueve el correcto *splicing* del transcrito de DCL1 [83]. A nivel post-transcripcional, DCL1 se encuentra modulado por un *feedback* regulatorio en el que participan dos miARNs por él mismo producidos. Por un lado, el miR162 silencia al transcrito de DCL1 en la unión entre los exones 12 y 13 [84]. Por otro lado, en el intrón 14 del ARNm de DCL1 reside el precursor del miR838, lo que produce una competencia entre la maquinaria de procesamiento de pri-miARNs, en la que DCL1 es el cofactor principal, y la maquinaria de *splicing*, produciéndose fragmentos de ARNm aberrantes de DCL1 por una incapacidad en la eliminación de este intrón, y una disminución en sus niveles de transcrito funcional [85]. A nivel post-traducciona, DCL1 se fosforila en su dominio helicasa, y esta fosforilación es necesaria para su interacción con DDL [76], [78], sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál sería el rol molecular de esta fosforilación sobre DCL1.

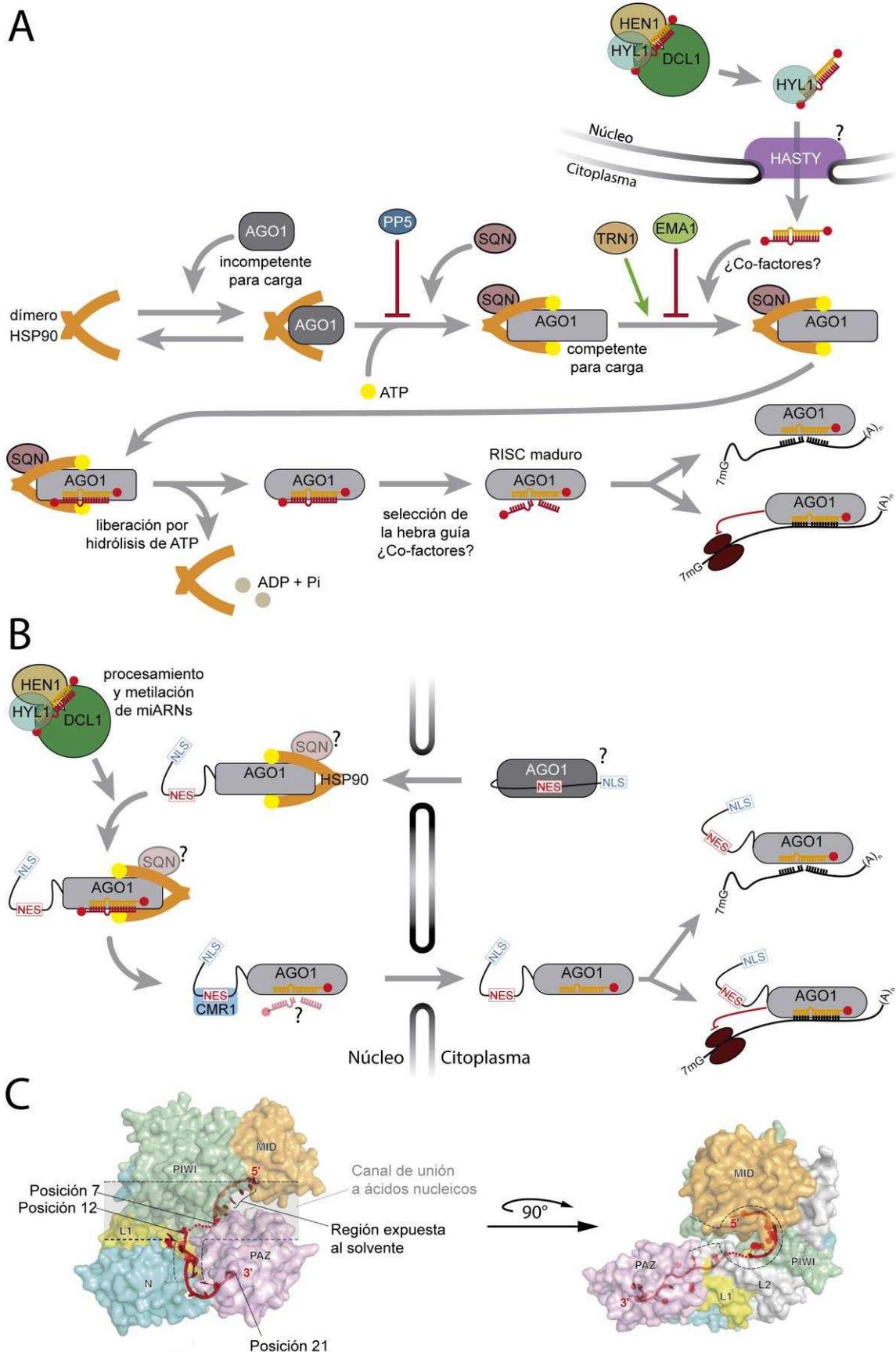
La actividad, estabilidad y localización subcelular de HYL1 se encuentra compleja y finamente modulada. En 2012, Manavella y col. [86] demostraron que en *Arabidopsis* HYL1 se fosforila en determinados residuos de serina en sus motivos de unión a dsARN (DRBMs), y que esta fosforilación inactiva a HYL1, lo que deriva en la producción de miARNs defectuosos debido a un mal procesamiento por parte de DCL1, y a fallas en la selección y retención de la hebra del dúplex de miARN/miARN\* por parte de AGO1 y el complejo efector. La inactivación de HYL1 mediante su fosforilación se produce por la acción de las quinasas MPK3 y SnRK2 [80], [87], en tanto que su activación por defosforilación es mediada mayormente por las fosfatasas CPL1 y 2 a través de la interacción directa con SE, convirtiéndolas en cofactores muy importantes dentro de la maquinaria de procesamiento de precursores de los miARNs [86]. El estado de fosforilación de HYL1, además de modular la actividad de la proteína, define su estabilidad y localización celular [88]. HYL1 se mueve entre el núcleo y el citoplasma dinámicamente, aunque se desconoce que función cumple en este último. La  $\beta$  importina KETCH1 se encarga de importar a HYL1 desde el citoplasma hacia el núcleo, para que se acople a la maquinaria de procesamiento de miARNs y cumplir con sus funciones en la vía [89]. En una condición de oscuridad, luego de cumplir sus funciones en el núcleo, la versión activa no fosforilada de HYL1, sale al citoplasma y es degradada por una proteasa aún no identificada [88], [90]. Sin embargo, una porción de HYL1 fosforilada se mantiene en el núcleo escapando de la degradación citoplasmática. Durante el día, el supresor de la fotomorfogénesis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) se transporta desde el núcleo al citoplasma, y protege a HYL1 de su degradación inhibiendo a la proteasa que la degrada [90]. En esta condición

lumínica, la versión fosforilada inactiva de HYL1 que se mantuvo en el núcleo, actúa como reserva para que la maquinaria de biogénesis se reactive rápidamente mediante la defosforilación de HYL1 mediada por CPL1/2 de modo de recuperar nuevamente los niveles de miARNs [88].

#### 5.4 Eventos post-procesamiento y ensamblado del complejo RISC

Una vez procesado un pri-miARN por DCL1, se libera un dúplex miARN/miARN\* con dos nucleótidos sobresalientes en cada extremo 3', y que carece del CAP-5' y cola de poli(A) en su 3', características que le brindan estabilidad a los ARNm protegiéndolos de su degradación por RNAasas. Este dúplex de miARN es reconocido por la metiltransferasa HUA ENHANCER1 (HEN1) en sus extremos 3' sobresalientes de cada hebra, y añade un grupo metilo al grupo 2'-hidroxilo de la ribosa de cada nucleósido en la posición 3', previniendo la degradación del miARN maduro [91], [92]. HEN1 contiene un motivo de unión a dsARN (DRBM), mediante el cual se une a los dúplex de miARN dejando sus extremos sobresalientes 3' apuntando hacia el sitio activo, metilándolos de manera  $Mg^{2+}$  dependiente [93]. HEN1 se localiza tanto en núcleo como citoplasma [56], pero su interacción con HYL1 y DCL1 sugiere que la metilación se produce en el núcleo inmediatamente después de la escisión del dúplex de su precursor [94]. De hecho, la interacción entre DCL1 y HEN1 se produce en el mismo motivo de DCL1 que le permite interactuar con SE, sugiriendo que luego del procesamiento del pri-miARN, SE es desplazada del complejo DCL1-HYL1-miARN/miARN\* por HEN1, la cual ocupa su lugar para modificar el miARN maduro [45], [94].

Una vez que el dúplex miARN/miARN\* es metilado y protegido de la maquinaria de degradación, se carga en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) mediante la asociación con la proteína AGO1, principal efector del PTGS mediado por miARNs [95]. El ensamblado del complejo RISC requiere de la chaperona HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90), la cual homodimeriza e interactúa con AGO1, proceso que es asistido y facilitado por la proteína SQUINT (SQN), proteína ortóloga a la CYCLOPHYLIN 40 (CYP40) de animales [96]–[99]. SQN contiene un dominio N-terminal peptidil-prolina isomerasa (PPIasa) y un dominio C-terminal TPR (del inglés *tetratrecopeptide repeat*) mediante el cual interactúa con el dominio C-terminal de secuencia MEEVD de las variantes citosólicas de HSP90, esencial para la función de SQN [96], [98], [100]. Por otra parte, la PROTEIN PHOSPHATASE 5 (PP5), actúa como un represor del ensamblado del complejo RISC [98].



**Figura 3.** Esquema de formación del complejo RISC. A) Modelo anterior (figura modificada de Iki y col., 2012 [98]). B) Modelo actual (figura modificada de Bologna y col., 2018 [101]) C) Estructura de Ago2 de humanos, homóloga a AGO1 de plantas. En rojo se representa la hebra guía del miARN. (figura modificada de Nakanishi, 2016 [102]).

El modelo propuesto para la formación del RISC sugiere que luego de su homodimerización, HSP90 se une a AGO1. Mediante la hidrólisis de ATP, HSP90 provoca un cambio conformacional en la estructura de AGO1, lo que facilita la incorporación del dúplex maduro miARN/miARN\*. Una vez el dúplex cargado, HSP90 se disocia de AGO1 de manera dependiente de ATP, provocando un nuevo cambio conformacional en AGO1 que induce la remoción de la hebra pasajera del dúplex (miARN\*), manteniendo cargada la hebra guía (miARN) (Figura 3A) [97], [98]. El mecanismo que describe cambios conformacionales en la estructura de AGO1 y su relación con la eliminación de la hebra pasajera también se ha descrito para otras proteínas AGO en animales [102].

Por mucho tiempo se pensó que el ensamblado del complejo RISC y la selección de la hebra guía se llevaban a cabo en el citoplasma, bajo la premisa de que el dúplex miARN/miARN\* metilado es exportado al citoplasma por la proteína HASTY (HST) [103], homóloga a la EXPORTIN 5 (EXPO5) de humanos que exporta pre-miARNs del núcleo al citoplasma donde son procesados por DICER [104], y la observación de que HSP90 y SQN, ambas necesarias para el ensamblado del RISC, son proteínas que cumplen sus funciones en el citoplasma [96], [100], [105], [106]. Sin embargo, a pesar de presentar niveles disminuidos de miARNs, plantas mutantes en *HST* presentan una distribución normal de miARNs en núcleo/citoplasma [103], lo que sugiere que debe existir otra vía mediante la cuál se transportan los miARNs del núcleo al citoplasma.

Varios reportes demuestran que AGO1 no sólo se localiza en citoplasma, sino también en el núcleo, cumpliendo funciones en la regulación de la expresión génica y reparación del ADN dañado por UV [107]. En este sentido, se ha reportado que AGO1 y HYL1 interactúan en el núcleo, más precisamente en corpúsculos nucleares que podrían ser los *D-bodies* [56]. HYL1, por su parte, además de asistir a DCL1 en el procesamiento de los precursores de miARNs, se mantiene unida a los dúplex de miARN post-procesamiento, e interactúa con HEN1 facilitando la metilación de los dúplex [67], [94]. También se ha reportado que HYL1 cumple un rol importante en el proceso de selección de la hebra guía de los miARNs una vez que se produjo su carga en AGO1 [86], [108], posiblemente mediante la interacción entre ambas [56]. Recientemente, Bolonga y colaboradores encontraron que el extremo N-terminal sin estructura de AGO1 contenía una señal de localización nuclear (NLS del inglés *Nuclear-Localization Signal*) putativa y una señal de exportación nuclear (NES del inglés *Nuclear-Export Signal*), ambas muy conservadas en todas las proteínas AGOs de plantas [101]. En el citoplasma el NES de AGO1 no cargada se encuentra escondido, pero no así su NLS, que se encuentra expuesto permitiendo el ingreso de AGO1 al núcleo donde es capaz de interactuar con homodímeros de HSP90 generando los cambios conformacionales que le permite la carga del dúplex miARN/miARN\* metilado (Figura 3B) [97], [101]. Si bien se ha descrito a las chaperonas HSP90 como

citoplásmicas, Samakovli y colaboradores reportaron que estas contienen NLS y NES putativos en sus secuencias, y confirmaron su localización subcelular tanto en núcleo como en citoplasma [109]. Una vez cargado el dúplex en AGO1, se produce la disociación del complejo AGO1-HSP90, cambiando nuevamente la conformación de AGO1, derivando en la remoción de la hebra pasajera del dúplex, y en la exposición del NES. Así el complejo miARN:AGO1 es exportado al citoplasma vía CRM1/EXPORTIN1 para disparar el silenciamiento (Figura 3B) [101]. Dos proteínas de la familia de las  $\beta$ -Importinas, ENHANCED MIRNA ACTIVITY1 (EMA1) y TRANSPORTIN1 (TRN1), han sido asociadas al control de la carga de los miARNs en AGO1. EMA1 tiene un rol negativo sobre la carga de los dúplex miARN/miARN\* en AGO1, mientras que TRN1, mediante una interacción directa con AGO1, regula la carga de los miARNs de manera positiva [110], [111]. Si bien ambas son proteínas pertenecientes a la familia de las  $\beta$ -Importinas, ninguna tiene un rol directo sobre la traslocación núcleo/citoplasma de AGO1, dado que plantas deficientes en estas proteínas no presentan diferencias en la partición núcleo/citoplasma ni de AGO1, ni de miARNs, respecto de plantas salvajes [110], [111]. Este modelo logra explicar parcialmente como los miARNs son exportados al citoplasma, pero aún resta identificar el mecanismo preciso de carga de AGO1 y responder algunas cuestiones fundamentales sobre este proceso. Entre ellas, ¿se precisa de algún otro cofactor para la carga del dúplex en AGO1, o sólo HYL1 es suficiente? En un reciente estudio se observó una gran variedad de dúplex miARN/miARN\* metilados en el citoplasma libres, es decir, no cargados en ningún complejo RISC ni asociados a ninguna proteína [112], lo que sugiere que al menos una porción de los dúplex se estaría exportando del núcleo en un mecanismo independiente y paralelo al recientemente descrito.

## 5.5 Proteínas ARGONAUTA

Las proteínas AGO se encuentran muy conservadas en todas las eucariotas, siendo las principales efectoras del silenciamiento mediado por ARN. La cantidad de genes AGO entre especies varía significativamente, habiendo solo uno en *Schizosaccharomyces pombe* pero ninguno en *Saccharomyces cerevisiae*, cinco en *Drosophila melanogaster*, ocho en Humanos, y 27 en *Caenorhabditis elegans* [113]. Por su parte, Arabidopsis contiene 10 genes AGO, los cuales se agrupan filogenéticamente en 3 clados. El primero lo componen AGO1, AGO5 y AGO10; el segundo AGO2, AGO3 y AGO7; y el tercero AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 [26].

Todas las proteínas AGO están definidas por 3 dominios funcionales muy conservados en su C-terminal (los dominios PAZ, MID y PIWI), y una región N-terminal variable en la cual recientemente se han identificado señales de localización y exportación nuclear (NLS y

NES) [26], [101]. Los dominios PAZ, MID y PIWI están conectados por dos regiones linkers L1 y L2, que les permiten adoptar la estructura adecuada para cargar al sARN y posicionarlo correctamente sobre su transcripto blanco a silenciar. Las proteínas AGO adoptan una estructura biglobular con una ranura central en donde se carga el sARNs. En el dominio MID, un *loop* específico para nucleótidos que recubre la ranura donde se unirá el sARN, reconoce su nucleótido 5', mientras que el dominio PAZ une el extremo terminal 3' del sARNs [102], [114], [115]. El dominio PIWI una estructura similar a la de las enzimas tipo RNaseH, exhibiendo actividad de endonucleasa (*slicer*), la cual es mediada por el motivo catalítico Asp-Asp-His (DDH) [116], sin embargo, la sola presencia de este motivo no es condición suficiente para que AGO presente actividad catalítica de endonucleasa.

### **5.5.1 Las proteínas AGO en *Arabidopsis thaliana***

Dentro del clado 1, AGO1 es el principal efector del silenciamiento mediado por miARNs, y a los fines de esta Tesis, merece una revisión específica donde será tratada en mayor detalle. AGO10, también conocida como ZWILLE o PINHEAD, es el parólogo más cercano de AGO1 [26]. Su expresión está limitada sólo a algunas células de forma tejido-específica, y su función está asociada a la represión de la actividad de los miR165/166, actuando en el mantenimiento de las células meristemáticas y en la polaridad de las hojas [117]–[121]. También participa en el silenciamiento mediante inhibición de la traducción de algunos ARNms, como el caso de *AGO1* a través del miR168 [122]. Por su parte, AGO5 se expresa particularmente en megasporas en desarrollo donde debería cumplir con funciones mediadas por miARNs y siARNs necesarias para el desarrollo de los gametofitos masculinos o la especificación del tipo celular [123].

El clado 2 se compone de AGO2, AGO3 y AGO7. La actividad de AGO2 es aditiva y se solapa con la de AGO1. AGO2 participa en el silenciamiento mediante siARNs de regiones intergénicas no conservadas, pseudogenes y transposones jóvenes activos. También participa en defensa contra virus y bacterias cargando y estabilizando varios miARN\*s, y en reparación del ADN cuando se daña por estrés genotóxico [4], [124]–[128]. AGO3, pese a la proximidad filogenética que existe con AGO2, parece no tener roles importantes en la planta, aunque recientemente se la ha relacionado con la respuesta de defensa contra virus y ABA [129]. En cuanto a AGO7, también conocido como ZIPPY, su función está asociada casi exclusivamente al miR390 y a la producción de tasiARNs a partir del ARN no codificante *TAS3*, los cuales regulan a los factores de respuesta a auxinas, ARF3 y ARF4, asegurando la correcta transición de la fase juvenil a la fase adulta y el patrón adaxial/abaxial de las hojas [30], [33].

Las proteínas AGO del clado 3, AGO4, AGO6 y AGO9, cargan específicamente siARNs de 24 nt generados por DCL3. AGO4 es el efector principal de la vía RdDM, y del silenciamiento de transposones y regiones repetitivas del genoma, como ha sido introducido previamente. Además, AGO4 también carga miARNs poco comunes de 24 nt producidos por DCL3, para dirigir la metilación de los genes *MIR* que dieron origen a esos miARNs. Incluso puede sustituir funcionalmente a AGO1 y AGO7 en la biogénesis de tasiARNs [33], [130]. Se ha observado que AGO6 tiene funciones parcialmente redundantes con AGO4, en determinados *loci* blancos de metilación vía RdDM [131]. Sin embargo, análisis a gran escala han demostrado que en general, los siARNs de 24 nt cargados en AGO4, AGO6 y AGO9 provienen de distintas regiones del genoma [15]. Más aún, los patrones de expresión de estas AGOs son diferentes, indicando que cada una dispara RdDM en distintos *loci* de manera tejido-específica [15]. Por su parte, AGO8 presenta niveles de expresión indetectables en todos los estadios y tejidos de *Arabidopsis* estudiados, por lo que es considerado un pseudogen sin función alguna [26].

## 5.6 ARGONAUTA1 (AGO1). Características, funciones y localización

AGO1 es el miembro fundador de la familia de proteínas ARGONAUTA de los organismos eucariotas, ya que fue identificada por primera vez en estudios que se realizaron en plantas de *Arabidopsis* [132]. De hecho, el nombre que recibe esta familia de proteínas en todos los reinos, se deriva del nombre que se le dio a las plantas del primer alelo mutante de AGO, al cual llamaron *argonaute1* (*ago1*) por el parecido entre la forma de las hojas y los tentáculos de los moluscos cefalópodos del género *Argonauta* [132]. Posteriormente, varios nuevos alelos mutantes *ago1* nulos o hipomórficos fueron identificados, algunos de los cuales surgieron de *screenings* relacionados a la reactivación de genes silenciados post-transcripcionalmente, lo cual rápidamente la ubicó como un importante factor en el silenciamiento mediado por ARN [133]–[135]. Hoy sabemos que AGO1 cumple un rol central en el silenciamiento génico mediado por miARNs (generados por DCL1), y en la producción y actividad de los tasiARNs (generados por DCL1 o DCL4 según el caso). También participa en el silenciamiento antiviral cargando viARNs de 21 y 22 nt (siARNs derivados de virus), producidos por DCL4 y DCL2, respectivamente [128]. En general AGO1 tiende a unir preferencialmente sARNs de 21 nucleótidos con un uracilo en la posición 5' y su principal modo de acción es a través del clivaje de transcritos blancos a través de su motivo canónico de actividad RNaseH, DDH, en su dominio PIWI [136], [137]. Sin embargo, AGO1 también participa en el silenciamiento mediante represión de la traducción, posiblemente acoplado a los mecanismos de decaimiento del ARN (*RNA decay*) [138]. Una fracción de AGO1 se encuentra asociada a membranas, siendo una proteína periférica de membrana. Esta

asociación depende de la síntesis de isoprenoides, dado que una deficiencia en *Arabidopsis* de enzimas de la vía de síntesis de estos compuestos como HMG1, presentan afectado el silenciamiento mediado por miARNs, y menores niveles de AGO1 asociada a membranas [139]. Los isoprenoides son componentes claves en las membranas, y tiene un rol muy importante en la asociación de proteínas a estas [139]. Además, AGO1 fue asociada particularmente al retículo endoplasmático rugoso (RER), más precisamente a polisomas, en donde se demostró que se produce el silenciamiento génico mediante inhibición de la traducción mediada por miARNs [140].

Así como el núcleo central de la maquinaria de procesamiento de precursores de miARNs está finamente regulada a varios niveles, AGO1 no es la excepción. A nivel post-transcripcional, AGO1 es blanco del miR168, en un feedback regulatorio que mantiene los niveles de AGO1 estables [141]. Dos genes codifican para el miR168, *MIR168a* y *MIR168b*. El *MIR168a* es el que mayormente se expresa y genera miARNs de 21 nt, en tanto que el *MIR168b* presenta bajos niveles de expresión y produce iguales cantidades de miARNs de 21 y 22 nt [142]. Esta isoforma de 22 nt pueden cargarse en AGO1, clivar al mRNA de AGO1 y desencadenar la producción de siARNs secundarios dependientes de RDR6, reforzando el silenciamiento de AGO1 [32], [142]–[144]. Recientemente se reportó que el dúplex miR168a/miR168a\* contiene en su región central una estructura flexible que genera tres alternativas posibles de apareamiento entre las dos hebras. Según la conformación que adquiera el precursor pri-miR168a, su procesamiento liberará distintos dúplex con diferentes propiedades y secuencias [122]. Mientras que el dúplex simétrico de 21 nt se carga normalmente en AGO1 y silencia a su propio transcripto, la isoforma de 22 nt generada por una conformación del precursor que presenta bucles asimétricos en la región del dúplex, es preferentemente cargada por AGO10 [122] y silencia al mensajero de AGO1 por inhibición traduccional, además de inducir la producción de siARNs secundarios amplificando la represión de AGO1. Este mecanismo parece ser aprovechado por el tombusvirus para suprimir el silenciamiento antiviral mediado por AGO1, a través de la proteína viral supresora del silenciamiento por ARN, P19 [122]. HOS1, una ubiquitin E3 ligasa de respuesta a estrés, regula transcripcionalmente al loci del MIR168 controlando así los niveles de AGO1 [145]. Proteínas relacionadas a la actividad de AGO1, como las HSPs que participan en la formación del RISC, se regulan bajo condiciones de estrés, lo que deriva en el control de la vía de silenciamiento de miARNs [146], [147].

A nivel post-traduccional, la regulación de la estabilidad proteica de AGO1 también tiene un rol fundamental en el control de su homeostasis. Los primeros indicios de la regulación de AGO1 vía degradación, aparecieron en estudios de interacción virus-planta. El principal mecanismo de defensa de las plantas contra los virus está asociado al silenciamiento de ARNs virales por la maquinaria de siARNs dependientes de AGO1. Por lo

tanto, muchos virus utilizan supresores virales para neutralizar este sistema de defensa, como la proteína 2b codificada por el virus de mosaico del pepino (CMV del inglés *Cucumber Mosaic Virus*) que interacciona con AGO1 para inhibir su actividad [148]. Además, existen numerosos supresores virales que actúan en la regulación de la estabilidad de AGO1 promoviendo su degradación. La proteína F-box P0 del Polevirus actúa como supresor viral reconociendo el dominio PAZ de AGO1 y dirigiéndola a degradación [149]. Las proteínas F-box forman parte de los complejos SCF (*Skp1-Cullin-F-box proteins*) E3 ubiquitin ligase, que marcan proteínas por ubiquitinación para dirigirlas a degradación vía proteosoma 26S [150]–[152]. Posiblemente P0 secuestra a la maquinaria SCF E3 ubiquitin ligasa, imitando a las F-box endógenas de la planta, y utiliza este sistema para desactivar la maquinaria de defensa antiviral [153]. Estudios posteriores, identificaron a la proteína F-box FBW2 (del inglés *F-box WD-repeat domain-containing protein 2*) como un regulador endógeno negativo de la estabilidad proteica de AGO1 [154]. Sin embargo, se ha observado que la AGO1 poli-ubiquitinada tanto por P0 como por FBW2 no se degradan vía proteosoma 26S exclusivamente, sino también por autofagia [149], [154], [155]. Aún cuando la desestabilización proteica de AGO1 por P0 y FBW2 ha sido asociada a autofagia, también se ha visto que la ubiquitinación de AGO1 por el supresor viral P25 del virus X de la papa promueve la degradación de la proteína por proteosoma 26S [156]. Recientemente en nuestro laboratorio, observamos que CURLY LEAF (CLF) es un regulador positivo de la actividad de los miARNs mediante el control de la estabilidad de AGO1 [157]. CLF es la subunidad metiltransferasa del Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2), y regula la expresión de genes blanco mediante la tri-metilación de la lisina 27 de la Histona3 (H3K27). Encontramos que CLF reprime directamente el loci de *FBW2*, la cual ubiquitina a AGO1 para su degradación vía autofagia y/o proteosoma, como se mencionó anteriormente. Ante exposición UV, CLF previene la degradación de AGO1 permitiendo la activación de las respuestas de reparación del ADN dañado por UV, así como la regulación programada de muerte celular después de la irradiación [107], [157]. También encontramos que AGO1 es preferentemente degradado en mutantes *clf* cuando está unida a mARNs blanco. Este fenómeno se encuentra promovido cuando los mensajeros blancos no son clivables, sugiriendo que una unión prolongada de AGO1 a su blanco favorece la degradación de AGO1 [157]. Esta observación adquiere relevancia en miras de un potencial mecanismo de reversión del silenciamiento de genes por inhibición traduccional mediada por AGO1, mediante la modulación de la estabilidad de esta proteína.

## 5.7 Carga y selección de hebras del dúplex miARN/miARN\* en proteínas AGO

Una vez cargado el dúplex miARN/miARN\* en AGO1, el complejo RISC debe quedarse con la hebra correcta, denominada hebra guía (miARN), y remover la hebra pasajera (miARN\*), para finalmente dirigirse hacia su transcripto blanco y silenciarlo. La selección de la hebra en *Arabidopsis* no es un proceso al azar; contrario a esto, depende de la presencia de ciertos factores, de la estabilidad de las hebras, de la naturaleza del nucleótido en el extremo 5', y de la estructura del dúplex.

Como regla general, tanto en animales, insectos y plantas, la hebra del dúplex de miARN con el extremo 5' menos estable termodinámicamente es la que frecuentemente se carga en el complejo RISC, y por lo tanto, definida como la hebra guía, mientras que la hebra con el extremo 5' unido más fuertemente en el dúplex, es la que finalmente se remueve y degrada [102], [108], [158]–[160]. Posiblemente la interacción más débil del 5' le facilite al dominio N-terminal de las proteínas AGO la separación de las hebras del dúplex desde ese extremo para remover la hebra pasajera. Sin embargo, esta regla general está lejos de explicar la selección de hebras de todos los miARNs dado que muchos miARNs retenidos no cumplen con esta premisa. En *Arabidopsis*, el tamaño del sARN define en qué AGO se terminará cargando. Así, siARNs de 24 nt se cargan en AGOs del clado III, mientras que los miARNs y siARNs de 21 y 22 nt se cargan preferentemente en AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 y AGO10 [4].

Otro factor importante que define en qué AGO se carga el dúplex miARN/miARN\*, es la naturaleza del primer nucleótido del extremo 5' de la hebra. El dominio MID de las proteínas AGO une el extremo 5' del miARN, y tiene la capacidad de discernir cuál es el primer nucleótido en la hebra. En *Arabidopsis*, AGO1 se une preferentemente a miARNs con un uracilo (U) en su extremo 5', mientras que AGO2 selecciona sARNs con una adenina (A), y AGO5 con una citosina (C). En tanto, AGO4, AGO6 y AGO9 tienen mayor preferencia por sARNs con una A en su extremo 5' [24], [25]. La mayoría de los miARNs de *Arabidopsis* tienen un 5'-U, sin embargo, sólo algunos pocos miARNs\* tienen un 5'-U. Por su parte, AGO7 y AGO10 cargan casi exclusivamente los miR390 y miR165/166, respectivamente [33], [121]. En humanos y moscas, las AGOs encargadas del silenciamiento vía miARNs se comportan de modo similar, teniendo preferencias por los miARNs con un U en su extremo 5' [158]–[160].

La estructura de los dúplex miARN/miARNs\* también juega un rol importante en la carga y selección de la hebra guía. AGO1 por ejemplo, prefiere cargar dúplex que presenten bases desapareadas en la región central, mientras que AGO2 los prefiere sin bases centrales desapareadas. En tanto que la preferencia de AGO10 por los miR165/166 está dada por bases desapareadas internas en la base del precursor del miR166 [121], [161]. Por

otro lado, recientemente se ha reportado que dependiendo de la estructura y simetría que adopte el dúplex miR168/miR168\*, puede cargarse en AGO1 o AGO10, disparando distintos mecanismos de silenciamiento [122].

Ciertos cofactores de la biogénesis de miARNs también están implicados en los mecanismos de carga y selección de hebras por AGO1. Se ha postulado que HYL1 participa de este proceso, posiblemente direccionando al dúplex para que adopte la correcta posición en AGO1 y la hebra pasajera pueda ser removida [108]. Este proceso sería dependiente de la actividad de CPL1/2 sobre HYL1 [86]. Por su parte, durante el ensamble del complejo RISC, HSP90, asistida por SQN, generan los cambios conformacionales en AGO1, necesarios tanto para la carga como para la remoción de la hebra pasajera [96]–[98].

Si bien hace algunos años se pensaba que la hebra pasajera era un mero subproducto de la biogénesis sin función alguna, actualmente existe evidencia de que, al menos algunos miARNs\* de *Arabidopsis* se cargan establemente en proteínas AGO y tienen la capacidad de silenciar genes blanco [24]. El dúplex miR393/miR393\* normalmente carga su hebra guía en AGO1 y regula factores de transcripción ABFs de respuesta a ABA, pero durante una infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, la hebra pasajera miR393\* se carga en AGO2 y silencia a *MEMB12*, la cual tiene un efecto negativo sobre la exocitosis y así contribuye en la respuesta inmune contra el patógeno [125]. Por otro lado, se reportó que las hebras pasajeras de los miR170 y miR171a, idénticas en secuencia, tienen la capacidad de cargarse en AGO1 y silenciar a su gen blanco *SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 (SUVH8)*, del cual todavía no se conoce su función [162]. Además, se observó que esta carga ocurre de forma tejida específica, sugiriendo que ambas hebras del dúplex miR171a/miR171a\* se cargan en AGO1 en distintos tejidos, silenciando en cada uno a sus respectivos transcritos blancos [162]. Todas estas observaciones plantean nuevos interrogantes que requieren de numerosos estudios para acercarnos a entender el funcionamiento y los mecanismos inherentes a la selección de la hebra del dúplex por parte de AGO1.

## 5.8 Mecanismos de acción de los miARNs

El complejo RISC maduro, compuesto por una proteína AGO1 unida a un miARN, se une a un transcrito blanco en el citoplasma y lo silencia. El PTGS puede darse por dos mecanismos: clivaje de los transcritos y/o inhibición de la traducción [161], [163], [164]. En general, el grado de complementariedad de secuencia entre los sARNs y sus blancos define el modo de acción de los ARNs pequeños. En animales la inhibición de la traducción es el modo más común de silenciamiento por miARN, asociado a un bajo grado de complementariedad entre el miARN y su transcrito blanco [165], dado que para que se produzca el silenciamiento, solo es necesario que se aparee la región semilla del miARN,

esto es, la región que va desde el nucleótido 2 al nucleótido 8 del mismo [102]. Un alto grado de complementariedad de secuencia dispara el silenciamiento mediante clivaje de los transcritos [166]. Este concepto llevó a pensar que, en plantas, donde los miARNs y sus ARNm blanco tienen una complementariedad casi perfecta, el clivaje de los transcritos era el modo de acción predominante [161], [163], [164]. Si bien en parte esto es cierto, no significa que la inhibición de la traducción se encuentre ausente en plantas. De hecho, muchos ARNm blanco de silenciamiento por inhibición de la traducción vía miARN presentan un alto grado de complementariedad ARNm-miARN [140], [167]. Varios estudios demuestran la asociación de miARNs con ribosomas y con el retículo endoplasmático, sugiriendo que la inhibición de la traducción en plantas ocurre más comúnmente de lo que se pensaba, ya sea de forma interdependiente o complementaria al clivaje [168]–[170]. De todas formas, estudios comparativos del silenciamiento de genes blancos de miARNs entre mutantes nulos y mutantes que carecen de actividad catalítica de *AGO1*, han demostrado que la actividad catalítica de *AGO1* es necesaria para el decaimiento de la mayoría de los transcritos blancos de miARNs, sugiriendo que ambos mecanismos podrían actuar de manera complementaria [171].

El clivaje de un transcrito dirigido por un miARN, se produce en una posición precisa del ARN blanco, y depende de un alto grado de complementariedad, sobre todo entre los nt de las posiciones 10 y 11 del miARN donde *AGO1* realiza este corte [4], [7], [172]. La actividad catalítica de *AGO1* está dictada por su dominio PIWI, el cual adopta una estructura del tipo *RNaseH* y exhibe actividad endonucleasa [26]. Esta actividad no es sólo característica de *AGO1*, ya que también la presentan *AGO2*, *AGO4*, *AGO7* y *AGO10* en menor medida [24], [25], [33], [121], [124], [173]. Realizado el corte, los fragmentos del 5' y 3' del transcrito liberados se degradan mediante exonucleasas. Para el caso del fragmento 3', en *Arabidopsis*, la exonucleasa 5'-3' EXORIBONUCLEASE 4 (*XRN4*) es la encargada de degradarlos [174]. Los fragmentos 5' en *Chlamydomonas reinhardtii* son poliadenilados por la nucleotidil transferasa *MUT68*, y luego degradados por el exosoma citoplasmático [175]. En *Arabidopsis*, el homólogo de *MUT68*, *HEN1 SUPPRESSOR 1 (HESO1)* y su parálogo *UTP:RNA URIDYLTRANSFERASE 1 (URT1)*, poli-uridilan a los fragmentos 5' liberados del clivaje [176], [177]. Estos fragmentos 5' poli-uridilados son degradados por *RISC-INTERACTING CLEARING 3'-5' EXORIBONUCLEASE (RICE1)* [178], aunque también podría cumplir un rol en este proceso el exosoma citoplasmático, ya que las subunidades de sus cofactores *SUPERKILLER2 (SKI2)*, *SKI3* y *SKI8* también son requeridas para la degradación de estos fragmentos [179], así como también otros factores reportados recientemente [180]. Durante la producción de siARNs secundarios y tasiARNs, la maquinaria *RDR6/SGS3* se asocia al complejo *RISC* luego del reconocimiento de características específicas en el dúplex miARN:transcrito blanco, y estabiliza a los

fragmentos 5' y 3', evitando su degradación y permitiendo que se inicie la vía de síntesis de estos sARNs [28], [181].

A diferencia de lo que sucede en animales, en plantas, la represión traduccional se produce en menor frecuencia que la represión por clivaje [4], [161], [164], [171]. Se han identificado algunos factores necesarios para que un miARN dispare el bloqueo traduccional, entre ellos, la enzima asociada a microtúbulos KATANIN 1 (KTN1) [167], el componente de los cuerpos de procesamiento (*P-bodies*) VARICOSE (VCS) [167], la proteína GW-repeat SUO [182], y la proteína de membrana de retículo endoplasmático ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) [140]. Mutaciones en todos estos genes produce alteraciones selectivamente en el silenciamiento de ciertos blancos, que sólo se observan en los niveles proteicos, pero no así en los transcritos, sugiriendo que la inhibición de la traducción y el clivaje de transcritos son dos modos independientes de acción de los miARNs en el silenciamiento. La asociación de los complejos miARN:AGO1 a retículo endoplasmático, más puntualmente, a polisomas, y su co-localización con AMP1, sugieren fuertemente que este modo de acción de los miARNs se produce en este sistema de endomembranas [138], [140]. Ensayos *in vitro* sugieren que los miARNs podrían inhibir el inicio de la traducción sin promover la deadenilación ni la degradación del mRNA, o bloquear el reclutamiento y/o movimiento de los ribosomas [183]. Sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares precisos mediante los cuales los miARNs inhiben la traducción de sus transcritos blanco en plantas.

# **HIPÓTESIS y OBJETIVOS**

## 6 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES

A fin de cumplir sus funciones todo gen tiene que expresarse en el momento, lugar y nivel adecuado. Para lograrlo, la mayoría de los genes son regulados transcripcional y post-transcripcionalmente. Durante la última década, el silenciamiento de genes mediado por micro ARNs (miARNs) se ha convertido en uno de los principales mecanismos de regulación post-transcripcional en estudio. Aunque se sabe que los miARNs están a su vez regulados a nivel transcripcional, la regulación general de la biogénesis y la acción de estas moléculas son en gran parte desconocidos, y sólo recientemente se perfiló como un tema emergente de suma importancia. En este sentido, los mecanismos de carga de miARNs en la proteína AGO1, que actúa como un cuello de botella en la vía al converger más de 300 familias de miARNs en esta única proteína efectora, son uno de los focos de estudio más importantes en la actualidad.

La principal **hipótesis** de este trabajo, es que la carga de miARNs en AGO1 y la posterior selección de la hebra guía por el complejo efector RISC, son procesos altamente regulados por factores y/o mecanismos aún desconocidos.

El **objetivo general** de esta propuesta es identificar los mecanismos y proteínas involucrados en la regulación de la actividad de miARNs, centrándonos en las etapas de carga y selección de la hebra activa del miARN en AGO1, utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* como modelo.

### 6.1 Objetivos específicos:

- Establecer un protocolo seguro para la detección no radioactiva de ARNs pequeños en muestras vegetales.
- Diseñar y evaluar un sistema reportero doble que permita estudiar el proceso de selección de hebras de miARN retenidas en la proteína AGO1.
- Identificar genéticamente factores que dirigen la selección de la hebra de miARN y su carga en la proteína AGO1.
- Determinar los mecanismos que dirigen la selección de la hebra de miARN y su carga en proteínas AGO1 usando las mutantes obtenidas.
- Estudiar el rol de la proteína CARP9 en el proceso de carga de miARNs en la proteína AGO1.

# **CAPÍTULO 1**

**“OPTIMIZACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE  
NORTHERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE miARNs”**

## 7 CAPÍTULO 1

### OPTIMIZACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE *NORTHERN BLOT* PARA LA DETECCIÓN DE miARNs

#### 7.1 INTRODUCCIÓN

La técnica de *northern blot* fue diseñada y utilizada inicialmente con el objetivo de medir niveles de expresión de determinados genes mediante la detección de ARN. Se basa en la separación electroforética de muestras de ARN total, seguido de la transferencia de los mismos a una membrana, e hibridación de una sonda de ADN específica que se une por complementariedad de bases al ARN de interés. Esta técnica no sólo permite medir los niveles relativos de ciertos ARNs, sino también identificar los tamaños de los mismos [184].

Desde el descubrimiento de los ARNs pequeños hace dos décadas, una versión modificada de la técnica de *northern blot* ha sido ampliamente utilizada como técnica de referencia para detectar, cuantificar y determinar el tamaño de especies de ARNs pequeños. Aunque el principio de detección es el mismo que en los *northern blot*, la técnica utilizada para detectar ARNs pequeños es comúnmente conocida como *small RNA blots* para resaltar las diferencias entre los dos métodos. Esta técnica involucra la separación por tamaño de ARNs pequeños del resto de los ARNs celulares mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida, la transferencia electroforética de los ARNs hacia una membrana de nylon cargada positivamente, y la subsecuente detección utilizando sondas de ADN marcadas [185]. El pequeño tamaño de estas moléculas hace esencial el uso de geles de poliacrilamida de alta concentración (mayor al 17%), a diferencia de los geles de agarosa utilizados en las técnicas de *northern blot* tradicionales, para lograr retener estas moléculas, separarlas del resto de los ARNs celulares y, por sobre todo, lograr diferenciar el tamaño de los sARN que suele variar en un solo nucleótido.

