



**“Estudio de la localización de HYL1 durante el desarrollo escotomorfogénico de *Arabidopsis thaliana*”**

Sacnun, Juan Manuel

Tesina para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Director: González Schain, Nahuel

Año 2018

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Nahuel Gonzalez Schain por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesina bajo su dirección, por su infinita paciencia, su apoyo incondicional y sus mil consejos.

Al Dr. Rasia por el apoyo brindado y por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A Robi, Flor, Marco y al resto del lab 5 por la ayuda que me brindaron cuando los necesité, y sobre todo por haber hecho de mi tesina un tiempo agradable tanto en el laboratorio como fuera de él.

A Diego Aguirre, por el consejo y cuidado de las plantas que usé durante todo este trabajo.

A la Dra. Florencia Ércoli, por dedicar su tiempo a ayudarme con los experimentos de fluorescencia.

A mi familia que me permitió estudiar y me brindó su apoyo de principio a fin.

A mis amigos de la facu que compartieron conmigo años de alegrías, festejos, estudio, y son los grandes responsables de que hoy este terminando esta etapa.

A mis amigos, por ser mi cable a tierra cuando lo necesite, y recordarme que hay una vida más allá de la facultad.

A todos muchas gracias!

# Índice

Índice .....	I
Abreviaturas y palabras extraídas del inglés .....	III
Resumen .....	IV
1. Introducción.....	1
1.1. Biogénesis de microARNs en plantas .....	1
1.2. Importancia biológica de HYL1 .....	2
1.3. Escotomorfogénesis.....	4
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo general .....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. Materiales y Métodos .....	8
3.1. Material vegetal utilizado .....	8
3.2. Esterilización superficial de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
3.3. Cultivo de plantas en tierra.....	8
3.4. Cultivo de plantas <i>in vitro</i> .....	8
3.5. Técnicas basadas en ácidos nucleicos .....	9
3.5.1. Extracción de ADN plasmídico .....	9
3.5.2. Extracción de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> .....	9
3.5.3. Extracción de ARN de <i>Arabidopsis</i> .....	9
3.5.4. Tratamiento de ARN con DNAsas .....	10
3.5.5. Síntesis de ADNc.....	10
3.5.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	11
3.6. Electroforesis en geles de agarosa .....	11
3.7. Digestión con enzimas de restricción .....	11
3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	11
3.9. PCR en tiempo real.....	12
3.10. Sistema de clonado <i>GreenGate</i> .....	13
3.11. Métodos de transformación .....	15
3.11.1. Preparación de células competentes .....	15
3.11.2. Preparación de células electrocompetentes .....	16
3.11.3. Transformación de células bacterianas .....	16
3.11.4. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
3.11.5. Selección de líneas transformadas .....	18
3.11.6. Análisis de segregación de las líneas transformadas .....	18
3.12. Medición de ángulo de apertura del <i>hook</i> y longitud de hipocotilo .....	19

3.13. Cuantificación de fluorescencia.....	19
3.14. Análisis estadístico .....	20
3.15. Oligonucleótidos utilizados .....	20
3.16. Número de acceso de genes utilizados .....	21
4. Resultados.....	22
4.1. Caracterización de líneas transgénicas de Arabidopsis que expresan la fusión HYL1-CFP.....	22
4.1.1. Generación de las líneas pHYL1::HYL1-CFP .....	22
4.1.2. Análisis fisiológico de las líneas pHYL1::HYL1-CFP .....	24
4.1.3. Niveles de fluorescencia en las líneas pHYL1::HYL1-CFP .....	26
4.1.4. Localización y cuantificación de HYL1 durante el desarrollo escotomorfogénico.....	29
4.1.5. Fluorescencia en semilla.....	30
4.1.6. Análisis de expresión de <i>HYL1</i> .....	32
4.1.7. Expresión de precursores de miARN 166a en escotomorfogénesis.....	35
4.1.8. Análisis de expresión de <i>HY5</i> y <i>PIF3</i> .....	36
4.1.9. Localización de SERRATE durante la escotomorfogénesis .....	38
4.2. Construcción de un sistema inducible de expresión de HYL1 <i>in planta</i> .....	39
5. Discusión y Conclusiones.....	44
6. Referencias Bibliográficas.....	48

## Abreviaturas y palabras extraídas del inglés

Buffer	Solución amortiguadora de pH
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
CFP	Proteína cian fluorescente
Kb	Kilo pares de bases
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige & Skoog
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
G	Fuerza centrífuga relativa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T-DNA	ADN de transferencia
P/V	Peso por Volumen
ON	Overnight
kDa	KiloDalton
RT	Room Temperature
ATP	Trifosfato de Adenosina
PPT	Fosfínotricina

Se omitieron las abreviaturas comunes del idioma español, del Sistema Internacional de Unidades y símbolos muy usuales en bioquímica.

## Resumen

En la presente Tesina se estudió detalladamente la localización subcelular de la proteína HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) en diferentes tejidos durante el desarrollo escotomorfogénico de *Arabidopsis Thaliana*. El estudio se realizó por microscopía confocal de fluorescencia mediante la utilización de plantas transgénicas que expresan la proteína de fusión HYL1-CFP.

HYL1 es una proteína clave para la biogénesis de microARNs (miARNs), ARNs pequeños que regulan negativamente un gran número de genes en múltiples procesos biológicos en *Arabidopsis*. Mutantes en HYL1 no consiguen procesar los precursores primarios de miARNs (pri-miARNs). En consecuencia, estos mutantes presentan alteraciones fenotípicas en hojas, flores o en el crecimiento general de la planta, lo que da la pauta de los procesos de desarrollo en los que los miARNs están involucrados.

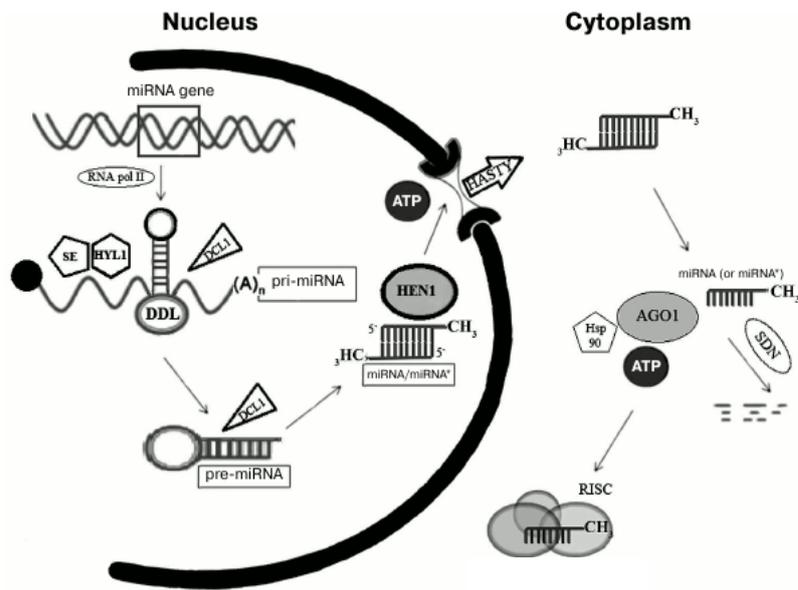
Durante el desarrollo de plántulas en oscuridad, o escotomorfogénesis, el hipocotilo se elonga rápida y exageradamente para alcanzar la luz, y los cotiledones y el gancho apical (o *hook*) se mantienen cerrados para proteger las células meristemáticas. Estudios previos de este laboratorio mostraron que mutantes nulos de *HYL1* (*hyl1-2*) presentan un desarrollo escotomorfogénico alterado, elongan el hipocotilo en menor medida y abren el *hook* más rápidamente que las plantas silvestres. La apertura temprana del gancho apical es un fenotipo característico de mutantes en *HYL1* y no en mutantes de otras proteínas involucradas en el procesamiento de miARNs, llevando a pensar que HYL1 podría estar cumpliendo una función biológica diferente durante este proceso. Estudios en otros sistemas mostraron que el complejo de procesamiento de miARNs se ensambla y actúa en el núcleo. En consecuencia, comprender si los componentes de procesamiento de miARNs están igualmente activos en los distintos tejidos de la plántula durante la escotomorfogénesis podría ayudar a entender mejor como la plántula regula este proceso. En el presente trabajo se observó en distintas líneas que expresaban HYL1::HYL1-CFP que, si bien HYL1 se encuentra presente en todos los tejidos durante la escotomorfogénesis, sus niveles van disminuyendo a través del tiempo. Además, se observó una mayor estabilidad de HYL1 en el *hook* respecto del hipocotilo. Adicionalmente, se generaron plantas transgénicas, en el fondo mutante *hyl1-2*, para expresar *HYL1* fusionado a GFP y a un *tag* 3x cMYC en sus extremos, bajo un promotor inducible por etanol que permitirán, en el futuro, un abordaje distinto para entender mejor el papel de HYL1 en la escotomorfogénesis.

# 1. Introducción

## 1.1. Biogénesis de microARNs en plantas

Los microARNs (miARNs) son una clase de ARNs pequeños (sARNs) endógenos que regulan negativamente la expresión de ARNs mensajeros a través del reconocimiento de secuencias complementarias <sup>1</sup>. Los miARNs conforman una de las familias más abundantes y estudiadas de los sARNs de plantas, con un papel central en el control de múltiples procesos biológicos. A día de hoy, se han identificado diversas familias de sARNs generadas endógenamente en plantas, las cuales regulan procesos tan diversos como la degradación de ARNs mensajeros, inhibición de la traducción, modificación de la cromatina o reparación del ADN <sup>2</sup>. Su regulación sobre transcritos diana juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, en la identidad celular, y en la respuesta a patógenos y a condiciones de estrés <sup>2</sup>. Esta regulación es crucial para el desarrollo normal de múltiples procesos biológicos, de manera conservada, en organismos tan diversos como ciliados, hongos, animales o plantas <sup>3</sup>.

La biosíntesis de miARNs es un proceso complejo que se lleva a cabo en varias etapas y en las que están involucradas numerosas proteínas (Figura 1). Los transcritos primarios de los miARNs (pri-miARN) son sintetizados por la ARN polimerasa II y contienen al miARN en una estructura en forma de hebillas. Este transcrito es procesado, en el núcleo, de manera precisa para dar un producto de aproximadamente 22 nucleótidos. El considerado cuerpo principal del complejo de procesamiento de miARNs está compuesto por la endoribonucleasa DICER LIKE1 (DCL1), la proteína con dedos de zinc SERRATE (SE) y la proteína de unión a ARN doble hebra HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) <sup>4</sup>. Éstas juegan un papel primordial en este proceso y su importancia se pone de manifiesto en la severidad de los defectos en el desarrollo de plantas mutantes en estos genes <sup>5-7</sup>. Luego de su procesamiento por el complejo DCL1-HYL1-SE, el miARN es metilado por la metiltransferasa HUA ENHANCER1 (HEN1) y transportado al citoplasma donde cumple su función reguladora en el contexto del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).



**Figura 1:** Esquema simplificado del procesamiento de miARNs en plantas.

Modificado de Pashkovskiy y Ryazansky, 2013 <sup>8</sup>.

## 1.2. Importancia biológica de HYL1

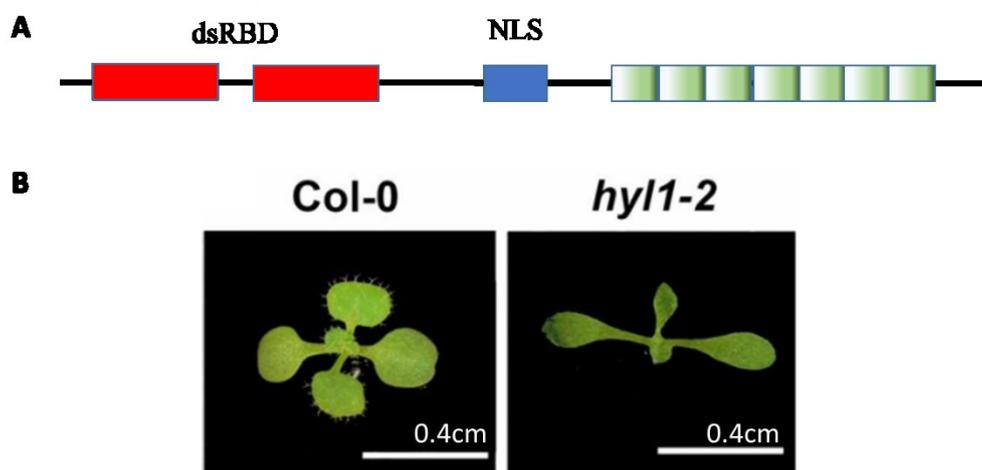
HYL1 es una proteína con dos dominios de unión a ARN doble hebra (dsRBD, *double-stranded RNA Binding Domain*) que son necesarios para la biogénesis de miARNs <sup>9,10</sup>, una señal de localización nuclear y 6 repeticiones de una secuencia de 28 aminoácidos, de función desconocida en el extremo carboxilo terminal (Figura 2A). El dominio dsRBD1 es el principal contribuyente a la interacción con los precursores de miARNs <sup>11-13</sup>. Por otra parte, el dominio dsRBD2 es responsable de las interacciones proteína-proteína dentro del complejo de procesamiento. Este dominio es necesario para el procesamiento eficiente y preciso de los miARNs mediante la interacción con DCL1 <sup>14,15</sup>, SERRATE <sup>16</sup> y HEN1 <sup>17</sup>. Además, este dominio también es necesario para la homodimerización de HYL1 <sup>13</sup>.

La importancia de la función de HYL1 se ve reflejada en los múltiples defectos de plantas mutantes en *HYL1*, tanto en el desarrollo vegetativo, con un ritmo de crecimiento menor y hojas más pequeñas, como en el reproductivo, con un retraso en la floración, flores más chicas y fertilidad reducida <sup>5</sup>. El fenotipo más característico de mutantes en *HYL1* es la hiponastia (curvatura hacia arriba) de las hojas, lo cual proporcionó originalmente el nombre al gen <sup>5</sup> (Figura 2B). También se han observado alteraciones en el desarrollo del embrión cuando HYL1 o algunos de los componentes del complejo de procesamiento

están ausentes <sup>18</sup>. Si bien estas plantas mutantes son viables, procesan los precursores de miARNs con muy baja eficiencia y generan cortes erróneos <sup>10,19</sup>.

Se ha sugerido que el gen de *HYL1* se expresa de manera ubicua y constitutiva <sup>20</sup>, sin embargo, los fenotipos que presentan los mutantes en este gen no parecen evidenciar que se requiera la proteína de manera ectópica. De hecho, un estudio reciente ha mostrado que la actividad de HYL1 en el microprocesamiento está regulada de manera específica de tejido <sup>21</sup>.

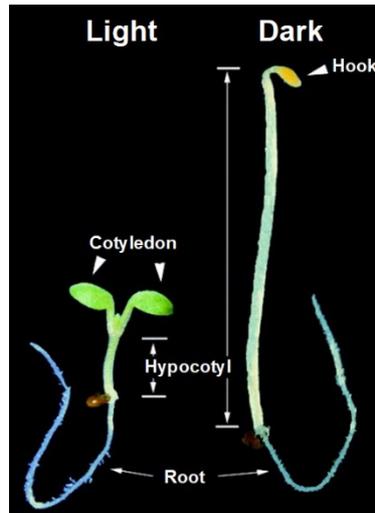
Se ha descrito que el complejo de procesamiento se ensambla y actúa en el núcleo, donde HYL1 y DCL1 colocalizan en cuerpos discretos llamados *dicing bodies* <sup>22</sup>. La localización subnuclear de SERRATE es más difusa dado que su participación en el complejo es transitoria y que su función no es específica del procesamiento de miARNs. Cabe destacar que se ha descrito la participación de SERRATE en el mecanismo de splicing alternativo de plantas <sup>23</sup>. Sin embargo, se ha reportado que HYL1 no siempre colocaliza con DCL1, y que puede presentar una distribución homogénea nuclear y, en algunas ocasiones, en el citoplasma con una distribución irregular <sup>10,24</sup>. Otro estudio *in vivo*, por expresión transitoria en *N. tabacum*, muestra una localización homogénea en el núcleo de HYL1 aunque también se observa su presencia fuera del mismo <sup>25</sup>. Así, aún se desconoce exactamente la naturaleza dinámica de su localización y si ésta afecta a su función.



**Figura 2.** Esquema de la proteína HYL1 y fenotipo del mutante *hyl1-2* en hojas. A) Diagrama de la estructura de HYL1 de *A. thaliana*. Representación de los dsRBDs (*double-stranded RNA Binding Domain*), la señal de localización nuclear (NLS) y las 7 repeticiones de 28 aminoácidos en el C- terminal de la proteína. B) Fenotipo de hiponastia en plantas de 7 días mutantes nulas de *HYL1* (*hyl1-2*) respecto de plantas silvestres Col-0. Figura de Zhang *et al.*, 2017 <sup>26</sup>.

