

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Modulación de la actividad de IYO y RIMA para entender la autorrenovación y diferenciación de células madre en plantas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Aleksandra Lazarova Lazarova**

Director

**Enrique Rojo de la Viesca**

Madrid



## **TESIS DOCTORAL**

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE IYO Y RIMA PARA ENTENDER LA  
AUTORRENOVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN  
PLANTAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

Aleksandra Lazarova Lazarova

**DIRECTOR**

Dr. Enrique Rojo de la Viesca

Madrid, 2022

# Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

TESIS DOCTORAL

## MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE IYO Y RIMA PARA ENTENDER LA AUTORRENOVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN PLANTAS

Doctorando: Aleksandra Lazarova Lazarova

Director: Dr. Enrique Rojo de la Viesca

Doctorado en Biología

Madrid, 2022

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la vida.

A mi director de tesis, ETERNAMENTE.

**DEDICATORIA:**

*A mi hermana*

*Tu luz se apagó justo antes del término de esta tesis, pero tu  
esencia siempre será lo que me guíe en esta vida...*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ABREVIATURAS .....	8
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
1.1    Identidad celular y reprogramación transcripcional durante el proceso de diferenciación celular:.....	17
1.2    Regulación de la transcripción mediada por ARN Polimerasa II.....	20
1.3    Identificación de las proteínas RPAP1 y RPAP2 .....	24
1.4    Funciones de IYO/RPAP1 y RIMA/RPAP2 en el desarrollo.....	25
1.5    Posibles funciones moleculares de RPAP1/IYO/RBA50 y RPAP2/RIMA/RTR1 .....	28
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1    Material biológico .....	40
3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	40
3.1.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	40
3.1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
3.2    Técnicas de cultivo .....	40
3.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	41
3.2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	41
3.2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
3.3    Técnicas de transformación .....	42
3.3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i> . .....	42
3.3.2 <i>Escherichia coli</i> .....	43

3.3.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	43
3.3.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
3.4	Preparación y análisis de ácidos nucleicos .....	45
3.4.1	Aislamiento de ARN.....	45
3.4.2	Aislamiento de ADN plasmídico .....	45
3.4.3	Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional.....	46
3.4.4	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	46
3.4.5	Técnicas electroforéticas y aislamiento de fragmentos de ADN en geles de agarosa.....	46
3.4.6	Mutagénesis dirigida.....	46
3.5	Técnicas para el análisis de proteínas.....	47
3.5.1	Extracción de proteínas.....	47
3.5.2	Ensayos de interacción proteína-proteína por dos híbridos de levadura .....	47
3.5.3	Ensayos de inmunoprecipitación (IP) y co-inmunoprecipitación (CoIP).....	48
3.5.4	Análisis por Western-blot.....	48
3.5.5	Análisis de localización subcelular por microscopía confocal .....	49
3.6	ARN-seq.....	49
3.6.1	Generación de las construcciones .....	49
3.6.2	Análisis de la expresión de genes mediante qPCR .....	51
3.6.3	Tratamientos y secuenciación masiva .....	51
3.7	Chip-seq.....	51
3.8	Secuestro con nanoanticuerpos frente a GFP .....	52
3.9	Aplicaciones Bioinformáticas .....	52
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.1	IYO promueve la transición a elongación productiva de la Pol II asociada a RIMA.....	58
4.2	Identificación de interactores de IYO y RIMA implicados en transcripción .....	62
4.3	Identificación de un dominio de interacción con PP1 en la proteína RIMA.....	65
4.4	Efecto del silenciamiento de <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> en el transcriptoma .....	74
4.4.1	Generación de las construcciones para ARNi inducible .....	75
4.4.2	Generación de líneas estables de ARNi .....	76
4.4.3	Inducción transitoria del silenciamiento de <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	78
4.4.4	Generación y caracterización de transcriptomas por ARN-seq .....	82
4.4.5	Identificación de genes desregulados tras el silenciamiento de <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	87
4.4.6	<i>IYO</i> y <i>RIMA</i> controlan la terminación transcripcional.....	98

4.5	Desarrollo de un sistema de inactivación de IYO y RIMA basado en el secuestro con nanoanticuerpos. ....	102
4.6	RIMA se asocia con el motivo sII reconocido por factores transcripcionales de la familia TCP.....	105
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
5.1	Papel del complejo IYO/RIMA en la iniciación y en la transición a elongación productiva .....	113
5.2	Papel del complejo IYO/RIMA en la terminación de la transcripción.....	116
5.3	Papel de RIMA en el importe nuclear .....	119
5.4	Efectos del silenciamiento de IYO y RIMA en el transcriptoma.....	120
5.5	Posibles dianas directas de IYO y RIMA .....	122
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>126</b>

## ÍNDICE DE TABLAS:

<b>Tabla 1.</b> Vectores obtenidos de stock center para los ensayos Y2H .....	54
<b>Tabla 2.</b> Cebadores empleados para la generación de construcciones .....	56
<b>Tabla 3.</b> Cebadores empleados para las qPCR .....	56
<b>Tabla 4.</b> Candidatos a interactores de IYO y RIMA. ....	63
<b>Tabla 5.</b> Resultados de ensayos de dos híbridos.....	65
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones y relación de absorbancia del ARN total obtenido para cada una de las muestras .....	83
<b>Tabla 7.</b> Distribución de lecturas obtenidas de las distintas librerías .....	84
<b>Tabla 8.</b> Resultado de la búsqueda en el servidor ShinyGO.....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1.</b> Ocupación media de la Pol II reconocida por los anticuerpos 3E8 y 3E10 en la cromatina de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	59
<b>Figura 2.</b> RIMA interacciona con la Pol II hiperfosforilada de una forma dependiente de IYO. ....	62
<b>Figura 3.</b> Interacción de dos híbridos entre RIMA y TOPP6.....	66
<b>Figura 4.</b> Interacción con TOPPs usando BD-RIMA como cebo .....	67
<b>Figura 5.</b> Localización subcelular e interacción entre las TOPPs y RIMA expresadas en <i>Nicotiana</i> .....	69
<b>Figura 6.</b> Alineamiento del motivo potencial de unión a PP1 de los ortólogos de RIMA en plantas .....	70
<b>Figura 7.</b> El motivo RSVTW es necesario para la interacción con fosfatasa de tipo PP1 .....	71
<b>Figura 8.</b> RIMA autointeracciona en ensayos de dos híbridos .....	73
<b>Figura 9.</b> Efecto de la mutación V430D sobre la interacción de RIMA con TOPP6 en <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	74
<b>Figura 10.</b> Esquema de las construcciones de ARNi en el plásmido pOpOff2 .....	76
<b>Figura 11.</b> El silenciamiento de IYO y RIMA provoca la inhibición del crecimiento y la organogénesis .....	77
<b>Figura 12.</b> El silenciamiento de IYO y RIMA provoca un aumento del tamaño del meristemo apical de raíz .....	79

<b>Figura 13.</b> Reducción de los niveles de RIMA en plantas <i>RIMAi</i> tratadas con DEX ...	80
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa del ARNm total de IYO y RIMA en las líneas transgénicas de ARNi inducibles por DEX.....	82
<b>Figura 15.</b> Distribución de la densidad génica en función de los niveles de expresión..	85
<b>Figura 16.</b> Determinación de la variabilidad intra e intergrupar entre muestras .....	86
<b>Figura 17.</b> Reducción en los niveles de ARNm de IYO y RIMA en las muestras del ARN-seq de las líneas silenciadas .....	88
<b>Figura 18.</b> Expresión génica diferencial entre las distintas líneas y tratamientos .....	89
<b>Figura 19.</b> El silenciamiento de IYO y RIMA causa una desregulación génica altamente coincidente.....	91
<b>Figura 20.</b> Co-regulación génica al silenciar <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	92
<b>Figura 21.</b> Sobrerepresentación de genes inducibles por WIND1 y activados en callos entre los DEGs inducidos al silenciar <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	94
<b>Figura 22.</b> WOX14 y NAC1 se inducen al silenciar <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	95
<b>Figura 23.</b> Represión general de genes que codifican proteínas ribosomales en las muestras silenciadas en <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	98
<b>Figura 24.</b> Disminución de lecturas en el extremo 3' tras el silenciamiento de <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> .....	99

<b>Figura 25.</b> El silenciamiento de <i>IYO</i> y <i>RIMA</i> provoca la reducción de la longitud del 3'UTR en un gran número de genes .....	101
<b>Figura 26.</b> Deslocalización de IYO-GFP y RIMA-GFP por nanoanticuerpos anti-GFP ancladas en mitocondrias .....	103
<b>Figura 27.</b> El secuestro de IYO-GFP medido por nanoanticuerpos en plantas <i>oyo-2</i> provoca defectos en diferenciación y desarrollo .....	105
<b>Figura 28.</b> Asociación de RIMA con el extremo 3' de genes U2 snARN.....	107
<b>Figura 29.</b> RIMA se une a regiones enriquecidas en el elemento sII .....	108
<b>Figura 30.</b> El silenciamiento de RIMA e IYO reprime la expresión de genes activadores del crecimiento de yemas axilares .....	109
<b>Figura 31.</b> IYO interacciona con TCPs de clase I .....	110
<b>Figura 32.</b> Intersección de los datos Chip-seq y ARN-seq.....	111

## **ABREVIATURAS**

APC: Anaphase- Promoting Complex

CDK: Cyclin-dependent Kinase

CSTF: Cleavage Stimulation Factor subunit

CTD: Carboxy-Terminal Domain

DEGs: Differentially Expressed Genes

DEX: Dexametasona

DSIF: DRB Sensitivity Inducing Factor

ELF: Early Flowering

ELO: subunidad del complejo Elongator

FACT: Facilitates Chromatin Transcription

GCN5: General Control Nonderepressible 5

GDOWN1: DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A

GFP: Green Fluorescent Protein

IWR1: Interacting with RNA polymerase II protein 1

LEO1: LEft Open reading frame 1

MED: subunidad del complejo Mediator

MINIYO: IYO

NAC: No Apical meristem domain- Containing protein

NELF: Negative Elongation Factor

NLS: Nuclear Localization Sequence

NAP3 Nucleolar Preribosomal Associated

Nrd1: Nuclear pre-mRNA Down-regulation

NRPD/E3b: DNA-directed RNA polymerase IV subunit 1

NRPE1: DNA-directed RNA polymerase V subunit 1

NUP: nucleoporina

PAF1C: RNA polymerase II – Associated Factor 1 Complex

Pcf11: Polyadenilation and Cleavage Factor subunit

Pol II: ARN polimerasa II

PP: Protein Phosphatase

P-TEFb: Positive Transcription Elongation Factor b

RAM: Root Apical Meristem

RBA50: RNA polymerase II-Associated Protein RBA50

RBP: subunidades de la Pol II

RIMA: RPAP2 IYO-MATE

RP: Ribosomal Protein

RPAP: RNA Polymerase II- Associated Protein

RPRD: Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein

RTR1: Regulator of transcription 1

Rtt103: Regulator of Tyr1 Transposition Protein 103

SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

SAM: Shoot Apical Meristem

SPT: transcription elongation factor

SSRP1: Structure Specific Recognition Protein 1

TCP: Teosinte branched1/Cycloidea/Proliferating cell factor

TES: Transcriptional End Site

TFIIF: Transcription Elongation Factor IIF

TFIIS: Transcription Elongation Factor IIS

TOPP: Type One Protein Phosphatase

TSS: Transcriptional Start Site

VIP: Vernalization Independence

WOX: Wuschel-like Homeobox

WT: Wild-Type

## RESUMEN

Título: Modulación de la actividad de *IYO* y *RIMA* para entender la autorrenovación y diferenciación de células madre en plantas

Introducción: La diferenciación celular engloba dos decisiones secuenciales por parte de la progenie de células madre. La primera de ellas, y común a todo evento de diferenciación, es decidir si iniciar la transición o mantener la pluripotencia. La segunda decisión, específica de cada proceso de diferenciación, es en qué tipo celular diferenciarse y qué patrón de expresión adquirir. Estudios previos revelaron que *IYO* y *RIMA*, dos proteínas que interactúan con la ARN polimerasa II (Pol II), son necesarias para todos los eventos de diferenciación celular que ocurren en la planta. En su ausencia, la diferenciación se bloquea completamente y las plantas crecen como una masa de células indiferenciadas, lo que sugiere que *IYO* y *RIMA* participan en la etapa más temprana, cuando las células deciden si entran o no en diferenciación. Además, *IYO* es limitante para iniciar esta transición y se acumula en el núcleo, de una forma dependiente de *RIMA*, en células de la periferia de los meristemos, justo cuando van a iniciar la diferenciación. Parece, por tanto, que la migración al núcleo del complejo *IYO/RIMA* funciona como un interruptor molecular para iniciar la diferenciación celular en plantas. La manipulación de este interruptor permite modificar el equilibrio entre la renovación de las células madre y su diferenciación y puede ser usado para revelar las propiedades fundamentales de estos estados celulares.

Sinopsis: En esta tesis nos propusimos dilucidar los mecanismos moleculares por los que el complejo *IYO/RIMA* activa la diferenciación celular, así como las posibles dianas transcripcionales que subyacen a esta activación. Los resultados de esta tesis demuestran que *RIMA* regula el fosfoestado de la Pol II de una forma dependiente de *IYO*

promoviendo su transición al estado hiperfosforilado propio de la polimerasa en elongación productiva. Además, se han identificado interacciones físicas de IYO y RIMA con reguladores centrales de la transcripción, sugiriendo que el complejo IYO/RIMA podría funcionar como una plataforma integradora para reclutar factores necesarios durante las distintas fases de la transcripción. Así, se ha demostrado la interacción de RIMA con fosfatasa tipo PP1 y se ha identificado un dominio conservado en todos los ortólogos de RIMA de plantas que media esta interacción. Las fosfatasas PP1 tienen como sustrato a la Pol II y cumplen un papel fundamental en la terminación de la transcripción. En relación a esto, hemos constatado que, al silenciar IYO y RIMA, se interfiere con la terminación transcripcional provocando un acortamiento generalizado de los 3'UTR. Además, el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* causa una acusada reprogramación transcripcional, induciéndose genes relacionados con el estado indiferenciado y la regeneración y produciéndose una represión generalizada de genes de proteínas ribosomales. Por otra parte, en experimentos de secuenciación masiva de cromatina inmunoprecipitada, se ha establecido que RIMA se une a promotores de genes que contienen el elemento sII, que está presente en los promotores de muchos genes de proteínas ribosomales y es reconocido por factores transcripcionales de la familia TCP. Experimentos de dos híbridos de levaduras indican que IYO interacciona con TCPs de clase I, sugiriendo que esta interacción podría mediar la asociación del complejo IYO/RIMA con los promotores que contienen el elemento sII. Además, la expresión de muchos de los genes a cuyos promotores se une RIMA, incluyendo genes de proteínas ribosomales, se desregula al silenciar *IYO* y *RIMA*, lo que indica que podrían constituir dianas transcripcionales directas. En conclusión, los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que el complejo IYO/RIMA opera en el núcleo modulando directamente la

actividad de la Pol II durante la transcripción para inducir la reprogramación transcripcional global de las células madre y permitir la diferenciación celular.

## SUMMARY

Title: Modulating the activity of *IYO* and *RIMA* to understand stem cell self-renewal and differentiation

Introduction: Cell differentiation entails two sequential decisions by the progeny of stem cells. The first one, shared in every event of differentiation, is whether to self-renew or initiate fate transition. The second decision, specific for each differentiation process, is which cell fate to attain and what expression pattern to acquire. Previous work in our laboratory suggests that *IYO* and *RIMA*, two proteins that interact with RNA polymerase II (Pol II), are necessary for all cell differentiation events that take place in the plant. In their absence, differentiation is completely blocked, and plants grow as a mass of undifferentiated cells, suggesting that *IYO* and *RIMA* participate at the earliest stage of the process, when cells decide whether or not to differentiate. Moreover, *IYO* is rate-limiting for initiating this transition and accumulates in the nucleus, in a *RIMA*-dependent way, in the periphery of the meristems, just when cells are bound to initiate differentiation. Therefore, it appears that migration to the nucleus of the *IYO/RIMA* complex works as a molecular switch to initiate cell differentiation in plants. Manipulation of this switch allows to modify the balance between stem cells self-renewal and differentiation and can be used to reveal the fundamental properties of these cellular states.

Synopsis: In this thesis we set out to elucidate the molecular mechanisms by which the *IYO/RIMA* complex activates cell differentiation, as well as the possible transcriptional targets that underlie this activation. Our results demonstrate that *RIMA* regulates the Pol II phosphostatus in an *IYO*-dependent manner, promoting the transition of the polymerase

into a hyperphosphorylated state characteristic of productive elongation. Moreover, we identified physical interactions of IYO and RIMA with central regulators of transcription, suggesting that the IYO/RIMA complex functions as an integrative platform to recruit factors needed during the different phases of transcription. For instance, we have demonstrated that RIMA interacts with PP1-type phosphatases through a motif that is conserved among plant RIMA-orthologues. Pol II is a substrate for dephosphorylation by PP1 phosphatase, which have a critical role in transcription termination. Consistent with this, we have verified that silencing of IYO and RIMA interferes with transcriptional termination causing an overall shortening of 3'UTRs. Furthermore, IYO and RIMA silencing causes a marked transcriptional reprogramming, inducing genes related to the undifferentiated state and regeneration, and a general repression of ribosomal protein genes. On the other hand, in ChIP-seq experiments we found that RIMA binds to gene promoters in regions containing the sII element, which is present in the promoters of many ribosomal protein genes and is bound by TCP transcription factors. Yeast two-hybrid experiments suggest that IYO interacts with class I TCPs, suggesting that this interaction could mediate the recruitment of the IYO/RIMA complex to promoters containing the site II element. In addition, the expression of many genes whose promoters are bound by RIMA, including ribosomal protein genes, is deregulated upon *IYO* and *RIMA* silencing, indicating that they constitute direct transcriptional targets. In conclusion, our results support the hypothesis that the IYO/RIMA complex operates in the nucleus directly modulating Pol II activity during transcription to induce global transcriptional reprogramming of stem cells to allow cell differentiation.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Identidad celular y reprogramación transcripcional durante el proceso de diferenciación celular:

El desarrollo de las plantas tiene un elevado grado de plasticidad y, además, la organogénesis se prolonga a lo largo de todo su ciclo vital, de tal manera que el patrón de crecimiento es dinámico y variable, incluso en individuos clonales. Esta plasticidad en el desarrollo es una adaptación fundamental para que estos organismos sésiles exploren el medio circundante y maximicen la obtención de recursos (Lodha et al., 2008, Gaillochet y Lohmann, 2015). Los nuevos órganos de las plantas se generan a partir de la descendencia de células madre localizadas en nichos denominados meristemos (Scheres, 2007). Durante la embriogénesis se establecen los meristemos apicales de tallo (“Shoot Apical Meristem” o SAM) y de raíz (“Root Apical Meristem” o RAM) junto al meristemo vascular o cámbium, que serán responsables respectivamente de generar los órganos aéreos y subterráneos y los haces vasculares de la plantas adultas. A partir de estos meristemos principales, las plantas desarrollan meristemos secundarios, como son el periciclo, que es responsable de la formación de las raíces laterales, el protodermo que genera las células de la epidermis o los meristemos florales que generan las flores. Además, hay meristemos específicos de grupos de plantas, como son los meristemos intercalares de monocotiledóneas que permiten un crecimiento internodal muy rápido (en bambú se han llegado a medir tasas de crecimiento cercanas a 1 m/día) y la regeneración de hojas en forrajeras (Jouannet et al., 2015, Gaillochet y Lohmann, 2015). Los meristemos de plantas tienen una organización común, con una zona central donde las células se mantienen indiferenciadas como células pluripotentes. Al dividirse las células madre del centro del meristemo, su progenie se va desplazando hacia la periferia hasta

alcanzar una posición donde comienzan a diferenciarse y se inicia la organogénesis. Además, los meristemas apicales tienen centros organizadores constituidos por grupos de células madre encargadas de mantener la funcionalidad de los meristemas, controlando el tamaño del nicho de células madre y el mantenimiento de la pluripotencia mediante la acción de genes de la familia WOX (Van Den Berg et al., 1997; Willoughby y Nimchuk, 2021). Asimismo, gradientes de hormonas, principalmente de auxinas y citoquininas, regulan el equilibrio entre proliferación celular y diferenciación, controlando el tamaño del meristemo y la organogénesis (Shi y Vernoux 2022; Yamoune et al., 2021).

La identidad de los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular depende de cómo se expresa la información genética común a todas sus células. La diferenciación conlleva la adquisición de una determinada identidad y, por tanto, la implementación de su programa de expresión específico. Además, este es un proceso reversible, tanto en animales (Takahashi y Yamanaka 2016) como en plantas (Ikeuchi et al., 2019), pudiendo las células cambiar su identidad e incluso revertir a un estado pluripotente. Por ejemplo, estudios de ablación en *Arabidopsis thaliana* han demostrado que después de eliminar células de los distintos tejidos del meristemo de la raíz, las células del tejido interno adyacente se dividen periclinalmente y la progenie externa cambia de identidad adoptando la de las células eliminadas (Hoermayer y Friml, 2019). La identidad celular se establece y mantiene mediante una red muy compleja de reguladores moleculares que integran señales espaciales y de desarrollo y entre los que destacan flujos y gradientes hormonales junto a péptidos de señalización, que convergen para regular la actividad del genoma, en muchos casos a través de factores transcripcionales de identidad celular (Yadav et al., 2010, Caggiano et al., 2017). Los parámetros principales que controlan la expresión del genoma en un tipo celular son los niveles de síntesis y degradación de ARNs y de las proteínas que en su caso codifiquen, si bien otros parámetros como el transporte

inter e intracelular de ARNs y proteínas también son importantes. Uno de los mayores desafíos genéticos es poder descifrar, a nivel molecular, el fino y preciso control del genoma que media la transición entre distintas identidades y, en particular, entre células madre y su progenie que inicia la diferenciación (Iyer-Pascuzzi y Benfey, 2009, Sanmartín et al., 2011). Se conocen muchos genes de identidad celular, pero todavía se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes que dirigen la reprogramación del genoma cuando las células pluripotentes inician la diferenciación (Benfey, 2016). Las plantas ofrecen ventajas claras para diseccionar genéticamente estos mecanismos y evaluar cómo su desregulación afecta al desarrollo del organismo completo. La principal es que se puede monitorizar de forma muy sencilla el desarrollo de los meristemos e identificar mutaciones que afecten al equilibrio entre proliferación y diferenciación de las células madre y, por tanto, al tamaño de los meristemos y a la organogénesis (Sanmartín et al, 2011). Las mutaciones que afecten a la diferenciación celular es probable que también afecten al fenómeno inverso de la dediferenciación, por el cual células adultas con una identidad celular fijada pueden revertir hacia un estado de célula madre pluripotente (Ikeuchi et al., 2019).

En definitiva, la diferenciación celular implica grandes cambios de expresión del genoma en dos sentidos; por un lado, el silenciamiento de los programas responsables de la pluripotencia y, por otro, la activación de los programas responsables de la nueva identidad celular (Sablowski, R., 2011). Sin duda, el control transcripcional juega un papel preponderante en esta reprogramación, aunque también el control de la traducción global ha sido implicado en la transición de las células madre hacia la diferenciación (Sanchez et al., 2016).

## **1.2 Regulación de la transcripción mediada por ARN Polimerasa II**

Las polimerasas de ácido ribonucleico (ARN) dependientes de ácido desoxirribonucleico (ADN) son grandes complejos multiproteicos encargados de transcribir la información codificada en el genoma. En plantas existen cinco complejos distintos con actividad ARN polimerasa. La ARN Polimerasa I es responsable de la transcripción de los ARN ribosomales (ARNr). La ARN Polimerasa II (Pol II) transcribe los ARNs codificantes de proteínas y ARNs no codificantes como los miARNs, snARN y snoARNs. La ARN Polimerasa III se encarga principalmente de la transcripción de los ARNt y el 5S ARNr (Ream et al., 2015). Las ARN polimerasas IV (Pol IV) y V (Pol V) se encuentran exclusivamente en plantas y transcriben tanto pequeños ARNs de interferencia (siARNi), como lncARNs que participan en el silenciamiento de genes mediante la metilación del ADN dirigida por ARN (Haag y Pikaard, 2011). Además, las ARN polimerasas se asocian con múltiples proteínas para llevar a cabo la transcripción del ADN. Entre las proteínas asociadas se pueden encontrar factores generales de transcripción (FGT), factores transcripcionales (FTs) específicos, el complejo Elongator, el complejo Mediator, y muchos otros coactivadores/correpresores necesarios para la transcripción en el contexto de la cromatina y su compleja estructura (Thomas y Chiang, 2006, Wild y Cramer., 2012; Antosz et al, 2017). De hecho, muchos de estos complejos están implicados en la remodelación y modificación de la cromatina para facilitar la transcripción.

La Pol II es un complejo de 12 subunidades cuyo proceso de ensamblaje e importe al núcleo está altamente regulado. Además, numerosas modificaciones post-traduccionales, especialmente en el extremo C-terminal (CTD) de la subunidad mayor RPB1, controlan la actividad de la Pol II durante todo el ciclo de la transcripción (Ni et al., 2011; Peck et al., 2019). Estudios filogenéticos apuntan a que la divergencia de las dos ARN polimerasas (Pol IV y Pol V) específicas de plantas ocurrió antes de la subunidad mayor

tuviese CTD, pues las dos carecen de ella (Luo y Hall, 2007). El CTD contiene repeticiones de un heptapéptido con secuencia consenso YSPTSPS (26 repeticiones en levadura, 34 en Arabidopsis y 52 repeticiones en humanos) y es indispensable para la viabilidad celular, aunque dispensable para la actividad catalítica de la Pol II (Koiwa et al., 2004; Stiller y Cook, 2004; Zhang et al., 2020). Todos los residuos del heptapéptido son modificados post-traduccionalmente, al menos en algunas de las repeticiones. Las serinas, treoninas y tirosinas son objeto de fosforilación, las serinas y treoninas de O-GlcNacetilación y las prolinas de isomerización cis-trans. Además, algunas repeticiones del heptapéptido presentan variaciones de la secuencia consenso y contienen lisinas que pueden ser acetiladas, ubiquitinadas o metiladas (Harlen y Churchman, 2017). Todas estas modificaciones, en las numerosas repeticiones del heptapéptido suponen una enorme cantidad de combinaciones posibles que funcionan como un código para reclutar los diferentes complejos necesarios durante las distintas fases de la transcripción (Eick y Geyer, 2013). El ciclo de la transcripción se puede dividir en varias fases con transiciones altamente reguladas: pre-iniciación, iniciación, elongación y terminación (Peck et al., 2019). Quinasas, fosfatasas, prolil-isomerasas, acetilasas, ubiquitinasas, deubiquitinasas y metilasas regulan, a través de modificaciones en el CTD, la interacción con los diferentes factores necesarios para que la Pol II progrese y avance a las siguientes fases y la transcripción se lleve a cabo correctamente (Hsin y Manley, 2012). La transcripción comienza con la unión de FTs a secuencias específicas del promotor. Estos FTs interaccionan con complejos co-activadores de la transcripción, tales como complejos remodeladores/modificadores de cromatina y el complejo Mediator, que promueven el reclutamiento a la región proximal del promotor de la Pol II en forma hipofosforilada y de factores generales de la transcripción para formar el complejo de preiniciación (PIC) (Weake y Workman, 2010; Soutourina, 2018; Akhtar et al., 2009; Hu et al., 2019; Max

et al., 2007; Buendía-Monreal y Gillmor, 2016; Malik et al., 2017). Para que la Pol II escape del promotor e inicie la transcripción es necesario que la quinasa CDK7/Kin28 fosforile el CTD en la serina 5 (Rimel y Taatjes, 2018). En levaduras, esta fase de inicio de la transcripción es la más limitante para la expresión de los genes y se considera que una vez iniciada, la transcripción procede sin mayores obstáculos. En cambio, en plantas y animales se ha descrito que, en una buena parte del genoma, poco después de iniciarse la transcripción, la Pol II se detiene en una conformación que se denomina pausada (Zhu et al., 2018; Liu et al., 2015; Core y Adelman, 2019). En estos genes, la transición de la Pol II entre este estado pausado y la reactivación a un estado de elongación efectiva es limitante para su expresión. Por tanto, en plantas y animales los factores que regulan la entrada en pausa de la Pol II y su reactivación son fundamentales para controlar la expresión de una fracción importante del genoma. En animales, NELF y DSIF son esenciales para establecer y mantener la pausa de la Pol II (Dollinger y Gilmour, 2021; Schier y Taatjes, 2020). En plantas hay homólogos de DSIF, pero no de NELF, aunque se ha propuesto que la proteína TPL podría cumplir un papel similar promoviendo la entrada en pausa de la Pol II (Morffy y Strader 2021). Mientras está pausada, la Pol II puede retroceder sobre el ADN, lo que provoca que el extremo 3' del ARN se desalinee, bloqueándose así la transcripción. El factor TFIIS promueve la actividad nucleasa de la Pol II para cortar el extremo desalineado del ARN (Kettenberger et al., 2003; Gonzalez et al., 2021), lo que permite a la Pol II continuar con la transcripción. El complejo P-TEFb es esencial para reactivar a la Pol II pausada (Li et al., 2018). A través de su subunidad quinasa CDK9 fosforila a DSIF, a NELF, a la proteína fosfatasa PP4 (inhibiéndola e impidiendo la defosforilación de DSIF) y a la Pol II en la serina 2 del CTD. Estas fosforilaciones provocan la disociación de NELF y la transición de la Pol II de su estado pausado a la elongación productiva, una etapa donde la Pol II, a través de modificaciones

específicas de su CTD, recluta factores de elongación como SPT6 y los complejos PAF1C y FACT junto a factores de procesamiento del ARN (Antosz et al., 2017). SPT6 y el complejo FACT, un heterodímero formado por SSRP1 y SPT16, tienen actividad chaperona de histonas y, además de promover la elongación transcripcional, participan en muchos otros procesos celulares (Gopalakrishnan y Winston, 2021; Grasser, 2020). PAF1C es un complejo de cinco subunidades (VIP3, VIP4/LEO1, VIP5, ELF7 y ELF8) que participa en todas las fases de la transcripción (He, Y., 2009; Hou et al., 2019, Oh et al., 2008; Fal et al., 2019; Van Oss et al. 2017).

La terminación de la transcripción es también una fase altamente regulada, que además puede producirse en distintos puntos del gen, dando lugar a transcritos diferentes por poliadenilación alternativa. En esta fase se produce el corte del transcrito, la poliadenilación y la disociación de la Pol II del ADN. El código de modificaciones del CTD es también fundamental para este proceso. Así, la defosforilación de la tirosina 1 del CTD es esencial para reclutar factores de la terminación como Nrd1, Pcf11 y Rtt103 (Mayer et al., 2012) y la sustitución de las tirosinas del CTD por fenilalaninas impide la correcta terminación a nivel genómico (Shah et al., 2018). También el fosfoestado de la treonina 4 parece tener un papel en la terminación de la transcripción y la disociación de la polimerasa (Nemec et al., 2017; Kecman et al., 2018). Cuando la polimerasa pasa por el sitio de poliadenilación, se produce el corte de transcrito y la desaceleración de la polimerización, lo que permite que las exonucleasas 5'-3' RAT1/XRN2 degraden el fragmento de ARN aún asociado a la Pol II para forzar su disociación del ADN (Eaton y West, 2020). Proteína fosfatasas del tipo PP1 son esenciales para esta ralentización, al defosforilar la treonina 4 del CTD y a SPT5 (Kecman et al., 2018). Además, también son responsables de defosforilar la tirosina 1 del CTD que coordina el reclutamiento de componentes del complejo de corte y poliadenilación (Schreieck et al., 2014). La

regulación de la poliadenilación está íntimamente ligada a las transiciones entre quiescencia, proliferación y diferenciación de células madre en sistemas animales (Sommerkamp et al., 2021), en los que se ha descrito que la diferenciación conlleva asociado un alargamiento de los 3'UTR, mientras que la reprogramación a un estado pluripotente conlleva su acortamiento (Ji y Tian, 2009; Ji et al., 2009; Mueller et al., 2013; Sommerkamp et al., 2021).

### **1.3 Identificación de las proteínas RPAP1 y RPAP2**

Experimentos de purificación en tándem y espectrometría de masas en células humanas determinaron que la red de interacciones de la Pol II soluble es muy amplia (Jeronimo et al., 2007). Dentro de esa red, cuatro proteínas denominadas RPAP1-4 (ARN Polymerase II Associated Proteins 1-4) forman nodos centrales situándose entre las subunidades de la polimerasa y complejos reguladores de la transcripción (Mediator, Integrator, GDOWN1) o complejos con actividad chaperona (R2TP/prefoldinas, CCT), sugiriendo que pueden cumplir una función en el ensamblaje y la regulación de la actividad transcripcional de la Pol II (Jeronimo et al., 2007; Forget et al., 2010). Además, homólogos de las proteínas RPAP de hongos, plantas y animales mantienen la asociación con la Pol II, indicando que estas proteínas han conservado esta función ancestral a lo largo de la evolución (Jerónimo et al., 2004; Itsuki et al., 2008; Forget et al., 2010; Forget et al., 2013; Garrido-Godino et al., 2021). De RPAP1 y RPAP2 sólo se encuentran homólogos en los genomas de eucariotas, pero con diferencias significativas entre los distintos grupos. Así, los homólogos de RPAP1 de humanos y plantas son proteínas de gran tamaño (RPAP1 de humanos es un polipéptido de 1393 aminoácidos (aa) y MINIYO (IYO), su homólogo en *Arabidopsis thaliana*, tiene 1465 aa) mientras que en levaduras los homólogos de RPAP1 son proteínas significativamente más cortas (el homólogo de *Saccharomyces cerevisiae*, RBA50, tiene 439 aa). Asimismo, los homólogos de RPAP2

en humanos y plantas son proteínas más grandes que los homólogos de levaduras (RPAP2 de humanos es un polipéptido de 610 aa, RIMA, su homólogo en *Arabidopsis*, tiene 735 aa, mientras que RTR1, el homólogo de *Saccharomyces cerevisiae*, tiene 226 aa). Sin embargo, en hongos pluricelulares el tamaño de estas proteínas es similar al de animales y plantas (en *Pleurotus ostreatus* el homólogo de RPAP1 tiene 1256 aa y el de RPAP2 587 aa). El significado biológico/evolutivo de estas diferencias es desconocido, pero es interesante resaltar que la reducción en el tamaño de IYO es común a clados de hongos (i.e *Shizosaccharomyces* y *Saccharomyces*) que supuestamente revertieron a formas de vida unicelular de forma independiente (Naranjo-Ortiz y Gabaldón, 2020).