En los últimos años, la secuenciación de alto rendimiento de bibliotecas de ARNs pequeños ha acelerado el descubrimiento de nuevos ARNs pequeños a ritmos sin precedentes. Aunque se han desarrollado algunos métodos alternativos para cuantificar ARNs pequeños [186]–[191], el *small RNA blot* todavía es la técnica de referencia para validar los datos obtenidos de secuenciaciones de alto rendimiento. En comparación con las técnicas de RT-qPCR o aquellas basadas en secuenciación, los análisis por *small RNA blot* son menos sensibles, tienen bajo rendimiento, y fallan en la diferenciación entre ARNs pequeños con una secuencia muy similar (como el caso de diferentes miembros de una familia de miARNs o especies de miARNs levemente mal procesadas). Sin embargo, es

simple y relativamente libre de artefactos, y puede ser utilizada para determinar el tamaño de los ARNs pequeños. Adicionalmente, permite la detección en simultáneo de ARNs pequeños y sus precursores, como en el caso de los pri- y pre-miARNs.

Generalmente los primeros dos pasos de este método, el gel de electroforesis y la transferencia, presentan mínimas diferencias entre los protocolos alternativos con sólo algunas excepciones [192]. Sin embargo, muchos métodos han sido descritos para el marcado de sondas y la detección de ARNs pequeños. Entre ellos, el marcado de sondas de ADN mediante la incorporación del isótopo radioactivo  $^{32}\text{P}$  es el protocolo más popular. Debido a la vida media del radioisótopo, es posible exponer la membrana con placas de rayos X por varias semanas si fuese necesario, permitiendo una alta sensibilidad y la detección de ARNs pequeños muy poco abundantes. De todas formas, el marcado con isótopos radiactivos puede ser tedioso, peligroso, y con altos requerimientos de infraestructura. Alternativamente, propuestas de marcación no radioactivas han sido desarrolladas para la detección de ARNs pequeños luego de la transferencia del gel [185], [193]–[195]. En este trabajo de Tesis, una de las propuestas fue la puesta a punto de un protocolo para la detección de ARNs pequeños (miARNs, siARNs y tasiARNs), utilizando sondas marcadas con digoxigenina (DIG) [32], [86], [162], [196], [197], técnica que posteriormente fue ampliamente utilizada a lo largo de todo este trabajo, como así también por otros miembros del laboratorio [66], [88], [157], [198]–[200]. Este protocolo conserva la sensibilidad de los métodos basados en radioactividad, es más seguro y presenta la gran ventaja de poder realizar el protocolo completo en la mesada de trabajo sin la necesidad de una infraestructura especial preparada para dicho protocolo. Sin embargo, la principal desventaja que presenta esta metodología comparada con la detección radioactiva de sARN, es la imposibilidad de reutilizar las membranas hibridadas para cuantificar más de un sARN. En las técnicas radioactivas es común medir varios sARNs utilizando las mismas membranas donde se transfirieron las muestras. Esto, además de reducir costos, permite principalmente, en los casos en los que se dispone de poca muestra, que la cantidad de ARN no sea un factor limitante cuando se requiere medir múltiples sARNs en las mismas muestras, aunque el tiempo de caída de la radioactividad de cada sonda a utilizar es de unas dos semanas aproximadamente, siendo una desventaja el tiempo de espera entre la medida de cada uno de los sARNs de interés. En los métodos radioactivos, para lograr la reutilización de las membranas, simplemente se deja decaer la radioactividad de la sonda hibridada y se vuelve a hibridar con sondas con marca fresca. Esta aproximación no es posible en la técnica no radioactiva utilizada, dado que las sondas usadas están marcadas mediante la adición covalente de una molécula de digoxigenina, la cual es estable en el tiempo. Esta desventaja fue un desafío considerable al inicio de este trabajo dado el gran número de miARNs que requeríamos medir durante el transcurso de la Tesis. Por tal motivo,

nos planteamos desarrollar un protocolo, inexistente en la literatura, para la reutilización de membranas hibridadas con sondas marcadas con digoxigenina.

## 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dada la necesidad de cuantificar niveles de miARNs en todas las líneas de trabajo llevadas a cabo en nuestro laboratorio, y en especial en las que competen al presente trabajo de Tesis, fue necesario desarrollar y poner a punto un protocolo de sARN *blot* no radioactivo para su utilización a lo largo de todo este proyecto, como una herramienta rápida, eficaz, precisa y sensible de medición de miARNs.

Fue por esto que, como primer objetivo para esta Tesis, propusimos establecer un protocolo seguro para la detección no radioactiva y reutilizable de ARNs pequeños en muestras vegetales.

## 7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.3.1 Extracción de ARN total de plantas de *Arabidopsis thaliana*

El ARN total se extrajo de plantas de 15 días de edad 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, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min en la mesada. Luego se adicionó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 12.000 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 12.000 g y 4° C y el pellet obtenido se lavó con etanol 70 % v/v. Una vez seco, el precipitado se disolvió en 30 µL de agua miliQ estéril. Por último, la calidad y concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

---

#### 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 recambió 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%), H<sub>2</sub>O hasta 100 mL.

---

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

Para la preparación de dos geles desnaturizantes de poli(acrilamida) (PAA) al 17% (m/v) se siguió la siguiente receta: en un tubo falcon de 50 mL agregar 6,375 mL de acrilamida/bis-acrilamida 40% (37,5:1), 6,3 g de urea, 3 mL de 5X TBE, y llevar a 15 mL volumen final con agua miliQ estéril. Se calentó la mezcla a 50° C hasta que la urea se disolvió y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 20 µL de APS 25% y 7,5 µL de TEMED. Armados los geles en sus respectivos soportes, se los dejó polimerizar

por 60 min y luego se los pre-corrió a 180V en 1X TBE durante 60 min. Durante la pre-corrida, 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-corrida, 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 corrida azul de bromofenol salió del gel, aproximadamente unos 90 min. Finalizada la corrida electroforética, se realizó la transferencia del ARN a una membrana de nylon cargada negativamente (Amersham Hybond-N+), utilizando el sistema de transferencia semi-seco *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), durante 1 hora a 10 V y 400 mA. Luego, se secaron las membranas y se fijó covalentemente el ARN con luz UV a 12.000 µJ/cm<sup>3</sup> en un *UV Crosslinker* (Stratagen).

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

Para la detección de los ARNs pequeños con las sondas marcadas con digoxigenina, primeramente se incubaron las membranas con solución de bloqueo por 30 min en agitación lenta para bloquear las membranas. Luego, se incubaron por 1 h 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 minutos en solución de detección. Las membranas ya equilibradas se colocaron en un folio, se aplicó solución *CSPD ready-to-use* (Roche) en la superficie de cada membrana, y se incubó 10 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).

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

### 7.3.3 **Marcación de Sondas**

Cada oligonucleótido a utilizar como sonda fue diseñado complementario a cada ARN pequeño a detectar. Para su marcación, primeramente se resuspendieron 100 pmoles de cada oligonucleótido en 10  $\mu$ L de agua miliQ estéril tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC, inactivador de enzimas RNAsas). Luego, siguiendo las indicaciones del fabricante, se utilizó el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling de segunda generación (Roche) para marcar los oligonucleótidos de la siguiente manera: a los 10  $\mu$ L de oligonucleótido resuspendido se le adicionaron 4  $\mu$ L de solución de reacción 5X (Roche), 4  $\mu$ L de solución de cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), 1  $\mu$ L de DIG-ddUTP, y 1  $\mu$ L enzima transferasa terminal, manteniendo todo el tiempo los reactivos y el tubo de reacción en hielo. Se mezcló y centrifugó brevemente. Posteriormente se incubó durante 15 min a 37° C, e inmediatamente después de transcurrido ese tiempo, se enfrió en hielo. La reacción de marcación se detuvo mediante la adición de 2  $\mu$ L de 0,2 M EDTA pH 8,0. A continuación, las sondas marcadas con DIG fueron purificadas utilizando una columna cromatográfica Bio-Gel P-6 Micro Bio-Spin™ (Bio Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, cada oligonucleótido marcado con DIG fue diluído hasta una concentración de 2,5 pmol/ $\mu$ L adicionando 18  $\mu$ L de agua miliQ estéril tratada con DEPC.

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

### 7.3.4 **Stripping de la Membrana y Re-hibridación con otras sondas**

Para la re-hibridación de sondas en las membranas ya hibridadas, primeramente se lavaron con agua miliQ para remover la solución *CSPD*. Luego se incubaron las membranas 2 veces con 25 mL de solución de *stripping* precalentada a 80° C por 60 min cada vez en agitación constante. Se lavaron 3 veces con solución 4X SSC por 15 min cada vez, y posteriormente se enjuagaron brevemente con agua miliQ estéril para continuar con la re-

hibridación de nuevas sondas a partir de la pre-hibridación con solución Church tal cual fue descrito previamente.

---

**Solución de *Stripping*:** 50% v/v formamida; 5% p/v SDS; 50 mM Tris-HCl pH: 7,4.

---

## 7.4 RESULTADOS

Para abordar los objetivos de esta Tesis, fue preciso en un inicio poner a punto la técnica de *small RNA blot*, ya que la misma iba a ser muy utilizada a lo largo de todo el proyecto como una técnica de rutina para medir niveles de miARNs en distintos tipos de muestras. Por tal motivo, se decidió optimizar y redactar un protocolo para su posterior utilización en nuestro y otros laboratorios. Para tal fin, basándonos en protocolos ampliamente utilizados [185], [193]–[195], generamos uno propio optimizando cada paso, desde cantidad de muestra hasta tiempos de exposición y revelado, en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio. Además, creamos un protocolo para la reutilización de membranas previamente hibridadas.

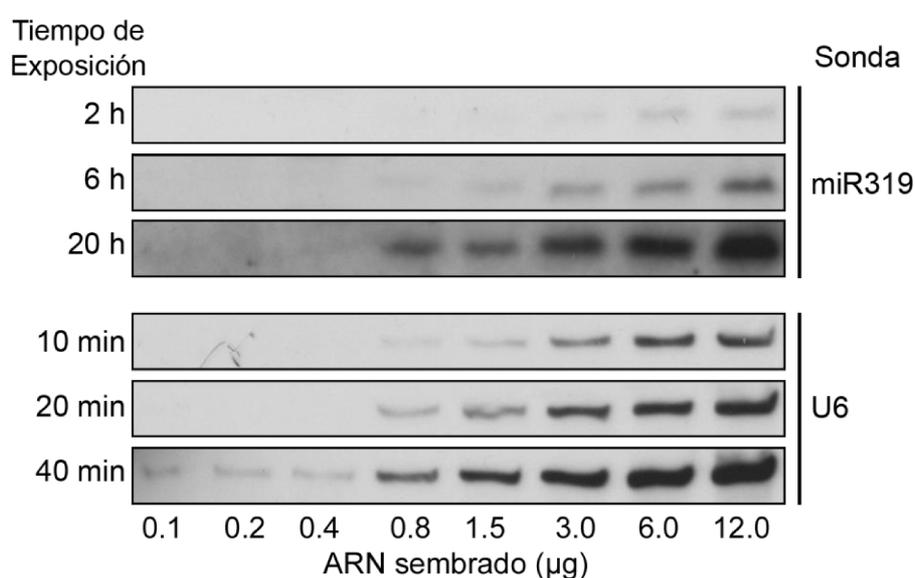
### 7.4.1 Geles de Poliacrilamida y Transferencia

Primeramente, definimos la concentración de los geles desnaturizantes de poliacrilamida a utilizar. Observamos que una concentración de 17% (m/v) para los geles, con una relación acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1 fue óptima para la resolución de miARNs y ARNs pequeños de mayor longitud como el sARN U6 (utilizado como control de carga). Cabe destacar que, a esta concentración de poliacrilamida, la banda del marcador de corrida xylene cyanol migra entre las moléculas de miARN y el sARN U6. Esto nos permite, luego de la transferencia, usar este colorante como guía para cortar la membrana en dos partes e hibridar luego la mitad inferior con sondas para miARNs, y la superior con la sonda para el control de carga U6.

Luego, definimos la concentración de ARN total estándar a utilizar para cada *blot* a realizar. Para ello, se realizaron diluciones seriadas al 50% de ARN total de plantas Col-0 de 15 días empezando con una cantidad de ARN total de 12  $\mu\text{g}$  llegando hasta 0,1  $\mu\text{g}$ . Encontramos que 100 ng de ARN total ya es suficiente para detectar U6, sin embargo, para la detección de miARNs se requiere de al menos 800 ng para un miARN de mediana abundancia como es el miR319 (Figura 4). Por otra parte, a cantidades de ARN total muy grandes, observamos una pérdida en la linealidad de la intensidad de las bandas. Por estos motivos, determinamos que 2  $\mu\text{g}$  de ARN total es una cantidad estándar adecuada para cuantificar y determinar diferencias entre distintos miARNs mediante esta técnica. En caso de tener muestras con bajas concentraciones de ARN total, y en caso de no poder optimizar la extracción de los mismos, se puede utilizar una cantidad menor de ARN total, evitando cantidades menores a 1  $\mu\text{g}$ . Por otro lado, mayores cantidades de ARN total mejoran la sensibilidad del ensayo, por lo cual se aconseja utilizar siempre cantidades iguales o

mayores a la estándar, para evitar problemas al momento de la detección de los miARNs, sobre todo con aquellos de media o baja abundancia (Figura 5A).

Otro de los parámetros a definir fue el modo y tiempo de transferencia de los ARNs a las membranas de nylon cargadas. Dado que usualmente medimos miARNs en muchas muestras al mismo tiempo, lo que representan normalmente de 2 a 4 corridas electroforéticas en paralelo, es conveniente utilizar un método de transferencia que permita realizar la mayor cantidad de transferencias posibles de una sola vez. Es por esto que se eligió el método de transferencia semi-húmeda, el cual permite realizar la transferencia de hasta 4 geles al mismo tiempo, en 60 minutos, a diferencia el método de transferencia húmeda en la que el tiempo mínimo de transferencia es de 90 minutos, y sólo se pueden transferir hasta 2 geles en simultáneo dentro de la misma cuba. De cualquier manera, no hemos detectado diferencia entre ambos métodos de transferencia (Figura 5B).



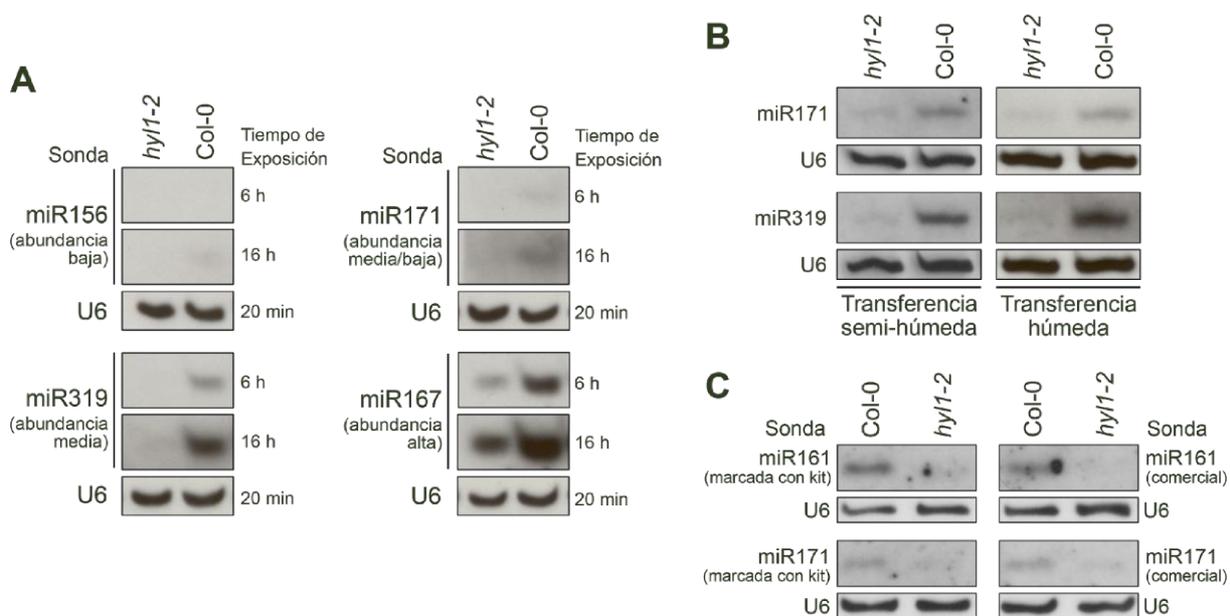
**Figura 4. Análisis de la sensibilidad de los ARN blots con sondas no radioactivas.** Cantidades crecientes de ARN total (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,5; 3,0; 6,0; y 12,0 µg), extraídos de plántulas de 15 días de *A. thaliana* Col-0 salvajes, fueron sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 17%, corridas electroforéticamente, transferidas, e hibridadas con sondas no radioactivas tal cual se explica en la sección 7.3.2. Post-incubación con el anticuerpo anti-DIG y la solución CSPD, las membranas fueron expuestas a placas radiográficas hipersensibles por diferentes períodos de tiempo (2, 6 y 20 h para la detección del miR319; 10, 20 y 40 min para la detección del sARN pequeño U6, normalmente utilizado como control de carga). Una detección clara del miR319 requiere de al menos 0,8 µg de ARN total, en tanto que con 0,1 µg es suficiente para la detección del U6.

#### 7.4.2 Sondas y Marcación con Digoxigenina

Los oligonucleótidos que se utilizarán como sondas fueron diseñados perfectamente complementarios a los ARNs pequeños a detectar. Es posible utilizar oligonucleótidos del tipo *Locked Nucleic Acid* (LNA) para aumentar la especificidad, sin embargo, en nuestra experiencia un oligonucleótido tradicional es altamente específico para cada familia de miARNs y, aunque poseen menor capacidad de diferenciación entre miembros de una

misma familia, los oligonucleotidos LNA no mejoran sustancialmente este aspecto e incrementan los costos notablemente.

Respecto a la marcación de dichas sondas con digoxigenina, ensayamos dos formas de obtenerlas. En el laboratorio hemos marcado sondas usando el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling de segunda generación (Roche) como se describe en materiales y métodos, y también hemos adquirido las sondas comercialmente marcadas. A fin de definir si ambas estrategias producen sondas de la misma calidad hemos procedido a realizar sARN blots en paralelo usando las mismas muestras, y sondas marcadas en el laboratorio con el kit mencionado o adquiridas comercialmente (Figura 5C). Dado que no se observaron diferencias significativas variando el tipo de sonda usada, decidimos utilizar sondas marcadas por el proveedor de oligonucleótidos en su extremo 3' para la detección de los miARNs, debido a la practicidad y facilidad de su adquisición, y ahorrándonos así el paso de la marcación de los oligonucleótidos con el kit previamente mencionado.



**Figura 5. Optimización de distintos pasos del protocolo de sARN blots.** Una cantidad de 2 µg de ARN total, extraído de plántulas de *A. thaliana* Col-0 salvajes, fue utilizado para la realización de distintos sARN blots tal como se describe en la sección 7.3.2. A) Se detectaron miARNs de baja, media/baja, media y alta abundancia (miR156, miR171, miR319 y miR167, respectivamente) a distintos tiempos de exposición (6 y 16 horas). Para miARNs de baja y media/baja abundancia son necesarios tiempos de exposición de 16 h, en tanto que para miARNs de media y alta abundancia con 6 h de exposición es suficiente para su detección. B) Se realizaron en paralelo transferencias semi-húmedas y húmedas según lo descrito en la sección 7.3.2, no habiéndose observado diferencias en la sensibilidad de la posterior detección de los miARNs. C) Se detectaron los miARNs miR161 y miR171 con sondas marcadas con kit según lo descrito en la sección 7.3.3, y adquiridas comercialmente, para analizar diferencias en la sensibilidad de cada una. No se observaron grandes diferencias entre ambos tipos de sondas.

### 7.4.3 Hibridización de los ARNs pequeños

Dada la diferencia de tamaño entre los miARNs y los ARN pequeños nucleares U6 utilizados como control de carga, determinamos que realizar el corte de las membranas por encima de la marca del Xileno Cianol permite separar en la mitad superior a los sARN U6 y en la mitad inferior los miARNs. Esto tiene como ventaja la posibilidad de realizar la hibridación tanto de los ARNs pequeños de referencia para el control de carga, como de los miARNs en simultáneo, acortando los tiempos del ensayo.

Previo a la hibridación de las sondas, es necesario prehibridar las membranas con el buffer *PerfectHyb Plus Hybridization*. Debido a los elevados costos de esta solución y al elevado número de *blots* que se realizan en el laboratorio, se probaron alternativas más económicas [193]. Si bien con estos buffers de hibridación se pierde una porción de la señal obtenida comparada con aquellas obtenidas con el buffer *PerfectHyb Plus Hybridization*, obtuvimos muy buenos resultados con el buffer *Church* [201], [202] (detallado en la sección 7.3.2), siendo el elegido durante la puesta a punto de este protocolo. Se definió también un tiempo mínimo de prehibridación de 60 minutos a 38° C, por debajo de este tiempo el *background* al momento del revelado será elevado, dificultando el análisis del resultado. Tiempos mayores de prehibridación mejoran la hibridación y permiten un revelado más limpio.

Por último, fue necesario determinar la concentración óptima de sonda marcada a utilizar por cada membrana a revelar. Observamos que con 5 pmoles de sonda por cada membrana e hibridando toda la noche, se obtenían buenos niveles de señal para todos los miARNs probados.

### 7.4.4 Detección No-Radioactiva de ARNs pequeños

Luego de la hibridación durante toda la noche, es necesario remover la solución con las sondas para su posterior incubación con el anticuerpo anti-DIG. Observamos que 2 lavados de unos 20 minutos con al menos 25 mL de solución 4x SSC es suficiente para obtener revelados limpios, sin *background* que interfiera con la señal emitida por las sondas. Lavados con mayor volumen de solución SSC ayudan a tener menos *background* pero a expensas de una pérdida de señal.

Los pasos de bloqueo de las membranas e incubación con el anticuerpo pueden realizarse en cajas de plástico chicas o en placas de Petri, dando vueltas las membranas cada 10-15 minutos para asegurar la distribución homogénea de la solución sobre la membrana. Una alternativa a estas opciones que hemos encontrado más práctica es la utilización de bolsas de polietileno de 8 cm de ancho, las cuales se cortan del largo de las

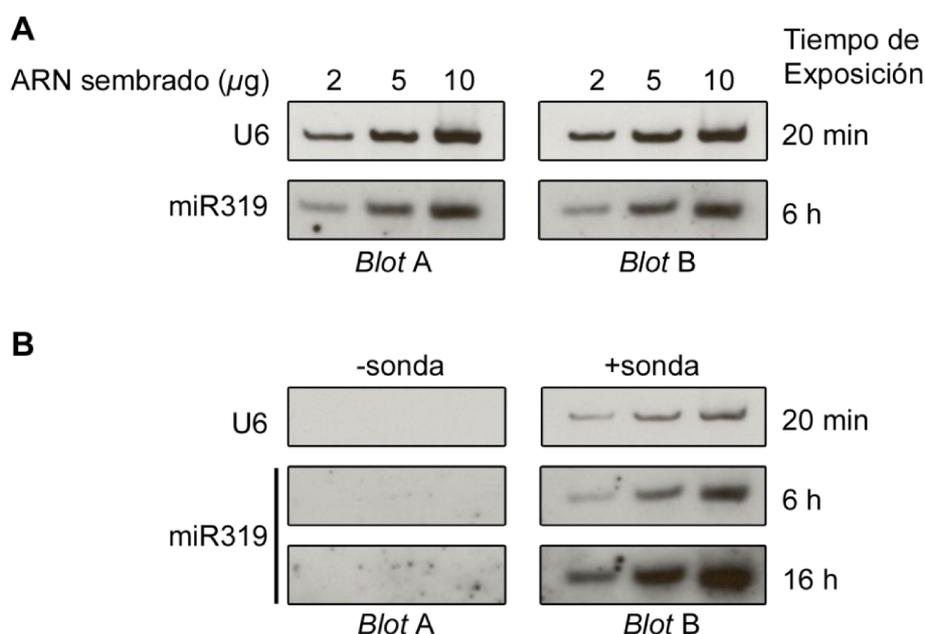
membranas, para luego sellarse con la membrana y la solución de anticuerpo en su interior. Estas bolsas, por su tamaño, permiten utilizar volúmenes de soluciones menores, ahorrando solución de bloqueo y anticuerpo. Además, al colocarlas sobre un rotor, durante el tiempo de bloqueo e incubación con el anticuerpo, agiliza las etapas de bloqueo e incubación. Es fundamental asegurar la completa disolución del agente de bloqueo en la solución de ácido maleico para evitar la aparición de puntos negros en las placas radiográficas al revelarlas. Luego de estos pasos, es necesario lavar bien las membranas, para ello determinamos que 4 lavados de 15 minutos cada uno con al menos 50 mL de solución de lavado y bajo agitación vigorosa, es suficiente para eliminar el anticuerpo sobrante y evitar que interfiera luego en el revelado.

Por último, definimos los tiempos de exposición a las películas radiográficas según las cantidades de ARN total utilizados en el ensayo y/o la abundancia del miARN analizado. En la figura 4 se observa que para una cantidad de 1,5  $\mu\text{g}$  de ARN, entre todos los tiempos probados, 10 min de exposición son suficientes para que aparezca señal en las U6, en tanto que con 6 hrs de exposición la señal del miR319 (miARN de abundancia media) es visible. Es importante aclarar que, si bien las U6 pueden dejarse exponiendo durante tiempos más prolongados, no es aconsejable superar los 40 min de exposición debido a que las señales de cada muestra se saturan y dejan de ser comparables para su posterior cuantificación y análisis. Como se mencionó anteriormente, definimos 2  $\mu\text{g}$  de ARN total como cantidad estándar a utilizar para nuestros ensayos, y para dicha cantidad de ARN, determinamos que los tiempos de exposición sobre las placas de rayos X sean: 15-20 min para las U6; 3-4 hrs para miARNs de alta expresión o miARNs artificiales expresados bajo un promotor fuerte y constitutivo; 6-20 hrs para miARNs de mediana y baja expresión, tasiARNs y siARNs endógenos (Figura 5A). Dado que tiempos de exposición excesivos producen un incremento en el *background* de las películas radiográficas reveladas, se aconseja no sobreexponer las placas.

#### **7.4.5 Stripping de la Membrana y Re-hibridación con otras sondas**

Con el objetivo de poder medir los niveles de varios ARNs pequeños en un único ensayo y así ahorrar tiempo y costos, se generó un protocolo que permite re-hibridar las mismas membranas con distintas sondas. Esto permite también, en una misma muestra medir distintos ARNs pequeños, haciendo las comparaciones entre muestras más confiables y precisas. Previo a la re-hibridación, es necesario eliminar las sondas utilizadas en primera instancia dado que la señal generada por la molécula de digoxigenina es estable en el tiempo. Después de algunos intentos fallidos o poco eficientes, y probando distintas alternativas, encontramos que con 2 rondas de 60 min de incubación de las membranas en

la solución de *stripping* (detallado en la sección 7.3.4), a 80° C y en constante agitación, es suficiente para eliminar las sondas pegadas a las membranas, sin perder gran cantidad de muestra (Figura 6B). Para descartar que parte de la señal que detectamos provenga de la primera sonda utilizada, incluimos en nuestros experimentos de puesta a punto membranas sometidas a *stripping* pero no re-hibridadas. Como se pudo observar no hubo señal detectable en este caso (Figura 6B). De todas formas, para reducir el riesgo de una detección cruzada, utilizamos siempre el criterio de hibridar primero con aquellas sondas que detectan los miARNs más escasos, y progresivamente continuar con la detección de aquellos más abundantes. Esto también es favorable dado el hecho de que en cada ronda de *stripping* se pierde una pequeña porción de los ARNs pequeños pegados a la membrana, perdiendo así sensibilidad en cada ronda.



**Figura 6. Stripping y re-hibridación de sondas en sARN blots.** A) Cantidades crecientes de ARN total fueron separadas electroforéticamente por duplicado y transferidas a membranas de nylon cargadas positivamente (*blots* A y B). Las membranas fueron hibridadas con sondas marcadas con DIG para U6 y el miR319. La detección de los sARNs se realizó exponiendo las membranas por diferentes períodos de tiempo a placas radiográficas hipersensibles. B) Las mismas membranas fueron luego sometidas a un *stripping* según lo descrito en la sección 7.3.4 y re-hibridadas con o sin las mismas sondas utilizadas en A). Las membranas fueron expuestas a placas radiográficas hipersensibles para detectar U6 y miR319. No se detectó señal en las membranas sometidas a *stripping* aún luego de largos períodos de exposición cuando no se le aplicó sonda. Se observó una mínima reducción en la señal de detección de los sARNs, particularmente visible en la detección de U6 cuando se utilizó inicialmente una cantidad de 2 µg de ARN total.

## 7.5 DISCUSIÓN

Para este trabajo de Tesis, y en general para el trabajo cotidiano que se realiza en nuestro laboratorio, fue necesario poner a punto un protocolo que permita detectar y medir los niveles de ARNs pequeños de manera sencilla, rápida y segura. Si bien se han desarrollado otras técnicas [186]–[191], el *small RNA blot* sigue siendo en la actualidad el método más utilizado, incluso para la validación de secuenciaciones de alto rendimiento.

Dentro de los *small RNA blots*, se han descrito varios métodos de marcación de sondas para la detección de los ARNs pequeños [186]–[191]. Las sondas marcadas radioactivamente son las más populares, pero su obtención y utilización es un tanto tedioso y con el riesgo que conlleva la manipulación de material radioactivo. Una alternativa son las sondas no radioactivas marcadas con DIG [193], [203], las cuales conservan la sensibilidad de los métodos radioactivos, además de ser un método más seguro y que no requiere instalaciones o infraestructuras especiales para su realización.

En este capítulo presentamos los resultados de la optimización del protocolo para su utilización en nuestro laboratorio, como así también en otros laboratorios ajenos a nuestro instituto [66], [88], [157], [198]–[200]. Logramos estandarizar todos los parámetros en cuanto a concentraciones de geles, cantidad de ARN total a sembrar en los geles por muestra, tiempos de corrida, transferencia, pre-hibridación e hibridación de las sondas, lavados, cortes de membrana para detectar en simultáneo los ARNs pequeños y U6 como control de carga del experimento, y tiempos de exposición de las membranas a las películas radiográficas para la detección de los ARNs pequeños en estudio. Esta optimización y estandarización de parámetros para esta técnica fue necesaria y muy útil a los fines de cumplir con los objetivos de este trabajo de Tesis, y de los futuros trabajos que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, dado que es la técnica que se utiliza cotidianamente para el estudio de los niveles de miARNs en mutantes con alteraciones en la biogénesis y/o acción de estos ARNs pequeños, aisladas del *screening* aquí presentado, o de *screenings* previos realizados en nuestro laboratorio.

# **CAPÍTULO 2**

**“LA PROTEÍNA INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA CARP9  
INTERACCIONA CON HYL1 PARA PROMOVER LA CARGA DE  
LOS miARNs EN AGO1”**

## 8 CAPÍTULO 2

### LA PROTEÍNA INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA CARP9 INTERACCIONA CON HYL1 PARA PROMOVER LA CARGA DE LOS miARNs EN AGO1

#### 8.1 INTRODUCCIÓN

##### 8.1.1 El miARN maduro y el ensamblado del complejo RISC

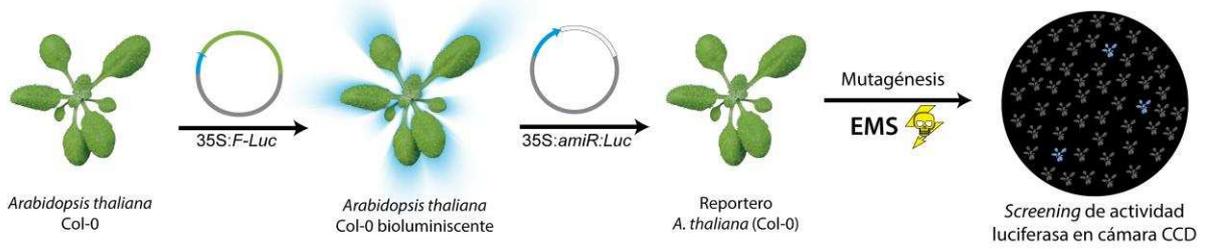
En *Arabidopsis thaliana*, la ARN polimerasa II transcribe los loci de *MIARNs* a miARN primarios (pri-miARN) que se procesan, mediante cortes múltiples y secuenciales, en dúplex de miARN maduros de aproximadamente 21 nt [65], [204], [205]. La endonucleasa DCL1, junto con la proteína de unión a ARN HYL1 y la proteína SE, reconocen y procesan los pri-miARNs en dúplex de miARN maduros [59], [64]. La evidencia indica que HYL1 permanece unido a los dúplex de miARN maduros e interactúa con HEN1, actuando como anclaje para asegurar la metilación del miARN [67], [94], [206]. Los miARNs maduros metilados son posteriormente cargados en una de las proteínas AGO, principalmente AGO1, para cumplir con sus funciones [95]. Durante mucho tiempo se creyó que la carga de los dúplex de miARNs en AGO1 y el ensamblaje del complejo RISC eran procesos citoplasmáticos [4]. Esto se basaba en la carga citoplásmica de miARNs en el complejo RISC en células de mamíferos, y en el hecho de que plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en el homólogo de la EXPORTIN-5 de humanos, HASTY (HST), mostraron una alteración en la acumulación de miARNs [28]. Sin embargo, estas plantas mutantes en *HST*, presentaban niveles reducidos de miARNs tanto en la fracción nuclear como en la citoplásmica [28], sugiriendo para esta proteína una función en la vía de silenciamiento por miARNs, pero no necesariamente en la exportación núcleo/citosol. Un reporte reciente demostró que AGO1 carga los dúplex de miARN en el núcleo y luego se exportan al citosol como complejos AGO1:miARN [101]. En este capítulo de la Tesis describimos la identificación y caracterización de CARP9, una proteína intrínsecamente desordenada de funciones hasta el momento desconocidas, como un componente en la vía de miARNs con un rol importante en el proceso de carga nuclear de miARNs en AGO1.

### **8.1.2 Identificación de nuevos cofactores de la vía de miARNs mediante un Screening genético**

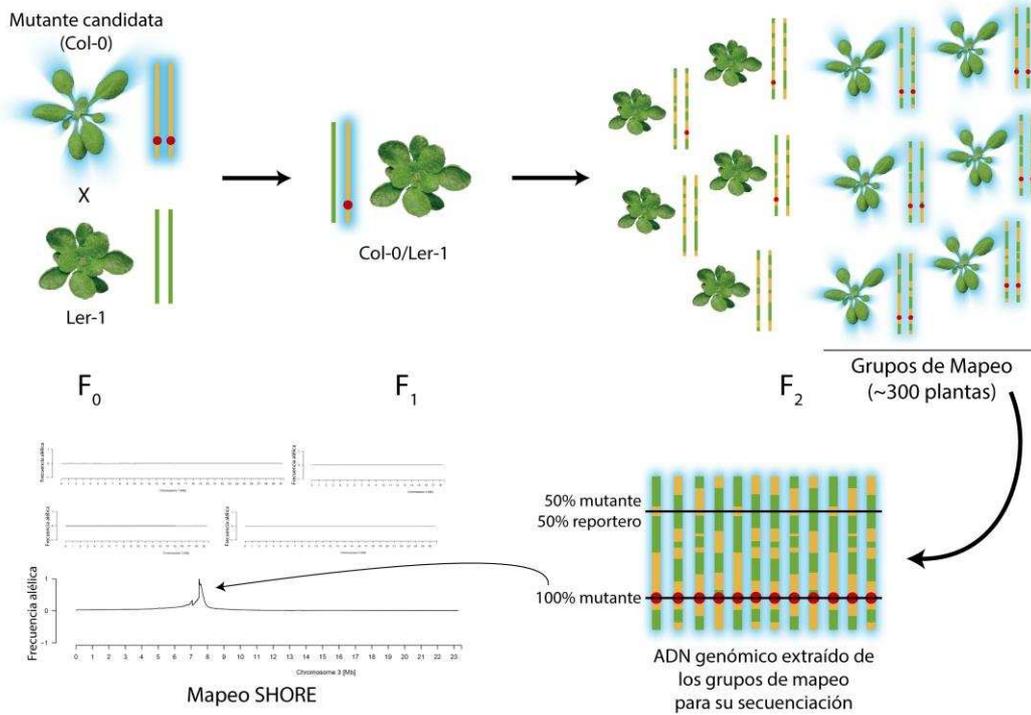
En los últimos años se han identificado numerosos cofactores que regulan diferentes etapas de la biogénesis y acción de miARNs en plantas [45]–[48]. Muchos de estos nuevos cofactores han sido identificados a partir de *screenings* genéticos diseñados en distintos laboratorios, en base a sistemas reporteros que permiten realizar análisis sobre la actividad de los miARNs de manera fácil y rápida [86], [110], [167], [207].

Por su parte, el director de este trabajo de Tesis ha ideado y generado un sistema reportero de actividad de miARNs, basado en la expresión constitutiva del gen de la *Firefly Luciferase (F-Luc)*, el cual es simultáneamente silenciado por un miARN artificial diseñado para reconocer al gen *F-Luc* (amiR:Luc) [86]. Por ende, las plantas transformadas con el sistema reportero carecen de actividad bioluminiscente, a pesar de contener el gen que codifica para la F-Luc, dado que el amiR:Luc lo mantiene silenciado vía PTGS. Estas plantas fueron sometidas a mutagénesis al azar mediada por EMS, sobre las cuales luego, se realizó el *screening* en busca de plantas con su actividad F-Luc restituida, indicador de una alteración en la vía de biogénesis y/o acción de los miARNs (Figura 7) [86]. Estas plantas, ecotipo Col-0, fueron posteriormente cruzadas con plantas de *Arabidopsis* ecotipo *Lansberg erecta* (Ler-1) para generar grupos de mapeo, los cuales fueron secuenciados, y los genes candidatos a actuar en la vía de miARN, identificados por mapeo *SHORE* (Figura 7) [208]. El mapeo *SHORE* detecta los genes candidatos basándose en la distribución de frecuencias alélicas de los polimorfismos asociados al fenotipo en base al *background* genético de los parentales. Eso se traduce en un pico en el gráfico de frecuencia alélica arrojada por el análisis *SHORE*, lo que permite finalmente identificar la región del genoma donde se aloja la mutación causal. A partir de este *screening* genético, se identificaron numerosos factores involucrados en la biogénesis de miARNs, o en la regulación de la misma, a distintos niveles [86], [157], [196], [197]. Producto de esta búsqueda genética, en el laboratorio disponemos de un gran número de mutantes de interés que todavía no han sido caracterizadas. En este capítulo del trabajo de Tesis, se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de la caracterización de una de estas mutantes.

**Screening de actividad de miARNs**



**Identificación de mutaciones por secuenciación y mapeo SHORE**



**Figura 7.** Descripción gráfica del *screening* genético con el sistema reportero basado en la actividad Luciferasa y su silenciamiento por el miARN artificial amiR:Luc

## 8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En nuestro laboratorio disponemos de una serie de mutantes, aún no estudiadas, aisladas de un *screening* genético previamente diseñado en busca de nuevos factores involucrados en la vía de biogénesis y acción de los miARNs. Dichas mutantes presentan alteraciones constitutivas en la vía de ARNs pequeños, motivo por el cual fueron denominadas mutantes *carp* (del inglés *C*onstitutive *A*lterations in *s*mall*R*NAs *P*athways). Seleccionamos una de esas mutantes, *carp9*, y nos propusimos como uno de los objetivos de esta Tesis, identificar el gen que provoca la mutación y caracterizar molecularmente a la proteína codificada, estudiando su rol en la vía de miARNs y particularmente en el proceso de carga de miARNs en AGO1.

## 8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.3.1 Plásmidos

**pENTR™/D-TOPO®:** Es un 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 permite la recombinación LR en vectores *Gateway* de destino. 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-IIS* [209] 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, y se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente el sistema reportero de doble gatillo y el ADNc de *CARP9* en plantas de *Arabidopsis* transformadas de manera estable. Confiere resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas eficientemente.

**pFK241:** Es otro vector de destino *Gateway* de la serie *pFK* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, seguido de la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (eGFP) y se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente el ADNc de *CARP9* con una fusión N-terminal de eGFP en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas de manera transitoria, y en plantas de *Arabidopsis* transformadas de manera estable. 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-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, seguido de la secuencia que codifica para la proteína mCherry y se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente el ADNc de *CARP9* con una fusión N-terminal de mCherry en hojas de *Nicotiana benthamiana*

transformadas de manera transitoria.

**pAS54:** Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, y luego del sitio de recombinación, contiene la mitad N-terminal de la secuencia codificante de la proteína mCitrine. Se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente el ADNc de *CARP9* con una fusión C-terminal de la mitad N-terminal de mCitrine en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas de manera transitoria para ensayos de BiFC.

**pAS59:** Es un vector de destino *Gateway* de la serie *pAS* derivado del plásmido *pGREEN-IIS*. Este vector posee un promotor 35S CaMV, y luego del sitio de recombinación, contiene la mitad C-terminal de la secuencia codificante de la proteína mCitrine. Se lo utilizó para expresar ectópica y constitutivamente el ADNc de *CARP9* con una fusión C-terminal de la mitad C-terminal de mCitrine en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas de manera transitoria para ensayos de BiFC.