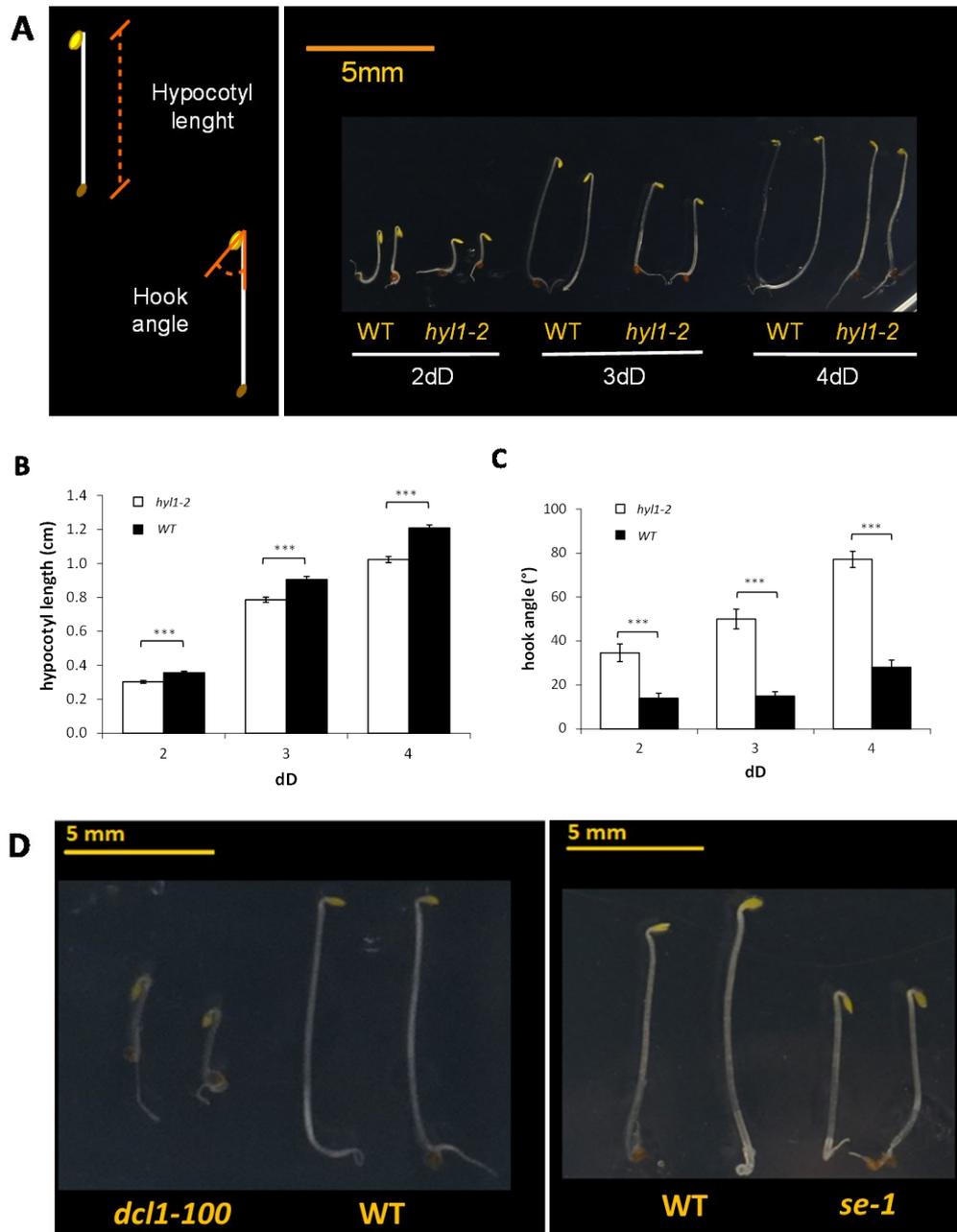
### 1.3. Escotomorfogénesis

El desarrollo de plántulas en oscuridad, o escotomorfogénesis, en las especies vegetales dicotiledóneas se caracteriza por un crecimiento exagerado del hipocotilo y la inhibición de la apertura del gancho apical (*hook*) y de la separación de los cotiledones, estas diferencias pueden ser apreciadas a simple vista en plántulas cultivadas el mismo número de días en luz u oscuridad (Figura 3). Todos estos procesos han evolucionado con el fin de proteger el meristema apical y alcanzar más rápidamente la luz abriéndose paso a través de la tierra. El desarrollo escotomorfogénico utiliza las reservas almacenadas en la semilla hasta que la plántula alcanza la luz y puede cambiar a un desarrollo autotrófico. Durante este proceso, tanto la apertura del *hook*, como también la elongación del hipocotilo, tienen un ritmo característico en la plántula silvestre. Este proceso biológico es crucial para la supervivencia de la planta y, por lo tanto, se encuentra finamente regulado a diferentes niveles, transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional <sup>27</sup>. A pesar de que se conocen numerosos factores que controlan este proceso no se ha identificado al día de hoy miARNs, o componentes implicados en su biogénesis, que participen en esta regulación. Entre los factores más importantes se encuentran: los fotoreceptores Fitocromo A y B; los factores de transcripción PIFs (Phytochrome Interacting Factors) que promueven el desarrollo escotomorfogénico y, a la vez, reprimen la fotomorfogénesis; el factor de transcripción HY5 (elongated HYpocotyl 5), y su homólogo HYH, que promueven el desarrollo en luz; la ubiquitin ligasa COP1 (Constitutive Photomorphogenic1); y varias fitohormonas <sup>27,28</sup>. COP1 cumple un papel central en estos procesos mediando la degradación de promotores de la fotomorfogénesis, como los fitocromos <sup>29,30</sup> y HY5 <sup>31</sup> en oscuridad. Por otra parte, se ha sugerido la participación de ciertos miARNs durante el proceso de desetiación de las plantas. Así, en el pasaje de oscuridad a luz el factor de transcripción HY5, que es estabilizado en presencia de luz, activa indirectamente la expresión de HEN1. La expresión de HEN1 permite la metilación y estabilización del miARN 157d, quien a su vez regula negativamente la expresión de HY5 <sup>27</sup>.



**Figura 3:** Morfología de plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en luz y oscuridad <sup>32</sup>.

Resultados previos del laboratorio mostraron que plántulas mutantes en *HYL1* desarrollan un hypocotilo más corto y abren el gancho apical más rápidamente que plantas control cuando son cultivadas en oscuridad (Figura 4A, B y C), lo que sugiere que *HYL1* participa en el control de este proceso de desarrollo. Mutantes en *DCLI* y *SE* comparten el fenotipo de hypocotilo corto, pero presentan un fenotipo opuesto de apertura del gancho apical al mantenerlo más cerrado que las plántulas de tipo silvestre, WT (figura 4D). El hecho de presentar fenotipo distinto a otros componentes del procesamiento de miARNs en el control de la apertura del *hook* podría indicar que *HYL1* está jugando un papel específico en este proceso. Hasta el momento, no se ha descrito ninguna función alternativa de *HYL1* a la de su participación en el complejo de procesamiento de miARNs. Entender el momento y lugar donde *HYL1* es activo durante la escotomorfogénesis podría contribuir a dilucidar el papel específico de *HYL1*, ayudando a comprender mejor la regulación de este proceso crucial para el correcto desarrollo de la planta.



**Figura 4:** Fisiología de mutantes *hyll-2*, *se-1* y *dcll-100* durante la escotomorfogénesis. A) Plántulas *hyll-2* y de tipo silvestre (WT) cultivadas a 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). B) Medidas de longitud de hipocotilo de plántulas *hyll-2* y WT. C) Medidas de ángulo de apertura del *hook* de plántulas *hyll-2* y WT. D) Plántulas *dcll-100* y *se-1* cultivadas tres días en oscuridad junto a plántulas WT. Las barras en B y C indican el promedio  $\pm$  SEM de dos réplicas biológicas. Los asteriscos en B y C indican diferencias significativas ( $p < 0,001$ ).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

El presente proyecto pretende estudiar detalladamente la localización espacial y temporal de HYL1 durante el desarrollo escotomorfogénico, tanto a nivel subcelular como de tejido. Este objetivo general se encuadra dentro del proyecto global del laboratorio para entender el papel preciso que cumple HYL1 en este proceso biológico.

### **2.2. Objetivos específicos**

El estudio de la localización de HYL1 se abordará de dos perspectivas distintas con sus consiguientes objetivos específicos:

1-Generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresen la fusión HYL1-CFP y verificar su funcionalidad. Utilización de estas líneas para estudiar cualitativamente la localización de la fusión por microscopía confocal de fluorescencia, durante los distintos estadios de la escotomorfogénesis. Estudiar cuantitativamente los niveles de proteína por fluorescencia.

2-Generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresen HYL1, fusionado a GFP y con 3 *tags* cMYC, bajo un promotor inducible por etanol mediante la utilización del sistema de dos componentes de *Aspergillus nidulans* AlcA-AlcR. Estas líneas servirán para el estudio futuro de la localización *de novo* de HYL1 por microscopía confocal de fluorescencia, así como identificar el momento exacto en que es necesaria durante el desarrollo escotomorfogénico. También permitirán estudios bioquímicos de la proteína HYL1 mediante el uso de anticuerpos anti-cMYC o anti-GFP

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Material vegetal utilizado**

Se utilizaron como control de todos los experimentos plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y, para la generación de líneas transgénicas, plantas mutantes nulas de *HYL1* (*hyl1-2*) o de *SERRATE* (*se-1*), provistas por el *Arabidopsis Biological Resource Center* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Las plantas sobreexpresantes de la región codificante de *HYL1* con el promotor del 35SCaMV (35S::*HYL1*) fueron generadas en nuestro laboratorio <sup>12</sup>.

#### **3.2. Esterilización superficial de semillas de *Arabidopsis thaliana***

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente en tubos *ependorf*, se les agregó 1 mL de Etanol 96%, se agitaron y luego se dejaron decantar. Luego de descartar el etanol, se agregó 1 mL de una solución 20% (v/v) de lavandina (NaClO 55 g/L) y detergente triton X-100 0,05% y se agitó durante 10 minutos. Posteriormente se las lavó con 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril 5 veces. El procedimiento se realizó en flujo laminar.

#### **3.3. Cultivo de plantas en tierra**

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se cultivaron en potes de plástico de 200 ml con sustrato Klamann TS1. Previamente se estratificaron las semillas en placas y en oscuridad a 4°C durante 5 días. Las plantas se cultivaron en fitotrones con condiciones controladas a una temperatura de 22°C y con humedad relativa de 60-70 % y se regaron 3 veces por semana. Se iluminaron bajo un régimen de día largo (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) con tubos fluorescentes Osram 36W / 840 (luz clara) y Osram 36W / 830 (luz cálida).

#### **3.4. Cultivo de plantas *in vitro***

Luego de ser esterilizadas superficialmente, las semillas se sembraron en placas de petri conteniendo 20 mL de medio sólido 0,5X de sales de Murashige & Skoog (Sigma) con agar 0,8% p/v. A este medio se le agregaron antibióticos y/o herbicidas en los casos en que fue necesario.

### **3.5. Técnicas basadas en ácidos nucleicos**

#### **3.5.1. Extracción de ADN plasmídico**

Para la extracción de ADN plasmídico, a partir de células de *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens*, se utilizó el método de lisis alcalina. Brevemente, 3 mL de un cultivo saturado de células, cultivadas ON a 37°C para *E. coli* ó a 28°C para *A. tumefaciens*, en medio Luria-Bertani (LB) con los antibióticos correspondientes, se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego se purificó con el kit de Wizard Plus SV Minipreps según las recomendaciones del fabricante.

#### **3.5.2. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis**

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo de Edwards<sup>33</sup>. Se trituró una hoja de la roseta de Arabidopsis en un tubo *ependorf* y se añadió 400 µL de solución Buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS). Se agitó con vortex durante 5 segundos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo *ependorf*. A este sobrenadante se le agregó 300 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar el pellet durante 5 minutos y se resuspendió el ADN con 100 µL de TE (100 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a 4°C.

#### **3.5.3. Extracción de ARN de Arabidopsis**

Para la extracción de ARN de plántulas de Arabidopsis se utilizó el protocolo de Piskurewicz<sup>34</sup> con algunas modificaciones. Se pulverizaron con mortero y pilón aproximadamente 100 mg de tejido con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se incubó en tubo *ependorf* de 2 mL a 4 °C ON con buffer de extracción (LiCl 8 M, β-mercaptoetanol 2%) previamente enfriado a 4 °C. Al día siguiente, se agitó y centrifugó brevemente el tejido y se transfirió el sobrenadante a un nuevo *ependorf* de 2 mL, el cual se centrifugó a 18000 g por 30 min a 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 750 µL de etanol 75% frío. Luego de centrifugar a 18000 g durante 5 min se descartó el etanol, se dejó secar 5 min a RT y se resuspendió el pellet con 500

$\mu\text{L}$  de buffer de solubilización (SDS 0,5 %, NaCl 100mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,6,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%). El ARN se extrajo con 500  $\mu\text{L}$  de una solución de fenol-cloroformo previamente equilibrada con solución ANE 1X (para equilibrar se mezcló cloroformo, fenol, solución 1 X ANE (NaAc 100 mM, NaCl 1mM, EDTA 10 mM, pH 6) en proporción 1:1:0,6 y se descartó la fase superior), se agitó con vórtex 30 seg y se centrifugó a 18000 g por 5 min a RT. Luego de la centrifugación, la fase superior hidrosoluble se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL. Este procedimiento se repitió dos veces. La fase superior recuperada se dejó precipitar con 0,1 volúmenes de NaAc 3M y dos volúmenes de etanol absoluto frío por 30 min a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 18000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75%. Se centrifugó 5 min a 18000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se repitió este último lavado una vez más. Finalmente se descartó el sobrenadante, se dejó secar 5 min a RT y se resuspendió el pellet en 30-40  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

#### **3.5.4. Tratamiento de ARN con DNAsas**

El ARN, para la posterior síntesis de ADNc, se trató previamente con DNasa I para evitar posibles contaminaciones en las PCR en tiempo real con ADN genómico. Se incubó 1 $\mu\text{g}$  de ARN total durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con DNasa I "RQ1" (Promega) y su buffer correspondiente en 10  $\mu\text{L}$  finales frenándose la reacción con el agregado de 1  $\mu\text{L}$  de *DNasa Stop Solution* (Promega) e incubando 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.5.5. Síntesis de ADNc**

Para la síntesis del ADNc (ADN complementario) se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de la muestra de ARN previamente tratada con DNasa y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT 40 $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  de hexanucleótidos al azar 40 $\mu\text{M}$  (Promega) y 1 $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs 10mM. Se incubó durante 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$ , se enfrió rápidamente en hielo 1 min y, posteriormente, se realizó una centrifugación corta para bajar todo el contenido al fondo del tubo. A esta mezcla se le agregaron 4 $\mu\text{L}$  de FirstStrand Buffer 5X (Invitrogen), 2 $\mu\text{L}$  de DTT (Invitrogen) 0,1M y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima M-MLV RT (Invitrogen). La solución se mezcló con pipeta y se incubó primero 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$  (para facilitar la hibridación de los hexanucleótidos con los ADNc) y luego 50 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se inactivó la enzima incubando 15 min a

70°C. El ADNc se diluyó 50 veces, a una concentración final aproximada de 1 ng/μL, para ser utilizado como molde para PCR en tiempo real.

### **3.5.6. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de ADN, tanto plasmídico como genómico, y ARN se realizó con alícuotas de 1 μL midiendo absorbancia a 260 nm en nanoVue™ Plus (General Electric). También se midieron absorbancias a 230 nm y 280 nm para calcular las relaciones de absorbancia y, así, evaluar la calidad del ARN.

### **3.6. Electroforesis en geles de agarosa**

El tamaño aproximado del ADN se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio en buffer TAE 1X (Tris-HCl 0,05 M pH 8, ácido acético 0,02 M, EDTA 0,001 M). La concentración de agarosa utilizada en cada caso varió entre 0.8% a 2% p/v dependiendo del tamaño del fragmento de ADN esperado. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 1X (azul de bromofenol 0,04 % p/v, xilencianol 0,04 % p/v, glicerol 5 % v/v en agua). La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 5 V/cm. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó corriendo a la par marcadores de peso molecular adecuado según el tamaño esperado. Para evaluar la calidad de las extracciones de ARN, se corrieron extractos de ARN total en geles de agarosa 1.4% p/v.

### **3.7. Digestión con enzimas de restricción**

La digestión con enzimas de restricción se utilizó para el clonado y verificación de los vectores del sistema *Greengate*. Las enzimas de restricción utilizadas fueron provistas por la empresa Promega. Las reacciones de restricción de ADN se llevaron a cabo según lo especificado por el fabricante en un volumen final de 20 μL.