#### **1.4 Funciones de IYO/RPAP1 y RIMA/RPAP2 en el desarrollo**

En un rastreo de mutantes de *Arabidopsis* afectados en la organogénesis del meristemo apical de tallo (SAM) se identificó el mutante *miniyo* (*iy0-1*) (Sanmartín et al., 2011). El mapeo posicional reveló que el fenotipo se debía a una mutación hipomórfica en el gen At4g38440/IYO, que codifica una proteína con homología a RPAP1 de humanos. Además de la homología de secuencia, IYO copurifica con la Pol II (Sanmartín et al., 2011; Muñoz et al., 2017; Li et al., 2018), indicando que IYO y RPAP1 presentan homología funcional y podrían tener funciones conservadas regulando la transcripción. La mutación en *iy0-1* causa la sustitución de la glicina en posición 962 por ácido glutámico (G963E). Esta mutación modifica un residuo estrictamente conservado en todos los homólogos de IYO de embriófitas, modificando un motivo RGG localizado dentro de una zona rica en glicinas. Los motivos RGG se han asociado con la interacción con ácidos nucleicos y con el importe de la proteínas a núcleo (Gonzalez et al., 2021). Además de *iy0-1*, se han identificado otros tres alelos de IYO: los alelos nulos resultantes de la inserción de T-ADN *iy0-2* (SALK\_099872) e *iy0-3* (SAIL\_692-G12) y el alelo hipomórfico *iy0-4* resultante de la sustitución de la glicina en posición 1281 por aspartato

(G1281D) que se ha descrito recientemente (Li et al., 2018). La caracterización de los mutantes *iy0-1*, *iy0-2* e *iy0-3* ha revelado que *IYO* es un gen esencial para la viabilidad y el correcto desarrollo de las plantas (Sanmartín et al., 2011). Asimismo, si bien el alelo débil *iy0-4* no presenta defectos en el desarrollo, plantas con *IYO* silenciado tienen un desarrollo muy alterado (Li et al., 2018). La mutación *iy0-1* causa un retraso en la organogénesis de los órganos aéreos y un aumento del tamaño del meristemo apical de tallo que resulta en el desarrollo de tallos fasciados. Además, el defecto en diferenciación resulta en la especificación de meristemos ectópicos de tallo y de flor. El meristemo apical de raíz y la embriogénesis también se ven afectados y se generan, aunque con baja penetrancia, meristemos de raíz y embriones ectópicos (Sanmartín et al., 2011). Los estudios transcriptómicos corroboran los defectos en diferenciación, mostrando que en el mutante *iy0-1* la expresión de genes de desarrollo está disminuida mientras que aumenta la expresión de genes activos en células indiferenciadas (Sanmartín et al., 2011). Además, los defectos en diferenciación se exageran en plantas transheterocigotas que combinan el alelo *iy0-1* con los alelos nulos *iy0-2* o *iy0-3*, presentado un desarrollo sin apenas diferenciación de órganos, con un crecimiento tipo callo con pequeñas hojas rudimentarias que solamente puede mantenerse en condiciones de cultivo *in vitro*. Por el contrario, la sobreexpresión de *IYO* provoca la aceleración de la diferenciación y la terminación temprana de los meristemos de tallo y raíz (Sanmartín et al., 2011). Estos datos sugieren que *IYO* es un factor necesario y limitante para iniciar la diferenciación en *Arabidopsis*. La expresión de *IYO* es máxima en embriones, meristemos, y primordios de órganos, mientras que en tejidos adultos es muy baja. Su distribución subcelular tampoco parece ser uniforme. El estudio de fusiones funcionales a GFP que complementan los fenotipos de *iy0-1* y de los alelos nulos, mostró que en células madre del meristemo, *IYO* se acumula en el citoplasma, pero cuando las células inician la diferenciación, *IYO* se

traslada al núcleo (Sanmartín et al., 2011). Considerando que IYO es un factor limitante para la diferenciación y que podría tener una función nuclear asociada a la Pol II, la coincidencia con el inicio de la diferenciación sugiere que su acumulación nuclear puede funcionar como un interruptor molecular para iniciar la diferenciación. Además, esta función podría estar conservada a lo largo de la evolución, ya que en ratones se ha constatado que cuando se inicia la diferenciación, RPAP1 se traslada al núcleo, donde es esencial para activar programas de desarrollo y para mantener la identidad celular de células diferenciadas (Lynch et al., 2018). La depleción de RPAP1 causa retrasos y defectos en la diferenciación de células madre y, adicionalmente, facilita la reprogramación de células diferenciadas adultas a células madre pluripotentes (Lynch et al., 2018).

En una búsqueda de interactores de IYO, se identificó a la proteína RIMA, que es homóloga a RPAP2 de humanos (Muñoz et al., 2017). El mutante hipomórfico *rima-2* fenocopia los defectos en diferenciación del mutante *iyo-1*, con el que además comparte alteraciones en el transcriptoma muy similares. La interacción física de estas dos proteínas y la similitud en los efectos moleculares y de desarrollo causadas por sus depleciones apoyan que *IYO* y *RIMA* cooperan directamente para regular la diferenciación de las células madre en plantas. En este sentido se ha demostrado que RIMA se requiere para la acumulación de IYO en el núcleo y que la reducción de los niveles nucleares de IYO en el mutante *rima-2* coinciden con un retraso en la diferenciación. Además, se han obtenido evidencias genéticas de la interacción funcional de estos dos genes para regular la diferenciación. Así, la combinación de los dos alelos hipomórficos *iyo-1* y *rima-2* tiene un efecto sinérgico bloqueando totalmente la diferenciación, de tal manera que el doble mutante crece como un callo de células indiferenciadas (Muñoz et al., 2017). Por otro lado, la mutación *rima-2* bloquea la diferenciación prematura que causa la sobreexpresión

de *IYO*, mientras que la sobreexpresión conjunta de *IYO* y *RIMA* acelera aún más la diferenciación. El patrón de expresión de *RIMA* también coincide con el de *IYO*, expresándose a altos niveles en embriones, meristemos y primordios. El estudio de fusiones funcionales a GFP mostró que, aunque la localización basal de *RIMA* es predominantemente citoplasmática, la proteína se mueve entre el citoplasma y el núcleo, donde se concentra si se inhibe el transporte nuclear con leptomicina B o si se co-expresa con *IYO* (Muñoz et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no se han podido determinar las funciones moleculares de *IYO* y *RIMA*, y demostrar si, efectivamente, el traslado de *IYO* al núcleo dependiente de *RIMA* es el interruptor que activa la diferenciación celular de células madre en plantas.

### **1.5 Posibles funciones moleculares de RPAP1/IYO/RBA50 y RPAP2/RIMA/RTR1**

Por analogía con el ensamblaje de la ARN polimerasa en bacterias, se ha propuesto que durante la biogénesis de la Pol II se forma primero un subcomplejo de las subunidades RPB3, RPB10, RPB11 y RPB12 que después se asocia con RPB2 y RPB9, formando el subcomplejo RPB2/RPB3, al que posteriormente se le unirían las subunidades RPB1, RPB5, RPB6 y RPB8 y finalmente las subunidades RPB4 y RPB7, que forman otro subcomplejo disociable de la polimerasa (Wild and Cramer, 2012; Garrido-Godino et al., 2021). En apoyo de este modelo de ensamblaje, cuando se induce la degradación de RPB1 con  $\alpha$ -amanitina y se inmunopurifica RPB3, aumenta su interacción con las otras subunidades del subcomplejo RPB2/RPB3 mientras que disminuye la interacción con el resto de subunidades de la Pol II, sugiriendo que este subcomplejo se forma *in vivo* y es un intermediario en la formación de la holoenzima (Boulon et al., 2010). En estos experimentos también se observó que al degradar la RPB1 aumentaba la interacción de RPB3 con RPAP1, RPAP2 y RPAP4/GPN1/NPA3, por lo que se propuso que podrían

asociarse al subcomplejo RPB2/RPB3 durante el ensamblaje de la Pol II. En apoyo de esta hipótesis, en extractos de células de humanos, RPAP1 co-purifica con las subunidades RPB2, RPB3 y RPB11 (Jeronimo et al., 2004), mientras que, en extractos de plantas, IYO co-purifica con RPB2, RPB3, RPB10, RPB11 y RPB12 (Sanmartín et al. et al., 2017; Muñoz et al., 2017; Li et al., 2018). Ensayos de dos híbridos de levaduras y de interacción *in vitro* indican que RBA50 interacciona directamente con RPB2, RPB3 y RPB10 (Liu et al., 2020), mientras que IYO interacciona directamente con RPB3 y RPB10 (Sanmartín et al., 2011; Li et al., 2018) sugiriendo que RPAP1/IYO/RBA50 se podría unir al subcomplejo RPB2/RPB3 por interacción directa con tres de sus subunidades. Debido a la presencia en este subcomplejo se postuló que RPAP1 podría tener un papel en el ensamblaje la Pol II, pero los resultados obtenidos hasta ahora no son concluyentes. En experimentos en levaduras con un alelo termosensible de RBA50 (*rba50-3*) se vio que a la temperatura restrictiva disminuían los niveles de RPB12 asociados a RPB3 en el mutante con respecto al tipo silvestre (Zeng et al., 2018), lo que indicaría que RBA50 se requiere al menos para el ensamblaje de estas dos subunidades. Sin embargo, la interacción entre RPB3 y RPB11 no se veía afectada por la mutación *rba50-3*. También se ha publicado que la depleción de NPA3 provoca una disminución en la co-purificación de RPB3 con RPB1 y RPB2, lo que sería compatible con una función muy temprana en el ensamblaje (Liu et al., 2020). En contraste, en células de ratón se ha visto que el silenciamiento de RPAP1 no afecta a la integridad de la Pol II sino a la interacción de Pol II con un gran número de factores implicados en transcripción, entre los que destacan el complejo Mediator, FTs, modificadores de la cromatina y maquinaria de procesamiento del ARN (Lynch et al., 2018), lo que sugiere que IYO podría funcionar como una plataforma para reclutar estos factores durante la transcripción. Por otro lado, se ha publicado que en Arabidopsis el silenciamiento de *IYO* disminuye la co-purificación

de RPB1 con RPB3, RPB4, RPB5, RPB7, RPB8 y RPB11, pero la cantidad de RPB2 y RPB10 copurificado con RPB1 no disminuye y la de RPB9 incluso aumenta (Li et al., 2018). Estos resultados indicarían que IYO es necesario para la integridad de la Pol II, pero no son compatibles con un papel en el ensamblaje de la Pol II según el modelo aceptado (Wild y Cramer, 2012; Garrido-Godino et al., 2021), ya que debería disminuir de forma coordinada la interacción de RPB1 con todas las subunidades del subcomplejo RPB2/RPB3. Estos resultados indicarían que el efecto de interferir con IYO/RBA50 es promover el desensamblaje de la Pol II y no inhibir su ensamblaje. El desensamblaje de la Pol II ocurre cuando la polimerasa se detiene irreversiblemente durante la transcripción, ya sea porque falte algún componente necesario para la reacción (Aoi et al., 2021) o porque la polimerasa se encuentra con obstáculos insalvables, como pueden ser daños en el ADN (Nakazawa et al., 2020). Para disociar del ADN a la polimerasa detenida, la subunidad RPB1 se ubiquitina y degrada, lo que provoca el desensamblaje del complejo, (Gonzalez et al., 2021). En el mutante *iy0-1* se detectan altos niveles de ubiquitinación y mayor inestabilidad de RPB1, lo cual sugiere que hay problemas globales con la transcripción que provocan la degradación de RPB1 (Sanmartín et al., 2011). Este aumento en la degradación de la RPB1 explicaría la disminución de los niveles de Pol II ensamblada al silenciar *IYO* (Li et al., 2018). La mutación de *IYO* también afecta a la integridad de las polimerasas específicas de plantas Pol IV y Pol V, con mayor intensidad que a la de Pol II (Li et al., 2018). En el mutante hipomórfico *iy0-4*, que no altera significativamente a la Pol II, los niveles de Pol IV y Pol V completamente ensamblada son casi indetectables y consecuentemente, la producción de siARNs dependiente de Pol IV y los niveles de metilación del ADN están severamente afectados (Li et al., 2018). Los niveles de la subunidad catalítica NRPD1 están muy disminuidos en el mutante *iy0-4*,

indicando que probablemente su estabilidad está comprometida, lo que podría provocar el desensamblaje de la Pol IV.

Las subunidades de la Pol II, Pol IV y Pol V no tienen señales de localización nuclear (NLS), y aunque las de menor tamaño pueden entrar al núcleo por difusión a través del poro nuclear (Gómez-Navarro y Estruch, 2015), las subunidades grandes, así como los complejos y subcomplejos, necesitan cofactores para su importe a núcleo. Se ha propuesto que tanto RPAP1/IYO/RBA50 como RPAP2/RIMA/RTR1 juegan un papel en el importe de las polimerasas. En mutantes de estos genes se altera la distribución subcelular de subunidades de la Pol II, produciéndose una mayor acumulación en el citosol, lo que se ha interpretado como que las correspondientes proteínas participan en su importe nuclear. Así, en el mutante *rba50-3* de levaduras se acumulan menores niveles de RPB1 en el núcleo (Zeng et al., 2018) y en el mutante *iy0-4* de Arabidopsis se acumulan menores niveles nucleares de las subunidades NRPE1 y NRPD/E3b de la Pol IV y Pol V (Li et al., 2018). Sin embargo, en células de ratón el silenciamiento de *RPAP1* no afecta a los niveles nucleares de RPB1 (Lynch et al., 2018). En levaduras, mutaciones en los genes *IWR1* y *RTR1* bloquean parcial y aditivamente la acumulación de RPB1 en el núcleo (Gómez-Navarro y Estruch, 2015), de tal manera que se han propuesto dos rutas de importe, una principal dependiente de la proteína IWR1 (Czeko et al., 2011) y otra secundaria dependiente de RTR1. IWR1 interaccionaría con la Pol II ensamblada en el citosol y aportaría su NLS para importar el complejo usando la ruta canónica dependiente de importinas. Además, RPAP2 mediaría el importe activo de subcomplejos o de subunidades individuales de la Pol II cuando la ruta dependiente de IWR1 no fuese funcional o suficientemente activa (Gómez-Navarro y Estruch, 2015). Esta otra vía de transporte permitiría el ensamblaje de la Pol II en el núcleo y daría robustez genética al proceso de importe de la polimerasa. Esta función de RTR1 en levaduras parece

conservada en los homólogos de plantas y animales. Así, en el mutante *rma-2* de *Arabidopsis*, los niveles nucleares de RPB1-GFP, RPB2-GFP y RPB3-GFP están reducidos (Chen et al., 2021) y en células humanas, el silenciamiento de *RPAP2* provoca la acumulación de RPB1 en el citosol (Forget et al, 2013). Estos datos apoyan que RPAP1/IYO/RBA50 y RPAP2/RIMA/RTR1 son necesarios para la correcta acumulación de subunidades de la Pol II en el núcleo, aunque no clarifican si son parte del mecanismo de importe o si su ausencia afecta indirectamente a la distribución subcelular de las subunidades. Por ejemplo, los efectos sobre la integridad de la Pol II podrían ser responsables de la acumulación de RPB1 en el citosol. En apoyo de esto, se ha reportado que, si se elimina cualquier subunidad de la Pol II en células de humano o de levadura, impidiendo la formación de la holoenzima, la RPB1 se acumula en el citosol (Boulon et al., 2010; Gómez-Navarro y Estruch 2015).

Independientemente de una posible función citosólica en el ensamblaje o en el transporte de las ARN polimerasas al núcleo, existen evidencias de que tanto RPAP1/IYO/RBA50 como RPAP2/RIMA/RTR1 tienen funciones nucleares relacionadas con la transcripción de la Pol II. Como se indicó anteriormente, los altos niveles de ubiquitinación y la inestabilidad de la RPB1 en el mutante *iy0-1* apuntan directamente a que *IYO* es necesario para que la transcripción proceda de forma eficiente (Sanmartín et al., 2011). En este sentido *IYO* interacciona física y funcionalmente, para regular la diferenciación, con el complejo Elongator (Sanmartín et al., 2011) que ha sido implicado en la regulación de la cromatina y el control de la elongación transcripcional (Jarosz et al, 2020). *IYO* también interacciona físicamente con las subunidades MED14 y MED19 de Mediator (Contreras R., 2018). Además, en células de ratón se ha reportado que RPAP1 se asocia a promotores de genes activados durante la diferenciación y que su silenciamiento provoca que factores fundamentales para la transcripción como el complejo Mediator, FTs y factores de

procesamiento de ARN se disocian de la Pol II (Lynch et al., 2018). RPAP1/IYO son proteínas de gran tamaño sin dominio enzimático conocido y podrían actuar como plataforma de anclaje para reclutar cofactores necesarios para la transcripción. Por el contrario, se han reportado evidencias sugiriendo que RPAP2/RIMA/RTR1 sí tendrían actividad enzimática intrínseca, como fosfatasas que defosforilan la Pol II durante la transcripción. RTR1 y RPAP2 se asocian a la cromatina en el cuerpo de genes diana, con un pico que coincide con el punto en el que la fosforilación en serina 5 del CTD empieza a disminuir cuando la polimerasa se mueve hacia el extremo 3' de los genes (Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012). Además, la mutación de RTR1 o el silenciamiento de RPAP2 provocan un aumento de los niveles de fosforilación en serina 5 del CTD de la Pol II en el cuerpo de los genes, sugiriendo que su actividad es necesaria para la bajada de esta marca que se produce cuando la polimerasa entra en elongación productiva (Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Hunter et al., 2016). Esto concuerda con ensayos *in vitro* que sugieren que RTR1 y RPAP2 tienen actividad fosfatasas defosforilando la serina 5 (Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Ni et al., 2014; Irani et al., 2016) y también la tirosina 1 del CTD (Hsu et al., 2014). Sin embargo, la actividad fosfatasa de estas proteínas es controvertida. La actividad *in vitro* reportada es muy baja y en otros estudios no se ha detectado tal actividad (Xiang et al., 2012; Chen et al., Biorxiv 2022). Además, análisis estructurales no han revelado similitud con ninguno de los sitios activos conocidos en las distintas familias de fosfatasas (Xiang et al., 2012; Fianu et al., 2021; Chen et al., Biorxiv 2022). Sin embargo, se ha definido un dominio conservado que estructuralmente podría constituir un centro activo atípico (Irani et al., 2016). Otra posibilidad es que en los ensayos *in vitro*, RTR1 o RPAP2 co-purifiquen bajas cantidades de una fosfatasa que fuese responsable de la actividad observada. Esta posible fosfatasa contaminante tendría que estar presente en extractos de *E. coli* o de células de insectos

(Hsu et al., 2014), que son los sistemas que se han usado para los ensayos *in vitro*. En este sentido es interesante resaltar que en ensayos de espectrometría de masas se han detectado copurificando con RPAP2 a proteína fosfatasa del tipo PP1 (Jeronimo et al., 2007; Egloff et al., 2012), que es una familia conservada desde procariotas a eucariotas.

Recientemente se han publicado estudios de criomicroscopía electrónica que describen la estructura de RPAP2 en complejo con la Pol II, bien expresada *in vitro* (Chen et al., Biorxiv 2022) o bien purificada de extractos de timo de vaca (Fianu et al., 2021). En las estructuras resueltas, RPAP2 se une a través de su extremo N-terminal conservado al dominio “*jaw*” de RPB1 y RPB5, formando un complejo que es estéricamente incompatible con el complejo de iniciación o de elongación, lo que indica que RPAP2, al menos en esta conformación, no interacciona con la Pol II transcripcionalmente activa. Además, RPAP2 impide la interacción de Pol II con el factor de transcripción general TFIIF, por lo que se ha propuesto que RPAP2 podría ejercer un control negativo sobre la iniciación de la transcripción (Chen et al., Biorxiv 2022). En concordancia con esto, el complejo Pol II-RPAP2 ensamblado *in vitro* no es capaz de iniciar la transcripción y cuando se elimina RPAP2 *in vivo*, aumenta la incorporación de TFIIF y de la Pol II a los promotores de una forma global en el genoma (Chen et al., Biorxiv 2022). Sin embargo, hay también resultados que muestran que RTR1 y RPAP2 se asocian al promotor y al cuerpo de genes e interaccionan con Pol II hiperfosforilada (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Wani et al., 2014; Ni et al., 2014), que es la forma transcripcionalmente activa. Además, cuando se aísla la Pol II asociada a RTR1 de extractos celulares, este complejo sí tiene actividad transcripcional (Mosley et al., 2009) indicando que RPAP2/RIMA/RTR1 puede adoptar otra conformación en su interacción con Pol II que es compatible con la transcripción. Esta otra forma de interacción podría ser directa entre RPAP2 con otras subunidades de la Pol II o a través de algún cofactor.

En este sentido se han publicado evidencias de interacción directa de RPAP2 con RPB6, RPB10 y RPB12 (Wani et al., 2014) y de RIMA con RPB1, RPB3, RPB4 y RPB6 (Chen et al., 2021). En el caso de la interacción con RPB6, es a través de un dominio localizado en el extremo C-terminal de RPAP2 distinto del que interacciona con el dominio *jaw* de RPB1 y RPB5 (Wani et al., 2014). Además, se ha reportado que las proteínas RPRD funcionan como un andamiaje para reclutar a RPAP2 al CTD y promover la defosforilación de la serina 5 (Ni et al., 2014). Las proteínas RPRD tienen un dominio de unión al CTD, con mayor afinidad a formas fosforiladas e interaccionan directamente con RPAP2, promoviendo su actividad serina 5 fosfatasa *in vitro*. Además, *in vivo*, el silenciamiento de RPRD1A impide la interacción entre RPAP2 y la Pol II hiperfosforilada, bloquea el reclutamiento de RPAP2 a los promotores de genes y provoca un aumento de la fosforilación en serina 5, (Ni et al., 2014). Estos datos sugieren que las proteínas RPAP2/RIMA pueden adoptar distintas formas de interacción con la Pol II y que, por tanto, es posible que se asocien a la Pol II durante la transcripción. En apoyo de esta hipótesis, se ha publicado que RPAP2 interacciona con factores implicados en las distintas fases de la transcripción como Mediator, DSIF, NELF, Integrator y factores de procesamiento y poliadenilación del ARN (Jeronimo et al., 2007; Egloff et al., 2012) y que RIMA copurifica con factores implicados en elongación transcripcional (DSIF, TFIIS, PAF1C) y en poliadenilación (CSTF77) (Antosz et al., 2017). Además, estudios funcionales sugieren que RPAP2 es responsable de reclutar al complejo Integrator para la correcta terminación de la transcripción de genes snARN (Egloff et al., 2012) y que RPAP2 y RTR1 regulan la terminación dependiente e independiente de poliadenilación (Wani et al., 2014; Victorino et al., 2020). Si bien, todos estos resultados apoyan firmemente la relación de las proteínas RPAP1/IYO/RBA50 y RPAP2/RIMA/RTR1 con

la Pol II, existen aún muchos interrogantes acerca de su modo de acción y cómo y en que fases de la transcripción actúan.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Estudios genéticos previos indican que la acumulación nuclear de IYO dependiente de RIMA funciona como un interruptor molecular para iniciar la diferenciación celular. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares mediante los que *IYO* y *RIMA* activan la diferenciación, si bien se supone que es a través de su interacción con la ARN polimerasa II y la regulación de la transcripción. Por tanto, en la presente tesis se ha planteado como objetivo general la caracterización de mecanismos moleculares de acción de *IYO* y *RIMA* y la identificación de sus posibles dianas transcripcionales. Para ello, se plantean los 3 siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar cómo IYO y RIMA modulan la actividad de la ARN polimerasa II
2. Identificar y caracterizar funcionalmente interactores de IYO y RIMA
3. Identificar dianas transcripcionales de IYO y RIMA

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico**

##### *3.1.1 Arabidopsis thaliana*

En este trabajo se han utilizado las accesiones Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (Ler) de *Arabidopsis thaliana*, y los mutantes *iy0-1* (Sanmartín et al., 2011), *iy0-2* (SALK\_099872), *rima-1* (SALK\_012339) y *rima-2* (SALK\_115762) obtenidos del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC).

##### *3.1.2 Escherichia coli*

Las bacterias empleadas para el desarrollo del presente trabajo pertenecen a la cepa DH-5 $\alpha$ , para transformación, amplificación, propagación y asilamiento de plásmidos y de la cepa DB3.1 para trabajar con los vectores vacíos del sistema GATEWAY®.

##### *3.1.3 Agrobacterium tumefaciens*

Se empleó la cepa GV3101 (Van Larebeke et al., 1974) para la transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* y estable de *Arabidopsis*

##### *3.1.4 Saccharomyces cerevisiae*

Se empleó la cepa AH109, derivada de la cepa PJ69-2A, que contiene los marcadores ADE2 y HIS3 (James et al., 1996).

#### **3.2 Técnicas de cultivo**

##### *3.2.1 Arabidopsis thaliana*

Para la germinación *in vitro* de las semillas, se procedió a su esterilización en tubo Eppendorf con una mezcla de lejía comercial al 70 % y TWEEN-20 (SIGMA) al 0.1 %, seguido de la agitación por vórtex durante cinco minutos. Tras cinco lavados con agua estéril, las semillas se vernalizaron a 4°C durante 48 horas, en todos los casos, para

sincronizar su germinación. Se sembraron en placas estériles de medio sólido MS (4.7 g/l sales Murashige-Skoog) con 1% sacarosa ajustado a pH 5.7 con KOH y agar al 0.7% (crecimiento en placas en horizontal) o al 1 % (crecimiento en placas en vertical). Se crecieron también las plantas en medio MS líquido (misma composición de MS, pero sin agar) en placas multi-pocillo. La dexametasona (DEX) se ha utilizado en un rango de concentraciones de 10-100  $\mu$ M a partir de un stock de 20 mM en DMSO. Los antibióticos/herbicidas de selección necesarios se añadieron a concentraciones estándares (Kanamicina 50 mg/l, Higromicina 40 mg/l; Claforán 250 mg/l; Glufosinato 12 mg/l). Para el crecimiento en tierra, se empleó una mezcla estéril de tierra con vermiculita, en proporción 3:1. En todos los casos, tanto en *in vitro* como en invernadero, las plántulas crecieron en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), en cámaras climáticas ajustadas a 21°C y 60 % de humedad relativa.

### 3.2.2 *Escherichia coli*

Las bacterias se cultivaron en medio autoclavado (20 minutos a 120°C) Luria Bertani (LB: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l y pH = 7.4 ajustado con NaOH). En los casos de cultivo en medio sólido, se suplementó con agar 15 g/l. Se incubaron por un periodo de 24 horas, a 37°C, en oscuridad y, en el caso de los cultivos líquidos, a 200 rpm de agitación.

Para la selección en cada caso, los antibióticos fueron usados a concentraciones finales estándar, siendo filtrados para su esterilización con membranas Whatman de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro, en campana de flujo estéril.

### 3.2.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Las bacterias se cultivaron en medio autoclavado (20 minutos a 120°C) Yeast Extract Broth (YEB: bacto-peptona 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l y pH=7,

ajustado con NaOH); en los casos de cultivo en medio sólido, se suplementó con agar 15 g/l. Se incubaron por un periodo de 48 horas, a 28°C, en oscuridad para los cultivos sólidos y se incubaron por un periodo de 24 horas a 28°C en oscuridad y con 200 rpm de agitación para los cultivos líquidos. La adición de antibióticos se llevó a cabo de la misma manera que en el apartado anterior.

#### 3.2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras fueron cultivadas en medio completo YPDA (Sherman et al., 1991) (1 % extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de glucosa; en el caso de medio solidificado, se añadió 2 % de bacto-agar, Clontech) y medio Synthetic Dextrose (SD: 0,67% de tampón nitrogenado de levadura, 2 % de glucosa, 0,5 % de ácido succínico, pH ajustado = 5.5 con Tris Base, Clontech y 2 % de agar). Para las selecciones auxotróficas se empleó medio SD-LW (medio SD carente de los aminoácidos leucina y triptófano), medio SD-LWH (medio SD-LW carente de histidina), medio SD-LWA (medio SD-LW carente de adenina), y medio SD-LWHA (medio SD carente de leucina, triptófano, histidina y adenina). La afinidad y la fuerza de interacción de los posibles positivos se testó añadiendo al medio restrictivo SD-LWHA el compuesto 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) a diferentes concentraciones (Walhout y Vidal, 1999).

### 3.3 Técnicas de transformación

#### 3.3.1 *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*.

Las plantas crecieron en macetas hasta la aparición de las primeras flores, momento en el que fueron sometidas a la técnica de transformación por inmersión floral con cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Los tallos florales se sumergieron dos veces en una solución de células de esta bacteria (portadoras de las construcciones de interés), una solución MS tamponada a pH 5.7 con 5% sacarosa y 0.05% (vol/vol) de detergente Silwet L77. Entre cada inoculación se apretaron las flores suavemente con los

dedos para contribuir, de esta manera, a la infección, a través de micro-heridas mecánicas. Después de la infiltración, las bandejas con las plantas fueron selladas con plástico film para guardar la humedad y favorecer la recuperación, durante un periodo de 48 horas. La obtención de líneas homocigotas para el gen de inserción de interés se llevó a cabo mediante la siembra de semillas, obtenidas de las plantas transformadas, en placas *in vitro* de selección con los antibióticos necesarios en cada caso, a concentración final estándar.

Para la transformación transitoria en *Nicotiana benthamiana*, se agroinfiltraron hojas de plantas de 3 semanas por su parte abaxial con suspensiones de *Agrobacterium tumefaciens* a una densidad óptica a 600 nm de 0.15 y se recogieron las muestras o se visualizaron al microscopio a las 48 h postinoculación.

### 3.3.2 *Escherichia coli*

La transformación de células termocompetentes (obtenidas previamente según el protocolo de Untergasser, 2006) se realizó mediante la técnica de choque térmico (Sambrook et al., 1989), a partir de alícuotas de 100 µl conservadas a -80°C. Una vez descongeladas en hielo, se añadió el ADN de interés, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se procedió al choque térmico (42°C durante 75s), para después dejarlas dos minutos en hielo. Transcurridos los dos minutos en hielo, se añadieron 800 µl de LB líquido a cada tubo (sin antibiótico) y se dejaron los tubos incubando una hora a 37°C en agitación de 200 rpm, para favorecer la recuperación de las células después del choque térmico. Finalmente, se plaquearon en placas LB suplementadas con los antibióticos necesarios para seleccionar colonias transformadas.

### 3.3.3 *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de células termocompetentes (previamente obtenidas según el protocolo de Hofgen y Willmitzer, 1988) se llevó a cabo mediante la técnica de choque

térmico (Holsters et al., 1978), a partir de alícuotas de 100  $\mu$ l conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongeladas en hielo, se añadió el ADN de interés y se volvieron a congelar los tubos en nitrógeno líquido durante cinco minutos. Seguidamente, se pusieron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante otros cinco minutos, después de lo cual, se añadió 1 ml de YEB a cada tubo y se dejaron entre dos y cuatro horas incubando en agitación de 220 rpm, a temperatura ambiente. Por último, se plaquearon en placas YEB con rifampicina y los antibióticos necesarios para seleccionar colonias transformantes.

#### 3.3.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Para la transformación de levaduras se siguió el método de Acetato de Litio (LiAc) (Ito et al., 1983). A partir de alícuotas gliceroladas se hizo estría en placa YPDA para, después de 3 días de crecimiento a  $30^{\circ}\text{C}$ , seleccionar una colonia aislada. Con la colonia aislada se puso pre-cultivo de 25 ml en YPDA líquido dejándolo crecer toda la noche en agitación a 220 rpm y a  $30^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, después de comprobar que el pre-cultivo presentaba una  $\text{OD}_{600}$  mayor de 1,5, se puso cultivo grande (100- 300 ml) a partir del pre-cultivo y, una vez alcanzada la fase competente ( $\text{OD}_{600}$  de 0,6 - 0,8), las células se recolectaron por centrifugación durante 5 minutos a 2100g. Se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con agua estéril volviéndolas a centrifugar en las mismas condiciones. Se repartieron en tubos eppendorf y se añadieron 400  $\mu$ l de TE (tampón Tris/EDTA) /LiAc por tubo. En relación de volúmenes 1/10. Se repartieron 100  $\mu$ l para cada transformación a tubos eppendorf nuevos que contenían el ADN a transformar. Se añadieron 600  $\mu$ l de PEG (polietilenglicol al 50%) /TE/LiAc. En relación de volúmenes 1/10. Las células se dejaron durante 30 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación 220 rpm. Después se añadieron 70  $\mu$ l de DMSO por tubo y se procedió al choque térmico dejando las células a  $42^{\circ}\text{C}$ , sin agitación, durante 15 minutos. Seguidamente se transfirieron a hielo durante 2 minutos. Finalmente, mediante un *spin* de centrifugación de 6 segundos se quitó el medio y las células se

resuspendieron en 200 µl de agua estéril de los cuales se plaquearon 100 µl en placas de medio SD-LW.

### **3.4 Preparación y análisis de ácidos nucleicos**

#### *3.4.1 Aislamiento de ARN*

Se siguió el método de TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific), según el protocolo del fabricante. A partir de plántulas de 11 días se procedió a machacar 100-200 mg de tejido vegetal contenido en tubos eppendorf, previamente congelado en nitrógeno líquido, con un émbolo y 1 ml de TRIZOL. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadieron 200 µl de Cloroformo, tras una agitación manual de quince segundos se incubaron los tubos otros dos minutos a temperatura ambiente para centrifugarlos en frío durante quince minutos a 10 000 rpm. Tras esa separación de fases, se transfirió la fase acuosa (fase superior) a un tubo Eppendorf con 500 µl de isopropanol y se dejó que precipitara el ARN durante un tiempo mínimo de dos horas a -20°C. Transcurrido ese tiempo, se hicieron dos lavados con etanol al 75 % para resuspender el pellet en 100 µl de agua. A partir de este punto, se trató con ADNasa y se purificó con el kit de Roche “High Pure RNA Isolation Kit”, siguiendo el protocolo indicado en las instrucciones. Al finalizar, se cuantificó el ARN con un nano-drop. Alternativamente se usó el kit FavorPrep. Plant Total RNA Purification Mini Kit (100 preps) de FAVORGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### *3.4.2 Aislamiento de ADN plasmídico*

Dado que en este trabajo no se han necesitado volúmenes grandes de ADN plasmídico, se han hecho minipreps a partir de cultivos líquidos de 3 ml incubados toda la noche a 37°C, con 200 rpm de agitación. Se ha empleado el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep Kit de Quiagen, atendiendo a las instrucciones del fabricante.

### *3.4.3 Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional*

Para el genotipado de plantas, bacterias y levaduras se realizaron amplificaciones con Taq Polymerase® (Biotools). Para amplificar fragmentos para clonajes se usó la polimerasa “proof Reading” Phusion (Neb).

