



Caracterización molecular y funcional del gen *AtMBD4L*, codificante de una nueva DNA glicosilasa de *Arabidopsis thaliana*

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Biol. María Florencia Nota

Dra. María Elena Álvarez
Directora

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA
(CIQUIBIC-CONICET)
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2014

Directora de Tesis:

Dra. María Elena Álvarez

Comisión de Tesis:

Dr. Carlos Argaraña

Dra. Susana Genti

Dra. María Gabriela Paraje

Evaluadora Externa

Dra. Paula Casati

Esta tesis de doctorado fue realizada gracias al apoyo de las siguientes Instituciones:

- Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología (FONCyT).

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

- Secretaría de Ciencia y Técnica-Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC).

- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
RESÚMEN	11
INTRODUCCIÓN	14
SISTEMAS DE ESCISIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA	15
El sistema BER	17
DNA glicosilasas del sistema BER	18
DNA glicosilasas mono y bifuncionales	19
CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS DNA GLICOSILASAS	19
Uracilo DNA glicosilasas (UDG)	20
3-metil purina DNA glicosilasas (MPG)	21
Nei/Fpg DNA glicosilasas	23
HhH-GPD DNA glicosilasas	23
Endonucleasa III (NTH)	25
8-oxo Guanina DNA glicosilasa (OGG1)	25
DNA glicosilasas de la familia DEMETER (DME)	26
La HhH DNA glicosilasa MBD4	28
EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS HHH DNA GLICOSILASAS DE ARABIDOPSIS	30
3-metil purina DNA glicosilasas (MPG)	30
Nei/Fpg DNA glicosilasas	31
HhH-GPD DNA glicosilasas	31
ACCIÓN DE DNA GLICOSILASAS DURANTE EL DESARROLLO Y EN RESPUESTA AL ESTRÉS	33
Fenotipos de desarrollo asociados a la falta de DNA glicosilasas	33
Participación de DNA glicosilasa en las respuesta al estrés	35
Demetilación y decondensación del genoma de Arabidopsis en condiciones de estrés ...	35
LAS DNA GLICOSILASAS PODRÍAN REMOVER 5-mC	38

OBJETIVOS E HIPÓTESIS	43
RESULTADOS	45
CAPÍTULO I: SELECCIÓN DE UNA DNA GLICOSILASA (MBD4L) QUE PARTICIPA EN LA DECONDENSACIÓN CENTROMÉRICA EN INFECCIÓN	46
I.1 El gen <i>At3g07930</i> de Arabidopsis codifica para un homólogo de hMBD4	47
I.1.1 Efecto de MBD4L en la decondensación de cromatina	55
I.1.1.1 Selección de plantas mutantes con inserción de T-DNA en <i>AtMBD4L</i>	56
I.1.1.2 Decondensación de cromocentros (CCs) en plantas <i>mbd4l-1</i> durante infección con <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	57
I.1.2 Decondensación de cromatina en plantas <i>siAtMBD4L</i> durante la infección con <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	60
I.1.3 Decondensación en plantas mutantes de 5-mC DNA glicosilasas durante infección con <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	62
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE <i>AtMBD4L</i> Y PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE ARABIDOPSIS	65
II.1 Caracterización del gen <i>AtMBD4L</i>	65
II.1.1 Estructura y transcritos	65
II.1.2 Expresión y regulación transcripcional	68
II.1.2.1 Elementos regulatorios del promotor de MBD4L	70
II.1.2.2 Expresión del gen reportero <i>GUS</i> regulado por el promotor de <i>AtMBD4L</i>	70
II.1.2.3 Nivel de transcritos <i>AtMBD4L.3</i> y <i>AtMBD4L.4</i> en diferentes tejidos	73
II.2 Proteínas codificadas por los transcritos <i>AtMBD4L.3</i> y <i>AtMBD4L.4</i>	73
II.2.1 Localización subcelular de MBD4L3 y MBD4L4	75
II.2.2 Niveles de MBD4L en plantas transgénicas <i>35S:AtMBD4L-GFP</i>	80
II.3 Participación de <i>AtMBD4L</i> en el desarrollo de Arabidopsis	82
II.3.1 Generación de plantas con niveles reducidos de <i>AtMBD4L</i>	83
II.3.2 Desarrollo vegetativo	84
II.3.2.1 Crecimiento y número de células	84
II.3.2.2 Dominancia apical y desarrollo de frutos	90
II.3.3 Desarrollo reproductivo	87
II.3.3.1 Tiempo de floración	87
II.3.3.2 Dominancia apical y desarrollo de frutos	90
II.3.4 Anormalidades fenotípicas durante diferentes generaciones de plantas <i>mbd4l-1</i> ...	96

CAPÍTULO III: RESPUESTAS AL ESTRÉS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO

AFECTADAS POR <i>AtMBD4L</i>	95
III. 1 Estrés biótico	95
III.1.1 Nivel de transcritos de <i>AtMBD4L</i> en condiciones de infección con <i>P. syringae</i> <i>pv. tomato</i>	95
III.1.4 Crecimiento de <i>P. syringae pv. tomato</i> en plantas con expresión reducida de <i>AtMBD4L</i>	97
III.2 Estrés abiótico	99
III.2.1 MBD4L en estrés oxidativo	100
III.2.1.1 Germinación y plántulas	100
III.2.1.2 Plantas adultas	102
III.2.2 MBD4L en estrés salino	104
III.2.2.1 Germinación y plántulas	104
III.2.2.1 Plantas adultas	105
III.3 Participación de MBD4L en el sistema BER	107
DISCUSIÓN	109
MBD4L es una HhH-DNA glicosilasa de Arabidopsis homóloga a hMBD4	110
MBD4L participa de la decondensación de la heterocromatina centromérica del genoma de Arabidopsis que ocurre durante la infección con <i>P. syringae pv. tomato</i>	110
<i>AtMBD4L</i> es funcional y presenta expresión regulada espacial y temporalmente	113
MBD4L participa en procesos de desarrollo	116
Desarrollo vegetativo	117
Desarrollo reproductivo	118
MBD4L está involucrado en respuestas ante patógenos biótrosos	120
MBD4L participa en respuestas al estrés abiótico	121
CONCLUSIONES	124
MATERIALES Y MÉTODOS	127
Condiciones de Crecimiento de plantas	128
Construcción de plantas transgénicas	128
Transformación y selección de líneas transgénicas	129
Extracción de DNA y RNA	129
Análisis de Transcritos (RT-PCR semicuantitativa)	130
Tinción para GUS	131
Microscopía	131