### **3.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones de amplificación se realizaron con las enzimas Pfu (Promega) o Taq ADN Polimerasa (Genbiotech) en un volumen final de 20 μL. Para evitar posibles mutaciones, se utilizó la enzima Pfu para amplificar la región codificante del gen *HYL1*, gracias a su actividad *proofreading*. La concentración de los reactivos utilizados en las reacciones con

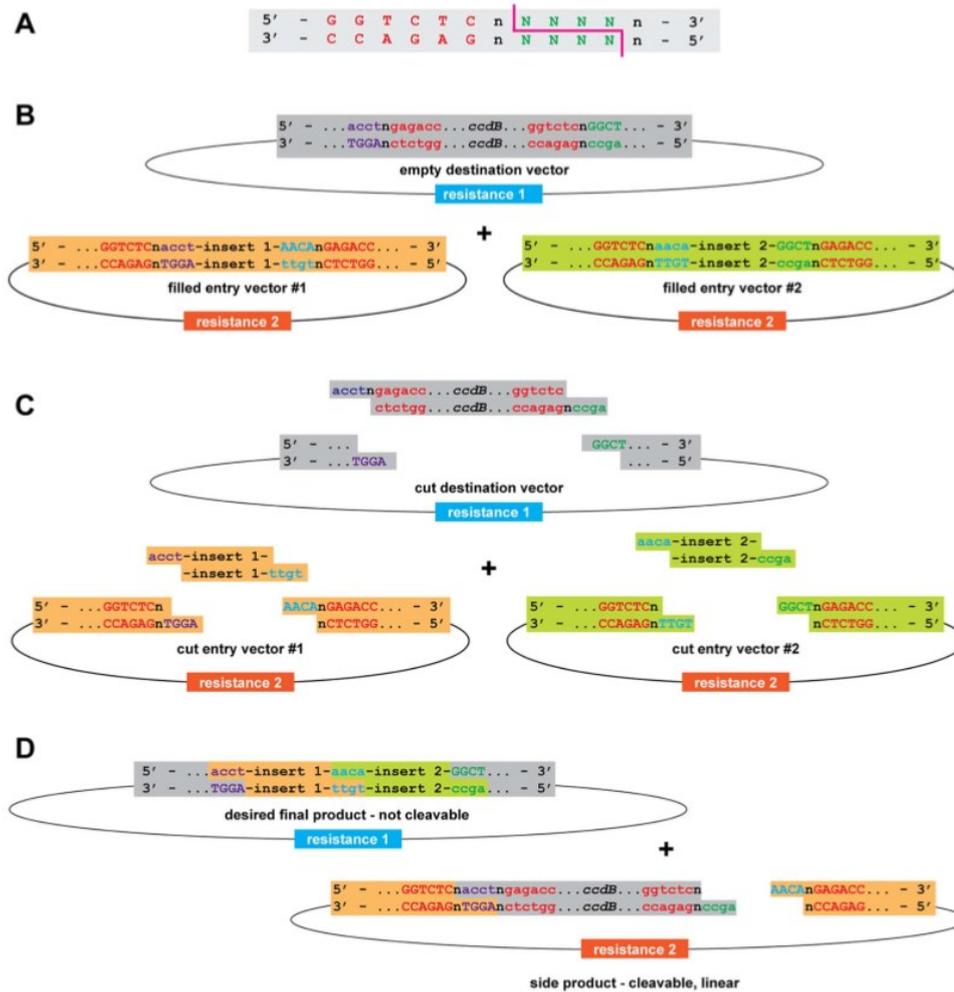
Pfu fueron: Pfu buffer + MgSO<sub>4</sub> 1X (Promega), dNTPs 0,4 mM cada uno, cebadores 0,4 μM cada uno, 0,75U Pfu ADN Polimerasa (Promega) y entre 20 y 50 ng de ADN molde. La Taq de Genbiotech fue utilizada para el resto de las reacciones de PCR. Las concentraciones de los reactivos utilizados en las reacciones con Taq fueron: Taq buffer 1X (GenBiotech), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTPs 0,25 mM cada uno, cebadores 0,25 μM cada uno, 1U Taq ADN Polimerasa (GenBiotech) y la cantidad de ADN molde necesario en cada caso. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador IVEMA T-18 (IVEMA). Los oligonucleótidos utilizados se adecuaron a cada caso (tabla I). Un ejemplo de protocolo de amplificación fue: [95°C x 1 min, (95°C x 45 s, 55°C x 1 min, 72°C x 2 min) x 35 ciclos, 72°C x 5 min]. La temperatura de anillado utilizada dependió de los oligonucleótidos utilizados, así como el tiempo de elongación dependió del tamaño del fragmento que se amplificaba (1min por cada 1000bp).

### 3.9. PCR en tiempo real

Para analizar el nivel de expresión de los genes estudiados en esta tesina se recurrió a la técnica de PCR semicuantitativa en tiempo real. Se utilizó como gen de referencia el gen codificante para la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Se diseñaron oligonucleótidos específicos, mediante el software online Primer3Plus, de manera tal que los productos amplificados tuvieran un tamaño entre 80 y 150 pb. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el AriaMx Real Time PCR System (Agilent) utilizando el compuesto fluorescente *EvaGreen* (Genbiotech) y ADN polimerasa Taq (Genbiotech). Cada muestra se analizó por triplicado usando dos réplicas biológicas. Para la amplificación se utilizaron aproximadamente 5 ng de ADNc sintetizado, 300nM de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1U de Taq ADN polimerasa (Genbiotech), 1X Buffer Taq polimerasa, 1X *EvaGreen* en un volumen final de 15 μL. El protocolo de amplificación fue: [95°C x 1 min, (95°C x 15 s, 58°C x 15 s, 72°C x 20s) x 40 ciclos]. La especificidad de la amplificación fue chequeada mediante el análisis de la curva de fusión de los productos amplificados luego de 40 ciclos, mediante la subida progresiva de 0,5°C cada 5 seg hasta 95°C y detección de la fluorescencia. El nivel de expresión génica se calculó aplicando la siguiente fórmula: Ct= Ct (gen de interés)-Ct (gen de referencia).

### 3.10. Sistema de clonado *GreenGate*

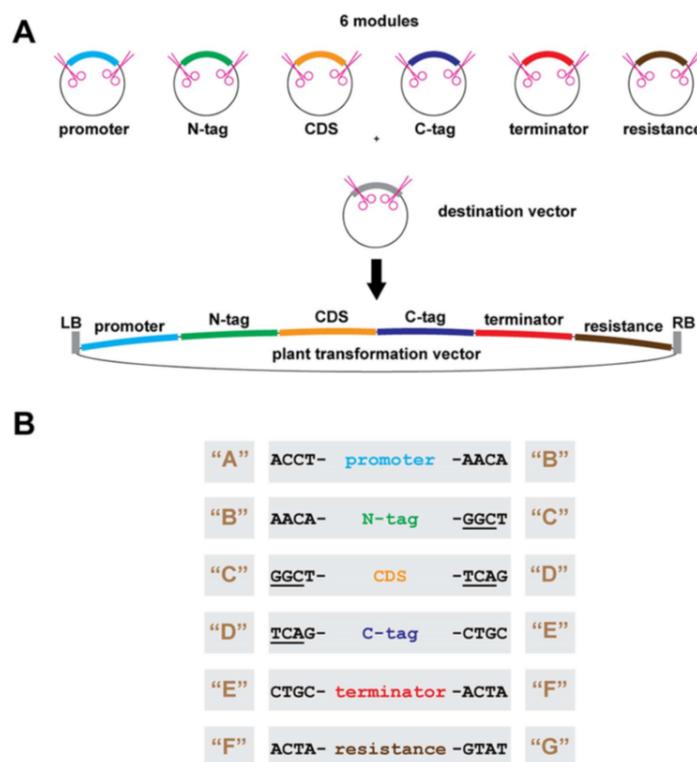
Se utilizó el sistema de clonado *GreenGate*<sup>35</sup> para generar dos constructos: pJM01 (p16::AlcR) y pJM02 (pAlcA::3xcMYC-HYL1-GFP), que permitan expresar la proteína de fusión mediante inducción por etanol en *Arabidopsis thaliana*. Este sistema utiliza la enzima de restricción BsaI, del tipo IIS, que corta el ADN un par de bases después del sitio de reconocimiento, lo cual facilita el proceso de ligación de varios fragmentos distintos de manera simultánea. Esta enzima es suficiente para liberar fragmentos de distintos módulos preensamblados y el sitio de reconocimiento se puede colocar de manera que se pierda luego de la ligación. Como los extremos protuberantes se pueden elegir libremente al estar fuera del sitio de reconocimiento, el número de fragmentos que se puede combinar en una sola reacción es alto. En un ejemplo para el caso de dos vectores (Figura 5), un vector de destino con sitios internos de BsaI libera un fragmento dejando dos extremos protuberantes distintos a cada lado. Los módulos preensamblados, con los fragmentos de interés, liberan un fragmento con un sitio compatible con el vector de destino y otro sitio compatible con el otro fragmento de interés. De esta manera solo hay una combinación posible para que ambos fragmentos se inserten en el vector de destino. Los vectores de destino expresan la toxina ccdB. Debido a la presencia de ésta, los vectores de destino solo pueden estar presentes en la cepa de *E. coli* DB3.1, resistente a la toxina. Durante el corte y ensamblado, estos vectores pierden la toxina y luego se transforman en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , sensible al ccdB, permitiendo contra seleccionar solo aquellas bacterias donde se insertaron los fragmentos y se perdió la toxina.



**Figura 5:** Modelo simplificado del sistema de clonado *GreenGate*. A) Sitio de reconocimiento de la enzima *BsaI*. B) Ejemplo de un vector de destino y dos de vectores de llenado. C) Fragmentos liberados por la enzima *BsaI*. D) Posibles ligaciones de una reacción *GreenGate* para dos vectores. Esquema de Lampropoulos *et al.*, 2013.

El sistema *GreenGate*, pensado para la transformación de plantas, permite un rápido ensamblado de 6 módulos típicos que incluyen: un promotor; un *tag* N-terminal; una secuencia codificante del gen de interés; un *tag* C-terminal; un terminador de plantas y; un casete de resistencia, dentro de un plásmido binario para transformación de plantas (Figura 6). Cabe resaltar que los módulos se insertan dentro de un T-DNA a transferir a la planta, definido por sus bordes izquierdo y derecho (LB y RB). La reacción de corte y ligación para incorporar los fragmentos al vector de destino se realizó en un termociclador IVEMA T-18, con el siguiente programa: [(37°C x 2 min, 16°C x 2 min) x 30 ciclos; 80°C x 5 min, 50°C x 5 min)]. Para esta reacción se utilizó: 150 ng de cada uno de los módulos,

100 ng del vector de destino, 1,5X Buffer G (Thermo Scientific), 1 mM ATP (Thermo Scientific), 1 U Ligasa T4 (Promega), 1 U BsaI (Thermo Scientific) en un volumen final de 20  $\mu$ L. Finalmente se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con la mitad de esta reacción.



**Figura 6:** Esquema de clonado *Greengate* en vectores de transformación de plantas. A) esquema de los módulos necesarios para generar el vector de transformación de plantas. B) Sitios protuberantes que deja la digestión con BsaI, que permiten el clonado direccional de los distintos módulos. Figura de Lampropoulos *et al.*, 2013.

### 3.11. Métodos de transformación

#### 3.11.1. Preparación de células competentes

Se utilizaron 2 mL de células, de las cepas DH5 $\alpha$  o DB3.1, de *Escherichia coli* de un cultivo en medio LB líquido, ON a 37°C bajo agitación, para inocular 200 mL de medio LB. Las bacterias crecieron a 37°C bajo agitación hasta alcanzar una DO550 de 0,5 (aproximadamente 2 h). El cultivo se incubó en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 4000 g 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 mL de solución fría MgCl<sub>2</sub> 100 mM y luego se centrifugó y

descartó el sobrenadante, como se describió anteriormente. Por último, las células se resuspendieron en 10 mL de solución fría y estéril de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, luego se alicuotaron y almacenaron a -70°C, quedando listas para ser usadas.

### **3.11.2. Preparación de células electrocompetentes**

Para preparar células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 las bacterias crecieron en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos rifampicina (50 µg/ml) y gentamicina (25 µg/ml), para los cuales esta cepa es resistente, durante 48 h a 28°C con agitación. Este cultivo se utilizó para inocular 100mL de LB suplementado con antibióticos, como se describió anteriormente, el cual se incubó a 28°C con agitación hasta alcanzar una DO550 de 0,5 (aproximadamente 5 h) deteniéndose el crecimiento por incubación en hielo durante 10 min. Posteriormente, las células se centrifugaron a 4000 g durante 10 min y 4°C, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron suavemente en 10 mL de agua destilada estéril y se centrifugaron nuevamente 10 min a 2700 g a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante se repitió este paso de lavado 2 veces más. Finalmente, las células se resuspendieron en 1mL de glicerol 10% v/v estéril frío y se fraccionaron en alícuotas de 50 µL en tubos eppendorf, las cuales se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido para ser almacenadas a -80°C.

### **3.11.3. Transformación de células bacterianas**

Para la construcción del sistema *Greengate* se transformaron células de *Escherichia coli* *DH5a* con cada uno de los vectores de llenado para luego poder seleccionar aquellas que portaran el constructo correcto, que se corroboró por digestión con enzimas de restricción. Los vectores de destino se transformaron en células de *Escherichia coli* DB3.1. Se realizó la transformación mediante el método de shock térmico, para esto se mezcló 1 ng de ADN plasmídico en 100 µL de células. Se incubó en hielo durante 5 min, se realizó un shock térmico de 1,5 min a 42°C y se agregaron 900 µL de LB. Se incubaron a 37°C durante 1 h para que el plásmido exprese la resistencia y se plaqueó en placa de Petri con el antibiótico correspondiente. Las placas se dejaron ON a 37°C y, al día siguiente, se eligieron colonias aisladas. Éstas se repicaron sobre una placa master, y se realizaron cultivos individuales para la extracción de ADN plasmídico (3.5.2) para comprobar la identidad del plásmido por digestión con enzimas de restricción y corrida en gel de agarosa. Para el constructo con *HYLI*, se enviaron los plásmidos aislados a secuenciar al

DNA Sequencing Facility de la Universidad de Maine, USA (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/index.htm>). Estas secuencias se compararon con la secuencia de *HYL1*, obtenida a partir de bases de datos (<http://www.arabidopsis.org>) para corroborar la ausencia de mutaciones.

Se utilizó la electroporación como método de transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens*. Se transformó la cepa GV3101 con los vectores finales de la construcción *Greengate*, pJM01 (p16::AlcR) y pJM02 (pAlcA::3xcMYC-HYL1-GFP). Dado que en el sistema *Greengate* los vectores de destino están basados en el pGreen-IIS, es necesario cotransformar con el plásmido pSoup, que le provee la replicasa en *trans* al pGreen-IIS para poder replicarse en *Agrobacterium tumefaciens*. Se agregaron aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico y 50 ng de pSoup a 50  $\mu$ L de células competentes, se incubaron 30 min en hielo, se transfirió el contenido total a la cubeta de electroporación de 0,1 cm de paso preincubada en hielo. Se utilizó un electroporador Gene Pulser (BioRad), las condiciones de electroporación fueron: 25  $\mu$ F, 2,5 kV y 200  $\Omega$ . Inmediatamente después del pulso de electroporación, se incubaron los 50  $\mu$ L de células con 1 mL de medio LB en agitación a 28°C durante 2 h y, por último, se plaqueó en placa de Petri en medio LB con los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron 48 hs a 28°C, al día siguiente, se eligieron colonias aisladas. Éstas se repicaron sobre una placa master, y se realizaron cultivos individuales para la extracción de ADN plasmídico (3.5.2). Debido a que *Agrobacterium tumefaciens* posee más de un plásmido, lo cual hace complicado verificar la presencia del plásmido por digestión con enzimas de restricción, el ADN plasmídico obtenido, se utilizó para retransformar *E. coli DH5 $\alpha$*  para luego verificar la presencia. El proceso de transformación y verificación de la identidad del plásmido en *E. coli DH5 $\alpha$*  es el descrito anteriormente.

#### **3.11.4. Transformación de *Arabidopsis thaliana***

Para la transformación estable de *A. thaliana* mediada por *Agrobacterium* se utilizó la técnica de *floral dip* <sup>36</sup>. Las plantas se transformaron con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido pJM01 (p16::AlcR), con resistencia a higromicina B, o pJM02 (pAlcA::3xcMYC-HYL1-GFP), con resistencia a fosfotricina (PPT). Se inoculó un cultivo inicial de 2 ml de medio LB con células de *Agrobacterium* crecidas en medio sólido con los antibióticos correspondientes. Se incubó

el cultivo 24 hs a 28°C bajo agitación y, al día siguiente, se inoculó con este cultivo a 100 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se incubó 24 hs a 28°C bajo agitación y se trasvasó a tubos *Falcon* de 50 mL, los cuales se centrifugaron 20 min a 4000 g a RT. Las células se resuspendieron en 200 mL de medio de infiltración (sacarosa 50 g/L, Silwet L-77® 0,04% v/v, pH 5,7). El Silwet es un componente clave para la eficiencia de la transformación al ser un surfactante que genera daños en las paredes celulares de la planta y que permite que *Agrobacterium* se adhiera y comience el proceso de transferencia del T-DNA al genoma de la planta. La suspensión de células obtenidas se utilizó para sumergir las inflorescencias de mutantes *hyl1-2* de *Arabidopsis thaliana* durante 15 segundos. Se utilizaron plantas cultivadas entre 6 y 8 semanas a las que se eliminó flores auto fecundadas y silicuas ya formadas. Luego se dejan las plantas en horizontal, en oscuridad, ON para escurrir la solución. Al día siguiente se enderezan y vuelven al fitotrón con condiciones controladas hasta que se recogen las semillas maduras.