### *3.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)*

Para clonajes, el ADNc se sintetizó con con oligo dT y la enzima SuperScript II RT (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para RT-QPCR se usó el kit de Applied Biosystems con oligos random para la RT y la mezcla EVAGreen para la PCR.

### *3.4.5 Técnicas electroforéticas y aislamiento de fragmentos de ADN en geles de agarosa*

Para la electroforesis horizontal de ADN, se usaron geles de agarosa de porcentaje variable (entre el 1 % y el 4 %) según el tamaño de banda esperado, en una solución tampón 1X TBE (100 mM Tris-HCl, 100 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). Los geles se resolvieron aplicando un voltaje de 100V. Para visualizar las bandas bajo luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989), se añadió bromuro de etidio en el gel antes de su solidificación. Las bandas de ADN se aislaron y purificaron con el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit de Quiagen, atendiendo las instrucciones del fabricante.

### *3.4.6 Mutagénesis dirigida*

Las construcciones con la secuencia de RIMA mutagenizada en el motivo de unión a PP1 (RIMA $\Delta$ RSVTW y RIMAV430D) se generaron mediante mutagénesis dirigida con el sistema In-Fusion (Takara) a partir de un plásmido que contenía la secuencia codificante clonada en el vector pDONR207 con los oligos mostrados en la Tabla 2.

### **3.5 Técnicas para el análisis de proteínas**

#### *3.5.1 Extracción de proteínas*

Para la extracción de proteínas totales de *Arabidopsis* para su análisis directo por SDS-PAGE, el tejido congelado en nitrógeno líquido se machacó mecánicamente, homogeneizándolo en tampón de carga (31.5 % glicerol, 31.5 % SDS -20 %, 31.5 % Tris-HCl 0.5M pH=6.8 y 7.5 %  $\beta$ -mercaptoetanol). Para los ensayos de inmunoprecipitación los extractos se hicieron en tampón de extracción (50 mM TrisHCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Tx-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail).

#### *3.5.2 Ensayos de interacción proteína-proteína por dos híbridos de levadura*

Se llevaron a cabo mediante la técnica de Yeast Two Hybrid (Y2H) doble híbrido (Fields y Song, 1989), utilizando el sistema Gateway® cebo-presa, a través de los plásmidos pGADT7 (dominio AD) y pGBkT7 (dominio BD). Los clones a estudiar (ver Tabla 1) fueron obtenidos del TAIR en plásmidos pENTR223 y pDONOR207, respectivamente. Se subclonaron en los plásmidos deseados vía LR y BP.

Se co-transformó la cepa de levadura AH109 con ambas construcciones (AD- gen candidato y BD- gen de interés o viceversa según el caso), siguiendo el protocolo de PEG/Acetato de Litio. Las colonias transformantes se seleccionaron con medio mínimo SD-LW (Sherman et al., 1981); con lo que se dejaron crecer tres días a 30°C.

Posteriormente, se incubaron tres de las colonias transformantes en SD-LW líquido, con el fin de favorecer su recuperación, durante cinco horas a 30°C con 220 rpm. Después de la incubación, se midió la OD<sub>600</sub> y se hicieron diluciones seriadas de 1, 1/10 y 1/100 en forma de gotas, sobre medio control SD-LW y medio selectivo para testar posible interacción, SD- LWA, SD-LWH y SD- LWHA. Así mismo, se testó la fuerza de las

posibles interacciones proteicas con una placa adicional de SD- LWHA + diferentes concentraciones de 3AT, que incrementa la selectividad y pone de manifiesto qué tan fuerte es la interacción entre dos proteínas dadas.

### 3.5.3 *Ensayos de inmunoprecipitación (IP) y co-inmunoprecipitación (CoIP)*

Se recolectaron las muestras de hojas de *Nicotiana Benthamiana* co-infiltradas en tubos eppendorf congelándolas en nitrógeno líquido. El tejido se machacó con un émbolo homogeneizándolo con 1 ml de tampón de extracción (50 mM TrisHCl pH=7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tx-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail – Thermo Scientific™). Se añadieron 20 mg de PVPP a cada muestra y se dejaron en la oscuridad dando vueltas a 4°C durante 10 minutos. Se centrifugaron 2 veces durante 10 minutos a 13.000 rpm recogiendo el sobrenadante. Se añadió BSA (Bovine Serum Albumin) al 2% y 1 ml tampón de extracción (20 mM TrisHCl pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón-100). Después las muestras se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 2 horas a 4°C. Se centrifugaron durante 1 minuto a 2000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 850 µl de tampón de extracción a los pellet y se hicieron 4 lavados (centrifugaciones de 1 minuto a 2000 rpm). Para eluir las proteínas se añadió tampón Cracking (1 volumen de glicerol, 1 volumen de SDS 20%, 1 volumen de Tris 0,5M pH=6,8, Bromofenol y β-mercaptoetanol en relación 7,25 µl/100 µl) y se hirvieron las muestras 5 minutos a 100°C y se analizaron por western blot.

### 3.5.4 *Análisis por Western-blot*

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond® ECL (Amersham Biosciences) que se incubaron con anticuerpos primarios y/o secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP) y se revelaron con el sistema ECL® Western Blotting Detection (Amersham Biosciences). Diluciones de

anticuerpos usadas: anti-RIMA (1:2000), 8GW16- BioLegend (1:2000), 3E8 - abcam (1:2000), 3E10 -abcam (1:2000), GFP – Living Colors®, Clontech (1:1000), HA - BioLegend (1:1000), Anticuerpos secundarios: antimouse-HRP (Amersham, 1:10.000), antiRabbit-HRP (Thermofisher, 1:10.000) y antiRat-HRP (Thermofisher, 1:10000).

### *3.5.5 Análisis de localización subcelular por microscopía confocal*

La localización de proteínas fusionadas a GFP se llevó a cabo mediante expresión transitoria de la construcciones en hojas de *Nicotiana benthamiana* y la visualización de la fluorescencia 48 horas después de la agroinfiltración en un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems), excitando la GFP con un láser de Argón de 488 nm y capturando la luz en un rango 496-538 nm.

## **3.6 ARN-seq**

### *3.6.1 Generación de las construcciones*

Mediante PCR convencional, con la enzima Phusion® High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific), se amplificó un fragmento de IYO (exón 8, nucleótidos del 82 al 540) y otro de RIMA (exón 1, nucleótidos del 3 al 429), diseñando cebadores específicos para esos fragmentos con colas GATEWAY® Cloning Technology (Thermo Fisher Scientific), incluidas para trabajar más adelante con ese sistema (ver Tabla 2). Se aislaron las bandas y se clonaron en el vector pDONOR207 (Invitrogen), en los dos casos, vía BP, con el kit Gateway BP II (Invitrogen).

Seguidamente, se hizo LR con el kit Gateway LR clonase (Invitrogen), para pasar los fragmentos al vector pOpOff2 (cedido por el Dr. Antonio Leyva) (Wielopolska et al., 2005). Este vector deriva del pART27 (Gleave, 1992) y es un sistema binario (se inserta el fragmento deseado en los dos sentidos) pHELLSGATE (Wielopolska et al., 2005) modificado: permite la inducción de ARNi (ARN interferente) mediante la aplicación de

DEX en el momento deseado e incorpora resistencias a antibióticos para selección tanto en bacterias (Espectinomicina) como en plantas (Kanamicina). Finalmente, se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* para, posteriormente, agrotransformar plantas *Arabidopsis* adultas y generar líneas inducibles homocigotas estables.

De forma paralela, mediante PCR, se amplificó otro fragmento de IYO (exón 2, nucleótidos del 21 al 395) y de RIMA (exón 4, nucleótidos del 45 al 390). En este caso, los cebadores se diseñaron específicamente para estos fragmentos, pero con colas que incluían sitios de corte para las enzimas Xho I, EcoRI, XbaI-SpeI y HindIII (ver Tabla 2). De esta manera, después de aislar las bandas, se insertaron en el vector pKannibal (cedido por la doctora Pilar Cubas), gracias a la enzima T4 ligasa (sistema de clonación clásico), previa digestión del vector con los mismos sitios de corte y posterior aislamiento de la banda resultante.

Una vez obtenido el vector pKannibal con los dos fragmentos clonados dentro (uno en un sentido y el otro en antisentido), para los dos casos, se procedió a cortar los insertos con las enzimas XhoI y SpeI, para clonarlos en el vector pDEX (derivativo del pBI121). A partir de la enzima T4 ligasa (previa digestión del pDEX vacío con las mismas enzimas y posterior aislamiento de la banda), se introdujeron los dos insertos en este vector que igualmente permite la inducción de ARNi, mediante la aplicación de DEX en el momento deseado e incorpora resistencias a los antibióticos para la selección tanto en bacterias (Kanamicina) como en plantas (Hygromicina). Finalmente, se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* para, luego, agrotransformar plantas *Arabidopsis* adultas y generar líneas inducibles homocigotas estables.

### 3.6.2 Análisis de la expresión de genes mediante qPCR

Mediante esta técnica, se analizaron los niveles de expresión de *IYO* y de *RIMA* en las líneas ARNi generadas. El ADNc se diluyó a 20 ng/μlitro para cada una de las muestras. Se diseñaron cebadores específicos para cada caso (ver Tabla 3) y se utilizó el sistema EVA GREEN® PCR Máster Mix (ROX). Se hicieron tres réplicas técnicas de cada muestra en la misma placa. Por último, la cuantificación relativa de la expresión de estos dos genes se determinó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Así, se obtuvieron los fold changes de la expresión de *IYO* y de *RIMA*, normalizada con respecto a un gen de control interno (PP2A) y relativo a una línea calibradora.

### 3.6.3 Tratamientos y secuenciación masiva

Plantas Col-0, *IYOi* L9.1 y *RIMAi* L6.2 crecidas en líquido durante 9 días se trataron con DEX 40 μM o con una cantidad equivalente de DMSO y se recogieron 48 h después. Por cada genotipo y tratamiento se obtuvieron 3 muestras biológicas independientes, cada una de las cuales era una mezcla de dos experimentos independientes para cada uno de los genotipos y tratamientos (18 muestras en total). Se obtuvieron extractos totales de ARN tratados con ADNasa de las 18 muestras y se enviaron a la empresa NovoGene para su secuenciación. Se obtuvieron >20 millones de lecturas *paired end* de 150 bp por librería secuenciada (<6 Gb de secuencia por muestra).

## 3.7 Chip-seq

Se recogieron 4 g de plántulas Col-0 de 8 días crecidas en placas verticales sobre una red de nylon y se fijaron en 1% formaldehído infiltrando al vacío durante 15 minutos. Se añadió glicina (concentración final 125 mM) y después de mezclar la solución se volvieron a infiltrar las muestras durante 5 min al vacío. Tras lavarlas exhaustivamente las muestras se congelaron en nitrógeno líquido. Se purificaron los núcleos de las

muestras, se extrajo la cromatina en tampón de lisis y se sonicó hasta un tamaño medio de entre 200-300 bp. La cromatina sonicada se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-RIMA o con suero preinmune del mismo conejo. Después de comprobar por Western Blot que la inmunoprecipitación había sido eficiente se enviaron dos muestras independientes de cada inmunoprecipitación a secuenciar al servicio de genómica del CRAG. Las secuencias obtenidas las mapeamos al genoma de Arabidopsis (TAIR10) con el programa Bowtie2 del servidor Usegalaxy. La búsqueda de regiones enriquecidas en la muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-RIMA relativamente al suero preinmune se hizo con la aplicación MACS2 callpeak.

### **3.8 Secuestro con nanoanticuerpos frente a GFP**

La línea transgénica *PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* fue cedida por el Dr. Van Damme (Winkler et al., 2021) y se cruzó con el mutante *iy0-2* complementado con *pIYO:IYO-GFP* y con el mutante *rima-1* complementado con *pRIMA:RIMA-GFP*, obteniéndose en la F2 las plantas analizadas en esta tesis.

### **3.9 Aplicaciones Bioinformáticas**

Listado de servidores utilizados durante esta tesis

ACT: <https://www.michalopoulos.net/act/>

ATTED- II: <https://atted.jp>

BioGrid: <https://thebiogrid.org>

Bowtie2: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>

David: <https://david.ncifcrf.gov>

FIESTA viewer: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA/index.php>

Galaxy: <https://usegalaxy.org>

GORilla: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>

IGV: <https://software.broadinstitute.org/software/igv>

ImageJ: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>

MACS2: <https://github.com/macs3-project/MACS>

NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NEBaseChanger: <https://nebasechanger.neb.com>

OligoCalc: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

PlantTFDB: <http://planttfdb.gao-lab.org>

ShinyGO: <http://bioinformatics.sdstate.edu/go>

TAIR: <https://www.arabidopsis.org>

ThaleMine: <https://bar.utoronto.ca/thalemine/begin.do>

UniProt: <https://www.uniprot.org>

Yeastgenome database: <https://www.yeastgenome.org>

<b>Clon</b>	<b>Nombre Gen</b>	<b>Vector</b>
G09114	CDK9/CDKC2	pEntr223
G14631	PPM1B	pEntr223
G13318	ADA2B	pEntr223
G14590	SWN/SDG10	pEntr223
G15315	LEO1/VIP4	pEntr223
G16295	GCN5/HAG1	pEntr223
G16388	CYP71	pEntr223
G16885	BRE1/HUB1	pEntr223
G20920	ELO4/DRI1	pEntr223
G21075	ELO1/ELP	pEntr223
G82162	CYPRS64	pEntr223
G87386	NELF/ RBP45A	pEntr223
GC104882	NUP53/MPPN	pEntr223
GC104790	RBR1	pEntr223
GC104978	DDB1A	pEntr223
U16887	MSI1	pEntr-SD-TOPO
U25121	APC8	pEntr-SD-TOPO
PYAT5G06110	ZRF1/GLSA2	pEntr-SD-TOPO
U61682	MAD2	pEntr-SD-TOPO
UNK001	MED19	pGBW6
U86559	MED18	pUNI51

**Tabla 1. Vectores obtenidos de stock center para los ensayos Y2H.**

IYO GWF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAGTTCACCTCATCTCT TGAC	Exon8 82-540 nt ARNi (pOpOff2)
IYO GWR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AACCAC	Exon8 82-540 nt ARNi (pOpOff2)
RIMA GWF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCAAAGGATAATGAA GCAATC	Exon1 3-429 nt ARNi (pOpOff2)
RIMA GWR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTACATCCAAAG AACC	Exon1 3-429 nt ARNi (pOpOff2)
IYO XhoI F	GTCAATCTCGAGCAGCATAGCACAACTAAGGA	Exon2 21-455 nt ARNi (pTA7002)
IYO EcoRI R	AGTAGAGAATTCACCTTTCAAGAGACGAAGACG	Exon2 21-455 nt ARNi (pTA7002)
IYO XbaI F	AGAAAGTCTAGACAGCATAGCACAACTAAGGA	Exon2 21-455 nt ARNi (pTA7002)
IYO HindIII R	AACTATAAGCTTCACCTTTCAAGAGACGAAGACG	Exon2 21-455 nt ARNi (pTA7002)
RIMA XhoI F	GACATACTCGAGGATGAGATGGGTCTTGCGAGT	Exon4 45-390 nt ARNi (pTA7002)
RIMA EcoRI R	AGTAAGGAATTC TAAGGCATGATTTAGTGACGA	Exon4 45-390 nt ARNi (pTA7002)
RIMA XbaI F	AGAAAGTCTAGAGATGAGATGGGTCTTGCGAGT	Exon4 45-390 nt ARNi (pTA7002)
RIMA HindIII R	AACAATAAGCTTTAAGGCATGATTTAGTGACGA	Exon4 45-390 nt ARNi (pTA7002)
TOPP3 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatggaagatagtgtgtgga	CDS TOPP3 (Gateway)
TOPP3 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtcagcctttccaccacc	CDS TOPP3 (Gateway)
TOPP4 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatggcgacgacgacgacgac	CDS TOPP4 (Gateway)
TOPP4 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcctaaatctttggacatca	CDS TOPP4 (Gateway)
TOPP6 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatggatcctgtactttaaac	CDS TOPP6 (Gateway)
TOPP6 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtcagttgtattcttcaattttg	CDS TOPP6 (Gateway)
TOPP7 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatggatgagactttacttgac	CDS TOPP7 (Gateway)
TOPP7 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTttaacgacctttccacc	CDS TOPP7 (Gateway)
TCP1 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgtcgtctccaccaatg	CDS TCP1 (Gateway)
TCP1 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTctagtttacaaaagagtcttg	CDS TCP1 (Gateway)
TCP14 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgcaaaagccaacatcaag	CDS TCP14 (Gateway)
TCP14 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcctaattctgctgatcctcctc	CDS TCP14 (Gateway)
TCP15 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatggatccggatccggatc	CDS TCP15 (Gateway)
TCP15 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTctaggaatgatgactgtgc	CDS TCP15 (Gateway)
TCP18 CDS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgaacaacaacattttcag	CDS TCP18 (Gateway)

TCP18 CDS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCtcaatacatgtttgatagttg	CDS TCP18 (Gateway)
RIMA delPP1 F	GAAGCTTAGTGGCCGATCAGAATGATGGCCTG	RIMA ΔRSVTW (In-fusión)
RIMA delPP1 F	CTGATCGGCCACTAAGCTTCTTCGAGCCAG	RIMA ΔRSVTW (In-fusión)
RIMA mutPP1 F	AGTCGTTTCAGATACTTGGGGCCGATCAG	RIMA V430D (In-fusión)
RIMA mutPP1 F	CCCAAGTATCTGAACGACTAAGCTTC	RIMA V430D (In-fusión)

**Tabla 2. Cebadores empleados para le generación de construcciones.** El color naranja indica colas para la clonación en vectores *Gateway*. Los colores rojo y verde indican las dianas de las respectivas enzimas de restricción. F= directo, R= reverso, Frag= fragmento, nt= nucleótidos.

IYO qPCR 2/2 F	GATAGCCGAGGAAGGGGTCAG	158 bp amplicón
IYO qPCR 2/2 R	AGTGTGGAGGTAGGGGCATTCT	158 bp amplicón
qPCR RIMA3F	CCACCGCAAACCAAGCAAGC	119 bp amplicón
qPCR RIMA3R	CTCACGACGAAATCTCGAAAC	119 bp amplicón
PP2AA3-F	TAACGTGGCCAAAATGATGC	61 bp amplicón
PP2AA3-R	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	61 bp amplicón

**Tabla 3. Cebadores empleados para las qPCR**

## **RESULTADOS**

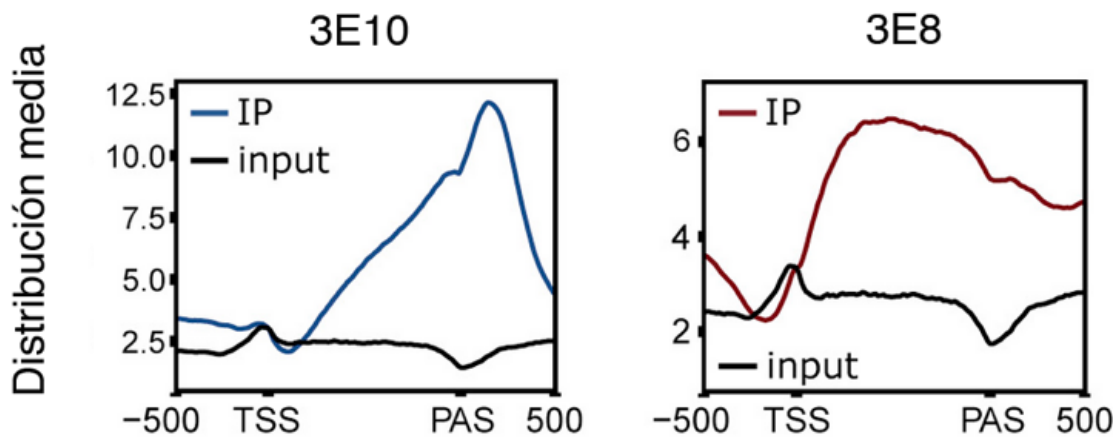
## **4. RESULTADOS**

Datos previos a esta tesis indican que la actividad pro-diferenciación del complejo IYO/RIMA tiene lugar en el núcleo. Sin embargo, se desconocen las funciones moleculares de IYO y RIMA y cómo activan la diferenciación celular. Si bien se ha propuesto que IYO y RIMA participan, respectivamente, en el ensamblaje e importe al núcleo de la Pol II, también hay evidencias de que ambas proteínas regulan directamente la transcripción y que esta actividad subyace a su función en la iniciación de la diferenciación celular. En esta tesis planteamos explorar como hipótesis de partida que IYO y RIMA efectivamente regulan directamente a la Pol II durante la transcripción, buscando evidencias en este sentido y caracterizando posibles actividades moleculares y dianas transcripcionales de ambas proteínas.

### **4.1 IYO promueve la transición a elongación productiva de la Pol II asociada a RIMA**

El CTD de la Pol II se fosforila durante la transcripción y se defosforila una vez terminada para disociarse del ADN e iniciar una nueva ronda de transcripción (Mayfield et al., 2016). Las formas transcripcionalmente activa (forma hiperfosforilada, Ilo) e inactiva (forma hipofosforilada, IIa) se pueden distinguir en ensayos de tipo western por su distinta movilidad, que es mayor para la forma hipofosforilada, y con anticuerpos específicos para distintas fosforilaciones del CTD (Corden 2013). De esta manera, se ha podido comprobar que RTR1 de levaduras y RPAP2 de animales se unen a la forma hiperfosforilada de la Pol II (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Wani et al., 2014; Ni et al. 2014) lo que constituye un indicio muy claro de que están asociadas a la Pol II durante la transcripción. Para testar si RIMA mantiene esta interacción en plantas, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de RIMA y analizamos la presencia de

distintas formas de la Pol II en las fracciones inmunoprecipitadas con los anticuerpos monoclonales 8WG16, que reconoce heptapéptidos del CTD sin modificar o que no estén fosforilados a la vez en serina 2 y serina 5, con 3E10, que reconoce heptapéptidos fosforilados en serina 2 pero sólo si la serina 5 del mismo heptapéptido no está fosforilada, y con 3E8 que reconoce heptapéptidos fosforilados en serina 5 (Chapman et al., 2007). En consonancia con esta especificidad, la Pol II reconocida por 3E10 está asociada al cuerpo de los genes, incrementándose rápidamente tras el sitio de inicio de la transcripción y manteniéndose constante en el cuerpo de los genes hasta empezar a disminuir en el extremo 3' de los transcritos, mientras que la Pol II reconocida por 3E8 aumenta su asociación progresivamente desde el TSS hasta el extremo 3', alcanzando el pico en el 3'UTR pasado el sitio de poliadenilación (Kecman et al., 2018).



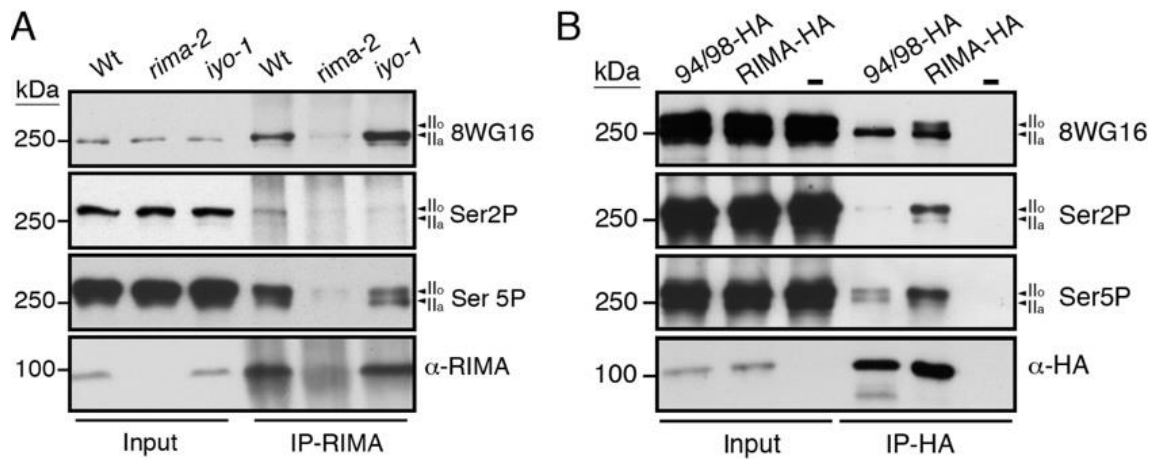
Adaptado de Kecman et al., Cell Reports 2018

**Figura 1. Ocupación media de la Pol II reconocida por los anticuerpos 3E8 y 3E10 en la cromatina de *Schizosaccharomyces pombe*.** Adaptado de Kecman et al., 2018.

RIMA co-precipita con Pol II en extractos de plantas de tipo silvestre (Wt, Figura 1A), lo que concuerda con la interacción entre RIMA y Pol II detectada en experimentos de dos híbridos (Chen et al., 2021) y de inmunoprecipitación y espectrometría de masas (Carmen

García, TFM). Además, estos ensayos muestran que RIMA se une tanto a la forma hipofosforilada (IIa, Figura 1A) como a la forma hiperfosforilada (IIo, Figura 1A), sugiriendo que RIMA interactúa con la Pol II antes y después de iniciar la transcripción. En estos ensayos también analizamos la interacción de RIMA con Pol II en los mutantes *rima-2* e *iy0-1*. En los extractos de *rima-2* se inmunoprecipita mucha menos proteína RIMA, consistente con los bajos niveles de expresión de la proteína completa en este mutante (Figura 2A). Además, los niveles de Pol II co-precipitada disminuyen proporcionalmente, demostrando que estos ensayos de co-precipitación son específicos y reflejan fielmente la interacción entre RIMA y Pol II. En los extractos del mutante *iy0-1*, se altera el patrón de fosforilación de la Pol II asociada con RIMA, aumentando la cantidad de Pol II hipofosforilada reconocida por el anticuerpo 8WG16 que inmunoprecipita con RIMA y disminuyendo la de la forma hiperfosforilada reconocida por los anticuerpos 3E8 y 3E10. Además, esto coincide con la co-precipitación de una nueva forma de Pol II de migración similar a la forma hipofosforilada, pero reconocida también por el anticuerpo 3E8. Estos resultados indican que, si se interfiere con la actividad de *IYO*, aumenta la interacción de RIMA con una Pol II con bajos niveles de fosforilación, pero fosforilada en serina 5, lo que correspondería a una polimerasa cercana al TSS iniciando la transcripción. Además, la inhibición de *IYO* disminuye la interacción de RIMA con una Pol II hiperfosforilada en serina 5 y serina 2 que correspondería con la polimerasa en elongación. Por tanto, *IYO* podría ser necesario para que la polimerasa asociada a RIMA haga la transición de la iniciación a la fase de elongación productiva. Seguidamente, estudiamos el efecto sobre la asociación con Pol II de mutaciones en el dedo de zinc de RIMA (C94A/C98A) que impiden su interacción con *IYO* (Muñoz et al., 2017). Para ello generamos líneas transgénicas que sobreexpresan bajo un promotor inducible por estradiol versiones etiquetadas con HA de RIMA silvestre (RIMA-HA) y

del mutante RIMA C94A/C98A (94/98-HA). Como se muestra en la Figura 2B, en inmunoprecipitaciones con anticuerpo frente a HA, la Pol II hipo e hiperfosforilada co-precipita con RIMA-HA, mientras que no co-precipita en los controles negativos (extractos de plantas sin transformar), demostrando de nuevo que estos ensayos reflejan la interacción específica entre RIMA y Pol II. La proteína 94/98-HA mantiene la interacción con Pol II hipofosforilada, pero se reduce muy drásticamente la interacción con la forma hiperfosforilada en serina 2 y serina 5. De nuevo, esta bajada coincide con la aparición de una nueva forma de migración similar a la forma hipofosforilada, pero reconocida también por el anticuerpo 3E8 (Figura 2B). Estos datos sugieren que la interacción con IYO es necesaria para que la polimerasa asociada a RIMA progrese de la iniciación a elongación productiva. Conjuntamente, los resultados obtenidos apoyan fuertemente que IYO y RIMA regulan coordinadamente la actividad de la Pol II durante la transcripción, promoviendo la transición a la fase de elongación.



**Figura 2. RIMA interacta con la Pol II hiperfosforilada de una forma dependiente de IYO.** (A) Extractos de plántulas Wt, *rima-2* e *iyo-1* de 10 días se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a RIMA ( $\alpha$ -RIMA). Las fracciones del input e inmunoprecipitación (IP-RIMA) se analizaron por western con  $\alpha$ -RIMA, 8WG16, 3E10 (Ser2P) y 3E8 (Ser5P). (B) Extractos de plántulas sin transformar (-) o de líneas transgénicas que expresan RIMA (RIMA-HA) o C94A/C98A RIMA (94/98-HA) etiquetadas con el epítipo HA y bajo un promotor inducible por estradiol, crecidas en cultivo líquido y tratadas con 20  $\mu$ M de estradiol durante 16h. Los extractos se inmunoprecipitaron con anti-HA ( $\alpha$ -HA) y las fracciones del input e inmunoprecipitación (IP-RIMA) (IP-HA) se analizaron por western con  $\alpha$ -HA, 8WG16, 3E10 (Ser2P) y 3E8 (Ser5P). Ilo: Forma hiperfosforilada de la Pol II; Ila: Forma hipofosforilada de la Pol II

#### 4.2 Identificación de interactores de IYO y RIMA implicados en transcripción

Para profundizar en el análisis funcional de IYO y RIMA, realizamos un ensayo dirigido de dos híbridos para identificar interactores. Se eligieron genes candidato con funciones relacionadas con la transcripción, usando como filtro que estuviesen co-expresados con *IYO* y *RIMA* o que interaccionasen con ortólogos de *IYO* y *RIMA* (Tabla 4). Para el ensayo de doble híbrido (Y2H por sus siglas en inglés) se usó la cepa AH109 (Fields y Song, 1989). El ADNc de los genes candidato fue clonado mediante el sistema *Gateway* en los plásmidos pGBKT7 para fusiones al dominio de unión al ADN (BD) y pGADT7 para fusiones al dominio de activación (AD). Como controles negativos se usaron los vectores vacíos y como control positivo de interacción se utilizó la combinación BD-IYO y AD-RIMA.

Proteína	AGI	Co-exp IYO	Co-exp RIMA	Evidencia previa de interacción
MED18	AT2G22370		✓	Interacción física con RPAP2
MED19	AT5G12230	✓	✓	Interacción física con IYO
APC8	AT3G48150	✓	✓	
RBP45A	AT5G54900	✓	✓	Interacción física con RPAP2
ADA2B	AT4G16420	✓		Interacción física con RPAP1 y RTR1
NUP53	AT3G16310	✓	✓	
ELO1	AT3G11220			Interacción genética con IYO
CDK9	AT5G64960	✓		
DDB1A	AT4G05420	✓		
RBR	AT3G12280	✓	✓	
GCN5/HAG1	AT3G54610		✓	Interacción física con RBA50
LEO1/VIP4	AT5G61150	✓	✓	
CYP71	AT3G44600	✓	✓	
PPM1B	AT4G31860			Interacción física con RPAP2
SWN/SDG10	AT4G02020	✓	✓	
BRE1/HUB1	AT2G44950	✓	✓	
ELO4/DRL1	AT1G13870			Interacción genética con IYO
CYPR564	AT3G63400	✓	✓	
MSI1	AT5G58230	✓	✓	
ZRF1	AT5G06110	✓		
MAD2	AT3G25980			Interacción física con IYO
TOPP3	AT1G64040			Interacción física con RPAP1 y RPAP2
TOPP4	AT2G39840			Interacción física con RPAP1 y RPAP2
TOPP6	AT5G43380			Interacción física con RPAP1 y RPAP2
TOPP7	AT4G11240	✓		Interacción física con RPAP1 y RPAP2

**Tabla 4. Candidatos a interactores de IYO y RIMA.** Se indica si los genes se co-expresan significativamente con IYO y RIMA (base de datos ACT) y si hay evidencias previas de interacción con IYO y RIMA o sus ortólogos

Para testar la interacción con IYO se usó como cebo la proteína completa y dos fragmentos de la proteína, desde el ATG inicial al aminoácido 978 (IYOATG978) y desde el aminoácido 979 hasta el final de la proteína (IYO979REV). Se detectó interacción de Y2H entre la proteína completa IYO y las proteínas ADA2B, APC8, RBP45A y MED18 (Tabla 5). En cambio, no se detectó interacción de ninguno de los candidatos testados con las versiones truncadas de IYO. La interacción de IYO con ADA2B, APC8, RBP45A y MED18 se perdía en presencia de 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT), sugiriendo que la

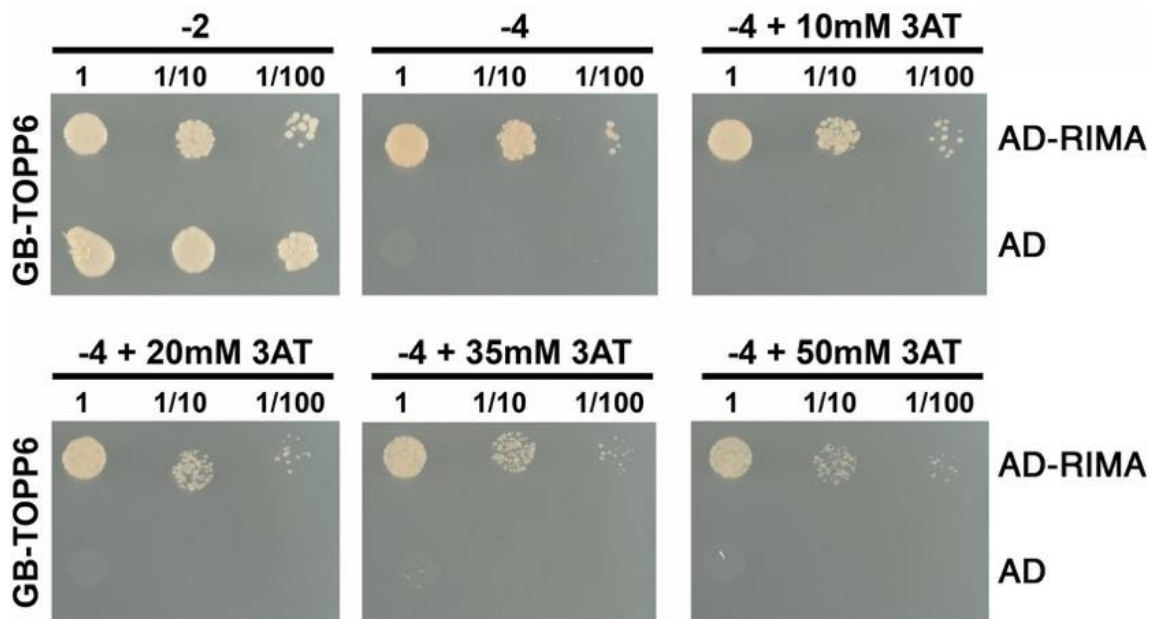
activación de los genes de selección es baja y que posiblemente sean interacciones débiles. En el caso de RIMA, los genes candidato fueron testados con la secuencia completa de la proteína fusionada al dominio de activación (AD-RIMA) ya que al fusionar RIMA al dominio de unión al ADN (BD-RIMA) se observaba autoactivación basal. Los ensayos de Y2H revelaron la interacción de RIMA con NUP53, ELO1, GCN5, LEO1 (Tabla 5). ADA2B y GCN5 son subunidades del módulo histona acetiltransferasa del complejo SAGA que modifica la cromatina para activar la transcripción de genes (Vlachonasios et al., 2021). MED18 es una subunidad del complejo Mediator que es esencial para iniciar la transcripción (Schier y Taatjes, 2021) y LEO1 es una subunidad del complejo PAF1 que promueve la elongación transcripcional y también participa en la terminación, corte y poliadenilación de los transcritos (Francette et al., 2021). La interacción con estos reguladores centrales de la transcripción apoya fuertemente la hipótesis de que IYO y RIMA participan directamente en la transcripción e identifica posibles efectores y funciones moleculares que serán exploradas en el futuro.