Análisis de decondensación de Cromocentros (CCs)	131
Determinación de localización subcelular mediante GFP	131
Análisis de número y tamaño de células en hojas	132
Purificación de Proteínas y ensayos de <i>Western Blot</i>	132
Manipulación de bacteria patógena	133
Cepas y condiciones de crecimiento	133
Curvas de crecimiento <i>in vivo</i>	133
Tratamientos con estresores	134
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	135
BIBLIOGRAFÍA	142

ABREVIATURAS

3-mA: 3-metil adenina
5-mC: 5-metil citosina
5-hmU: 5-hidroxi metil uracilo
5-hmC: 5-hidroxi metil citosina
5'dRP: grupo desoxirribosa-fosfato
8-oxoG: 8-oxo guanina
ABA: ácido abscísico
ABRC: Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis
aMAG: Arabidopsis 3-metil adenina DNA glicosilasa
AP: apurínico / apirimídico
APE: AP endonucleasa
ARP: APURINIC-ENDONUCLEASE-REDOX
AtMBD4L: gen que codifica para MBD4L
AtMBD9: *Arabidopsis thaliana* METIL BINDING DOMAIN-9
AtUNG: Arabidopsis thaliana uracilo DNA glicosilasa
BLAST: Basic Local Aligment Search
BER: Base Excision Repair
CCs: cromocentros
CO: gen que codifica para CONSTANTS
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindol
DME: DEMETER
DML: DEMETER-LIKE
DNMT1: DNA METHYL TRANSFERASE 1
EndoIII: ENDONUCLEASE III
FLC: gen que codifica para FLOWERING LOCUS C
FPG: FORMAMIDOPYRIMIDIN DNA GLYCOSYLASE
FT: FLOWERING LOCUS T
GUS: β-glucoronidasa
GAPC: gen que codifica para Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP: Green Fluorescent Protein
HhH-GPD: Hélice horquilla Hélice – Glicina Prolina Aspártico
HIT4: HEAT-INTOLERANT-4
hMBD4: MBD4 de humanos
HMM: Hiden Markov Model
INRA: Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia
kDa: kilo Dalton
LFY: gen que codifica para LEAFY
LIG: DNA LIGASE

MAX: MORE AXILLARY BRANCHES
MBD: Methyl Binding Domain
MBD4: METHYL BINDING DOMAIN-4
MBD4L: METHYL BINDING DOMAIN 4- LIKE
MET1: METILTRANSFERASE 1
MMR: Mismatch Repair
MMS: metil metano sulfonato
MPG: 3-metil purina DNA glicosilasa
MtOGG1: *Medicago trunculata* 8-OXO GUANINE DNA GLYCOSYLASE
MV: metil viológeno
NEI: ENDONUCLEASE VIII
NER: Nucleotide Excision Repair
NLS: Nuclear Localization Signal
OGG1: 8-OXO GUANINE DNA GLYCOSYLASE
Pol: DNA POLIMERASE
PR1: Pathogenesis Related Protein 1
R: purina
ROS: especies reactivas de oxígeno
ROS1: REPRESSOR OF SILENCING 1
SA: ácido salicílico
ScFPG: sugar cane FPG
siAtMBD4L: plantas silenciadas para *AtMBD4L*
SOC1:SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
TET: TEN ELEVEN TRANSLOCATION 1
UDG: Uracilo DNA glicosilasas
UV: ultravioleta
TDG: THYMINE DNA GLYCOSYLASE
Y: pirimidina

RESUMEN

La DNA glicosilasa METHYL BINDING DOMAIN 4 (MBD4) al igual que el gen codificante para la misma están muy bien caracterizados en animales. Sin embargo, al presente no existen estudios sobre el gen que codifica para esta enzima en plantas, donde se desconoce su patrón de expresión, participación en procesos biológicos y de desarrollo y sus efectos sobre respuestas al estrés. En bacterias y animales MBD4 forma parte de uno de los sistemas de reparación del DNA donde actúa como DNA glicosilasa monofuncional. Estructuralmente MBD4 pertenece a la superfamilia HhH-GPD y actúa sobre diversos sustratos, constituyendo una enzima multifacética implicada en diversos procesos celulares.

En este trabajo de Tesis doctoral se seleccionó y caracterizó un homólogo de MBD4 de humanos en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), llamada METHYL BINDING DOMAIN 4-LIKE (MBD4L). Los resultados contenidos en este trabajo indican que *AtMBD4L* presenta dos transcritos alternativos, uno de ellos no descrito anteriormente. Ambos transcritos codifican para dos proteínas nucleares que conservan intacto el dominio DNA glicosilasa y difieren en la región N-terminal. Se observó, además que el dominio de MBD4L presenta una estructura similar a la descrita para la superfamilia HhH-GPD DNA glicosilasa, a la cual también pertenece MBD4 de animales y está muy conservado desde bacterias hasta humanos, aunque no presenta proteínas homólogas en *Arabidopsis*.

Para contribuir a la caracterización funcional del gen se estudió la participación de *AtMBD4L* en procesos de desarrollo y en respuestas al estrés biótico y abiótico. Se determinó que MBD4L participa en la decondensación de heterocromatina centromérica que sufre el genoma de *Arabidopsis* en infecciones con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*P. syringae* pv. *tomato*) y favorece el crecimiento del patógeno en la planta. Además, el análisis de fenotipos en plantas mutantes y silenciadas para *AtMBD4L* indicó que dicho gen participa en procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis*.

Por otra parte, para abordar la participación de MBD4L en respuestas al estrés abiótico se utilizaron plantas mutantes y líneas transgénicas sobre-expresantes, las cuales demostraron que MBD4L estimula la tolerancia al estrés oxidativo y salino en plantas adultas, pero no durante la germinación.

Finalmente, durante este trabajo de Tesis doctoral se propusieron diferentes blancos para MBD4L, aunque por el momento se desconoce el mecanismo de acción.

En condiciones de infección con el patógeno bacteriano, MBD4L podría actuar sobre las repeticiones y transposones centroméricos, permitiendo la activación de reguladores negativos de la defensa.

Durante el desarrollo, MBD4L podría regular la expresión de *FLC*, determinando el tiempo de floración, posiblemente mediante mecanismos epigenéticos.

En condiciones de estrés oxidativo y salino en plantas adultas, MBD4L podría participar en la reparación del genoma de *Arabidopsis*, removiendo mutaciones tales como U:G, T:G y 5-hmU.

INTRODUCCIÓN

SISTEMAS DE ESCISIÓN Y REPARACIÓN DEL DNA

El genoma de los organismos vivos está constantemente expuesto al ataque de factores ambientales y subproductos metabólicos endógenos que pueden alterar la estructura química del DNA. La integridad del DNA es vital para la viabilidad de las células y la salud de los organismos (Baute y Depicker, 2008), y en la mayoría de los casos es mantenida por acción de múltiples sistemas de reparación que restauran los daños producidos sobre bases nitrogenadas (Krokan y Bjoras, 2013). La restauración de estos daños se produce básicamente por dos diferentes mecanismos: reversión directa y reparación por escisión.