### **3.11.5. Selección de líneas transformadas**

Las semillas provenientes de las transformaciones fueron esterilizadas superficialmente (sección 1.1) y se mezclaron con top agar estéril (0,2% agar) para poder sembrar uniformemente en placas de Petri con medio sólido MS 0,5x y el agente de selección correspondiente. Se utilizó higromicina B para plantas transformadas con el vector pJM01, líneas HHC y líneas pSE::YFP-SE, y PPT para plantas transformadas con el vector pJM02. Las placas con plántulas fueron incubadas en un fitotrón con condiciones controladas (sección 3.3) hasta observar la selección. Las plántulas resistentes obtenidas (T1) se trasplantaron a potes con tierra y se continuó su cultivo en fitotrón hasta que se recolectaron las semillas maduras. La selección con higromicina se realizó en oscuridad porque permite diferenciar perfectamente resistentes y sensibles en tan solo tres días en oscuridad.

### **3.11.6. Análisis de segregación de las líneas transformadas**

Se realizaron análisis de segregación de las semillas obtenidas de las plantas T1 para verificar que las plantas transgénicas tuvieran un solo inserto. Las semillas se esterilizaron superficialmente y se plaquearon con los agentes de selección correspondientes hasta que

se pueden diferenciar y contar plantas sensibles o resistentes. Para el análisis de segregación, se calculó el chi cuadrado ( $\chi^2$ ) a partir del cultivo de 100 semillas aproximadamente, esperando una distribución normal de plantas resistentes/sensibles de 3:1 para plantas transgénicas con un solo inserto. Las plantas resistentes, obtenidas a partir del análisis de segregación de las líneas con un solo inserto (T2), se cultivaron hasta obtener semillas maduras. Entre 20–30 de estas semillas se cultivaron en placas con antibióticos para poder seleccionar aquellas que sean homocigotas (T3). Las semillas de las líneas T3 seleccionadas, son las líneas homocigotas estables que se utilizaron para los experimentos.

### **3.12. Medición de ángulo de apertura del *hook* y longitud de hipocotilo**

Para realizar las mediciones de ángulo de apertura del *hook* y longitud del hipocotilo se cultivaron plántulas 2, 3 y 4 días en placas en oscuridad. Las semillas se sembraron en placas, que se estratificaron durante 5 días, se indujeron 3h en luz y luego se taparon y cultivaron en oscuridad los días correspondientes. En el momento de la medición se acomodaron las plántulas horizontalmente utilizando pinzas (cuidando de no dañar los tejidos), se agregó una referencia de medidas, y se fotografió la placa. Se utilizó el programa ImageJ (ImageJ 1.51n versión 10.2) para realizar las mediciones tanto de longitud como de ángulo. Se cuantificaron entre 40 y 60 plántulas para cada muestra. Se utilizó el programa Excel para graficar y analizar estadísticamente los datos obtenidos.

### **3.13. Cuantificación de fluorescencia**

Para los análisis de cuantificación de fluorescencia se cultivaron plántulas HYL1::HYL1-CFP a 2, 3 y 4 días en oscuridad. Las plántulas se transfirieron a un portaobjeto, se recubrieron con agua y se colocó encima un cubreobjetos. Para obtener las fotos se utilizó el microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM 880 Axio Observer. Para la adquisición de fotos se utilizó el objetivo 20X y el canal de fluorescencia correspondiente al cian, con una lambda de excitación de 458 nm y de detección de 459-522 nm. Se utilizó el programa ImageJ para cuantificar fluorescencia a partir de las fotografías obtenidas. En este se definió una región de interés (ROI) de un área aproximada al tamaño de un núcleo, que se estandarizó, es decir que se utilizó la misma área para la medición de todos los núcleos, y se midió el brillo. El valor final obtenido en el programa es la densidad integrada, que se corresponde al valor de la media del área.

### 3.14. Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente mediante la comparación de dos muestras, utilizando la prueba t de Student. Se consideró que dos valores presentan una diferencia significativa cuando la  $P < 0,05$ . Para la comparación entre 3 o más muestras, se utilizó ANOVA y el post-test de Tukey.

### 3.15. Oligonucleótidos utilizados

En la Tabla I se especifican los oligonucleótidos utilizados.

**Tabla I.** Oligonucleótidos utilizados.

Descripción	Secuencia
115	AACACGTCTGAGGCTCTATGACCTCCACTGATGTTTC
117	AACAGGTCTCACTGATGCGTGGCTTGCTTCTG
CLNB2	GGAATTCCATATGATGACCTCCACTGATGTTTCCTC
CLNB3	CGGATCCTCATCCCGTTTCGTGAACAGGTTGTGA
CLNB4	GGAATTCCATATGCACGAAACGGGATTATGCAAGAAC
CLNB5	CGGATCCTCATGACTGGATCGCTAAAAGAGCAGT
CLNB6	GGAATTCCATATGGACACTAAAAACAACCTTGCCAAC
CLNB7	CGGATCCTCACTGATCGTTTTGACAATGATCAGT
HYL1qPCR-fw	CAATCGTAAGGCTGCAGAGC
HYL1qPCR-rev	CCCGTTTCGTGAACAGGTTG
PP2A-Fw	TATCGGATGGACGATTCTTCGTGCAG
PP2A-Rv	GCTTGGTTCGACTATCGGAATGAGAG
Oligo dTV	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT V
PIF3-Fw	GGTATGGGAATGCCTTATGCA
PIF3-Rv	TGGAACTGTGGTCCGTGGTTA
HY5-Fw	CCATCAAGCAGCGAGAGGTCATCAA
HY5-Rv	CGCCGATCCAGATTCTCTACCGGAA
pri-166a fw	CTTCGGACCAGGCTTCATTC
pri-166a rev	ATTCAGTGGATCTGAAACCC

### 3.16. Número de acceso de genes utilizados

En la tabla II se detallan los genes utilizados

**Tabla II.** Genes utilizados.

Gen	Numero AGI
<i>HYL1</i>	AT1G09700
<i>SERRATE</i>	AT2G27100
<i>HY5</i>	AT5G11260
<i>PIF3</i>	AT1G09530
<i>PP2A</i>	AT1G13320

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la fusión HYL1-CFP

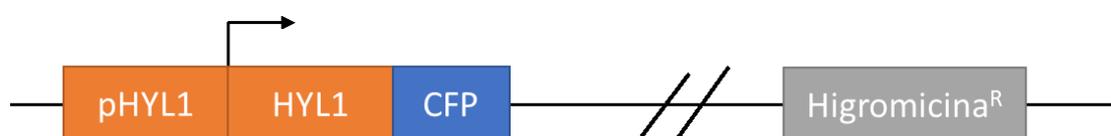
Con el objetivo de estudiar detalladamente la localización de HYL1 durante el desarrollo escotomorfogénico, en las condiciones más similares posibles a una plántula WT, se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la proteína de fusión HYL1-CFP bajo su promotor endógeno. Estas líneas se utilizaron para estudiar la proteína de fusión por microscopía confocal de fluorescencia.

#### 4.1.1. Generación de las líneas pHYL1::HYL1-CFP

Debido a que las diferentes localizaciones reportadas de HYL1 se obtuvieron en sistemas heterólogos como *N. tabacum* o células aisladas, como protoplastos (ver sección 1.2 de la Introducción), se optó por abordar el estudio de la localización de la misma manera que en el trabajo de Fang y Spector (2007). Así, se utilizó un plásmido con la construcción pHYL1::HYL1-CFP (cedido amablemente por los mismos investigadores) para transformar plantas *hyl1-2*, de modo de evitar interferencias con la proteína endógena. Esta estrategia permite trabajar en condiciones más similares a las silvestres debido al uso del promotor endógeno de HYL1. Las plantas transgénicas generadas se utilizaron posteriormente para evaluar detalladamente la localización de HYL1 durante la escotomorfogénesis.

La transformación estable de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens* se logra gracias a la transferencia de un T-DNA contenido en un plásmido de la bacteria a la planta y la inserción de éste en el genoma. Esta inserción se produce, en teoría, en lugares al azar del genoma. La expresión de un gen está regulada por su promotor, pero podría estar influenciada por el sitio de inserción en el genoma. Por este motivo se decidió estudiar varias líneas independientes de plantas *hyl1-2* que expresaran HYL1-CFP bajo su promotor endógeno (HHC: pHYL1::HYL1-CFP) (Figura 7). Al inicio de este trabajo, el laboratorio contaba con semillas T2 de más de 40 líneas independientes obtenidas por selección en higromicina, a partir de semillas de plantas *hyl1-2* transformadas con la construcción HHC. Aproximadamente 100 semillas de algunas de estas líneas se cultivaron en placas con higromicina, para hacer el análisis de segregación (Tabla III).

Todas las líneas presentaron una distribución normal para una inserción del T-DNA excepto por la línea HHC 6. Plántulas de las líneas que presentaron una distribución normal de resistentes/sensibles 3:1 se pasaron a tierra y se cultivaron hasta la obtención de semillas T3. Cada planta se cosechó de manera independiente. Estas semillas T3 de plantas independientes se cultivaron en placas con el agente de selección higromicina, para seleccionar aquellas en que la totalidad de las plantas sean resistentes, es decir, que sean homocigotas. Plantas de cada una de las líneas homocigotas seleccionadas se pasaron a tierra, junto a controles *hyl1-2* y Col-0, y se cultivaron hasta obtener semillas T4. De esta manera, se obtuvieron 6 líneas homocigotas independientes HHC: 7.8; 10.5; 15.1; 20.4; 25.1; 31.10, que fueron utilizadas para los experimentos posteriores.



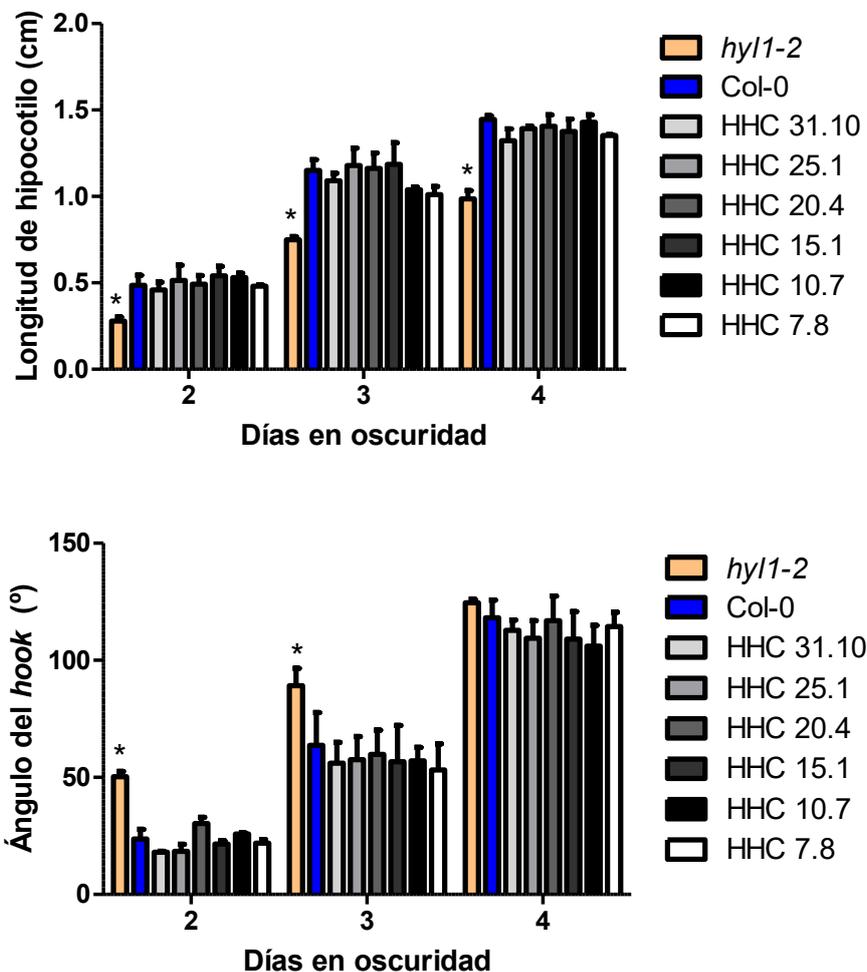
**Figura 7.** Esquema lineal del plásmido con la construcción HHC: pHYL1::HYL1-CFP.

**Tabla III.** Análisis de segregación de semillas T2 de distintas líneas pHYL1::HYL1-CFP (HHC). La columna de segregación indica el número de plantas resistentes respecto de las sensibles al agente de selección higromicina. Para el análisis de segregación se espera un  $\chi^2 < 3.84$  para un  $p < 0.05$  con un grado de libertad.

Línea	Segregación	$\chi^2$	T-DNA
HHC 6	92/11	7.4124	>1
HHC 7	84/26	0.0982	1
HHC 10	79/26	0.0252	1
HHC 15	80/28	0.0244	1
HHC 20	81/39	1.6476	1
HHC 25	74/33	0.8338	1
HHC 31	78/31	0.3759	1

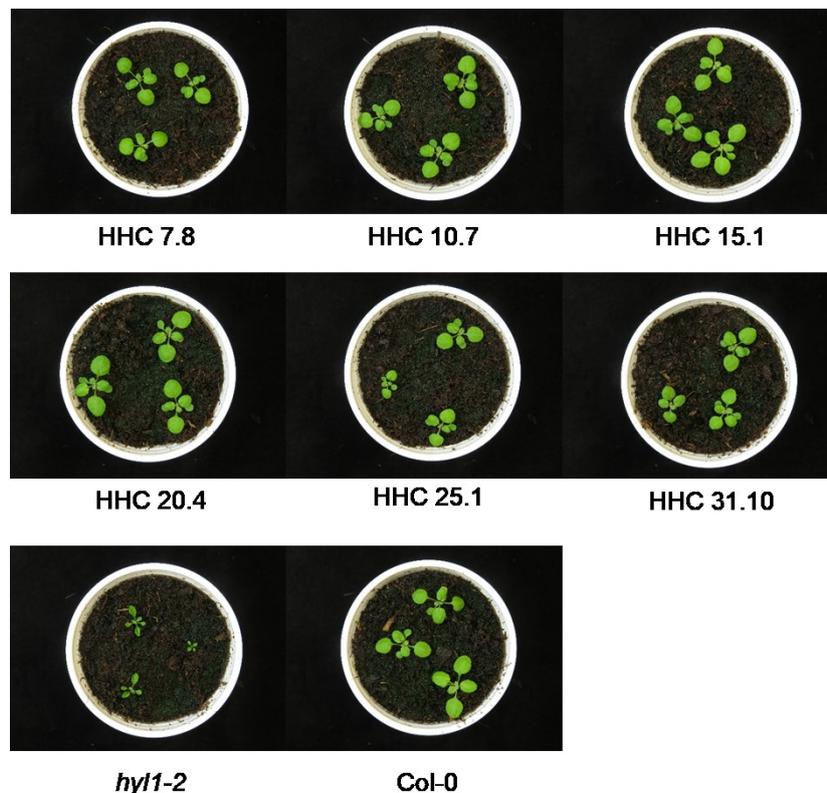
#### 4.1.2. Análisis fisiológico de las líneas pHYL1::HYL1-CFP

Para comprobar que la proteína de fusión HYL1-CFP es funcional *in planta*, se evaluó si las líneas HHC seleccionadas lograban complementar la mutación *hyl1-2*. Se compararon las líneas HHC a nivel fenotípico durante el desarrollo escotomorfogénico y en plantas adultas, con plantas WT (Col-0) y *hyl1-2*. Para estudiar el comportamiento de las líneas transgénicas durante el desarrollo escotomorfogénico se realizaron medidas de longitud del hipocotilo y del ángulo del gancho apical, o *hook*, de plántulas de 2, 3 y 4 días cultivadas en oscuridad. Como se explicó anteriormente, las mutantes *hyl1-2* presentan un desarrollo alterado en oscuridad de tal modo que alargan en menor medida el hipocotilo y abren el *hook* más rápidamente que las plántulas silvestres (Figura 4). Todas las líneas HHC complementan la mutación *hyl1-2*. Las líneas HHC 7.8; 10.5; 15.1; 20.4; 25.1 y 31.10 se comportaron de manera similar a las plantas Col-0, tanto en el ángulo de apertura del *hook* como en la elongación del hipocotilo (Figura 8).



**Figura 8:** Las líneas pHYL1::HYL1-CFP complementan los defectos de *hyl1-2* durante la escotomorfogénesis. Mediciones de ángulo del *hook* y longitud del hipocotilo de plántulas pHYL1::HYL1-CFP (HHC) y controles (*hyl1-2* y Col-0) cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad. Las barras indican el promedio  $\pm$  SEM de dos réplicas biológicas. Se midieron entre 40 y 60 plántulas para cada línea y replica biológica. El asterisco señala diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) respecto de Col-0.