BD-Presa	Interacción AD-RIMA		AD-Presa	Interacción BD-IYO
NUP53	SI		NUP53	NO
ELO1	SI		ELO1	NO
MED19	NO		MED19	NO
CDK9	SI		CDK9	NO
DDB1A	NO		DDB1A	NO
RBR1	NO		RBR1	NO
GCN5/HAG1	SI		GCN5/HAG1	NO
LEO1/VIP4	SI		LEO1/VIP4	NO
CYP71	NO		CYP71	NO
PPM1B	NO		PPM1B	NO
ADA2B	NO		ADA2B	SI
SWN	no probado		SWN	NO
BRE1	no probado		BRE1	NO
ELO4	NO		ELO4	NO
CYPR564	no probado		CYPR564	NO
RBP45A	no probado		RBP45A	SI
MSI1	no probado		MSI1	NO
APC8	no probado		APC8	SI
ZRF1	no probado		ZRF1	NO
MAD2	no probado		MAD2	NO
MED18	no probado		MED18	SI
TOPP3	SI		TOPP3	no probado
TOPP4	SI		TOPP4	no probado
TOPP6	SI		TOPP6	no probado
TOPP7	SI		TOPP7	no probado

**Tabla 5. Resultados de ensayos de dos híbridos.** En verde se muestran los genes que han dado interacción positiva con BD-IYO o con AD-RIMA mediante la técnica de Y2H y en rojo los que no mostraron interacción.

#### 4.3 Identificación de un dominio de interacción con PP1 en la proteína RIMA

En los ensayos de dos híbridos detectamos también la interacción de RIMA con las fosfatasa TOPP3, TOPP4, TOPP6 y TOPP7 (Tabla 2, Figuras 3-4, Figura 7), que son fosfatasa del tipo PP1. La interacción de RIMA con las fosfatasa TOPP se mantiene en condiciones restrictivas con concentraciones altas del inhibidor competitivo 3AT (Figura 3), lo que indica que la interacción es fuerte.

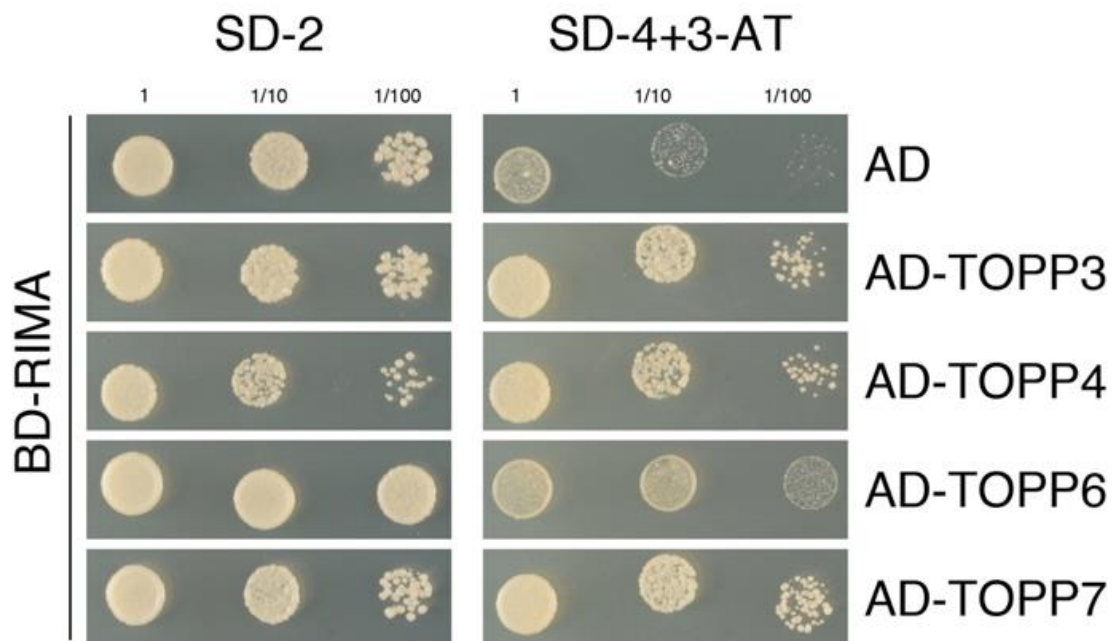


**Figura 3. Interacción de dos híbridos entre RIMA y TOPP6.** La interacción entre RIMA y TOPP6 se mantiene en presencia de altas concentraciones del inhibidor competitivo 3AT.

Se ha descrito que las PP1 tienen como sustrato a la RPB1 y a factores que se asociarían con la Pol II durante la transcripción. En particular, se ha demostrado el papel crucial de las PP1 en la terminación de la transcripción, desfosforilando el CTD y al factor de elongación SPT5, para ralentizar a la polimerasa y reclutar factores de poliadenilación y corte del transcrito (Schreieck et al., 2014; Parua et al., 2018; Kecman et al., 2018). La interacción de RIMA con fosfatasas que defosforilan el CTD resulta especialmente interesante dada la controversia en torno a la actividad fosfatasa de RTR1/RPAP2 que aún no está resuelta (Mosley et al., 2009; Xiang et al., 2012; Hsu et al., 2014; Ni et al., 2014; Irani et al., 2016; Chen et al., 2021; Fianu et al., 2021). Esta interacción podría explicar la actividad fosfatasa detectada *in vitro* para las proteínas RTR1 y RPAP2, que no poseen un sitio catalítico de fosfatasa canónico (Xiang et al., 2012; Irani et al., 2016). De hecho, en ensayos *in vitro* con RTR1/RPAP2 expresadas de forma recombinante en

*Escherichia coli* o en células de insectos se detecta una actividad fosfatasa muy reducida (Mosley et al., 2009; Hsu et al., 2014; Ni et al., 2014; Irani et al., 2016) que puede corresponder a la co-purificación con baja eficiencia de proteínas homologas a PP1 presentes en esos organismos (Kerk et al., 2021).

Para confirmar la interacciones de RIMA con las proteínas TOPP, realizamos ensayos de dos híbridos con las fusiones recíprocas de RIMA con el BD y las TOPPs con el AD. Aunque RIMA-BD autoactiva los promotores de selección y las levaduras crecen incluso con el vector AD vacío, se detectaba un claro incremento en el crecimiento cuando se combinaba con las construcciones AD-TOPP (Figura 4), demostrando que las proteínas interactúan en el sistema de dos híbridos.

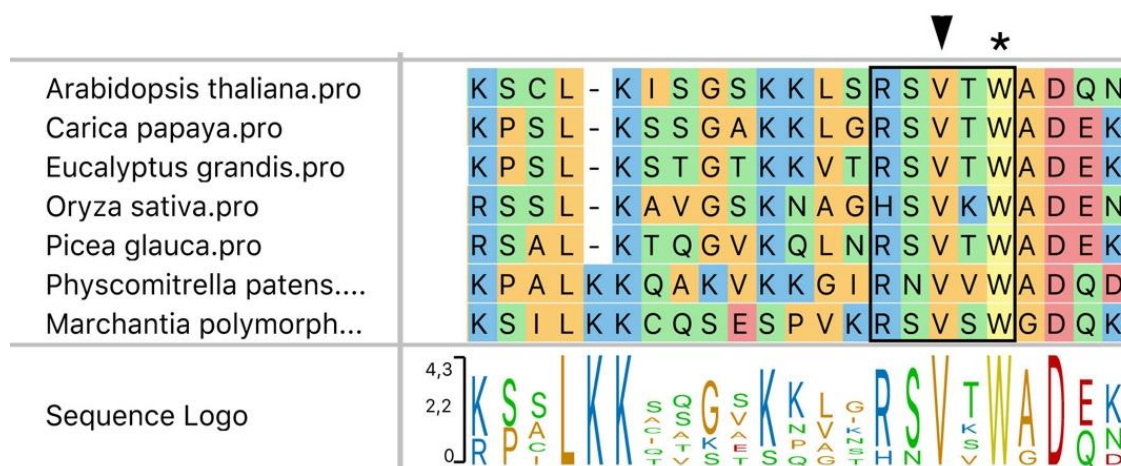


**Figura 4. Interacción con TOPPs usando BD-RIMA como cebo.** Se muestra el crecimiento de levaduras expresando las proteínas señaladas en los paneles en medio SD-2 y en medio selectivo SD-4 suplementado con 10 mM 3AT.

Para corroborar estos datos de interacción de una forma independiente, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación con muestras de plantas de *Nicotiana benthamiana* expresando transitoriamente RIMA fusionado a HA y las proteínas TOPP fusionadas a GFP. Las proteínas TOPP3, TOPP4, TOPP6 y TOPP7 fusionadas a GFP se localizan en el citosol y en el núcleo (Figura 5A), que son los compartimentos en los que se encuentra RIMA (Muñoz et al., 2017), lo que es por tanto compatible con su interacción *in vivo*. Para testar esta interacción, inmunoprecipitamos extractos de *Nicotiana benthamiana* con un anticuerpo frente a GFP y analizamos la co-precipitación de RIMA-HA por ensayos de western blot. Estos ensayos mostraron que RIMA-HA co-precipita con TOPP3, TOPP4, TOPP6 y TOPP7 fusionadas a GFP (Figura 5B), apoyando la conclusión que estas proteínas interactúan *in vivo*.



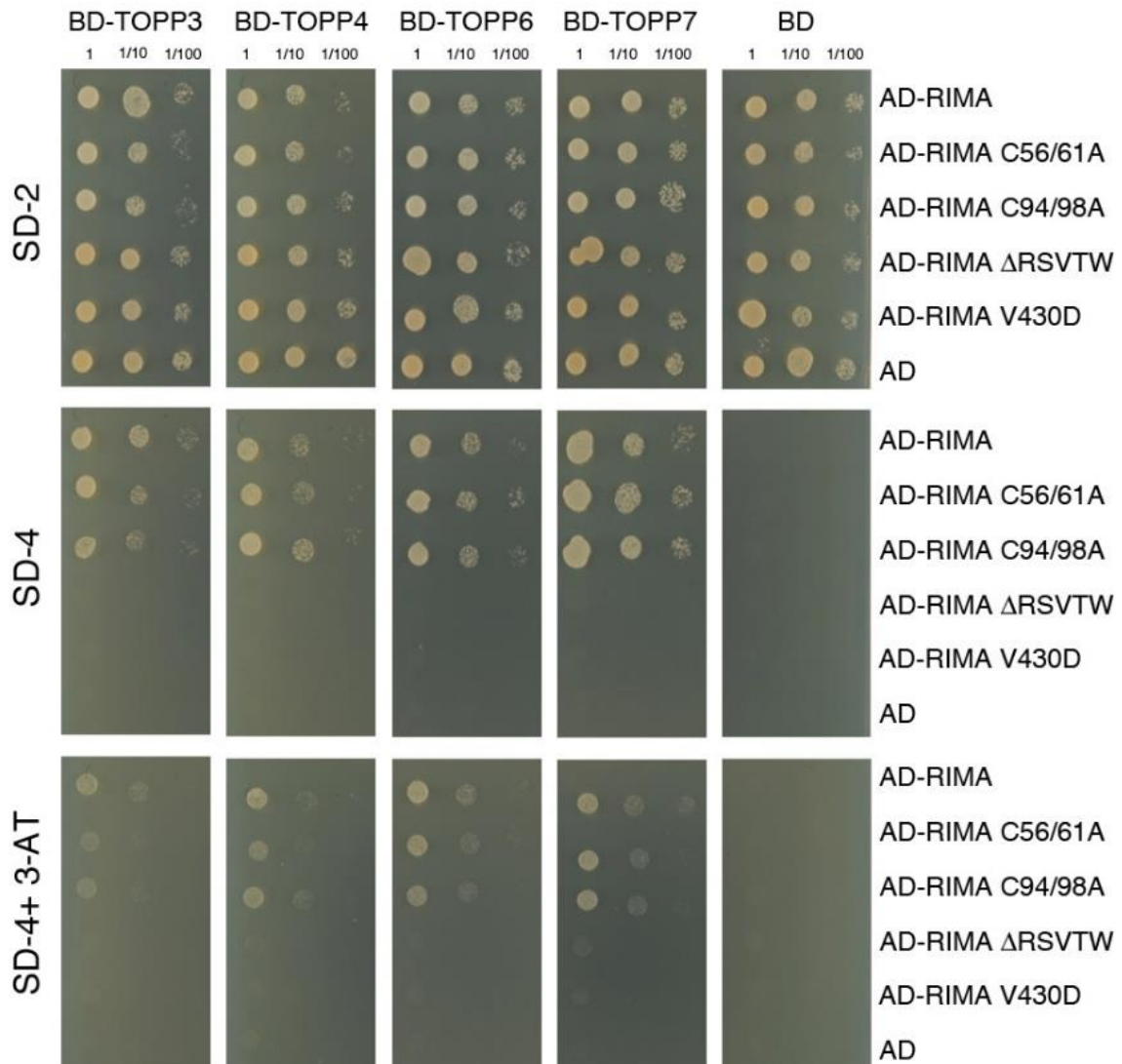
ortólogos de RIMA y en especial los dos residuos que serían fundamentales para la interacción con PP1s, la valina invariante en posición 3 (V430 en RIMA de *Arabidopsis*) y el triptófano en posición 5 (W432 en RIMA de *Arabidopsis*), que están estrictamente conservados en todos los ortólogos de plantas (Figura 6), lo cual indica su relevancia funcional.



**Figura 6. Alineamiento del motivo potencial de unión a PP1 de los ortólogos de RIMA en plantas.** El posible motivo de unión a PP1 aparece recuadrado. La valina 430 y el triptófano 432 de RIMA de *Arabidopsis thaliana* se indican con una punta de flecha y un asterisco, respetivamente. Los aminoácidos básicos de la secuencia que precede al motivo de unión a PP1 están resaltados en azul. Las especies de las que proceden las secuencias están señaladas en el lateral.

Para determinar si este motivo es importante para la interacción con PP1s, generamos dos versiones mutantes, una en la que sustituimos la valina 430 por aspártico (RIMAV430D) y otra en la que eliminamos el motivo RSVTW completo (RIMA $\Delta$ RSVTW). Ensayos de doble híbrido mostraron que estas dos mutaciones bloquean completamente la interacción de RIMA con las fosfatasa PP1, mientras que mutaciones en las cisteínas del dedo de zinc (RIMA C56/61A y RIMA C94/98A) que bloquean la interacción con IYO (Muñoz et al., 2017) no afectan a la interacción con las PP1 (Figura 7). Estos resultados apoyan

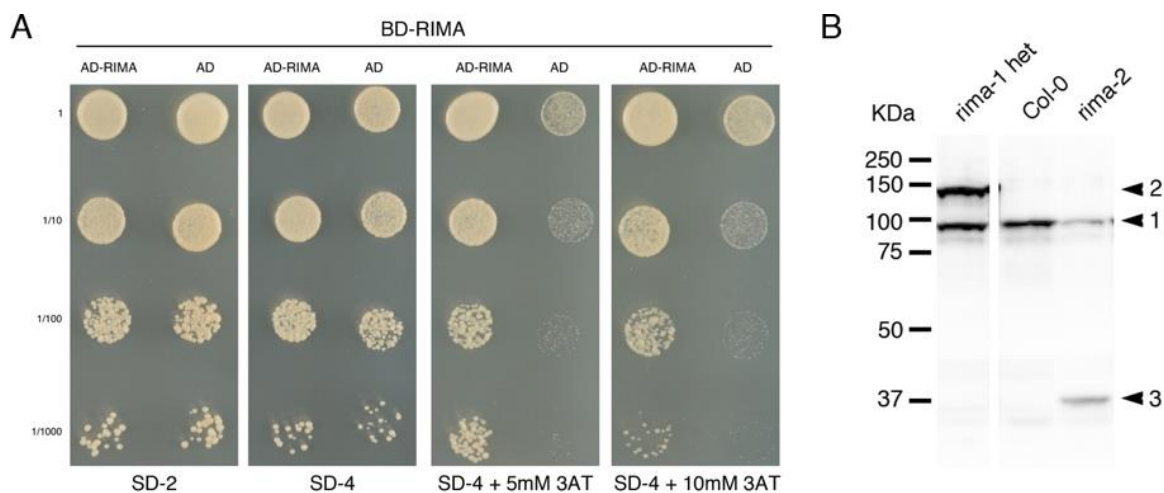
la relevancia del motivo identificado en la interacción con PP1s y en particular de la valina  
430.



**Figura 7. El motivo RSVTW es necesario para la interacción con fosfatasa de tipo PP1.** Se muestra el crecimiento de levaduras expresando las proteínas señaladas en los paneles en medio SD-2, en medio selectivo SD-4 y en medio SD-4 suplementado con 10 mM 3AT.

Para analizar la relevancia *in vivo* de el motivo de unión a PP1, generamos construcciones con las versiones mutadas *RIMAV430D* y *RIMAΔRSVTW* bajo el control del promotor de *RIMA* y transformamos plantas heterocigotas para el alelo *rima-1*, que es letal embrionario en homocigosis (Muñoz et al., 2017). En la T2 obtuvimos plantas

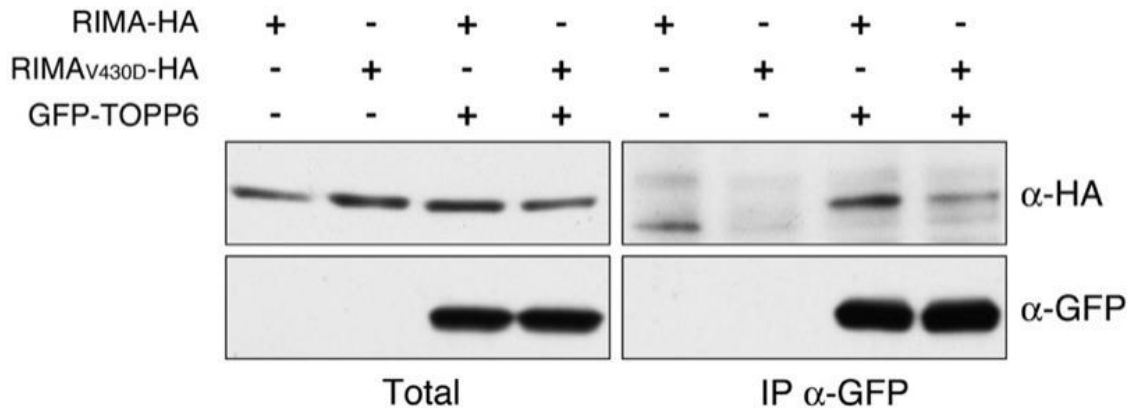
homocigotas para *rima-1* que eran transgénicas para *pRIMA:RIMAV430D* o *pRIMA:RIMAΔRSVTW* y tenían un desarrollo similar al de plantas silvestres, pero nunca obtuvimos plantas homocigotas *rima-1* sin transgen. Estos datos indican que las construcciones mutadas complementan los fenotipos causados por la mutación *rima-1* y en particular la letalidad embrionaria, unos resultados muy sorprendentes teniendo en cuenta la conservación evolutiva del dominio y su función en la interacción con PP1. Una posible explicación de estos resultados es que exista un fenómeno de transcomplementación entre las proteínas mutadas en el dominio de unión a PP1 y el alelo *rima-1*. La transcomplementación es más probable en proteínas que homodimerizan de tal manera que cada alelo puede aportar la función que le falta al otro. En este sentido, comprobamos que RIMA interacciona consigo misma en ensayos de dos híbridos (Figura 8A), lo cual apoya la posibilidad de la transcomplementación. Además, en extractos de proteínas de plantas heterocigotas *rima-1* se detecta una banda adicional de mayor tamaño reconocida por el anticuerpo anti-RIMA (Figura 8B), indicando que el alelo *rima-1* dirige la síntesis de una proteína quimérica, a niveles parecidos al de la proteína RIMA silvestre. Por tanto, el alelo *rima-1* podría generar una proteína disfuncional, pero con el dominio de unión a PP1 intacto, que se transcomplementase con las construcciones mutantes, a las que solo les falta ese dominio.



**Figura 8. RIMA autointeracciona en ensayos de dos híbridos.** (A) Se muestra el crecimiento de levaduras expresando las proteínas señaladas en los paneles en medio SD-2 y en medio selectivo SD-4 suplementado con distintas concentraciones de 3AT. (B) Análisis por western blot con anticuerpo anti-RIMA de muestras de proteínas totales de plantas Col-0, de plantas homocigotas *rima-2* y de plantas heterocigotas *rima-1*. Se indica la posición de la proteína RIMA silvestre (1) y de proteínas RIMA mutantes que se sintetizan a partir de los alelos *rima-1* (2) y *rima-2* (3).

En consonancia con la hipótesis de transcomplementación, cuando realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en *Nicotiana benthamiana*, comprobamos que la proteína RIMAV430D mantiene parcialmente la interacción con PP1s (Figura 9), mientras que en levaduras la interacción se suprime totalmente (Figura 7). Esto apoya la idea que existe transcomplementación entre la proteína RIMAV430D y la proteína RIMA endógena de *Nicotiana*. Estos datos por tanto abren la posibilidad de que el dominio de unión a PP1 sea esencial para la función de RIMA, pero que el alelo *rima-1* se transcomplemente con las versiones mutadas en este dominio. Para determinar inequívocamente si la función del dominio de unión a PP1 es fundamental para la función de RIMA, estamos generando construcciones de CRISPR-cas para eliminar el dominio en el gen endógeno. Si, tal como esperamos, estos alelos tienen un efecto fenotípico fuerte (p. ej. letalidad embrionaria),

se podrá testar la complementación con las construcciones mutadas, sin que el alelo mutante pueda aportar el dominio de unión a PP1.



**Figura 9. Efecto de la mutación V430D sobre la interacción de RIMA con TOPP6 en *Nicotiana benthamiana*.** Extractos totales de proteínas de *Nicotiana benthamiana* transformadas (+) con RIMA-HA o RIMAV430D-HA y GFP-TOPP6 se inmunoprecipitaron con anti-GFP (IP  $\alpha$ -GFP) y se analizaron por western blot con anticuerpos frente a HA ( $\alpha$ -HA) y a GFP ( $\alpha$ -GFP).

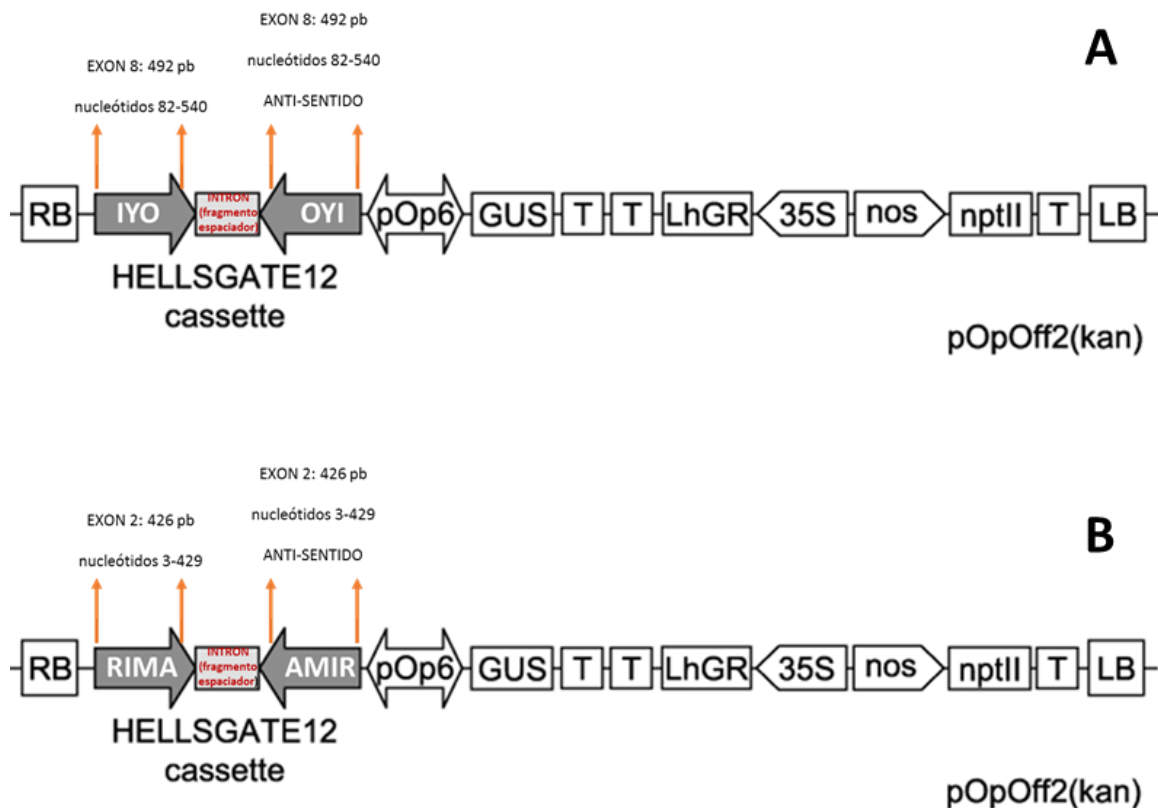
#### 4.4 Efecto del silenciamiento de *IYO* y *RIMA* en el transcriptoma

En anteriores estudios transcriptómicos de los mutantes *iyo-1* y *rima-2* y de una línea con sobreexpresión constitutiva de *IYO* (*35S:IYO-GFP*) se observó la desregulación de numerosos genes relacionados con el desarrollo (Sanmartín et al., 2011; Muñoz et al., 2017). Estos datos concuerdan con un posible papel de *IYO* y *RIMA* en regulación transcripcional de programas de diferenciación. Sin embargo, las líneas analizadas tenían muy alterada su morfología por lo que es difícil dilucidar qué genes podrían estar directamente regulados por *IYO* y *RIMA* y cuales están desregulados como efecto secundario de los cambios en el desarrollo. Para estudiar los efectos tempranos en el

transcriptoma de la disrupción de *IYO* y *RIMA* e intentar identificar dianas directas de estos genes, generamos líneas de silenciamiento inducible de *IYO* y *RIMA*.

#### *4.4.1 Generación de las construcciones para ARNi inducible*

Se clonaron fragmentos de 458 pb del octavo exón de *IYO* y de 426 pb del primer exón de *RIMA* en el vector de entrada pDONR207. Estas secuencias no tienen homología significativa con ningún otro gen de *Arabidopsis* por lo que el silenciamiento debería ser específico para *IYO* y *RIMA* (Chuang y Meyerowitz, 2000). Los fragmentos clonados se introdujeron en el cassette HELLSGATE del plásmido pOpOff2 en las dos orientaciones y separados por un intrón, que aumenta la eficacia del silenciamiento (Wielopolska et al., 2005). Esta construcción de ARNi está bajo el control del promotor pOp6 inducible por DEX, que también dirige la expresión del gen GUS, para testar en su caso los niveles de inducción en las líneas transgénicas (Figura 10). La inducción del promotor pOp6 se produce por la traslocación al núcleo inducida por DEX del factor transcripcional quimérico LhGR, que consiste en la fusión del dominio de unión a ADN del represor Lac, el dominio de activación de GAL4, y el dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoides. La secuencia reconocida por el represor Lac está repetida 6 veces en el promotor pOp6.



**Figura 10. Esquema de las construcciones de ARNi en el plásmido pOpOff2.** (A) Inserción de los fragmentos de ADNc clonados de IYO (nucleótidos del 82 al 540), en sentido y anti-sentido, separados por un intrón el cual aumenta la eficacia del silenciamiento. (B) Inserción de los fragmentos de ADNc clonados de RIMA (nucleótidos del 3 al 429), en sentido y anti-sentido, separados por el intrón espaciador. Adaptado de Wielopolska et al., 2005.

#### 4.4.2 Generación de líneas estables de ARNi

Se transformaron plantas *Arabidopsis* de la accesión Col-0 y se seleccionaron 13 líneas con la construcción de ARNi de IYO (*IYOi*) y 16 con la de *RIMA* (*RIMAi*), con una segregación en la T2 de 3:1 (plantas resistentes: plantas sensibles), indicativo de una única inserción del transgén. Varias líneas independientes presentaban en presencia de DEX un fenotipo similar al de los mutantes *iyol* y *rima-2*, mientras que sin DEX tenían un desarrollo similar al de las plantas silvestres. En medio con DEX, estas líneas mostraban un retraso en la emergencia de las hojas verdaderas y cuando emergían se desarrollaban

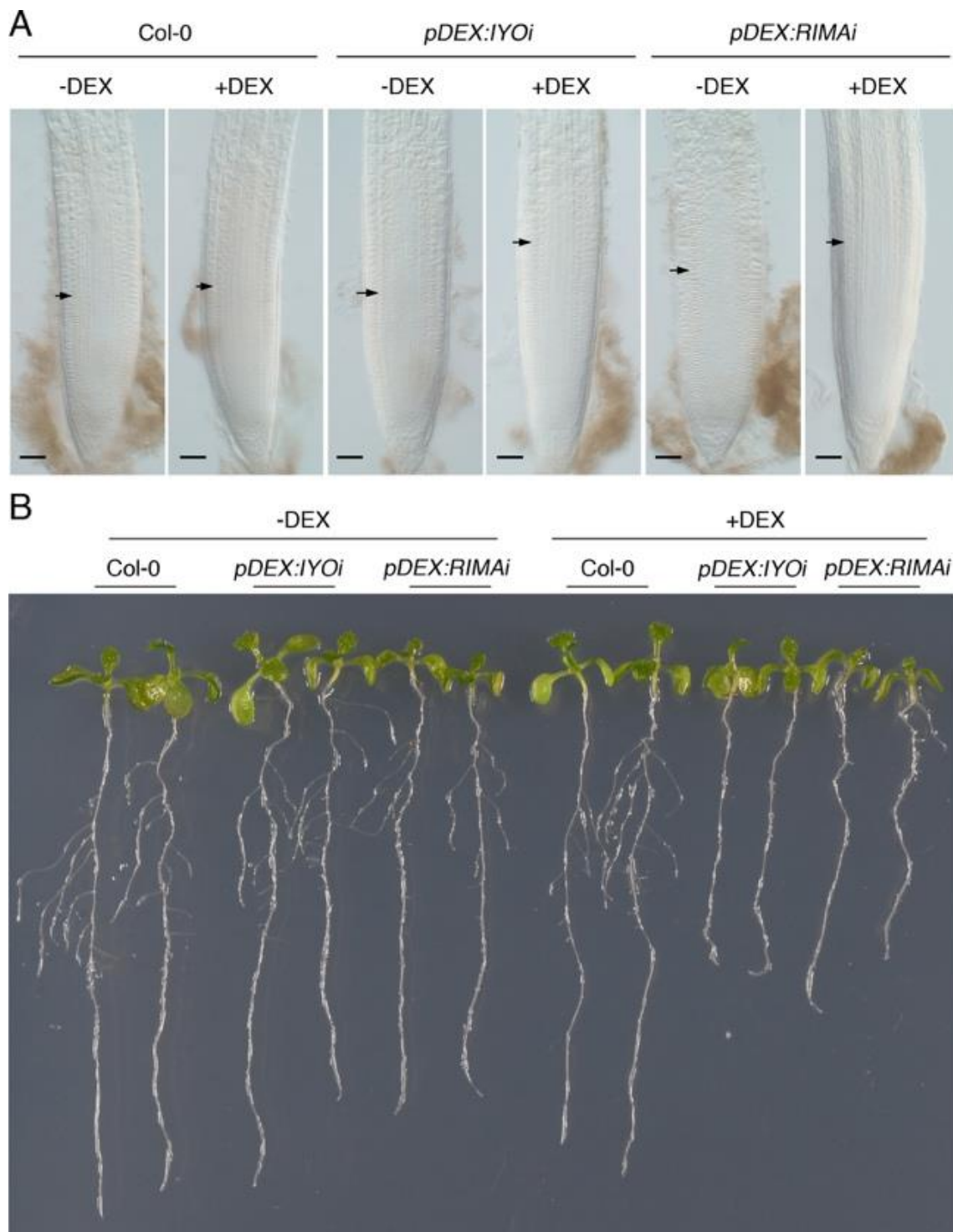
con una morfología muy alterada y un tamaño muy reducido (Figura 11). La raíz también era significativamente más corta y el meristemo estaba muy desorganizado. Todos estos fenotipos sólo se observaban en presencia de DEX y fenocopian fielmente el fenotipo de los mutantes *iy0-1* y *rima-2*. Para caracterizar en mayor profundidad el efecto de la inducción del ARNi, se eligieron dos líneas homocigotas representativas, *IYOi* L9.1 y *RIMAi* L6.2.



**Figura 11. El silenciamiento de IYO y RIMA provoca la inhibición del crecimiento y la organogénesis.** Se muestra el fenotipo de plantas Col-0 y de líneas transgénicas homocigotas estables *IYOi* L9.1 (pDEX:*IYOi*) y *RIMAi* L6.2 (pDEX:*RIMAi*) crecidas durante 9 días en placas con medio MS y 10  $\mu$ M de dexametasona.