El mecanismo de reversión directa repara daños ocasionados por reacciones de alquilación y condiciones de exposición a radiación ultravioleta (UV) que generan dímeros de pirimidina (fotoreacción). Este mecanismo de reparación es el más simple e involucra la acción de una única enzima cuya identidad depende del tipo de daño a reparar (Tuteja y col., 2009). En general, este sistema está conservado desde bacterias hasta humanos, aunque estos últimos carecen de la enzima que cataliza la fotoreversión (Cline y Hanawalt, 2003).

La reparación por escisión es un proceso más complejo que involucra la acción conjunta de varias enzimas o complejos enzimáticos. Este tipo de reparación es responsable de restaurar la mayoría de las modificaciones de bases que afectan al genoma (Cline y Hanawalt, 2003). Dentro de este mecanismo se distinguen tres sistemas que difieren en su modo de acción: el sistema de reparación de bases apareadas incorrectamente (Mismatch Repair, MMR), el sistema de escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair, NER) y el sistema de escisión de bases modificadas (Base Excision Repair, BER) (Fig. 1).

El sistema MMR actúa inmediatamente luego de la replicación para reconocer y reparar bases mal apareadas o pequeñas inserciones o deleciones ubicadas en la cadena del DNA recién sintetizada (Spampinato y col., 2009). El sistema NER actúa asociado a la replicación del DNA o posterior a la misma, para reparar modificaciones que distorsionan la estructura helicoidal normal del dúplex de DNA (Yang, 2008). Entre ellas, se encuentran dímeros de pirimidina ciclobutano y fotoproductos pirimidina-(6,4)-pirimidona generados por la radiación UV, aductos de bases creadas por agentes químicos exógenos y lesiones producidas por reacciones de oxidación derivadas de incrementos de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Iyama y Wilson III, 2013).

Por su parte, el sistema BER reconoce un amplio rango de alteraciones derivadas de reacciones de deaminación, oxidación y alquilación de bases, las cuales no generan cambios en la estructura del DNA (Zharov, 2008; Baute y Depicker, 2008; Robertson y col., 2009).

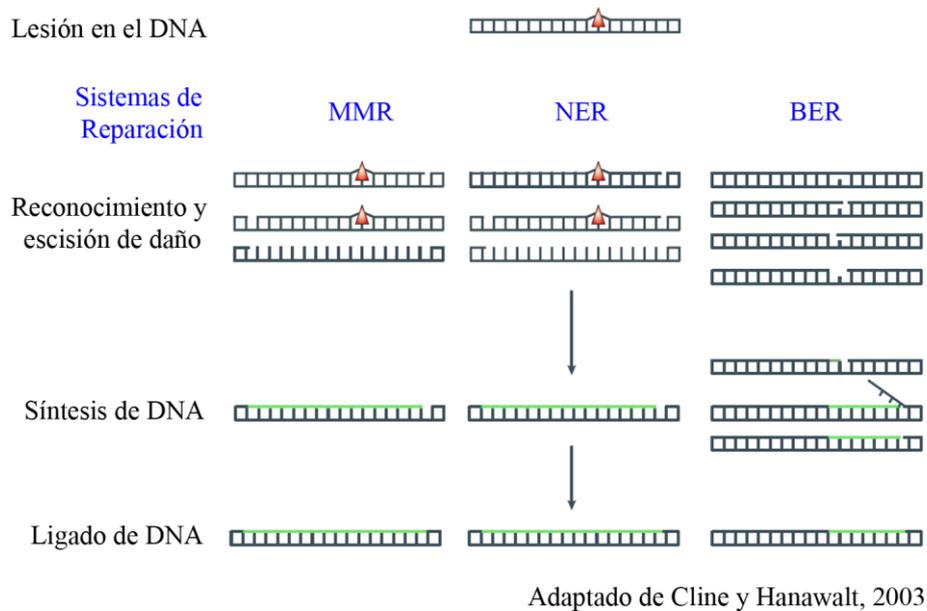


Figura 1. Principales sistemas de reparación del DNA por escisión. Comparación entre los sistemas de reparación MMR (bases apareadas incorrectamente), NER (escisión de nucleótidos) y BER (reparación por escisión base). Todos los sistemas producen cortes en una cadena del DNA y comparten tres etapas bien diferenciadas (reconocimiento y escisión del daño, síntesis y ligado de DNA) en las que muestran características distintivas. Para el sistema BER se ejemplifica la vía larga. El triángulo rojo indica la lesión en el DNA. En verde se muestra la cadena re-sintetizada.

Los tres sistemas, MMR, NER y BER, generan cortes en una única cadena del DNA, en regiones cercanas a la lesión. Mientras que los sistemas MMR y NER reemplazan varios nucleótidos alrededor de ese sitio, sólo el sistema BER puede escindir únicamente la base dañada. Alternativamente el BER también puede recaer en una vía que remueve algunos nucleótidos aledaños al nucleótido modificado mediante un proceso más complejo, que involucra más pasos (Fig. 1).

En este capítulo se describen ambos sistemas de reparación del DNA, haciendo incapié en el sistema que involucra la escisión de bases, del cual forma parte la enzima objeto de estudio. Luego se presentan las principales características de las DNA glicosilasas, enzimas limitantes de este sistema, su clasificación estructural y mecanismo de acción. Posteriormente, se analiza la implicancia de las DNA glicosilasas en procesos de desarrollo, reparación del DNA y su rol en epigenética, con énfasis en las enzimas vegetales.

El sistema BER

Este sistema fue descubierto en 1974 por el grupo del Dr. Lindahl, que describió la actividad enzimática de una DNA glicosilasa de *Escherichia coli* capaz de remover la base uracilo (U) del DNA mediante una actividad diferente a la de una nucleasa. En este proceso se generaba un sitio abásico que era reparado posteriormente por acción de otras enzimas (Lindahl y col., 1974). Posteriormente, otros grupos demostraron que la Uracilo DNA glicosilasa era la responsable de esa actividad, y que su función estaba asociada a procesos de reparación del DNA (Olsen y col., 1989). A partir de entonces, numerosos estudios, han permitido la caracterización de cada uno de los componentes del sistema BER principalmente en bacterias y animales. A diferencia de otros sistemas de reparación, este sistema está ampliamente conservado en diferentes reinos (Hitomi y col., 2007). El sistema BER remueve bases dañadas en dos pasos consecutivos (Fig. 2).