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

**pDEST™22:** Es un vector de destino *Gateway* (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de activación de la proteína GAL4 (GAL4AD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores *pUC*, y el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia *ARS4/CEN6* de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen *TRP1* como marcador de selección en medios carentes de triptofano para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAL4AD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (*ADH1*). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

**pDEST™32:** Es un vector de destino *Gateway* (Invitrogen) que permite la fusión de una proteína de interés al dominio de unión a ADN de la proteína GAL4 (GAL4BD). Posee un origen de replicación para *E. coli* basado en el de los vectores *pUC*, y el gen de resistencia a gentamicina como marcador de selección en bacterias. Contiene la secuencia *ARS4/CEN6* de replicación y mantenimiento de bajo número de copias en levaduras, y el gen *LEU2* como marcador de selección en medios carentes de leucina para las levaduras transformadas eficientemente. El gen de interés fusionado al GAL4BD se expresa bajo el control del promotor y el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levaduras (*ADH1*). Este vector se utilizó en los ensayos de doble híbrido para el estudio de interacciones proteína-proteína.

**pEXP-AD502:** Este vector tiene las mismas características que el *pDEST™22* a excepción de los sitios de recombinación *attR* y el casete de muerte flanqueado por estos

sitios. Los sitios *attR* fueron reemplazados por los sitios de recombinación *attB* que flanquean un SMC para generar bibliotecas para la realización de *screenings* de interacción proteína-proteína. Este vector se utilizó como control de vector vacío frente a las proteínas de interés fusionadas al GAL4BD en los ensayos de doble híbrido, para descartar falsos positivos de interacción.

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

### 8.3.2 Cepas bacterianas y de levaduras utilizadas

*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$  [F<sup>-</sup>  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1] [210].

*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 [211]

*Saccharomyces cerevisiae*, MAV203 [MAT $\alpha$ , leu2-3,112, trp1-901, his3 $\Delta$ 200, ade2-101, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3<sub>UAS</sub> GAL1::HIS3@LYS2, can1<sup>R</sup>, cyh2<sup>R</sup>] [212].

### 8.3.3 Material vegetal y condiciones de cultivo

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 *carp9-2* (SALK\_032566) y *hyl1-2* (SALK\_064863) fueron adquiridas del Arabidopsis Biological Resource Centre (ABRC), Ohio State University, OH, USA. Se identificó la inserción del ADN-T y la presencia del alelo salvaje en las plantas mutantes realizando PCR sobre ADN genómico de las mismas utilizando oligonucleótidos específicos (ver Anexo). La línea reportera de actividad de miARNs Col-0 (*reporter*) ha sido descrita previamente [86], en tanto que la línea mutante puntual *carp9-1* fue aislada de un *screening* previa mutagénesis con EMS de la línea *reporter*.

Las plantas fueron crecidas en tierra, en macetas de 8 cm de diámetro y 7 cm de

altura, en condiciones de día largo (16 hs de luz / 8 hs de oscuridad) a 22-24 °C y una intensidad lumínica aproximada de 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . 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.

Alternativamente, para selección de plántulas de *Arabidopsis* por resistencia a kanamicina, o en caso de que el ensayo así lo requiera, las semillas se germinaron en placas de Petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0,5X (pH 5,7) y agar al 0,6% (p/v). En el caso de selección con kanamicina, al medio MS-Agar se le adicionó 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del antibiótico. Para germinar las semillas de *Arabidopsis* en placas, se las desinfectó con etanol 70% (v/v) por 5 min, luego por 30 min con una mezcla de hipoclorito de sodio 10% (v/v) y SDS 0,1% (p/v), y se las lavó 4 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas fueron resuspendidas en una solución de agar 0,1% (p/v) estéril, estratificadas en oscuridad a 4° C por 2-3 días, y sembradas en las placas de Petri conteniendo medio MS-Agar y antibiótico si correspondiese. El proceso anteriormente descrito se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo de aire laminar. Una vez sembradas las placas, se trasladaron a la cámara de cultivo en las condiciones de día largo descriptas previamente. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave Ficoinox, con un programa de 121° C durante 20 min.

#### **8.3.4 Construcciones genéticas y generación de líneas transgénicas en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana***

Para el ensayo de complementación de fenotipo de la mutante *carp9-1*, se amplificó la región codificante de *CARP9* (3579 pb) mediante RT-PCR de ARN de plantas de 15 días de *A. thaliana* con oligonucleótidos específicos (ver Anexo) y se clonó en el vector pENTR™/D-TOPO®, obteniéndose la construcción **pAT007** (ver Anexo). Luego se realizó la recombinación en el vector pFK209 de la serie *pGREEN IIS* obteniéndose la construcción **pAT011**, la cual fue introducida en plantas *carp9-1* heterocigotas para el alelo mutante, debido a que la transformación de las homocigotas no progresó. Para analizar la complementación del fenotipo se utilizaron plantas T1 resistentes a kanamicina, las cuales fueron genotipadas mediante secuenciación de un fragmento de ADN genómico amplificado por PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean la mutación puntual de *carp9-1* (ver Anexo).

Para obtener construcciones capaces de expresar la proteína CARP9 fusionada a las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry, se clonó mediante recombinación *Gateway* la región codificante de *CARP9* en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (pAT007) en los vectores pFK241 y pJV117 de la serie *pGREEN IIS*. Estos vectores permiten la fusión en el

C-terminal de las proteínas eGFP y mCherry, respectivamente, bajo el control del promotor 35S CaMV. De estas recombinaciones se obtuvieron las construcciones **pAT015** y **pAT016** (ver Anexo), las cuales fueron introducidas de manera transiente en hojas de *N. benthamiana* para los ensayos de localización y co-localización. A su vez, la construcción pAT015 fue introducida de manera estable en plantas de Arabidopsis, las cuales fueron utilizadas para los ensayos en los que se requirió inmunoprecipitar eGFP:CARP9 con anticuerpos anti-GFP.

Para la construcción utilizada en los experimentos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC), se amplificó la región codificante de *CARP9* obviando el codón de detención (3576 pb) por PCR con oligonucleótidos específicos (ver Anexo) utilizando como molde la construcción pAT007. Este amplicón fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO® obteniéndose la construcción pAT025 (ver Anexo), la cual fue recombinada en el vector pAS054 de la serie *pGREEN IIS*, obteniéndose la construcción **pAT026** (ver Anexo). Esta última construcción fue utilizada para co-transformar hojas de *N. benthamiana* con construcciones que expresen factores de la maquinaria de biogénesis de miARNs conocidos (ver Anexo) fusionados a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente mCitrine para realizar los ensayos de BiFC por microscopía confocal o de epifluorescencia.

Para las construcciones utilizadas en los experimentos de doble híbrido en levaduras, se clonó mediante recombinación *Gateway* la región codificante de *CARP9* de la construcción pAT007 (ver Anexo) en los vectores de destino pDEST™22 y pDEST™32, obteniéndose las construcciones **pAT019** y **pAT020** respectivamente. Las mismas fueron utilizadas para co-transformar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa MAV203 con construcciones que expresen cofactores conocidos de la maquinaria de biogénesis de miARNs clonados previamente en los mismos vectores de destino.

Los clonados en el vector pENTR™/D-TOPO® (Life Technologies) y los clonados por recombinación *Gateway* en los vectores de la serie *pGREEN IIS* y *pDEST™* (Invitrogen) utilizando la enzima LR Clonase™ (Invitrogen), fueron realizados siguiendo los protocolos correspondientes de cada fabricante.

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

La amplificación de fragmentos de ADN para clonados, análisis de mutantes insercionales y 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 (Transgen 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, 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 T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: (30 s 94° C, 30 s [Tm - 5]° C, *t* a 72° C) x 30 ciclos + 10 minutos a 72° C, donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados [Tm=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 1.000 pb a amplificar, mientras que para *Pfu* ADN polimerasa el tiempo estimado fue de 2 min por cada 1.000 pb. Los productos de amplificación fueron resueltos y visualizados en geles de agarosa.

### 8.3.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de amplificación de ADN obtenidos por PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa [213]. 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 1/1.000 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 transluminador 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®).

---

### 8.3.7 Clonados

#### 8.3.7.1 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.

#### **8.3.7.2 Digestión con endonucleasas de restricción**

Las reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción se realizaron según las instrucciones provistas por los fabricantes de cada enzima en particular. En todas las reacciones se utilizaron entre 1 y 5 U de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

#### **8.3.7.3 Ligación de moléculas de ADN**

La ligación de fragmentos de ADN se realizó utilizando 1 U de enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific) en un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{L}$ . En la mezcla de reacción se incorporaron la solución amortiguadora y los fragmentos a ligar en las proporciones recomendadas por el fabricante de la enzima. La reacción de ligación se incubó durante 16 h a 4<sup>o</sup> C.

#### **8.3.7.4 Introducción de moléculas de ADN en vectores de entrada Gateway**

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

#### **8.3.7.5 Recombinación Gateway en vectores de destino**

Los clonados por recombinación *Gateway* en los vectores de la serie *pGREEN IIS* y *pDEST™* (Invitrogen) utilizando la enzima LR Clonase™ (Invitrogen) se realizaron según las indicaciones del fabricante de la enzima. Brevemente, se mezclan 150 ng del vector de entrada con el fragmento a recombinar, 100 ng del vector destino, 0,5  $\mu\text{L}$  de LR Clonase™, y se lleva a volumen final 3  $\mu\text{L}$  con solución amortiguadora TE 1X. Se incuba a temperatura ambiente de 2 a 4 h, y se procede a la transformación de bacterias.

---

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

---

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

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

---

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

**Medio LB sólido:** Medio LB, agar 15 g/L.

---

### 8.3.7.7 Transformación de bacterias de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico

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

### 8.3.8 Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* transformadas se realizó según el método de la lisis alcalina [214]. 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 5.000 g durante 5 min, y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución I de minipreparación. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución II de minipreparación, los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de solución III y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 min antes de ser centrifugada a 13.000 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 10.000 g y temperatura ambiente, y el ADN plasmídico presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol frío. La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 h y posteriormente se centrifugó a 13.000 g por 10 min a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 70% (v/v) para eliminar las sales, y se centrifugó por a 13.000 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.

### **8.3.9 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN**

Para determinar la secuencia de ADN de las distintas construcciones realizadas, se utilizó el servicio provisto por MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Se enviaron 20 µl de plásmido a una concentración de 100 ng/µl junto con 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM). Las muestras fueron procesadas por un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron provistos en forma electrónica.

### **8.3.10 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*) [215]. Las plantas se cultivaron hasta floración en las condiciones descriptas 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, se cultivaron durante 16 horas en agitación a 28 °C células de *A. tumefaciens* en un tubo de ensayo que contenía 3 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se utilizó para inocular un Erlenmeyer que contenía 200 ml del mismo medio suplementado con los antibióticos correspondientes. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas en agitación a 28 °C). Luego se precipitaron por centrifugación a 2.000 g durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 5% (p/v) que contenía 40 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron de 30 a 60 s, 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 colocaron en posición vertical y se cultivaron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra). Una vez las vainas secas y maduras, se cosecharon las semillas y se guardaron en cámara fría (4°C) para su posterior selección. Las semillas transgénicas fueron seleccionadas en placas de Petri con 50 mg/L de kanamicina y posteriormente transplantadas en tierra. Se utilizaron 10 líneas transgénicas con eventos de inserción independientes para continuar con los ensayos que fueron necesarios.

### **8.3.11 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana***

La transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó siguiendo el protocolo descrito por de Felippes y Weigel [216]. Para ello se crecieron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés por 16 h 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, inhibiendo su función [217], [218]. Los cultivos fueron centrifugados a 2.000 g por 5 min a 4 °C, los pellets celulares fueron resuspendidos en solución amortiguadora de infiltración e incubados por 3-4 h 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 (Constr.A:p19) para los ensayos de localización celular, y 2:2:1 (Constr.A:Constr.B:p19) para los ensayos de co-localización celular y BiFC. Finalmente, se infiltró con cada combinación la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 días de *Nicotiana benthamiana* con jeringas sin aguja de 1 mL.

---

**Solución amortiguadora de infiltración:** MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM pH 5,7, acetosiringona 150 µM.

---

### **8.3.12 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 durante 15 segundos 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 16.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se trató el sobrenadante con 1 volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó por 10 min a 10.000 g y temperatura ambiente, y el ADN genómico presente en la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de isopropanol. Luego se centrifugó a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se resuspendió en 50 µL de agua miliQ estéril.

---

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

---

### **8.3.13 Análisis de ARN**

#### **8.3.13.1 Extracción de ARN total de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Las extracciones de ARN total de plantas de *Arabidopsis* se realizó según lo descrito en la sección 7.3.1.

#### **8.3.13.2 Transcripción reversa (RT)**

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando 1µg de ARN total tratado con DNaseI (Thermo Fisher Scientific) utilizando el kit de transcripción inversa RevertAid RT (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos poli-dTv (un nucleótido variable en el extremo 5' seguido de 18 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, oligonucleótidos dN6 (mezcla de oligonucleótidos de 6 pb con secuencias aleatorias) para medir por RT-qPCR los niveles de pri-miARNs, u oligonucleótidos específicos para miARNs maduros (ver Anexo) para medir por RT-qPCR de tallo-burbuja [219] niveles de miARNs.

### 8.3.13.3 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las RT-qPCR cuantitativas se realizaron en un termociclador Mx300SP (Stratagene, La Jolla, CA, USA), en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L conteniendo 1X solución amortiguadora para *Taq* ADN polimerasa (Transgen Biotech), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido específico (ver Anexo), 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 *pooles de* plántulas. Como genes de referencia fueron utilizados *ACTINA2* (At3g18780) y *ACTINA8* (At1g49240) [220] para la normalización de los niveles de expresión de los transcritos analizados. La cuantificación de miARNs por RT-qPCR de tallo-burbuja se realizó según lo descrito por Kramer y colaboradores [219]. Los promedios de triplicados biológicos y SEM se calcularon a partir de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , y el error se mostró como dos veces SEM. 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.

### 8.3.14 Análisis de proteínas

#### 8.3.14.1 Extracción de proteínas totales de *Arabidopsis thaliana*

Para el análisis de *western blot*, se extrajeron proteínas de *poools* de plantas de 15 días (3 a 5 plantas). Para ello se agregó 100  $\mu$ l de solución de extracción de proteínas por cada 100 mg de tejido molido. Luego se centrifugó durante 20 min a 16.000 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 [221], 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).

---

#### 8.3.14.2 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 [222]. Las proteínas se resolvieron en geles de separación con una concentración final de acrilamida

del 8% (p/v), con geles superiores de concentración del 6% (p/v). Los extractos proteicos a sembrar fueron mezclados con solución de siembra Laemmli 5X en una relación 4:1, respectivamente, y luego incubados por 5 min a 95 °C con el fin de desnaturalizar las proteínas de las muestras. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética en solución de corrida 1X. A continuación, las proteínas se transfirieron 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 proteico PageRuler Pretined Protein Ladder (Thermo Scientific). Terminada la transferencia, se dejó incubando toda la noche la membrana en solución de bloqueo. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a visualizar en solución de bloqueo, durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación 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 HBR (Agrisera AS09602; dilución 1:20.000) para detectar anticuerpos primarios, por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 10 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 ECL™ 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. AGO1, HYL1 y SE se detectaron usando un anticuerpo policlonal dirigido a la proteína endógena de Arabidopsis (Agrisera AS09527, AS06136 y AS09532; dilución 1:10.000 en los tres casos). Como controles de carga en diferentes experimentos se utilizaron ACTINA 8 (Agrisera AS132640; dilución 1:10.000), HISTONA 3 (Agrisera AS10710; dilución 1:10.000), o tinción con azul de Coomassie.

---

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

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

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

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

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

---

### 8.3.14.3 Ensayos de cuantificación de la actividad Luciferasa

Para las medidas de actividad Luciferasa, se cortaron 4-8 discos de 5 mm de diámetro de hojas de plantas de Arabidopsis de 2-3 semanas, los cuales fueron embebidos individualmente en una solución de D-Luciferina sal de potasio 100 mM (PJK GmbH, Alemania), y se les cuantificó la bioluminiscencia utilizando un luminómetro de placa

Fluoroskan Ascent™ FL (Thermo Scientific). Cada disco utilizado en las medidas fue una réplica biológica.

### **8.3.15 Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)**

Para los ensayos de localización subcelular, se transformaron de manera transitoria hojas de *N. benthamiana* con las fusiones de CARP9 a las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry. En tanto que para los ensayos de co-localización se cotransformó con las fusiones de CARP9 a eGFP o mCherry, y las fusiones de HYL1, SE, DCL1 y CPL1 a eGFP o mCherry, según corresponda. Pasadas 72 h de la infiltración, se llevó a cabo la visualización y captura de imágenes con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Solms, Alemania). Para tal fin, las capturas se realizaron con un lente 40x, excitando las muestras con los láseres de 488 nm y 552 nm, y recolectando la emisión a 500-530 nm y 600-630 nm para eGFP y mCherry respectivamente, agregando una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. Se utilizó una apertura del *pinole* de 1, una ganancia con valores de 700-850, y una potencia de láser que varió en un rango entre 0,5% y 20% según la proteína a visualizar. El procesamiento de las imágenes se realizó en el software Fiji [223].

Para los ensayos de BiFC, se cotransformaron hojas de *N. benthamiana* con la fusión de CARP9 al fragmento N-terminal de la proteína fluorescente mCitrine, y las fusiones de HYL1, SE, DCL1, AGO1 y HaHB11 al fragmento C-terminal de la proteína mCitrina. Luego de cumplidas las 72 h post infiltración, se procedió de la misma manera que para las localizaciones y co-localizaciones previamente descritas, 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 [223].

### **8.3.16 Tratamientos con MG132**

Los tratamientos con MG132, un inhibidor general y reversible de la degradación proteica vía proteosoma, se realizaron rociando con una solución de MG132 20  $\mu$ M plantas de 12 días cultivadas en placas con medio MS-Agar. El tratamiento se realizó por 24 h, dejando las placas en cámara de cultivo. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la toma de muestra y congelamiento de las mismas en nitrógeno líquido.

### 8.3.17 Fraccionamiento núcleo/citoplasma

El fraccionamiento núcleo/citoplasma se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por Wang y colaboradores [224]. Brevemente, se pulverizaron en mortero muestras de plantas de 15 días de edad (2,5 g) en hielo con 2 mL/g de solución de lisis suplementado con PMSF 200  $\mu$ M (solo para los fraccionamientos de proteínas). El homogenato se filtró a través de una capa de Miracloth, y la fase acuosa se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante (fracción citoplasmática) se centrifugó a 10.000 g y 4 °C durante 10 minutos para eliminar restos de sedimentos, y el sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo Eppendorf y congelado inmediatamente. El sedimento se lavó de 3 a 5 veces con 5 ml de solución NRBT y luego se resuspendió en 500  $\mu$ 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  $\mu$ 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 16.000g y 4 °C durante 1 a 3 minutos, dependiendo de la cantidad de núcleos purificados. Para la extracción de proteínas, el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución de lisis y se sonicó en un sonicador Bioruptor Pico con baño de agua (Diagenode) (10 ciclos de 30 s de pulsos a alta intensidad/30 s sin pulsos). A continuación, se centrifugó a 16.000 g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se recolectó como la fracción proteica nuclear. Para la extracción de ARN, el sedimento se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución de lisis, y luego se le agregó 1 mL de reactivo TRIzol (Life Technologies), como así también a la fracción citoplasmática, siguiendo luego el protocolo estándar de extracción de ARN ya descrito. Como controles de calidad y carga del fraccionamiento, se utilizaron un anticuerpo anti-ACTINA8 (para análisis de proteínas) y una sonda de ARNt (para cuantificaciones de ARN) como marcadores de citoplasma, mientras que Histona H3 (para análisis de proteínas) y U6 sARN (para cuantificaciones de ARN) se utilizaron como marcadores nucleares.

---

**Solución de lisis:** Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 20 mM, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 25% glicerol, sacarosa 250 mM, DTT 5 mM.

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

**Solución NRB2:** 20 mM Tris-HCl pH 7,5, sacarosa 0.25 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 0.5% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM.

**Solución NRB3:** Tris-HCl 20 mM pH 7,5, sacarosa 1,7 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 0,5% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM.

---

### 8.3.18 Ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP)

Para el ensayo de Co-IP, se inmunoprecipitó AGO1 con un anticuerpo anti-AGO1 (dilución 1:1.000) de muestras extraídas de flores transgénicas de *A. thaliana* transformadas con la construcción 35S::eGFP::CARP9 utilizando las beads magnéticas Sure Beads™ Protein-A (Bio Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detectó eGFP-CARP9 en la fracción de IP mediante *western blot* usando el anticuerpo anti-GFP ABCAM ab290. Las flores de plantas de *Arabidopsis Col-0* salvajes se incluyeron en el experimento como control negativo para ayudar a identificar la banda específica de eGFP-CARP9.

### 8.3.19 Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP de los loci asociados a eGFP::CARP9 y DCL1 se realizaron utilizando anti-GFP (ABCAM ab290, dilución 1:250) y anti-DCL1 (AS122102, dilución 1:200). Se realizó un enriquecimiento de núcleos de muestras obtenidas de 3 g de plántulas siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para el ensayo de fraccionamiento núcleo/citoplasma. Los núcleos extraídos se resuspendieron luego 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™ Proteín-A (Bio Rad) y la cantidad apropiada de anticuerpo. Después de lavar cinco veces con solución de dilución de ChIP, las beads se resuspendieron en 100 µL de solución TE 1X y se agregó 1 µL de proteinasa K 20 mg/L (Quiagen). Las muestras se incubaron a 43 °C durante 1 h y la proteinasa K se inactivó mediante una incubación a 95 °C durante 10 min. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a máxima velocidad, y finalmente se utilizaron 1,5 µL para las reacciones de qPCR. Se realizaron controles negativos con muestras en las que no se incluyeron anticuerpos específicos.

---

**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.

---

### 8.3.20 Ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP)

Los ensayos de RIP para detectar miARN o pri-miARN maduros unidos a eGFP::CARP9, HYL1 y AGO1 se realizaron siguiendo un protocolo descrito por Carbonell

[298] con algunas modificaciones y la reducción al 50% de los volúmenes utilizados. La inmunoprecipitación se realizó con 4 g de tejido (flores) utilizando anti-GFP (ABCAM ab290, dilución 1:250), anti-HYL1 (AS06136, dilución 1:500) y anti-AGO1 (AS09527, dilución 1:500). En el caso de los experimentos de RIP con AGO1, se utilizaron plantas de 15 días crosslinkadas con UV, cultivadas en placas con MS agar y tratadas con MG132 durante 24 horas, como material de partida. En todos los casos, se usaron beads magnéticas Sure Beads™ Protein-A (Bio Rad) para la inmunoprecipitación. Finalmente, se extrajo el ARN de la fracción de IP mediante una extracción estándar con TRIzol. Las cuantificaciones de ARN asociadas se realizaron por RT-qPCR como se describió previamente.

### 8.3.21 Ensayos en levaduras

#### 8.3.21.1 Co-transformación de levaduras

La co-transformación de células de las cepas *S. cerevisiae* MaV203 se llevó a cabo mediante una modificación del método de acetato de litio descrito por Gietz y colaboradores [225]. Partiendo de un cultivo saturado de levaduras en medio YPDA, incubado por 20- 24 horas a 30 °C y en agitación, se tomó un volumen de 1,5 mL del mismo el cual fue centrifugado a 5.000 g durante 1 min, y lavado con 1 ml de agua bidestilada estéril. Luego se adicionaron 240 µL de PEG 3350 50% (p/v), 30 µL de acetato de litio 1 M, 10 µL de ADNss de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/mL), y 200-400 ng de las construcciones de interés (ver Anexo) en un volumen final de 355 µL. Posteriormente, la mezcla fue incubada en un baño a 42 °C durante 40 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron, se resuspendieron en 200 µL de agua bidestilada estéril y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se sembraron 100 µL de esta suspensión en placas de Petri con el medio selectivo correspondiente, y se las incubó a 30 °C durante 3-5 días hasta la aparición de colonias.

---

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

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

---

#### 8.3.21.2 Ensayos de Doble Híbrido en levaduras

Los ensayos de Doble Híbrido en levaduras [226] se realizaron siguiendo las instrucciones descritas en el manual Yeast Protocols Handbook (Clontech Laboratories). Se tomaron 2-3 colonias de levaduras co-transformadas con las construcciones a analizar crecidas en medio selectivo SD -trp -leu, y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. La

suspensión se llevó a una DO600 = 0,5 y se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10. Se sembraron en placas con medio selectivo SD -trp -leu como control de crecimiento y SD -trp -leu -his para el ensayo de interacción entre las proteínas en estudio, y se incubaron a 30 °C durante 3-5 días hasta la observación de crecimiento de colonias. El medio de selección SD -trp -leu -his se suplementó con 5 mM de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) para reducir la autoactivación propia de algunas construcciones.

---

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

---

### 8.3.22 *Análisis bioinformáticos*

Las secuencias de proteínas similares a CARP9 de especies de plantas representativas se obtuvieron de Phytozome [227] utilizando la secuencia completa de aminoácidos de AtCARP9 como query para la búsqueda mediante BLASTP con parámetros predeterminados. Se descartaron las secuencias de proteínas con baja homología (cobertura <30%, valor E > 1.1-10). Las secuencias resultantes se alinearon utilizando el método iterativo de MAFFT G-INS-1 [228] y se recortaron automáticamente utilizando el servidor web TrimAl [229] con una fracción umbral de 0,9 espacios. Variantes de splicing fueron eliminados manualmente. El análisis filogenético se realizó utilizando el método de máxima probabilidad (ML) con los parámetros predeterminados de IQ-Tree [230] usando la prueba de razón de probabilidad aproximada Shimodaira-Hasegawalike. El árbol consenso se obtuvo con todos los grupos compatibles y se visualizó utilizando FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Para probar la conservación de CARP9 en especies de algas, se utilizaron las secuencias proteicas de AtCARP9 y CARP9 de *Marchantia polymorpha* como query para la búsqueda de BLASTP contra la base de datos no redundante del NCBI. Las búsquedas de arquitectura de dominio se realizaron utilizando InterProScan [231]. El score de aminoácidos desordenados y las regiones se obtuvieron de MobiDB [232] utilizando secuencias de proteínas completas. La calidad de la alineación se calculó con Jalview [233] utilizando la misma alineación obtenida para el análisis filogenético. La señal de localización nuclear (NLS) se predijo utilizando cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>) con un puntaje de corte de 7,0

## 8.4 RESULTADOS

En esta parte de la Tesis, se presentan los resultados obtenidos a partir de la caracterización de una de las mutantes aisladas del *screening* genético previamente descrito, la cual llamamos *carp9-1*.

### 8.4.1 Identificación de *CARP9* a partir de un *screening* de actividad de miARNs

#### 8.4.1.1 Búsqueda del gen causal de la deficiencia de miARNs en la mutante *carp9-1*

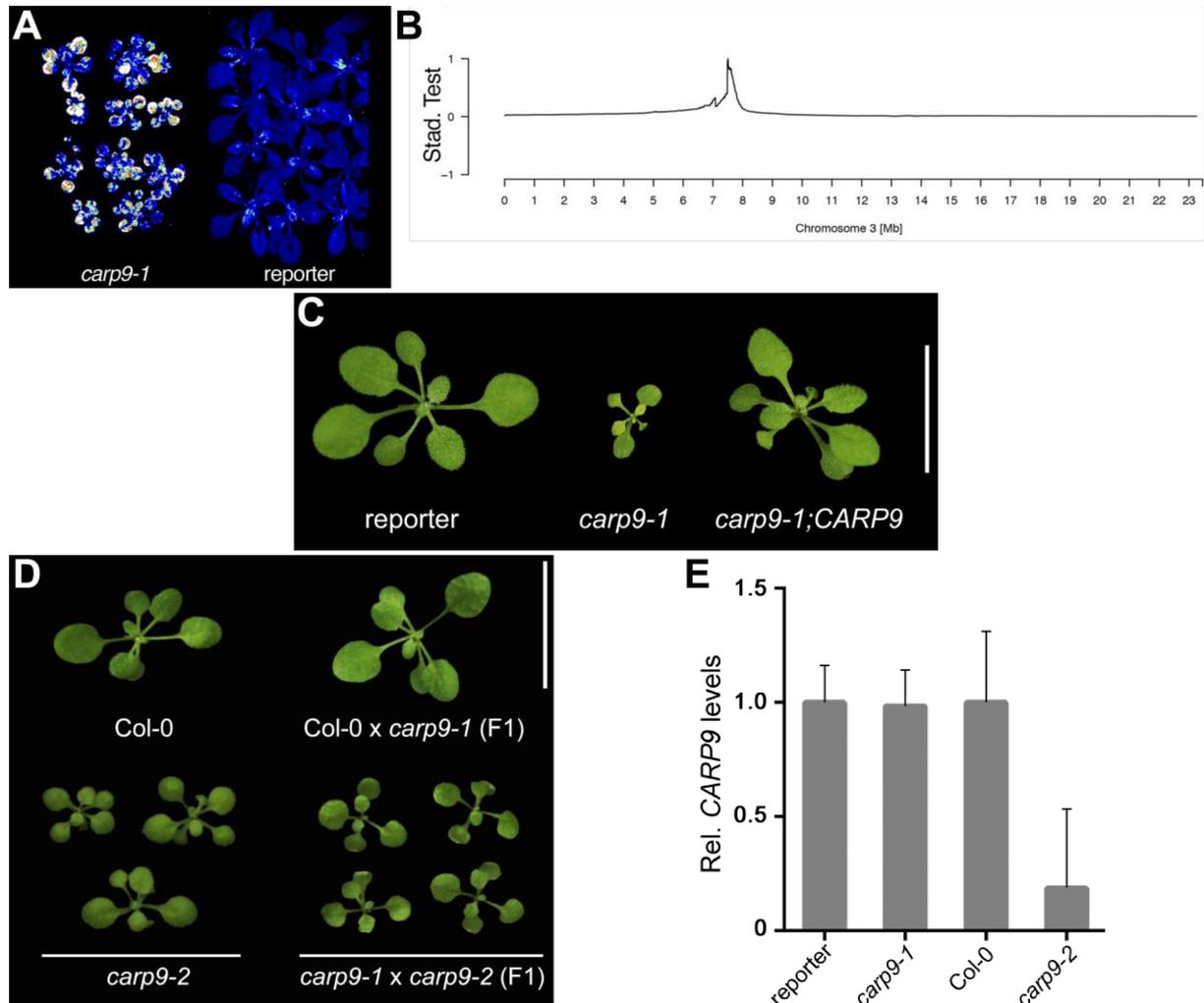
En este trabajo estudiamos una de las mutantes aisladas previamente en el laboratorio [86] que presenta alteraciones constitutivas en la vía de ARNs pequeños, *carp9-1*, por sus siglas del inglés *Constitutive Alterations in smallRNAs Pathways 9 (CARP9)* (Figura 8A). Mediante mapeo por secuenciación de genoma completo, localizamos las mutaciones causales en una pequeña región del cromosoma 3 (Figura 8B). Dentro de esta región encontramos 7 genes con mutaciones en homocigosis en el grupo de mapeo, de los cuales descartamos aquellos en los que la mutación no se encontraba en su secuencia codificante, quedándonos con 4 genes candidatos (Tabla 1, resaltados en gris). Para determinar cuál de ellos causa la falla en la vía de biogénesis y/o acción de miARNs clonamos los ADNc salvajes de estos 4 genes y los utilizamos para transformar las plantas mutantes *carp9-1* aisladas del *screening*, buscando cuál de ellas era capaz de revertir el fenotipo morfológico y molecular de la mutante.

**Tabla 1.** Resultados del análisis de mapeo SHORE de la mutante *carp9*.

| Cromosoma | Posición | Nt WT | SNP | Región de la mutación | Gen                                            | Tipo de mutación | AA WT | AA mut |
|-----------|----------|-------|-----|-----------------------|------------------------------------------------|------------------|-------|--------|
| 3         | 7486786  | G     | -   | CDS                   | AT3G21290 (dentin sialophosphoprotein-related) | Nonsyn           | D     | X      |
| 3         | 7573323  | G     | A   | intronic/noncoding    | AT3G21490 (copper ion binding)                 |                  |       |        |
| 3         | 7595872  | G     | A   | five_prime_UTR        | AT3G21560 (UDP-glycosyltransferase activity)   |                  |       |        |
| 3         | 7836772  | G     | A   | CDS                   | AT3G22200 (GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE)   | Nonsyn           | R     | K      |
| 3         | 7841502  | G     | A   | CDS                   | AT3G22220 (MKA23.20)                           | Nonsyn           | P     | L      |
| 3         | 7098888  | G     | A   | CDS                   | AT3G20350 (unknown protein)                    | Nonsyn           | S     | N      |
| 3         | 7928826  | G     | A   | intronic/noncoding    | AT3G22400 (LOX5; electron carrier)             |                  |       |        |

La transformación de la mutante con la construcción pAT011 (ver sección 8.3.4 de Materiales y Métodos), que contiene una copia salvaje del ADNc del gen AT3G21290 bajo un promotor constitutivo *35S*, revirtió completamente el fenotipo morfológico de la mutante (Figura 8C, 9B, 9C, y 9D), lo que nos indicó que la mutación en dicho gen es la causal de los fenotipos observados. Dentro de esta región, detectamos una delección de un solo nucleótido

(CDS G2464del, Chr3: 7486786, TAIR10) que causa un cambio en el marco abierto de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*), lo que resulta en un codón de *STOP* prematuro 34 codones corriente abajo de la mutación detectada (Figura 9A). Dado que este gen codifica una proteína de funciones aún desconocidas y nunca ha sido descrito, mantuvimos la denominación *CARP9* para referirnos a este gen.



**Figura 8. Identificación de la mutante *carp9-1* y búsqueda del gen causal de la deficiencia de miARNs.** A) Actividad de bioluminiscencia en mutantes *carp9-1* y plantas reporteras de 20 días de edad. La intensidad de la luminiscencia se presenta en escala de colores desde el bajo (azul) a alto (blanco). B) Resultado del mapeo *SHORE* en el cromosoma 3 de la mutante *carp9-1*. C) Reversión del fenotipo morfológico de la mutante *carp9-1* mediante la inserción de una copia de ADNc salvaje del gen AT3G21290 (*CARP9*). D) Cruza de la mutante *carp9-1* con una mutante insercional por ADN-T en el *locus* AT3G21290 (*carp9-2*) para confirmar que el fenotipo morfológico observado se debe a este gen. E) Niveles de expresión de *CARP9* en plantas *carp9-1* y *carp9-2*, y sus respectivos controles, medidos por RT-qPCR. Las barras de error muestran 2xSEM, valor de p de menos de 0.05 (\*) en una prueba t no pareada se consideraron significativos. En C) y D) las barras blancas verticales a la derecha representan 1 cm. Las plantas se fotografiaron individualmente y se montaron en un único fondo negro para facilitar la comparación y la observación.

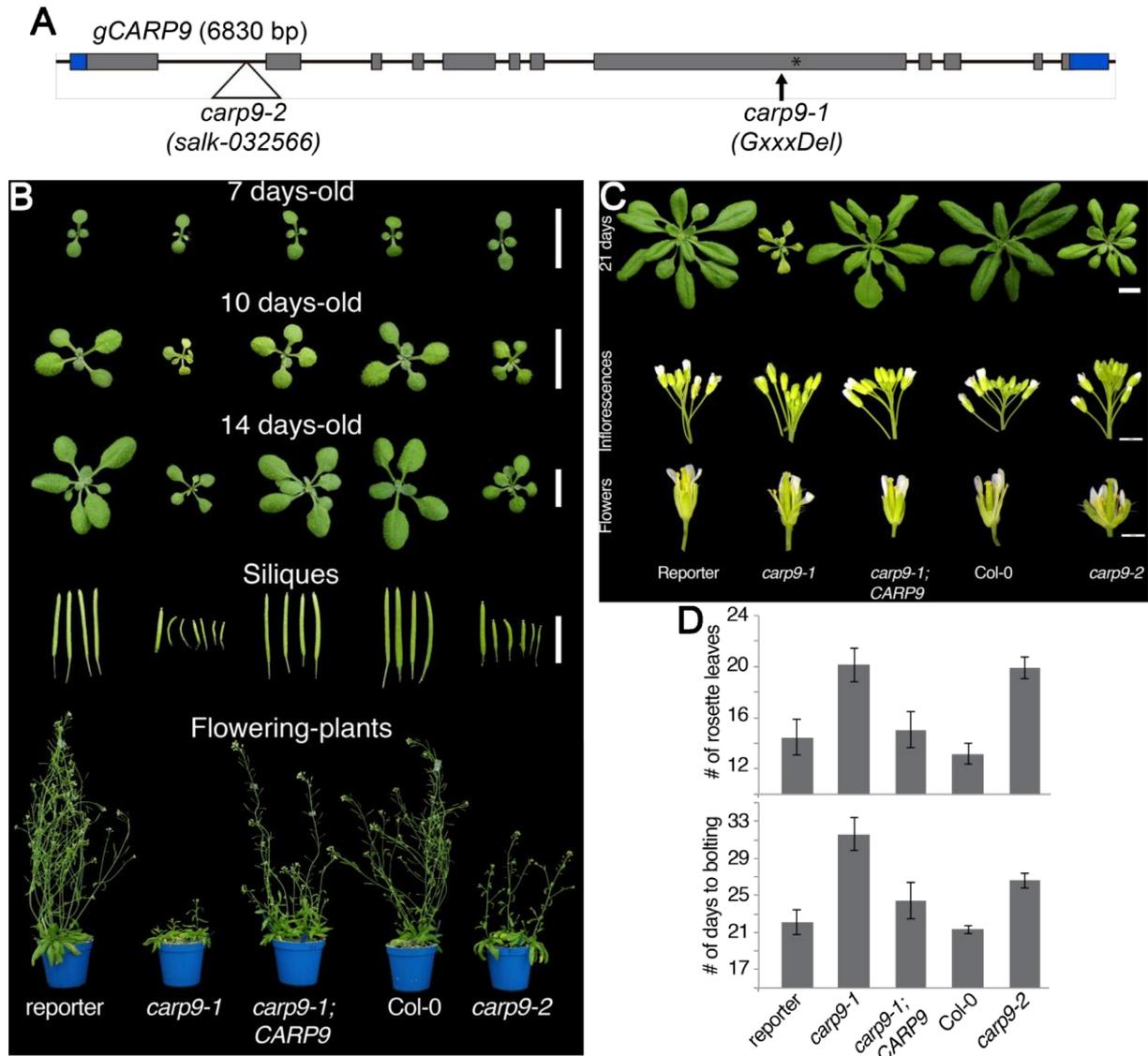
En paralelo, estudiamos una mutante por inserción de ADN-T en el mismo *locus*, la cual denominamos *carp9-2*, a fin de confirmar el rol de este gen en la vía de miARNs. Al medir

los niveles de expresión de *CARP9* en esta mutante, observamos que los mismos se encuentran reducidos respecto de plantas salvajes (Figura 8E), indicando que es una mutante del tipo *knock-down*, en tanto que en la mutante *carp9-1*, los niveles del transcripto no se ven disminuídos respecto de su control (Figura 8E), indicando en principio, que la mutación puntual no afectaría la estabilidad del ARNm, pudiendo existir en estas plantas una versión trunca de la proteína *CARP9* producto del codón de *STOP* prematuro en su secuencia. Por otro lado, realizamos la cruce de esta mutante insercional *carp9-2* con el alelo *carp9-1*, y analizamos el fenotipo de las semillas obtenidas de esta cruce. Si el locus AT3G21290 es efectivamente el responsable del fenotipo observado en *carp9-1*, esperamos que en una primera filiar de la cruce, donde ambos alelos se encuentran mutados, el fenotipo morfológico se mantenga, caso contrario, si el fenotipo se revierte al de una planta salvaje, entonces la mutación en este gen no sería la responsable del fenotipo. Tal como esperábamos, en la primera filial de la cruce *carp9-1/carp9-2* el fenotipo observado en la mutante se mantuvo, dándonos un nuevo indicio de que es AT3G21290 (*CARP9*) el gen responsable (Figura 8D).