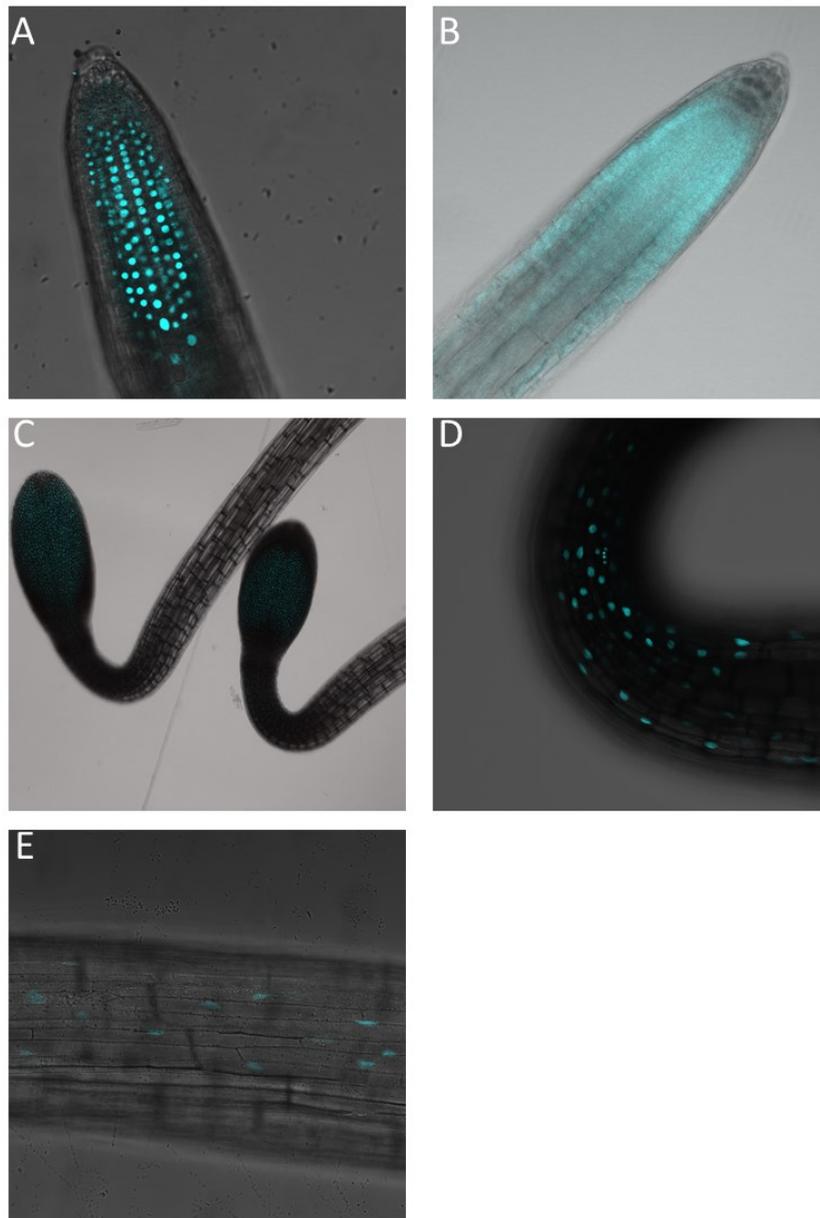
Las plantas mutantes nulas en *HYL1* (*hyl1-2*) presentan un fenotipo de hojas característico denominado hiponastia, una curvatura hacia arriba (Figura 2), además de presentar un ritmo de crecimiento menor y mayor infertilidad que las plantas WT. Se cultivaron 3 plantas de cada una de las líneas HHC anteriormente seleccionadas, junto a los controles Col-0 y *hyl1-2* (Figura 9). Al igual que en los estudios fisiológicos en escotomorfogénesis, las plantas adultas se comportaron de manera similar que las plantas WT, indicando que *HYL1* es también funcional en hojas de las líneas HHC, validando su uso como herramienta para el estudio posterior de la localización por microscopia de fluorescencia.



**Figura 9:** Las líneas pHYL1::HYL1-CFP complementan los defectos de *hyl1-2* en planta adulta. Plantas cultivadas 15 días con un régimen de luz de día largo.

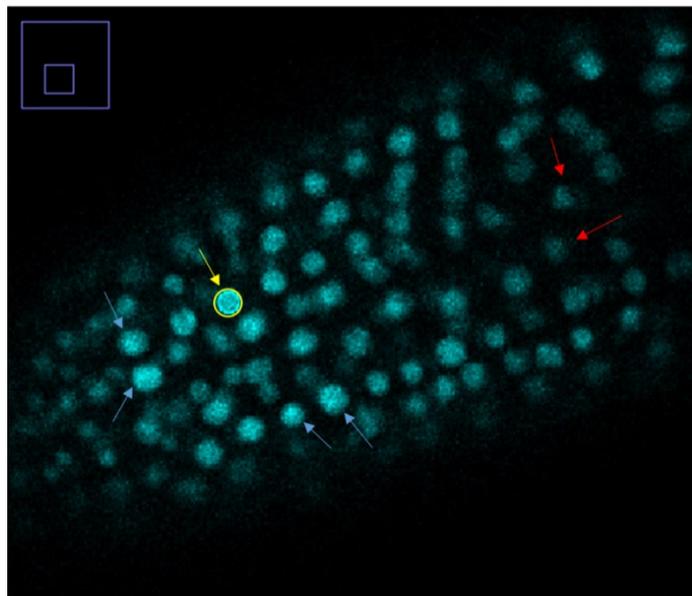
### 4.1.3. Niveles de fluorescencia en las líneas pHYL1::HYL1-CFP

Se realizó un paneo general de plántulas cultivadas 3 días en oscuridad para observar la localización de HYL1 en las distintas líneas HHC durante la escotomorfogénesis. Este estudio preliminar mostró que HYL1 tiene una localización predominantemente nuclear en todos los tejidos analizados: cotiledones, gancho apical, hipocotilo y raíces (Figura 10). Sin embargo, la fluorescencia en algunas plántulas se mostraba deslocalizada, como en la figura 10B.



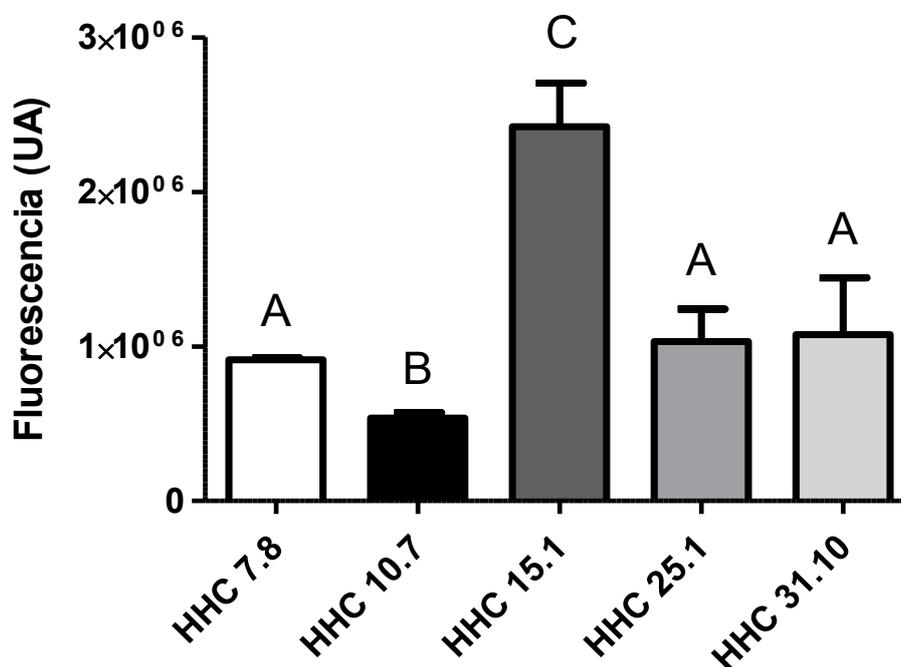
**Figura 10:** Microscopía de fluorescencia de HYL1-CFP bajo su propio promotor. Plántulas cultivadas 3 días en oscuridad. A) Raíz con localización nuclear. B) Raíz con localización difusa. C) Cotiledones. D) *Hook*. E) Hipocotilo.

En el estudio preliminar, se pudo observar también que las distintas líneas HHC parecían tener distintas intensidades de fluorescencia. Por este motivo se decidió cuantificar niveles de la fusión traduccional por fluorescencia. A diferencia de otros tejidos, donde los núcleos de las células se encuentran más dispersos, en la raíz existen una gran cantidad de núcleos cercanos convirtiéndolo en un sistema idóneo para cuantificar fluorescencia al minimizar la variabilidad entre núcleos. La raíz es un sistema simple, el extremo apical radicular cuenta con células meristemáticas en división, las cuales son células pequeñas en donde el núcleo ocupa la mayor parte del espacio intracelular. La raíz es un cuerpo de células que se expande en las 3 dimensiones. En un microscopio confocal, la máxima fluorescencia de un núcleo se capta cuando este está en el plano observado, por lo que se optó por elegir los núcleos más brillantes para cuantificar. Según como haya quedado ubicada la raíz se podrán ver más o menos núcleos en un mismo plano, de modo que casi siempre se pueden observar 10 núcleos en un mismo plano. Idealmente, se podría realizar un z-stack (imagen 3D compuesta por la suma de los planos confocales) de toda la raíz y medir en 3D, pero dado que esto requiere una demanda de tiempo excesiva de operario y de uso de confocal se decidió adoptar el criterio anterior. Se cuantificaron al menos 10 núcleos de 8 plántulas de cada línea independiente HHC. Para cuantificar se utilizó el programa ImageJ1.51n (versión 10.2). En este se delimitó un área aproximada al tamaño de un núcleo, se estandarizó, y se midió el brillo del área. El valor final obtenido en el programa es la densidad integrada, que se corresponde al valor de la media del área (Figura 11).



**Figura 11:** Localización nuclear de HYL1-CFP en raíz de plántula HHC 15.1 cultivada 2 días en oscuridad. La imagen corresponde a una captura de pantalla del programa ImageJ que se utilizó para la cuantificación de fluorescencia. La flecha amarilla señala el núcleo que fue seleccionado para medir el nivel de fluorescencia, el círculo amarillo delimita la región de interés (ROI). Las flechas azules señalan otros núcleos que corresponderían al mismo plano confocal. Las flechas rojas señalan núcleos que se evitaron cuantificar porque posiblemente correspondan a otros planos confocales.

Para estos experimentos se utilizaron plántulas HHC cultivadas dos días en oscuridad porque en este estadio la mayoría de las muestras presentaban una localización nuclear discreta. La línea HHC 20.4 mostró consistentemente una localización difusa, por lo que se descartó para su cuantificación. Si bien la línea 15.1 mostró mayor fluorescencia que el resto, casi 5 veces más que la línea 10.7, el resto de las líneas mostraron niveles similares (Figura 12).



**Figura 12:** Niveles relativos de fluorescencia de HYL1-CFP en líneas HHC. Se obtuvieron fotos de raíces de cinco líneas HHC cultivadas dos días en oscuridad por microscopía confocal de fluorescencia. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de entre 8 y 10 núcleos por cada raíz de al menos 8 plántulas de cada línea. Las barras indican promedio  $\pm$  SEM de dos réplicas biológicas. Las diferencias significativas observadas se corresponden con un  $P < 0.05$ . UA: Unidades arbitrarias.

#### 4.1.4. Localización y cuantificación de HYL1 durante el desarrollo escotomorfogénico

En los experimentos anteriores, los resultados muestran que las líneas HHC complementan la mutación *hyl1-2*, indicando que HYL1 es funcional en estas plantas. Además, se puso a punto la observación y cuantificación por fluorescencia de la fusión HYL1-CFP. Para estudiar la localización de HYL1 durante la escotomorfogénesis se decidió analizar plántulas cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad de las líneas HHC 10.7 y 15.1. Si bien los niveles de proteína deberían ser similares al endógeno en todas las líneas, dado que se usó el promotor endógeno, se optó por utilizar las dos líneas con mayores diferencias por si había algún efecto cuantitativo.

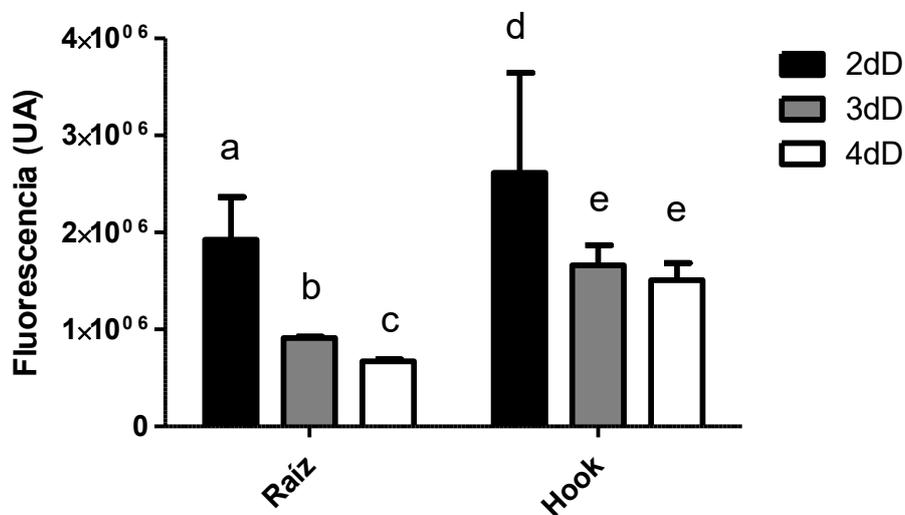
Se puede observar que, a 2 días, la localización es preferencialmente nuclear en los tres tejidos analizados (raíz, *hook*, hipocotilo), pero luego conforme avanza el tiempo cada vez son más las plántulas que muestran una distribución deslocalizada y difusa (Tabla IV), tal como se muestra en la figura 10B. A tres días hay una mayor proporción de núcleos difusos en la línea 10.7 que en la línea 15.1. Finalmente, a los 4 días en oscuridad la localización ya no es claramente nuclear en raíz ni en hipocotilo en ninguna de las dos líneas. La localización en el *hook* es nuclear y estable durante todo el desarrollo escotomorfogénico.

**Tabla IV:** Localización subcelular de HYL1-CFP en distintos tejidos durante el desarrollo escotomorfogénico.

HHC 10.7	2dD		3dD		4dD	
	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso
Raíz	11	3	11	8	4	11
<i>Hook</i>	14	0	19	0	14	1
Hipocotilo	10	4	1	18	0	15

HHC 15.1	2dD		3dD		4dD	
	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso	Nuclear	Difuso
Raíz	18	1	19	3	12	14
<i>Hook</i>	19	0	21	1	26	0
Hipocotilo	18	1	21	1	15	11

El estudio cualitativo anterior arrojó diferencias en la localización de HYL1 en los distintos tejidos, por lo que se decidió caracterizar cuantitativamente las diferencias observadas. La línea HHC10.7, además de la dificultad de encontrar suficientes plántulas con localización nuclear, no se pudo utilizar para cuantificar debido a sus niveles muy bajos de fluorescencia, sobre todo a 3 y 4 días en oscuridad. Para la línea HHC15.1, se evidenció que los niveles de fluorescencia decaen conforme avanza el tiempo, tanto en *hook* como en raíz (Figura 13). Los mayores niveles de fluorescencia se encuentran a 2 días. Entre el día 2 y 3 hay una caída abrupta, para luego disminuir un poco más en la raíz, o estabilizarse en el caso del *hook* (Figura 13). Si bien en ambos tejidos HYL1 se comporta de manera similar, la mayor concentración de HYL1 en el *hook* y su mayor estabilidad hacia el día 3 y 4, en conjunto con los datos cualitativos de la tabla IV, sugieren que HYL1 podría estar sometido a una regulación postraduccional diferencial en distintos tejidos.

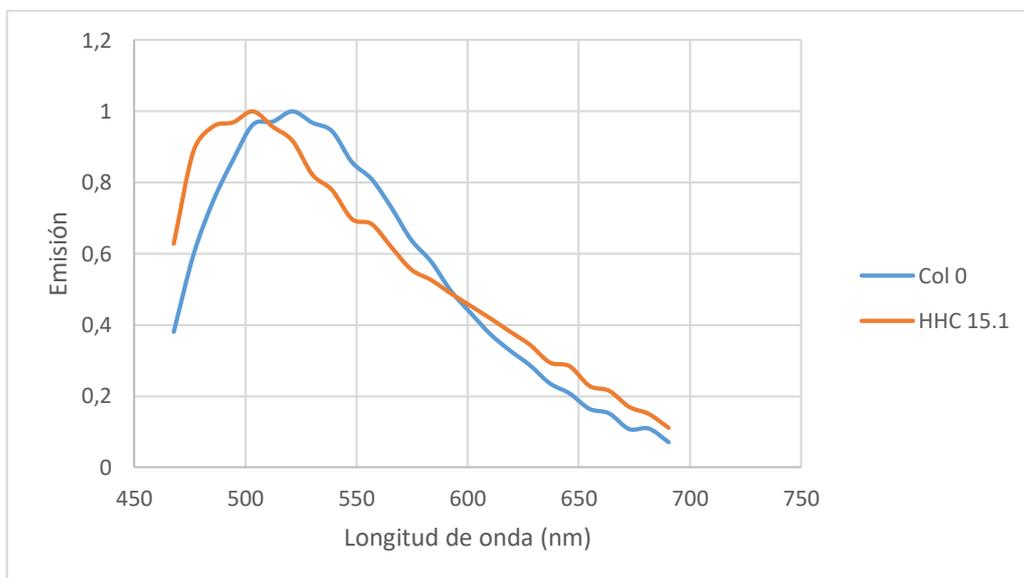


**Figura 13:** Niveles de fluorescencia de HYL1-CFP durante el desarrollo escotomorfogénico. Cuantificación de intensidad de fluorescencia, mediante el programa ImageJ, de núcleos de raíces y *hooks* de la línea HHC15.1 cultivada 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). Las barras corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 2 réplicas biológicas de al menos 70 núcleos para cada muestra. Las diferencias significativas observadas se corresponden con un  $P < 0.05$ . UA: Unidades arbitrarias.