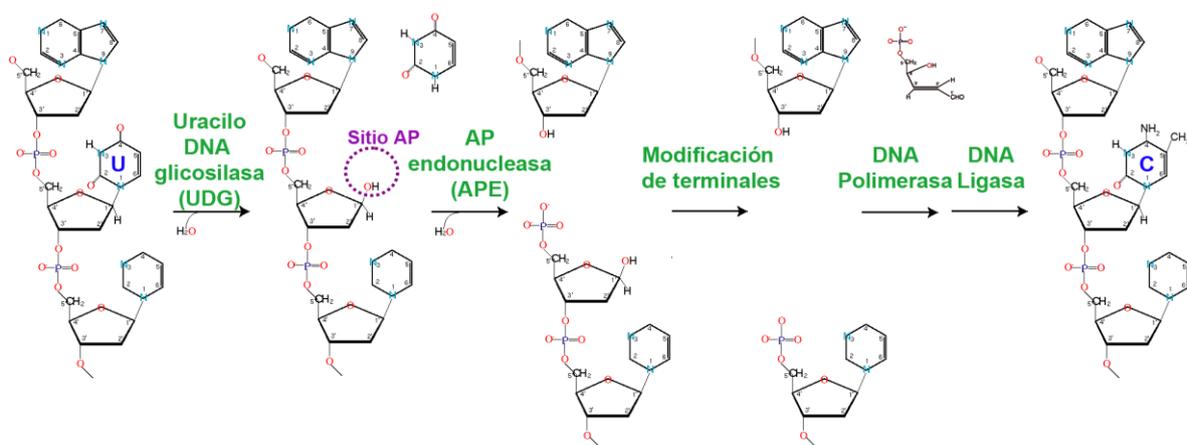


Figura 2. Etapas del funcionamiento del sistema BER. Se esquematiza la acción de las principales enzimas que conforman el sistema. La base lesionada, en este ejemplo U, es reconocida por una DNA glicosilasa (Uracilo DNA glicosilasa) que cliva el enlace glicosídico. Posteriormente una apurínico/apirimídico (AP) endonucleasa (liasa) corta el enlace fosfodiéster, generando extremos 3'-OH y 5'-desoxirribosa-fosfato (5'dRP). Posteriormente, por acción de una DNA polimerasa y una DNA ligasa se re-sintetiza y liga el DNA.

El primer paso es catalizado por las DNA glicosilasas, que controlan la etapa limitante del proceso (Yang, 2008). Estas enzimas detectan la base lesionada y catalizan el clivaje del enlace glicosídico entre ésta y la desoxirribosa, generando un sitio apurínico o apirimídico

(AP). El segundo paso es catalizado por una AP endonucleasa (APE) que reconoce el producto abásico y cliva el enlace fosfodiéster en el extremo 5' de la lesión para dejar expuestos un OH⁻ y un grupo desoxirribosa-fosfato (5'dRP) en los extremos 3' y 5', respectivamente. Posteriormente, los extremos 3' y 5' son adaptados, para permitir que la DNA polimerasa incorpore el nuevo nucleótido y que la DNA ligasa selle la cadena de DNA (Yang, 2008; Baute y Depicker, 2008).

En algunos casos, el sistema BER opera no sólo reemplazando la base dañada (*short path* BER) (Fig. 2), sino también sintetizando nucleótidos cercanos a la base dañada (*long path* BER) (Fig. 1). La decisión de proceder mediante una u otra vía no se conoce en profundidad, pero se hipotetiza que podría depender de la concentración relativa de ATP en el sitio AP. Curiosamente, la vía más larga ocurre cuando la concentración de ATP es menor, ya que las enzimas que catalizan la vía corta requieren mayores cantidades de ATP (Petermann y col., 2003).

DNA glicosilasas del sistema BER

En los últimos años se determinó la estructura cristalina de varias DNA glicosilasas de diversos organismos, proporcionando una visión más clara de los mecanismos de reconocimiento y catálisis en la región de la lesión (Zharkov, 2008).

Aunque cada DNA glicosilasa actúa sobre sustratos específicos, todas presentan un principio de acción común. Se especula que las bases dañadas son reconocidas específicamente por su forma, potencial de unión al hidrógeno y distribución de carga eléctrica, que resultan diferentes a las de bases normales (Yang, 2008). Las DNA glicosilasas unen la base lesionada al sitio activo ubicado en un bolsillo catalítico, desplazando la misma fuera de la doble hebra del DNA (Kim y Wilson III, 2012). La selectividad de sustrato ocurriría por exclusión de las bases normales y una unión eficiente a la base dañada. Si esta unión resulta exitosa se producirá la escisión del enlace N-glicosílico, liberando la base mutada para generar un sitio AP (Zharkov, 2008; Kim y Wilson, 2012). Tras la liberación de la base, las DNA glicosilasas permanecen unidas al sitio AP (Jacobs y Schär, 2012), favoreciendo el reclutamiento de varias enzimas que son necesarias para estabilizar roturas de la cadena de DNA hasta que la reparación se complete (Kim y Wilson III, 2012).

DNA glicosilasas mono y bifuncionales

De acuerdo a su mecanismo de acción las DNA glicosilasas del sistema BER se clasifican en enzimas mono y bifuncionales. Las DNA glicosilasas monofuncionales sólo catalizan la ruptura del enlace glicosílico, mientras que las bifuncionales también tienen asociada una actividad liasa, que les permite escindir el enlace fosfodiéster sin requerir la acción de las APE. Por ello, estas últimas se definen como DNA glicosilasas/liasas.

Las etapas asociadas a la acción de DNA glicosilasas mono y bifuncionales del sistema BER han sido estudiadas principalmente en animales. A modo informativo las diferencias principales entre las DNA glicosilasas mono y bifuncionales se detallan en la Figura suplementaria I (SI, pág. 131), aunque en esta Tesis no se evaluó el mecanismo de acción de la DNA glicosilasa en estudio. Notoriamente, en plantas, la reparación del DNA mediante el sistema BER no ha sido caracterizada tan exhaustivamente. Los escasos estudios en este campo indican que la diferencia más considerable entre plantas y animales es la falta de genes que codifiquen para Pol β y DNA LIGIII (Uchiyama y col., 2004) (Fig. S1, pág.131). Por el contrario, las plantas poseen genes codificantes para la mayoría de las enzimas del sistema BER, pero reemplazarían a Pol β por Pol λ (Uchiyama y col., 2004) y a DNA LIGIII por la (LIGI) y/o la DNA LIGASE IV (LIG IV). Además, la mayor actividad AP endonucleasa observada en extractos de células de Arabidopsis es llevada a cabo por la APURINIC-ENDONUCLEASE-REDOX (ARP) (Córdoba-Cañero y col., 2011).

CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS DNA GLICOSILASAS

Cada DNA glicosilasa reconoce una cohorte particular de lesiones, actuando sobre estas bases dañadas entre millones de bases normales en el DNA (Fromme y col., 2004). De acuerdo a su estructura, las DNA glicosilasas se clasifican en 4 superfamilias, cuyas principales características se presentan en la Tabla I.