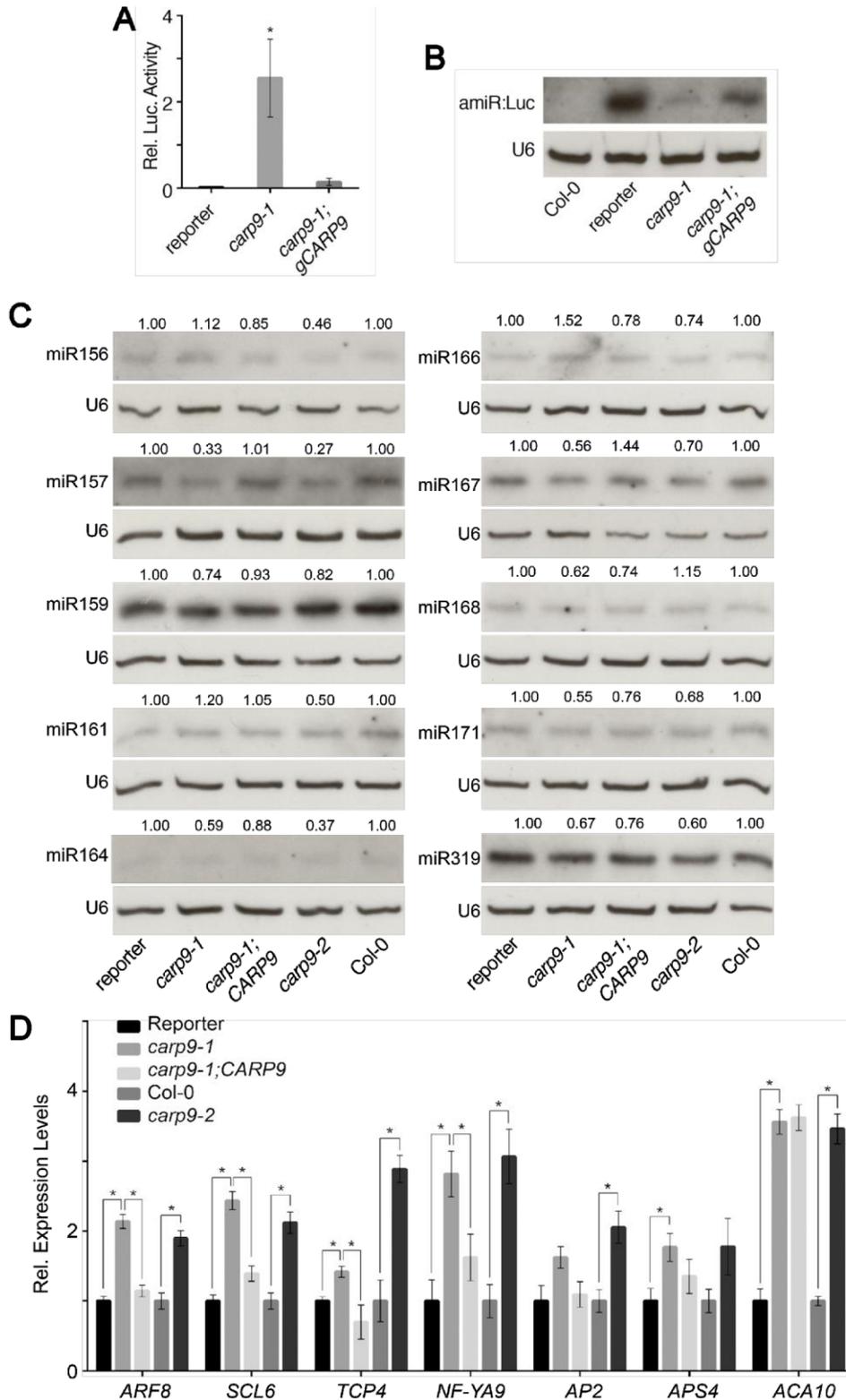
#### 8.4.1.2 Caracterización de mutantes *carp9*

En una primera instancia, realizamos una caracterización morfológica de ambos alelos mutantes de *CARP9*, y las comparamos con plantas salvajes y con aquellas que fueron complementadas con una copia salvaje del ADNc del gen. En comparación con una planta salvaje (Col-0), *carp9-2* presenta altura reducida, bordes irregulares de las hojas jóvenes, color verde pálido, silicuas más cortas y retorcidas, y un retraso en el tiempo de floración sin ningún defecto observable en la arquitectura de las flores. Todas estas características morfológicas se comparten con las plantas *carp9-1*, aunque en esta última los defectos morfológicos son visiblemente más acentuados (Figura 9B, 9C, y 9D). Por su parte, el agregado de una copia del gen salvaje a la mutante *carp9-1* logró revertir todos los defectos morfológicos descriptos.

La mutante *carp9-1* mostró un aumento en la actividad Luciferasa con una reducción importante de los niveles de amiR:LUC (Figura 10A y 10B), efectos revertidos cuando se le agregó una copia salvaje del gen. A su vez, los niveles endógenos de la mayoría de los miARNs medidos, cuantificados por sARN *blot*, se encontraron disminuídos, en mayor o menor medida, en las mutantes *carp9-1* y *carp9-2* respecto de sus controles, con un incremento en los niveles transcripcionales de los genes regulados por esos miARNs, los cuales fueron cuantificados por RT-qPCR (Figura 10C y 10D). Estas características moleculares fueron revertidas en la mutante *carp9-1* con la transformación con una copia salvaje del *CARP9*. (Figura 10C y 10D).



**Figura 9.** Caracterización de mutantes *carp9*. A) Estructura génica de *CARP9* que muestra la eliminación de un solo nucleótido del alelo *carp9-1* y los sitios de inserción de T-ADN en *carp9-2*. Las cajas y líneas sólidas representan exones e intrones, respectivamente; los cuadros grises representan la secuencia codificante, mientras que el cuadro azul muestra las regiones 5'- y 3'-UTR. Un asterisco negro (\*) marca la posición del codón de stop que resulta en un cambio en el marco de lectura provocado por la deleción de un solo nucleótido en *carp9-1*. B) Caracterización fenotípica de mutantes *carp9*, líneas control y mutantes *carp9-1* complementados por la sobreexpresión del ADNc de *CARP9* (*carp9-1*; *CARP9*). Cada fila muestra plantas o tejidos en diferentes etapas de desarrollo. C) Plantas de 21 días de *carp9-1*, *carp9-2*, control y plantas complementadas. Inflorescencias y flores de las mismas plantas. En B) y C) las barras blancas a la derecha representan 1 cm. Las plantas se fotografiaron individualmente y se montaron en un único fondo negro para facilitar la comparación y la observación. D) Análisis del tiempo de floración del control, de la mutante *carp9* y líneas complementadas crecidas en fotoperíodo de día largo, midiendo el número de hojas de roseta o el número de días hasta la aparición del botón floral. Las gráficas muestran promedio  $\pm$  SEM ( $n \geq 15$ ).

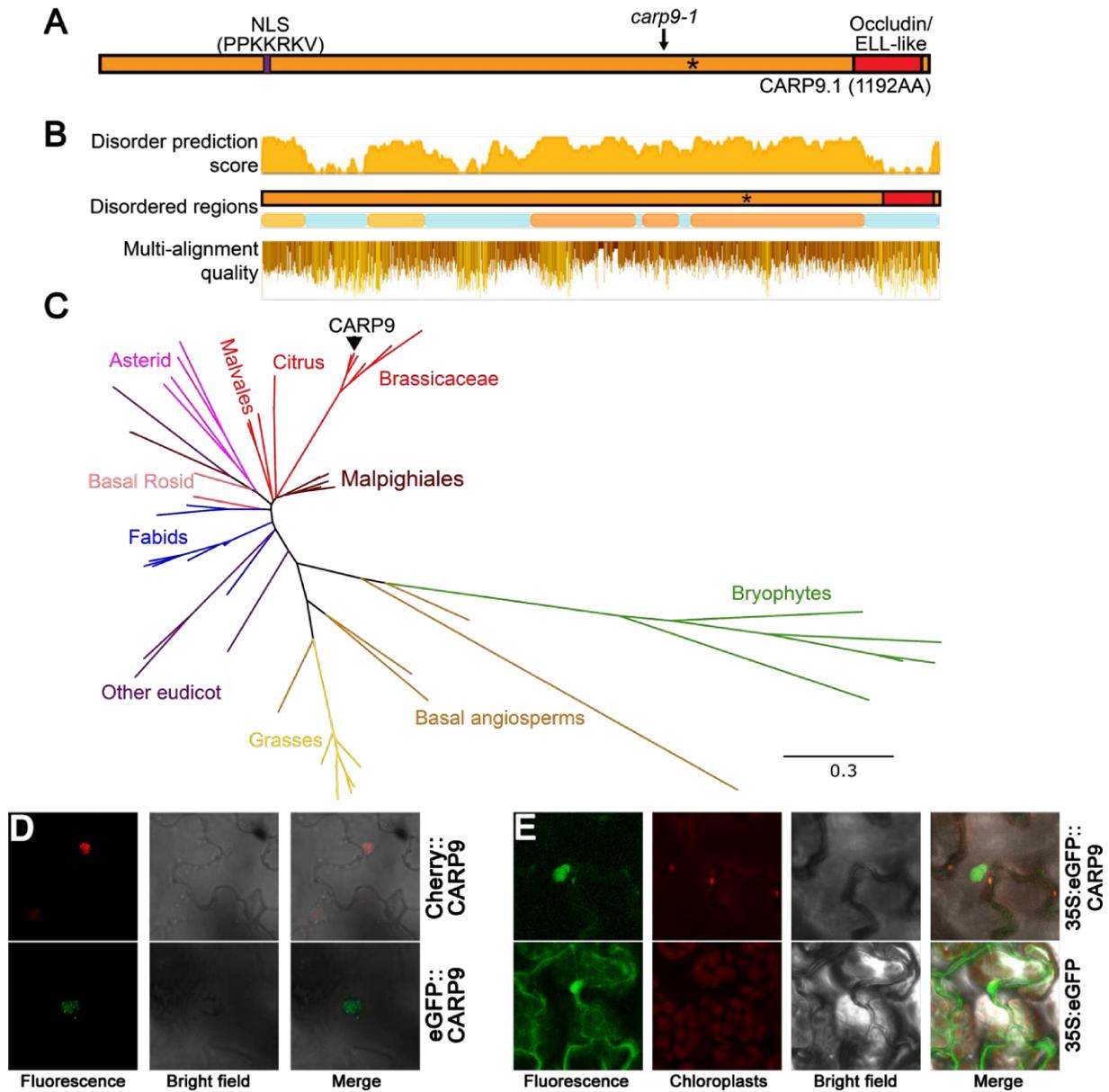


**Figura 10. Fenotipo molecular de las mutantes *carp9*.** A) Cuantificación de la actividad Luciferasa en plántulas control, *carp9-1*, y complementadas. B) ARN *blots* para detectar el miARN artificial que silencia al gen reportero de la Luciferasa. Se utilizó U6 como control de carga. C) ARN *blots*, para detectar miARNs. Se utilizó U6 como control de carga. La abundancia relativa de cada miARN, indicada arriba de cada banda, se calculó midiendo la intensidad de la banda utilizando ImageJ y relativizada a la planta de control correspondiente (reportero para *carp9-1* y plantas complementadas, y Col-0 para *carp9-2*). D) Expresión de genes blancos de miARN en plantas control y mutantes, medida por RT-qPCR. Las barras de error muestran 2xSEM, valor de p de menos de 0.05 (\*) en una prueba t no pareada se consideraron significativos.

En conjunto estos resultados nos permitieron identificar a *CARP9* como el gen responsable de la deficiencia en la vía de miARNs, y las alteraciones morfológicas observadas en la mutante identificada en el *screening* genético y estudiada en este trabajo.

#### **8.4.2 *CARP9* codifica una proteína intrínsecamente desordenada de función desconocida conservada en plantas terrestres**

*CARP9* codifica para una proteína de 1192 aminoácidos, con funciones aún desconocidas, que incluye una señal de localización nuclear (NLS) en las posiciones 238-245 según predicciones bioinformáticas (Figura 11A). Además de la NLS predicha, un análisis de la secuencia proteica en búsqueda de dominios conservados por homología reveló la presencia de un dominio similar a los dominios Occludin/ELL (*pfam* *E-value*:  $8,71e^{-27}$ , [234]) en la región C-terminal (aminoácido 1088 al 1187, Figura 11A). La mayoría de los factores de elongación de la ARN polimerasa II (ELLS) de eucariotas contienen este tipo de dominio, pero en plantas son ampliamente desconocidos [235]. Se cree que los dominios Occludin-ELL son los encargados de mediar la interacción con otras proteínas [236], [237]. Por fuera de este dominio, se observó, mediante predicción de estructura, que *CARP9* es una proteína altamente desordenada (61,1% de secuencia desordenada, Figura 11B) [238]. Curiosamente, de acuerdo con la base de datos InterPro, parece que las proteínas con largas regiones desordenadas seguidas de un dominio Occluding, son exclusivas de plantas [231]. En este sentido, un análisis de la conservación de *CARP9* en plantas, basado en un BLASTp, indicó que esta proteína está altamente conservada en especies embriofitas (Figura 11C). Encontramos también ortólogos de *CARP9* en briófitas, linaje basal temprano de las embriofitas, y su ausencia en algas ancestrales, lo que sugiere que *CARP9* ha evolucionado en plantas terrestres. Usando el método de Máxima Probabilidad, realizamos un análisis filogenético de estas proteínas (Figura 11C). Obtuvimos un árbol filogenético totalmente coherente con la evolución de las especies de plantas, indicando además, que en la mayoría de las especies, como en *Arabidopsis*, los ortólogos de *CARP9* corresponden a genes de copias únicas. El alineamiento proteico reveló que las regiones conservadas incluyen tanto el dominio Occludin/ELL como la región desordenada (Figura 11B). Además, los parálogos de *CARP9* también son predichos como proteínas desordenadas en todas las especies. Esto sugiere que ambas partes de la proteína, el dominio Occludin/ELL y la región desordenada, podrían ser importantes para su función molecular.



**Figura 11. Análisis de conservación de CARP9 en todo el reino vegetal.** A) En la parte superior, estructura génica de CARP9 como se muestra en la Figura 8B. En la parte inferior, la estructura de la proteína CARP9, en púrpura, está marcada la señal de localización nuclear putativa (NSL). El dominio de Occluding/ELL está marcado en rojo. B) Superior y medio, puntaje de desorden y regiones en la secuencia de aminoácidos de *AtCARP9* según MobiDB [232]. Debajo, la calidad del alineamiento de aminoácidos de los genes *CARP9-like* utilizando el software Jalview [233], las posiciones se basan en la secuencia completa de *AtCARP9*. C) Filogenia de genes similares a CARP9 en embriofitas. El árbol consenso se generó usando el método de Probabilidad Máxima. Los colores representan diferentes linajes de especies de plantas, referenciados en la figura. *AtCARP9* se resalta con una flecha negra. D) y E) Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización nuclear de CARP9. En D) CARP9 fusionada a eGFP y mCherry en hojas de *N. benthamiana* transformadas de manera transitoria. En E) CARP9 fusionada a eGFP en hojas de *A. thaliana* transformadas de manera estable. Plantas de *A. thaliana* transformadas con la construcción 35S::eGFP fueron utilizadas como control de la localización subcelular de la proteína eGFP sola.

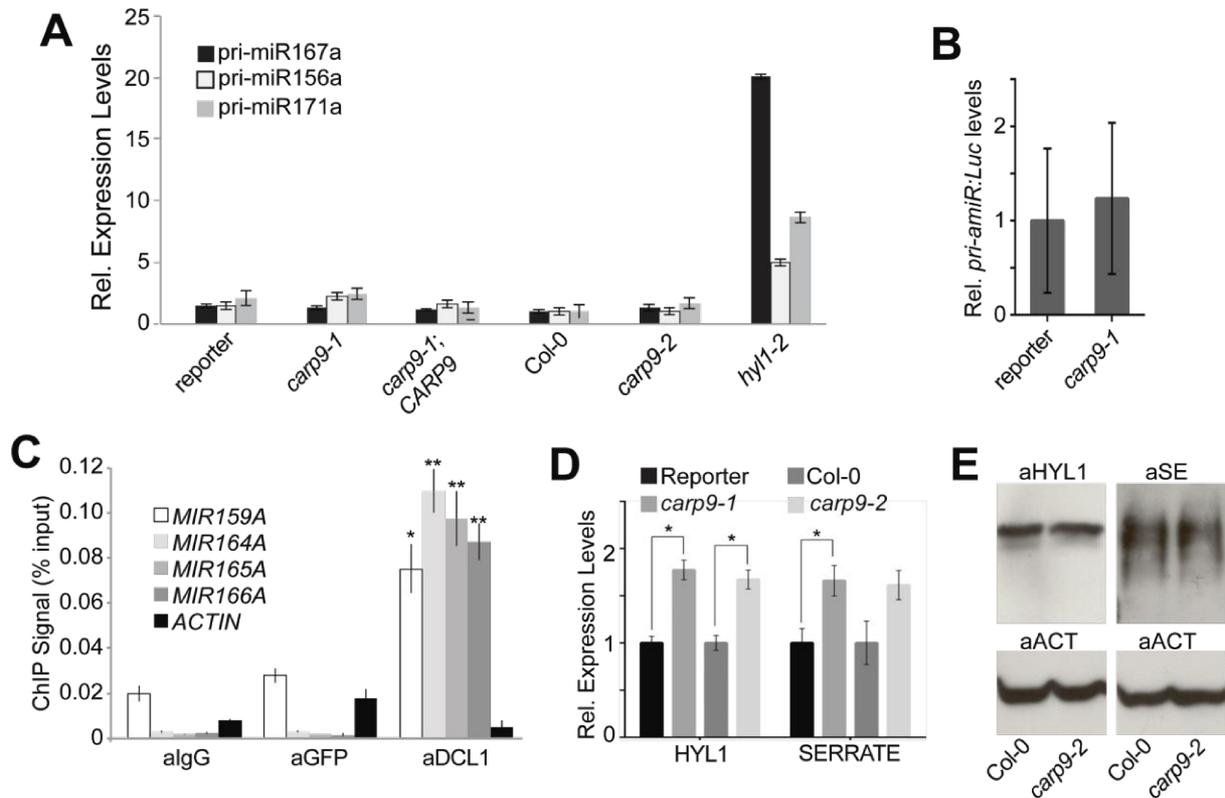
Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP) demostraron ser importantes para el reconocimiento molecular [239] y funcionan como anclaje en muchas interacciones proteicas [240]. A su vez, son particularmente abundantes en orgánulos sin membrana

celular como corpúsculos nucleares o gránulos de estrés [241]. Por otra parte, se ha demostrado que las regiones intrínsecamente desordenadas son importantes en las interacciones proteína-ARN, que median interacciones específicas y no específicas [242], [243]. Recientemente, se demostró que la proteína desordenada FLL2 de *A. thaliana*, estaba localizada en corpúsculos nucleares promoviendo la separación de la fase líquido-líquido [244]. En concordancia con estos resultados, el estudio por microscopía confocal de CARP9 fusionada con las proteínas fluorescentes eGFP o mCherry, reveló que se localiza en el núcleo, particularmente en corpúsculos nucleares de naturaleza desconocida (Figura 11D). Dichas entidades nucleares podrían reflejar perfectamente orgánulos líquidos específicos o los bien conocidos *dicing bodies* (orgánulos subnucleares de procesamiento de miARN).

#### **8.4.3 CARP9 no actúa como un factor de elongación en loci de MIARNs**

Es posible que la reducción en los niveles de los miARNs en las mutantes *carp9* sea consecuencia de una reducción en los niveles de transcritos de los genes que codifican algún factor de la biogénesis de miARNs o incluso una reducción de la transcripción de los genes *MIARNs*. Esta es una hipótesis válida basada en el dominio ELL de CARP9, que puede sugerir un papel regulador de la transcripción de esta proteína. Para probar esta hipótesis, cuantificamos por RT-qPCR los niveles de transcripción de pri-miARNs y genes que codifican los componentes centrales de la maquinaria de biogénesis de miARN. A diferencia de la mutante *hyl1-2*, donde los pri-miARNs están claramente sobre acumulados, *carp9-1* y *carp9-2* presentaron niveles normales de los precursores de miARNs (Figura 12A), incluso no se observaron mayores variaciones del pri-miR:Luc en la mutante *carp9-1* respecto de su control *reporter* (Figura 12B). Entre todos los genes probados que codifican proteínas relacionadas con miARN, observamos un leve pero significativo incremento en los niveles de transcripción de HYL1 y SE (Figura 12B), un resultado que se opone a nuestra hipótesis de que CARP9 actúa como un factor de elongación sobre estos genes, pero que es coherente con una respuesta de retroalimentación a la falta de actividad de miARNs en las mutantes. Ensayos de *western blots* mostraron que los niveles proteicos de HYL1 y SE permanecen estables en las mutantes a pesar del cambio sutil en los niveles de transcripción (Figura 12C). Se ha demostrado que DCL1 es reclutado a genes *MIARNs* por la acción de factores de elongación [55]. Por lo tanto, es posible que CARP9 no afecte la transcripción de los genes *MIARN* en sí, sino que permita el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento hacia estos *loci*. Para ello, inmunoprecipitamos una versión de CARP9 fusionada a eGFP y evaluamos su capacidad de interactuar con los *loci* de *MIARNs* mediante qPCR (ChIP-qPCR). A diferencia de DCL1, utilizado como control positivo, CARP9 no apareció asociado a los genes *MIARNs* (Figura 12D). Estos resultados en conjunto,

sugirieron que CARP9 no está actuando como un factor de elongación controlando la actividad de los miARNs.



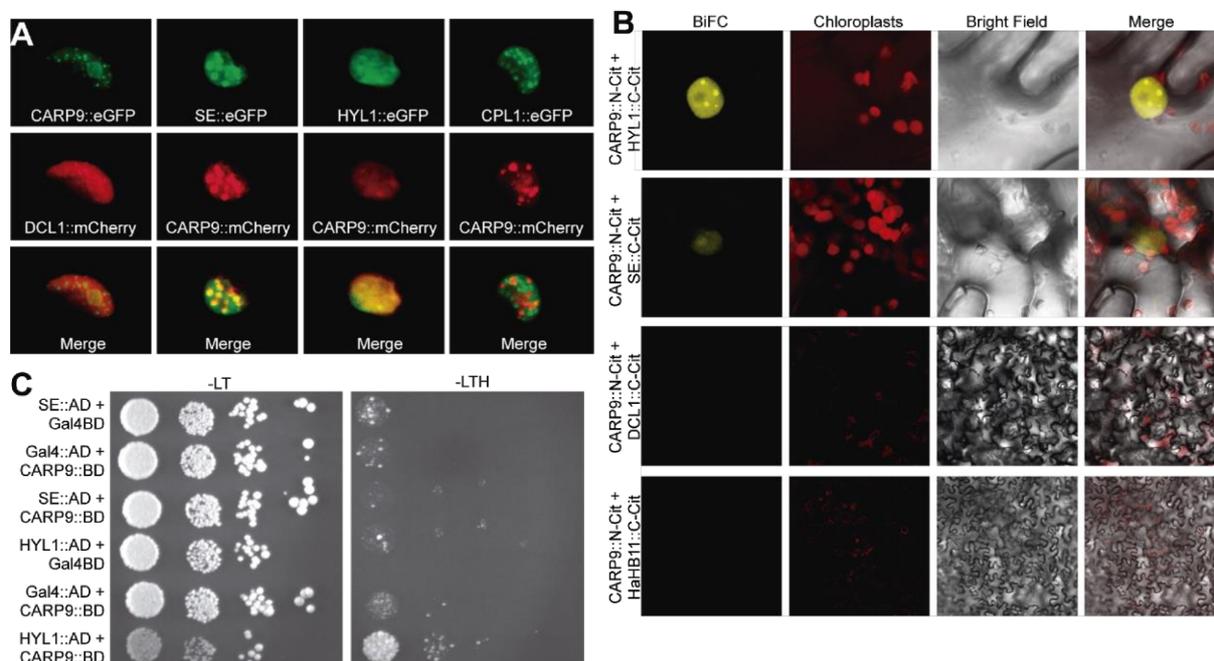
**Figura 12. CARP9 no regula transcripcionalmente a genes *MIARN* ni a factores de la biogénesis.** A), B) y D) Expresión de pri-miARNs endógenos y pri-amir:Luc, HYL1 y SE en plantas control y mutantes, medidos por RT-qPCR. C) Experimento de ChIP utilizando anticuerpos anti-GFP, anti-DCL1 o anti-IgG en plantas que expresan una versión de CARP9 fusionada a eGFP para detectar la asociación de dichas proteínas con los loci *MIARNs*. Los oligos utilizados para la amplificación se enumeran en la tabla del anexo utilizados en reportes previos (Fang et al., 2015). ACTINA se utilizó como gen control no unido por CARP9 o DCL1. D) Cuantificación de HYL1 y SE por *western blot* en muestras extraídas de plantas mutantes *carp9-2* y Col-0. La detección de ACTINA se utilizó como control de carga. En A), B), C) y D) las barras de error muestran 2xSEM, valor de p de menos de 0.05 (\*) en una prueba t no pareada se consideraron significativos.

#### 8.4.4 CARP9 interactúa con HYL1, pero no con otros factores del procesamiento de los pri-miARNs

Alternativamente, también es posible que CARP9 esté directamente implicado en el procesamiento de pri-miARN, basado en su localización subnuclear en corpúsculos nucleares similares a los *D-bodies* (Figura 11D y 11E). La expresión transitoria de CARP9 fusionado a una proteína fluorescente en hojas de *N. benthamiana* seguido de microscopía confocal nos indicó que CARP9 co-localiza con SE y HYL1 en corpúsculos nucleares, pero no co-localiza, o solo parcialmente, con DCL1 y CPL1 (Figura 13A). Este resultado es llamativo ya que SE, HYL1, CPL1 y DCL1 co-localizan en corpúsculos nucleares denominados *D-Bodies* [56], [57], los cuales se creían únicos. Nuestro resultado sugiere que

pueden existir más de un tipo de “*D-Bodies*” dentro del núcleo con composiciones proteicas variables.

Para analizar si, además de co-localizar, CARP9 tiene la capacidad de interactuar con HYL1 y SE, realizamos ensayos de complementación de la fluorescencia bimolecular (BiFC). Los resultados obtenidos mostraron reconstitución de la fluorescencia cuando CARP9::N-Citrine se enfrentó con HYL1 y SE, pero nuevamente no con DCL1, fusionadas con el fragmento C-terminal de la proteína fluorescente Citrina (Figura 13B). Estos resultados son consistentes con lo observado previamente en las co-localizaciones subcelulares. El factor de transcripción nuclear HaHB11 [245] se utilizó como control negativo para el ensayo.



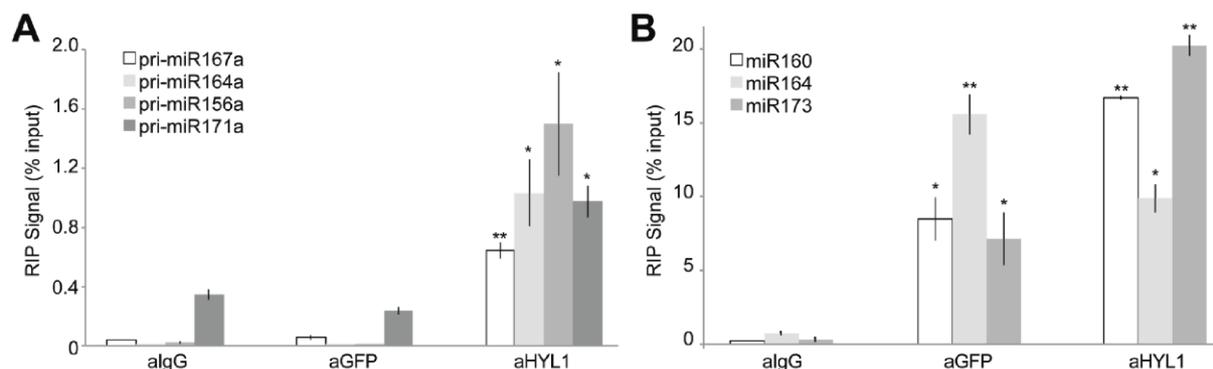
**Figura 13. CARP9 interacciona con HYL1.** A) Imágenes de microscopía confocal que muestran simultáneamente la localización de CARP9 con DCL1, SE, HYL1 y CPL1 en hojas de *N. benthamiana* transformadas de manera transitoria. F) Ensayo de BiFC en células de *N. benthamiana* que muestra la interacción de CARP9 con HYL1 y SE. G) Interacción de CARP9 con HYL1, pero no con SE, según lo detectado por los ensayos de doble híbridos en levaduras. Dominio de activación GAL4 (AD); Dominio de unión al ADN GAL4 (BD); -LT, medio sin leucina y triptófano; -LTH, medio selectivo sin leucina, triptófano e histidina. Cada columna muestra una dilución en serie de 1:10.

Dado que los ensayos de co-localización y BiFC indican la proximidad de la proteína, pero no necesariamente confirman interacciones directas entre las proteínas analizadas, realizamos un ensayo de doble híbrido en levaduras para evaluar la interacción directa proteína-proteína entre CARP9, HYL1 y SE. En este ensayo encontramos que sólo HYL1 puede interactuar con CARP9, mientras que no fue el caso para SE (Figura 13C). La interacción de HYL1 con SE, ampliamente descrita y estudiada [62], puede explicar la señal positiva detectada por los ensayos de microscopía junto a CARP9, indicando que las

tres proteínas se encuentran muy próximas entre sí pero no necesariamente interaccionando entre ellas de manera directa. Estos resultados sugieren, en conjunto con la incapacidad de CARP9 de interaccionar con DCL1, que CARP9 podría estar interaccionando con HYL1 en el núcleo en alguna etapa posterior al procesamiento de pri-miARNs durante la biogénesis de miARNs.

#### **8.4.5 El complejo CARP9-HYL1 se forma en una etapa posterior al procesamiento de los pri-miARNs**

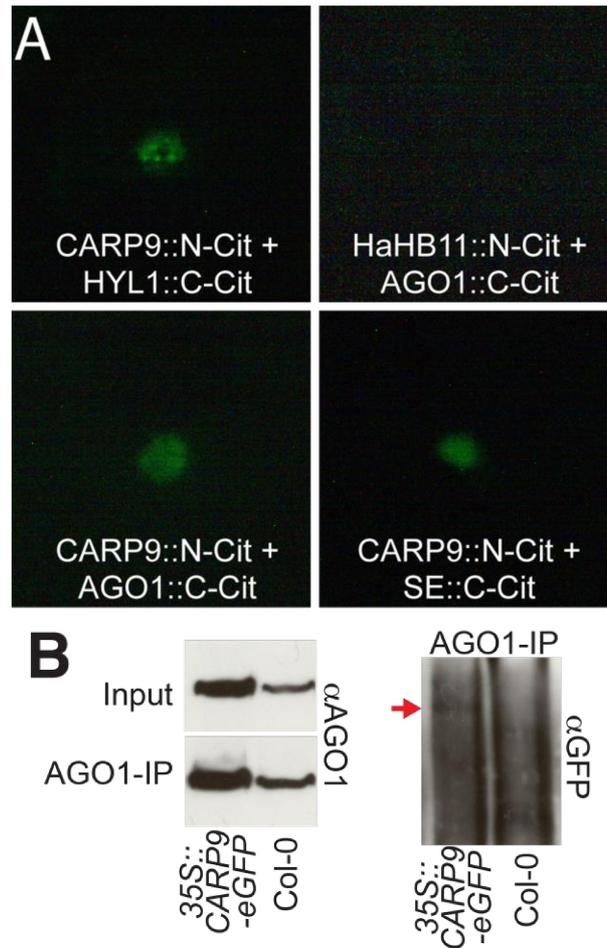
A fin de evaluar si CARP9 interacciona con HYL1 en una etapa temprana o tardía de la biogénesis de miARNs, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de ARN asociado a proteínas (RIP-qPCR) para cuantificar la asociación de CARP9 a precursores de miARN o miARN maduros. Este ensayo consiste en inmunoprecipitar una versión de CARP9 fusionada a eGFP con anticuerpos anti-GFP en plantas Col-0 transgénicas; HYL1 con anticuerpos anti-HYL1 como control positivo; y un anticuerpo anti-IgG como control negativo del ensayo. Los ARNs inmunoprecipitados junto a las proteínas en cuestión, fueron utilizados para detectar por RT-qPCR pri-miARNs y miARNs maduros asociados a las mismas. A diferencia del RIP contra HYL1, no detectamos pri-miARNs asociados a CARP9 (Figura 14A), confirmando una vez más que CARP9 no estaría actuando en las etapas tempranas de la biogénesis de miARNs. Sin embargo, encontramos abundantes miARNs maduros asociados a CARP9, al igual que a HYL1, en las muestras inmunoprecipitadas (Figura 14B). Esta asociación de CARP9 con miARNs maduros es, probablemente, a través de la interacción con HYL1, ya que se sabe que esta proteína interactúa con los miARNs [67]. El hecho de que HYL1 es capaz de unirse tanto a pri-miARN como a los miARNs maduros [67], pero que CARP9 solo pueda interaccionar con miARNs maduros, sugiere que la interacción CARP9-HYL1 ocurre luego del procesamiento de los precursores de miARNs. Esto se condice con los niveles inalterados de pri-miARNs detectados en los alelos mutantes *carp9-1* y *carp9-2*, que tienden a acumularse en mutantes de procesamiento [246], sugiriendo que esta proteína no es activa durante la biogénesis de miARNs (Figura 12A y 12B).



**Figura 14. CARP9 está asociado a miARNs maduros, pero no a pri-miARNs.** A) pri-miARNs y (B) miARNs maduros asociados con CARP9 cuantificados por RIP-RTqPCR en muestras extraídas de plantas que expresan una versión de CARP9 fusionada a GFP e inmunoprecipitadas con un anti-GFP, anti-HYL1 o anticuerpos anti-IgG. Los valores se dan como un porcentaje de la señal detectada por qPCR en las muestras *input*. En todos los paneles que incluyen experimentos de qPCR, las barras de error muestran 2xSEM, se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05 (\*) o 0,01 (\*\*) en una prueba t no pareada.

#### 8.4.6 CARP9 interacciona con AGO1 en el núcleo y modula la carga de miARNs

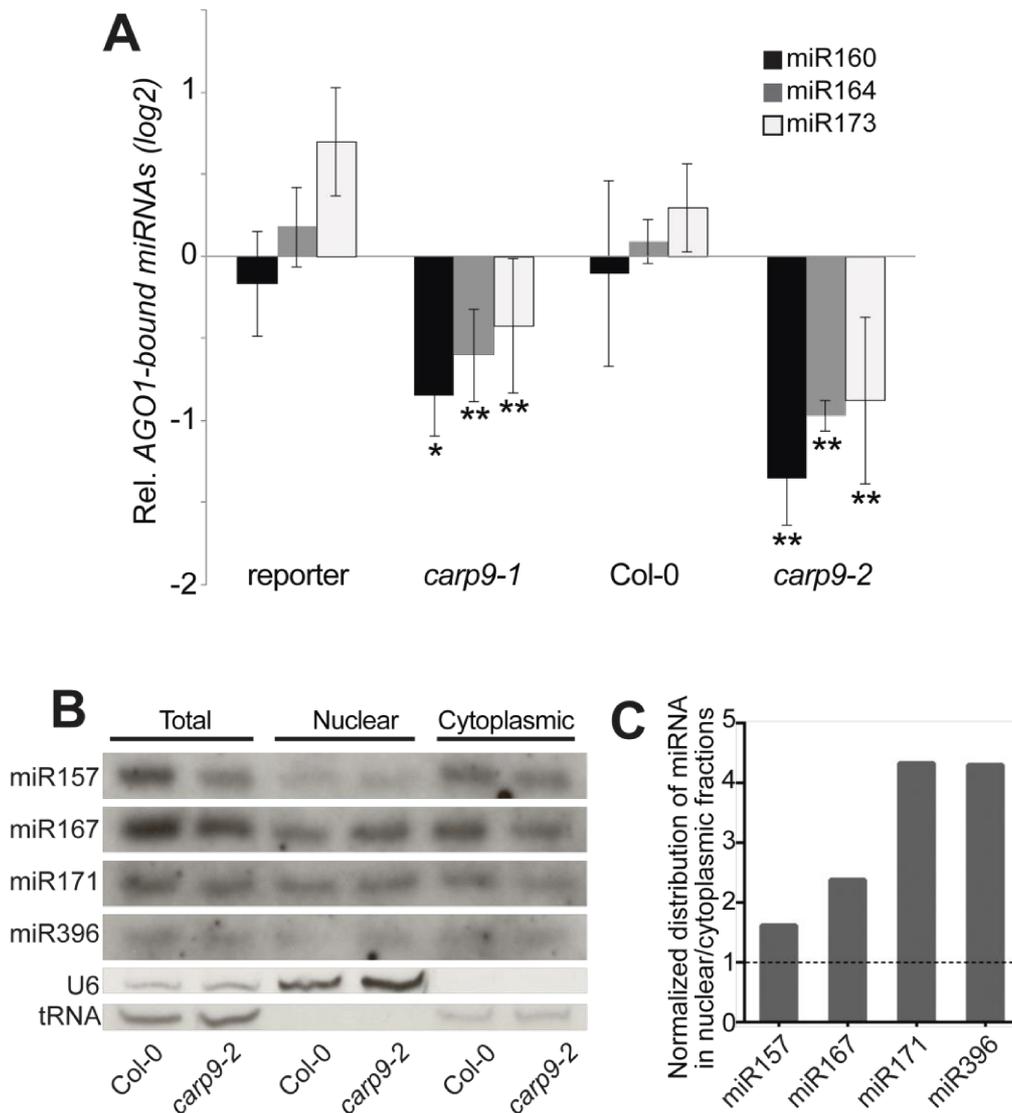
La posible interacción entre CARP9 y HYL1 post-procesamiento de miARNs, y su localización nuclear, sugieren que esta proteína podría afectar uno de los pasos de la vía de miARNs que se dan en el núcleo corriente abajo de la biogénesis, como la carga nuclear en AGO1 recientemente reportada por Bologna y colaboradores [101]. Para explorar esta posibilidad, probamos la capacidad de CARP9 para interaccionar con AGO1 mediante ensayos de BiFC y co-inmunoprecipitación (Co-IP). Para los ensayos de BiFC, enfrentamos nuevamente a CARP9 contra HYL1 y SE, como controles positivos de interacción/cercanía de las proteínas, y a AGO1 contra HaHB11 como control negativo de interacción para la construcción de AGO1. Para los ensayos de Co-IP, se utilizaron extractos proteicos de plantas de *Arabidopsis Col-0* que expresan constitutivamente a CARP9 fusionada a GFP, y se inmunoprecipitó a AGO1 con anticuerpos específicos, para finalmente realizar la detección de eGFP::CARP9 por *western blot*, utilizando un anticuerpo anti-GFP. Ambos experimentos demostraron que CARP9 tiene la capacidad de interaccionar con AGO1, y que esta interacción se da en el núcleo, como se observa en el ensayo BiFC (Figura 15A y B).



**Figura 15. CARP9 interacta con AGO1.** A) Ensayo de BiFC en células de *N. benthamiana* que muestra la interacción de CARP9 con AGO1, usando HYL1 y SE como controles positivos, y HaHB11 como control negativo. B) Ensayos de Co-IP. Las muestras de proteína extraídas de plantas Col-0 WT o plantas transformadas con un 35S::eGFP:CARP9 se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo antiAGO1, luego se detectó la interacción AGO1-CARP9 usando un anticuerpo anti-GFP. La flecha roja indica la banda correspondiente a la fusión eGFP-CARP9 ausente en el control negativo Col-0.

Dado que CARP9 es capaz de interactuar con HYL1, miARNs maduros y AGO1 en el núcleo, es posible que esta proteína esté involucrada en el proceso de carga de miARNs en AGO1. Para evaluar esta posibilidad, realizamos ensayos de RIP-qPCR inmunoprecipitando AGO1 en plantas salvajes y mutantes *carp9-2* y medimos los niveles de miARNs asociados. Sorprendentemente, observamos una marcada disminución de los niveles de miARNs asociados a AGO1 en las plantas mutantes en relación con las plantas salvajes (Figura 16A). Este resultado sugiere que CARP9 estaría participando en la carga de miARNs en AGO1 en el núcleo, posiblemente actuando como anclaje entre HYL1 y AGO1, permitiendo el traspaso del miARN maduro entre proteínas. Esta reducción en la carga de AGO1 podría potencialmente explicar los niveles alterados de miARNs que observamos en las mutantes *carp9* (Figura 10C). La deficiente carga de miARNs en AGO1 en las mutantes *carp9* también fue evidente cuando medimos miARNs maduros en fracciones nucleares y citoplasmáticas. Ensayos de sARN blot revelaron que la porción nuclear de los miARNs

maduros está enriquecida en *carp9-2*, mientras que la porción citoplasmática se encuentra en niveles muy bajos, sugiriendo que los miARNs no cargados quedan preferencialmente retenidos en núcleo (Figura 16B y 16C).



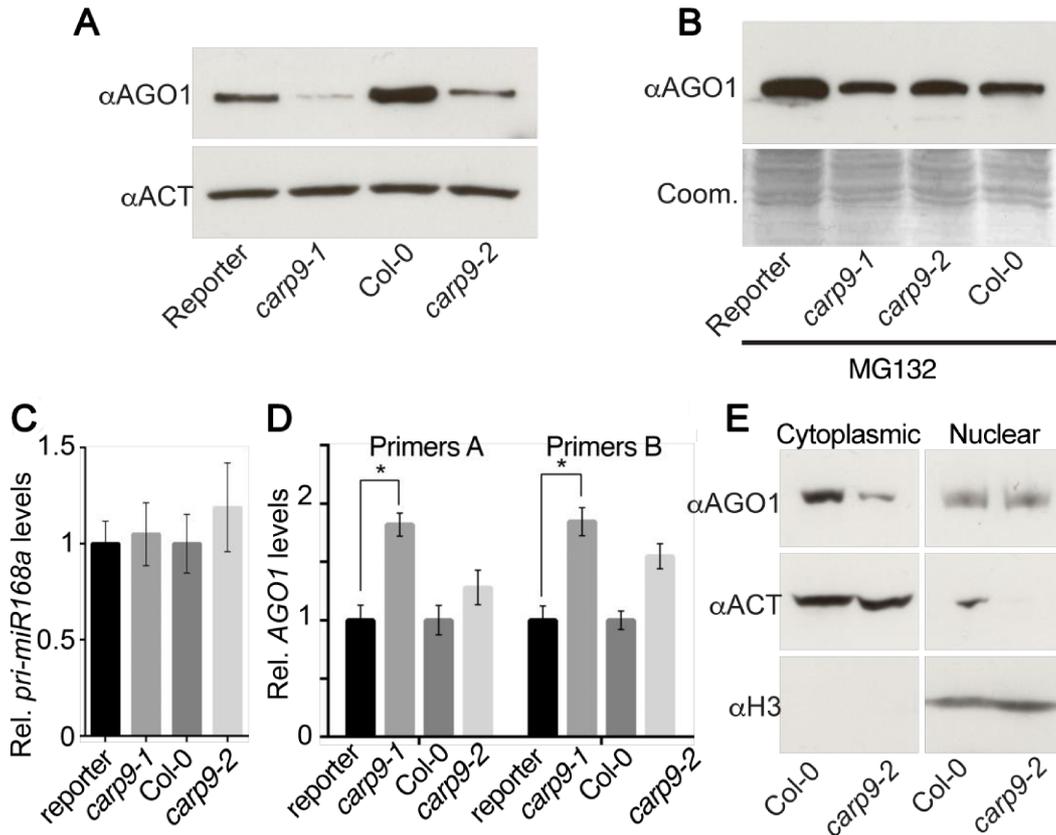
**Figura 16. AGO1 es incapaz de cargar miARNs en las mutantes *carp9*.** A) Cantidad relativa de miARNs maduros unido a AGO1 medidos por Stem-loop RT-qPCR de muestras inmunoprecipitadas utilizando un anticuerpo anti-AGO1. Para ambas mutantes, los niveles de miARN se expresaron como relativos a su control correspondiente. Las barras de error muestran 2xSEM y los valores de p inferiores a 0,05 (\*) o 0,01 (\*\*) en una prueba t no pareada se consideraron significativos. B) Ensayos de *northern blots* para detectar miARNs en diferentes fracciones subcelulares. La cuantificación de U6 y los ARNt se utilizaron como control de carga y para controlar la pureza de las fracciones nucleares/citoplasmáticas. C) Cuantificación de la distribución de miARN medida en (B). La intensidad de la banda se cuantificó mediante ImageJ y se normalizó mediante el control de carga correspondiente. Las distribuciones de los miARNs en las fracciones nucleares/citoplasmáticas se expresaron como relativas a Col-0 (marcadas como una línea discontinua).