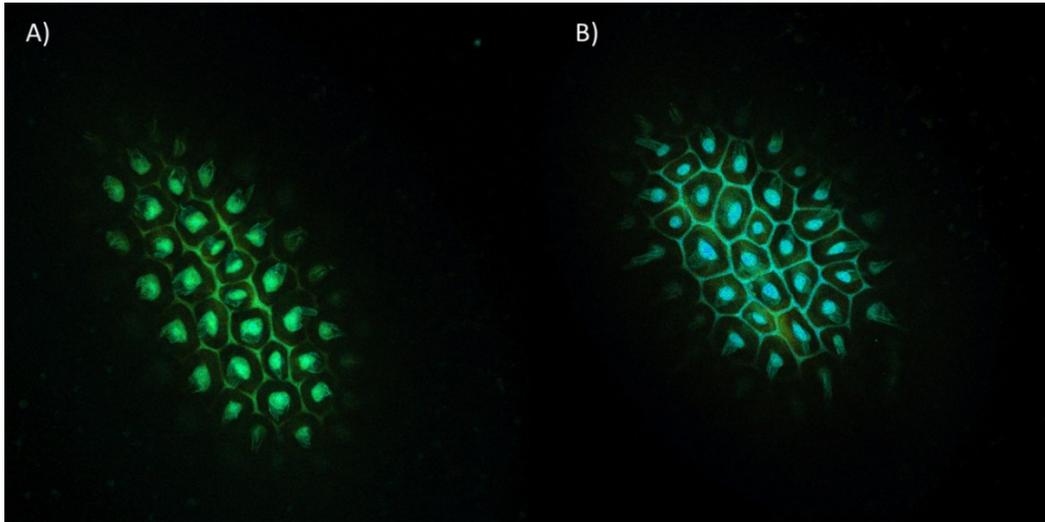
#### 4.1.5. Fluorescencia en semilla

Los resultados mostrados previamente sugieren que los niveles de HYL1 decaen con el transcurso del tiempo durante el desarrollo escotomorfogénico. Además, los fenotipos

alterados que muestran las plántulas *hyl1-2* parecen atenuarse en el día 3 y 4, al mostrar menor diferencia con la plántula silvestre que en el día 2 (Figura 3). Estas razones sugieren que HYL1 tiene un mayor impacto en el desarrollo temprano, por lo que se decidió estudiar si la proteína de fusión estaba presente en semillas embebidas mediante microscopía de fluorescencia. Las semillas poseen numerosos compuestos que generan autofluorescencia, por lo que para poder evidenciar la presencia de HYL1-CFP se realizó un barrido espectral desde 465nm a 690nm de semillas de la línea HHC 15.1 y de Col-0 como control (Figura 14). La semilla Col-0 tiene su pico de emisión a 521 nm, mientras que la línea HHC 15.1 muestra un pico de emisión a 503 nm. La proteína CFP tiene su pico de emisión a 485nm. Este corrimiento al azul implicaría la existencia de la proteína de fusión HYL1-CFP en semillas HHC 15.1. En la figura 15 se puede apreciar la diferencia de color entre semillas Col-0 y semillas HHC 15.1. La presencia de HYL1 en semilla sugiere que podría estar cumpliendo un papel desde la germinación.



**Figura 14:** Barrido espectral de emisión de fluorescencia de semillas Col-0 y HHC 15.1. Se utilizó el microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM 880 Axio Observer.

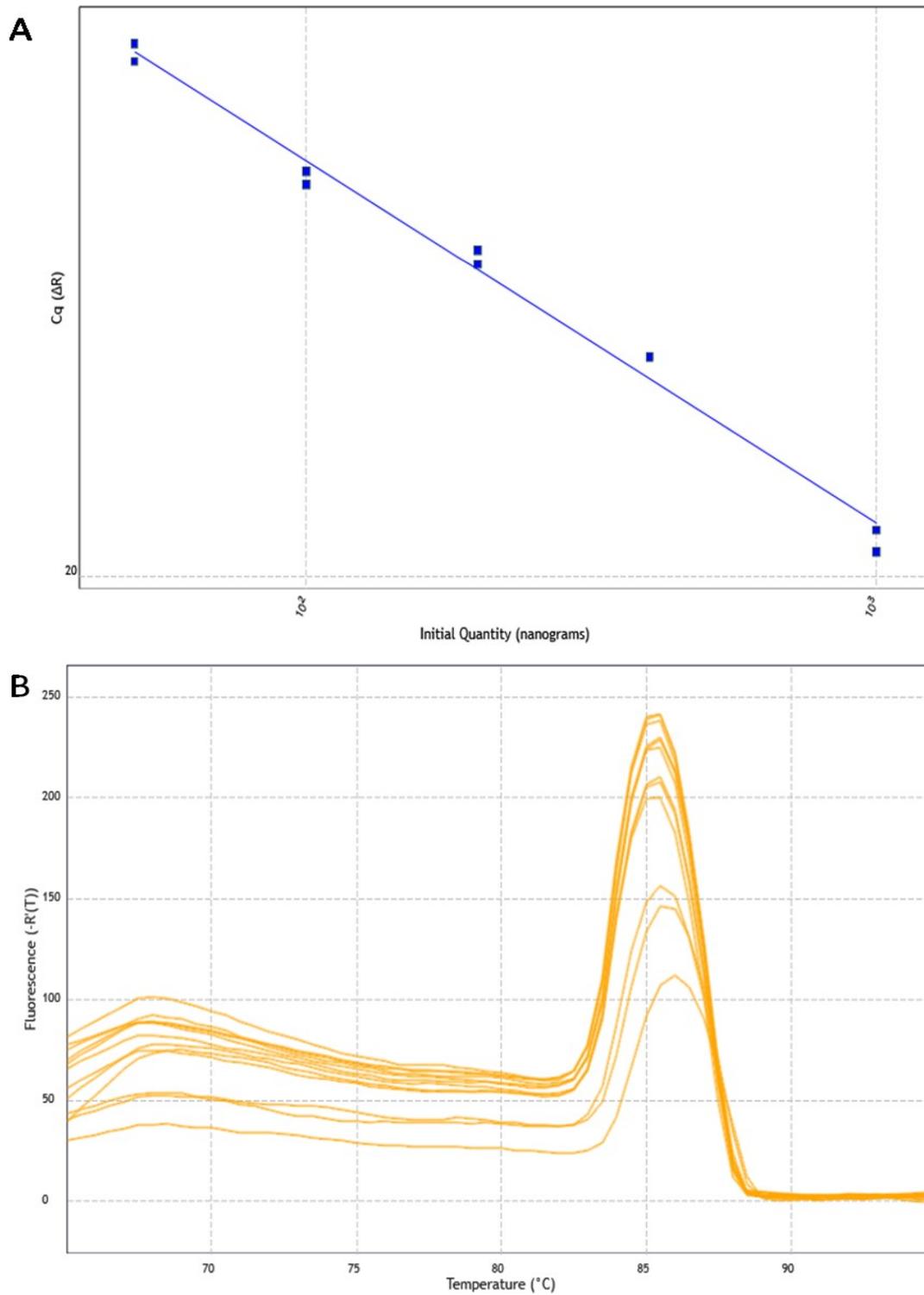


**Figura 15:** HYL1-CFP se expresa en semillas. Imágenes de fluorescencia de semillas embebidas de Col-0 (A), y de la línea HHC 15.1 (B).

#### 4.1.6. Análisis de expresión de *HYL1*

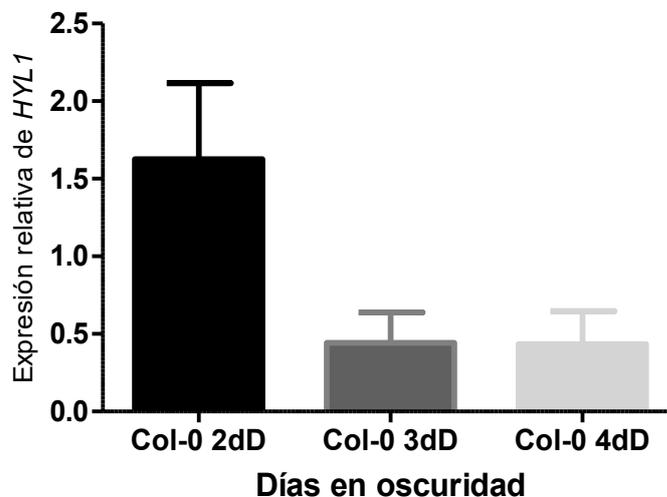
Los niveles de fluorescencia de la fusión HYL1-CFP van disminuyendo paulatinamente durante la escotomorfogénesis. A pesar que los resultados sugieren que HYL1 está sujeto a una regulación postranscripcional en oscuridad, no podemos descartar que sus niveles también sean producto de una disminución en la expresión del gen. Con el objetivo de abordar esta pregunta se decidió evaluar los niveles de expresión de *HYL1* durante la escotomorfogénesis. Para realizar este análisis, se decidió medir expresión por PCR en tiempo real. Se probaron tres pares de oligonucleótidos con los que ya contaba el laboratorio (CLNB2-CLNB3, CLNB4-CLNB5, CLNB6-CLNB7, amablemente cedidos por el Dr. Palatnik), y otro par diseñado en este trabajo de tesina, HYL1qPCR-fw y HYL1qPCR-rev. Todos estos oligonucleótidos hibridan en distintas regiones del gen generando amplicones de distintos tamaños. Estos oligonucleótidos se probaron utilizando 5 ng de ADNc de plántulas 35SCaMV::*HYL1* (plantas sobreexpresantes de *HYL1*; generadas en nuestro laboratorio <sup>12</sup>), cultivadas 3 días en oscuridad como molde. Se utilizaron estas plantas para asegurar que los oligonucleótidos se probarían en muestras que expresaran *HYL1*. De los pares de oligonucleótidos utilizados, el par HYL1qPCR-fw y HYL1qPCR-rev permitió detectar *HYL1* entre tres y cuatro ciclos (Ct) antes que con los pares CLNB 2-3 y 4-5. Con el par CLNB 6-7 no se obtuvo amplificación. Los resultados obtenidos podrían deberse al tamaño de los amplicones, mayores en los pares CLNB, o a una menor eficiencia de estos pares de oligonucleótidos. Como las pruebas de

los oligonucleótidos se realizaron en plantas sobreexpresantes de HYL1 se decidió continuar con los experimentos con el par de oligonucleótidos HYL1qPCR-fw y HYL1qPCR-rev ya que proveen una mayor sensibilidad para detectar *HYL1* (Ct más bajo). Con este par se procedió a realizar la curva de calibración con diluciones seriadas (1/10, 1/25, 1/100 y 1/200) a partir de una muestra de 50 ng/ul de ADNc para corroborar que ajustaba a la curva con una buena eficiencia (figura 16). La curva de calibración donde se grafica cantidad relativa vs Ct, ajustó con una eficiencia del 101,48 y un  $R^2 = 0,989$  y una pendiente de -3,287 (figura 16A), demostrando la buena eficiencia de los oligonucleótidos utilizados. La curva de *melting* confirmó la especificidad de la reacción al mostrar un pico único (figura 16B).



**Figura 16:** Optimización de oligonucleótidos para amplificar HYL1 por qPCR. Se utilizaron los oligonucleótidos HYL1qPCR-fw y HYL1qPCR-rev. A) Curva de calibración con diluciones seriadas a partir de ADNc de plantas 35SCaMV::HYL1. B) Curva de *melting* del producto amplificado. Se efectuaron dos réplicas técnicas para cada muestra.

Luego se cuantificaron los niveles de expresión de *HYL1* durante el desarrollo escotomorfogénico. Para esto se extrajo ARN de plántulas Col-0 cultivadas a 2, 3 y 4 días en oscuridad. El ARN se analizó por espectrofotometría para evaluar cantidad y pureza y luego se corrió en gel de agarosa para verificar la calidad del ARN extraído, evaluando la integridad de los ARN ribosomales. Finalmente, se sintetizó el ADNc de cada muestra y se utilizó para el análisis de expresión de *HYL1* (Figura 17). Si bien parece haber una mayor expresión de *HYL1* a dos días de oscuridad en comparación con 3dD y 4dD, las diferencias no son estadísticamente significativas. En consecuencia, se necesitarían más experimentos para corroborar, con un respaldo estadístico, si hay una expresión diferencial o no.

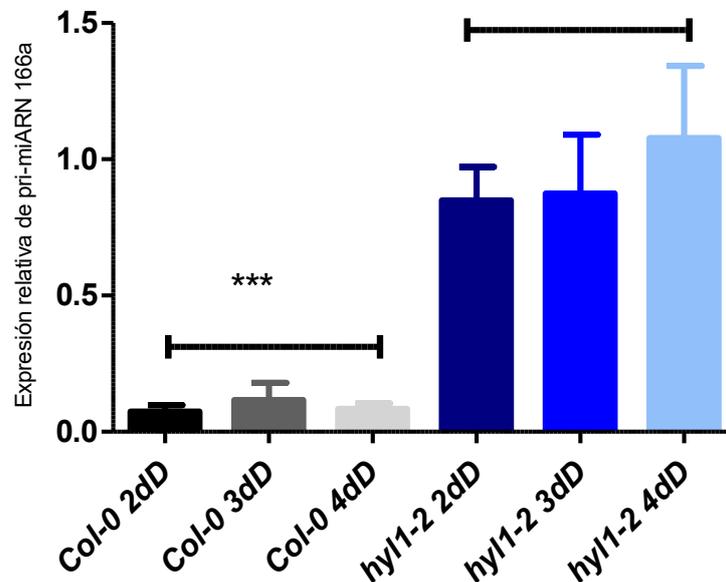


**Figura 17.** Expresión de *HYL1* durante la escotomorfogénesis. Medidas de expresión del gen *HYL1* por PCR en tiempo real relativo al gen *housekeeping PP2A*, en plántulas Col-0 y *hyl1-2* cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). Se utilizaron dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas para cada estadio. Las barras indican el promedio  $\pm$  SEM.

#### **4.1.7. Expresión de precursores de miARN 166a en escotomorfogénesis.**

Como se explicó anteriormente, mutantes en *HYL1* muestran defectos severos en el procesamiento de microARNs. Al ser incapaz de procesarlos hay una acumulación de precursores, contrariamente a lo que ocurre en plantas silvestres, donde los precursores se procesan eficientemente y son casi imposible de detectar por PCR semicuantitativa. Para corroborar que el procesamiento de microARNs esté activo durante la

escotomorfogénesis, se analizó la expresión de un precursor modelo, el pri-microARN 166a. La figura 18 muestra una sobreacumulación de precursores del miR 166a en plantas *hyl1-2*, respecto de las plantas Col-0 durante todos los tiempos analizados. Este dato, junto con otros precursores analizados en el laboratorio, sugieren que el procesamiento está activo durante el desarrollo en oscuridad.



**Figura 18.** Los precursores del microARN 166a se acumulan en *hyl1-2* durante la escotomorfogénesis. Medidas de expresión del pri-microARN166a por PCR en tiempo real relativo al gen *housekeeping PP2A*, en plántulas Col-0 y *hyl1-2* cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). Las barras indican el promedio  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas observadas se corresponden con un  $P < 0,05$ .

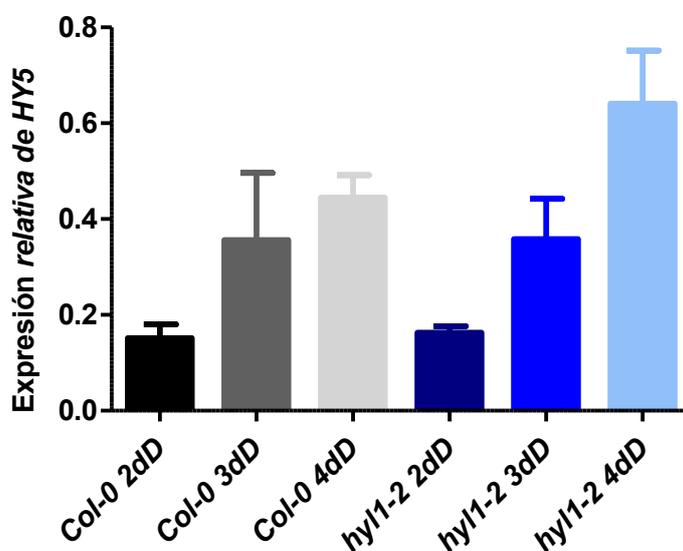
#### 4.1.8. Análisis de expresión de *HY5* y *PIF3*

Dado que plántulas mutantes en *HYL1* cultivadas en oscuridad elongan el hipocotilo en menor medida y despliegan el *hook* más rápidamente que plántulas silvestres, éstas tienen un comportamiento parcialmente fotomorfogénico. Este hecho nos conduce a pensar que algunos de los factores clave que controlan la escotomorfogénesis o la fotomorfogénesis podrían estar desregulados. Dos de los factores más importantes de esta regulación son *HY5* y la familia *PIFs*, como se describió en la introducción. Brevemente, *HY5* es un factor de transcripción activador del desarrollo fotomorfogénico que regula la actividad de una gran cantidad de genes, e incluso promoviendo la biosíntesis de algunos miARNs <sup>31</sup>.