Si bien esta clasificación es estructural, las enzimas agrupadas en una misma superfamilia generalmente comparten sustratos, sugiriendo que la estructura de la enzima define la especificidad de la misma. Asimismo, enzimas agrupadas en diferentes superfamilias, pueden actuar sobre un mismo sustrato. Los miembros de cada superfamilia y sus características principales se describen con mayor detalle en la Tabla S1 (pág. 139).

Tabla I. Superfamilias de DNA glicosilasas implicadas en el sistema BER

Superfamilia	Principales Sustratos^(*)
Uracilo DNA glicosilasas (UDG)	U simple cadena y doble cadena (U:G, U:A, U:T) U modificados (5-FU, 5FU:G, 5-hmU, 5fU:G) Pirimidinas oxidadas
3-metil purina DNA glicosilasas (MPG)	Purinas metiladas (3-meA, 7-meA, 7-meG)
Endonucleasa VIII / Formamidopirimidina DNA glicosilasas (NEI / FPG)	Bases oxidadas (8-oxoG:C, FapyG, FapyA, Tg) Derivados de oxidación de C (5-hC, 5-hU, 5-fU)
Hélice horquilla hélice – Gly Pro Asp (HhH-GPD) DNA glicosilasas	Derivados de C y 5-mC deaminadas (G:T, G:U, 5-hmU) Purinas metilads (3-meA, 7-meG, 3-meG, 7-meA) Bases oxidadas (8-oxoG:A, 8-oxoG:C, FapyG:C) C metiladas y derivados (5-mC, 5-hmC)

(*) 5FU, 5-fluoro uracilo; 5-hmU, 5-hidroxi metil uracilo; 3-meA, 3-metil adenina; 7-meA, 7-metil adenina; 7-meG, 7-metil guanina; 8-oxoG, 7,8-dihidro-8-oxo guanina; FapyG, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamido pirimidina; Tg, timina glicol; 5-hC, 5-hidroxi citosina; 5-hU, 5-hidroxi uracilo; 5-hmU, 5-hidroxi metil uracilo; 5-mC, 5-metil citosina; 5-hmC, 5-hidroxi metilcitosina.

Como se describe luego, en estas superfamilias las enzimas de plantas fueron menos estudiadas y comenzaron a caracterizarse tardíamente. Sin embargo, un grupo particular de DNA glicosilasas con capacidad de generar demetilación activa del DNA, fue mejor caracterizada en plantas que en otros organismos. A continuación se detallan los aspectos más relevantes de cada familia para evidenciar sus diferencias con la superfamilia en estudio (HhH-GPD DNA glicosilasas) y en la Tabla II (pág. 22) se incluyen todas las DNA glicosilasas de Arabidopsis, describiendo para cada una de ellas el conocimiento actual sobre estas enzimas para comparar con MBD4L. Las DNA glicosilasas descritas hasta el momento en Arabidopsis se detallan en la Tabla II.

Uracilo DNA glicosilasas (UDG)

La superfamilia UDG incluye enzimas que escinden U del DNA simple o doble cadena (Fig. 2, pág. 17). El U que es propio del RNA, puede aparecer en el DNA por dos procesos: incorporación errónea de dUTP durante la síntesis de DNA que genera un apareamiento de U con A (U:A) y no resulta mutagénico (Franco y col., 2013) o deaminación de C. Este último proceso genera un incorrecto apareamiento de U con G (U:G) y, en caso de no repararse,

produce potenciales transiciones C→T durante la replicación (Zharkov y col., 2010). Tal como se describe posteriormente, las UDG también son capaces de reconocer y escindir T apareada incorrectamente con G (T:G), donde la T deriva de la deaminación de 5-metil citosina (5-mC) (Zharko y col., 2010; Franco y col., 2013) (Fig. 2). Las UDG están conservadas desde bacterias hasta mamíferos (Baute y Depicker, 2008; Jacob y Schär, 2012) y la primera enzima caracterizada fue la Ung de *E. coli* (Lindahl y col., 1974). La similitud de secuencias entre las UDG es baja, excepto por motivos muy cortos conservados en el sitio activo. Todas las UDG presentan una estructura central de cuatro hojas β extendidas paralelas, intercaladas entre al menos dos α hélices de cada lado. Los bucles que conectan estos elementos llevan los aminoácidos (aa) que forman el sitio activo y el bolsillo de reconocimiento de la lesión (Zharkov, 2008; Baute y Depicker, 2008).

En plantas, la primera UDG fue purificada por cromatografía de afinidad a partir de un cultivo de células de zanahoria, utilizando fragmentos de DNA enriquecidos en U y marcados radiactivamente como sustrato (Talpaert-Borle y Liuzzi, 1982). En *Arabidopsis*, la única enzima de esta superfamilia descrita es AtUNG, la cual presenta una especificidad estrecha por U en ensayos *in vitro* con diferentes sustratos (U, T, 5-mC, U y 5-mC modificados) (Córdoba-Cañero y col., 2010) (Tabla II).

3-metil purina DNA glicosilasas (MPG)

Las MPG han sido caracterizadas en diversos organismos incluyendo bacterias, levaduras, plantas y mamíferos (Wyatt y col., 1999). Estas enzimas presentan una estructura compacta formada por un solo dominio que consta de una hoja β antiparalela, rodeada de α helices (Baute y Depicker, 2008).

Una actividad 3-metil adenina DNA glicosilasa (aMAG) similar a la de bacterias fue descrita en *Arabidopsis* (Santerre y Britt, 1994) y en extractos de células BY-2 de tabaco (Kraszewska y col., 1998). En *Arabidopsis*, el gen codificante para esta enzima se identificó a partir de librerías de cDNA por su capacidad para revertir el fenotipo de hipersensibilidad a metil metano sulfonato (MMS) que presentan cepas de *E. coli* mutantes en genes que codifican para MAG. Además, ensayos *in vitro* con extractos de bacterias complementadas con el gen *aMAG*, mostraron actividad DNA glicosilasa solamente sobre 3-mA, (Santerre y Britt, 1994).