#### 8.4.7 Los niveles proteicos de AGO1 están disminuidos en mutantes *carp9*

Curiosamente, los ensayos de Co-IP AGO1-CARP9 revelaron niveles aumentados de AGO1 en las plantas que sobreexpresan la construcción eGFP:CARP9 (Figura 15B),

sugiriendo un efecto positivo de CARP9 sobre los niveles proteicos de AGO1. En concordancia con esta observación, las mutantes *carp9-1* y *carp9-2* mostraron niveles reducidos de AGO1 en comparación con sus controles respectivos (Figura 17A). Por otro lado, no observamos un incremento en los niveles de miR168 maduro o en la transcripción del su gen que pudieran explicar los niveles reducidos de AGO1 en las mutantes (Figura 10C y 17C). En oposición a los niveles proteicos de AGO1, los niveles de su ARNm, medidos por RT-qPCR con oligos diseñados hacia el extremo 3' del ARNm (A) o que flanquean el sitio de reconocimiento del miR168 (B), fueron más altos en las mutantes que en las plantas control, probablemente como una respuesta a la baja cantidad de proteína, o como consecuencia de la menor actividad del miR168 (Figura 17D). Se sabe que AGO1 es poli-ubiquitinada por la F-box FBW2, y degradada por autofagia/proteosoma 26S [155]–[157] y que el reactivo MG132 inhibe esa degradación [157]. Tratamientos de plantas mutantes con el inhibidor de proteasoma MG132, revirtió parcialmente la reducción de AGO1, lo cual indica que esta proteína es degradada activamente en las plantas mutantes (Figura 17B). Estos resultados llevaron a que los ensayos de RIP descritos en la sección anterior fueran realizados en plantas tratadas con MG132 para evitar que esa reducción de AGO1 afecte la interpretación de los resultados.

Dado que AGO1 localiza tanto en núcleo como en citoplasma [56], [101], [107], y que CARP9 influye en su carga con miARNs, nos preguntamos si la disminución en los niveles de AGO1 es general o se presenta sólo en alguna fracción celular. Podría esperarse que la alteración en la carga de AGO1 con miARNs conduzca a un incremento de la población de esta proteína no asociada a miARNs, la cual podría presentar diferencias en su estabilidad proteica respecto de las AGO1 cargadas con miARNs. Para analizar esta posibilidad, realizamos fraccionamientos núcleo/citoplasma de plantas WT y *carp9-2*, y analizamos los niveles de AGO1 en los extractos proteicos obtenidos. Este ensayo mostró que la fracción nuclear de AGO1 no se reduce en la mutante *carp9-2* (Figura 17E), sugiriendo que la partición subcelular de AGO1 podría verse afectada en plantas mutantes y que la fracción citoplasmática es la que potencialmente se degrada vía proteasoma y/o autofagia.



**Figura 17. AGO1 es degradada por el proteosoma en las mutantes *carp9*.** A) Niveles de AGO1 cuantificados por *western blot* en muestras extraídas de plantas *carp9* y plantas control. Los niveles de ACTINA se midieron como control de carga. B) Cuantificación por *western blot* de los niveles de AGO1 en plantas mutantes y en plantas control tratadas con el inhibidor de proteosoma MG132. C) y D) Expresión de pri-miARN168 (C) y AGO1 (D), medida por RT-qPCR. Los niveles de transcripción de AGO1 se midieron utilizando dos conjuntos de oligonucleótidos; un par que amplifica el 3' del transcripto (primers A) y un par que flanquea el sitio de reconocimiento del miR168 en el ARNm de AGO1 (primers B). Las barras de error muestran 2xSEM y los valores de p inferiores a 0,05 (\*) en una prueba t no pareada se consideraron significativos. E) Niveles de AGO1, medidos por *western blot*, en muestras enriquecidas en núcleos. ACTINA e Histona 3 (H3) se utilizaron para verificar la pureza de las fracciones.

## 8.5 DISCUSIÓN

Durante los últimos años, nuestro conocimiento de la vía de miARNs en plantas ha crecido de manera exponencial. Se asignaron nuevas funciones a proteínas de la vía conocidas desde hace mucho tiempo como la asociación de AGO1 y DCL1 a la cromatina [55], [247], [248], el papel de estas mismas proteínas en la reparación de daños en el ADN [126], [249], la regulación transcripcional y epigenética de los genes por SE [250], [251], y la independencia de algunos pri-miARN de HYL1 a bajas temperaturas [66], entre algunos ejemplos. Quizás uno de los descubrimientos más llamativos fue el reciente reporte que demuestra que algunos miARNs se cargan en AGO1 dentro del núcleo y se exportan como un complejo pre-formado [101]. Esta evidencia rompió con la concepción anterior de que los miARNs eran exportados al citoplasma por HASTY para ser cargados en AGO1. Dicha carga nuclear de AGO1 también gana importancia dadas las nuevas funciones descriptas para esta proteína en procesos nucleares [247]–[249]. Sin embargo, hasta el momento no se sabe si esta carga nuclear de AGO1 es un proceso pasivo o si está asistida por componentes de la maquinaria de procesamiento. La evidencia de que HEN1 es capaz de interactuar con HYL1, pero no con el factor de procesamiento SE [94], junto a los reportes que indican que HYL1 es capaz de unirse eficientemente a los miARNs maduros *in vitro* [67], sugieren que después del procesamiento, el miARN maduro podría permanecer unido a HYL1 hasta que se cargue en AGO1 (Figura 18). De hecho, ya hace más de una década se describió que AGO1 es capaz de interactuar con HYL1 en corpúsculos nucleares [56]. Además, se ha demostrado que la carga adecuada del miARN maduro en AGO1, y particularmente la selección correcta de su hebra guía, está alterada en mutantes de *HYL1* [86], [108], lo que sugiere que este factor de procesamiento es un nexo clave entre la maquinaria de biogénesis de miARNs y la posterior carga de estos en AGO1.

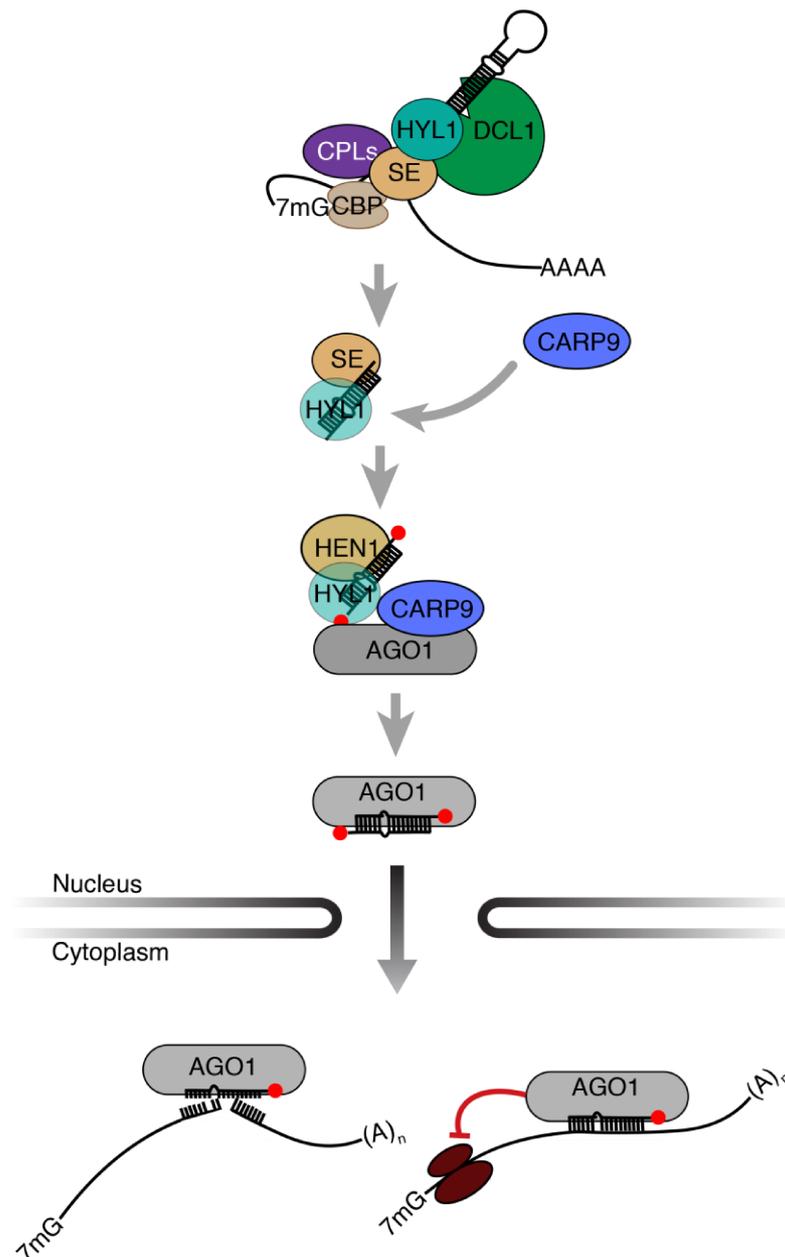
En esta parte de la Tesis doctoral, hemos identificado a CARP9 como una proteína nuclear intrínsecamente desordenada, altamente conservada entre plantas, que participa en la carga nuclear de miARNs en AGO1. En este sentido, encontramos que CARP9 es capaz de interactuar con HYL1 y miARNs maduros, pero no así con la maquinaria de procesamiento de miARNs ni los precursores de miARNs, posicionando la función de la proteína después del procesamiento de los pri-miARNs. Este descubrimiento también implica que HYL1 podría permanecer unido a los dúplex de miARN maduro una vez que se producen como ya ha sido propuesto previamente [94] (Figura 18). En este contexto, es posible que después del procesamiento de pri-miARN, HYL1 transfiera los dúplex de miARN maduros a AGO1 en los corpúsculos nucleares donde co-localizan [56]. Sin embargo, hasta el momento, no hay evidencia de interacción directa entre HYL1 y AGO1. Además de su interacción con HYL1, encontramos que CARP9 también interactúa con AGO1

contribuyendo al proceso de carga de miARN (Figura 15). CARP9 es en gran parte una proteína intrínsecamente desordenada, y es común que este tipo de proteínas actúen como chaperonas que ayudan al plegamiento de otras proteínas, permitiendo interacciones e incluso evitando su agregación [239], [252]. En tal escenario, CARP9 podría actuar como un anclaje que promueva la interacción AGO1-HYL1 y la carga de miARNs en el núcleo. Como HYL1 también se encuentra en el citoplasma celular, es posible que esta proteína de unión a ARN escolte a AGO1 durante la translocación núcleo/citoplasma del miARN, proceso que excluiría a CARP9, ya que encontramos que es exclusivamente nuclear.

Los alelos mutantes *carp9* analizados, mostraron en general una reducción de los niveles de miARNs totales, una unión deficiente de miARNs a AGO1, y defectos morfológicos compatibles con mutantes deficientes de miARNs. Sin embargo, estos defectos fueron más leves que los observados comúnmente en mutantes de proteínas centrales de la vía, como HYL1 y AGO1. Es poco probable que la redundancia con homólogos cercanos explique esta observación, ya que CARP9 apareció como un gen único en la mayoría de los genomas de las plantas analizadas, incluida *A. thaliana* (Figura 11C). Es más probable que la actividad parcial de CARP9 en los alelos mutantes explique las observaciones. En este sentido, el codón de *STOP* prematuro en *carp9-1* permitiría que una gran parte de la proteína se traduzca, y la inserción intrónica de ADN-T de *carp9-2* posiblemente represente un alelo *knock-down* como lo indican los niveles de transcritos de CARP9 en este alelo mutante (Figura 8E). Apoyando esta idea, no hemos logrado identificar plantas homocigotas para otros alelos insercionales donde la mutación se encuentra en los primeros exones, lo que sugiere que mutantes nulas no serían viables. Otra observación interesante fue la reducción de los niveles de AGO1 en las mutantes *carp9*, y su incremento cuando se sobreexpresó una copia del gen *CARP9*. Esta observación podría indicar que CARP9 tiene un papel en el control del *turnover* de AGO1, en su localización subcelular, o simplemente, que AGO1 se desestabilice cuando no está cargada con miARNs. Es notable el alto grado de conservación de CARP9 entre las plantas terrestres, lo que sugiere un papel crucial de esta proteína para la homeostasis en plantas. El alto nivel de conservación de aminoácidos en las regiones intrínsecamente desordenadas de la proteína, que comúnmente tienden a divergir rápidamente durante la evolución, refuerza la idea de una presión evolutiva para conservar esta proteína.

CARP9 representa un nuevo componente en la vía de los miARNs que une la maquinaria de procesamiento con la carga nuclear de AGO1. Varias preguntas permanecen abiertas, como por ejemplo, si AGO1 se asocia a miARNs ya metilados o si la metilación ocurre después de la carga; si la selección de hebras de miARN ocurre en núcleo o en citoplasma; cuál es el rol de HYL1 en programar el destino del complejo efector RISC; y si la fracción citoplasmática de HYL1 tiene un rol activo en la vía de miARNs. También se mostró

que EMA1 y TRN1 interactúan con AGO1 para modular la carga de miARN [110], [111]. Sin embargo, queda por abordar si estas proteínas participan en el proceso de carga de AGO1 nuclear, si interactúan con HYL1 y CARP9, o si tienen un papel diferente durante la estabilidad del complejo en citoplasma. De manera similar, demostramos que CARP9 interactúa con AGO1 y HYL1 para facilitar la carga, pero la actividad bioquímica de CARP9 durante este proceso no está clara. Serán necesarios más estudios para examinar varios de estos aspectos y así comprender con mayor precisión el mecanismo de carga de los miARNs en AGO1 en plantas.



**Figura 18. Modelo para el rol de CARP9** actuando como un puente entre el procesamiento post pri-miARN y la carga nuclear de AGO1. Después del procesamiento de pri-miARNs por DCL1, el dúplex maduro permanece asociado con HYL1 y SE, que luego se reemplaza por HEN1. CARP9 es reclutado a este complejo de post-procesamiento por su unión a HYL1. La AGO1 nuclear se asocia luego con el complejo que interactúa con CARP9, proceso que guía la carga de los miARNs maduros en AGO1. El complejo AGO1:miARN se exporta al citosol para silenciar a sus genes blanco.

# **CAPÍTULO 3**

***“SCREENING GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
FACTORES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE SELECCIÓN DE  
HEBRAS DE miARNs”***

## 9 CAPÍTULO 3

### “SCREENING GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FACTORES QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE SELECCIÓN DE HEBRAS DE miARNs”

#### 9.1 INTRODUCCIÓN

A fin de poder cumplir sus funciones regulatorias, AGO1 retiene sólo una de las dos hebras del miARN maduro mientras que la otra es degradada. La hebra retenida en el complejo RISC se conoce comúnmente como miARN o hebra guía mientras que la complementaria se conoce como miARN\* o hebra pasajera. Por años se consideró al miARN\* como un mero subproducto de la biogénesis de miARNs. Sin embargo, en la última década, estudios en *Drosophila melanogaster*, humanos y plantas demostraron que ambas hebras pueden ser retenidas en el complejo RISC y cumplir funciones específicas. Incluso se ha observado que ambas hebras de un solo miARN pueden ser retenidas específicamente en distintas proteínas AGO disparando respuestas completamente diferentes [32], [125], [162], [253]. Estos hallazgos plantean un aumento en la cantidad de genes que podrían ser regulados en un organismo por el mismo grupo de miARNs, como así también la potencial carga preferencial de cada hebra de forma tejido-específica [162]. Estos descubrimientos ponen en evidencia un nuevo nivel de regulación de la vía de miARNs, esta vez no a nivel transcripcional o de su biogénesis, sino a nivel de la especificidad de cargado del complejo RISC. A pesar de estos descubrimientos, la respuesta a la pregunta elemental de cómo AGO1 elige cuál hebra del dúplex de miARN debe retener, aún sigue esquivada. Aunque se ha propuesto que la hebra termodinámicamente más inestable es la que queda retenida [102], [108], [158]–[160], este mecanismo parece más la excepción que la regla, ya que un gran número de miARNs no se corresponden con este modelo. Entender el mecanismo inherente a la selección de hebras por AGO1 y su regulación, o al menos generar las herramientas necesarias para su estudio, se convirtieron en un objetivo primordial de esta Tesis.

## 9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La carga de miARNs en AGO1 y la posterior selección de la hebra guía por el complejo efector RISC son procesos regulados por factores y/o mecanismos aún desconocidos. Es por ello que el objetivo de este capítulo es la identificación de los mecanismos y proteínas involucradas en la regulación de la actividad de miARNs, centrándonos en las etapas de carga y selección de la hebra activa del miARN en AGO1, utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* como modelo.

Para ello, nos propusimos como objetivos específicos diseñar y evaluar un sistema reportero doble que permita estudiar el proceso de selección de hebras de miARN retenidas en la proteína AGO1, identificar genéticamente factores que dirigen la selección de la hebra de miARN y su carga en la proteína AGO1, y finalmente determinar los mecanismos que dirigen la selección de la hebra de miARN y su carga en proteínas AGO1 usando las mutantes obtenidas.

### 9.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 9.3.1 Plásmidos

**pJL-Blue(r)**: Es un vector de entrada derivado del *pENTR1A* (Invitrogen) al cual se le reemplazó el *polylinker* y el gen *ccdB* por el sitio de múltiple clonado (SMC) del *pBluescript* que contiene 11 sitios de restricción únicos que permite realizar clonados estándar. El SMC está flanqueado por las regiones de homología *attL1* y *attL2* para permitir la recombinación LR en vectores *Gateway* de destino. Posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección en *Escherichia coli*. Este vector se utilizó para clonar el casete *amiR:Basta:Rbcs:35S::Luciferasa* y luego reemplazar la *Luciferasa* por una versión modificada con el sitio de reconocimiento para el *amiR:Basta\** de la construcción pPM225 en los sitios XbaI/NotI.

#### 9.3.2 Cepas bacterianas y de levaduras utilizadas

Descriptas en la sección 8.3.2.

#### 9.3.3 Material vegetal y condiciones de cultivo

La línea mutante *rdr6-12* [254] fue cedida gentilmente por el laboratorio del Dr. Detlef Weigel (Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Alemania). Se identificó la inserción del ADN-T y la presencia del alelo salvaje en las plantas mutantes realizando PCR sobre ADN genómico de las mismas utilizando oligonucleótidos específicos (ver Anexo).

Las condiciones de cultivo de las plantas se describen en la sección 8.3.3.

#### 9.3.4 Construcciones genéticas y generación de líneas transgénicas en *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*

Para obtener plantas con el sistema reportero de doble gatillo, se reemplazó el ADNc de la *luciferasa* de la construcción pPM168 (ver Anexo) por una versión modificada de la misma capaz de ser silenciada por la hebra pasajera del miARN artificial *amiR:BASTA\**, la cual se escindió de la construcción pPM225 (ver Anexo) con la enzima de restricción XbaI (Thermo Scientific) según el protocolo del fabricante, y se clonó en el vector pPM168 digerido con la misma enzima, obteniéndose la construcción **pAT001** (ver Anexo). Posteriormente, el casete formado por la secuencia del *amiR:BASTA*, seguido del terminador de la transcripción de la *RuBisCO*, el promotor 35S CaMV, y el ADNc de la

luciferasa modificada, flanqueados por los sitios de recombinación *attL* del vector pJL-Blue(r), fue transferido mediante el sistema de clonado *Gateway* (Invitrogen) al vector destino pFK209 de la serie *pGREEN IIS*, obteniéndose la construcción **pAT002** (ver Anexo). Esta construcción fue introducida en la línea mutante *rdr6-12* [254], que expresa constitutivamente el gen de resistencia al herbicida BASTA. Una línea insercional independiente homocigota en los genes que componen el sistema reportero de doble gatillo fue seleccionada para su mutagénesis con EMS y posterior *screening* para la identificación de plantas mutantes con una potencial alteración en la selección de hebras de miARNs.

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

Se llevaron a cabo según lo descrito en la sección 8.3.5.

### **9.3.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Las corridas electroforéticas se realizaron según lo descrito en la sección 8.3.6.

### **9.3.7 Clonados**

Los clonados y transformación de bacterias competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizaron según los protocolos descritos en la sección 8.3.7.

### **9.3.8 Minipreparación de ADN plasmídico**

Las minipreparaciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo según lo descrito en la sección 8.3.8.

### **9.3.9 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN**

La secuenciación de moléculas de ADN se realizó según lo descrito en la sección 8.3.9.

### **9.3.10 Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana***

La transformación estable de plantas de *Arabidopsis* por el método de inmersión floral se describe en la sección 8.3.10.

### 9.3.11 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* por el método de infiltración se describe en la sección 8.3.11.

### 9.3.12 Extracción de ADN genómico de plantas de *Arabidopsis thaliana*

La extracción de ADN genómico se realizó según lo descrito en la sección 8.3.12.

Alternativamente, cuando fue necesario obtener ADN genómico de mayor pureza para ser secuenciado, se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción de ADN con CTAB [255]. Brevemente, se pulverizó el material con nitrógeno líquido en un mortero estéril y el polvo congelado se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL (el equivalente a aproximadamente 4 mL de tejido pulverizado proveniente de 300 plantas de 15 días). Se agregó a cada tubo 6 mL de solución CTAB y 5  $\mu$ L de ARNasa A preparada 100 mg/mL (Promega) y se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló por completo. Luego se incubó por 30 min a 65 °C en un baño de agua, mezclando por inversión cada 5 min. Transcurridos los primeros 15 min de incubación, se suplementó cada tubo con 12  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, se mezcló y se dejó incubando a 65 °C los restantes 15 min. Pasado ese tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Luego se agregó 6 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitó hasta emulsión completa, y se centrifugó a 3.000 g durante 20 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 15 mL, se mezcló con 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), y se centrifugó a 3.000 g durante 20 min a 4 °C. Se transfirió nuevamente la fase acuosa a otro tubo Falcon de 15 mL, se adicionó el mismo volumen de isopropanol para precipitar el ADN genómico, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 3.000 g durante 10 min. A continuación, se lavó el pellet de ADN con 5 mL de etanol 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 3.000 g por 5 min, y se dejó secar completamente el pellet de ADN. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de TE 1X pH 8,0, se agregó 0,5  $\mu$ L de ARNasa A preparada 100 mg/mL (Promega), y se incubó a 55 °C por al menos 30 min. Por último, se centrifugó a 3.000 g por 2 min para eliminar sedimentos no disueltos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL listo para realizar la secuenciación de genoma completo.

---

**Solución CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2% (p/v), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, Polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v).

---

### 9.3.13 Análisis de ARN

Los análisis de ARN se realizaron siguiendo los protocolos descritos en la sección 8.3.13.

#### **9.3.14 Ensayos de cuantificación de la actividad Luciferasa**

La cuantificación de la actividad Luciferasa se realizó según lo descrito en la sección 8.3.14.3.

#### **9.3.15 Mutagénesis en semillas de *Arabidopsis thaliana* con etilmetanosulfonato (EMS)**

Una vez obtenida la línea transgénica homocigota para todo el sistema reportero de doble gatillo (sección 9.3.4), se procedió a realizar la mutagénesis de las semillas con el mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS). Todo el proceso de mutagénesis fue supervisado y asistido directamente por el director de esta Tesis, quien oportunamente recibió en Alemania entrenamiento en esta técnica, los recaudos a tener en cuenta durante su ejecución, y las metodologías de eliminación adecuada de los residuos generados. Se alicuotaron de 17.000 a 20.000 semillas (equivalente a 300-400 mg de semillas) y se las hidrató con 45 ml de una solución de Tween-20 al 0,005% (v/v) por 2-4 h en un tubo Falcon de 50 mL en rotación suave. Pasado ese tiempo, las semillas se lavaron 2 veces con 45 mL de agua para remover el detergente. A partir de este punto se trabajó bajo campana de extracción química utilizando obligatoriamente guardapolvo y 2 pares de guantes de nitrilo, tomando además todas las precauciones necesarias debido a la peligrosidad del EMS. Se mezclaron 150  $\mu$ L de EMS con 350  $\mu$ L de agua utilizando una jeringa con aguja hipodérmica 25G, obteniendo una solución de EMS 30% (v/v) en estado de emulsión. Al tubo Falcon de 50 mL conteniendo las semillas en agua, se le adicionó 250  $\mu$ L de EMS 30% (v/v) y se llevó a volumen final 50 mL con agua, quedando el EMS en una concentración final del 0,15 % (v/v). Se selló la tapa del tubo con dos capas de parafilm, se introdujo el tubo Falcon dentro de una bolsa con cierre hermético, y se incubó durante 16 h en rotación para mantener a todas las semillas en contacto con la solución. Luego, se descartó la solución de EMS y se realizaron 8 lavados con 45 mL de agua durante 20 min en rotación continua. Luego del último lavado, se resuspendieron las semillas en agar 0,1% (p/v) y se las estratificó por 3 días a 4 °C en oscuridad. Todos los desperdicios contaminados con EMS, ya fueran líquidos o sólidos, incluidos guantes, jeringas, etc., fueron descontaminados mediante tratamiento con una solución de NaOH 1N durante toda la noche. En el caso de los residuos sólidos, estos fueron sumergidos directamente en la solución NaOH 1N. Los residuos líquidos se recolectaron en un envase volumétrico descartable con tapa, el cual permitió el agregado 1 volumen de NaOH 2N para culminar con una solución de concentración final de NaOH 1N.

Pasados los 3 días de estratificación, las semillas fueron sembradas en tierra con una densidad de aproximadamente 60 semillas por pote (15 cm de largo por 12 cm de ancho) y

se las cultivó en cámara hasta que estuvieron listas para la cosecha de sus semillas (alrededor de 60 días). La tasa de mutagénesis, la cual deber ser lo suficientemente alta para garantizar el éxito del experimento, pero no excesiva para evitar causar una letalidad masiva, fue medida observando el porcentaje de plantas que presentan clorosis en mosaico (falta de clorofila como signo de mutación en las vías de biogénesis de este compuesto), porcentaje que comúnmente no debe superar una planta por pote. Luego se cosechó cada pote por separado, de modo de tener aproximadamente unos 300 grupos de unas 60 plantas cada uno. Con estos grupos de semillas se procedió a realizar el *screening* para aislar plantas mutantes con restauración de la resistencia a BASTA.

### **9.3.16 Screening de genética directa por mutagénesis con EMS utilizando un sistema reportero de doble gatillo**

El *screening* de genética directa por mutagénesis se diseñó en base a los descripto previamente por Manavella y colaboradores [86] con algunas modificaciones. Para la identificación de plantas mutantes con la selección de hebras de miARN alterada, se utilizó como sistema reportero de doble gatillo con un micro ARN artificial, descripto en la sección de resultados 9.4.1. Para el *screening* se sembraron *pooles* de semillas de unas 60 plantas en tierra, las cuales fueron regadas con 0,1% (v/v) de glufosinato de amonio (BASTA) a fin de seleccionar en una primera instancia aquellas plantas que recuperen la resistencia al herbicida debido a algún defecto en la biogénesis, acción o carga en AGO1 del miARN artificial. Las plantas que sobrevivieron al herbicida fueron sometidas a un segundo *screening* basado en la actividad luciferasa. Para tal fin, se cortaron 4 discos de 5mm de diámetro de hojas de las plantas resistentes a BASTA, los cuales fueron embebidos individualmente en una solución de D-Luciferina sal de potasio 100 mM (PJK GmbH), y se les cuantificó la bioluminiscencia utilizando un luminómetro de placa Fluoroskan Ascent™ FL (Thermo Scientific). Las plantas mutantes que presentaron menores niveles de bioluminiscencia que el control sin mutagenizar fueron seleccionadas como mutantes candidatas a presentar alteraciones en la selección y/o carga de las hebras de miARNs, el resto fueron catalogadas como mutantes en la biogénesis o acción de miARNs.

### **9.3.17 Generación de los grupos de mapeo y secuenciación de genoma completo**

La identificación de los genes candidatos por secuenciación de genoma completo se realizó según lo descripto previamente por Manavella y colaboradores [86] con algunas modificaciones. Brevemente, las plantas mutantes seleccionadas fueron cruzadas con

plantas de la línea reportero amiR:BASTA salvajes (*backcross*) con el fin de generar los grupos de mapeo para la secuenciación de genoma completo. Una vez alcanzada la segunda filial de semillas, las mismas se sembraron en tierra y se regaron con el herbicida BASTA para seleccionar aquellas plantas con el fenotipo de interés. Para el armado de los grupos de mapeo, se tomaron muestras de aproximadamente unas 300 plantas por cada mutante de interés, y se realizó la extracción de ADN genómico con el protocolo de CTAB previamente descrito.

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

---

**Transposomas Tn5:** la transposasa Tn5 fue expresada y purificada según lo descrito por Picelli y colaboradores [256].

**5X TAPS-DMF MgCl<sub>2</sub>:** 50 mM TAPS; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 50% DMF (v/v).

**Solución de lavado:** 30 mM Tris pH 8; 50 mM NaCl; 0,1% Tween-20 (v/v).

---

### 9.3.18 Mapeo de mutaciones por secuenciación de próxima generación

Un total de ocho grupos de plantas procedentes de la retrocruza con la línea reportero amiR:BASTA salvajes fueron secuenciadas, además del parental reportero amiR:BASTA sin mutagenizar. Se hizo una secuenciación de lecturas pareadas de 150 bases por lectura,

obteniéndose en promedio un total de 72 millones de pares de lecturas por conjunto y 25 millones para la línea parental reportero amiR:BASTA.

El análisis bioinformático se realizó comenzando por eliminar bases de mala calidad del extremo 3' de las lecturas con el programa *trimmomatic* [257], quedando en promedio lecturas de 140 bases. Luego se mapearon al genoma de *Arabidopsis thaliana* usando *bowtie2* [258], obteniéndose porcentajes promedio de mapeo superiores al 90% de las lecturas. Los mapeos de múltiples líneas (*lanes*) fueron combinadas y se determinaron las variantes genómicas en los conjuntos haciendo un análisis de apilamiento de lecturas con *samtools* y *bcftools* (versión 0.1.19 compatible con *SHORE*, [259]). A continuación, se utilizó el programa *SHOREmap* (versión 3.6, [208], [260]) para identificar los polimorfismos candidatos a explicar el fenotipo de las plantas mutantes obtenidas del *screening*. Las variantes de los conjuntos se contrastaron con las variantes presentes en la línea reportero amiR:BASTA salvaje usando *SHOREmap backcross* con un *qscore* mínimo de 25 y se seleccionaron las variantes con una frecuencia alélica mayor a 0,9. Finalmente las variantes fueron anotadas con *SHOREmap annotate* para identificar los genes afectados y el potencial efecto de la mutación.

## 9.4 RESULTADOS

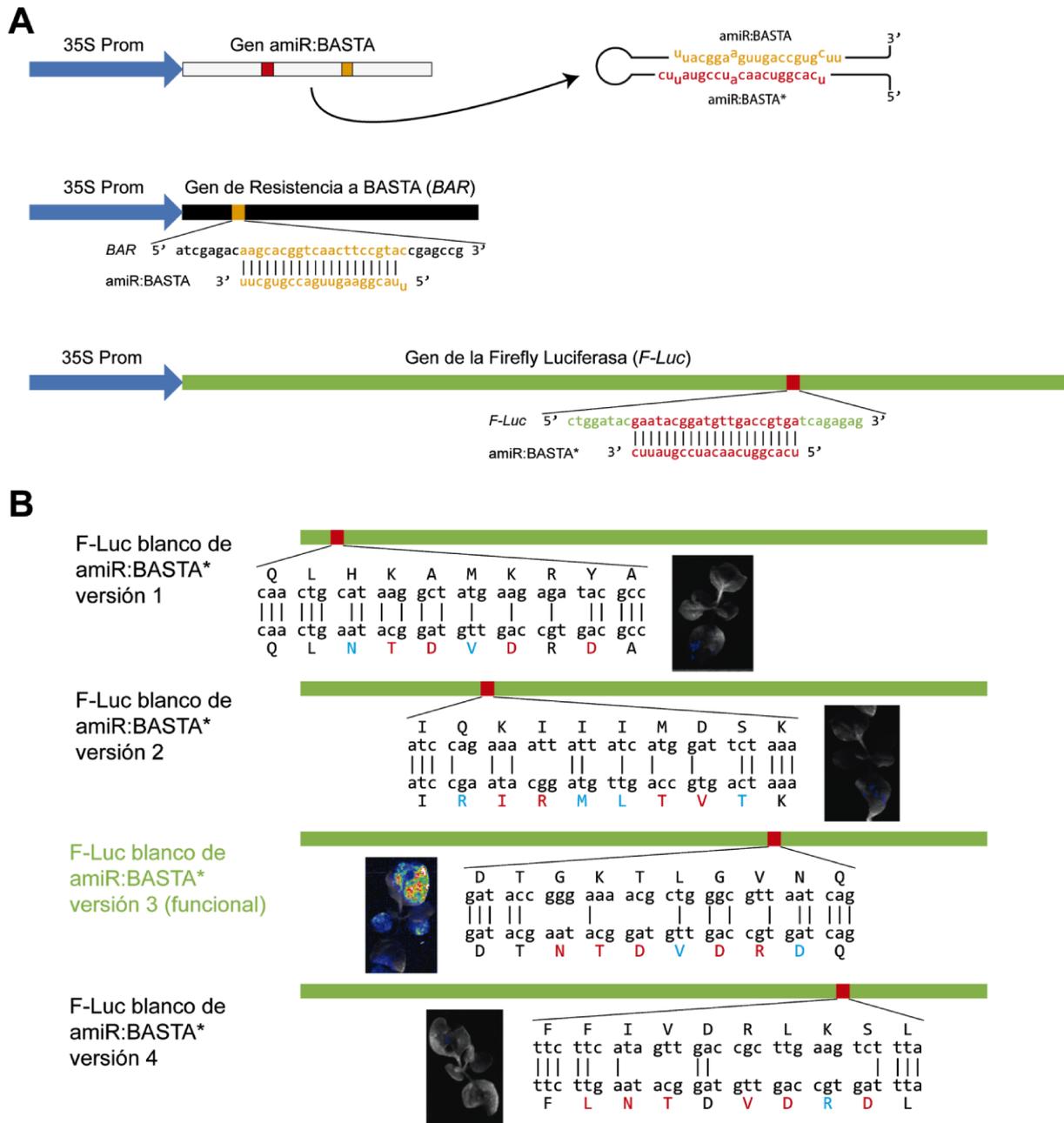
### 9.4.1 Sistema Reportero de Doble Gatillo

A fin de identificar los mecanismos, los determinantes estructurales y/o los factores responsables de la selección de hebras, planteamos diseñar un sistema reportero capaz de discernir qué hebra de un miARN artificial es cargada en AGO1. A fin de maximizar las posibilidades de éxito comenzamos diseñando dos opciones de sistemas reporteros de carga de miARNs. El primer sistema se compone de un miARN artificial (amiR:BASTA) que silencia al gen de resistencia al herbicida BASTA mientras que su hebra complementaria silencia una versión modificada de la Firefly Luciferasa (F-Luc) (Figura 20). El primer componente del sistema, el amiR:BASTA, fue relativamente sencillo de diseñar. Para esto se usó el software online *WMD3 - Web MicroRNA Designer* (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) y se seleccionó un miARN artificial que reconociera la secuencia codificante del gen que codifica para la resistencia al herbicida BASTA, y que además, su hebra pasajera tuviera un uracilo (U) en su extremo 5' a fin de ser activo en AGO1 (Figura 19A). Usando esta secuencia para diseñar oligonucleótidos usamos técnicas de fusión por PCR para reemplazar la secuencia del miR319a de su gen codificante por la del amiR:BASTA. Esta construcción fue posteriormente clonada bajo el promotor constitutivo 35S CaMV en un vector que confiere resistencia en plantas al antibiótico kanamicina. A fin de comprobar la funcionalidad del amiR:BASTA, se transformaron plantas que presentaban resistencia a BASTA y se evaluó en líneas T2 la resistencia al herbicida. Confirmando la funcionalidad de la construcción, el 75% de las plántulas T2 fueron sensibles al herbicida, mientras que un 25% restante sobrevivieron al herbicida, producto de la pérdida del trasngén por segregación.

El segundo componente del sistema, una *Firefly* Luciferasa potencialmente silenciada por el amiR:BASTA\*, fue más desafiante de obtener. El principal problema en el diseño de este segundo componente radicó en la necesidad de modificar la secuencia codificante del gen F-Luc para ser reconocido por el amiR:BASTA\*, lo cual podría conllevar a una pérdida de la actividad enzimática de la proteína dado el cambio de secuencia y el consiguiente cambio de aminoácidos en la posición mutada. Para minimizar esta posibilidad, buscamos dentro de la secuencia de la *F-Luc* aquellas posiciones donde el reemplazo de 21 nt tuviera el menor impacto posible en los 7 aminoácidos codificantes (mutaciones sinónimas o conservativas). Basados en este criterio, se seleccionaron cuatro regiones del gen *F-Luc*, y se reemplazó por la secuencia complementaria a los 21 nt del amiR:BASTA\* mediante fusión vía PCR (Figura 19B). Para evaluar si las versiones mutadas de la *F-Luc* eran capaces de generar una proteína bioluminiscentemente activa, procedimos a clonar las

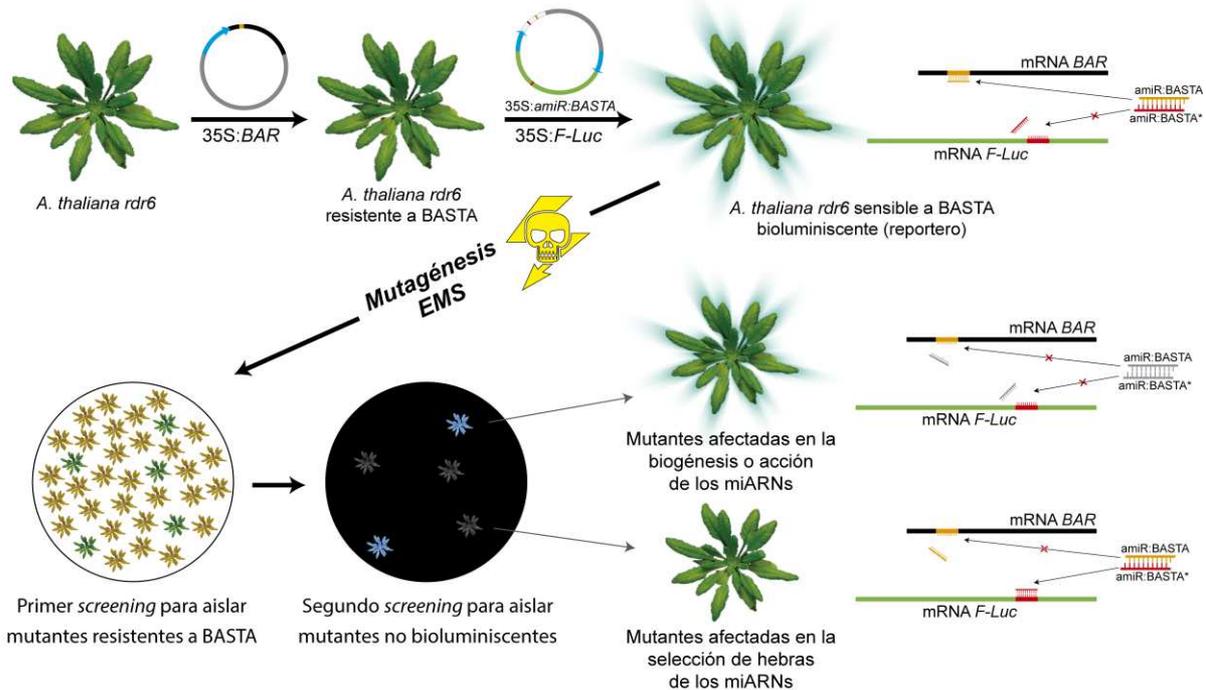
cuatro mutantes bajo el promotor constitutivo 35S CaMV, transformar transitoriamente hojas de *N. benthamiana*, y medir bioluminiscencia usando una cámara hiper-refrigerada CCD. Este ensayo demostró que sólo la versión 3 de la *F-Luc* mutada conservó la actividad enzimática (Figura 19B) por lo cual seleccionamos esta versión para ensamblar el sistema reportero final. Ya con ambos componentes del sistema clonados y evaluados individualmente (amiR:BASTA y *F-Luc* mutada), los ensamblamos en un único vector que a su vez presenta el gen que codifica para la resistencia a kanamicina en plantas (ver sección 9.3.4, y tabla de construcciones en el Anexo). Esta construcción fue transformada en plantas de *Arabidopsis* que ya presentaban resistencia al herbicida BASTA (Figura 20). Estas plantas además, tienen una deleción en el gen *RDR6* (alelo *rdr6-12*), gen que codifica para una proteína clave en el silenciamiento de transgenes mediado por siARNs [22], [261], [262], de modo de evitar posibles problemas de silenciamiento del sistema reportero mediados por siARNs. La principal ventaja de este sistema reportero es que permite un *screening* de mutantes rápido, dado que sólo requiere crecer las plantas mutagenizadas en presencia del herbicida BASTA para encontrar aquellas que sobreviven (mutantes con un defecto en la acción del amiR:BASTA). Posteriormente, podemos medir el nivel de bioluminiscencia en estas plantas seleccionadas, para identificar aquellas que, además, tengan un cambio en la selección de hebras (observable por una reducción de la actividad luciferasa), siendo este último parámetro cuantificable dentro del sistema.