Mutantes en *HY5*, entre otros defectos, generan un hipocotilo alargado en presencia de luz, como si estuvieran bajo un desarrollo escotomorfogénico <sup>37</sup>.

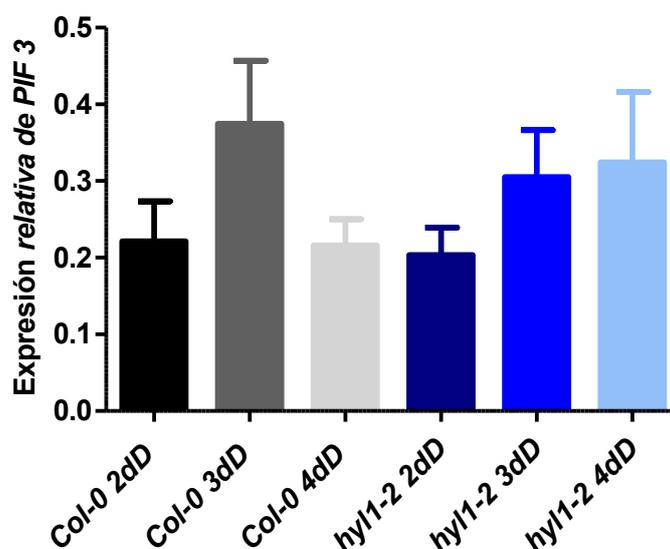
PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (*PIF 3*), es un factor de transcripción perteneciente a la familia PIF que mantiene el estado etiolado de las plántulas mientras crecen en oscuridad al reprimir un gran número de genes que promueven la fotomorfogénesis y activar otros de escotomorfogénesis <sup>38</sup>. Mutantes puntuales de algún miembro de la familia PIF no tiene grandes consecuencias fenotípicas para las plántulas, pero mutantes múltiples de varias PIFs conducen a un fenotipo completamente fotomorfogénico a pesar de crecer bajo condiciones de oscuridad <sup>39</sup>.

Para entender si alguno de estos factores se encuentra desregulado durante la escotomorfogénesis en mutantes *HYL1* se evaluaron los niveles de expresión de *HY5* y *PIF 3*, en plántulas Col-0 y *hyl1-2*, cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad (Figura 19 y 20). La figura 19 sugiere que la expresión de *HY5* va aumentando durante el desarrollo escotomorfogénico, pero no se observan diferencias entre plantas *hyl1-2* y WT. Por lo que si los niveles de proteína de *HY5* están aumentados en la mutante *hyl1-2*, explicando el fenotipo parcialmente fotomorfogénico, no se debe a un aumento de la expresión del gen. La figura 20 sugiere que la expresión de *PIF 3* no se ve afectada en la mutante *hyl1-2*. Con idéntico razonamiento, si hubiera menores niveles de proteína *PIF 3* que justifiquen el fenotipo parcialmente fotomorfogénico, esto no parece deberse a una disminución en los niveles de expresión del gen.



**Figura 19:** La expresión de *HY5* no se ve afectada por la ausencia de *HYL1* en escotomorfogénesis. Medidas de expresión de *HY5* por PCR en tiempo real relativo al gen *housekeeping PP2A*, en plántulas Col-0 y *hyl1-2* cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). Se

utilizaron dos réplicas biológicas con tres replicas técnicas para cada estadio. Las barras indican el promedio  $\pm$  SEM.

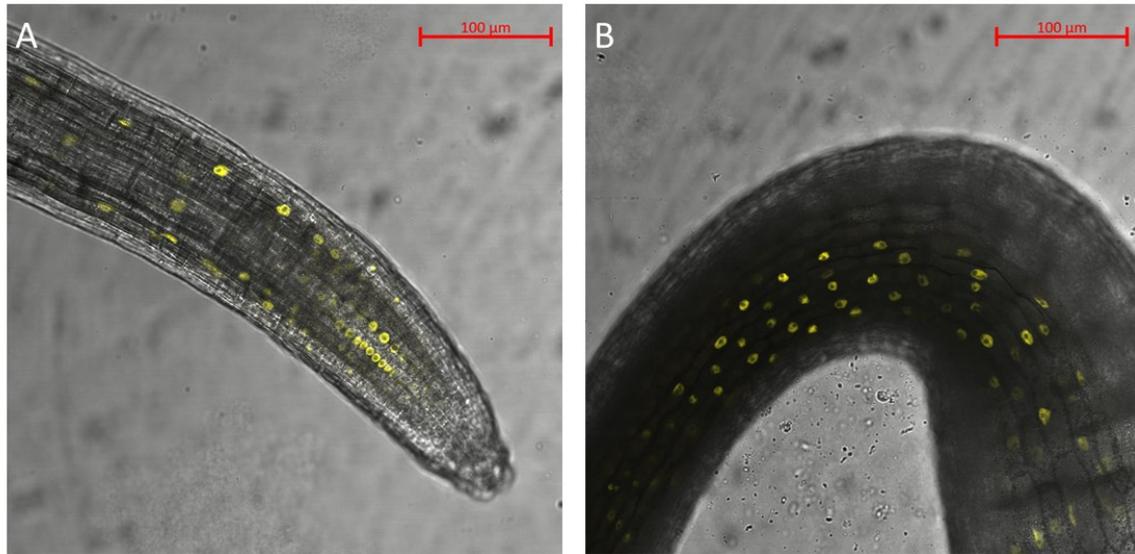


**Figura 20:** La expresión de *PIF3* no se ve afectada por la ausencia de *HYL1* en escotomorfogénesis. Medidas de expresión de *PIF3*, por PCR en tiempo real, relativo al gen *housekeeping PP2A* en plántulas Col-0 y *hyl1-2*, cultivadas 2, 3 y 4 días en oscuridad (dD). Se utilizaron dos réplicas biológicas con tres replicas técnicas para cada estadio. Las barras indican el promedio  $\pm$  SEM.

#### 4.1.9. Localización de SERRATE durante la escotomorfogénesis

La proteína SERRATE (SE) es otro de los componentes centrales de la maquinaria de procesamiento de miARNs, como fue descrito en la introducción. Mutantes en *SE* (*se-1*), al igual que *hyl1-2*, elongan el hipocotilo a menor velocidad que plántulas silvestres. Sin embargo, presentan un fenotipo opuesto de apertura del *hook* (más cerrado) al de *hyl1-2* comparado con las WT. Por esta razón, decidimos comprobar la localización de SE durante la escotomorfogénesis mediante microscopía confocal de fluorescencia. En el laboratorio contábamos con semillas T1 de plantas *se-1* transformadas con SE-YFP bajo su propio promotor (pSE::YFP-SE *se-1*). Al igual que con las líneas HHC, se optó por transformar plantas *se-1* para evitar posibles interferencias de la proteína endógena. Estas semillas T1 se sometieron a una selección con higromicina en oscuridad y se observaron las plántulas resistentes bajo microscopio confocal para visualizar la fluorescencia de la fusión. Se observaron 5 plántulas y todas mostraron la misma localización cualitativa,

esto es, la presencia de SERRATE en todos los tejidos analizados, cotiledones, *hook*, hipocotilo y raíz, con una localización nuclear discreta en forma de anillos (Figura 21). Debido a que estas plántulas T1 fueron cultivadas en presencia de higromicina, que podría estar afectando los resultados, los resultados obtenidos son preliminares. En el futuro se obtendrán líneas homocigotas de éstas, de igual modo a como se obtuvieron las líneas HHC, para un estudio más detallado.



**Figura 21:** Localización de SE-YFP en oscuridad. Imágenes de fluorescencia por microscopia confocal de plántulas pSE::SE-YFP *se-1* cultivadas 3 días en oscuridad en presencia de higromicina. Raíz (A), *hook* (B)

#### **4.2. Construcción de un sistema inducible de expresión de HYL1 *in planta***

Mediante la utilización de las líneas HHC conseguimos visualizar la localización de HYL1 durante todo el desarrollo escotomorfogénico. Los resultados nos llevaron a sugerir que la proteína podría estar sometida a una regulación postraduccional específica de tejido. Sin embargo, este abordaje no permite entender en qué momento y lugar HYL1 es funcional. Con el objetivo de generar una herramienta que permita abordar esta pregunta se decidió construir un sistema de expresión de *HYL1* inducible, utilizando el método de clonado *GreenGate*<sup>35</sup>. Además, el sistema se concibió para poder seguir la proteína por fluorescencia, fusionándole GFP al C- terminal, y para estudios bioquímicos fusionando tres epítopes de cMYC al N- terminal. El sistema inducible utilizado proviene del sistema de dos componentes *AlcA-AlcR* para inducir por etanol. En presencia de

etanol, la proteína AlcR se une al promotor *AlcA* y activa la expresión a partir de este promotor. El sistema *AlcA-AlcR*, ya se ha utilizado para la expresión inducible de genes en plantas, incluida *Arabidopsis thaliana* <sup>35</sup>.

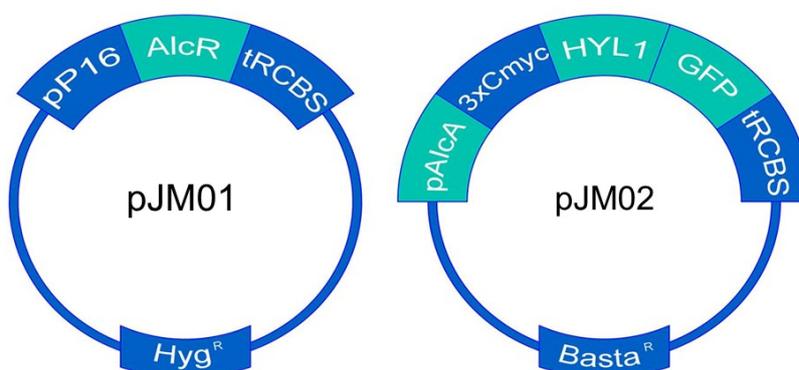
El sistema de clonado *GreenGate*, pensado para la transformación de plantas, permite un rápido ensamblado de 6 módulos típicos en un vector binario de destino. Todos los vectores utilizados en este trabajo fueron amablemente cedidos por J. Palatnik. Se verificó la identidad de cada uno de los vectores, mediante corte con enzimas de restricción y posterior corrida en gel de agarosa. Para poder introducir *HYL1* en el vector pGGC000, se obtuvo la región codificante del gen mediante una reacción de PCR, utilizando un vector binario que contiene la construcción 35SCaMV::GFP-HYL1 (cedido amablemente por el Dr. Manavella) como molde. Para esta reacción, se utilizó la enzima Pfu, con función correctora, y los oligonucleótidos 115 y 117 (Tabla I), adecuadamente diseñados para que los extremos sean compatibles para la reacción *GreenGate*. El producto amplificado se purificó a partir de gel de agarosa, luego de efectuar la electroforesis, y posteriormente se clonó en el vector pGGC000 mediante una reacción *GreenGate* (generando el nuevo vector pGGCN01). Se comprobó que la construcción no tuviera mutaciones mediante secuenciación, utilizando los oligonucleótidos 115 y 117 para tener doble lectura de la secuencia. Una vez obtenido el módulo pGGN01, se procedió a realizar las reacciones *Greengate*. Se utilizaron los módulos detallados en la tabla V para la obtención de los constructos finales, pJM01 y pJM02 (figura 22). El constructo pJM01, además del cassette de resistencia a higromicina, contiene la región codificante del gen *AlcR*, bajo el promotor constitutivo de la subunidad ribosomal P16 y el terminador de la Rubisco. El constructo pJM02 contiene a la región codificante de *HYL1* fusionada en su N-terminal a 3 copias del epítipo del cMYC, y en el C-terminal a la proteína fluorescente GFP, toda esta fusión bajo el promotor *pAlcA*, y el terminador de la enzima Rubisco, además del cassette de resistencia a Basta.

**Tabla V:** Vectores utilizados para las reacciones *GreenGate*.

\* Las secuencias *dummy* contienen unos pocos pares de bases para ensamblarse de manera compatible en la reacción *GreenGate*.

pJM01		pJM02	
Vector	Módulo	Vector	Módulo
pGGA005	pP16	pGGA008	p <i>AlcA</i>
pGGB003	B- <i>dummy</i> *	pGGB020	3xc-myc
pGGC011	<i>AlcR</i>	pGGCN01	CDS
pGGD017	D- <i>dummy</i> *	pGGD001	<i>Linker-GFP</i>
pGGE001	tRBCs	pGGE001	tRBCs
pGGF005	pUBQ:Higromicina <sup>R</sup> :tOCSj	pGGF008	pNOS:Basta <sup>R</sup> :tNOS
pGGZ003	Vector de destino	pGGZ003	Vector de destino

Los vectores generados pJM01 y pJM02 (Figura 22) se analizaron por digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa. Los vectores se transformaron en *A. tumefaciens* (sección 3.11.3) y estas cepas se utilizaron para transformar plantas *hyll-2* por el método de *floral dip* (sección 3.11.4).



**Figura 22:** Vectores construidos a partir del sistema *GreenGate*. En el vector pJM01 no se muestran los módulos correspondientes a los *tags* C- y N- terminal, ya que se usaron vectores *dummy*. Hyg<sup>R</sup>: cassette de resistencia a Hygromicina B; Basta<sup>R</sup>: cassette de resistencia a fosfinotricina.

La obtención de plantas homocigotas que contengan cada una de las construcciones se realizó de la misma manera que para las líneas HHC, como se explica en la sección 4.1.1. Se obtuvieron 44 líneas independientes (T1) con el vector pJM02, y 12 con el vector pJM01, los cuales se seleccionaron en placa con las resistencias correspondientes (higromicina para JM01 y fosfotricina para JM02) y luego se pasaron a tierra. Con las semillas (T2) de estas plantas se hicieron análisis de segregación en placas de las 2 líneas conseguidas a partir de la transformación con pJM01 y de 6 líneas con pJM02 (Tabla VI). En el caso de las líneas JM01, la selección con higromicina no funcionó de manera correcta, siendo toxica incluso para plantas resistentes, por este motivo solo se pudo continuar con las dos líneas q sobrevivieron. Finalmente, se plaquearon semillas de las líneas pJM01-1 y -2, y de las líneas pJM02-1, -6 y -7 para seleccionar líneas homocigotas (T3). Se analizaron 9 plantas para el caso de JM01-1 y -2, y 8 plantas de las líneas JM02-1, -6, y -7. De estas, se obtuvieron finalmente las líneas homocigotas pJM01-1.3, pJM01-1.7, pJM02-1.7, pJM02-1.13. Para cada generación de plantas, se comprobó que ninguna de las líneas transgénicas pJM02 conseguía complementar los defectos en hojas de las mutantes *hyl1-2*, lo que asegura que el promotor *pAlcA* no manifiesta “escapes” en la expresión de *HYL1*.

**Tabla VI.** Análisis de segregación de semillas T2 de líneas independientes JM01 y JM02. La columna de segregación indica el número de plantas resistentes respecto de las sensibles al agente de selección higromicina para JM01 y PPT para JM02. Para el análisis de segregación se espera un  $\chi^2 < 3.84$  para un  $p < 0.05$  con un grado de libertad.

Línea	Segregación	$\chi^2$	T-DNA
JM02-1	72/21	0.1191	1
JM02-2	37/19	1.074	1
JM02-6	70/18	0.5176	1
JM02-7	37/11	0.0572	1
JM02-8	53/31	2.7851	1
JM02-9	29/23	4.2484	>1
JM01-1	64/26	1.1906	1
JM01-2	54/19	0.0566	1

Una vez obtenidas las líneas homocigotas (T3) para JM01 y JM02 se realizaron cruzamientos para conseguir plantas que contengan ambos constructos. Para realizar un cruzamiento se eliminan de la planta elegida como madre los sépalos, pétalos y estambres. Luego, se frota las anteras de la planta macho con el carpelo remanente para polinizarla. Todo este procedimiento se realiza bajo lupa. El carpelo polinizado se cubre con papel film para evitar contaminaciones y se espera a que se desarrolle la silicua. Se realizaron tres cruzamientos para maximizar las posibilidades de éxito: pJMX1 (pJM01-1.7 X pJM02-1.13), pJMX2 (pJM02-1.7 X pJM01-1.7) y pJMX3 (pJM01-1.3 X pJM02-1.13). Las semillas obtenidas de estos cruzamientos (F1) se cultivaron en tierra para obtener semillas F2. En las semillas F2, ambos constructos están segregando, por lo que se plaquearon con ambos agentes de selección. Aquellas que sobrevivieron a la selección, indicando que contienen ambos constructos, se trasplantaron a tierra. Las semillas que se obtengan de estas plantas deberán analizarse para conseguir plantas homocigotas para ambas construcciones. Este sistema inducible servirá para complementar los resultados obtenidos por las líneas HHC, permitiendo estudiar el momento exacto en que *HYLI* es necesario para el correcto desarrollo escotomorfogénico, así como estudiar su localización a partir de su síntesis *de novo*.