Tabla II. DNA glicosilasas de Arabidopsis

Enzima	Sigla	Sustrato ⁽⁺⁾	Localización subcelular	Tejidos	Referencia
Uracilo DNA glicosilasa (UDG)					
URACILO DNA GLICOSILASA ^(a)	AtUNG	U	Nd	Nd	Córdoba-Cañero, 2010
3-metil purina DNA glicosilasa (MPG)					
3- METIL ADENINA DNA GLICOSILASA	aMAG	3-mA	Nd	Meristemas, embrión, hojas con alta tasa de crecimiento	Santerre y Britt, 1994; Shi y col., 1997
NEI/FPG					
FORMAMIDOPIRI MIDINA DNA GLYCOSYLASA 1 ^(b)	AtFPG1	Bases oxidadas o dañadas por irradiación con UV-C, ds8-oxoG	N*	Inflorescencias y raíces	Ohtsubo y col., 1998; Murphy y Gao, 1998; Murphy y Gao, 2001
FORMAMIDOPIRI MIDINA DNA GLICOSILASA 2 ^(b)	AtFPG2	Bases oxidadas o dañadas por irradiación con UV-C	N*	Inflorescencias y tallo	Ohtsubo y col., 1998; Murphy y Gao, 1998; Murphy y Gao, 2001
HhH-GPD DNA glicosilasa					
NTH1 ^(b)	NTH1	ds urea y dsTg, plásmidos tratados con radiaciones γ y UV	C	Raíz, hojas de roseta y caulinares, tallo y flores	Roldán-Arjona y col., 2001; Gutman y Niyogi, 2009
NTH2 ^(b)	NTH2	ds Tg	C	Nd	Gutman y Niyogi, 2009
8-OXO GUANINA DNA GLICOSILASA ^(b)	AtOGG1	ds8-oxoG	N	Constitutiva	Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001; Murphy, 2005
DEMETER ^(b)	DME	5-mC, T:G,5-hmC	N	Célula central gametófito femenino y célula vegetativa del pólen	Choi y col., 2002, Gehring y col., 2006, Jang y col., 2014
REPRESSOR OF SILENCING 1 ^(b)	ROS1	5-mC, T:G,5-hmC	N	Constitutiva	Gong y col., 2002, Gehring y col., 2006, Jang y col., 2014
DEMETER-LIKE 2 ^(b)	DML2	5-mC	N*	Constitutiva	Penterman y col., 2007
DEMETER-LIKE 3 ^(b)	DML3	5-mC	N*	Constitutiva	Penterman y col., 2007

(a) DNA glicosilasa monofuncional, (b) DNA glicosilasa/liasa, (N) núcleo, (C) cloroplastos, (*) Determinado bioinformáticamente, (nd) no determinado.

(+) 3-mA, 3-metil adenina; U, uracilo; ds8-oxoG, 8-oxo guanina doble cadena; ds urea, urea doble cadena; dsTg, timina glicol doble cadena; 5-mC, 5-metil citosina; 5-hmC, 5-hidroxi metil citosina.

NEI/FPG DNA glicosilasas

Los dos prototipos de esta superfamilia son las enzimas de *E. coli*, ENDONUCLEASE VIII (NEI) y FORMAMIDOPYRIMIDIN DNA GLYCOSYLASE (FPG), también conocida como MutM. La estructura cristalina de estas enzimas revela la existencia de dos dominios conectados por una región flexible. El dominio N-terminal se organiza alrededor de dos hojas β , mientras que el C-terminal incluye dos motivos de unión al DNA: un motivo hélice –doble giro-hélice y un motivo de dedo de zinc (Zharcov, 2008). Tanto NEI como FPG están conservadas en procariotas como en eucariotas, aunque varias proteínas eucariotas homólogas a estas enzimas carecen de algunos de estos motivos y otras poseen dominios adicionales (Kathe y col., 2009).

En plantas no se han descrito homólogos de NEI, aunque se aisló y caracterizó un gen que codifica para un homólogo a *FPG*, con varios transcritos alternativos. Las isoformas proteicas más estudiadas de *Arabidopsis*, AtFPG1 y AtFPG2, conservan el dominio N-terminal con un alto porcentaje de similitud respecto a las FPGs de bacterias y animales, y difieren en la región C-terminal (Ohtsubo y col., 1998). Ambas proteínas presentan actividad DNA glicosilasa/liasa y son capaces de reparar *in vitro* bases oxidadas o dañadas por irradiación con UV-C. Además, AtFPG1, pero no AtFPG2, remueve 8-oxoG de oligonucleótidos doble cadena, indicando que diferencias estructurales entre las dos proteínas influyen sobre su actividad enzimática (Gao y Murphy, 2001).

En síntesis, las superfamilias UDG, MPG y NEI/FPG parecen actuar sobre un estrecho rango de sustratos. Aunque hay gran conocimiento sobre estas superfamilias en animales, levaduras y bacterias (Tabla SI), hasta el momento se reportaron pocas enzimas de plantas las cuales no han sido aún estudiadas en profundidad (Tabla II). La actividad *in vitro* de las enzimas vegetales y sus sustratos han sido reportados, pero no su participación en procesos biológicos y del desarrollo ni tampoco su participación en respuestas al estrés.

HhH-GPD DNA glicosilasas

La superfamilia HhH-GPD DNA glicosilasas presenta un rango amplio de sustratos y está conservada en organismos de todos los reinos (Jacobs y Schär, 2012) (Tabla I). A este grupo estructural pertenece la enzima estudiada en esta Tesis. La primera enzima de esta

superfamilia en ser caracterizada fue la ENDONUCLEASE III de *E. coli* (EndoIII), también conocida como NTH (Cunningham y col., 1985; Asahara y col., 1989) (Tabla SI, pág. 139).

La estructura de estas enzimas se muestra en la Figura 3. Estas proteínas presentan varias α hélices que contiene un motivo hélice – horquilla – hélice (motivo HhH), seguido por un bucle rico en residuos glicina (Gly, G) y prolina (Pro, P), y la presencia de un ácido aspártico (Asp, D) conservado y esencial para la actividad de la enzima (motivo GPD) (Fig. 3A). Las α hélices dan lugar a una estructura en forma de barril con un bolsillo hidrofóbico formado por los dos motivos (HhH y GPD) donde se ubica el sitio activo (Zharkov, 2008) (Fig. 3B). En varias DNA glicosilasas de esta superfamilia la presencia de dominios adicionales contribuye a la función específica de la enzima (Baute y Depicker, 2008).