El segundo sistema reportero generado se basa en las mismas premisas, pero mientras la hebra guía fue diseñada para silenciar al gen de la *F-Luc* [86], la hebra complementaria reconoce una versión mutada de la proteína bioluminiscente Renilla Luciferasa (R-Luc). Este segundo sistema presenta la ventaja que la actividad de ambas hebras del amiR:Luc pueden ser cuantificadas, pudiendo así identificar mutantes con distintos grados de variabilidad en la selección de las hebras del miARN artificial. Lamentablemente ninguna de las versiones mutadas de la R-Luc presentó actividad de bioluminiscencia, por lo cual decidimos proseguir utilizando el sistema reportero amiR:BASTA.

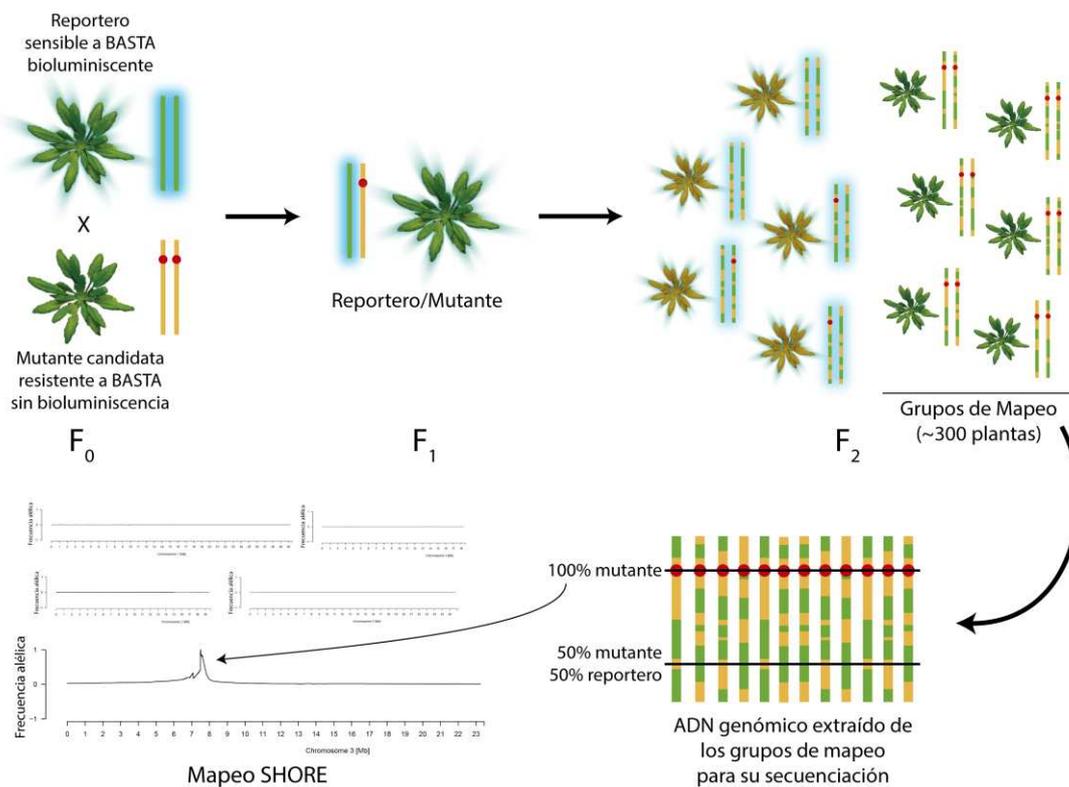


**Figura 19. Representación esquemática del sistema reportero amiR:BASTA de doble gatillo.** A) Esquema de los genes de *amiR:BASTA*, resistencia a BASTA (*BAR*) y *Firefly Luciferasa*, y las secuencias blanco reconocidas por dicho miARN artificial. B) Esquema de las secuencias codificantes de las 4 versiones modificadas de la *F-Luc* para su reconocimiento por la hebra *amiR:BASTA\**, e imágenes de bioluminiscencia obtenidas de una cámara CCD de hojas de *N. benthamiana* transformadas de manera transitoria con las versiones mutadas de la *F-Luc* para analizar la actividad de cada una de ellas. La *F-Luc* versión 3 fue la única que presentó bioluminiscencia. Los aminoácidos en color negro son los que se mantuvieron sin modificaciones de la secuencia original, los aminoácidos en color celeste representan un cambio conservativo respecto de la secuencia original, en tanto que los aminoácidos en color rojo representan un cambio no conservativo.

**A) Screening de selección y carga de hebras de miARNs**



**B) Identificación de mutaciones por secuenciación y mapeo SHORE**

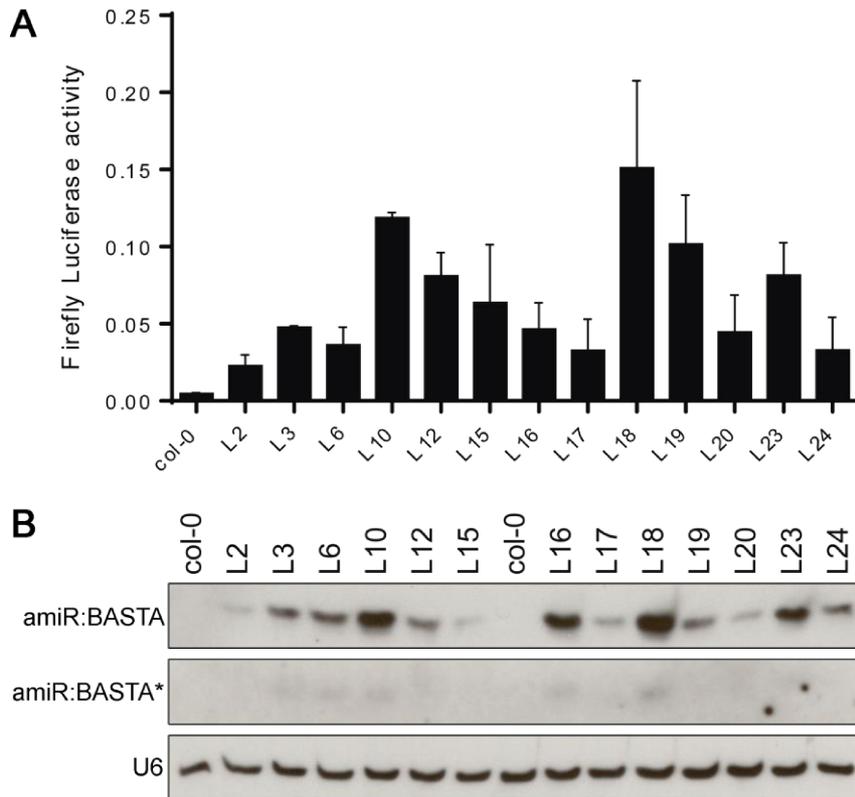


**Figura 20. Esquema representativo del screening** para la identificación de plantas mutantes con alteraciones en la carga, selección y retención de hebras del dúplex de miARN en AGO1, basado en el silenciamiento del gen de resistencia a BASTA (*BAR*) y el gen de la *F-Luc* por las hebras amiR:BAR y amiR:BAR\*, respectivamente. A) *Screening* y aislamiento de mutantes de interés. B) Identificación de los genes causales del fenotipo de interés por secuenciación de genoma completo y mapeo *SHORE*.

#### **9.4.2 Evaluación del correcto funcionamiento del Sistema Reportero en plantas de *Arabidopsis transgénicas***

Una vez transformado el sistema reportero doble gatillo amiR:BASTA en plantas de *Arabidopsis thaliana*, seleccionamos eventos únicos e independientes de inserción mediante la tasa de segregación e identificamos 13 líneas homocigotas para los transgenes mediante selección con kanamicina. Luego se procedió a comprobar el correcto funcionamiento del sistema reportero en estas plantas y a la posterior selección de la línea de trabajo, basándonos en los niveles de expresión de los componentes del sistema y el nivel de silenciamiento obtenido. En primera instancia, se incubaron hojas de las plantas seleccionadas con 1 mM de Luciferina, sustrato de la F-Luc, para cuantificar los niveles de bioluminiscencia en las mismas mediante un Luminómetro de placas (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent™, Figura 21A). A su vez, se realizaron sARN *blots* de muestras de ARN total extraídos de hojas de estas plantas para detectar los niveles de las hebras amiR:BASTA y amiR:BASTA\* con sondas no radioactivas utilizando el protocolo desarrollado en esta Tesis (Capítulo 1 [263]). Se pudieron observar niveles variables de acumulación de ambas hebras del amiR:BASTA, como así también de la actividad F-Luc en las distintas líneas (Figura 21B). Esta variabilidad es lógica en líneas insercionales independientes, y nos permitió seleccionar una línea de trabajo con niveles adecuados de cada componente del sistema.

Como es de esperar, aquellas líneas donde el análisis de segregación del transgén en la 3<sup>o</sup> generación (T3) permitió identificarlas como portadoras de más de una inserción, fueron también las líneas con mayores niveles de amiR:BASTA y bioluminiscencia (Figura 21A y 21B, líneas L10 y L18). Estas líneas con inserciones múltiples, así como también aquellas con niveles muy bajos de bioluminiscencia (podría dificultar la cuantificación del cambio en la actividad de F-Luc) o con niveles muy altos de amiR:BASTA (potencialmente más difícil de revertir la resistencia al herbicida BASTA por una mutación débil), fueron descartadas. Por último, también descartamos aquellas líneas que presentaron fenotipos aberrantes y/o baja producción de semillas, posiblemente debido a efectos insercionales. De esta forma, nos quedamos con 3 líneas independientes (L3, L6 y L19) para realizarles las pruebas faltantes y determinar la línea a mutagenizar.

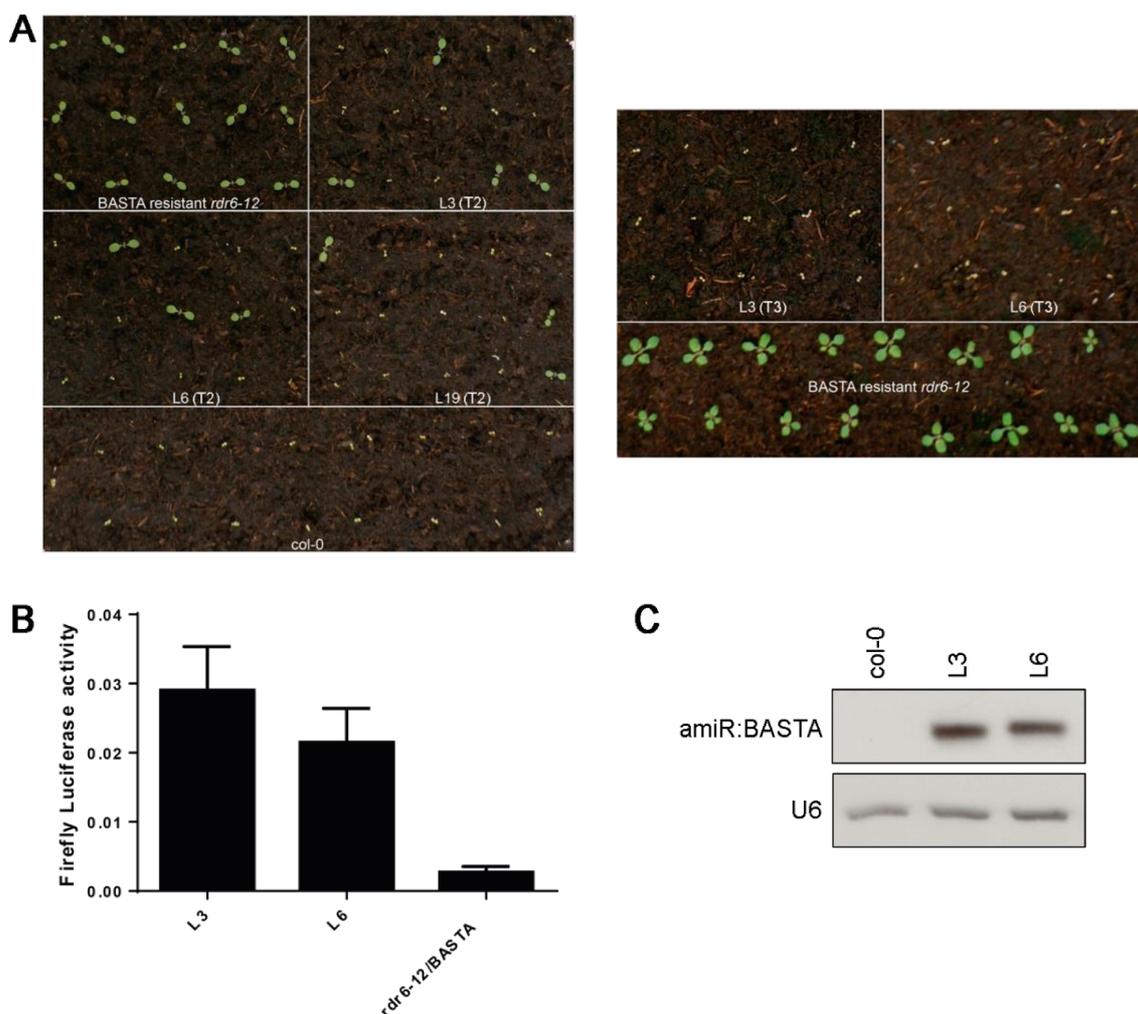


**Figura 21.** Evaluación del sistema reportero en plantas T1 de Arabidopsis. A) Medidas de bioluminiscencia para determinar niveles de actividad F-Luc. B) sARN *blot* para detección de amiR:BASTA y amiR:BASTA\*.

Otro de los controles necesarios para establecer el correcto funcionamiento del sistema es corroborar que las plantas transformadas pierden la resistencia al herbicida BASTA. Para ello, se sembraron aproximadamente 15 semillas de cada una de las tres líneas seleccionadas junto a plantas de Arabidopsis ecotipo Col-0 salvajes (como control de efectividad del herbicida) y plantas *rdr6-12* resistentes a BASTA (como control de resistencia total al herbicida) (Figura 22A). En las plantas transformadas con el sistema reportero, ~75% de las plantas T2 y el 100% de las T3 murieron en presencia del herbicida confirmando la funcionalidad del amiR:BASTA (Figura 21A). En última instancia, también descartamos la línea L19 producto de una reducida producción de semillas en la tercera filial de plantas transgénicas (T3). Por último, repetimos nuevamente los experimentos para medir los niveles de bioluminiscencia y amiR:BASTA en las dos líneas restantes como último control del sistema, a fin de tener una comparación directa entre ambas líneas y definir cuál de las dos sería la elegida para realizar la mutagénesis y posterior *screening* (Figura 22B y 22C).

Los ensayos realizados indicaron que el sistema reportero funcionaba acorde a lo esperado, siendo apto para proseguir con el *screening* en busca de plantas mutantes con alteraciones en la carga, selección y retención de las hebras de miARNs. Bajo la premisa de que ambas líneas, L3 y L6, presentaban niveles similares del amiR:BASTA pero que la bioluminiscencia fue mayor en la línea L3, seleccionamos esta última para realizar la

mutagénesis. Una vez seleccionada esta línea, se procedió a determinar la concentración óptima de trabajo del herbicida para realizar el *screening*. En este sentido apuntamos a buscar la concentración mínima de herbicida capaz de matar al 100% de las plántulas con el sistema reportero amiR:BASTA. Este criterio se basa en que, trabajar cerca del umbral de resistencia permitirá la detección de cambios leves en el silenciamiento del gen de resistencia al herbicida BASTA, evitando la pérdida de mutantes débiles en el proceso. Para ello, se tomaron semillas de la línea L3 y se sembraron en tierra, junto con plantas *rdr6* resistentes al herbicida y Col-0 como controles. Las plantas fueron regadas con una solución conteniendo distintas cantidades del herbicida BASTA (Figura 23). El ensayo mostró que una dilución 1/1.000 del herbicida puro, fue la mínima concentración necesaria para provocar la muerte de las plantas transformadas con el sistema reportero de manera constante entre experimentos y, por lo tanto, la seleccionada para la realización del primer *screening* con el fin de identificar las plantas mutantes de interés.

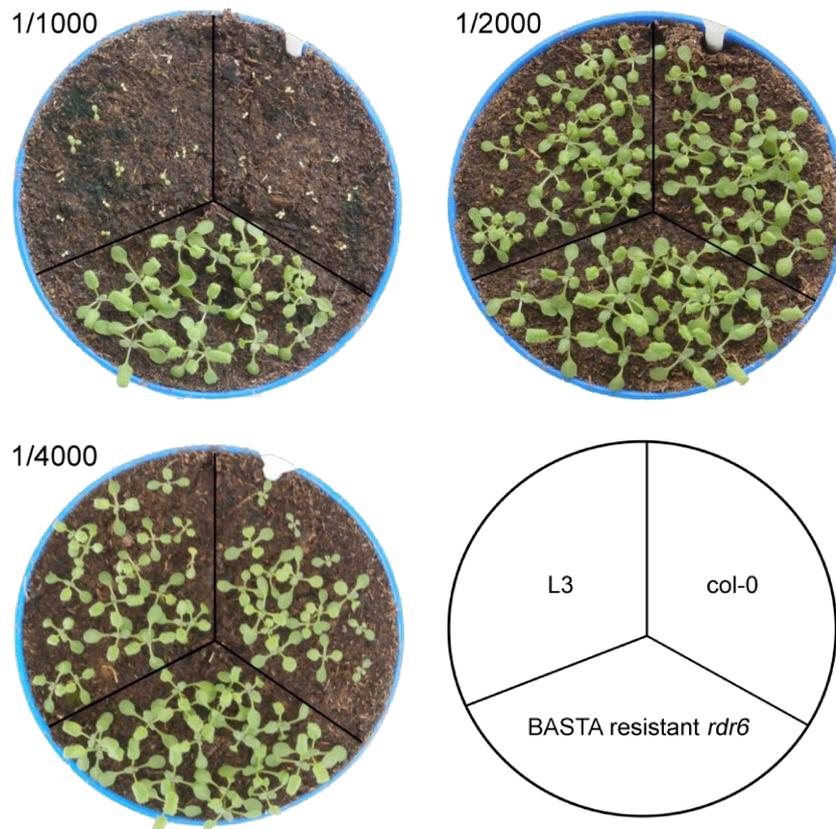


**Figura 22. Controles del sistema reportero en plantas T2 y T3 de Arabidopsis.** A) Control de sensibilidad al herbicida BASTA por silenciamiento del gen de resistencia. B) Medidas de actividad F-Luc para determinar niveles de bioluminiscencia. C) Northern blot para detección de amiR.

### 9.4.3 Screening para la identificación de mutantes de interés

#### 9.4.3.1 Generación de plantas mutantes

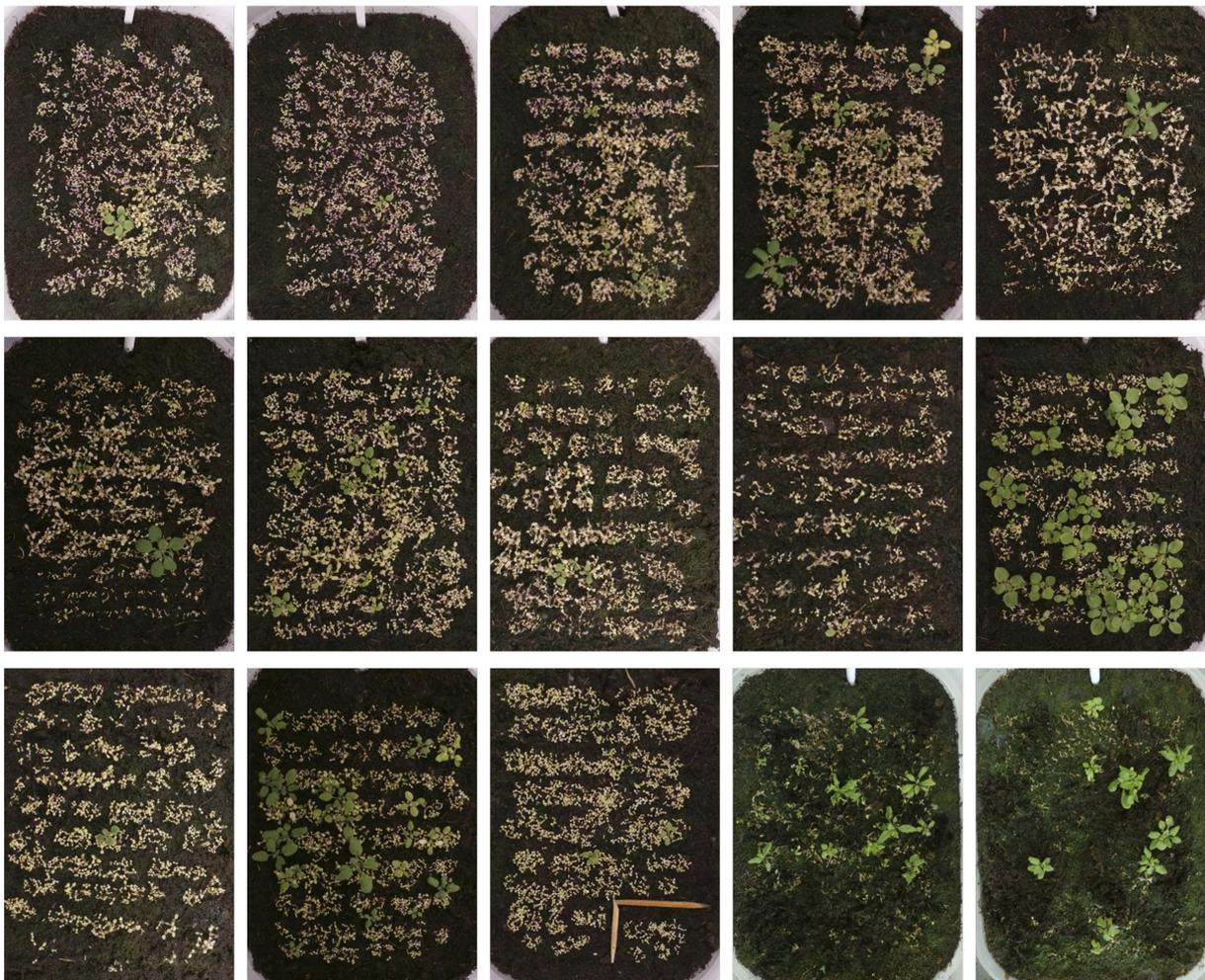
Una vez multiplicadas las semillas, se realizó el proceso de mutagénesis al azar mediado por EMS como se describe en la sección 9.3.15. El Etilmetanosulfonato (EMS) es un agente alquilante que induce modificaciones químicas en los nucleótidos, que derivan en la pérdida de apareamiento y cambio de bases. La alquilación parcial de residuos de guanina (G) resulta en la formación de la O<sup>6</sup>-etilguanina, la cual puede aparearse con una timina (T) pero no con una citosina (C). Luego de la reparación del ADN, el par original G/C conteniendo una G alquilada es reemplazado por el par adenina (A)/T. El 99% de las veces, el EMS induce cambios del tipo C a T, resultando en sustituciones de C/G por T/A [264]. Para tal fin, unas 18.000 semillas fueron tratadas con EMS y sembradas en tierra como se describe detalladamente en la sección 9.3.15 de Materiales y Métodos.



**Figura 23.** Plantas T3 de *Arabidopsis* transformadas con el sistema reportero sembradas en presencia de diferentes concentraciones del herbicida BASTA para determinar la concentración óptima de trabajo.

### 9.4.3.2 Identificación de plantas mutantes con alteraciones en la vía de miARNs o en la selección y carga de hebras en AGO1

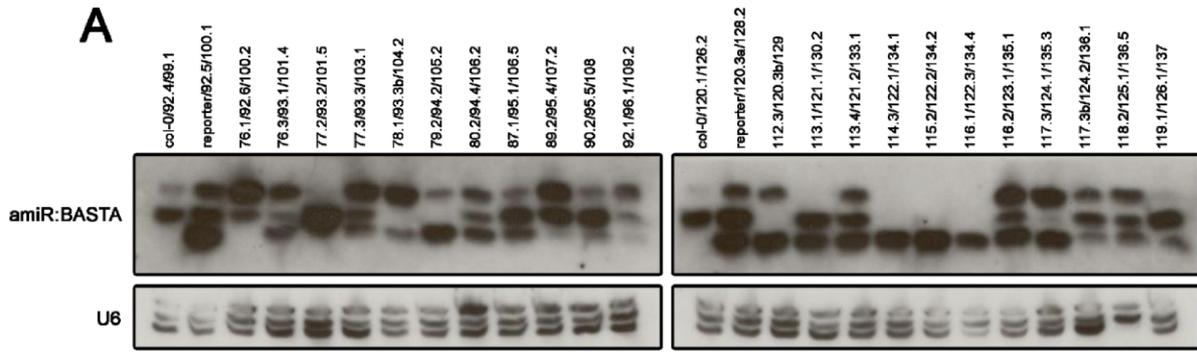
Las semillas mutagenizadas, todas ellas heterocigotas en las mutaciones puntuales que el EMS provocó, fueron sembradas en tierra para posteriormente ser cosechadas en aproximadamente unos 300 grupos de unas 60 plantas cada uno. Debido a la cantidad de espacio físico que se requiere para realizar el primer *screening* con el herbicida (a razón de 8 grupos por bandeja, se precisan aproximadamente 38 bandejas de 30 cm x 45 cm, lo que equivale a 5,2 m<sup>2</sup> en la cámara de cultivos), los 300 grupos fueron sembrados en etapas sucesivas. Luego de buscar plántulas resistentes al herbicida, signo de una falla en la vía de miARNs, en 90 grupos de semillas se lograron identificar alrededor de 130 plantas que presentaban el fenotipo de resistencia a herbicida buscado. En la Figura 24, y a modo representativo, se muestran algunos de los grupos de plantas que fueron aislados del primer *screening* con BASTA.



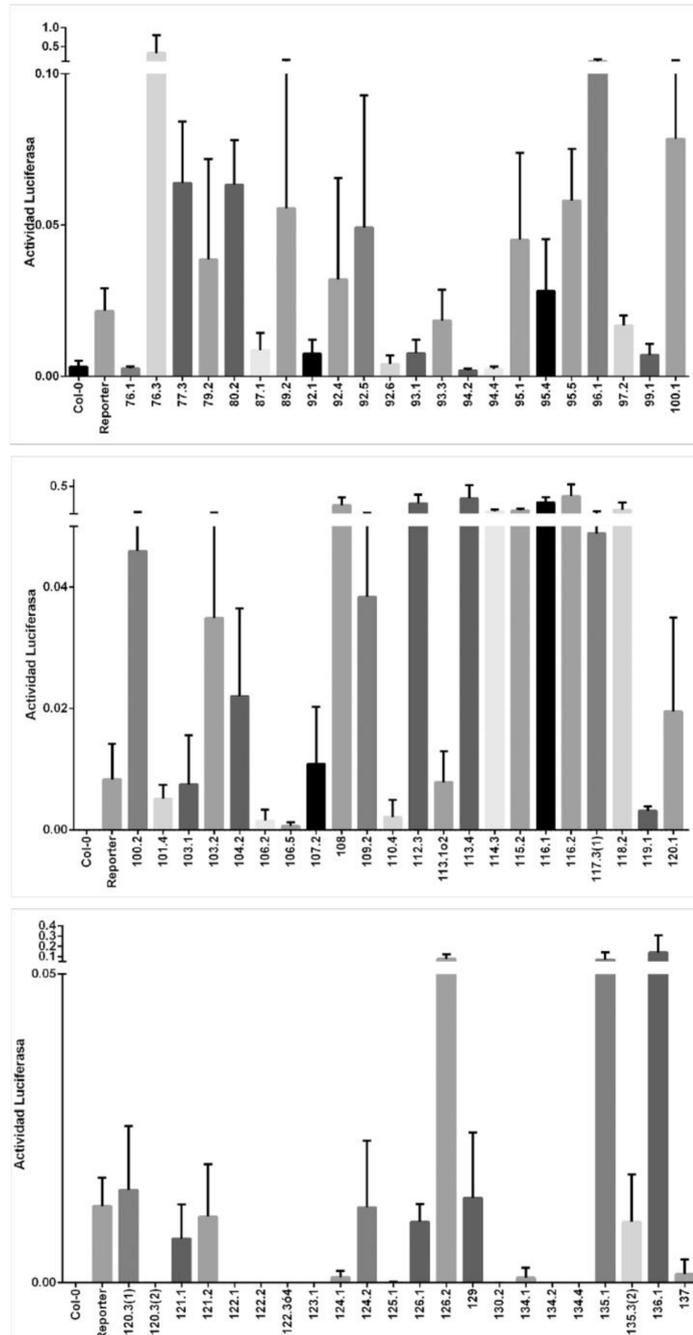
**Figura 24. *Screening* con el herbicida BASTA.** Algunas de las potenciales mutantes defectuosas en los mecanismos de biogénesis y/o acción de los miARNs obtenidas en la primer etapa del *screening* genético.

Para identificar aquellas mutantes de interés a los fines de este trabajo, se realizó por un lado la evaluación de los niveles de amiR:BASTA mediante sARN *blots* de aquellas plantas que recuperaron la resistencia al BASTA, y por otro lado la cuantificación de los niveles de bioluminiscencia en discos de hojas de dichas mutantes. Varias de las plantas que habían recuperado la resistencia al herbicida mostraban un fenotipo morfológico notoriamente afectado, característica esperable en una mutante con alteraciones en las vías de miARNs, siendo difícil la toma de muestra de discos de hojas. Por este motivo la medición de actividad de F-Luc se realizó sólo en aquellas plantas en las que fue posible la toma de muestra, y por ello no todas las mutantes a las que se le midieron los niveles de amiR:BASTA (Figura 25A), figuran en la cuantificación de la actividad de F-Luc (Figura 25B).

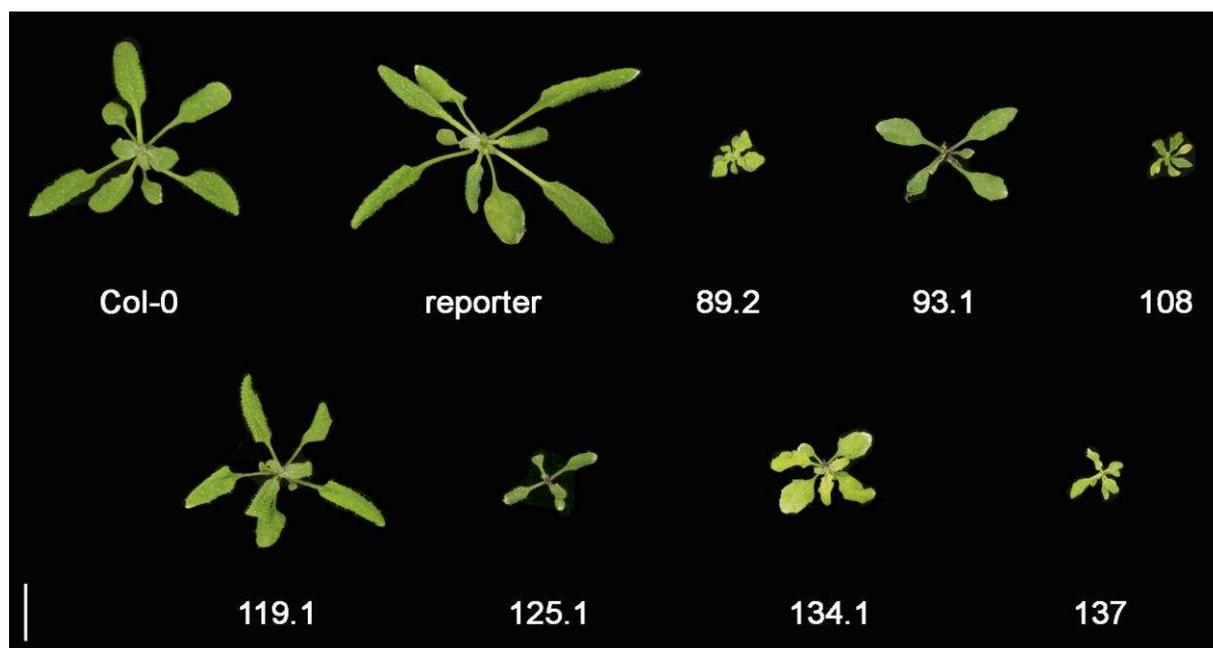
Las plantas con niveles de amiR:BASTA y actividad F-luc por debajo del control (reportero) fueron las seleccionadas para continuar con su secuenciación y determinar los polimorfismos causales de los fenotipos de interés. A su vez, algunas de las mutantes con niveles bajos de amiR:BASTA pero altos niveles de actividad F-Luc (por encima del reportero), llamaron nuestra atención, dado que ese patrón podría denotar un defecto fuerte en la maquinaria de biogénesis y/o acción de los miARNs. De esta forma, también seleccionamos algunas mutantes con estas características para continuar con su estudio. Así, para el primer grupo de mutantes de interés, nos quedamos con las líneas 87.1, 92.1, 92.6, 93.1, 99.1, 101.4, 106.2, 106.5, 119.1, 123.1, 124.1, 125.1, 134.1 y 137; en tanto que del segundo grupo de mutantes que llamaron nuestra atención, sólo nos quedamos con las líneas 89.2 y 108 (Figura 25A y 25B). Estas plantas fueron cruzadas con plantas de la línea del reportero salvaje, con el fin de generar los grupos de mapeo para la secuenciación de genoma completo. No todas las cruza fueron exitosas dado que muchas de las mutantes obtenidas presentaron severos defectos en sus órganos reproductivos, y no se obtuvieron semillas en los reiterados intentos de cruzarlas. De todas formas, aquellas mutantes de interés que pudieron ser cruzadas (líneas 89.2, 93.1, 108, 119.1, 125.1, 134.1 y 137), fueron reproducidas hasta alcanzar la segunda filial de semillas (Figura 26).



**B**



**Figura 25.** Screening sobre líneas mutantes independientes resistentes al herbicida BASTA. A) sARN *blot* para la detección de amiR:BASTA. En cada calle se sembraron 3 muestras independientes, esperando 20 min de corrida entre una muestra y otra. De esta forma, por cada calle se visualizan 3 bandas correspondientes al amiR:BASTA y a las U6. B) Medidas de bioluminiscencia para determinar niveles de actividad F-Luc.



**Figura 26. Líneas mutantes aisladas del *screening* genético.** Estas líneas son las que finalmente se retro-cruzaron con la línea del reportero salvaje a fin de armar posteriormente los grupos de mapeo para su secuenciación.

#### **9.4.4 Obtención de grupos de mapeo e identificación de mutaciones causales del fenotipo observado**

La segunda filial ( $F_2$ ) de semillas provenientes de la cruce entre las mutantes obtenidas y las plantas reportero salvajes, filial donde las mutaciones de forma azarosa vuelven a encontrarse en homocigosis, fueron sembradas en tierra con el herbicida BASTA a fin de seleccionar aquellas que fijaron la mutación causal de los fenotipos de interés. Entre la 2° o 3° semana de germinadas, se comenzaron a recolectar los grupos de mapeo tomando muestras de aproximadamente unas 300 plantas por cada mutante. Cabe destacar que como estas plantas son seleccionadas sólo bajo el criterio de su resistencia a BASTA, es de esperar que la única mutación que se encuentre en homocigosis en todas las plantas por igual sea la que causa la resistencia al herbicida (esquemático en Figura 20B). Una vez colectados los grupos de mapeo, se realizaron extracciones de ADN genómico para su secuenciación (sección 9.3.12). Las muestras de ADN fueron enviadas al Instituto Max-Planck de Biología del Desarrollo en Tübingen, Alemania, donde el Dr. Cambiagno, posdoc de nuestro laboratorio, realizó las bibliotecas necesarias y posterior secuenciación Illumina de genoma completo (sección 9.3.17). Una vez secuenciadas las mutantes, se realizó el mapeo *SHORE* (sección 9.3.18) para identificar los polimorfismos causales de los fenotipos de interés, trabajo realizado en colaboración con el Dr. Arce, investigador de nuestro laboratorio. En la Tabla 2 figuran los resultados obtenidos de este análisis, en el cual se filtraron aquellos genes en los que la mutación se ubicaba en las regiones intergénicas, 5' y

3' UTR, o aquellas que aparecían en regiones intrónicas a menos que dicha mutación genere un cambio en las secuencias dadoras oceptoras de *splicing*.

**Tabla 2.** Genes que presentan mutaciones puntuales en las plantas mutantes secuenciadas.

| Mutante | Gen       | Tipo de mutación | Región*                  | Cambio en la secuencia proteica** |
|---------|-----------|------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 89.2    | AT5G28350 | T → G            | CDS                      | F → V (Nonsyn)                    |
| 93.1    | AT2G24490 | C → T            | CDS                      | R → H (Nonsyn)                    |
|         | AT2G25700 | C → T            | CDS                      | C → Y (Nonsyn)                    |
|         | AT2G26810 | A → C            | CDS                      | D → E (Nonsyn)                    |
| 108     | AT1G39350 | T → C            | Sitio de <i>splicing</i> | -                                 |
|         | AT1G40104 | G → T            | CDS                      | G → V (Nonsyn)                    |
|         | AT1G40104 | G → T            | CDS                      | Q → H (Nonsyn)                    |
|         | AT1G50520 | T → A            | CDS                      | L → H (Nonsyn)                    |
| 137     | AT5G36320 | G → A            | CDS                      | Q → * (Nonsyn)                    |
|         | AT5G37150 | G → A            | CDS                      | A → T (Nonsyn)                    |

\*CDS: Secuencia Codificante (del inglés *Coding Sequence*)

\*\*Nonsyn: Sustitución No Sinónima (del inglés *Nonsynonymous substitution*)

Lamentablemente no todas las muestras que se enviaron para su secuenciación funcionaron, posiblemente por una baja profundidad de secuenciación en algunas de ellas, por errores durante el proceso de generación de los grupos de mapeo, o por co-dominancia entre dos mutaciones en la misma planta, y por tanto, no pudieron ser analizadas. Es importante aclarar en este punto que, hasta el momento, de los aproximadamente 300 grupos de mutantes obtenidos post-mutagénesis, sólo un tercio ha sido analizado para la obtención de mutantes de interés, quedando alrededor de 200 grupos más para evaluar a futuro.

#### 9.4.5 Caracterización preliminar de las mutantes identificadas

Con el fin de analizar los genes mutados en las plantas obtenidas, se comenzó por realizar una búsqueda en bases de datos como TAIR, BAR-Toronto, etc., a fin de identificar el tipo de proteína que estos genes codifican, y su patrón de expresión en la célula. De las 7 mutantes secuenciadas, hemos logrado asociar ciertas mutaciones al fenotipo observado en 4 de ellas (89.2, 93.1, 108 y 137). En el caso de la mutante 89.2, el único gen que aparece como un posible candidato a causar el fenotipo es AT5G28350. Este gen codifica para una proteína con dominios WD-repetitivos predichos por bioinformática, además de un dominio RIC1 conservado en levaduras [265]. Los dominios WD-repetitivos están asociados a interacciones proteína-proteína, en tanto que el dominio RIC1 se ha asociado al transporte de vesículas de endosoma al aparato de Golgi en levaduras [265]. Este gen se expresa prácticamente en toda la planta y en todos los estadios, pero no se ha descrito su función

hasta el momento. Por su parte, en la mutantes 93.1 se identificaron 3 genes candidatos a ser los causales del fenotipo observado. AT2G24490 es un gen que codifica para la Replicon Protein A 2 (RPA2), también conocido como ROR1, una proteína que forma parte del complejo RPA de unión a ADN simple cadena, asociado a los procesos de replicación, recombinación y reparación del ADN [266]–[268]. Se ha reportado que esta proteína cumple un rol importante en el mantenimiento del silenciamiento génico (TGS) pero no es requerida para la metilación del ADN, y además, no afecta los niveles de los ARNs pequeños. Se ha demostrado también que cumple una función en la reparación del ADN cuando es dañado con MMS (Metilmetanosulfonato) [266], [267]. También se ha demostrado que juega un papel importante en la regulación del desarrollo y mantenimiento del meristema apical del tallo [268], tejido en el que se expresa fuertemente. A su vez, también se expresa en raíces y hojas jóvenes en el estadio vegetativo, y en el gineceo de las flores en el estadio reproductivo. Por su parte, AT2G25700 codifica para ASK3 (Arabidopsis Skp1-related protein 3), una de las 19 proteínas relacionadas a Skp1, la cual forma parte del complejo E3 ubiquitin ligasa SCF [269], [270]. Este complejo marca proteínas por ubiquitinación para su degradación. Si bien ASK3 ha sido relacionada con este complejo, hasta el momento no se le ha asignado una función específica. Este gen se expresa mayormente en órganos reproductivos [270]. AT2G26810 codifica para una metiltransferasa putativa, pero hasta el momento no ha sido estudiado, por lo que no tiene una función asignada. Sin embargo, su expresión ubicua en toda la planta y en todos sus estadios sugiere que tendría una función importante. Para el caso de la mutante 108, el análisis por SHORE-map arrojó 3 genes que posiblemente estén asociados al fenotipo en ella observado. Sin embargo, de esos 3 genes, AT1G39350 sería un transposón, por lo que posiblemente deba descartarse como un candidato posible, en tanto que del gen AT1G40104 no aparece ninguna información en base de datos de su expresión, ni estudios que la describan, por ende, no tiene una función asignada hasta el momento. En tanto que el gen AT1G50520 codifica para una proteína de la familia Citocromo P450, proteínas asociadas a la producción de distintos pigmentos, antioxidantes, polímeros estructurales y compuestos de defensa. Este gen se expresa fuertemente en raíces, y semillas secas. Hasta el momento, tampoco se lo ha estudiado ni asignado una función particular. Por último, para la mutante 137 se han identificado dos genes candidatos. AT5G36320 codifica para una proteína de la familia ECA1 relacionadas al proceso de gametogénesis. Se expresa fuertemente en gineceo y óvulos, y tampoco se lo ha estudiado ni asignado una función específica. Además, no hemos encontrado disponibles mutantes por ADN-T en este gen. Finalmente, al gen AT5G37150 tampoco se le ha asignado una función particular, ni se ha descrito su perfil de expresión en la planta. Codifica para una proteína de la familia P-loop containing nucleoside triphosphate

hydrolases. En la Tabla 3 se describen brevemente, y a modo de resumen, todos los genes aquí mencionados.