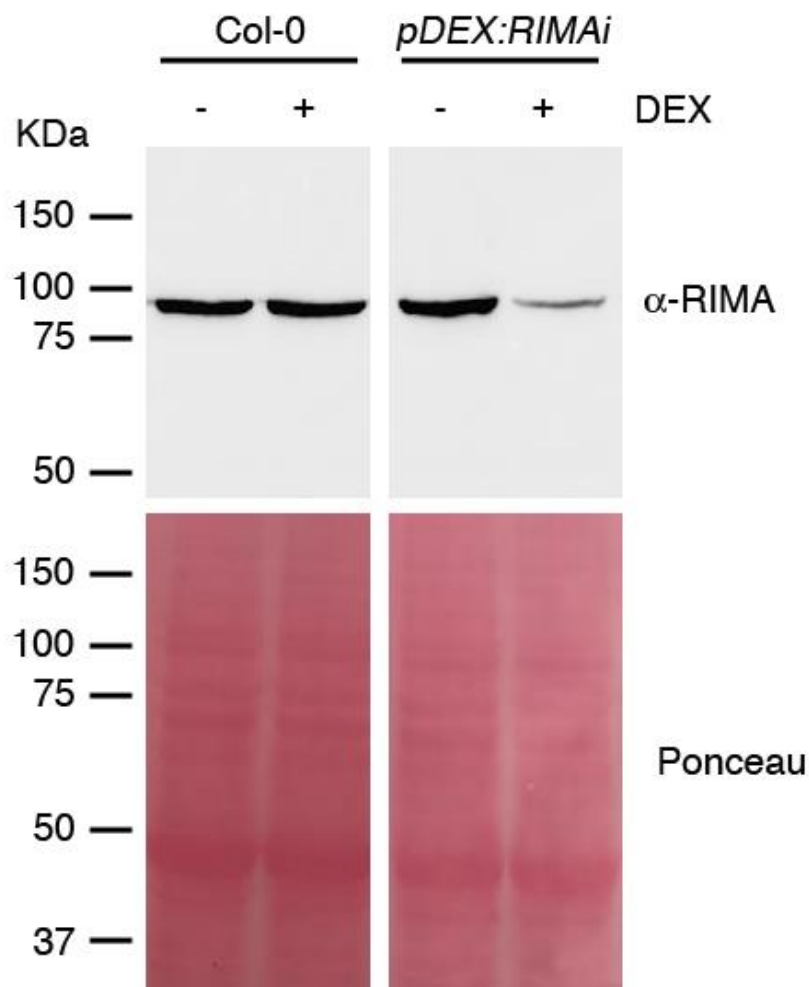
#### 4.4.3 Inducción transitoria del silenciamiento de *IYO* y *RIMA*

Como se mencionó anteriormente, la gran ventaja de los sistemas inducibles es que se pueden hacer experimentos de respuesta temprana y transitoria. Para analizar si las líneas generadas respondían a tratamientos transitorios, se crecieron las plantas en medio sólido o líquido sin DEX y se transfirieron al cabo de los días a medio sólido o líquido con o sin DEX para monitorizar su desarrollo. Los efectos observados fueron similares en todos los medios, por lo que en muchos casos hemos elegido el tratamiento en líquido por su sencillez. Al analizar el efecto sobre la raíz, se comprobó que el tratamiento con DEX provocaba un aumento del tamaño del meristemo en la líneas de ARNi de *IYO* y *RIMA*, pero no en plantas silvestres (Figura 12). Sin embargo, la longitud de la raíz de las líneas de ARNi en presencia de DEX era menor que la de las plantas silvestres. Conjuntamente estos dos resultados indican que la inducción con DEX en las líneas de ARNi retrasa la diferenciación de las células meristemáticas, provocando la expansión del meristemo, y, o bien reduce el ritmo de división de las células meristemáticas o el grado de elongación de las células en diferenciación, provocando el acortamiento de la raíz.



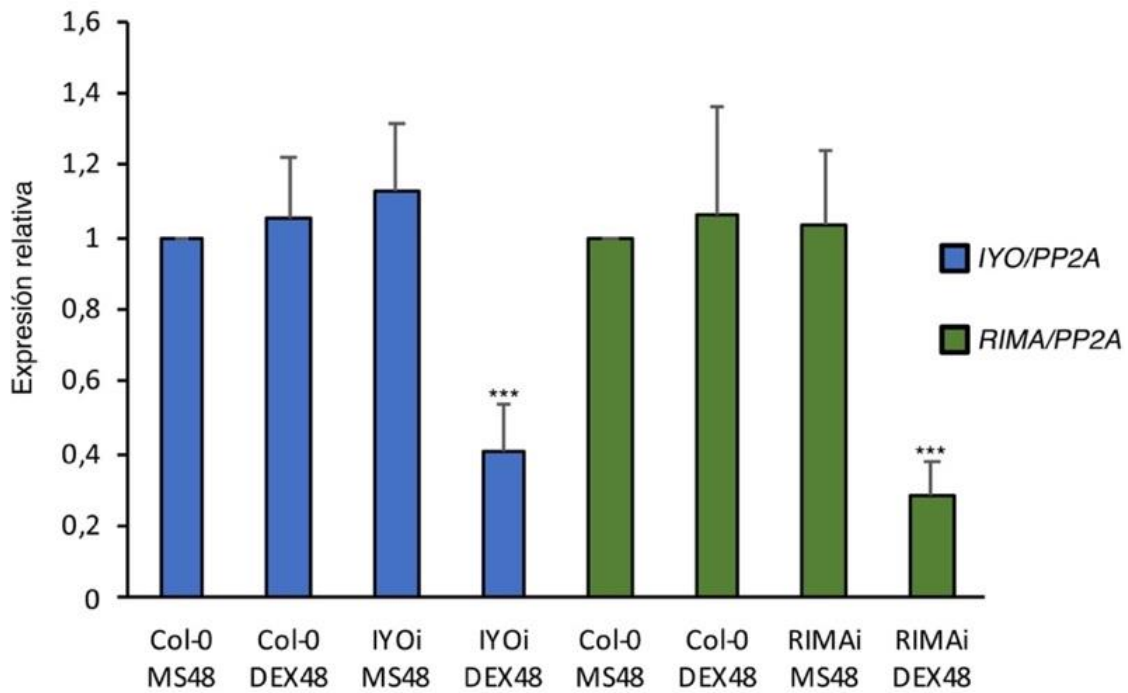
**Figura 12. El silenciamiento de IYO y RIMA provoca un aumento del tamaño del meristemo apical de raíz.** Imágenes de plantas Col-0, *IYOi* L9.1 (*pDEX:IYOi*) y *RIMAi* L6.2 (*pDEX:RIMAi*) germinadas en medio MS sólido, transferidas después de 4 días e medio líquido con (+DEX) y sin (-DEX) 20  $\mu$ M DEX y fotografiadas tres (A) y 6 días (B) después. La punta de la flecha indica el final del meristemo.

Con el fin de establecer si estos fenotipos correlacionaban con el silenciamiento de *IYO* y *RIMA*, se analizó su expresión mediante ensayos de western blot y RT-QPCR. En ensayos de western se comprobó una bajada en la cantidad de proteína RIMA en la línea *RIMAi* L6.2 en presencia de DEX, claramente apreciable después de 48 h de iniciar el tratamiento con DEX.



**Figura 13. Reducción de los niveles de RIMA en plantas *RIMAi* tratadas con DEX.** Análisis por western blot con anticuerpo frente a RIMA ( $\alpha$ -RIMA) de extractos de proteínas totales de plántulas Col-0 y *RIMAi* L6.2 (*pDEX:RIMAi*) crecidas durante 9 días en medio líquido MS y transferidas a medio MS con 40  $\mu$ M de dexametasona (+) o con la misma concentración de DMSO (-) durante 48h. Se muestra la tinción con Ponceau como control de carga.

Además, tras el tratamiento de 48h con DEX se detectó en ensayos de RT-qPCR una bajada del 60% en los niveles del transcrito de *IYO* en la línea *IYOi* L9.1 y del 72% del de *RIMA* en la línea *RIMAi* L6.2 (Figura 14). Se ha reportado que una bajada en torno al 55% del transcrito de *IYO* en una línea que expresa constitutivamente un amiARN provoca claros defectos en el desarrollo (Li et al., 2018). Por otro lado, el mutante *rima-2* acumula unos niveles de proteína *RIMA* similares a los observados en la línea *RIMAi* L6.2 tras 48h de tratamiento. Estos datos confirman que los niveles de silenciamiento obtenidos tras tratamientos cortos con DEX son suficientes para interferir en la actividad de *IYO* y *RIMA* y provocar los defectos en desarrollo observados. Un grado de silenciamiento mayor de estos dos genes esenciales podría comprometer la viabilidad de las plantas (Sanmartín et al., 2011; Muñoz et al., 2017).



**Figura 14. Expresión relativa del ARNm total de IYO y RIMA en las líneas transgénicas de ARNi inducibles por DEX.** Análisis de la efectividad del silenciamiento evaluado por RT-qPCR de plántulas Col-0, *IYOi* L9.1 (pDEX:*IYOi*) y *RIMAi* L6.2 (pDEX:*RIMAi*) de 9 días crecidas en MS líquido e incubadas durante 48 horas en MS líquido con 40  $\mu$ M de DEX (DEX48) o una cantidad equivalente del solvente DMSO (MS48). Los niveles de expresión de ambos genes fueron normalizados con respecto al gen constitutivo PP2A y se muestran como expresión relativa a la expresión en muestras de Col-0 control (Col-0 MS48). Para ambos casos la media  $\pm$  la desviación estándar se calculó a partir de 5 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas por cada réplica biológica. La significancia estadística se calculó aplicando el test de Student (t-test), (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

#### 4.4.4 Generación y caracterización de transcriptomas por ARN-seq

Para analizar el efecto en el transcriptoma del silenciamiento de *IYO* y *RIMA*, secuenciamos muestras de ARN (ARN-seq) de plantas silvestres y de las líneas *IYOi* L9.1 y *RIMAi* L6.2 después del tratamiento con DEX o DMSO durante 48 h. Para ello, se crecieron plantas durante 9 días en MS líquido, tras lo cual se cambió por medio MS fresco con 40  $\mu$ M DEX o con una cantidad equivalente del solvente DMSO, se incubaron durante 48 horas y se recolectaron. Para cada genotipo y tratamiento se obtuvieron tres muestras biológicas independientes, cada una de las cuales estaba formada a su vez por

muestras de dos experimentos independientes. Se extrajo el ARN total de las muestras y se obtuvo una concentración por encima de los 1000 ng/μl y relación de absorbancia A260/A280 en el rango 1.8-2.00, lo que indica baja contaminación por proteínas (Tabla 6).

<b>Muestra</b>	<b>Genotipo+tratamiento</b>	<b>Concen. (ng/μl)</b>	<b>A260/A280</b>
C1	Col-0 + DMSO réplica 1	1295	1.95
C2	Col-0 + DMSO réplica 2	1597	1.88
C3	Col-0 + DMSO réplica 3	1426	1.90
CDEX1	Col-0 + DEX réplica 1	1285	1.91
CDEX2	Col-0 + DEX réplica 2	1390	1.91
CDEX3	Col-0 + DEX réplica 3	1481	1.92
IY1	IYOi + DMSO réplica 1	1483	1.89
IY2	IYOi + DMSO réplica 2	1367	1.87
IY3	IYOi + DMSO réplica 3	1276	1.87
IYDEX1	IYOi + DEX réplica 1	1587	1.89
IYDEX2	IYOi + DEX réplica 2	1419	1.93
IYDEX3	IYOi + DEX réplica 3	1030	1.84
RI1	RIMAi + DMSO réplica 1	1682	1.92
RI2	RIMAi + DMSO réplica 2	1636	1.92
RI3	RIMAi + DMSO réplica 3	1259	1.86
RIDEX1	RIMAi + DEX réplica 1	1231	1.91
RIDEX2	RIMAi + DEX réplica 2	1029	1.87
RIDEX3	RIMAi + DEX réplica 3	1012	1.93

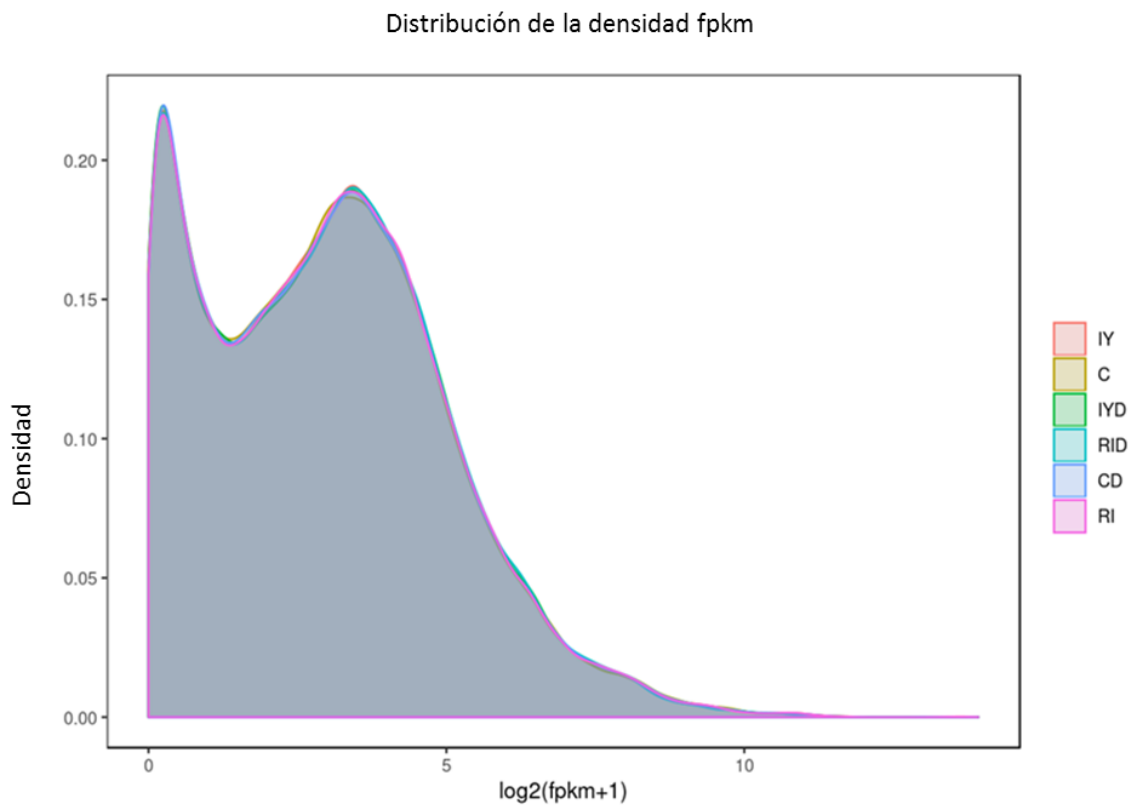
**Tabla 6. Concentraciones y relación de absorbancia del ARN total obtenido para cada una de las muestras.**

Con las 18 muestras independientes se generaron y secuenciaron 18 bibliotecas, obteniéndose entre 19.6 y 28 millones de lecturas limpias y correctamente alineadas con el genoma de Arabidopsis por muestra (Tabla 7).

<b>Muestra</b>	<b>Numero de lecturas limpias</b>	<b>Bases secuenciadas</b>
C1	23470821	7.0 Gbp
C2	20799543	6.2 Gbp
C3	20657204	6.2 Gbp
CDEX1	26011639	7.8 Gbp
CDEX2	22518684	6.8 Gbp
CDEX3	26471385	7.9 Gbp
IY1	19677555	5.9 Gbp
IY2	22853097	6.9 Gbp
IY3	20343243	6.1 Gbp
IYDEX1	21648732	6.5 Gbp
IYDEX2	21611151	6.5 Gbp
IYDEX3	21932946	6.6 Gbp
RI1	22215910	6.7 Gbp
RI2	21525573	6.5 Gbp
RI3	21701469	6.5 Gbp
RIDEX1	28253569	8.5 Gbp
RIDEX2	21669037	6.5 Gbp
RIDEX3	23317020	7.0 Gbp

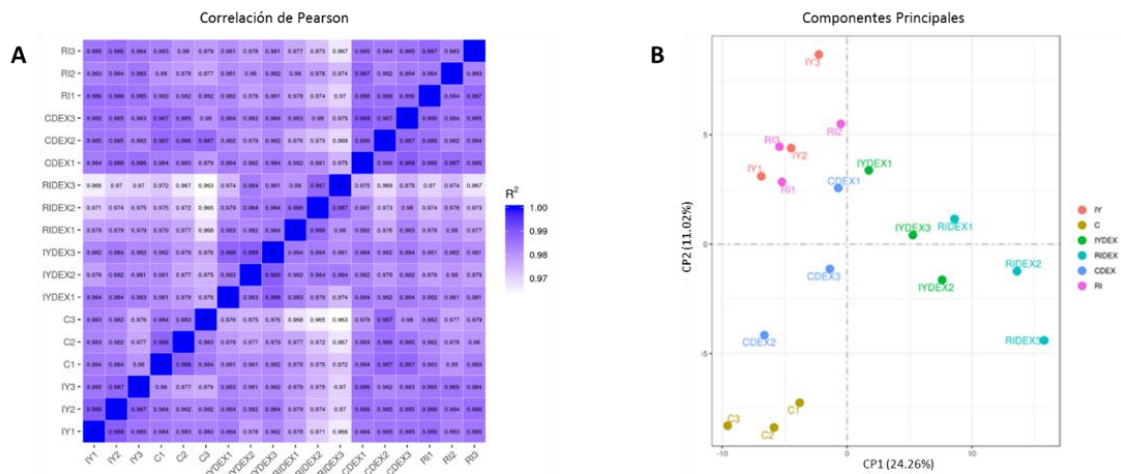
**Tabla 7. Distribución de lecturas obtenidas de las distintas librerías.**

Examinar la distribución global de lecturas para cada muestra es importante para identificar posibles errores en la generación de las librerías o en la secuenciación que pudieran inferir en los análisis posteriores de los datos obtenidos. Idealmente, las distribuciones globales de lecturas de todas las muestras deberían ser parecidas. El gráfico de densidad de la Figura 15 muestra un solapamiento casi total en las muestras de los distintos tratamientos, mostrando que la variabilidad técnica entre las librerías es mínima (Liu et al., 2018).



**Figura 15. Distribución de la densidad génica en función de los niveles de expresión.** La gráfica muestra la distribución de genes en función de la expresión ( $\log_2(\text{FPKM}+1)$ ) en los distintos grupos de muestras secuenciadas. IY= media en IY1-IY3, RI= media en RI1-RI3, CD= media en CDEX1-CDEX3, IYD= media en IYDEX1-IYDEX3, RID= media en RIDEX1- RIDEX3, C= media en C1-C3. Se puede observar que la mayoría de los grupos muestran una distribución similar (área gris).

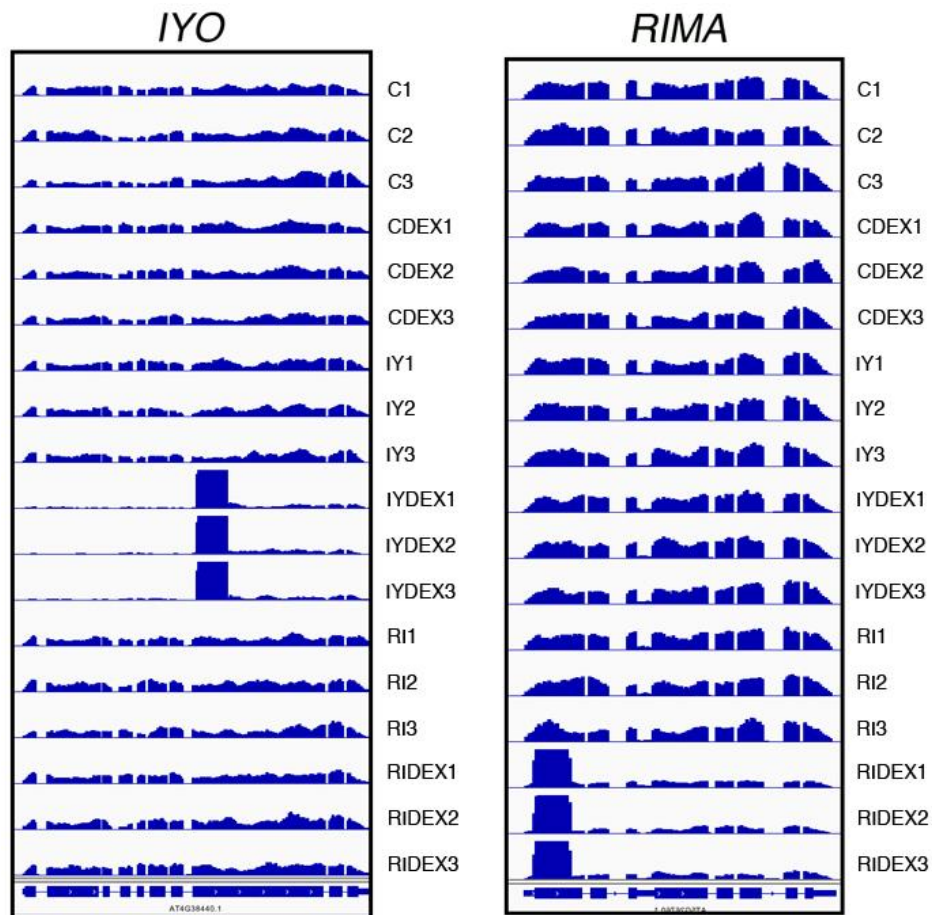
El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) mide la variabilidad (biológica y técnica) entre las muestras. En las librerías secuenciadas se obtuvieron valores de  $r > 0.98$  entre las réplicas de un mismo tratamiento/muestra, y valores algo menores entre los distintos tratamientos/muestras (Figura 16A), lo que indica que la variabilidad intragrupal, que debería reflejar principalmente la variabilidad técnica, es menor que la intergrupal, que debería reflejar principalmente la variabilidad biológica entre los distintos genotipos/tratamientos. De acuerdo con esto, un análisis de componentes principales agrupa a las réplicas de cada muestra/tratamiento (Figura 16B). Además, el componente principal 1 separa a las réplicas de las plantas IYOi y RIMAi tratadas con DEX del resto de las muestras, indicando que el perfil transcripcional es parecido entre ellas y distinto del resto.



**Figura 16. Determinación de la variabilidad intra e intergrupal entre muestras.** (A) Correlación de Pearson; se muestran los coeficientes de correlación ( $r$ ) entre las distintas muestras. (B) Análisis de Componentes Principales (APC); se visualizan las 18 muestras a lo largo de CP1 y CP2 que describen el 24,26% y el 11,02% de la variabilidad total, respectivamente.

#### 4.4.5 Identificación de genes desregulados tras el silenciamiento de *IYO* y *RIMA*

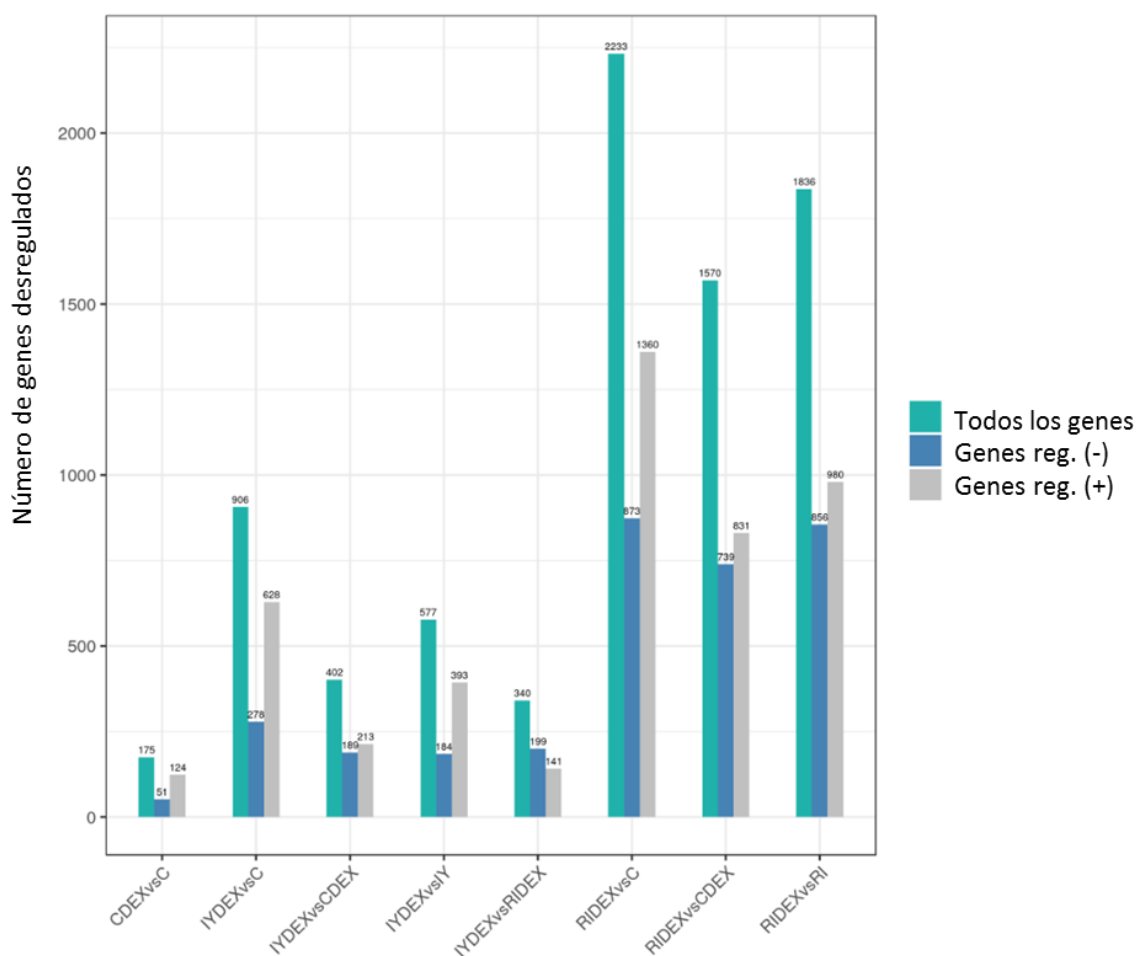
En primer lugar, analizamos la expresión de los genes *IYO* y *RIMA* en las librerías secuenciadas, para comprobar si efectivamente había un silenciamiento en las muestras de las líneas de ARNi tratadas con DEX. En la Figura 17 se muestra una imagen del IGV de la distribución de lecturas en los genes *IYO* y *RIMA* en las distintas librerías. Como se puede observar la expresión de *IYO* es similar en todas las muestras, salvo en las líneas *IYOi* tratadas con DEX, en las que hay una bajada muy significativa en el número de lecturas a lo largo del gen, indicando que el silenciamiento es efectivo y específico de esas muestras. Además, se ve un aumento de lecturas que corresponden al fragmento que se utilizó para generar la construcción de ARNi, lo que evidencia que la inducción por DEX es eficiente. De forma muy similar, hay una reducción significativa de lecturas de *RIMA* y una inducción de lecturas en el fragmento usado para el ARNi específicamente en las líneas *RIMAi* tratadas con DEX (Figura 17).



**Figura 17. Reducción en los niveles de ARNm de IYO y RIMA en las muestras del ARN-seq de las líneas silenciadas.** Histograma con la distribución de lecturas que mapean en los genes *IYO* y *RIMA* en las muestras secuenciadas.

Una vez realizado el control de calidad y comprobado que había silenciamiento inducido por DEX en las muestras de las plantas de ARNi, procedimos a identificar genes diferencialmente regulados (DEGs, por sus siglas en inglés) entre los distintos tratamientos/genotipos, tomando como corte un P-valor ajustado  $< 0.05$  (Figura 18). Las muestras de las plantas *IYOi* L9.1 tratadas con DEX (IYDEX) tenían entre 402-906 DEGs en relación a los controles (IY, C y CDEX). Las muestras de las plantas *RIMAi* L6.2 tratadas con DEX (RIDEX) fueron las que mayores cambios en la expresión génica mostraron, con más de 1500 DEGs en relación a los controles (C, DCEX y RI).

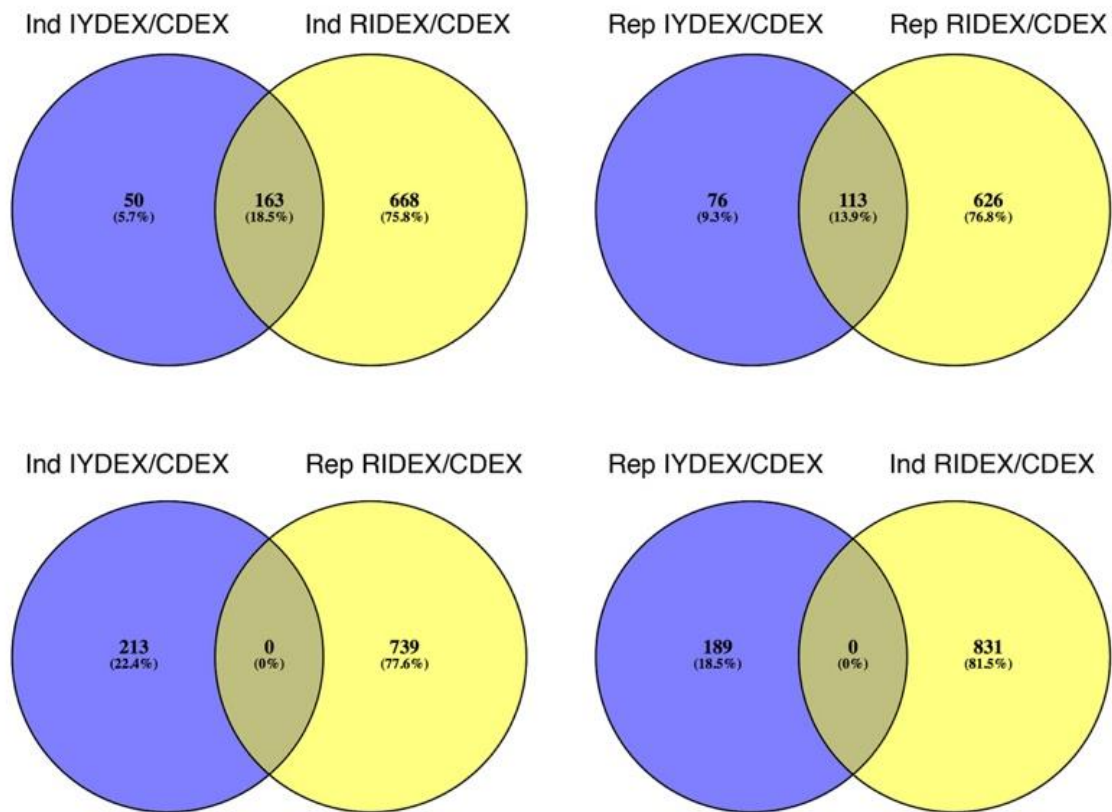
### Expresión génica diferencial



**Figura 18. Expresión génica diferencial entre las distintas líneas y tratamientos.** La gráfica muestra el número de genes regulados negativamente (azul) y el número de genes regulados positivamente (gris) junto al número total de genes desregulados (verde) con un p-valor ajustado  $< 0.05$  entre las muestras indicadas.

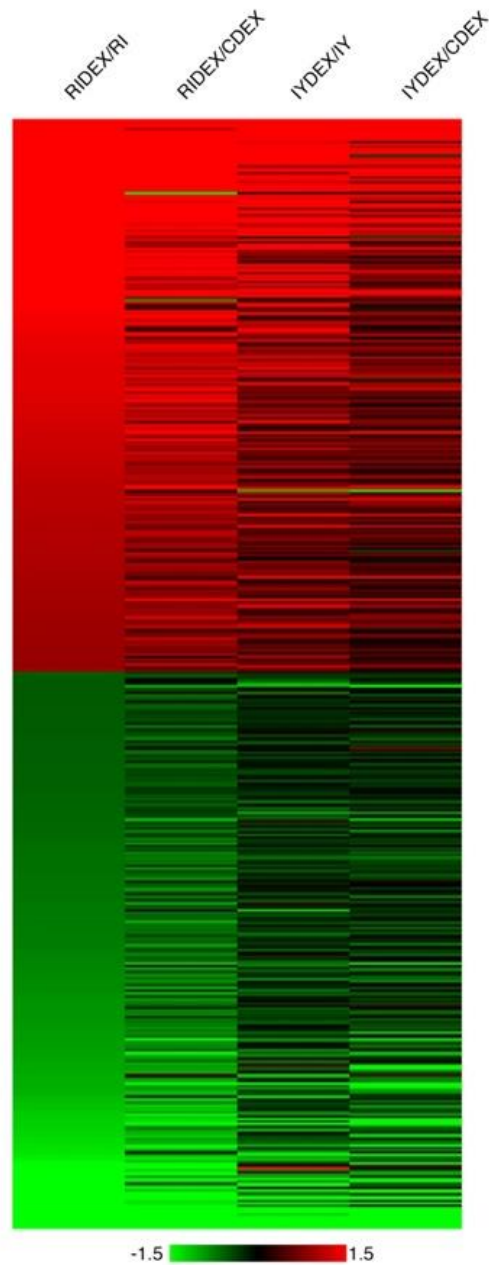
Sin embargo, el número de DEGs de RIDEX respecto a las muestras de las plantas IYDEX era mucho menor (340 DEGs), lo que indica que en ambas muestras hay cambios transcripcionales similares si bien en el caso de IYDEX los cambios en los DEGs deben ser menores, situándose su expresión entre las de las muestras RIDEX y la de las muestras control, por lo que la expresión de muchos de esos genes en IYDEX no resulta significativamente ( $p\text{-adj} < 0.05$ ) distinta de la expresión en RIDEX o en los controles. Esto concuerda con el análisis de componentes principales que sitúa a las muestras

IYDEX entre los controles y las muestras RIDEX. Además, un análisis de solapamiento entre los genes activados en IYDEX y RIDEX frente a CDEX o C o los reprimidos en IYDEX y RIDEX frente a CDEX o C, muestran que hay muchos más genes en común que los esperados al azar (Figura 19). Así, de los 213 genes más significativamente inducidos tras el silenciamiento de *IYO*, 163 (el 76%) están entre los más significativamente inducidos al silenciar *RIMA*, una sobrerrepresentación de 22 veces lo esperado al azar ( $p < 10^{-197}$ , test hipergeométrico). Entre los 189 DEGs más significativamente reprimidos después del silenciamiento de *IYO*, 113 también están entre los más significativamente reprimidos al silenciar *RIMA*, lo cual supone una sobrerrepresentación de 19 veces lo esperado al azar ( $p < 10^{-122}$ , test hipergeométrico). Por el contrario, entre los genes más significativamente inducidos al silenciar *IYO* y los genes más significativamente reprimidos al silenciar *RIMA* o los reprimidos al silenciar *IYO* y los inducidos al silenciar *RIMA*, no hay ningún gen en común, lo que demuestra la estrecha co-regulación génica que ocurre en las plantas silenciadas.