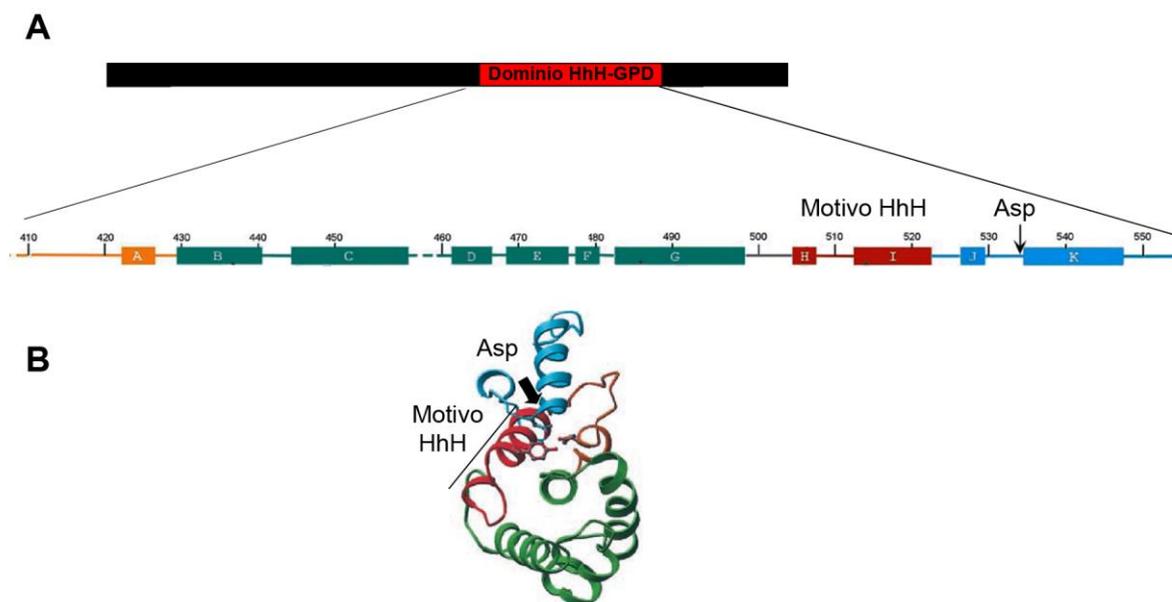


Figura 3. Estructura del dominio HhH-GPD DNA glicosilasa. A) Esquema de una DNA glicosilasa representativa. El dominio HhH-GPD se muestra en rojo, la flecha muestra la posición del aspártico del sitio catalítico. Abajo, la estructura de α hélices representada por cajas de diferentes colores. Los números indican los aa. B) Estructura terciaria del dominio HhH-GPD DNA glicosilasa de MBD4 de ratón adaptado de Wu y colaboradores (2003). Los colores de cada α hélice se mantienen en A y B donde el motivo dominio HhH se muestra en rojo. La flecha muestra el aspártico catalítico.

En *Arabidopsis* varias HhH-GPD DNA glicosilasas han sido caracterizadas. Estas enzimas, se clasifican en distintas familias, principalmente por la especificidad de sustrato

(Tabla II). Las características de las principales HhH-GPD DNA glicosilasas de *Arabidopsis* se detallan a continuación.

Endonucleasa III (NTH)

Las enzimas NTH fueron descubiertas en *E. coli* (Cunningham y col., 1985; Asahara y col., 1989) y hoy se conoce que las mismas están conservadas en numerosos organismos en los cuales catalizan la renovación de bases dañadas de manera oxidativa (Robertson y col., 2009). Además del dominio HhH-GPD estas enzimas presentan un grupo hierro-azufre [4Fe-4S] sostenido por cuatro residuos cisteína (Rogers y col., 2003; Denver y col., 2003).

El gen *AtNTH1* de *Arabidopsis* fue identificado por homología de secuencia con los genes de EndoIII de *E. coli* (Roldán-Arjona y col., 2001). *AtNTH1* se expresa en diversos tejidos, lo que sugiere que la actividad de reparación de *AtNTH1* no sólo es necesaria para prevenir eventos mutagénicos en células que se dividen, sino también para evitar los efectos citotóxicos que pueden tener las pirimidinas dañadas debido al bloqueo de la maquinaria transcripcional en las células que no se dividen. El producto de este gen presenta actividad DNA glicosilasa/liasa *in vitro* sobre DNA doble cadena de plásmidos tratados con radiaciones γ y UV (Roldán-Arjona y col., 2001) (Tabla II).

El genoma de *Arabidopsis* codifica también para una enzima con 80% de similitud con NTH2 de humanos. La actividad DNA glicosilasa/liasa de *AtNTH2* fue demostrada recientemente *in vitro* sobre DNA plasmídico que contienen timina glicol (Gutman y Niyogi, 2009) (Tabla II).

8-oxo Guanina DNA glicosilasa 1 (OGG1)

Esta enzima fue identificada inicialmente en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por su homología con FPG de *E. coli* (van der Kemp y col., 1996; Nash y col., 1996). En la actualidad numerosas proteínas homólogas fueron aisladas en diversos organismos. OGG1 tiene una especificidad de sustrato similar a FPG, con preferencia por 8-oxoG opuesto a C, pero no a A (Zharcov, 2008).

Los homólogos estructurales y funcionales de las OGG1 de eucariotas que están presentes en *Arabidopsis* y *Medicago trunculata*, son *AtOGG1* y *MtOGG1*, respectivamente (Tabla II) (Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001; Macovei y col., 2011). *AtOGG1* fue identificado por homología de secuencia con *OGG1* de humanos. La enzima *AtOGG1*

presenta una actividad DNA glicosilasa/liasa, que fue evidenciada *in vitro* por el corte de 8-oxoG:C en oligonucleótidos doble cadena y por complementación del fenotipo hipermutador de cepas de *E. coli* doble mutante *mutM mutY* (Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001).

DNA glicosilasas de la familia DEMETER (DME)

A diferencia de las enzimas NTH1, NTH2 y OGG1 que participan en la reparación de mutaciones principalmente generadas por daño oxidativo, los miembros de la familia DME remueven la 5-mC, generando modificaciones epigenéticas.

Durante varios años se estudió la capacidad de las DNA glicosilasas de animales de catalizar procesos de demetilación activa sin obtener candidatos para esta función. En paralelo, las DNA glicosilasas de la familia DME de *Arabidopsis* que fueron aisladas mediante rastreos genéticos no diseñados para este fin, y luego evidenciaron esta capacidad cuando fueron estudiadas a nivel bioquímico.

Estudios realizados *in vitro* con 5-mC DNA glicosilasas recombinantes de *Arabidopsis* indican que estas enzimas remueven preferencialmente 5-mC (Choi y col., 2002; Gong y col., 2002; Penterman y col., 2007) y con menor afinidad T que está apareada incorrectamente con G (T:G) (Gehring y col., 2007; Morales-Ruiz y col., 2006) (Tabla II, pág. 22). De esta manera los miembros de la familia DME participan en la reparación del genoma, removiendo bases modificadas con lesiones mutagénicas (T:G) y en el establecimiento de patrones de metilación por remoción de marcas epigenéticas (5-mC). Además, estudios recientes muestran que dos miembros de esta familia catalizan la remoción de 5-hidroxi metil citosina (5-hmC) (Jang y col., 2014).

Las 5-mC DNA glicosilasas de *Arabidopsis* se caracterizan por tener un peso molecular superior a 1000 kDa y un dominio DNA glicosilasa discontinuo (Ponferrada-Marin y col., 2011). Esto las diferencia de las otras DNA glicosilasas que son proteínas pequeñas de alrededor de 400 aa, (Baute y Depicker, 2008).