Significativamente, ninguno de los genes, identificados como potencialmente implicados en la selección de hebras por AGO1, han sido descritos hasta el momento como componentes de las vías de los ARNs pequeños. Debido a que la técnica de mutagénesis por EMS genera mutaciones al azar, es frecuente encontrar múltiples mutaciones en la región del genoma asociada al fenotipo, como se puede observar en la Tabla 2. Para confirmar cuál de estos genes es verdaderamente el causal del fenotipo observado utilizamos dos aproximaciones. Por un lado, se adquirieron del ABRC mutantes insercionales para cada uno de estos genes. Una vez tengamos en nuestro poder dichas semillas, será confirmada la inserción en el gen de interés y su homocigosis por técnicas de PCR y posteriormente se procederá a evaluar su fenotipo molecular en relación a la acumulación de miARNs y miARN\*s. Por otro lado, nos encontramos en el proceso de clonado de los fragmentos genómicos (2.000 pb de promotor más el gen de interés conteniendo 5'UTR, exones e intrones) en vectores adecuados para la transformación de plantas. Utilizando estas construcciones, se transformarán las plantas mutantes y se verificará si esa construcción es capaz de compensar la mutación mediante la reversión del fenotipo observado a nivel morfológico y de acumulación de miARNs. Ambas aproximaciones se encuentran en proceso actualmente.

Una vez confirmados los genes mutados causales de los fenotipos de interés, se seguirá un esquema experimental que permita entender las funciones de estas proteínas en la carga diferencial de hebras, caracterización que excede a este trabajo de Tesis, y que será abordada a futuro en el laboratorio donde ha sido realizado este trabajo.

**Tabla 3.** Descripción de los genes candidatos obtenidos de la secuenciación de las mutantes obtenidas y posterior análisis por mapeo SHORE.

| Mutante | Gen       | Nombre                                                                           | Función                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Expresión según BAR                                                                                                                                                                                                | Mutantes disponibles                                                                                           |
|---------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 89.2    | AT5G28350 | amine dehydrogenase beta chain-like; RIC1-like guanyl-nucleotide exchange factor | No descripta. Predicha como una proteína con dominios repetitivos WD, asociados a interacciones proteína-proteína. También tiene un dominio predicho RIC1 conservado en proteínas levaduras involucradas en el transporte de vesículas derivadas de endosoma al aparato de Golgi [265].                         | Bajos niveles de expresión en semillas, silículas y meristema apical del tallo (SAM). Elevados niveles de expresión en general, en todos los órganos de la planta, tanto en estadios vegetativo como reproductivo. | SALK_069037<br>SALK_022134<br>SAIL_452_E05<br>GABI_317E10<br>GABI_103G09                                       |
| 93.1    | AT2G24490 | ATRPA2, ATRPA32A, REPLICON PROTEIN A2, RPA2, RPA32A, ROR1, SUPPRESSOR OF ROS1    | Componente del complejo proteico Replication Protein A (RPA). RPA2/ROR1 tiene importantes roles en el mantenimiento del TGS de forma independiente a la metilación del ADN y sin afectar la acumulación de sARNs endógenos, en reparación del ADN, y en la regulación del desarrollo del meristema [266]–[268]. | Se expresa en SAM, raíces y hojas jóvenes, y en el gineceo de flores.<br>Se localiza en núcleo.                                                                                                                    | <i>ror1-3;rpa2-5</i> (SALK_129173)<br><i>rpa2-4</i> (SALK_111834)<br>SALK_006944<br>SALK_056634<br>SALK_051729 |
|         | AT2G25700 | ASK3, SK3, SKP1-LIKE 3                                                           | Una de las 19 proteínas relacionadas a Skp1 (ASK3, <i>Arabidopsis Skp1-related protein 3</i> ), componente del complejo E3 ubiquitin ligase SCF, que marca proteínas por ubiquitinación para su degradación [269], [270].                                                                                       | Se expresa en flores, silicuas y semillas.<br>Se localiza tanto en núcleo como en citoplasma.                                                                                                                      | SALK_087897<br>SALK_087898<br>SALK_087905<br>SALK_087909                                                       |
|         | AT2G26810 | -                                                                                | No descripta. Es una metiltransferasa putativa. Gen no estudiado hasta el momento.                                                                                                                                                                                                                              | Se expresa en todos los órganos de la planta, tanto en estadios vegetativo como reproductivo.                                                                                                                      | SALK_144932<br>SALK_125244<br>SALK_024440<br>GABI_368A06                                                       |
| 108     | AT1G39350 | -                                                                                | Elemento transponible.                                                                                                                                                                                                                                                                                          | -                                                                                                                                                                                                                  | -                                                                                                              |
|         | AT1G40104 | -                                                                                | No descripta.                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | -                                                                                                                                                                                                                  | SALK_001185<br>SALK_001527                                                                                     |

|     |           |                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                    |                                                                          |
|-----|-----------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|     |           |                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                    | SALK_038007<br>GABI_167H12                                               |
|     | AT1G50520 | "CYTOCHROME P450, FAMILY 705, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 27", CYP705A27 | No descripta. Proteína de la familia Citocromo P450, proteínas involucradas en reacciones de hidroxilación dependientes de O <sub>2</sub> y NADPH, asociadas a diversos procesos de síntesis de pigmentos, antioxidantes, polímeros estructurales, y compuestos de defensa. | Se expresa fuertemente en raíces y semillas secas. | SALK_070485<br>SALK_134075<br>WiscoxDslox_507A01                         |
| 137 | AT5G36320 | -                                                                     | No descripta. Codifica para una proteína de la familia ECA1 relacionada a gametogénesis.                                                                                                                                                                                    | Fuerte expresión en gineceo y óvulos.              | -                                                                        |
|     | AT5G37150 | -                                                                     | No descripta. Es una proteína de la superfamilia <i>P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases</i> .                                                                                                                                                              | -                                                  | SALK_128896<br>SALK_127090<br>SAIL_192_A05<br>GABI_400E01<br>FLAG_265F05 |

## 9.5 DISCUSIÓN

En los últimos años se ha logrado un enorme avance en el conocimiento de cómo se producen y actúan los miARNs. Sin embargo, muchas etapas en esta vía aún permanecen poco comprendidas, destacando entre ellas los mecanismos que rigen la carga y selección de las hebras del miARN en el complejo efector RISC. Recientemente se ha propuesto que la carga de los miARNs en AGO1 no ocurre en el citosol como se pensaba, sino que es AGO1 quien ingresa al núcleo, se asocia a los miARNs maduros, y juntos son exportados al citosol [101]. Sin embargo, es poco nuestro conocimiento sobre cómo ocurre este proceso de carga en AGO1, y cómo esta proteína decide qué hebra de miARN debe retener y cuál debe liberar para su degradación. Por años se consideró al miARN\* como un simple subproducto de la biogénesis de miARNs sin función alguna, sin embargo, varios estudios en distintas especies como *Drosophila*, humanos y plantas demostraron que ambas hebras pueden ser retenidas por el complejo RISC y cumplir funciones específicas [158]–[160]. Incluso se ha observado que ambas hebras de un único miARN pueden ser retenidas específicamente en distintas proteínas AGO, disparando respuestas completamente diferentes [32], [125], [162], [253]. Más aún, se ha observado también que cada hebra de un mismo miARN puede ser preferencialmente cargada en AGO1, dependiendo del tejido o etapa del desarrollo [162]. Estas evidencias sugieren por un lado que ambas hebras de los miARNs pueden ser funcionales, y por otro que esta etapa sería otro nivel de regulación de la vía de silenciamiento por miARNs, a nivel de especificidad de carga en AGO1.

En este trabajo de Tesis, se diseñó y utilizó un sistema reportero doble que permitió aislar mutantes con alteraciones en la selección de la hebra que es retenida en AGO1; mutantes que permitirán estudiar este proceso, buscando comprender cómo AGO1 ejecuta la decisión de qué hebra debe retener, y a su vez, cuáles pueden ser los cofactores que regulan este proceso. Tras un extenso trabajo de diseño, puesta a punto y evaluación del sistema reportero, logramos obtener una herramienta única que nos permitió realizar experimentos de genética directa para encontrar las mutantes previamente mencionadas. Mediante mutagénesis por EMS y secuenciación de genoma completo, se logró identificar un conjunto de mutantes defectuosas en la selección de hebras de miARNs, así como también mutantes que sólo presentan alteraciones en la biogénesis y/o acción de los miARN sin afectar la selección de hebras. Cabe destacar que en este trabajo de Tesis, sólo se analizó un tercio de las mutantes obtenidas, y de estas, sólo una pequeña proporción de plantas fueron secuenciadas e identificadas las mutaciones que posiblemente causen la incorrecta selección de hebras. La decisión de reducir el número de plantas a analizar se debió a varias cuestiones y criterios considerados. En primer lugar, se decidió buscar mutantes solo en un tercio de los grupos obtenidos post-mutagénesis (90 de 300), por

cuestiones logísticas, de espacio requerido para su crecimiento, y para lograr que el proceso de *screening* completo se ajuste temporalmente al tiempo de ejecución de esta Tesis. Por otro lado, el reducido grupo de mutantes secuenciadas se debe a que, de aquellas mutantes seleccionadas con una potencial alteración en la selección de hebras, sólo algunas pudieron ser cruzadas, para luego obtener los grupos de mapeo. Además, sumamos a esta tanda de mutantes a secuenciar, dos que presentaron una alteración general de la vía. Dado los tiempos estipulados para este proyecto, se decidió entonces, sólo mandar los grupos de mapeo obtenidos en esta primera instancia a pesar de ser un número reducido, lo que nos permitió acotar los tiempos y costos de esta etapa del proyecto, y utilizarlo como una prueba piloto para determinar si la aproximación había funcionado correctamente. El resto de los grupos de mutantes no analizados, así como aquellas mutantes no secuenciadas, formarán parte de una segunda etapa de este proyecto que no coincidirá temporalmente con este trabajo de Tesis. En este sentido, este trabajo ha generado una invaluable y novedosa herramienta para futuros estudios relacionados a la selección y carga de las hebras de miARNs en AGO1.

Del conjunto de mutantes secuenciadas (7), no hemos podido identificar los genes causales del fenotipo en 3 de ellas. No son infrecuentes las fallas en la identificación de mutaciones asociadas a un fenotipo de interés, y en general, esto puede deberse a varios factores. Por un lado, problemas técnicos en la realización de las librerías y posterior secuenciación pueden conllevar a secuencias con baja cobertura. *SHORE-map*, el algoritmo usado para identificar SNPs en las plantas mutantes, necesita un nivel de cobertura alto en cada posición mutada para alcanzar el poder estadístico necesario para identificarlas. Este problema puede solucionarse simplemente secuenciando nuevamente las mismas muestras con el fin de ganar mayor nivel de cobertura. Por otro lado, el error puede deberse a una incorrecta recolección de los grupos de mapeos. Para que el análisis sea eficiente, es condición *sine qua non* que los grupos de mapeos sean puros, es decir, que durante la recolección de plantas mutantes (aproximadamente unas 300 plantas individuales) todas presenten el fenotipo de interés. A pesar de que esto a primera vista parece fácil, en ciertas mutantes la diferencia fenotípica es sutil, motivo por el cual es posible que puedan incluirse accidentalmente plantas que no presentan la mutación en cuestión. Una vez más, este problema es potencialmente solucionable repitiendo la toma de muestra de los grupos de mapeo, aumentando la astringencia en la selección de plantas a incluir en el grupo. Por último, un problema frecuente, y causado en parte por el gran número de mutaciones que el EMS incorpora en el genoma, es que un grupo de mapeo incluya todas plantas que presentan el fenotipo de interés, pero que no en todas estas plantas el fenotipo sea causado por mutaciones en un único gen. De esta forma, si la mutante aislada originalmente tiene mutaciones en dos o más genes que puedan dar el fenotipo de alteración en la carga y

selección de las hebras de miARNs, el algoritmo utilizado fallará en identificarlas. En este caso, la solución sería hacer segregarse estas mutaciones, en el caso en que se las pueda diferenciar fenotípicamente, y generar grupos de mapeo paralelos para cada fenotipo observado. A pesar de que estos tres problemas son potencialmente solucionables, lo más fácil es, dado el gran número de mutantes identificadas, proseguir con el análisis de otras mutantes en el futuro, descartando o postergando el re-análisis de aquellas que hayan presentado los problemas descriptos.

De todas formas, de las 7 mutantes secuenciadas, en 4 de ellas (89.2, 93.1, 108 y 137) logramos asociar determinados genes con SNPs al fenotipo de interés. A simple vista, la mayoría de los genes mutados obtenidos en este análisis, candidatos a ser los causales de alteraciones en la carga y selección de hebras de miARNs, no tienen funciones asociadas, y ninguno estaría relacionado, al menos hasta el momento, con los procesos de silenciamiento génico mediado por miARNs. Sólo uno de ellos, RPA2/ROR1 (AT2G24490), identificado como uno de los genes candidatos en la mutante 93.1, tiene localización nuclear y está asociado a regulación de la expresión de genes, aunque no mediada por miARNs [266]–[268]. Es interesante que este gen haya sido asociado a los procesos de reparación del ADN, dado que AGO1 también ha sido relacionado a dichos procesos [107], lo que deja abierta la pregunta de si ambas proteínas podrían participar de las mismas vías de reparación de ADN, y en algunos otros procesos. No menos interesante parece la proteína ASK3, también identificada en la mutante 93.1, ya que al formar parte del complejo E3 ubiquitin ligasa SCF [269], [270] podría estar participando en la marcación para degradación del algún factor importante en el proceso de carga y selección de hebras de miARNs por AGO1, al menos, en los tejidos donde este gen se expresa.

Con el objetivo de definir cuál de los genes mutados es el que confiere el fenotipo en cada mutante, en primer lugar, adquirimos del ABRC líneas mutantes por ADN-T para dichos genes, las cuales deberían replicar el fenotipo de alteración en la carga y selección de las hebras de miARNs en AGO1 si el gen en cuestión estuviese involucrado en dicho proceso. Por otro lado, comenzamos a clonar las versiones salvajes de todos estos genes, con las cuales transformaremos las plantas mutantes obtenidas. En este caso, sólo las copias salvajes de los genes que causen el fenotipo molecular buscado serán capaces de revertirlo. El análisis y caracterización, tanto molecular como mecanística de cada uno de estos genes, comprenderán una segunda etapa del proyecto que quedará fuera del marco de este trabajo de Tesis.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

## 10 CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusión general de este trabajo de Tesis, podemos remarcar que, en primer lugar, hemos logrado poner a punto un protocolo de sARN blot no radioactivo, que nos permitió la medición y cuantificación de niveles de numerosos miARNs durante todo este trabajo de Tesis, como así también en otros proyectos que se llevaron y se están llevando a cabo en nuestro laboratorio [148], [196], [197]. Además, este protocolo ha sido útil para otros laboratorios ajenos a nuestro instituto [198]–[200]. Esta parte de la Tesis, aunque parezca trivial, constituye una contribución fundamental para el laboratorio donde se realizó este trabajo, para el instituto de Agrobiotecnología del Litoral, y potencialmente para otros grupos ajenos al Instituto. En este sentido, el protocolo desarrollado está siendo utilizado constantemente en nuestro laboratorio, así como en colaboraciones con otros grupos. De la misma forma, se prevee su utilización indefinidamente a futuro.

En segundo lugar, identificamos a CARP9 a partir de una mutante obtenida previamente en nuestro laboratorio de un screening genético en el cual se buscaba identificar factores involucrados en la biogénesis y/o acción de los miARNs. Gracias a este trabajo de Tesis podemos decir que CARP9, una proteína previamente no descrita, es una proteína nuclear intrínsecamente desordenada, capaz de interactuar con HYL1 y AGO1 en el núcleo, actuando como anclaje entre ambas proteínas para permitir la correcta carga nuclear del dúplex de miARNs maduro en AGO1 post-procesamiento de su correspondiente precursor. Además, nuestros resultados sugieren que HYL1 actúa como “dador” del dúplex de miARN a AGO1 para su carga y posterior selección de la hebra correcta. La identificación y caracterización de CARP9 la posiciona como el primer factor conocido de la vía de miARNs en actuar exclusivamente en la interfase entre la maquinaria de biogénesis de miARNs y el complejo efector RISC. El estudio de mutantes en el gen *CARP9* ya permitió responder algunas preguntas fundamentales sobre la carga de miARNs en AGO1, y será un eslabón clave para el estudio de la dinámica de este proceso.

Por último, logramos desarrollar un sistema reportero de doble gatillo, como herramienta para la identificación de nuevos factores asociados al proceso de carga, selección y retención de hebras del dúplex de miARN, de modo de lograr comprender con mayor profundidad cómo es que AGO1 decide con qué hebra quedarse, y los mecanismos por los cuáles se dicta este proceso. Además del diseño y armado de esta herramienta, logramos también, mediante su utilización, la obtención de un importante número de potenciales mutantes con fallas en el proceso de selección y retención de la hebra correcta, como así también, otras mutantes con alteraciones en otros pasos de la vía de biogénesis y/o acción de los miARNs. A su vez, 4 mutantes obtenidas de este screening

fueron secuenciadas, obteniéndose los genes mutados potencialmente causales de los fenotipos observados. Estos genes, actualmente están siendo estudiados y caracterizados, con el objetivo de comprender su rol en el proceso de carga y selección de hebras de miARNs en AGO1. Un estudio más profundo de estos genes, y/o de otras mutantes obtenidas durante el desarrollo de este trabajo, quedarán disponibles para futuros proyectos del laboratorio, que trascienden al presentado en esta Tesis.

A modo de cierre, quisiera destacar que, con este trabajo de Tesis y los resultados obtenidos en el mismo, hemos realizado un valioso aporte a la comprensión de la vía de silenciamiento génico mediado por miARNs. En especial, quisiera resaltar la contribución de este trabajo en el estudio de la carga de los miARNs en AGO1, por un lado con la identificación de CARP9 como partícipe clave de este proceso, y por otro lado, con la generación de una invaluable colección de mutantes que servirá para el estudio de los procesos de selección de la hebra por AGO1.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] GC Ingram, R Waites (2006) Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (1):12–20.
- [2] L Taiz, E Zeiger (2003) *Plant physiology*, Third Edit., Sinauer Associates,.
- [3] MJ Axtell (2013) Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64 (1):137–159.
- [4] NG Bologna, O Voinnet (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65 (1):473–503.
- [5] AJ Hamilton, DC Baulcombe (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 (5441):950–952.
- [6] C Llave, KD Kasschau, MA Rector, JC Carrington (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14 (7):1605–1619.
- [7] C Llave, Z Xie, KD Kasschau, JC Carrington (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297 (5589):2053–2056.
- [8] BJ Reinhart, EG Weinstein, MW Rhoades, B Bartel, DP Bartel (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16 (13):1616–26.
- [9] RC Lee, RL Feinbaum, V Ambros (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5):843–854.
- [10] B Wightman, I Ha, G Ruvkun (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5):855–862.
- [11] RA Mosher, F Schwach, D Studholme, DC Baulcombe (2008) PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (8):3145–3150.
- [12] Z Xie, LK Johansen, AM Gustafson, KD Kasschau, AD Lellis, D Zilberman, SE Jacobsen, JC Carrington (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2 (5):642–652.
- [13] C Lu, K Kulkarni, FF Souret, R MuthuValliappan, SS Tej, RS Poethig, IR Henderson, SE Jacobsen, W Wang, PJ Green, BC Meyers (2006) MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res.* 16 (10):1276–1288.
- [14] JR Haag, TS Ream, M Marasco, CD Nicora, AD Norbeck, L Pasa-Tolic, CS Pikaard (2012) In Vitro Transcription Activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 Reveal Coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA Synthesis in Plant RNA Silencing. *Mol. Cell* 48 (5):811–

- 818.
- [15] ER Havecker, LM Wallbridge, TJ Hardcastle, MS Bush, KA Kelly, RM Dunn, F Schwach, JH Doonan, DC Baulcombe (2010) The arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22 (2):321–334.
- [16] AT Wierzbicki, JR Haag, CS Pikaard (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135 (4):635–48.
- [17] X Zhong, CJ Hale, JA Law, LM Johnson, S Feng, A Tu, SE Jacobsen (2012) DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19 (9):870–5.
- [18] AT Wierzbicki, R Cocklin, A Mayampurath, R Lister, M Jordan Rowley, BD Gregory, JR Ecker, H Tang, CS Pikaard (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes Dev.* 26 (16):1825–1836.
- [19] MA Matzke, RA Mosher (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15 (6):394–408.
- [20] D Schubert, B Lechtenberg, A Forsbach, M Gils, S Bahadur, R Schmidt (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16 (10):2561–2572.
- [21] A Deleris, J Gallago-Bartolome, J Bao, KD Kasschau, JC Carrington, O Voinnet (2006) Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313 (5783):68–71.
- [22] Z Luo, Z Chen (2007) Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19 (3):943–958.
- [23] IR Henderson, X Zhang, C Lu, L Johnson, BC Meyers, PJ Green, SE Jacobsen (2006) Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* 38 (6):721–5.
- [24] S Mi, T Cai, Y Hu, Y Chen, E Hodges, F Ni, L Wu, S Li, H Zhou, C Long, S Chen, GJ Hannon, Y Qi (2008) Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* 133 (1):116–127.
- [25] A Takeda, S Iwasaki, T Watanabe, M Utsumi, Y Watanabe (2008) The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* 49 (4):493–500.
- [26] H Vaucheret (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* 13 (7):350–358.

- [27] AJ Herr, A Molnàr, A Jones, DC Baulcombe (2006) Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (41):14994–15001.
- [28] M Yoshikawa, A Peragine, YP Mee, RS Poethig (2005) A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 19 (18):2164–2175.
- [29] E Allen, Z Xie, AM Gustafson, JC Carrington (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121 (2):207–21.
- [30] MJ Axtell, C Jan, R Rajagopalan, DP Bartel (2006) A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127 (3):565–77.
- [31] MD Howell, N Fahlgren, EJ Chapman, JS Cumbie, CM Sullivan, SA Givan, KD Kasschau, JC Carrington (2007) Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* 19 (3):926–42.
- [32] PA Manavella, D Koenig, D Weigel (2012) Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (7):2461–6.
- [33] TA Montgomery, MD Howell, JT Cuperus, D Li, JE Hansen, AL Alexander, EJ Chapman, N Fahlgren, E Allen, JC Carrington (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* 133 (1):128–141.
- [34] Q Fei, R Xia, BC Meyers (2013) Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks, *Plant Cell*, 25 (7). :2400–2415, Jul-2013.
- [35] F Vazquez, H Vaucheret, R Rajagopalan, C Lepers, V Gascioli, AC Mallory, JL Hilbert, DP Bartel, P Crété (2004) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell* 16 (1):69–79.
- [36] EJ Chapman, JC Carrington (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* 8 (11):884–896.
- [37] KD Kasschau, N Fahlgren, EJ Chapman, CM Sullivan, JS Cumbie, SA Givan, JC Carrington (2007) Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol.* 5 (3):0479–0493.
- [38] D Gagliardi, DA Cambiagno, AL Arce, AH Tomassi, JI Giacomelli, FD Ariel, PA Manavella (2019) Dynamic regulation of chromatin topology and transcription by inverted repeat-derived small RNAs in sunflower. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (35):17578–17583.
- [39] Y Zhao, L Cong, WJ Lukiw (2018) Plant and Animal microRNAs (miRNAs) and Their Potential for Inter-kingdom Communication. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38 (1):133–140.
- [40] S Li, C Castillo-González, B Yu, X Zhang (2017) The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *Plant J.* 90 (4):654–670.

- [41] Y Moran, M Agron, D Praher, U Technau (2017) The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nat. Ecol. Evol.* 1 (3):1–8.
- [42] JT Cuperus, N Fahlgren, JC Carrington (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23 (2):431–42.
- [43] MW Jones-Rhoades (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol. Biol.* 80 (1):3–16.
- [44] MJ Axtell, BC Meyers (2018) Revisiting criteria for plant microRNA annotation in the Era of big data. *Plant Cell* 30 (2):272–284.
- [45] NP Achkar, DA Cambiagno, PA Manavella (2016) miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends Plant Sci.* 21 (12):1034–1044.
- [46] Y Yu, J Tianran, X Chen (2017) The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytol* 216 (4):1002–1017.
- [47] J Wang, J Mei, G Ren (2019) Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Front. Plant Sci.* 10 (March):1–12.
- [48] PA Manavella, SW Yang, J Palatnik (2019) Keep calm and carry on: miRNA biogenesis under stress. *Plant J.* 99 (5):832–843.
- [49] Z Xie, E Allen, N Fahlgren, A Calamar, SA Givan, JC Carrington (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol.* 138 (4):2145–2154.
- [50] M Megraw, V Baev, V Rusinov, ST Jensen, K Kalantidis, AG Hatzigeorgiou (2006) MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA* 12 (9):1612–1619.
- [51] YJ Kim, B Zheng, Y Yu, SY Won, B Mo, X Chen (2011) The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* 30 (5):814–822.
- [52] M Hajheidari, S Farrona, B Huettel, Z Koncz, C Koncz (2012) CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *Plant Cell* 24 (4):1626–42.
- [53] L Wang, X Song, L Gu, X Li, S Cao, C Chu, X Cui, X Chen, X Cao (2013) NOT2 Proteins Promote Polymerase II-Dependent Transcription and Interact with Multiple MicroRNA Biogenesis Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 25 (2):715–727.
- [54] S Zhang, M Xie, G Ren, B Yu (2013) CDC5, a DNA binding protein, positively regulates posttranscriptional processing and/or transcription of primary microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:17588–93.
- [55] X Fang, Y Cui, Y Li, Y Qi (2015) Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in Arabidopsis. *Nat. Plants* 1 (6):15075.
- [56] Y Fang, DL Spector (2007) Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. *Curr. Biol.* 17 (9):818–823.
- [57] Q Liu, L Shi, Y Fang (2012) Dicing bodies. *Plant Physiol.* 158 (1):61–66.
- [58] W Park, J Li, R Song, J Messing, X Chen (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer

- homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 12 (17):1484–1495.
- [59] Y Kurihara, Y Watanabe (2004) *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (34):12753–12758.
- [60] MJ Axtell, JO Westholm, EC Lai (2011) Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol.* 12 (4):221.
- [61] F Vazquez, V Gascioli, P Crété, H Vaucheret (2004) The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr. Biol.* 14 (4):346–351.
- [62] D Lobbes, G Rallapalli, DD Schmidt, C Martin, J Clarke (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep* 7 (10):1052–1058.
- [63] L Yang, Z Liu, F Lu, A Dong, H Huang (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47 (6):841–850.
- [64] Z Dong, M-H Han, N Fedoroff (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (29):9970–5.
- [65] B Moro, U Chorostecki, S Arikiti, IP Suarez, C Höbartner, RM Rasia, BC Meyers, JF Palatnik (2018) Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Res.* 46 (20):10709–10723.
- [66] DA Re, PLM Lang, C Yones, AL Arce, G Stegmayer, D Milone, PA Manavella (2019) Alternative use of miRNA-biogenesis co-factors in plants at low temperatures. *Development* 146 (5):dev172932.
- [67] SW Yang, H-YY Chen, J Yang, S Machida, N-HH Chua, YA Yuan (2010) Structure of *Arabidopsis* Hyponastic Leaves1 and its molecular implications for miRNA Processing. *Structure* 18 (5):594–605.
- [68] X Yang, W Ren, Q Zhao, P Zhang, F Wu, Y He (2014) Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res.* 42 (19):12224–12236.
- [69] Y Kurihara, Y Takashi, Y Watanabe (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12 (2):206–212.
- [70] SP Grigg, C Canales, A Hay, M Tsiantis (2005) SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature* 437 (7061):1022–6.
- [71] S Machida, H-Y Chen, Y Adam Yuan (2011) Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Res.* 39 (17):7828–36.
- [72] BD Gregory, RC O'Malley, R Lister, MA Urich, J Tonti-Filippini, H Chen, AH Millar, JR Ecker (2008) A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis*

- development. *Dev. Cell* 14 (6):854–66.
- [73] S Laubinger, T Sachsenberg, G Zeller, W Busch, JU Lohmann, G Rättsch, D Weigel (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (25):8795–8800.
- [74] S Kim, JY Yang, J Xu, IC Jang, MJ Prigge, NH Chua (2008) Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiol.* 49 (11):1634–1644.
- [75] G Ren, M Xie, Y Dou, S Zhang, C Zhang, B Yu (2012) Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (31):12817–12821.
- [76] B Yu, L Bi, B Zheng, L Ji, D Chevalier, M Agarwal, V Ramachandran, W Li, T Lagrange, JC Walker, X Chen (2008) The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (29):10073–10078.
- [77] ER Morris, D Chevalier, JC Walker (2006) DAWDLE, a forkhead-associated domain gene, regulates multiple aspects of plant development. *Plant Physiol.* 141 (3):932–941.
- [78] S Machida, YA Yuan (2013) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* Dawdle forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding. *Mol. Plant* 6 (4):1290–300.
- [79] D Niu, YE Lii, P Chellappan, L Lei, K Peralta, C Jiang, J Guo, G Coaker, H Jin (2016) MiRNA863-3p sequentially targets negative immune regulator ARLPKs and positive regulator SERRATE upon bacterial infection. *Nat. Commun.* 7:11324.
- [80] J Yan, P Wang, B Wang, CC Hsu, K Tang, H Zhang, YJ Hou, Y Zhao, Q Wang, C Zhao, X Zhu, WA Tao, J Li, JK Zhu (2017) The SnRK2 kinases modulate miRNA accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 13 (4):1–21.
- [81] W Kim, M Benhamed, C Servet, D Latrasse, W Zhang, M Delarue, DX Zhou (2009) Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 19 (7):899–909.
- [82] X Fang, Y Shi, X Lu, Z Chen, Y Qi (2015) CMA33/XCT Regulates Small RNA Production through Modulating the Transcription of Dicer-Like Genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 8 (8):1227–1236.
- [83] S Li, R Xu, A Li, K Liu, L Gu, M Li, H Zhang, Y Zhang, S Zhuang, Q Wang, G Gao, N Li, C Zhang, Y Li, B Yu (2018) SMA1, a homolog of the splicing factor Prp28, has a multifaceted role in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 46 (17):9148–9159.

- [84] Z Xie, KD Kasschau, JC Carrington (2003) Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.* 13 (9):784–789.
- [85] R Rajagopalan, H Vaucheret, J Trejo, DP Bartel (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* 20 (24):3407–3425.
- [86] PA Manavella, J Hagmann, F Ott, S Laubinger, M Franz, B MacEk, D Weigel (2012) Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* 151 (4):859–870.
- [87] B Raghuram, AH Sheikh, Y Rustagi, AK Sinha (2015) MicroRNA biogenesis factor DRB1 is a phosphorylation target of mitogen activated protein kinase MPK3 in both rice and Arabidopsis. *FEBS J.* 282 (3):521–536.
- [88] NP Achkar, SK Cho, C Poulsen, AL Arce, DA Re, AJ Giudicatti, E Karayekov, MY Ryu, SW Choi, J Harholt, JJ Casal, SW Yang, PA Manavella (2018) A Quick HYL1-Dependent Reactivation of MicroRNA Production Is Required for a Proper Developmental Response after Extended Periods of Light Deprivation. *Dev. Cell* 46 (2):236-247.e6.
- [89] Z Zhang, X Guo, C Ge, Z Ma, M Jiang, T Li, H Koiwa, SW Yang, X Zhang (2017) KETCH1 imports HYL1 to nucleus for miRNA biogenesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (15):4011–4016.
- [90] SK Cho, S Ben Chaabane, P Shah, CP Poulsen, SW Yang (2014) COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nat. Commun.* 5:5867.
- [91] B Yu, Z Yang, J Li, S Minakhina, M Yang, RW Padgett, R Steward, X Chen (2005) Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307 (5711):932–935.
- [92] Z Yang, YW Ebright, B Yu, X Chen (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 Res.* 34 (2):667–75.
- [93] Y Huang, L Ji, Q Huang, DG Vassilyev, X Chen, J-B Ma (2009) Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461 (7265):823–7.
- [94] S Baranauske, M Mickute, A Plotnikova, A Finke, Č Venclovas, S Klimašauskas, G Vilkaitis (2015) Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res.* 43 (5):2802–2812.
- [95] X Fang, Y Qi (2015) RNAi in plants: An argonaute-centered view. *Plant Cell* 28 (2):272–285.
- [96] MR Smith, MR Willmann, G Wu, TZ Berardini, B Möller, D Weijers, RS Poethig (2009) Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- 106 (13):5424–5429.
- [97] T Iki, M Yoshikawa, M Nishikiori, MC Jaudal, E Matsumoto-Yokoyama, I Mitsuhara, T Meshi, M Ishikawa (2010) In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell* 39 (2):282–291.
- [98] T Iki, M Yoshikawa, T Meshi, M Ishikawa (2012) Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J.* 31 (2):267–278.
- [99] S Iwasaki, M Kobayashi, M Yoda, Y Sakaguchi, S Katsuma, T Suzuki, Y Tomari (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell* 39 (2):292–299.
- [100] KW Earley, RS Poethig (2011) Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 286 (44):38184–9.
- [101] NG Bologna, R Iselin, LA Abriata, A Sarazin, N Pumplin, F Jay, T Grentzinger, M Dal Peraro, O Voinnet (2018) Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol. Cell* 69 (4):709-719.e5.
- [102] K Nakanishi (2016) Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7 (5):637–660.
- [103] YP Mee, G Wu, A Gonzalez-Sulser, H Vaucheret, RS Poethig (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (10):3691–3696.
- [104] Y Zeng, BR Cullen (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32 (16):4776–85.
- [105] P Krishna, G Gloor (2001) The Hsp90 family of proteins in Arabidopsis thaliana. *Cell Stress Chaperones* 6 (3):238–246.
- [106] N Prunet, P Morel, AM Thierry, Y Eshed, JL Bowman, I Negrutiu, C Trehin (2008) Rebelote, Squint, and Ultrapetala1 function redundantly in the temporal regulation of floral meristem termination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 20 (4):901–919.
- [107] M Bajczyk, SS Bhat, L Szewc, Z Szweykowska-Kulinska, A Jarmolowski, J Dolata (2019) Novel nuclear functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: Beyond RNA interference. *Plant Physiol.* 179 (3):1030–1039.
- [108] AL Eamens, NA Smith, SJ Curtin, M-BB Wang, PM Waterhouse (2009) The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* 15 (12):2219–35.
- [109] D Samakovli, T Margaritopoulou, C Prassinou, D Milioni, P Hatzopoulos (2014) Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytol.* 203 (3):743–757.
- [110] W Wang, RQ Ye, Y Xin, XF Fang, CL Li, HQ Shi, XP Zhou, YJ Qi (2011) An Importin

- beta Protein Negatively Regulates MicroRNA Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23 (10):3565–3576.
- [111] Y Cui, X Fang, Y Qi (2016) TRANSPORTIN1 promotes the association of microRNA with ARGONAUTE1 in arabidopsis. *Plant Cell* 28 (10):2576–2585.
- [112] Á Dalmadi, P Gyula, J Bálint, G Szittyá, Z Havelda (2019) AGO-unbound cytosolic pool of mature miRNAs in plant cells reveals a novel regulatory step at AGO1 loading. *Nucleic Acids Res.* 47 (18):9803–9817.
- [113] A Mallory, H Vaucheret (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22 (12):3879–3889.
- [114] H-W Wang, C Noland, B Siridechadilok, DW Taylor, E Ma, K Felderer, JA Doudna, E Nogales (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (11):1148–53.
- [115] F Frank, J Hauver, N Sonenberg, B Nagar (2012) Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* 31 (17):3588–3595.
- [116] K-F Wei, L-J Wu, J Chen, Y Chen, D-X Xie (2012) Structural evolution and functional diversification analyses of argonaute protein. *J. Cell. Biochem.* 113 (8):2576–85.
- [117] B Moussian, H Schoof, A Haecker, G Jürgens, T Laux (1998) Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J.* 17 (6):1799–1809.
- [118] K Lynn, A Fernandez, M Aida, J Sedbrook, M Tasaka, P Masson, MK Barton (1999) The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* 126 (3):469–481.
- [119] AC Mallory, BJ Reinhart, MW Jones-Rhoades, G Tang, PD Zamore, MK Barton, DP Bartel (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: Importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J.* 23 (16):3356–3364.
- [120] Q Liu, X Yao, L Pi, H Wang, X Cui, H Huang (2009) The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in Arabidopsis. *Plant J.* 58 (1):27–40.
- [121] H Zhu, F Hu, R Wang, X Zhou, SH Sze, LW Liou, A Barefoot, M Dickman, X Zhang (2011) Arabidopsis argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* 145 (2):242–256.
- [122] T Iki, A Cléry, NG Bologna, A Sarazin, CA Brosnan, N Pumplin, FHT Allain, O Voinnet (2018) Structural Flexibility Enables Alternative Maturation, ARGONAUTE Sorting and Activities of miR168, a Global Gene Silencing Regulator in Plants. *Mol. Plant* 11 (8):1008–1023.
- [123] MR Tucker, T Okada, Y Hu, A Scholefield, JM Taylor, AMG Koltunow (2012) Somatic

- small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in arabidopsis. *Development* 139 (8):1399–1404.
- [124] N Maunoury, H Vaucheret (2011) AGO1 and AGO2 act redundantly in miR408-mediated Plantacyanin regulation. *PLoS One* 6 (12):e28729.
- [125] X Zhang, H Zhao, S Gao, WC Wang, S Katiyar-Agarwal, H Da Huang, N Raikhel, H Jin (2011) Arabidopsis Argonaute 2 Regulates Innate Immunity via miRNA393\*-Mediated Silencing of a Golgi-Localized SNARE Gene, MEMB12. *Mol. Cell* 42 (3):356–366.
- [126] W Wei, Z Ba, M Gao, Y Wu, Y Ma, S Amiard, CI White, JMR Danielsen, YG Yang, Y Qi (2012) A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 149 (1):101–112.
- [127] JJ Harvey, MG Lewsey, K Patel, J Westwood, S Heimstädt, JP Carr, DC Baulcombe (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6 (1):e14639.
- [128] N Pumplin, O Voinnet (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (11):745–60.
- [129] M Alazem, MH He, P Moffett, NS Lin (2017) Abscisic acid induces resistance against Bamboo mosaic virus through argonaute 2 and 3. *Plant Physiol.* 174 (1):339–355.
- [130] Y Qi, X He, XJ Wang, O Kohany, J Jurka, GJ Hannon (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 443 (7114):1008–1012.
- [131] X Zheng, J Zhu, A Kapoor, JK Zhu (2007) Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J.* 26 (6):1691–1701.
- [132] K Bohmert, I Camus, C Bellini, D Bouchez, M Caboche, C Banning (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 17 (1):170–180.
- [133] CA Kidner, RA Martienssen (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428 (6978):81–84.
- [134] C Sorin, JD Bussell, I Camus, K Ljung, M Kowalczyk, G Geiss, H McKhann, C Garcion, H Vaucheret, G Sandberg, C Bellini (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17 (5):1343–59.
- [135] L Yang, W Huang, H Wang, R Cai, Y Xu, H Huang (2006) Characterizations of a hypomorphic argonaute1 mutant reveal novel AGO1 functions in Arabidopsis lateral organ development. *Plant Mol. Biol.* 61 (1–2):63–78.
- [136] Y Qi, AM Denli, GJ Hannon (2005) Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol. Cell* 19 (3):421–8.
- [137] N Baumberg, DC Baulcombe (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer

- that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (33):11928–11933.
- [138] E Lanet, E Delannoy, R Sormani, M Floris, P Brodersen, P Crété, O Voinnet, C Robaglia (2009) Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *Plant Cell* 21 (6):1762–8.
- [139] P Brodersen, L Sakvarelidze-Achard, H Schaller, M Khafif, G Schott, A Bendahmane, O Voinnet (2012) Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (5):1778–1783.
- [140] S Li, L Liu, X Zhuang, Y Yu, X Liu, X Cui, L Ji, Z Pan, X Cao, B Mo, F Zhang, N Raikhel, L Jiang, X Chen (2013) MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* 153 (3):562–574.
- [141] H Vaucheret, AC Mallory, DP Bartel (2006) AGO1 Homeostasis Entails Coexpression of MIR168 and AGO1 and Preferential Stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell* 22 (1):129–136.
- [142] H Vaucheret (2009) AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One* 4 (7):1–9.
- [143] H-M Chen, L-T Chen, K Patel, Y-H Li, DC Baulcombe, S-H Wu (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (34):15269–74.
- [144] JT Cuperus, A Carbonell, N Fahlgren, H Garcia-Ruiz, RT Burke, A Takeda, CM Sullivan, SD Gilbert, TA Montgomery, JC Carrington (2010) Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (8):997–1003.
- [145] B Wang, CG Duan, X Wang, YJ Hou, J Yan, C Gao, JH Kim, H Zhang, JK Zhu (2015) HOS1 regulates Argonaute1 by promoting transcription of the microRNA gene MIR168b in Arabidopsis. *Plant J.* 81 (6):861–870.
- [146] A Barghetti, L Sjögren, M Floris, EB Paredes, S Wenkel, P Brodersen (2017) Heat-shock protein 40 is the key farnesylation target in meristem size control, abscisic acid signaling, and drought resistance. *Genes Dev.* 31 (22):2282–2295.
- [147] L Sjögren, M Floris, A Barghetti, F Völlmy, R Linding, P Brodersen (2018) Farnesylated heat shock protein 40 is a component of membrane-bound RISC in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 293 (43):16608–16622.
- [148] X Zhang, Y-R Yuan, Y Pei, S-S Lin, T Tuschl, DJ Patel, N-H Chua (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20 (23):3255–68.
- [149] N Baumberger, C-H Tsai, M Lie, E Havecker, DC Baulcombe (2007) The Polerovirus

- silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* 17 (18):1609–14.
- [150] PD Hare, HS Seo, J-Y Yang, N-H Chua (2003) Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (5):453–62.
- [151] T Cardozo, M Pagano (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (9):739–51.
- [152] J Callis (2014) The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arab. B.* 12:e0174.
- [153] M Pazhouhandeh, M Dieterle, K Marrocco, E Lechner, B Berry, V Brault, O Hemmer, T Kretsch, KE Richards, P Genschik, V Ziegler-Graff (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (6):1994–1999.
- [154] K Earley, M Smith, R Weber, B Gregory, R Poethig (2010) An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence* 1 (1):15.
- [155] B Derrien, N Baumberger, M Schepetilnikov, C Viotti, J De Cillia, V Ziegler-Graff, E Isono, K Schumacher, P Genschik (2012) Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (39):15942–6.
- [156] MH Chiu, IH Chen, DC Baulcombe, CH Tsai (2010) The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11 (5):641–649.
- [157] DA Ré, DA Cambiagno, AL Arce, AH Tomassi, M Giustozzi, P Casati, FD Ariel, PA Manavella (2019) CURLY LEAF regulates micro RNA activity by controlling ARGONAUTE 1 degradation in plants. *Mol. Plant* S1674-2052 (19):30327–2.
- [158] HA Meijer, EM Smith, M Bushell (2014) Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? *Biochem. Soc. Trans.* 42 (4):1135–1140.
- [159] K Okamura, N Liu, EC Lai (2009) Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol. Cell* 36 (3):431–444.
- [160] B Czech, R Zhou, Y Erlich, J Brennecke, R Binari, C Villalta, A Gordon, N Perrimon, GJ Hannon (2009) Hierarchical Rules for Argonaute Loading in *Drosophila*. *Mol. Cell* 36 (3):445–456.
- [161] Y Yu, T Jia, X Chen (2017) The “how” and “where” of plant microRNAs. *New Phytol.* 216 (4):1002–1017.
- [162] PA Manavella, D Koenig, I Rubio-Somoza, HA Burbano, C Becker, D Weigel (2013) Tissue-specific silencing of *arabidopsis* SU(VAR)3-9 HOMOLOG8 by miR171a\*1[W][OA]. *Plant Physiol.* 161 (2):805–812.
- [163] O Voinnet (2009) Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* 136 (4):669–687.