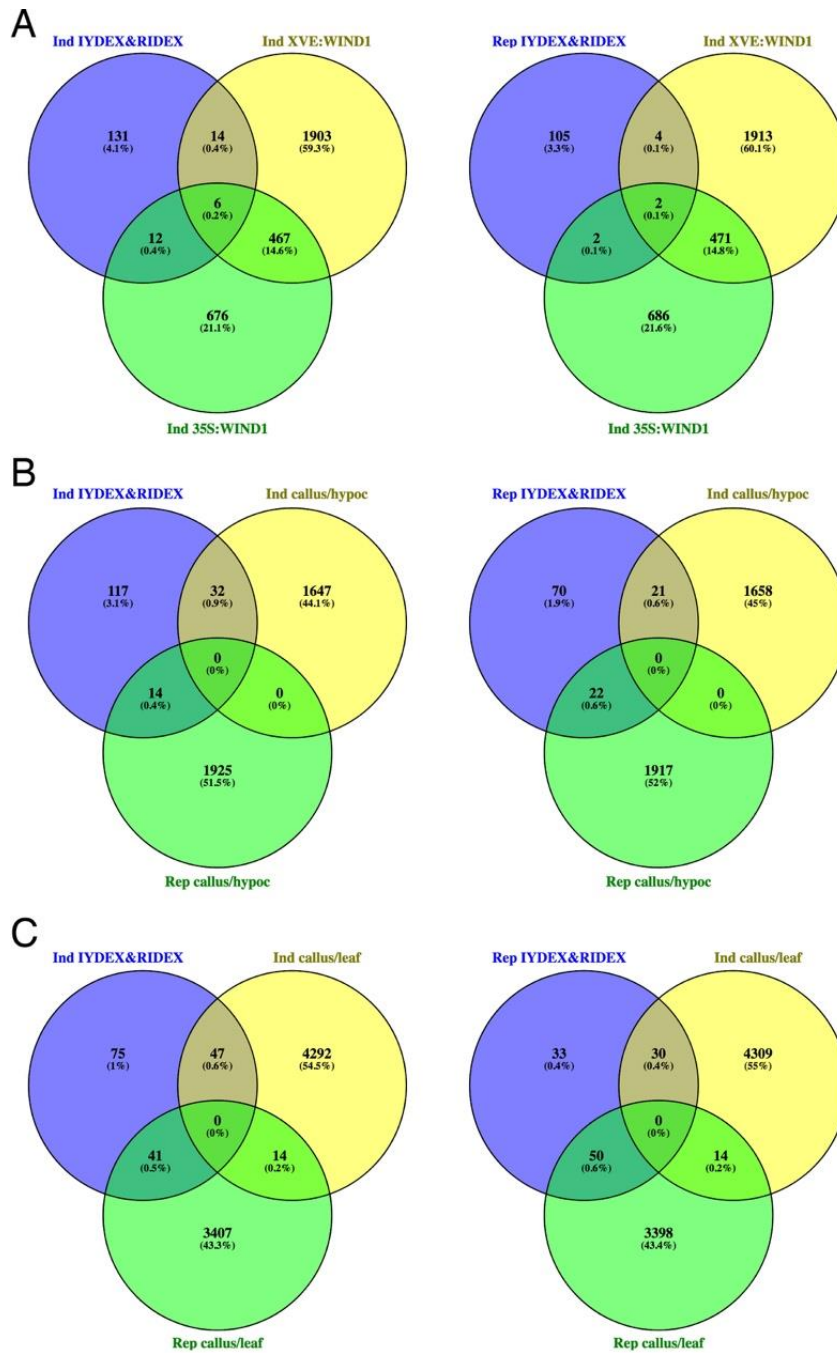
**Figura 19. El silenciamiento de *IYO* y *RIMA* causa una desregulación génica altamente coincidente.** Diagramas de Venn mostrando el solapamiento entre los genes más significativamente ( $p$ -valor ajustado  $< 0.05$ ) inducidos o reprimidos en las muestras IYDEX o RIDEX en relación a las muestras CDEX.

Conjuntamente, estos datos indican que el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* afecta de forma similar al transcriptoma, pero que los cambios son menores en el caso de las líneas silenciadas en *IYO*. Esto resulta muy evidente en el mapa de calor de la Figura 20 que muestra una clara co-regulación de los genes, pero con un menor grado de cambio en IYDEX. A nivel de transcrito, el nivel de silenciamiento de *IYO* no es muy diferente del de *RIMA*, pero desconocemos como esto se traduce sobre los niveles de proteína correspondientes, por lo que no podemos determinar si existe una correlación entre el grado de desregulación de los DEGs comunes y el nivel de silenciamiento de *IYO* y *RIMA*.



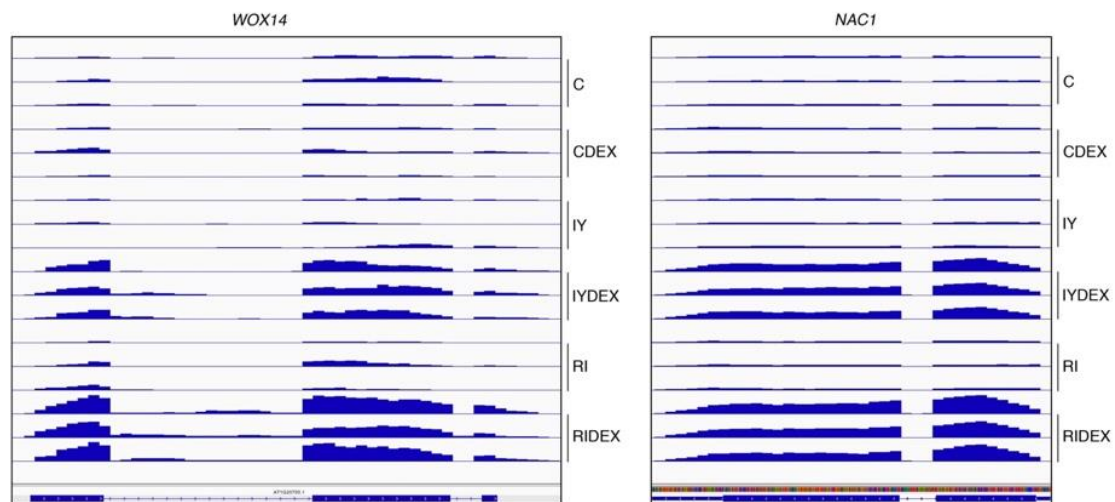
**Figura 20. Co-regulación génica al silenciar *IYO* y *RIMA*.** Mapa de calor de los 500 genes más inducidos y los 500 genes más reprimidos en las muestras RIDEX frente a las muestras RI. Se representa el logaritmo en base 2 de la relación entre la expresión de estos genes en RIDEX frente a RI (RIDEX/RI), RIDEX frente a CDEX (RIDEX/CDEX), IYDEX frente a IY (IYDEX/IY) e IYDEX frente a CDEX (IYDEX/CDEX).

Dado el papel de *IYO* y *RIMA* en la diferenciación de plantas, estudiamos si los DEGs de las muestras silenciadas estaban enriquecidos en genes desregulados en células en distintos estados de diferenciación. Los genes *WIND* son factores transcripcionales de la familia AP2 que participan en la regeneración de tejidos heridos. La sobreexpresión de los genes *WIND* provoca la desdiferenciación y el crecimiento en forma de callo (Iwase et al., 2011, 2017). Se han publicado estudios transcriptómicos de plantas que sobreexpresan constitutivamente *WIND1* (Iwase et al., 2011) o que lo expresan induciblemente para estudiar la respuesta temprana (0-1-3-6-12-24 h) tras la inducción de *WIND1* (Iwase et al., 2021). Entre los 163 genes comunes inducidos tanto en IYDEX y RIDEX relativamente a CDEX hay una mayor proporción de genes que se activan en respuesta a *WIND1* (32 de 163 genes, el 20%, Figura 21A) que entre los genes 113 genes comunes reprimidos tanto en IYDEX y RIDEX (8 de 113 genes, el 7%, Figura 21A), sugiriendo que el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* provoca una reprogramación transcripcional similar a la que ocurre cuando *WIND1* induce la desdiferenciación. En consonancia con esto, también hay una sobrerrepresentación entre los genes inducidos o reprimidos en IYDEX y RIDEX con, respectivamente, genes que se activan o reprimen durante la formación de callos y la adquisición de la pluripotencia (Figura 21B).



**Figura 21. Sobrerrepresentación de genes inducibles por WIND1 y activados en callos entre los DEGs inducidos al silenciar *IYO* y *RIMA*.** Diagramas de Venn mostrando el solapamiento entre los 163 genes significativamente inducidos (Ind IYDEX&RINDEX) y los 113 reprimidos (Rep IYDEX&RINDEX) al silenciar *IYO* y *RIMA* y (A) los genes inducidos al activar WIND1 transitoria (Ind XVE:WIND1) o constitutivamente (Ind 35S:WIND1), (B) genes inducidos (Ind callus/hipoc) o reprimidos (Rep callus/hipoc) durante la inducción de callos a partir de hypocótilos (Xu et al., 2012), (C) genes inducidos (Ind callus/hojas) o reprimidos (Rep callus/hojas) durante la inducción de callos a partir de hojas (He et al., 2012)

En una lista de 89 genes reguladores clave de la regeneración (Ikeuchi et al., 2019) hay cinco que se inducen significativamente ( $p\text{-aj} < 0.05$ ) en las muestras silenciadas en *RIMA*, dos que se inducen significativamente en las muestras silenciadas en *IYO* y ninguno que se reprima. Los dos reguladores comunes que se inducen al silenciar *IYO* y *RIMA* son los factores transcripcionales *WOX14* y *NAC1* (Figura 22), que han sido implicados en la adquisición de la pluripotencia (Etchells et al., 2013; Kim et al., 2018), la proliferación del cambium (Smit et al., 2020), y la regeneración (Chen et al., 2016).



**Figura 22. WOX14 y NAC1 se inducen al silenciar *IYO* y *RIMA*.** Histograma con la distribución de lecturas que mapean en los genes WOX14 y NAC1 en las muestras secuenciadas.

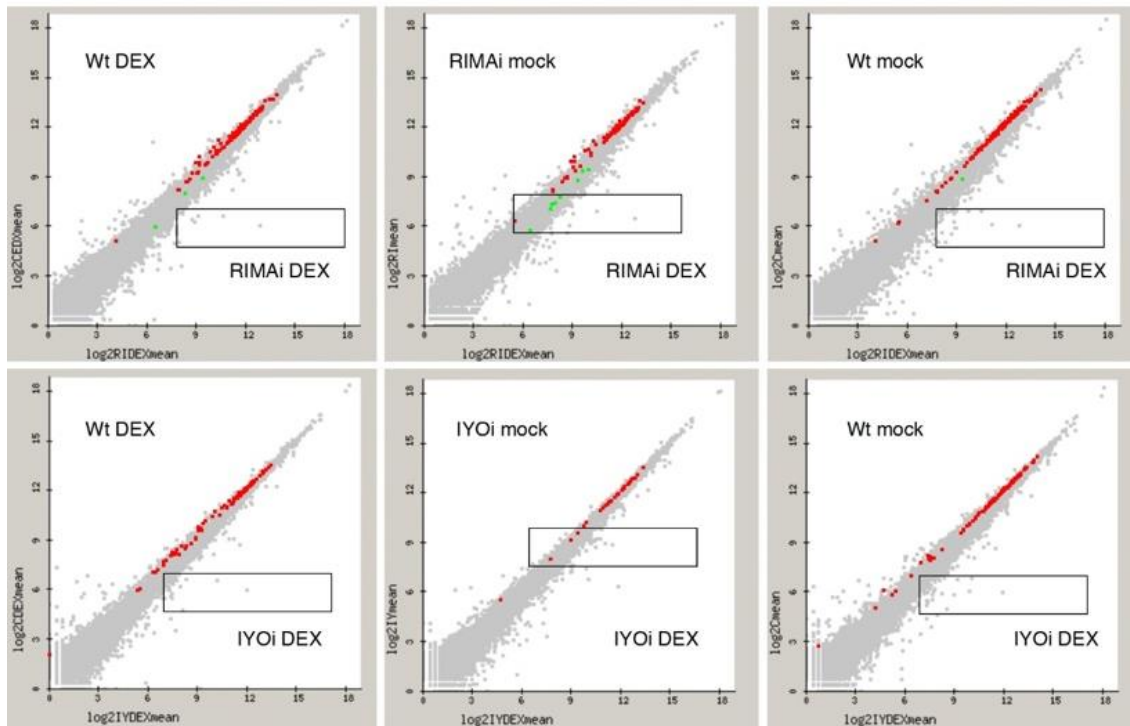
Al analizar en el servidor ShinyGO posibles enriquecimientos en ontología de términos entre los 163 comunes inducidos en IYDEX y RIDEX no se encontraron categorías claramente enriquecidas en las clasificaciones de proceso biológico, componente celular o función molecular. Sin embargo, si se detectaron varios conjuntos de genes en los que hay enriquecimiento de genes inducidos al silenciar *IYO* y *RIMA* (Tabla 8). Así, se

observó un enriquecimiento de genes inducidos en los mutantes *idn2*, *swi3b* y *dms4* que están afectados en la metilación de ADN dependiente de metilación (Ausin et al., 2012, Zhu et al., 2013, Kanno et al., 2010), lo que concuerda con el papel de *IYO* en este proceso (Li et al., 2018) y refuerza la conclusión de que la inactivación de *IYO* en estas muestras era efectiva. De igual manera se detectó un enriquecimiento de genes inducidos en los mutantes *elo3*, *elo2* y *elo4* (Kojima et al., 2011) del complejo Elongator que interacciona con *IYO* para activar la diferenciación celular. En este sentido se detectaron también enriquecimientos de genes inducidos en hipocótilos maduros que presentan una mayor capacidad de formar callos que los hipocótilos jóvenes (Chen et al., 2012), lo que apoya que el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* puede favorecer la reprogramación a la pluripotencia. El conjunto que tuvo el solapamiento con menor FDR fue el de los genes inducidos en el mutante *obe1 obe2* afectados en la transcripción de genes necesarios para las respuestas a auxinas (Thomas et al., 2009). Por último, también se detectó un enriquecimiento de genes inducidos en los mutantes *ago1* y *hyl1* (Kurihara et al., 2009), que afectan el silenciamiento mediado por miARNs (Yang et al., 2021).

FDR	Enriquecimiento	Condición	Publicación	PUBMED ID
4,34E-21	7,6x	ind en obe1 obe2	Thomas et al., 2009	19392692
1,70E-16	8,1x	ind en idn2	Ausin et al., 2012	22592791
2,60E-16	5,5x	ind en hipoc.maduros	Chen et al., 2012	22706032
1,76E-13	9,2x	ind en swi3b	Zhu et al., 2013	23246435
7,54E-12	5,8x	ind en ago1	Kurihara et al., 2009	19633021
4,06E-10	9,3x	ind en elo3	Kojima et al., 2011	21700721
1,16E-09	8,6x	ind en elo2	Kojima et al., 2011	21700721
1,63E-09	8,4x	ind en elo4	Kojima et al., 2011	21700721
3,73E-09	2,9x	ind en hyl1	Kurihara et al., 2009	19633021
2,69E-08	2,8x	ind en dms4	Kanno et al., 2010	20010803

**Tabla 8. Resultado de la búsqueda en el servidor ShinyGO.** Se muestran los conjuntos de genes que tienen un solapamiento significativamente mayor al esperado por azar con los 163 genes comunes inducidos en IYDEX y RIDEX relativamente a CDEX. Se indica el valor FDR, el ratio entre el número de genes solapantes y el esperado por azar (enriquecimiento), la condición que define al conjunto de genes comparado y la publicación en donde se describe. Ind = inducido.

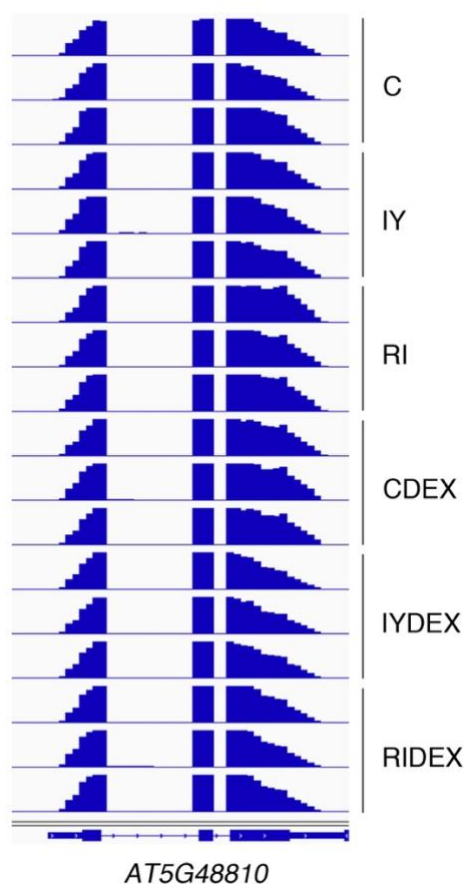
Entre los genes significativamente reprimidos en las plantas silenciadas en *IYO* y *RIMA* encontramos muchos que codifican proteínas ribosomales. De hecho, al analizar la expresión de todas las proteínas ribosomales constatamos que estaban globalmente reprimidas en las muestras de las plantas silenciadas (Figura 23), lo que sugiere que *IYO* y *RIMA* regulan la capacidad de síntesis de proteínas de una forma general. Además, también vimos una sobrerrepresentación de genes específicos de mitosis (Menges et al., 2005) entre los reprimidos en las plantas silenciadas, sugiriendo que al igual que ocurre en los mutantes hipomórficos *iy0-1* y *rima-2* (Sanmartín et al., 2011, Muñoz et al., 2017) la proliferación celular se ve comprometida cuando se interfiere con la actividad de *IYO* y *RIMA*. Al analizar los 113 genes comunes reprimidos en IYDEX y RIDEX en el servidor ShinyGO se detectó enriquecimiento en la categoría Ribosomas (GO:005840, FDR  $2.8 \times 10^{-11}$ ) y entre los genes reprimidos en hipocótilos maduros frente a hipocótilos jóvenes (FDR  $5.1 \times 10^{-13}$ , Chen et al., 2012).



**Figura 23. Represión general de genes que codifican proteínas ribosomales en las muestras silenciadas en *IYO* y *RIMA*.** Se muestran los gráficos de la expresión ( $\log_2$  de la media de FPKM) en muestras RIDEX y sus controles CDEX, RI y C (paneles superiores) y en muestras IYDEX y sus controles CDEX, IY y C (paneles inferiores). Los genes codificantes de proteínas ribosomales que se expresan preferencialmente en una de las dos condiciones con una p-valor ajustado  $< 0.05$  están resaltadas en color rojo si se expresan más en los controles y en color verde si se expresan más en RIDEX o IYDEX.

#### 4.4.6 *IYO* y *RIMA* controlan la terminación transcripcional

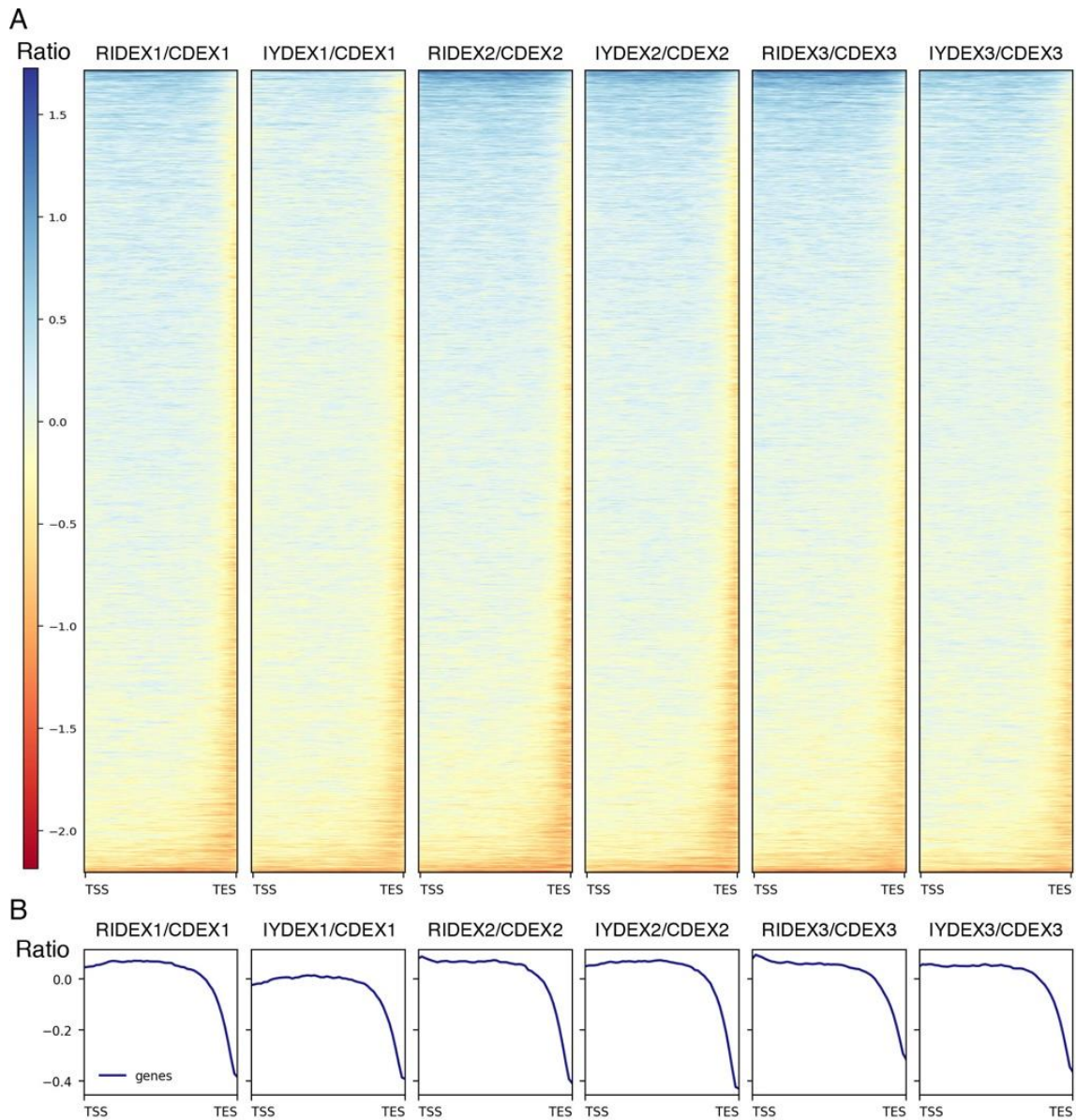
Al analizar la expresión con el programa IGV detectamos en algunos genes que la distribución de lecturas en las muestras silenciadas en *IYO* y *RIMA* (IYDEX y RIDEX) era distinta al resto de muestras, produciéndose una bajada más acusada hacia el extremo 3' del transcrito (Figura 24).



**Figura 24. Disminución de lecturas en el extremo 3' tras el silenciamiento de *IYO* y *RIMA*.** Se muestra como ejemplo la reducción de lecturas en el extremo 3' del gen AT5G48810 en las muestras IYDEX y RIDEX respecto al resto de muestras.

Para confirmar esta observación, cuantificamos el ratio de lecturas entre muestras silenciadas y controles en segmentos de 30 bp para todo el genoma de Arabidopsis usando la aplicación bamCompare del servidor Usegalaxy.org. El fichero resultante se analizó con la aplicación computeMatrix (Usegalaxy.org) y las regiones definidas en TAIR10.GFF para cuantificar el ratio en el cuerpo de los genes de Arabidopsis, desde el sitio de inicio (TSS) al sitio de terminación (TSS) de la transcripción. Estos datos se representaron gráficamente con la aplicación computeMatrix (Figura 25). Este análisis confirmó una bajada en el número de lecturas en el extremo 3' de un gran número de genes en los transcritos en las muestras de las líneas silenciadas en *IYO* y *RIMA* (Figura

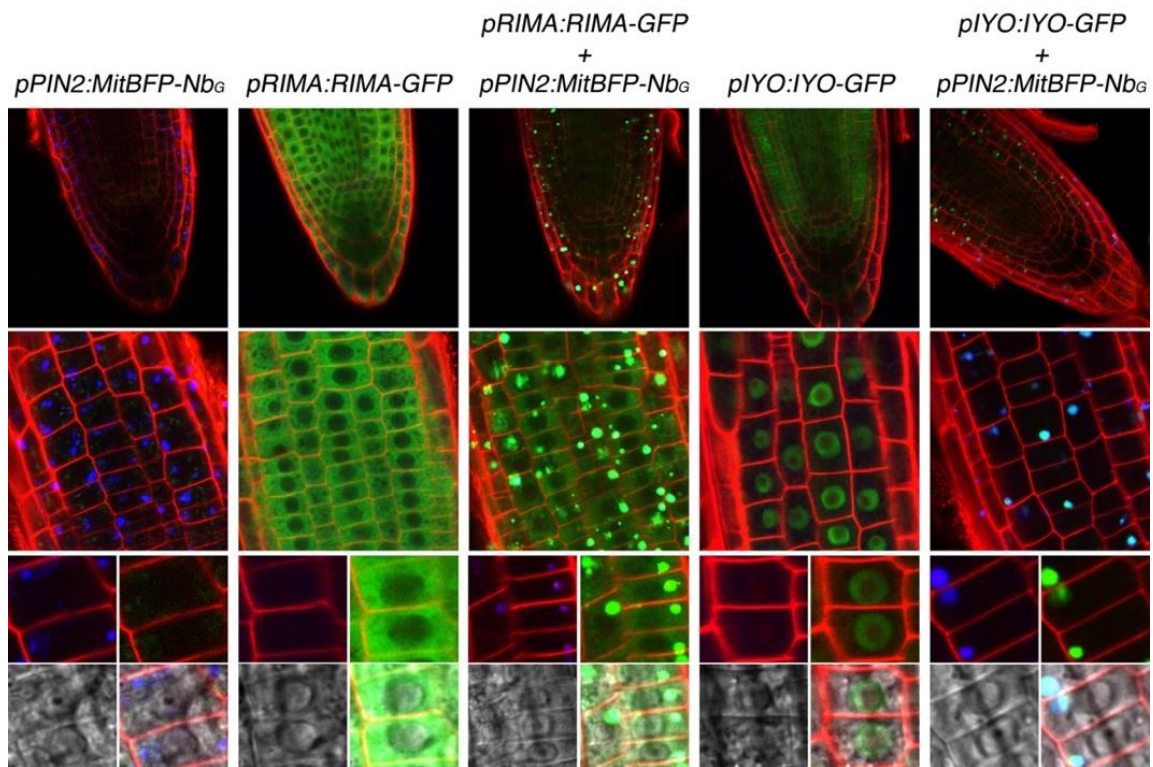
25A), con una media del ratio de lecturas en el extremo 3' entre las líneas silenciadas y los controles cercana al 0,75 ( $\log_2 \approx -0.4$ , Figura 25B). Entre los genes que muestran disminución de lecturas en el 3' hay un claro enriquecimiento de genes con poliadenilación alternativa. Por ejemplo, entre los genes con un ratio de lecturas en el 3' (últimos 120 bp) menor que en el 5' (primeros 120 bp) entre las muestras RIDEX1 y CDEX1, el 83% están entre los genes con evidencia experimental de poliadenilación alternativa (Wu et al., 2011), mientras en los que el ratio en el 3' es mayor que en el 5' el 72% tienen evidencia de poliadenilación alternativa (el 77% del total los genes de *Arabidopsis* detectados en el análisis de Wu y colaboradores tiene poliadenilación alternativa). Estos resultados indican que el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* afecta a la elección del sitio de poliadenilación, resultando en un acortamiento del 3'UTR en una escala genómica. Esta posible función de *IYO* y *RIMA* en el control de la longitud del 3'UTR es muy reveladora a la luz de resultados en sistemas animales que indican que la diferenciación de células madre lleva asociado un alargamiento de los 3'UTR, mientras que la reprogramación a un estado pluripotente conlleva el acortamiento de los 3'UTR (Ji y Tian 2009; Ji et al., 2009; Mueller et al. 2013; Sommerkamp et al., 2021).



**Figura 25. El silenciamiento de *IYO* y *RIMA* provoca la reducción de la longitud del 3'UTR en un gran número de genes.** (A) Mapa de calor representando el  $\log_2$  del ratio en el número de lecturas entre las muestras indicadas encima de los paneles, calculado en segmentos de 30 pb a lo largo del cuerpo de los genes. Se muestran el ratio en el cuerpo de los genes expresados en las librerías secuenciadas, desde el inicio (TSS) al sitio de terminación (TES) de la transcripción. (B) Representación gráfica de la media del  $\log_2$  del ratio en el número de lecturas entre las muestras indicadas encima de los paneles calculada con los genes expresados en las librerías secuenciadas.

#### 4.5 Desarrollo de un sistema de inactivación de IYO y RIMA basado en el secuestro con nanoanticuerpos.

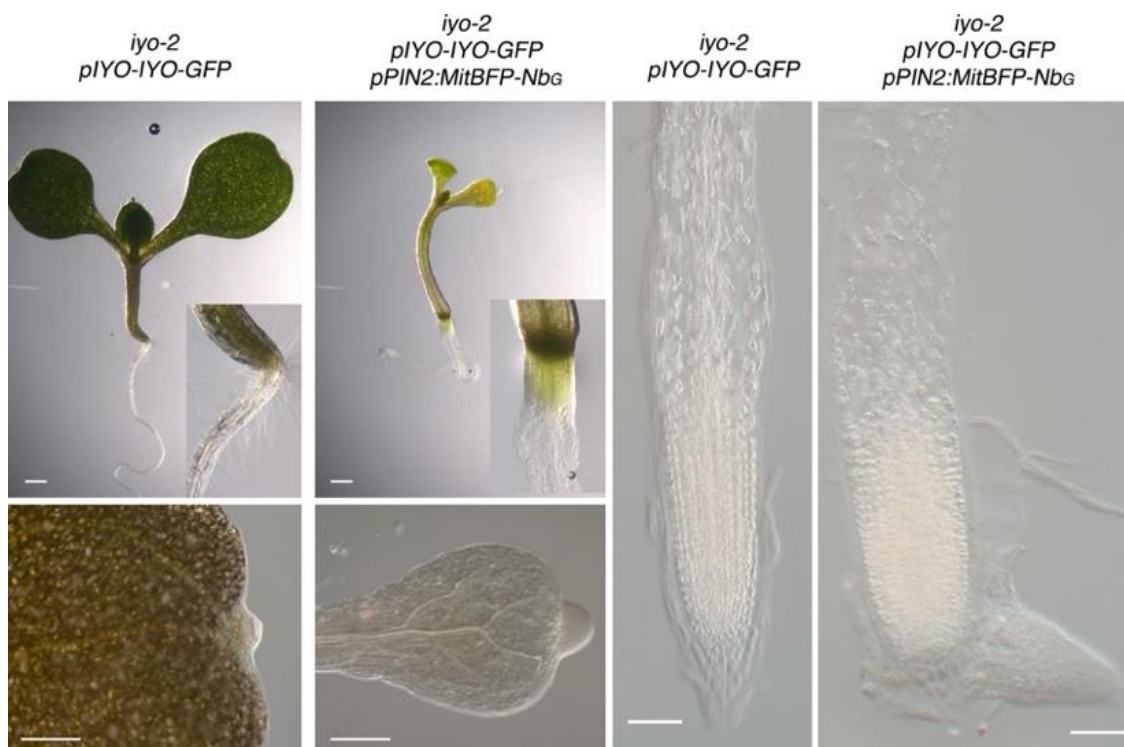
El sistema de ARNi inducible por DEX es eficiente pero relativamente lento, ya que después de degradarse el ARNm, la cantidad de proteína tiene que decaer por debajo de un nivel para que empiece a tener efecto. Por ejemplo, en el caso de RIMA, hasta 48 h después del tratamiento no se observan bajadas significativas de la cantidad de proteína. Con el objetivo de desarrollar un sistema más rápido de inactivación, exploramos el uso de nanoanticuerpos frente a GFP localizados en la membrana de las mitocondrias para secuestrar fusiones de proteínas a GFP. Obtuvimos de nuestro colaborador el Dr. Van Damme líneas transgénicas que expresan la construcción *PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* (Winkler et al., 2021). Esta construcción consiste en un nanoanticuerpo de camello frente a GFP (GFP Nb) fusionado a la proteína fluorescente BFP2 y la señal de importe de la proteína de la membrana exterior de mitocondria Tom70p (MITOTag) bajo el control del promotor de *PIN2*. Este promotor tiene especificidad de tejido y por ejemplo en raíces dirige la expresión en epidermis, córtex y caliptra. Para testar si esta construcción era capaz de deslocalizar nuestras proteínas, cruzamos la línea *PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* con los mutantes *oyo-2* y *rima-1* complementados respectivamente con las construcciones *pIYO:IYO-GFP* y *pRIMA:RIMA-GFP*. Al analizar por microscopia confocal la localización subcelular en plantas de la F2 de los cruces comprobamos que la proteína MITOTagBFP2 producía una clara deslocalización de las proteínas IYO-GFP y RIMA-GFP (Figura 26). Mientras que RIMA-GFP se localiza principalmente difusa en el citosol en plantas silvestres (Figura 26 y Muñoz et al., 2017), la co-expresión con MITOTagBFP2-GFPNb provoca una fuerte acumulación de la señal de RIMA-GFP en estructuras citosólicas que colocalizan con la señal de BFP2, indicando que se trata de mitocondrias. Sin embargo, el secuestro no es total y se detecta aún señal de RIMA-GFP difusa en el citosol (Figura. 26).



**Figura 26. Deslocalización de IYO-GFP y RIMA-GFP por nanoanticuerpos anti-GFP ancladas en mitocondrias.** Se muestran imágenes del confocal de plantas de 6 días que expresan las construcciones indicadas encima de los paneles. La señal de BFP2 se muestra en pseudocolor azul, la de GFP en pseudocolor verde y las paredes celulares marcadas con yoduro de propidio en pseudocolor rojo. Fusión de las señales azul, verde y roja de una sección ecuatorial de la punta de la raíz (paneles superiores) y de una sección de la epidermis en la zona de diferenciación (paneles centrales). En los paneles inferiores se muestra un detalle de células de epidermis de la zona de diferenciación, con un fusionado de la señal roja y azul en el panel superior izquierdo, una imagen de campo claro en el panel inferior izquierdo y un fusionado de todas las imágenes en el panel inferior derecho.