## 5. Discusión y Conclusiones

HYL1 es una proteína clave en la biogénesis de miARNs. Su participación, junto con SERRATE y DCL1, es necesaria para el correcto procesamiento de precursores de miARNs<sup>4</sup>. Mutantes en *HYL1* acumulan precursores de miARNs sin procesar y, por ende, muestran una disminución en los niveles de miARNs maduros. Además, mutantes en *HYL1* presentan un fenotipo de hiponastia en las hojas, una menor fertilidad y velocidad de crecimiento, lo que pone en evidencia la importancia de la regulación de distintos procesos del desarrollo de la planta por miARNs y sus genes diana. Aun así, se desconoce el alcance de esta regulación en otros procesos biológicos. Si bien hasta ahora no se han podido identificar miARNs que participen en la regulación del desarrollo escotomorfogénico, resultados de nuestro laboratorio muestran que plantas mutantes en DCL1, SE y HYL1 tienen un desarrollo escotomorfogénico alterado (Figura 4). El lento desarrollo del hipocotilo respecto de plántulas silvestres es un fenotipo compartido, tanto por mutantes *hyl1-2* como *se-1* (mutantes de *SE*) y *dcl1-100* (mutantes hipomórficas de *DCL1*). Por otra parte, el desarrollo del *hook* en estas mutantes muestran fenotipos opuestos (figura 4). Mientras que plántulas *hyl1-2* muestran una apertura temprana del *hook*, en plántulas *dcl1-100* y *se-1*, el mismo se mantiene más cerrado que en plántulas silvestres. Debido a que en plantas mutantes en el procesamiento de miARNs se encuentran afectadas muchas familias de miARNs, se puede hipotetizar que estas mutantes tengan un retraso global en diversos procesos biológicos. Esto podría estar ocurriendo en la elongación del hipocotilo en oscuridad, dado los fenotipos observados en plántulas *hyl1-2*, *dcl1-100* y *se-1*. Sin embargo, la dinámica de apertura del *hook* en oscuridad está alterada de manera opuesta en *hyl1-2* que en los mutantes de *SE* o *DCL1*. Este hecho sugiere que HYL1 podría estar cumpliendo una función alternativa a la que cumple en la biogénesis de miARNs. Si bien nadie describió esto en plantas, recientemente se descubrió que la proteína DGCR8 de animales (la homóloga funcional de HYL1) cumple una función independiente de Drosha (una homóloga a DCL1), actuando en el complejo del exosoma<sup>40</sup>. Por otra parte, HYL1 podría estar cumpliendo una función tejida específica diferente a SE y DCL1 en la biogénesis de miARNs, lo cual nos condujo a estudiar la localización de HYL1 durante la escotomorfogénesis. Se ha reportado una localización tanto discreta como homogénea en el núcleo de HYL1, y algunas veces citoplasmática, en trabajos con protoplastos de *Arabidopsis*<sup>10,24</sup> y *N. Tabacum*<sup>25</sup>. Los autores proponen que la presencia de HYL1 fuera del núcleo se debe al

exceso de proteína al estar expresada bajo el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S. La localización nuclear discreta la describen como puntos pequeños perinucleares denominados *dicing bodies*, donde colocan las proteínas que participan en la biogénesis de miARNs <sup>22</sup>. Este último estudio se realizó *in planta* con las mismas construcciones que se utilizaron para generar las líneas HHC y cabe destacar que todas las observaciones se hicieron en plantas cultivadas en condiciones de luz. En este trabajo de tesina, las líneas HHC también mostraron una localización nuclear homogénea y, raramente, la presencia de *dicing bodies*. Además, los resultados mostraron una localización difusa en todos los tejidos cada vez más frecuente a medida que avanza el desarrollo escotomorfogénico (Tabla IV). COP 1 es una proteína que cumple un papel central en el mantenimiento de la escotomorfogénesis, mediando la degradación de promotores de la fotomorfogénesis, como los fitocromos <sup>29,30</sup> y HY5 <sup>31</sup> en oscuridad. COP 1 en oscuridad migra al núcleo, mientras que en presencia de luz tiene una localización citoplasmática. El laboratorio de Cho sugirió la existencia de una proteasa X que proteoliza a HYL1 en oscuridad, cuando COP1 migra al núcleo <sup>41</sup>. En presencia de luz, COP1 sería capaz de algún modo de proteger a HYL1 en el citoplasma inhibiendo a la proteasa X. Tal vez, la fluorescencia deslocalizada observada en las líneas HHC se deba a la CFP junto a algún fragmento de HYL1, o la CFP sola, que es capaz de difundir hacia todas partes. La fluorescencia deslocalizada también se podría deber a un daño en el tejido que permita a la proteína difundir libremente, sin embargo, no se observaron daños en las imágenes de campo claro. Si bien ocasionalmente se pudieron apreciar *dicing bodies* en las líneas HHC no se encontró ningún patrón de su presencia, además, todas las líneas lograron complementar los fenotipos *hyl1-2* mostrando que HYL1 está presente y activa (Figura 8 y 9). Las medidas de expresión del precursor del miARN 166a, junto a otros precursores analizados en el laboratorio como el pri-miARN 156c y 162a, también confirman que el procesamiento de miARNs está activo durante la escotomorfogénesis (Figura 18). El análisis detallado de las dos líneas HHC mostró una localización preferencialmente nuclear durante todo el desarrollo escotomorfogénico en el *hook*, a diferencia del hipocotilo y las raíces (Tabla IV). La línea HHC15.1, que mostró mayores niveles de fluorescencia (Figura 12), también mostró una mayor predisposición a una localización nuclear que la línea 10.7 (Tabla 4). Esto podría explicarse por un efecto cuantitativo, donde una mayor resistencia a la degradación por la proteasa X se deba a que los mayores niveles de proteína podrían estar saturando la maquinaria de degradación. HYL1 alterna entre dos estados de fosforilación, un estado hipofosforilado activo, y un

estado hiperfosforilado inactivo. La desfosforilación de HYL1 es llevada a cabo en el núcleo por la fosfatasa C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 (CPL1)<sup>42</sup>. La actividad de CPL1 es específica de tejido, regulada por REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 3 (RCF3). CPL1 es activada por RCF3 principalmente en tejidos jóvenes y en las zonas meristemáticas<sup>21</sup>. El hecho de que las plántulas mantengan la localización nuclear en el *hook* y no en otros tejidos podría indicar una regulación postraduccional específica de tejido. De este modo, CPL1 podría mantener el estado hipofosforilado de HYL1 en el *hook*, favoreciendo su actividad durante todo el proceso escotomorfogénico, gracias a la expresión tejido específica de RCF3, y evitando así su degradación en el citosol. Esta regulación específica en el *hook* estaría de acuerdo con la hipótesis de que HYL1 está cumpliendo un rol específico en este tejido. De cualquier manera, esta hipótesis debería probarse con experimentos específicos que demuestren las diferentes poblaciones de HYL1 (hipo e hiperfosforilado), así como diferencias en expresión y actividad de CPL1 y RCF3, en distintos tejidos durante la escotomorfogénesis. Los niveles de HYL1-CFP durante la escotomorfogénesis muestran un máximo a dos días y luego decaen, manteniéndose estables entre el tercer y cuarto día en el *hook*, pero decayendo un poco más en la raíz (figura 13). Esto coincide con los fenotipos observados en la mutante *hyll-2*, donde las mayores diferencias son observadas a 2 días en oscuridad, mientras que la dinámica de crecimiento es bastante similar al WT luego del segundo día en oscuridad (figura 8). Este hecho podría sugerir que HYL1 tiene una mayor relevancia para la planta en los estadios más tempranos del desarrollo escotomorfogénico. Los resultados preliminares en semilla muestran la presencia de HYL1 previo a la germinación (Figura 15). Dado que en el laboratorio no se ha observado ningún retraso en la germinación de semillas *hyll-2* respecto de semillas silvestres, HYL1 parecería no estar participando en el control de este proceso. Sin embargo, La presencia de un *pool* de HYL1 en la semilla podría ser necesario para su utilización durante los primeros estadios de la escotomorfogénesis postgerminación. Demostrar si la caída en los niveles de fluorescencia, conforme avanza la escotomorfogénesis, es por una degradación postraduccional de un *pool* de la proteína acumulada en la semilla en los primeros días, ayudarían a entender el mecanismo de la regulación de HYL1 y porque esta proteína parece perder importancia a medida que avanza la escotomorfogénesis. La construcción de un sistema para la expresión inducible de HYL1 es una herramienta interesante para intentar responder a estas preguntas. Esta construcción ayudará a definir con mayor precisión cuando HYL1 es necesaria, induciendo la expresión en distintos momentos de

la escotomorfogénesis, y observando a partir de qué momento se debe sintetizar la proteína para contrarrestar los efectos de la mutación. Este sistema fue construido como una fusión de HYL1 a N-terminal cMYC y C-terminal a GFP (Figura 22), por lo que permitirá tanto estudios por fluorescencia como bioquímicos. Este sistema también permitirá observar la síntesis de *nov* de HYL1 y hacia donde se localiza. El estudio de otras proteínas que participan en el procesamiento de miARNs también será de utilidad para entender el papel de HYL1 en la escotomorfogénesis. En la observación preliminar de SE-YFP, ésta se encontró presente en los núcleos de todos los tejidos en plántulas cultivadas a 3 días en oscuridad (Figura 19). En el futuro, se estudiará la localización de SE durante la escotomorfogénesis como se realizó con HYL1. Al día de hoy, no se ha descrito que SE esté sujeta a una regulación postraduccional como HYL1, pero este estudio podrá ayudar a ver si hay diferencias en la localización que ayuden a explicar los fenotipos opuestos en el *hook* de las dos mutantes. Como los fenotipos observados en mutantes *hyll-2* en escotomorfogénesis se corresponden con un fenotipo parcialmente fotomorfogénico, se midió la expresión de PIF3 y HY5, dos importantes reguladores de estos procesos, sin embargo, no se apreciaron diferencias entre plantas *hyll-2* o WT (figuras 19 y 20). Dado que estos factores son regulados a nivel postraduccional por COP1<sup>31,38</sup>, se podría hipotetizar que sus niveles de proteína están alterados en los mutantes de la biogénesis de miARNs. Una mayor cantidad de HY5, o menor de PIF3, podría explicar los fenotipos parcialmente fotomorfogénicos. Para esto, deberían analizarse los niveles de proteína en *hyll-2* y *se-1* y compararlos con plantas WT por técnicas bioquímicas. Identificar a través de que vía transcripcional HYL1 controla la escotomorfogénesis podría ayudar, en el futuro, a explicar mecanísticamente cómo actúa esta proteína y si cumple una función alternativa a la conocida en el complejo de procesamiento de miARNs.

## 6. Referencias Bibliográficas

1. Rana, T. M. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 23–36 (2007).
2. Bologna, N. G. & Voinnet, O. The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 473–503 (2014).
3. Margis, R., Fusaro A., Smith N., Curtin, S., Watson, J., Finnegan & E., Waterhouse, P. The evolution and diversification of Dicers in plants. **580**, 2442–2450 (2006).
4. Xie, Z., Khanna, K. & Ruan, S. Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 790–797 (2010).
5. Lu, C. & Fedoroff, N. A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *Plant Cell Online* **12**, 2351–2366 (2000).
6. Prigge, M. J. & Wagner, D. R. The Arabidopsis SERRATE Gene Encodes a Zinc-Finger Protein Required for Normal Shoot Development. **13**, 1263–1279 (2001).
7. Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W. & Ray, A. DICER-LIKE1: Blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci.* **7**, 487–491 (2002).
8. Pashkovskiy, P. P. & Ryazansky, S. S. Biogenesis, evolution, and functions of plant microRNAs. *Biochem. Biokhimiia* **78**, 627–37 (2013).
9. Vazquez, F., Gascioli, V. & Cre, P. The Nuclear dsRNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development , but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. **14**, 346–351 (2004).
10. Han, M.-H., Goud, S., Song, L. & Fedoroff, N. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 1093–1098 (2004).
11. Rasia, R. M., Mateos, J., Bologna, N., Burdisso, P., Imbert, L., Palatnik, J. & Boisbouvier, J. Structure and RNA Interactions of the Plant MicroRNA Processing-Associated. 8237–8239 (2010). doi:10.1021/bi100672x
12. Burdisso, P. Bologna, N., Palatnik, J., Milia, F., Schapire, A. & Rasia, R. M. Structural Determinants of Arabidopsis thaliana Hyponastic Leaves 1 Function In Vivo. **9**, 1–8 (2014).
13. Yang, X., Ren, W., Zhao, Q., Zhang, P., Wu, F. & He, Y. Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 12224–12236 (2014).

14. Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J. & Yuan, Y. Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *Rna* **16**, 474–481 (2010).
15. Kurihara, Y., Takashi, Y. & Watanabe, Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *Rna* **12**, 206–212 (2005).
16. Machida, S., Chen, H. & Yuan, Y. A. Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. **39**, 7828–7836 (2011).
17. Baranauske, S., Klima, S. & Vilkaitis, G. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase : HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. **43**, 2802–2812 (2015).
18. Armenta-Medina, A., Lepe-Soltero, D., Xiang, D., Datla, R., Abreu-Goodger, C. & Gillmor, C. *Arabidopsis thaliana* miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote. *Dev. Biol.* **431**, 145–151 (2017).
19. Dong, Z., Han, M. & Fedoroff, N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. **105**, 9970–9975 (2008).
20. Eamens, A. L., Kim, K. W., Curtin, S. J. & Waterhouse, P. M. DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **7**, (2012).
21. Karlsson, P., Christie, M., Seymour, D., Wang, H., Wang, X., Hagmann, J., Kulcheski, F. & Manavella, P. KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 14096–14101 (2015).
22. Fang, Y. & Spector, D. L. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants. *Curr. Biol.* **17**, 818–823 (2007).
23. Raczynska, K., Stepień, A., Kierzkowski, D., Kalak, M. & Bajczyk, M. The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1224–1244 (2014).
24. Song, L., Han, M.-H., Lesicka, J. & Fedoroff, N. *Arabidopsis* primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5437–5442 (2007).
25. Lesicka-Górecka, J., Szarzyńska, B., Sawczak, M., Bagdiul, I., Górski, P., Jarmołowski, A. & Szweykowska-Kulińska, Z. Abscisic acid does not influence the subcellular distribution of the HYL1 protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biochim. Pol.* **55**, 517–524 (2008).
26. Zhang, Z., Guo, X., Ge, C., Ma, Z. & Jiang, M. KETCH1 imports HYL1 to nucleus for miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 4011–4016 (2017).

27. Tsai, H., Li, Y., Hsieh, W., Lin, M., Ahn, J. & Wu, S. HUA ENHANCER1 Is Involved in Posttranscriptional Regulation of Positive and Negative Regulators in *Arabidopsis* Photomorphogenesis. *Plant Cell* **26**, 2858–2872 (2014).
28. Mazzella, M. A., Casal, J. J., Jorge, P. & Fox, A. R. Hormonal networks involved in apical hook development in darkness and their response to light. **5**, 1–13 (2014).
29. Seo, H. S & Watanabe, E. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. 617–622 (2004). doi:10.1101/gad.1187804.rapidly
30. Jang, I.-C, Rossana, H. & Seo, H. Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR Proteins Promote Phytochrome B Polyubiquitination by COP1 E3 Ligase in the Nucleus. **22**, 2370–2383 (2010).
31. Osterlund, M. T., Wei, N. & Deng, X. W. The Roles of Photoreceptor Systems and the COP1- Targeted Destabilization of HY5 in Light Control of Arabidopsis Seedling Development I. 5–9 (2000).
32. Wei, N. & Deng, X. W. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet.* **15**, 98–103 (1999).
33. Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **19**, 1991 (1991).
34. Piskurewicz, U. & Lopez-Molina, L. Isolation of Genetic Material from Arabidopsis Seeds. in 151–164 (2011). doi:10.1007/978-1-61779-231-1\_10
35. Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J. & Forner, J. GreenGate - A novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PLoS One* **8**, (2013).
36. Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).
37. Oyama, T., Shimura, Y. & Okada, K. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. 2983–2995 (1997).
38. Josse, E. M. & Halliday, K. J. Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Curr. Biol.* **18**, R1144–R1146 (2008).
39. Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H. & Liu, T. L. Definition of Early Transcriptional Circuitry Involved in Light-Induced Reversal of PIF-Imposed Repression of Photomorphogenesis in Young Arabidopsis Seedlings. **21**, 3535–3553 (2009).
40. Macias, S., Cordiner, R. A., Gautier, P., Plass, M. & Cáceres, J. F. DGCR8 Acts as an Adaptor for the Exosome Complex to Degrade Double-Stranded Structured RNAs. *Mol. Cell* **60**, 873–885 (2015).

41. Cho, S. K., Ben Chaabane, S., Shah, P., Poulsen, C. P. & Yang, S. W. COP1 E3 ligase protects HYL1 to retain microRNA biogenesis. *Nat. Commun.* **5**, 5867 (2014).
42. Manavella, P., Hagmann, J. & Ott, F. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* **151**, 859–870 (2012).