- [164] K Rogers, X Chen (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25 (7):2383–2399.
- [165] Y Zeng, R Yi, BR Cullen (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (17):9779–9784.
- [166] G Hutvagner, PD Zamore (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297 (5589):2056–2060.
- [167] P Brodersen, L Sakvarelidze-Achard, M Bruun-Rasmussen, P Dunoyer, YY Yamamoto, L Sieburth, O Voinnet (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320 (5880):1185–1190.
- [168] CY Hou, WC Lee, HC Chou, AP Chen, SJ Chou, HM Chen (2016) Global analysis of truncated RNA ends reveals new insights into Ribosome Stalling in plants. *Plant Cell* 28 (10):2398–2416.
- [169] S Li, B Le, X Ma, S Li, C You, Y Yu, B Zhang, L Liu, L Gao, T Shi, Y Zhao, B Mo, X Cao, X Chen (2016) Biogenesis of phased siRNAs on membrane-bound polysomes in Arabidopsis. *Elife* 5:1–24.
- [170] X Yu, MR Willmann, SJ Anderson, BD Gregory (2016) Genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts reveals a role for the nuclear mrna cap-binding complex in cotranslational rna decay in arabidopsis. *Plant Cell* 28 (10):2385–2397.
- [171] L Arribas-Hernández, LJ Kielbinski, P Brodersen (2016) mRNA decay of most arabidopsis miRNA targets requires slicer activity of AGO1. *Plant Physiol.* 171 (4):2620–2632.
- [172] MA German, M Pillay, DH Jeong, A Hetawal, S Luo, P Janardhanan, V Kannan, LA Rymarquis, K Nobuta, R German, E De Paoli, C Lu, G Schroth, BC Meyers, PJ Green (2008) Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat. Biotechnol.* 26 (8):941–946.
- [173] L Ji, X Liu, J Yan, W Wang, RE Yumul, YJ Kim, TT Dinh, J Liu, X Cui, B Zheng, M Agarwal, C Liu, X Cao, G Tang, X Chen (2011) ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 7 (3):e1001358.
- [174] FF Souret, JP Kastenmayer, PJ Green (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell* 15 (2):173–183.
- [175] F Ibrahim, J Rohr, WJ Jeong, J Hesson, H Cerutti (2006) Untemplated oligoadenylation promotes degradation of RISC-cleaved transcripts. *Science* 314 (5807):1893.
- [176] G Ren, M Xie, S Zhang, C Vinovskis, X Chen, B Yu (2014) Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylates 5' RNA fragments

- generated by AGO1 cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (17):6365–70.
- [177] X Wang, S Zhang, Y Dou, C Zhang, X Chen, B Yu, G Ren (2015) Synergistic and Independent Actions of Multiple Terminal Nucleotidyl Transferases in the 3' Tailing of Small RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 11 (4):1–17.
- [178] Z Zhang, F Hu, MW Sung, C Shu, C Castillo-González, H Koiwa, G Tang, M Dickman, P Li, X Zhang (2017) RISC-interacting clearing 3'- 5' exoribonucleases (RICES) degrade uridylated cleavage fragments to maintain functional RISC in Arabidopsis thaliana. *Elife* 6:e24466.
- [179] A Branscheid, A Marchais, G Schott, H Lange, D Gagliardi, SU Andersen, O Voinnet, P Brodersen (2015) SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 43 (22):10975–88.
- [180] H Lange, SYA Ndecky, C Gomez-Diaz, D Pflieger, N Butel, J Zumsteg, L Kuhn, C Piermaria, J Chicher, M Christie, ES Karaaslan, PLM Lang, D Weigel, H Vaucheret, P Hammann, D Gagliardi (2019) RST1 and RIPR connect the cytosolic RNA exosome to the Ski complex in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 10 (1).
- [181] M Yoshikawa, T Iki, Y Tsutsui, K Miyashita, R Scott Poethig, Y Habu, M Ishikawa (2013) 3' fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and SGS3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (10):4117–4122.
- [182] L Yang, G Wu, RS Poethig (2012) Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:315–320.
- [183] Hoki Iwakawa, Y Tomari (2013) Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol. Cell* 52 (4):591–601.
- [184] JC Alwine, DJ Kemp, GR Stark (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (12):5350–5354.
- [185] T Blevins (2010) Northern Blotting Techniques for Small RNAs. *Methods Mol. Biol.* 631:87–107.
- [186] E Varkonyi-Gasic, RP Hellens (2011) Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol. Biol.* 744:145–157.
- [187] V Salone, M Rederstorff (2015) Stem-Loop RT-PCR Based Quantification of Small Non-Coding RNAs. *Methods Mol. Biol.* 1296:103–108.
- [188] E Varkonyi-Gasic, R Wu, M Wood, EF Walton, RP Hellens (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3 (1):12.

- [189] SW Yang, T Vosch (2011) Rapid detection of microRNA by a silver nanocluster DNA probe. *Anal. Chem.* 83 (18):6935–6939.
- [190] LH Yang, SL Wang, LL Tang, B Liu, W Le Ye, LL Wang, ZY Wang, MT Zhou, BC Chen (2014) Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One* 9 (12):1–13.
- [191] S Honda, Y Kirino (2015) Dumbbell-PCR: a method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences. *Nucleic Acids Res.* 43 (12):e77.
- [192] CJ Harris, A Molnar, SY Müller, DC Baulcombe, SY Müller, DC Baulcombe (2015) FDF-PAGE: A powerful technique revealing previously undetected small RNAs sequestered by complementary transcripts. *Nucleic Acids Res.* 43 (15):7590–7599.
- [193] SW Kim, Z Li, PS Moore, AP Monaghan, Y Chang, M Nichols, B John (2010) A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res.* 38 (7):e98.
- [194] Q Huang, Z Mao, S Li, J Hu, Y Zhu (2014) A non-radioactive method for small RNA detection by northern blotting. *Rice* 7 (1):26.
- [195] M Schwarzkopf, NA Pierce (2016) Multiplexed miRNA northern blots via hybridization chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 44 (15):e129.
- [196] AG Francisco-Mangilet, P Karlsson, MH Kim, HJ Eo, SA Oh, JH Kim, FR Kulcheski, SK Park, PA Manavella (2015) THO2, a core member of the THO/TREX complex, is required for microRNA production in Arabidopsis. *Plant J.* 82 (6):1018–1029.
- [197] P Karlsson, MD Christie, DK Seymour, H Wang, X Wang, J Hagmann, F Kulcheski, PAA Manavella (2015) KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (45):14096–14101.
- [198] DA Cambiagno, F Nota, D Zavallo, S Rius, P Casati, S Asurmendi, ME Alvarez (2018) Immune receptor genes and pericentromeric transposons as targets of common epigenetic regulatory elements. *Plant J.* 96 (6):1178–1190.
- [199] L Garcia, N Mansilla, N Ocampos, MA Pagani, E Welchen, DH Gonzalez (2019) The mitochondrial copper chaperone COX19 influences copper and iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 99 (6):621–638.
- [200] D Gemmill, S D'souza, V Meier-Stephenson, TR Patel (2019) Current approaches for RNA-labelling to identify RNA-binding proteins. *Biochem. Cell Biol.* 30:1–11.
- [201] GM Church, W Gilbert (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (7 l):1991–1995.
- [202] G Engler-Blum, M Meier, J Frank, GA Müller (1993) Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 210 (2):235–244.

- [203] T McCreery (1997) Digoxigenin Labeling. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* 7 (2):121–124.
- [204] NG Bologna, AL Schapire, J Zhai, U Chorostecki, J Boissouvier, BC Meyers, JF Palatnik (2013) Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Res.* 23 (10):1675–1689.
- [205] H Zhu, Y Zhou, C Castillo-González, A Lu, C Ge, Y-TT Zhao, L Duan, Z Li, MJ Axtell, X-JJ Wang, X Zhang (2013) Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (9):1106–15.
- [206] J Li, Z Yang, B Yu, J Liu, X Chen (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15 (16):1501–7.
- [207] V Jauvion, T Elmayan, H Vaucheret (2010) The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in arabidopsis. *Plant Cell* 22 (8):2697–2709.
- [208] K Schneeberger, S Ossowski, C Lanz, T Juul, AH Petersen, KL Nielsen, J-E Jørgensen, D Weigel, SU Andersen (2009) SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat. Methods* 6 (8):550–1.
- [209] RP Hellens, E Anne Edwards, NR Leyland, S Bean, PM Mullineaux (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42 (6):819–832.
- [210] D Hanahan (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4):557–580.
- [211] C Koncz, J Schell (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *MGG Mol. Gen. Genet.* 204 (3):383–396.
- [212] M Vidal (1997) The Reverse Two-Hybrid System, En: *The Two-Hybrid System*, (Ed: P. Bartel and S. Fields), Oxford University Press, Oxford, UK, p. :109–147.
- [213] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory,.
- [214] HC Bimboim, J Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6):1513–1523.
- [215] SJ Clough, AF Bent (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16 (6):735–743.
- [216] FF de Felippes, D Weigel (2010) Transient assays for the analysis of miRNA processing and function. *Methods Mol. Biol.* 592:255–264.
- [217] T Canto, JF Uhrig, M Swanson, KM Wright, SA MacFarlane (2006) Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J. Virol.* 80 (18):9064–72.

- [218] E Westhof (2004) How to silence silencing. *Chem. Biol.* 11 (2):158–160.
- [219] MF Kramer (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs, En: *Current Protocols in Molecular Biology*, (15), (Ed: F. M. Ausube), Blackwell Publishing Inc., p. :Supp 95.
- [220] B Charrier, A Champion, Y Henry, M Kreis (2002) Expression profiling of the whole Arabidopsis Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* 130 (2):577–590.
- [221] M Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1–2):248–254.
- [222] UK Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680–685.
- [223] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak, A Cardona (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7):676–682.
- [224] W Wang, RQ Ye, Y Xin, XF Fang, CL Li, HQ Shi, XP Zhou, YJ Qi (2011) An Importin beta Protein Negatively Regulates MicroRNA Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23 (10):3565–3576.
- [225] D Gietz, A St Jean, RA Woods, RH Schiestl (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20 (6):1425.
- [226] S Fields (1993) The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions. *Methods* 5 (2):116–124.
- [227] DM Goodstein, S Shu, R Howson, R Neupane, RD Hayes, J Fazo, T Mitros, W Dirks, U Hellsten, N Putnam, DS Rokhsar (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue):D1178-86.
- [228] K Katoh, DM Standley (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30 (4):772–80.
- [229] S Capella-Gutiérrez, JM Silla-Martínez, T Gabaldón (2009) trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25 (15):1972–1973.
- [230] J Trifinopoulos, L-T Nguyen, A von Haeseler, BQ Minh (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44 (W1):W232-5.
- [231] AL Mitchell, TK Attwood, PC Babbitt, M Blum, P Bork, A Bridge, SD Brown, HY Chang, S El-Gebali, MI Fraser, J Gough, DR Haft, H Huang, I Letunic, R Lopez, A Luciani, F Madeira, A Marchler-Bauer, H Mi, DA Natale, M Necci, G Nuka, C Orengo, AP Pandurangan, T Paysan-Lafosse, S Pesseat, SC Potter, MA Qureshi, ND

- Rawlings, N Redaschi, LJ Richardson, C Rivoire, GA Salazar, A Sangrador-Vegas, CJA Sigrist, I Sillitoe, GG Sutton, N Thanki, PD Thomas, SCE Tosatto, SY Yong, RD Finn (2019) InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1):D351–D360.
- [232] D Piovesan, F Tabaro, L Paladin, M Necci, I Micetic, C Camilloni, N Davey, Z Dosztányi, B Mészáros, AM Monzon, G Parisi, E Schad, P Sormanni, P Tompa, M Vendruscolo, WF Vranken, SCE Tosatto (2018) MobiDB 3.0: more annotations for intrinsic disorder, conformational diversity and interactions in proteins. *Nucleic Acids Res.* 46 (D1):D471–D476.
- [233] AM Waterhouse, JB Procter, DMA Martin, M Clamp, GJ Barton (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25 (9):1189–91.
- [234] S El-Gebali, J Mistry, A Bateman, SR Eddy, A Luciani, SC Potter, M Qureshi, LJ Richardson, GA Salazar, A Smart, ELL Sonnhammer, L Hirsh, L Paladin, D Piovesan, SCE Tosatto, RD Finn (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1):D427–D432.
- [235] A Shilatifard, WS Lane, KW Jackson, RC Conaway, JW Conaway (1996) An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* 271 (5257):1873–1876.
- [236] Y Li, AS Fanning, JM Anderson, A Lavie (2005) Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: Identification of the ZO-1 binding surface. *J. Mol. Biol.* 352 (1):151–164.
- [237] CM Van Itallie, JM Anderson (2018) Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do, *Tissue Barriers*, 6 (1). Taylor and Francis Inc., 02-Jan-2018.
- [238] E Potenza, T Di Domenico, I Walsh, SCE Tosatto (2015) MobiDB 2.0: An improved database of intrinsically disordered and mobile proteins. *Nucleic Acids Res.* 43 (D1):D315–D320.
- [239] P Tompa, E Schad, A Tantos, L Kalmar (2015) Intrinsically disordered proteins: Emerging interaction specialists, *Current Opinion in Structural Biology*, 35. Elsevier Ltd, :49–59, 01-Dec-2015.
- [240] MS Cortese, VN Uversky, A Keith Dunker (2008) Intrinsic disorder in scaffold proteins: Getting more from less, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98 (1). :85–106, Sep-2008.
- [241] VN Uversky, IM Kuznetsova, KK Turoverov, B Zaslavsky (2015) Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. *FEBS Lett.* 589 (1):15–22.

- [242] M Varadi, F Zsolyomi, M Guharoy, P Tompa, YK Levy (2015) Functional advantages of conserved intrinsic disorder in RNA-binding proteins. *PLoS One* 10 (10).
- [243] Al Järvelin, M Noerenberg, I Davis, A Castello (2016) The new (dis)order in RNA regulation, *Cell Communication and Signaling*, 14 (1). BioMed Central Ltd., 06-Apr-2016.
- [244] X Fang, L Wang, R Ishikawa, Y Li, M Fiedler, F Liu, G Calder, B Rowan, D Weigel, P Li, C Dean (2019) Arabidopsis FLL2 promotes liquid–liquid phase separation of polyadenylation complexes, *Nature*, 569 (7755). Nature Publishing Group, :265–269, 09-May-2019.
- [245] J V. Cabello, JI Giacomelli, C V. Piattoni, AA Iglesias, RL Chan (2016) The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic Arabidopsis plants. *J. Biotechnol.* 222:73–83.
- [246] S Ben Chaabane, R Liu, V Chinnusamy, Y Kwon, JH Park, SY Kim, JK Zhu, SW Yang, BH Lee (2013) STA1, an Arabidopsis pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 41 (3):1984–1997.
- [247] J Dolata, M Bajczyk, D Bielewicz, K Niedojadlo, J Niedojadlo, H Pietrykowska, W Walczak, Z Szweykowska-Kulinska, A Jarmolowski (2016) Salt stress reveals a new role for ARGONAUTE1 in miRNA biogenesis at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Plant Physiol.* 172 (1):297–312.
- [248] C Liu, Y Xin, L Xu, Z Cai, Y Xue, Y Liu, D Xie, Y Liu, Y Qi (2018) Arabidopsis ARGONAUTE 1 Binds Chromatin to Promote Gene Transcription in Response to Hormones and Stresses. *Dev. Cell* 44 (3):348-361.e7.
- [249] C Schalk, V Cognat, S Graindorge, T Vincent, O Voinnet, J Molinier (2017) Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA damage-binding protein 2 and argonaute 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (14):E2965–E2975.
- [250] Z Ma, C Castillo-González, Z Wang, D Sun, X Hu, X Shen, ME Potok, X Zhang (2018) Arabidopsis Serrate Coordinates Histone Methyltransferases ATXR5/6 and RNA Processing Factor RDR6 to Regulate Transposon Expression. *Dev. Cell* 45 (6):769-784.e6.
- [251] C Speth, EX Szabo, C Martinho, S Collani, S zur Oven-Krockhaus, S Richter, I Droste-Borel, B Macek, YD Stierhof, M Schmid, C Liu, S Laubinger (2018) Arabidopsis RNA processing factor SERRATE regulates the transcription of intronless genes. *Elife* 7.
- [252] P Tompa, D Kovacs (2010) Intrinsically disordered chaperones in plants and animals, in *Biochemistry and Cell Biology*, 2010, 88 (2), :167–174.
- [253] E a Devers, A Branscheid, P May, F Krajinski (2011) Stars and Symbiosis: MicroRNA- and MicroRNA\*-Mediated Transcript Cleavage Involved in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiol.* 156 (4):1990–2010.

- [254] A Peragine, M Yoshikawa, G Wu, HL Albrecht, RS Poethig (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 18 (19):2368–2379.
- [255] JD-P Bull., undefined 1987 A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *ci.nii.ac.jp* .
- [256] S Picelli, AK Björklund, B Reinius, S Sagasser, G Winberg, R Sandberg (2014) Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res.* 24 (12):2033–2040.
- [257] AM Bolger, M Lohse, B Usadel (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114–2120.
- [258] B Langmead, SL Salzberg (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9 (4):357–359.
- [259] H Li, B Handsaker, A Wysoker, T Fennell, J Ruan, N Homer, G Marth, G Abecasis, R Durbin (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25 (16):2078–2079.
- [260] H Sun, K Schneeberger (2015) SHOREmap v3.0: fast and accurate identification of causal mutations from forward genetic screens. *Methods Mol. Biol.* 1284:381–95.
- [261] T Dalmay, A Hamilton, S Rudd, S Angell, DC Baulcombe, S Rna (2000) An RNA-Dependent RNA Polymerase Gene in Arabidopsis Is Required for Posttranscriptional Gene Silencing Mediated by a Transgene but Not by a Virus. 101:543–553.
- [262] C Béclin, S Boutet, P Waterhouse, H Vaucheret (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* 12 (8):684–688.
- [263] AH Tomassi, D Gagliardi, DA Cambiagno, PA Manavella (2017) Nonradioactive Detection of Small RNAs Using Digoxigenin-Labeled Probes. *Methods Mol. Biol.* 1640:199–210.
- [264] Y Kim, KS Schumaker, J-KZ Zhu (2006) EMS Mutagenesis of Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 323:101–3.
- [265] K Morohashi, E Grotewold (2009) A Systems Approach Reveals Regulatory Circuitry for Arabidopsis Trichome Initiation by the GL3 and GL1 Selectors. *PLoS Genet.* 5 (2):e1000396.
- [266] T Elmayer, F Proux, H Vaucheret (2005) Arabidopsis RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Curr. Biol.* 15 (21):1919–1925.
- [267] A Kapoor, M Agarwal, A Andreucci, X Zheng, Z Gong, PM Hasegawa, RA Bressan, JK Zhu (2005) Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA- methylation-independent manner in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15 (21):1912–1918.

- [268] R Xia, J Wang, C Liu, Y Wang, Y Wang, J Zhai, J Liu, X Hong, X Cao, JK Zhu, Z Gong (2006) ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (1):85–103.
- [269] N Takahashi, H Kuroda, T Kuromori, T Hirayama, M Seki, K Shinozaki, H Shimada, M Matsui (2004) Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol.* 45 (1):83–91.
- [270] MH Dezfulian, DM Soulliere, RK Dhaliwal, M Sareen, WL Crosby (2012) The SKP1-Like Gene Family of *Arabidopsis* Exhibits a High Degree of Differential Gene Expression and Gene Product Interaction during Development. *PLoS One* 7 (11):e50984.

# **ANEXO**

Tabla A1. Construcciones utilizadas en esta Tesis.

| Nombre | Construcción                                                           | Descripción                                                                                                                                                                                     | Referencia             |
|--------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| pPM168 | amiR:BASTA::rbcS::Pro <sub>35S</sub> ::<br>F-Luc                       | amiR:BASTA fusionado al terminador de la transcripción <i>rbcS</i> , seguido del Pro <sub>35S</sub> y el ADNc de la <i>F-Luc</i> en el vector de entrada Gateway pJL-Blue.                      | Este trabajo           |
| pPM225 | F-Luc <sub>modificada</sub>                                            | ADNc de la <i>F-Luc</i> modificada versión 3 en el vector de entrada Gateway pENTR1A.                                                                                                           | Este trabajo           |
| pAT001 | amiR:BASTA::rbcS::Pro <sub>35S</sub> ::<br>F-Luc <sub>modificada</sub> | amiR:BASTA fusionado al terminador de la transcripción <i>rbcS</i> , seguido del Pro <sub>35S</sub> y el ADNc de la <i>F-Luc</i> modificada versión 3 en el vector de entrada Gateway pJL-Blue. | Este trabajo           |
| pAT002 | Reportero Doble Gatillo                                                | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del y amiR:BASTA y el ADNc de la <i>F-Luc</i> modificada versión 3.                                                                                  | Este trabajo           |
| pAT007 | CARP9                                                                  | ADNc de <i>CARP9</i> en el vector de entrada Gateway pENTR™/D-TOPO®                                                                                                                             | Este trabajo           |
| pAT011 | Pro <sub>35S</sub> ::CARP9                                             | Promotor 35S (Pro <sub>35S</sub> ) dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> .                                                                                                           | Este trabajo           |
| pAT015 | Pro <sub>35S</sub> ::eGFP:CARP9                                        | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionado a <i>eGFP</i> .                                                                                                   | Este trabajo           |
| pAT016 | Pro <sub>35S</sub> ::mCherry:CARP9                                     | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionado a <i>mCherry</i> .                                                                                                | Este trabajo           |
| pAT019 | Pro <sub>ADH1</sub> ::GAL4AD:CARP9                                     | Pro <sub>ADH1</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4</i> (AD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.                          | Este trabajo           |
| pAT020 | Pro <sub>ADH1</sub> ::GAL4BD:CARP9                                     | Pro <sub>ADH1</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionado al dominio de unión a ADN de <i>GAL4</i> (BD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.                         | Este trabajo           |
| pAT026 | Pro <sub>35S</sub> ::CARP9:N-Citrina                                   | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CARP9</i> fusionado a la mitad N-terminal de <i>Citrina</i> .                                                                         | Este trabajo           |
| pPM029 | Pro <sub>35S</sub> ::eGFP:SERRATE                                      | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>SERRATE</i> fusionado a <i>eGFP</i> .                                                                                                 | Manavella et al., 2012 |
| pPM082 | Pro <sub>35S</sub> ::eGFP:HYL1                                         | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i> fusionado a <i>eGFP</i> .                                                                                                    | Manavella et al., 2012 |
| pPM115 | Pro <sub>35S</sub> ::mCherry:DCL1                                      | Pro <sub>35S</sub> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>DCL1</i> fusionado a <i>mCherry</i> .                                                                                                 | Manavella et al., 2012 |
| pPM273 | Pro <sub>ADH1</sub> ::GAL4AD:HYL1                                      | Pro <sub>ADH1</sub> dirigiendo la expresión del                                                                                                                                                 | Manavella              |

|            |                                             |                                                                                                                                                                                |                                         |
|------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|            |                                             | ADNc de <i>HYL1</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4</i> (AD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.                                                          | et al., 2012                            |
| pPM275     | <i>Pro<sub>ADH1</sub>::GAL4AD:SE</i>        | <i>Pro<sub>ADH1</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>SERRATE</i> fusionado al dominio de activación de <i>GAL4</i> (AD) para ensayo de doble híbrido en levaduras. | Manavella et al., 2012                  |
| pPM334     | <i>Pro<sub>35S</sub>::AGO1:C-Citrina</i>    | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>AGO1</i> fusionado a a mitad C-terminal de la <i>Citrina</i> .                                                 | Este trabajo                            |
| pPM360     | <i>Pro<sub>35S</sub>::eGFP:CPL1</i>         | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>CPL1</i> fusionado a <i>eGFP</i> .                                                                             | Manavella et al., 2012                  |
| pPM363     | <i>Pro<sub>35S</sub>::HYL1:C-Citrina</i>    | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HYL1</i> fusionado a la mitad C-terminal de la <i>Citrina</i> .                                                | Manavella et al., 2012                  |
| pPM401     | <i>Pro<sub>35S</sub>::SERRATE:C-Citrina</i> | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>SERRATE</i> fusionado a la mitad C-terminal de la <i>Citrina</i> .                                             | Manavella et al., 2012                  |
| pDC090     | <i>Pro<sub>35S</sub>::DCL1:C-Citrina</i>    | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>DCL1</i> fusionado a la mitad C-terminal de la <i>Citrina</i> .                                                | Este trabajo                            |
| pPM085     | Reportero                                   | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>F-Luc</i> y <i>amiRLUC</i> .                                                                                   | Manavella et al., 2012                  |
| S/N        | <i>Pro<sub>35S</sub>::eGFP</i>              | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>eGFP</i> .                                                                                                     | Este trabajo                            |
| S/N        | <i>Pro<sub>35S</sub>::HaHB11:C-Citrina</i>  | <i>Pro<sub>35S</sub></i> dirigiendo la expresión del ADNc de <i>HaHB11</i> fusionado a la mitad C-terminal de la <i>Citrina</i> .                                              | Cedida por la Dra. Raquel L. Chan (IAL) |
| pEXP-AD502 | <i>Pro<sub>ADH1</sub>::GAL4AD</i>           | <i>Pro<sub>ADH1</sub></i> dirigiendo la expresión del dominio de activación de <i>GAL4</i> (AD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.                                     | Manavella et al., 2012                  |
| pDB-Leu    | <i>Pro<sub>ADH1</sub>::GAL4BD</i>           | <i>Pro<sub>ADH1</sub></i> dirigiendo la expresión del dominio de unión a ADN de <i>GAL4</i> (BD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.                                    | Manavella et al., 2012                  |

**Tabla A2.** Oligonucleótidos de ADN y sondas utilizadas en esta Tesis.

| <b>Gen/ARN pequeño</b> | <b>Secuencia</b>                                                 | <b>Utilizado en</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>amiR:LUC</i>        | CGG GAA AAC GCT GGG CGT TAA                                      | sARN blot           |
| <i>amiR:BASTA</i>      | AAG CAC GGT CAA CTT CCG TA                                       | sARN blot           |
| <i>amiR:BASTA*</i>     | TGA ATA CGG ATG TTG ACC GTG A                                    | sARN blot           |
| <i>miR156a-f</i>       | GTG CTC ACT CTC TTC TGT CA                                       | sARN blot           |
| <i>miR157</i>          | GTG CTC TCT ATC TTC TGT CA                                       | sARN blot           |
| <i>miR159a</i>         | TAG AGC TCC CTT CAA TCC AAA                                      | sARN blot           |
| <i>miR161a</i>         | CCC CGA TGT AGT CAC TTT CAA                                      | sARN blot           |
| <i>miR164a-b</i>       | TGC ACG TGC CCT GCT TCT CCA                                      | sARN blot           |
| <i>miR166a-g</i>       | GGG GAA TGA AGC CTG GTC CGA                                      | sARN blot           |
| <i>miR167a</i>         | TAG ATC ATG CTG GCA GCT TCA                                      | sARN blot           |
| <i>miR168a-b</i>       | TTC CCG ACC TGC ACC AAG CGA                                      | sARN blot           |
| <i>miR171</i>          | GAT ATT GGC GCG GCT CAA TC                                       | sARN blot           |
| <i>miR319a</i>         | GGG AGC TCC CTT CAG TCC AA                                       | sARN blot           |
| <i>U6</i>              | GCT AAT CTT CTC TGT ATC GTT CC                                   | sARN blot           |
| <i>ARF8</i>            | F: CCA CCA CTG CCT TCT CCA<br>R: TTC AGC AGC TAC CAC GAG CTG     | qPCR                |
| <i>SCL6</i>            | F: CGT GAA AGC CTC TCA CTG GCG<br>R: CAG CCG GAG ATA GAG AAG CTG | qPCR                |
| <i>TCP4</i>            | F: CAA CCG ATA CAG GAA ACG GAG<br>R: CTG GTA TGC GAA AAC CCG AAG | qPCR                |
| <i>NF-YA9</i>          | F: GGG TAC TGG AGG ACG GTT TG<br>R: CGG GGA CTG AGT AAC ATG ACC  | qPCR                |
| <i>AP2</i>             | F: GGT GTC GAA CAA ACC CAA AT<br>R: TAC ACG TAC TTC GCC GAC AA   | qPCR                |
| <i>APS4</i>            | F: CTC CGT GAC AAA AAG CTT CCA                                   | qPCR                |

|                         |                                                                                                                                       |          |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                         | R: CAA ATC GAT GCG ACT CGA CG                                                                                                         |          |
| <i>ACA10</i>            | F: TAC CAA AGG TGG CTT TTA GTG GT<br>R: AAC CGA AGA TGC CGT TTG C                                                                     | qPCR     |
| <i>ACTIN2/8</i>         | F: GGT AAC ATT GTG CTC AGT GGT GG<br>R: GGA GAT CCA CAT CTG CTG GAA TG                                                                | qPCR     |
| <i>HYL1</i>             | F: CAG AAG CAA GCC ACG CAT AAC<br>R: CTC AAT CGA CCA CCA AAT TGT ACC                                                                  | qPCR     |
| <i>SERRATE</i>          | F: GGA CCT GCC CCT TTT CTG TT<br>R: GCC CTT TAA CCC AAC CCG AA                                                                        | qPCR     |
| <i>AGO1 (Primers A)</i> | F: TCG GTG GAC AGA AGT GGG AAT A<br>R: CCA AAG AAC GTG GTA ATG AGC AGG                                                                | qPCR     |
| <i>AGO1 (Primers B)</i> | F: GAC CTT CTT CTG GAC CAC CG<br>R: GTA GGC TGA GAA GAC ACC GC                                                                        | qPCR     |
| <i>CARP9</i>            | F: GTT GGG GCA AGA CCT TGG G<br>R: AAC GTT TGT GTC TCT CCC CAT A                                                                      | qPCR     |
| <i>Pri-amiR:LUC</i>     | F: ACA AAC ACA CGC TCG GAC GCA T<br>R: ATA ACG CGC AGC GTT TTC TCG                                                                    | qPCR     |
| <i>Pri-miR156a</i>      | F: GTT AAA ACT CAG ATC TAA CAC AAA G<br>R: GAG AAC GAA GAC AGG CCA AAG                                                                | qPCR/RIP |
| <i>Pri-miR164a</i>      | F: CCC TCA TGT GCT TGG AAA TG<br>R: GCA AAT GAG ACG GAT TTC GTG                                                                       | qPCR     |
| <i>Pri-miR167a</i>      | F: TCC TTT GTT GTG TTT CAT GAC GAT<br>R: ACG GGT GAA ACT GCG AAC A                                                                    | qPCR/RIP |
| <i>Pri-miR168a</i>      | F: GGA ACC AAT TCG GCT GAC AC<br>R: GGG ATC CAA TCC CTG CTC AC                                                                        | qPCR     |
| <i>Pri-miR171a</i>      | F: TTT CCT TTG ATA TCC GCA CTT TAA G<br>R: TCC ATT TCA ACA CAC ACA TAC AAA TC                                                         | qPCR/RIP |
| <i>miR160</i>           | RT: GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC<br>GCA CTG GAT ACG ATG GCA T<br>F: TGG TAT GCC TGG CTC CCT GT<br>R: GTG CAG GGT CCG AGG T | RIP      |
| <i>miR164a</i>          | F: CCC TCA TGT GCT TGG AAA TG<br>R: GCA AAT GAG ACG GAT TTC GTG                                                                       | RIP      |

|                                             |                                                                                                                                          |                                                       |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>miR173</i>                               | RT: GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC<br>GCA CTG GAT ACG AGT GAT T<br>F: AGG ACA TTC GCT TGC AGA GAG A<br>R: GTG CAG GGT CCG AGG T | RIP                                                   |
| <i>MIR159A</i>                              | F: GAT CTG ACG ATG GAA GTA GAG<br>R: TAA AGC TCC TGA GAT ATG CA                                                                          | ChIP                                                  |
| <i>MIR164A</i>                              | F: TGC ACG TAC TTA ACT TCT CCA<br>R: ACA CTT ACA TAT ATG AGA ACT                                                                         | ChIP                                                  |
| <i>MIR165A</i>                              | F: GGG GAA TGT TGT CTG GAT CGA<br>R: GGA TGA AGC CTG GTC CGA G                                                                           | ChIP                                                  |
| <i>MIR166A</i>                              | F: TCT TCG GAC CAG GCT TCA TTC<br>R: CAA ACA ATC AAT AAC GCA TGT A                                                                       | ChIP                                                  |
| <i>CARP9</i>                                | F: CAC CAT GTT CAA AGG ATC GTC GAA AC<br>R: TCA ATC TTT TCC ATG AGA TGA TG                                                               | Clonado                                               |
| <i>CARP9</i> sin codón de stop              | F: CAC CAT GTT CAA AGG ATC GTC GAA AC<br>R: GAT CTT TTC CAT GAG ATG ATG CGT A                                                            | Clonado                                               |
| <i>ADN-T</i> <i>mutantes</i><br><i>SALK</i> | F: ATT TTG CCG ATT TCG GAA C<br>(LBb1.3)                                                                                                 | Genotipado<br>Mutantes<br>SALK                        |
| <i>CARP9</i> alelo salvaje                  | F: TGA GTC TGG CTT TCA CGA AAC<br>R: ATA CCC CTC GAA CAT ATT GGC                                                                         | Genotipado<br><i>SALK_03256</i><br>( <i>carp9-2</i> ) |
| <i>CARP9</i> (plantas transgénicas pAT011)  | F: CTC CAA ACG AGC ATC CAC ATC CC<br>R: TCA ATC TTT TCC ATG AGA TGA TG                                                                   | Chequeo de inserción<br>pAT011                        |

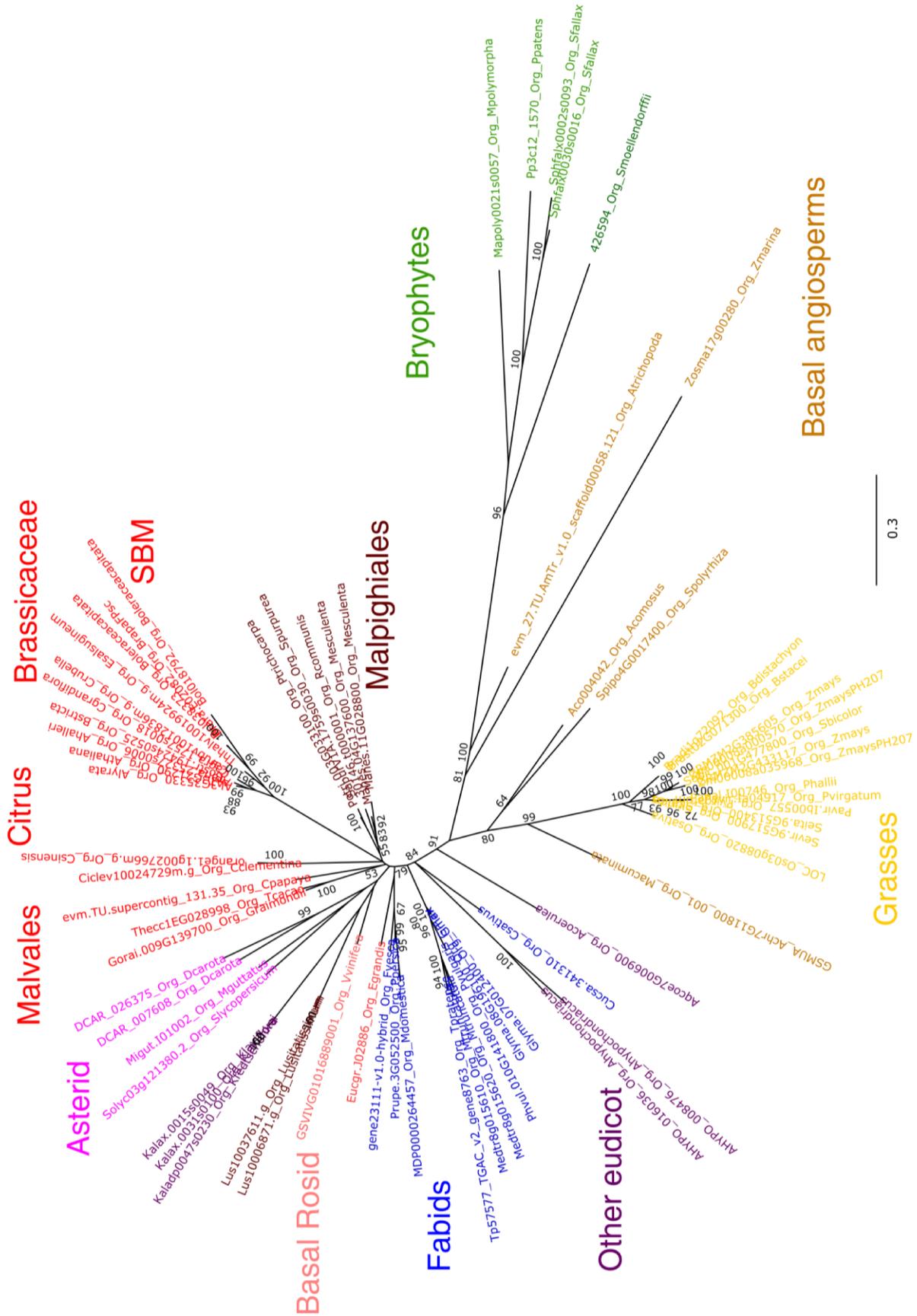


Figura A1. Conservación de CARP9 entre plantas. Árbol filogenético consenso de genes homólogos a CARP9 en plantas embriófitas. Los colores representan diferentes linajes de especies de plantas; los genes individuales aparecen anotados en esta versión del árbol que se muestran en la figura 11C.