La señal de IYO-GFP en plantas silvestres se localiza de forma difusa en células meristemáticas y se acumula en el núcleo en células que van a entrar en diferenciación o que están diferenciándose (Figura 26 y Sanmartín et al., 2011). La co-expresión con MITOTagBFP2-GFPNb provoca la relocalización de la fluorescencia de IYO-GFP a mitocondrias marcadas por la proteína fluorescente BFP2, tanto de la señal difusa de

células meristemáticas como de la nuclear de células en diferenciación (Figura 26). Además, en este caso el secuestro es más completo, posiblemente porque los niveles de expresión de *IYO-GFP* son menores que los de *RIMA-GFP*. En consonancia con esto, en la F2 del cruce *PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* X *pIYO:IYO-GFP* se encuentran plantas con el desarrollo muy afectado (Figura 27), que se corresponden con mutantes *iy0-2* que expresan *MITOTagBFP2-GFPNb* y *pIYO:IYO-GFP*, mientras que en la F2 del cruce *PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* X *pRIMA:RIMA-GFP* no hay plantas con el desarrollo muy afectado. Las plantas *iy0-2 pIYO:IYO-GFP; PIN2prom::MITOTagBFP2-GFPNb* presentan fenotipos consistentes con defectos en la diferenciación, tales como un crecimiento anormal de células sin elongar en cotiledones y en la zona de unión entre la raíz y el hipocótilo o la formación de meristemos apicales de raíz ectópicos (Figura 27). Estos fenotipos indican que la interrupción de la actividad *IYO* es efectiva y que se interfiere con la diferenciación. Estas líneas pueden resultar interesantes para caracterizar los efectos locales y globales que tienen eliminar la actividad de *IYO* y *RIMA* en tipos celulares específicos. Además, una vez demostrada la efectividad de este sistema para inactivar *IYO* y *RIMA*, estamos generando líneas que expresen induciblemente la construcción *MITOTagBFP2-GFPNb* para conseguir un sistema rápido de interrupción inducible y analizar respuestas muy tempranas.

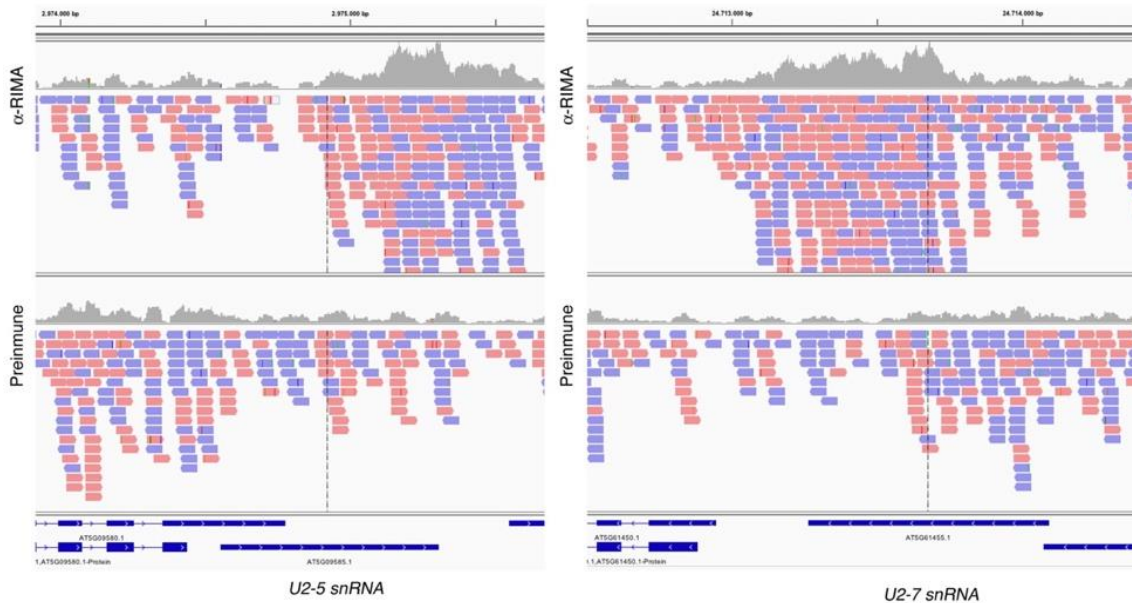


**Figura 27. El secuestro de IYO-GFP medido por nanoanticuerpos en plantas *iyo-2* provoca defectos en diferenciación y desarrollo.** Imágenes de plantas *iyo-2* pIYO:IYO-GFP y plantas *iyo-2* pIYO:IYO-GFP, PIN2<sub>prom::</sub>MITOTagBFP2-GFPNb crecidas en placas *in vitro* durante 7 días. Se muestran detalles a mayor ampliación de los cotiledones, de la zona de unión entre la raíz y el hipocótilo y de la punta de la raíz primaria.

#### **4.6 RIMA se asocia con el motivo sII reconocido por factores transcripcionales de la familia TCP**

Se ha reportado que RPAP1 y RPAP2/RTR1 interaccionan con la cromatina (Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Lynch et al., 2018), lo que apoya una función directa en la transcripción. Para comprobar si RIMA también se une a la cromatina, realizamos experimentos de inmunoprecipitación con los anticuerpos frente a la proteína endógena. Utilizamos extractos de cromatina obtenidos de plántulas Col-0 de 8 días que inmunoprecipitamos con anticuerpo frente a RIMA y con el suero preinmune del mismo conejo como control. La cromatina purificada se secuenció y se mapeó al genoma de

Arabidopsis usando la aplicación Bowtie2 en el servidor Usegalaxy. La localización de los sitios del genoma enriquecidos en lecturas de ADN inmunoprecipitado con el anticuerpo  $\alpha$ -RIMA relativo al control con el suero preinmune, se realizó con el programa MACS2 callpeak en el mismo servidor. De esa manera se encontraron 871 regiones del genoma enriquecidas en secuencias inmunoprecipitadas con  $\alpha$ -RIMA, la mayoría en regiones intergénicas (92.7 %). Entre el 7.3 % de picos en las regiones intergénicas, 16 se localizaban en el extremo 3' del cuerpo de genes U2 snARNs (Figura 27) con un máximo de lecturas en la caja 3' (3' box) que es esencial para el procesamiento del 3' del snARN para dar lugar al snARN maduro. Esta asociación con los U2 snARN y en particular con la caja 3' apoya resultados anteriores que indican que RPAP2 de humanos se une al cuerpo de los U2 snARN y promueve su procesamiento 3', reclutando al complejo de procesamiento Integrator (Egloff et al., 2012). Además, la detección de esta asociación conservada sugiere que la inmunoprecipitación de cromatina era eficiente y reflejaba regiones reales de unión de RIMA al genoma.



**Figura 28. Asociación de RIMA con el extremo 3' de genes U2 snARN.** Se muestra la distribución de lecturas en muestras de cromatina inmunopurificadas con el anticuerpo  $\alpha$ -RIMA (paneles superiores) o con el suero preimmune del mismo conejo (paneles inferiores) en los genes U2-5/AT5G09585 y U2-7/AT5G61455.

En las regiones intergénicas donde RIMA se une, la orientación de los genes adyacentes no es aleatoria, sino que está significativamente deplecionada la orientación cola a cola (9.2% cola a cola, frente a 30.2% cabeza a cabeza y 53.3% en la misma orientación) lo que indica que RIMA se localiza preferentemente en regiones promotoras de genes. De hecho, en un 64.4% de los casos, el pico de lecturas se localiza en las zonas proximales de promotores (a menos de 1Kb de distancia al TSS), regiones que contienen numerosas secuencias reguladoras y donde se ensambla el complejo de iniciación de la Pol II. Además, cerca del 90% de los picos se localizan en promotores de genes codificantes de proteínas y están sobrerrepresentados en los promotores de genes de proteínas ribosomales (presente en los promotores de 91 proteínas ribosomales). Un análisis de enriquecimiento de motivos en las regiones intergénicas a las que se une RIMA desveló un enriquecimiento altísimo de la secuencia TGGGC(T/C) (Figura 29,  $p < 10^{-608}$ , Meme

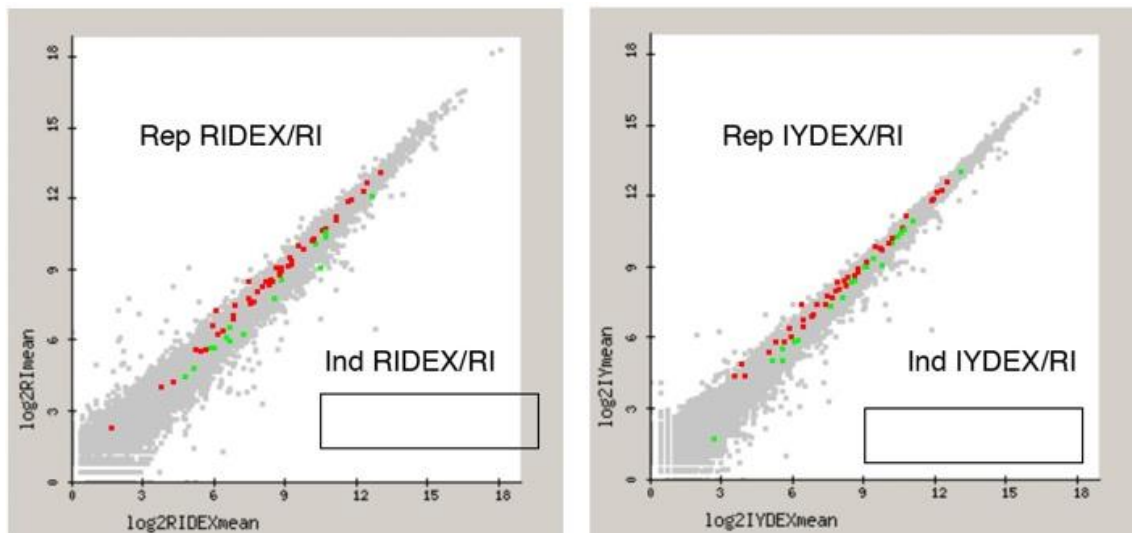
suite). El 82% de las regiones promotoras sobre las que se sitúa el pico de lecturas asociadas a RIMA contienen esta secuencia, con una media de 2,5 repeticiones por región promotora. La secuencia se corresponde con el elemento cis regulador “Site II element” (motivo sII) relacionado con expresión específica en tejidos meristemáticos y células en proliferación y con los promotores de proteínas ribosomales (Kosugi et al., 1995; Kosugi y Ohashi, 2002; Trémousaygue et al., 2003; Li et al., 2005; Xiong et al., 2021). De hecho, el motivo está presente en los promotores de las 91 genes de proteínas ribosomales unidos por RIMA.



**Figura 29. RIMA se une a regiones enriquecidas en el elemento sII.** Se muestra el logo de la secuencia consenso más enriquecida entre las regiones a las que se une RIMA.

El motivo sII es reconocido por factores transcripcionales de la familia TCP (Trémousaygue et al., 2003; Giraud et al., 2010; González-Grandio et al., 2013; Davière et al., 2014; Franco-Zorrilla et al., 2014), que tienen un papel fundamental en el crecimiento de meristemas y órganos y en la transición de proliferación a elongación, a través del control de la expresión de genes de ciclo celular y de las síntesis y señalización de hormonas (Nicolas y Cubas, 2016; Sarvepalli y Nath, 2018). En particular el motivo sII está enriquecido en un set de 63 genes activadores del crecimiento de yemas axilares, que se activan al decapitar las plantas y se reprimen en respuesta al sombreado de una forma dependiente de BRC1/TPC18 (González-Grandío et al., 2013). Al analizar esos 63

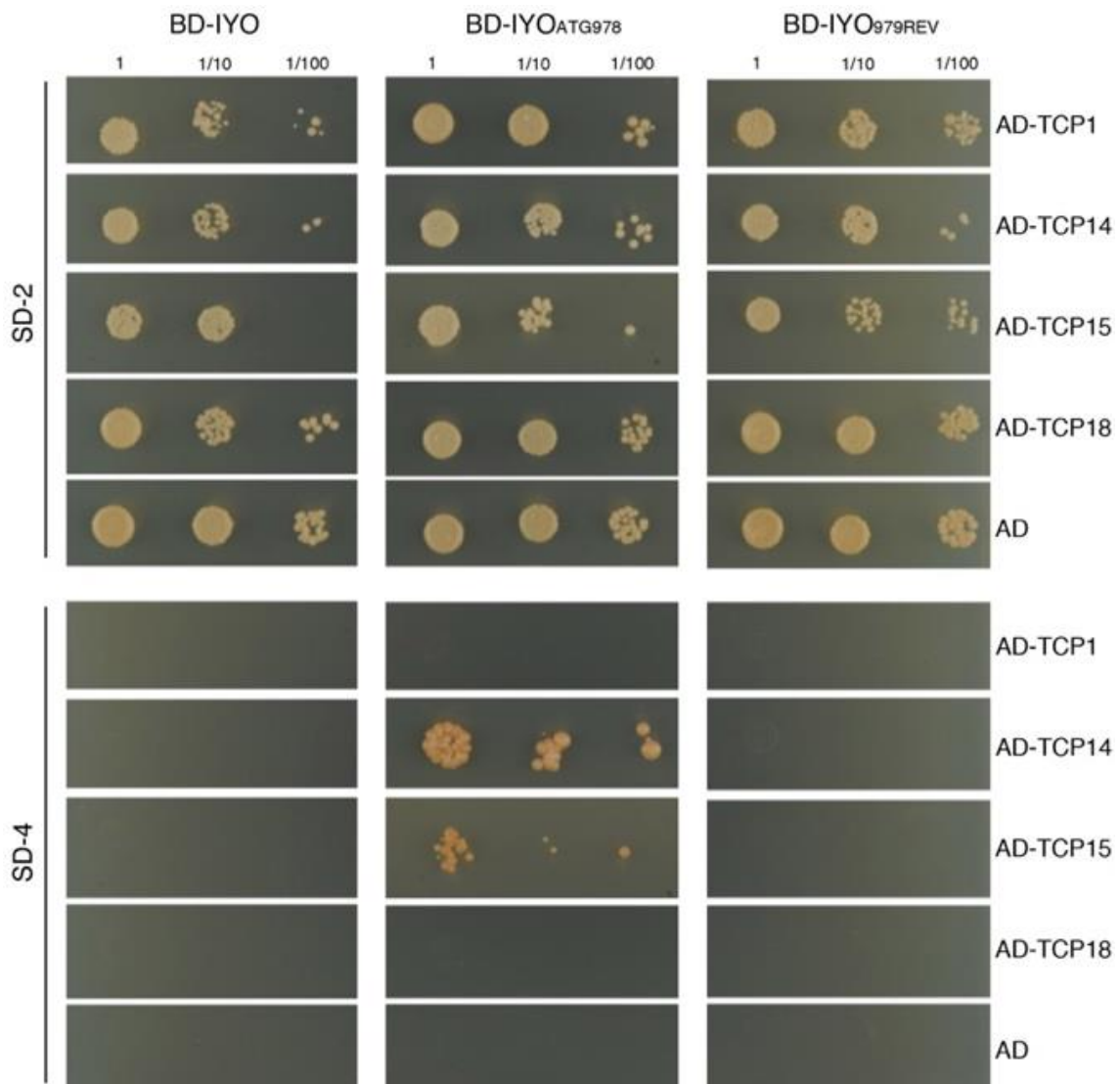
genes en los experimentos se constata que una mayoría se reprime al silenciar RIMA o IYO (48 de 63 genes reprimidos en RIDEX/RI y 42 de 63 genes reprimidos en IYDEX/IY, Figura 30).



**Figura 30. El silenciamiento de RIMA e IYO reprime la expresión de genes activadores del crecimiento de yemas axilares.** Se muestra la expresión ( $\log_2$  FPKM de la media) en las muestras RIDEX y RI (panel izquierda) e IYDEX e IY (panel derecha). Los 63 genes definidos como activadores de las yemas axilares (Gonzalez-Grandío et al., 2013) están resaltados en color en las gráficas, en rojo si están inducidos en los controles y en verde si están inducidos en las plantas silenciadas.

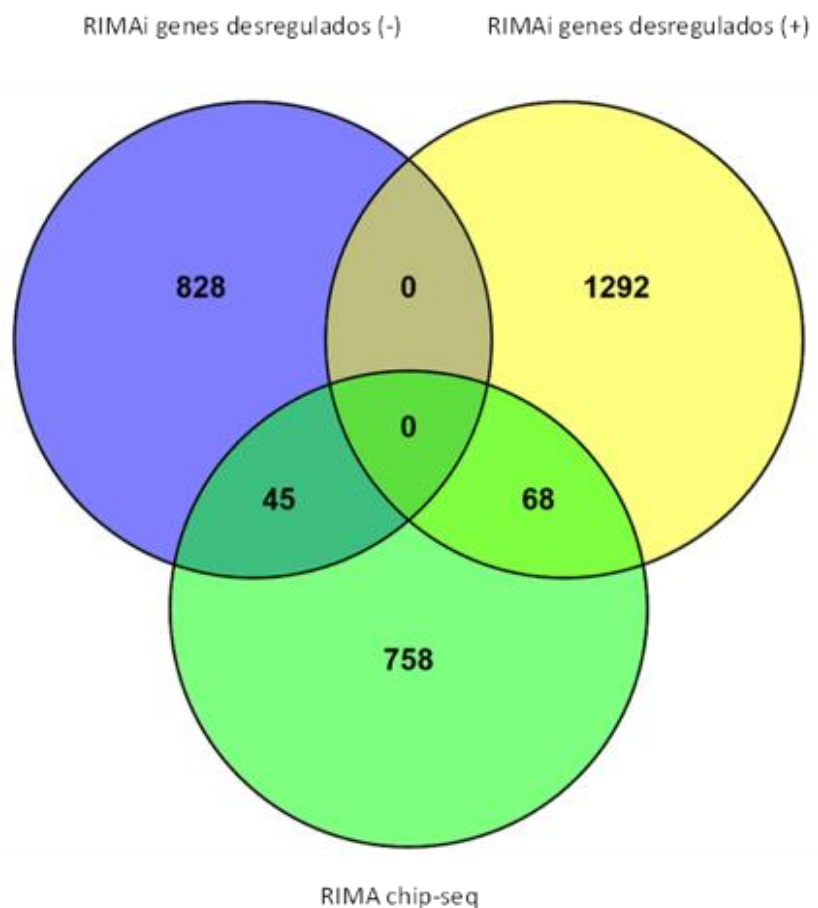
Estos resultados indican una relación de IYO y RIMA con los factores transcripcionales TCP. Para analizar si esta relación se produce por interacción directa realizamos un ensayo de doble híbrido con TCPs de clase I (TCP14 y TCP15) y de clase II (TCP1 y BRC1/TCP18) fusionados al AD. Estos análisis mostraron una interacción específica entre el fragmento N-terminal de IYO (IYOATG978) y los TCPs de clase I, mientras que no se observaba interacción con la proteína completa (IYOFL) o con el fragmento C-terminal (IYO979REV), ni con los TCPs de clase II (Figura 31). Estos resultados indican

que el complejo IYO/RIMA podría asociarse con los motivos sII a través de la interacción de IYO con factores transcripcionales TCP de clase I. En consonancia con estos resultados, ya se ha descrito la interacción directa de RIMA con otros factores transcripcionales implicados en el desarrollo de estomas (Chen et al., 2021), lo que sugiere que el complejo IYO/RIMA puede regular la transcripción a través de interacciones con distintos tipos de factores transcripcionales.



**Figura 31. IYO interacta con TCPs de clase I.** Se muestra el crecimiento de levaduras expresando las proteínas señaladas en los paneles en medio SD-2 y en medio SD-4.

Por otra parte, para profundizar en la caracterización, se cruzaron los datos obtenidos en el Chip-seq con los datos obtenidos en el ARN-seq (Figura 32). Así se pudo constatar que hay 45 genes que tienen a RIMA asociado a su promotor y que se reprimen en muestras silenciadas en *RIMA*, por lo que podrían ser genes activados por RIMA, y 68 genes con RIMA asociado a su promotor y que se activan en las muestras silenciadas, por lo que podrían ser dianas reprimidas por RIMA. Este número de genes es casi 3 veces mayor que el esperado al azar, lo que sugiere que hay una relación entre la unión de RIMA a la zona promotora y su desregulación al inactivar RIMA.



**Figura 32. Intersección de los datos Chip-seq y ARN-seq:** de los posibles genes diana de RIMA (RIMA chip-seq), 45 están en RIMAi genes desregulados (-) y 68 en RIMAi genes desregulados (+).

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

La transcripción mediada por Pol II durante la diferenciación celular es un proceso extraordinariamente complejo sujeto a múltiples puntos de control críticos y coordinado por la intervención de numerosos factores que regulan su avance a lo largo de la cromatina (Hsin y Manley, 2012). En esta tesis se presentan resultados que apoyan que el complejo IYO/RIMA es fundamental en la modulación de la Pol II durante varias fases de la transcripción.

### 5.1 Papel del complejo IYO/RIMA en la iniciación y en la transición a elongación productiva

Las modificaciones post-traduccionales del CTD, y en particular su fosforilación-defosforilación, son un mecanismo fundamental para controlar la actividad de la Pol II y su transición a las distintas fases de la transcripción (Ni et al., 2011; Peck et al., 2019). La Pol II se une al promotor en una forma defosforilada que se fosforila primero en la serina 5 del CTD para escapar del promotor e iniciar la transcripción. En muchos casos, se produce después una parada en la transcripción hasta que la Pol II se fosforila en la serina 2 y se defosforila progresivamente en la serina 5, para entrar en elongación productiva (Rimel y Taatjes, 2018; Peck et al., 2019; Li et al., 2018). Estudios previos han propuesto que los ortólogos de RIMA en levaduras y animales, RTR1 y RPAP2, actúan como fosfatasas defosforilando la serina 5 del CTD durante la transición a elongación productiva en el cuerpo de los genes (Gibney et al., 2008; Mosley et al., 2009; Egloff et al., 2012; Wani et al., 2014; Ni et al., 2014). Los resultados de esta tesis aportan evidencias consistentes con estos resultados, mostrando que RIMA modula el fosfoestado del CTD. Los ensayos de inmunoprecipitación indican que RIMA promueve, de una forma dependiente de *IYO*, la transición de la Pol II hipofosforilada a una forma

hiperfosforilada en serina 2. Este efecto se ve en la Pol II asociada a RIMA, sin percibirse cambios en el patrón de fosforilación de la Pol II total en los mutantes *iyo-1* y *rima-2*, ni tampoco al sobreexpresar la versión mutante RIMA C94A/C98A (94/98-HA). Por tanto, el complejo IYO/RIMA sería esencial para promover la entrada en elongación productiva de la Pol II, pero sólo a una fracción de esta, a la que se asocia. El hecho de que el efecto sobre la Pol II total no sea perceptible podría indicar que el complejo IYO/RIMA regula esta fase de la transcripción en un número limitado de genes. El fosfoestado de la Pol II se analizó en extractos de plántulas de 10 días, así que el limitado efecto detectado no es debido a que se examinó un restringido tipo celular. En los ensayos de ChIP-seq en plántulas de 8 días se identificaron 871 regiones a las que se une RIMA. Es posible que sea en estos genes en los que RIMA promueve la transición de la Pol II a elongación productiva. Alternativamente, es posible que el complejo IYO/RIMA regule a una escala mucho más amplia esta transición, pero que al ser los mutantes *iyo-1* y *rima-2* hipomórficos no se detecte una bajada global en la fosforilación de la Pol II. De igual manera, por cuestiones de sensibilidad, los ensayos de ChIP-seq pueden estar detectando únicamente los picos mayoritarios de RIMA unida al genoma. También es posible que RIMA una vez iniciada la transcripción esté asociada a proteínas que la enmascaren y bloqueen su reconocimiento por parte de los anticuerpos o incluso que eviten su enlace (“cross-linking”) al ADN durante la fijación con formaldehído de la cromatina, lo que impediría su detección por ChIP. Por tanto, con estos datos podemos concluir que el complejo IYO/RIMA regula a la Pol II durante el inicio de la transcripción y la transición a elongación productiva, pero no podemos asegurar cómo de global es esta regulación.

En apoyo del papel de IYO/RIMA en etapas tempranas de la transcripción, hemos detectado su interacción con factores centrales que regulan a la Pol II durante estas etapas, como son las interacciones de IYO con ADA2B y MED18 y de RIMA con ELO1, LEO1,

CDK9 y GCN5. Es destacable que estas interacciones parecen conservadas a lo largo de la evolución, si bien en algunos casos están intercambiadas entre los ortólogos de IYO y RIMA. Así, es RBA50, el ortólogo de IYO, el que co-purifica con GCN5 (Lee et al., 2011) y RTR1, el ortólogo de RIMA, el que interacciona con ADA2 (Costanzo et al., 2010) en levaduras. Por otro lado, se ha descrito que RTR1 interacciona con ELO1 y LEO1 (Smith-Kinnaman et al., 2014) y que RPAP2 interacciona con MED18 (Huttlin et al., 2017) en humanos. El análisis conjunto de los datos por tanto sugiere que es el complejo IYO/RIMA el que interacciona con estos factores reguladores de la transcripción funcionando como una plataforma integradora.

La interacción con GCN5, ADA2B y MED18 de los complejos SAGA y Mediator indica que el complejo IYO/RIMA podría participar en la remodelación de la cromatina y el posterior reclutamiento de la Pol II para formar el PIC (Kim et al., 2018; Vlachonasis et al., 2021; Schier y Taatjes, 2021). Esto sería consistente con la distribución de RIMA en la zona proximal de los promotores. En este sentido sería interesante determinar si el patrón de acetilación de histonas se modifica en los mutantes *iyo* y *rima*, en particular en los promotores unidos por RIMA y en ese caso, si es dependiente de la actividad histona acetiltransferasa del módulo GCN5-ADA2B del complejo SAGA. Además de este posible papel en la iniciación de la transcripción, consistente con la distribución de RIMA en la cromatina y la interacción con subunidades de los complejos Mediator y SAGA, la interacción de RIMA con ELO1, LEO1 y CDK9 y de IYO con el complejo Elongator (Sanmartín et al., 2011) apoyan fuertemente una función en elongación transcripcional. La interacción con CDK9, la subunidad quinasa del complejo P-TEFb, implica que el complejo IYO/RIMA podría regular directamente al factor responsable de la fosforilación de la serina 2 del CTD y la transición de la Pol II entre el estado pausado y la elongación productiva (Li et al., 2018). Teniendo en cuenta el efecto sobre el fosfoestado del CTD

de la polimerasa asociada a RIMA en el mutante *iy0-1*, es muy probable que IYO y RIMA ejerzan una regulación positiva sobre P-TEFb, promoviendo la fosforilación de la serina 2. Asimismo, IYO/RIMA a través de su interacción con la subunidad LEO1 puede favorecer la asociación de Pol II con complejo PAF1 que es necesario para la transcripción en todas sus fases, incluyendo para reclutar al complejo P-TEFb y promover la transición a elongación (Van Oss et al., 2017; Francette et al., 2021). En una publicación reciente se ha reportado que IYO co-inmunoprecipita con SPT4 y que RIMA co-precipita con SPT6L, TFIIIS y SPT4 (Antosz et al., 2017). En levaduras también se ha descrito la interacción de RTR1 con SPT4, SPT5 y SPT16, que se asocia con SPT6L (McWhite et al., 2020). Estas interacciones mantenidas a lo largo de la evolución amplían el rango de factores implicados en la iniciación y la elongación con los que interactúa el complejo IYO/RIMA. La transcripción de la cromatina es un proceso muy complejo durante el cual la Pol II pasa por varios puntos críticos que son fundamentales para determinar los niveles de transcripción finales y en los que incluso la polimerasa se puede parar (Palangat y Larson, 2012). Por ello, no es sorprendente que IYO y RIMA puedan interactuar con un gran número de proteínas para posibilitar el avance y la transcripción efectiva. En este sentido sería interesante establecer mediante ensayos genéticos y moleculares, la contribución exacta de cada uno de ellos a la función de IYO y RIMA, y en particular a su rol en la diferenciación y el desarrollo de las plantas.

## **5.2 Papel del complejo IYO/RIMA en la terminación de la transcripción**

El análisis de ARN-seq reveló que en las plantas silenciadas en *IYO* y *RIMA* se produce un acortamiento muy generalizado del 3'UTR de los transcritos de ARNm. Esto sugiere que IYO y RIMA participarían de manera directa en la terminación de la transcripción y regularían la poliadenilación alternativa. De hecho, los genes en los que se observa el

acortamiento del 3'UTR son genes para los que existen evidencias de poliadenilación alternativa en plantas silvestres. (Wu et al., 2011). Esta función del complejo IYO/RIMA en terminación de la transcripción de ARNms es reminiscente del papel que se había reportado para RPAP2 en el reclutamiento del complejo Integrator para la terminación de la transcripción de snARNs (Egloff et al., 2012). En este sentido, en los ensayos de inmunoprecipitación hemos constatado que RIMA se une al cuerpo de los U2 snARNs de *Arabidopsis* con un máximo de unión en la caja 3', que es esencial para el procesamiento del snARN, lo que apoya su función en terminación de estos transcritos. Además, recientemente se han publicado trabajos que apuntan a un papel de RPAP2 en el procesamiento 3' de ARNms (Wani et al., 2014) y de RTR1 en la terminación de la transcripción (Fox et al., 2019; Victorino et al., 2020).

Otra evidencia que corrobora la implicación de RIMA en la terminación transcripcional es su interacción física con las fosfatasas TOPP de tipo PP1, lo que concuerda además con la interacción entre RPAP2 y la fosfatasa PP1 detectada en células humanas (Jerónimo et al., 2007; Huttlin et al., 2021). Las fosfatasas PP1 son factores fundamentales en la terminación de la transcripción, el procesamiento 3' del transcrito y la poliadenilación. Son responsables de defosforilar la treonina 4 del CTD y al factor de elongación SPT5 para atenuar el avance de la Pol II y permitir así que se termine la transcripción (Kecman et al., 2018). Además, defosforilan la tirosina 1 del CTD que coordina el reclutamiento de componentes del complejo de corte y poliadenilación (Schreieck et al., 2014). Al comparar las secuencias de RIMA en plantas localizamos un dominio conservado que se ajusta al consenso descrito para el motivo de unión a PP1s de proteínas animales (Meiselbach et al., 2006). Mediante mutagénesis dirigida de este dominio hemos demostrado que es esencial para la interacción de RIMA con PP1s en un sistema semi-*in vitro* de levaduras. Sin embargo, en plantas la mutación del dominio

reduce, pero no bloquea, la interacción con las TOPPs y además las construcciones mutadas en el dominio son capaces de complementar el mutante letal embrionario *rima-1*. Este sorprendente resultado podría deberse a la transcomplementación de los alelos, ya que hemos constatado que RIMA interactúa consigo mismo y que el alelo *rima-1* genera una proteína mutante que se expresa a niveles parecidos a la silvestre. Esta posibilidad tendrá que ser comprobada con alelos que eliminen el motivo de unión a PP1 en la proteína endógena.

La función del complejo IYO/RIMA en la regulación de la terminación transcripcional y de la poliadenilación alternativa es muy reveladora, ya que se han descrito cambios muy importantes en los patrones de poliadenilación que coinciden con la transición entre proliferación y diferenciación de células madre en sistemas animales (Sommerkamp et al., 2021). En estos sistemas se ha descrito que la diferenciación implica un alargamiento de los 3'UTR, mientras que la reprogramación a un estado pluripotente provoca su acortamiento (Ji y Tian 2009; Ji et al., 2009; Mueller et al. 2013; Sommerkamp et al., 2021). Se ha propuesto que el alargamiento del 3'UTR durante la diferenciación añade elementos reguladores de la expresión génica (p.ej. de la estabilidad del transcrito) que son importantes para definir patrones de expresión específicos para los distintos tipos celulares. Por tanto, es probable que la regulación de la longitud de los 3'UTR sea un mecanismo importante, si no el principal, por el que el complejo IYO/RIMA activa la diferenciación en plantas.

### 5.3 Papel de RIMA en el importe nuclear

Los mutantes de RPAP1/IYO/RBA50 y de RPAP2/RIMA/RTR1 en levaduras, animales y plantas muestran un defecto en la acumulación en el núcleo de la Pol II, por lo que se ha propuesto que podría participar en el importe a núcleo de la polimerasa (Zeng et al., 2018; Li et al., 2018; Gomez-Navarro y Estruch, 2015; Forget et al, 2013; Chen et al., 2021). Sin embargo, estos resultados no esclarecen si RPAP1/IYO/RBA50 y RPAP2/RIMA/RTR1 están directamente implicados en el importe (o en la inhibición del exporte) de la Pol II o si su ausencia afecta indirectamente a las distribución subcelular de las subunidades, por ejemplo, provocando el desensamblaje de la polimerasa y el exporte subsecuente de las subunidades al citosol (Forget et al., 2010). Una posibilidad es que IYO y RIMA no sean parte de la maquinaria de importe, pero que sí acompañen a la polimerasa en su transporte a través del poro nuclear y aporten motivos o actividades necesarias para ese importe. En ese sentido, las subunidades de la polimerasa no tienen NLS, por lo que se supone que entran al núcleo asociadas a otras proteínas como IWR1 que interaccionaría con la Pol II ensamblada en el citosol y aportaría su NLS para importar el complejo usando la ruta canónica dependiente de importinas (Czeko et al., 2011). De modo similar, IYO podría importar a la Pol II o al subcomplejo RPB2/RPB3 usando los NLSs presentes en su secuencia (Contreras et al., 2019). Por otra parte, RIMA podría también facilitar el importe de la Pol II a través de su interacción con la nucleoporina NUP53 detectada en esta tesis. De hecho, predicciones de la estructura de RTR1 revelan similitud con importinas (Gómez-Navarro y Estruch, 2015), receptores de NLS que median el importe de sustratos gracias a su interacción con dominios FG de las nucleoporinas (Gómez-Navarro et al., 2013), como los que presenta NUP53.

#### 5.4 Efectos del silenciamiento de *IYO* y *RIMA* en el transcriptoma

La gran similitud en los cambios transcripcionales que ocurren al silenciar *IYO* y *RIMA* apoyan la conclusión de que funcionan como un complejo regulador de la transcripción, algo que ya se intuía por resultados previos que mostraban alteraciones semejantes del transcriptoma en los mutantes hipomorfos *iy0-1* y *rima-2* (Sanmartín et al, 2011; Muñoz et al., 2017). Los programas transcripcionales responsables en plantas de la transición entre la pluripotencia y la diferenciación no están definidos por lo que no es obvio determinar si el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* afecta la expresión de genes que dirijan estos procesos. Sin embargo, sí se ha detectado un enriquecimiento entre los genes inducidos al silenciar *IYO* y *RIMA* de genes activados por *WIND1* o durante la formación de callos, sugiriendo que el silenciamiento de *IYO* y *RIMA* provoca un aumento de células en un estado indiferenciado. Entre los genes que se reprimen en las plantas silenciadas destaca la represión global observada de genes de proteínas ribosomales. En el genoma de *Arabidopsis* hay 415 genes nucleares que codifican proteínas ribosomales y la gran mayoría de ellos se reprimen al silenciarse *IYO* y *RIMA*. Además, las proteínas ribosomales están enriquecidas entre los genes a los que se une *RIMA* en sus promotores, lo que sugiere que el complejo *IYO/RIMA* puede estar directamente implicado en activar su expresión. En *Arabidopsis* cada familia de proteínas ribosomales está codificada por entre 2 y 7 parálogos, que comparten entre 65-100% de identidad en sus secuencias aminoacídicas (Barakat et al., 2001). Esta proliferación de parálogos de proteínas ribosomales es mucho más pronunciado en los genomas de plantas que en levaduras y animales, lo que permite modular finamente respuestas adaptativas y de desarrollo (Giavalisco et al., 2005; Carroll, AJ., 2013). Las poblaciones ribosomales son dependientes del estadio de desarrollo y del tipo de tejido (Koyama et al., 1996) y se alteran en función de los estímulos ambientales (Hummel et al., 2012). Sin embargo, la

expresión de la mayoría de los genes de proteínas ribosomales de diferentes familias fluctúa coordinadamente, sugiriendo que hay un alto nivel de co-regulación transcripcional (Xiong et al., 2021). En este sentido, más de la mitad de los genes de proteínas ribosomales presentan motivos sII en la zona proximal de sus promotores. Entre los genes con múltiples copias de este motivo, están sobrerrepresentados significativamente las proteínas ribosomales, que los requieren para expresarse a niveles altos (Li et al., 2005). El motivo sII se identificó por primera vez en arroz (Kosugi et al., 1995) y se reportó que era reconocido por los factores de transcripción de la clase I TCP6, TCP11 y TCP20 (Kosugi y Ohashi, 2002; Trémousaygue et al., 2003; Li et al., 2005). En conjunto, los resultados de esta tesis sugieren que IYO y RIMA pueden unirse a los promotores de genes de proteínas ribosomales, mediante su interacción con TCPs de clase I unidos al motivo sII y activar coordinadamente su expresión. Esta inducción concertada podría aumentar la capacidad de síntesis de proteína, lo que puede requerirse para la diferenciación de células madre. De hecho, se ha reportado recientemente que, en sistemas animales, las células madre tienen bajos niveles de síntesis de proteínas y que su diferenciación requiere aumentarlos (Saba, et al., 2021). Asimismo, en rastreos para identificar factores implicados en la diferenciación de células madre embrionarias de ratón se encontraron mutaciones en genes de proteínas ribosomales (Fortier et al., 2015). Además, en plantas, mutantes en genes de proteínas ribosomales tienen alteraciones en el desarrollo y la diferenciación que también se observan en los mutantes *iyoy* y *rima*, como son una organogénesis defectuosa y la expresión ectópica de marcadores de células madre (Horiguchi et al. 2012) y retrasos en la regeneración de raíces (Ibáñez et al., 2019). Esto apoya que la activación de la expresión de genes de proteínas ribosomales por IYO y RIMA es importante para su actividad prodiferenciación.

## 5.5 Posibles dianas directas de IYO y RIMA

El análisis de CHIP-seq reveló que RIMA se une a la cromatina y se asocia a promotores de genes codificantes. Entre los genes a los que se une RIMA se detecta un enriquecimiento de genes de proteínas ribosomales, lo que concuerda con su desregulación. Por otro lado, cerca del 20% son genes que están implicados en regulación de la transcripción y de los cuales 85 son FTs- una décima parte de la totalidad de los genes diana. Entre ellos se puede destacar SHR, GRF2, MAF5, AGL77, WOX2, WOX4, GATA5 y algunos LBDs muy relacionados todos ellos con procesos de diferenciación celular. Un 16% son quinasas (SnRK2.3, SnRK2.4, RLK, MAPKKK20, MKK9, UNICORN, ERL1) y receptores LRR enriquecidos en Leucinas (PSY1R, PXY) que participan en muchos procesos de transducción de señales para, finalmente, terminar incidiendo sobre la función de FTs muy diversos. Esto podría sugerir que RIMA contribuye a la diferenciación regulando la expresión de genes cuya actividad dota a las células de una capacidad de respuestas frente a estímulos, tanto internos como externos, mucho mayor en comparación con las células no diferenciadas. Es decir, la planta se vuelve fisiológicamente mucho más activa y en este sentido, entre los genes diana de RIMA también se encuentran algunos de asimilación de agua (PIP1C, PIP3) y de asimilación de nitrógeno (NRT1.1, NRT2.1, NIA2), por ejemplo.

En definitiva, el análisis global de todos los datos obtenidos en esta tesis indica que el complejo IYO/RIMA participa en la transcripción mediada por Pol II desde la iniciación hasta la terminación. Su interacción con reguladores centrales de la transcripción sugiere que funciona como una plataforma integradora para reclutar estos factores necesarios para que la Pol II pueda continuar con la transcripción. Los análisis transcriptómicos y de CHIP-seq sugieren posibles mecanismos y dianas transcripcionales de IYO y RIMA que serían responsables de la activación de la diferenciación.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. RIMA se asocia a la ARN polimerasa II en su forma hiperfosforilada y transcripcionalmente activa
2. *IYO* es necesario para que la polimerasa II asociada a RIMA pase de un estado hipofosforilado al hiperfosforilado
3. *IYO* y RIMA interactúan con reguladores centrales de la transcripción mediada por Pol II como ADA2B, MED18, GCN5, CDK9, ELO1, LEO1
4. RIMA interactúa con fosfatasas del tipo PP1 a través del motivo conservado RSVTW presente en su secuencia aminoacídica
5. El silenciamiento de *IYO* y *RIMA* induce la expresión de genes relacionados con la pluripotencia, la formación de callos y la regeneración, incluyendo la expresión de *WOX14* y *NAC1*, dos reguladores centrales de estos procesos
6. El silenciamiento de *IYO* y *RIMA* reprime globalmente la expresión de genes que codifican proteínas ribosomales
7. El silenciamiento de *IYO* y *RIMA* provoca el acortamiento del 3'UTR de una forma muy global
8. El secuestro de *IYO*-GFP y *RIMA*-GFP con nanoanticuerpos anclados en la membrana de las mitocondrias es muy eficiente y puede ser usado para eliminar la función de estos genes
9. RIMA se une a la caja conservada del extremo 3' de los genes U2 snARN
10. RIMA se une a la cromatina en regiones promotoras de genes que contienen el motivo sII reconocido por factores transcripcionales de la familia TCP
11. *IYO* interactúa con factores TCP de clase I
12. Los genes a cuyos promotores se une RIMA están enriquecidos entre el conjunto de genes desregulados al silenciar *IYO* y *RIMA*, que podrían ser dianas directas

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Akhtar, M. S., Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD, Eick D, Ansari AZ. TFIIF Kinase Places Bivalent Marks on the Carboxy-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Mol. Cell* **34**, 387–393 (2009).

Antosz, W., Pfab A, Ehrnsberger HF, Holzinger P, Köllen K., *et al.* The composition of the arabidopsis RNA polymerase II transcript elongation complex reveals the interplay between elongation and mRNA processing factors. *Plant Cell* **29**, 854–870 (2017).

Aoi, Y., Takahashi YH, Shah AP, Iwanaszko M, Rendleman EJ., *et al.* SPT5 stabilization of promoter-proximal RNA polymerase II. *Mol. Cell* **81**, 4413-4424.e5 (2021).

Ausin, I., Greenberg MV, Simanshu DK, Hale CJ, Vashisht AA., *et al.* Involved in De Novo 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8374–8381 (2012).

Barakat, A., Szick-Miranda K, Chang IF, Guyot R, Blanc G, Cooke R, Delseny M, Bailey-Serres J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. *Plant Physiol.* **127**, 398–415 (2001).

Benfey, P. N. Defining the Path from Stem Cells to Differentiated Tissue. *Current Topics in Developmental Biology* **vol. 116** (Elsevier Inc., 2016).

Boulon, S., Pradet-Balade B, Verheggen C, Molle D, Boireau S, Georgieva M, Azzag K. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **39**, 912–924 (2010).

Buendía-Monreal, M. & Gillmor, C. S. Mediator: A key regulator of plant development. *Dev. Biol.* **419**, 7–18 (2016).

Caggiano, M. P., Yu X, Bhatia N, Larsson A, Ram H, *et al.* Cell type boundaries organize plant development. *Elife* **6**, 1–32 (2017).

Caroll, A. J. The Arabidopsis cytosolic ribosomal proteome: From form to function. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–14 (2013).

Chapman RD, Heidemann M, Albert TK, Mailhammer R, Flatley A, *et al.* Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science.* **318**, 1780–1783 (2007).

Chen, C.C., Fu SF, Lee YI, *et al.* Transcriptome analysis of age-related gain of callus-forming capacity in arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1457–1469 (2012).

Chen, L., Sun, B., Xu, L. & Liu, W. Wound signaling: The missing link in plant regeneration. *Plant Signal. Behav.* **11**, 1–3 (2016).

Chen, L., Zhao M, Wu Z, Chen S, Rojo E, *et al.* RNA polymerase II associated proteins regulate stomatal development through direct interaction with stomatal transcription factors in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **230**, 171–189 (2021).

Chen, X., Qi Y, Wang X, Wang L, Song A, *et al.* RPAP2 regulates a transcription initiation checkpoint by prohibiting assembly of preinitiation complex. *bioRxiv* 2021.06.18.448918 (2021).

Chuang, C. F. & Meyerowitz, E. M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4985–4990 (2000).

Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743 (1998).

Contreras, R. La partición núcleo - citoplásmica de IYO como interruptor binario de la diferenciación. (2018). Universidad Autónoma de Madrid.

Corden, J. L. RNA polymerase II C-terminal domain: Tethering transcription to transcript and template. *Chem. Rev.* **113**, 8423–8455 (2013).

Core, L. & Adelman, K. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: A nexus of gene regulation. *Genes Dev.* **33**, 960–982 (2019).

Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, *et al.* The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425-31 (2010).

Czeko, E., Seizl, M., Augsberger, C., Mielke, T. & Cramer, P. Iwr1 Directs RNA Polymerase II Nuclear Import. *Mol. Cell.* **42**, 261–266 (2011).

Davière, J. M., Wild M, Regnault T, Baumberger N, Eisler H, Genschik P, Achard P. Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr. Biol.* **24**, 1923–1928 (2014).

Dollinger, R. & Gilmour, D. S. Regulation of Promoter Proximal Pausing of RNA Polymerase II in Metazoans. *J. Mol. Biol.* **433**, 166897 (2021).

Eaton, J. D. & West, S. Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM!  
*Trends Genet.* **36**, 664–675 (2020).

Egloff, S., Dienstbier, M. & Murphy, S. Updating the RNA polymerase CTD code:  
Adding gene-specific layers. *Trends Genet.* **28**, 333–341 (2012).

Eick, D. & Geyer, M. The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code.  
*Chem. Rev.* **11**, 8456-90 (2013).

Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishr, L. & Turner, S. R. WOX4 and WOX14 act  
downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation  
independently of any role in vascular organisation. *Dev.* **140**, 2224–2234 (2013).

Fal, K., Cortes M, Liu M, Collaudin S, Das P, Hamant O, Trehin C. Paf1c defects  
challenge the robustness of flower meristem termination in *Arabidopsis thaliana*. *Dev.*  
**146**, 1–9 (2019).

Fianu, I., Dienemann, C., Aibara, S., Schilbach, S. & Cramer, P. Cryo-EM structure of  
mammalian RNA polymerase II in complex with human RPAP2. *Commun. Biol.* **4**, 1–7  
(2021).

Fields, S. & Song, O. K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions.  
*Nature.* **340**, 245–246 (1989).

Forget, D., Lacombe AA, Cloutier P, Al-Khoury R, Bouchard A, *et al.* The protein  
interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved  
GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of  
RNA polymerase II. *Mol. Cell. Proteomics.* **9**, 2827–2839 (2010).

Forget, D., Lacombe AA, Cloutier P, Lavallée-Adam M, Blanchette M, Coulombe B. Nuclear import of RNA polymerase II is coupled with nucleocytoplasmic shuttling of the RNA polymerase II-associated protein 2. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6881–6891 (2013).

Fortier, S., MacRaea, T., Bilodeau, M., Sargeant, T. & Sauvageau, G. Haploinsufficiency screen highlights two distinct groups of ribosomal protein genes essential for embryonic stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2127–2132 (2015).

Francette, A. M., Tripplehorn, S. A. & Arndt, K. M. The Paf1 Complex: A Keystone of Nuclear Regulation Operating at the Interface of Transcription and Chromatin. *J. Mol. Biol.* **433**, 166979 (2021).

Franco-Zorrilla, J. M., López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2367–2372 (2014).

Gaillochet, C. & Lohmann, J. U. The never-ending story: From pluripotency to plant developmental plasticity. *Dev.* **142**, 2237–2249 (2015).

García, C. Tracing and characterization of supressors and enhancers of the *rima-2* mutant in *Arabidopsis thaliana*. Centro Nacional de Biotecnología. Master's Degree in Biotechnology (2021).

Garrido-Godino, A. I., Gutiérrez-Santiago, F. & Navarro, F. Biogenesis of RNA Polymerases in Yeast. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 1–10 (2021).

Giavalisco, P., Wilson D, Kreitler T, Lehrach H, Klose J, Gobom J, Fucini P. High heterogeneity within the ribosomal proteins of the Arabidopsis thaliana 80S ribosome. *Plant Mol. Biol.* **57**, 577–591 (2005).

Gibney, P. A., Fries, T., Bailer, S. M. & Morano, K. A. Rtr1 is the Saccharomyces cerevisiae homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins. *Eukaryot. Cell.* **7**, 938–948 (2008).

Giraud, E., S, Carrie C, Duncan O, Low J, Lee CP, Van Aken O, Millar AH, Murcha M, Whelan J. TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell.* **22**, 3921–3934 (2010).

Gleave, A. P. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1203–1207 (1992).

Gómez-Navarro, N. & Estruch, F. Different pathways for the nuclear import of yeast RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1849**, 1354–1362 (2015).

Gonzalez, M., Blears, D. & Svejstrup, J. Q. Causes and consequences of RNA polymerase II stalling during transcript elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 3–21 (2021).

González-Grandío, E., Poza-Carrión, C., Sorzano, C. O. S. & Cubas, P. Branched1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell*. **25**, 834–850 (2013).

Gopalakrishnan, R. & Winston, F. The histone chaperone Spt6 is required for normal recruitment of the capping enzyme Abd1 to transcribed regions. *J. Biol. Chem.* **279**, 101205 (2021).

Grasser, K. D. The FACT Histone Chaperone: Tuning Gene Transcription in the Chromatin Context to Modulate Plant Growth and Development. *Front. Plant Sci.* **11**, 1–8 (2020).

Haag, J. R. & Pikaard, C. S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: Purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 483–492 (2011).

Harlen, K. M. & Churchman, L. S. The code and beyond: Transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 263–273 (2017).

He, Y. Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Mol. Plant* **2**, 554–564 (2009).

Hoermayer, L. & Friml, J. Targeted cell ablation-based insights into wound healing and restorative patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* **52**, 124–130 (2019).

Holsters, M., de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **163**, 181–187 (1978).

Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J. L. & Tsukaya, H. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Sci.* **191–192**; 24–34 (2012).

Hou, L., Wang Y, Liu Y, Zhang N, Shamovsky I, *et al.* Paf1C regulates RNA polymerase II progression by modulating elongation rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 14583–14592 (2019).

Hsin, J. P. & Manley, J. L. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* **26**, 2119–2137 (2012).

Hsu, P. L., Yang F, Smith-Kinnaman W, Yang W, Song JE, Mosley AL, Varani G. Rtr1 is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates Tyr1 and Ser5 on the RNA polymerase II CTD. *J. Mol. Biol.* **426**, 2970–2981 (2014).

Hu, Z., Ghosh A, Stolze SC, Horváth M, Bai B, *et al.* Gene modification by fast-track recombineering for cellular localization and isolation of components of plant protein complexes. *Plant J.* **100**, 411–429 (2019).

Hummel, M., Cordewener JH, de Groot JC, Smeekens S, America AH, Hanson J. Dynamic protein composition of Arabidopsis thaliana cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MS E proteomics. *Proteomics.* **12**, 1024–1038 (2012).

Hunter, G. O., Fox MJ, Smith-Kinnaman WR, Gogol M, Fleharty B, Mosley AL. Phosphatase Rtr1 Regulates Global Levels of Serine 5 RNA Polymerase II C-Terminal Domain Phosphorylation and Cotranscriptional Histone Methylation. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 2236–2245 (2016).

Huttlin, E. L., Bruckner, R, Paulo, J, *et al.* Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature* **545**, 505–509 (2017).

Huttlin, E. L., Pontano-Vaites L, Navarrete-Perea J, *et al.* Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* **184**, 3022-3040.e28 (2021).

Ibáñez, S., Ruiz-Cano H, Fernández MÁ, Sánchez-García AB, Villanova J., *et al.* A network-guided genetic approach to identify novel regulators of adventitious root formation in arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **10**, 1–15 (2019).

Ikeuchi, M., Favero DS, Sakamoto Y, Iwase A, Coleman D, Rymen B, Sugimoto K. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**, 377–406 (2019).

Irani, S., Yogesha SD, Mayfield J, Zhang M, Zhang Y, *et al.* Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Rtr1 reveals an active site for an atypical phosphatase. *Sci. Signal.* **9**, 1–12 (2016).

Ito, H., Murata, K. & Kimura, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations or Thiol Compounds. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 341–347 (1983).

Itsuki, Y., Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, *et al.* Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Lett.* **582**, 2365–2370 (2008).

Iyer-Pascuzzi, A. S. & Benfey, P. N. Transcriptional networks in root cell fate specification. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1789**, 315–325 (2009).

Iwase, A., Harashima H, Ikeuchi M, *et al.* WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 in arabidopsis. *Plant Cell* **29**, 54–69 (2017).

Iwase, A., Kondo Y, Laohavisit A, *et al.* WIND transcription factors orchestrate wound-induced callus formation, vascular reconnection and defense response in Arabidopsis. *New Phytol.* **232**, 734–752 (2021).

Iwase, A., Mitsuda N, Koyama T, *et al.* The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in arabidopsis. *Curr. Biol.* **21**, 508–514 (2011).

James, P., Halladay, J. & Craig, E. A. James\_Craig\_1996\_Highly\_Effic\_Y2H. *Genetics.* 1–12 (2002).

Jarosz, M., Van Lijsebettens, M. & Woloszynska, M. Plant elongator—protein complex of diverse activities regulates growth, development, and immune responses. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23 (2020).

Jeronimo, C., Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, *et al.* Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Mol. Cell.* **2**, 262–274 (2007).

Jeronimo, C., Langelier MF, Zeghouf M, Cojocar M, Bergeron D, *et al.* RPAP1, a Novel Human RNA Polymerase II-Associated Protein Affinity Purified with Recombinant Wild-Type and Mutated Polymerase Subunits. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7043–7058 (2004).

Ji Z, Lee JY, Pan Z, Jiang B, Tian B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **17**, 7028-33 (2009).

Ji, Z. & Tian, B. Reprogramming of 3' Untranslated Regions of mRNAs by Alternative Polyadenylation in Generation of Pluripotent Stem Cells from Different Cell Types. *PLoS One.* **4**, (2009).

Jouannet, V., Brackmann, K. & Greb, T. (Pro)cambium formation and proliferation: Two sides of the same coin? *Curr. Opin. Plant Biol.* **23**, 54–60 (2015).

Kanno, T., Bucher E, Daxinger L, Huettel B, Kreil DP., *et al.* RNA-directed DNA methylation and plant development require an IWR1-type transcription factor. *EMBO Rep.* **11**, 65–71 (2010).

Kecman, T., Kuš K, Heo DH, Duckett K, Birot A, *et al.* Elongation/Termination Factor Exchange Mediated by PP1 Phosphatase Orchestrates Transcription Termination. *Cell Rep.* **25**, 259-269.e5 (2018).

Kerk, D., Valdés-Tresanco, M.E, Ryan T, Sergei Y, *et al.* Origin of the Phosphoprotein Phosphatase (PPP) sequence family in Bacteria: Critical ancestral sequence changes, radiation patterns and substrate binding features. *Sci Rep.* **11**, 13681 (2021).

Kettenberger, H., Armache, K. J. & Cramer, P. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell.* **114**, 347–357 (2003).

Kim, J., Yang W, Forner J, Lohmann JU, Noh B, Noh YS. Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in Arabidopsis. *EMBO J.* **37**, 1–16 (2018).

Koiwa, H., Hausmann S, Bang WY, Ueda A, Kondo N, *et al.* Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14539–14544 (2004).

Kojima, S., Iwasaki M, Takahashi H, Imai T, Matsumura Y, Fleury D., *et al.* ASYMMETRIC LEAVES2 and elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1259–1273 (2011).

Kosugi S, Suzuka I & Ohashi Y. Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression. *Plant J.* (1995).

Kosugi, S. & Ohashi, Y. DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J.* **30**, 337–348 (2002).

Koyama, K., Wada, A., Maki, Y. & Tanaka, A. Changes in the protein composition of cytoplasmic ribosomes during the greening of etiolated barley leaves. *Physiol. Plant.* **96**, 85–90 (1996).

Kurihara, Y., Kaminuma E, Matsui A, Kawashima M, Tanaka M., *et al.* Transcriptome analyses revealed diverse expression changes in ago1 and hyl1 Arabidopsis mutants. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1715–1720 (2009).

Lee, K. K., Sardi M, Swanson S, *et al.* Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1–12 (2011).

Li, C., Potuschak, T., Colón-Carmona, A., Gutiérrez, R. A. & Doerner, P. Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12978–12983 (2005).

Li, Y., Liu, M., Chen, L. F. & Chen, R. P-TEFb: Finding its ways to release promoter-proximally paused RNA polymerase II. *Transcription.* **9**, 88–94 (2018).

Li, Y., Yuan Y, Fang X, Lu X, Lian B, Zhao G, Qi Y. A role for MINIYO and QUATRE-QUART2 in the assembly of rna polymerases II, IV, and V in arabidopsis. *Plant Cell.* **30**, 466–480 (2018).

Liu HM, Yang D, Liu ZF, Hu SZ, Yan SH, He XW. Density distribution of gene expression profiles and evaluation of using maximal information coefficient to identify differentially expressed genes. *PLoS One.* **7**, e0219551 (2019).

Liu, X., Kraus, W. L. & Bai, X. Ready, pause, go: Regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 516–525 (2015).

Liu, X., Xie D, Hua Y, Zeng P, Ma L, Zeng F. Npa3 interacts with Gpn3 and assembly factor Rba50 for RNA polymerase II biogenesis. *FASEB J.* **34**, 15547–15558 (2020).

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* **25**, 402–408 (2001).

Lodha, M., Marco, C. F. & Timmermans, M. C. P. Genetic and epigenetic regulation of stem cell homeostasis in plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **73**, 243–251 (2008).

Luo, J. & Hall, B. D. A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *J. Mol. Evol.* **64**, 101–112 (2007).

Lynch, C. J., Bernad R, Calvo I, Nóbrega-Pereira S, Ruiz S, *et al.* The RNA Polymerase II Factor RPAP1 Is Critical for Mediator-Driven Transcription and Cell Identity. *Cell Rep.* **22**, 396–410 (2018).

Malik, N., Agarwal, P. & Tyagi, A. Emerging functions of multi-protein complex Mediator with special emphasis on plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**, 475–502 (2017).

Max, T., Søgaaard, M. & Svejstrup, J. Q. Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *J. Biol. Chem.* **282**, 14113–14120 (2007).

Mayer, A., Heidemann M, Lidschreiber M, Schrieck A, Sun M, *et al.* CTD Tyrosine phosphorylation impairs termination factor recruitment to RNA polymerase II. *Science.* **336**, 1723–1725 (2012).

Mayfield JE, Burkholder NT, Zhang YJ. Dephosphorylating eukaryotic RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta.* **4**, 372-87 (2016).

McWhite, C. D., Papoulas O, Drew K, Cox RM, June V, *et al.* A Pan-plant Protein Complex Map Reveals Deep Conservation and Novel Assemblies. *Cell*. **181**, 460-474.e14 (2020).

Meiselbach, H., Sticht, H. & Enz, R. Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: Molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem. Biol.* **13**, 49–59 (2006).

Morffy, N. & Strader, L. C. Plant promoter-proximal pausing? *Nat. Plants*. **7**, 862–863 (2021).

Mosley, A. L., Pattenden SG, Carey M, Venkatesh S, Gilmore JM, *et al.* Rtr1 Is a CTD Phosphatase that Regulates RNA Polymerase II during the Transition from Serine 5 to Serine 2 Phosphorylation. *Mol. Cell*. **34**, 168–178 (2009).

Mueller, A. A., Cheung, T. H. & Rando, T. A. All's well that ends well: Alternative polyadenylation and its implications for stem cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 222–232 (2013).

Muñoz, A., Mangano S, González-García MP, Contreras R, Sauer M, De Rybel B, Weijers D, Sánchez-Serrano JJ, Sanmartín M, Rojo E. RIMA-dependent nuclear accumulation of IYO triggers auxin-irreversible cell differentiation in arabidopsis. *Plant Cell*. **29**, 575–588 (2017).

Nakazawa, Y., Hara Y, Oka Y, Komine O, van den Heuvel D., *et al.* Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair. *Cell*. **180**, 1228-1244.e24 (2020).

Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. *Biol. Rev.* **95**, 1198–1232 (2020).

Nemec, C. M., Yang F, Gilmore JM, Hintermair C, Ho YH, et al. Different phosphoisoforms of RNA polymerase II engage the Rtt103 termination factor in a structurally analogous manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3944–E3953 (2017).

Ni, Z., Olsen JB, Guo X, Zhong G, Ruan ED, et al. Control of the RNA polymerase II phosphorylation state in promoter regions by CTD interaction domain-containing proteins RPRD1A and RPRD1B. *Transcription.* **2**, 237–242 (2011).

Nicolas, M. & Cubas, P. TCP factors: New kids on the signaling block. *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**, 33–41 (2016).

Oh, S., Park, S. & Van Nocker, S. Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in arabidopsis. *PLoS Genet.* **4**, e1000077 (2008).

Palangat, M., & Larson, D. R. Complexity of RNA polymerase II elongation dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, **7**, 667–672. (2012).

Parua, P. K., Booth GT, Sansó M, Benjamin B, Tanny JC, Lis JT, Fisher RP. A Cdk9-PP1 switch regulates the elongation-termination transition of RNA polymerase II. *Nature* **558**, 460–464 (2018).

Peck, S. A., Hughes, K. D., Victorino, J. F. & Mosley, A. L. Writing a wrong: Coupled RNA polymerase II transcription and RNA quality control. *Wiley Interdiscip. Rev.* **10**, 1–22 (2019).

- Ream, T. S., Haag JR, Pontvianne F, Nicora CD, Norbeck AD, Paša-Tolić L, Pikaard CS. Subunit compositions of Arabidopsis RNA polymerases I and III reveal Pol I- and Pol III-specific forms of the AC40 subunit and alternative forms of the C53 subunit. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4163–4178 (2015).
- Rimel, J. K. & Taatjes, D. J. The essential and multifunctional TFIIF complex protein *Sci.* **27**, 1018–1037 (2018).
- Saba, J. A., Liakath-Ali, K., Green, R. & Watt, F. M. Translational control of stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 671–690 (2021).
- Sablowski, R. Plant stem cell niches: From signalling to execution. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 4–9 (2011).
- Sambrook, J., Fritsch EF & Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour laboratory press.* (1989).
- Sanchez, C. G., Teixeira FK, Czech B, Preall JB, Zamparini AL, *et al.* Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell.* **18**, 276–290 (2016).
- Sanmartín, M., Sauer M, Muñoz A, Zouhar J, Ordóñez A, van de Ven WT, Caro E, de la Paz Sánchez M, Raikhel NV, Gutiérrez C, Sánchez-Serrano JJ, Rojo E. A molecular switch for initiating cell differentiation in arabidopsis. *Curr. Biol.* **21**, 999–1008 (2011).
- Sarvepalli, K. & Nath, U. CIN-TCP transcription factors: Transiting cell proliferation in plants. *IUBMB Life.* **70**, 718–731 (2018).

Scheres, B. Stem-cell niches: Nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 345–354 (2007).

Schier, A. C. & Taatjes, D. J. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev.* **34**, 465–488 (2020).

Schrieck, A., Easter AD, Etzold S, Wiederhold K, Lidschreiber M, Cramer P, Passmore LA. RNA polymerase II termination involves CTD tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Europe PMC Funders Group. Nat Struct Mol Biol.* **21**, 175–179 (2014).

Shah, N., Maqbool MA, Yahia Y, El Aabidine AZ, Esnault C, *et al.* Tyrosine-1 of RNA Polymerase II CTD Controls Global Termination of Gene Transcription in Mammals. *Mol. Cell.* **69**, 48-61 (2018).

Sherman, F. Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.* **194**, 3–21 (1991).

Shi, B. & Vernoux, T. Hormonal control of cell identity and growth in the shoot apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **65**, 102111 (2022).

Smit, M. E., McGregor SR, Sun H, Gough C, Bågman AM, *et al.* A PXY-mediated transcriptional network integrates signaling mechanisms to control vascular development in Arabidopsis. *Plant Cell.* **32**, 319–335 (2020).

Smith-Kinnaman, W. R., Berna MJ, Hunter GO, True JD, Hsu P., *et al.* The interactome of the atypical phosphatase Rtr1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* **10**, 1730–1741 (2014).

Sommerkamp, P., Romero-Mulero MC, Narr A, Ladel L, Hustin L, Schönberger K. *et al.* Mouse multipotent progenitor 5 cells are located at the interphase between hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. **137**, 3218–3224 (2021).

Soutourina, J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 262–274 (2018).

Stiller, J. W. & Cook, M. S. Functional unit of the RNA polymerase II C-terminal domain lies within heptapeptide pairs. *Eukaryot. Cell*. **3**, 735–740 (2004).

Takahashi, K. & Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 183–193 (2016).

Thomas, C. L., Schmidt, D., Bayer, E. M., Dreos, R. & Maule, A. J. Arabidopsis plant homeodomain finger proteins operate downstream of auxin accumulation in specifying the vasculature and primary root meristem. *Plant J.* **59**, 426–436 (2009).

Thomas, M. C. & Chiang, C. M. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178 (2006).

Trémousaygue, D., Garnier L, Bardet C, Dabos P, Hervé C, Lescure B. Internal telomeric repeats and ‘TCP domain’ protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in Arabidopsis thaliana cycling cells. *Plant J.* **33**, 957–966 (2003).

Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. & Scheres, B. Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**, 287–289 (1997).

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., & Schell, J. Large plasmid in *agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*. **252**, 169–170 (1974).

Van Oss SB, Cucinotta CE, Arndt KM. Emerging Insights into the Roles of the Paf1 Complex in Gene Regulation. *Trends Biochem Sci*. **10**, 788-798 (2017).

Victorino, J. F., Fox MJ, Smith-Kinnaman WR, Peck Justice SA, Burriss KH, *et al.* RNA Polymerase II CTD phosphatase Rtr1 fine-tunes transcription termination. *PLoS Genetics*. **3**, e1008317 (2020).

Vlachonasios, K., Poullos, S. & Mougou, N. The histone acetyltransferase *gcn5* and the associated coactivators *ada2*: From evolution of the saga complex to the biological roles in plants. *Plants*. **10**, 1–13 (2021).

Walhout, A. J. M. & Vidal, M. A genetic strategy to eliminate self-activator baits prior to high-throughput yeast two-hybrid screens. *Genome Res*. **9**, 1128–1134 (1999).

Wani, S., Hirose, Y. & Ohkuma, Y. Human RNA polymerase II-associated protein 2 (RPAP2) interacts directly with the RNA polymerase II subunit Rpb6 and participates in pre-mRNA 3-end formation. *Drug Discov. Ther*. **8**, 255–261 (2014).

Weake, V. M. & Workman, J. L. Inducible gene expression: Diverse regulatory mechanisms. *Nat. Rev. Genet*. **11**, 426–437 (2010).

Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P. & Helliwell, C. A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol. J*. **3**, 583–590 (2005).

Wild, T. & Cramer, P. Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 99–105 (2012).

Willoughby, A. C. & Nimchuk, Z. L. WOX going on: CLE peptides in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **63**, 102056 (2021).

Winkler, J., De Meyer A, Mylle E, Storme V, Grones P, Van Damme D. Nanobody-Dependent Delocalization of Endocytic Machinery in Arabidopsis Root Cells Dampens Their Internalization. *Capacity. Front. Plant Sci.* **12**, 538580 (2021).

Wu, X., Liu M, Downie B, Liang C, Ji G., *et al.* Genome-wide landscape of polyadenylation in Arabidopsis provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12533–12538 (2011).

Xiang, K., Manley, J. L. & Tong, L. The yeast regulator of transcription protein Rtr1 lacks an active site and phosphatase activity. *Nat. Commun.* **3**, 946 (2012).

Xiong, W., Zhang J, Lan T, Kong W, Wang X, Liu L, Chen X, Mo B. High resolution RNA-seq profiling of genes encoding ribosomal proteins across different organs and developmental stages in Arabidopsis thaliana. *Plant Direct.* **5**, 1–14 (2021).

Yadav, R. K., Tavakkoli, M. & Reddy, G. V. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development.* **137**, 3581–3589 (2010).

Yamoune, A., Cuyacot, A. R., Zdarska, M. & Hejatko, J. Hormonal orchestration of root apical meristem formation and maintenance in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **72**, 6768–6788 (2021).

Yang, X., Dong W, Ren W, *et al.* Cytoplasmic HYL1 modulates miRNA-mediated translational repression. *Plant Cell* **33**, 1980–1996 (2021).

Zeng F., Hua Y, Liu X, Liu S, Lao K, Zhang Z, Kong D. Gpn2 and Rba50 Directly Participate in the Assembly of the Rpb3 Subcomplex in the Biogenesis of RNA Polymerase II. *Mol Cell Biol.* **13**, e00091-18 (2018).

Zhang, J., Zhang, X., Huang, H. & Ding, Y. A review on kinases phosphorylating the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II—Biological functions and inhibitors. *Bioorg. Chem.* **104**, 104318 (2020).

Zhu, J., Liu, M., Liu, X. & Dong, Z. RNA polymerase II activity revealed by GRO-seq and pNET-seq in Arabidopsis. *Nat. Plants.* **4**, 1112–1123 (2018).

Zhu, Y., Rowley, M. J., Böhmendorfer, G. & Wierzbicki, A. T. A SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complex Acts in Noncoding RNA-Mediated Transcriptional Silencing. *Mol. Cell.* **49**, 298–309 (2013).