Las dos primeras 5-mC DNA glicosilasas aisladas en *Arabidopsis* fueron REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) (Gong y col., 2002) y DEMETER (DME) (Choi y col., 2002), ambas fueron identificadas en rastreos genéticos. ROS1 fue aislada en un rastreo cuyo objetivo era identificar mutaciones capaces de alterar la expresión de un transgen que había sido introducido previamente en esa planta (transgen *RD29A:LUC*). El transgen contenía la región codificante de luciferasa bajo el control del promotor *RD29A*, inducible por estrés. En

respuesta al frío y al ácido abscísico (ABA), las plantas transgénicas salvajes expresaban *LUC*. Por el contrario, las plantas transgénicas mutantes *ros1-1* fueron incapaces de emitir luminiscencia en estas condiciones de estrés. Luego se determinó que ésto era debido a que el promotor *RD29A* del transgen estaba silenciado por hipermetilación. En un segundo paso se demostró que tal hipermetilación era debida a la falta de acción de ROS1 sobre ese promotor (Gong y col., 2002).

Por su parte, DME fue identificada en rastreos dirigidos a detectar alteraciones del desarrollo del embrión y endosperma (Choi y col., 2002). En este caso, las mutaciones de pérdida de función *dme-1* dieron lugar a la aparición de un alto porcentaje de embriones abortados. En ellos se manifestó la represión transcripcional e hipermetilación de *MEDEA* (*MEA*), un gen cuyo alelo materno es necesario para la viabilidad de las semillas (Choi y col., 2002).

Posteriormente, las enzimas de *Arabidopsis* DEMETER-LIKE 2 (DML2) y DEMETER-LIKE 3 (DML3) fueron identificadas por homología de secuencia con ROS1 y DME (Choi y col. 2002). A partir del aislamiento de DME y ROS1 en el año 2002, varios laboratorios estudiaron la expresión de los genes codificantes de esta familia y las características de estas enzimas a nivel bioquímico.

Todas las enzimas de la familia DME (DME, ROS1, DML2, DML3) son DNA glicosilasas bifuncionales que escinden la base a través de un mecanismo de β , δ eliminación (Fig. SI, pág.131) (Gehring y col. 2006; Morales-Ruiz y col. 2006; Agius y col., 2006; Penterman y col., 2007).

En su versión recombinante, ROS1 y DME son capaces de reconocer y escindir 5-mC en todos los contextos de metilación existentes en plantas (CpG, CpNpG, y asimétricos) (Gehring y col. 2006; Morales-Ruiz y col. 2006; Agius y col., 2006). Además, estas enzimas pueden remover T apareadas incorrectamente con G *in vitro*, aunque presentan mayor afinidad por la 5-mC y aún actuar sobre 5-hmC, resultante de la oxidación de la 5-mC (Jang y col., 2014) (Fig. 5). La remoción de 5-mC en todos los contextos de metilación también ha sido demostrado *in vitro* para DML3, mientras que una débil actividad de DML2 sólo fue observada sobre 5-mC de contextos CG (Penterman y col., 2007).

En síntesis, los miembros de familia DME son exclusivos de las plantas y hasta el momento lo únicos involucrados en promover modificaciones epigenéticas, generando cambios en el patrón de metilación del DNA de modelos vegetales. Además, estas enzimas se

diferencian de otras DNA glicosilasas de plantas por presentar mayor tamaño y un dominio HhH-GPD discontinuo.

Cabe destacar que a diferencia del resto de las DNA glicosilasas de Arabidopsis, la acción de DME y ROS1 ha sido asociada a procesos que regulan el desarrollo, aspecto que se evaluó en este trabajo para MBD4L.

La HhH DNA glicosilasa MBD4

La enzima que se estudia en esta Tesis es el homólogo de hMBD4 en Arabidopsis. MBD4 fue caracterizada inicialmente en animales. Al inicio de este trabajo varios rasgos de la enzima de mamíferos habían sido descritos pero, no existía ninguna publicación acerca de su homólogo en plantas, tanto a nivel de actividad enzimática como a nivel genético.

MBD4 de mamíferos posee un dominio Methyl Binding Domain (MBD) que media la unión a DNA metilado y un dominio DNA glicosilasa (Hendrich y col., 1998) (Fig. 4). La estructura cristalina de este último confirma que esta enzima pertenece a la superfamilia HhH-GPD (Zhang y col., 2011; Manvilla y col., 2012). La actividad de esta enzima fue descrita sobre diferentes sustratos (Bellacosa y col., 1999; Hendrich y col., 1999; Petronzelli y col., 2000; Zhu y col., 2000; Wu y col., 2003). MBD4 actúa preferencialmente sobre U, T y 5-hidroxi metil uracilo (5-hmU) (Hendrich y col., 1999; Petronzelli y col., 2000; Hashimoto y col., 2012).

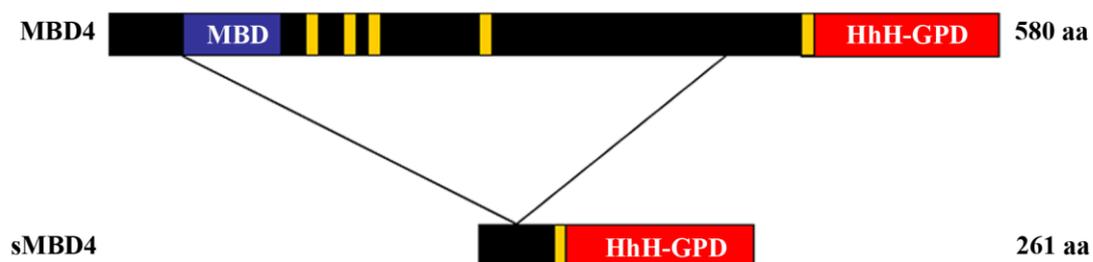


Figura 4. Esquema de formas alternativas de hMBD4. Esquema de la proteína completa (MBD4) y la variante corta (sMBD4) generadas por empalme (*splicing*) alternativo de *hMBD4*, adaptado de Owen y col. 2007. El dominio MBD se muestra en azul y el dominio DNA glicosilasa se indica en rojo. El tamaño de cada proteína se muestra a la derecha. En amarillo se indican las señales de localización nuclear (NLS) de cada variante.

MBD4 es la única DNA glicosilasa de la superfamilia HhH-GPD involucrada en procesos de demetilación activa en animales (Tabla I). La enzima THYMINE DNA GLYCOSYLASE (TDG), perteneciente a la superfamilia UDG, también posee esta capacidad (Sjolund y col., 2013).

El gen que codifica a MBD4 en humanos (*hMBD4*) genera dos transcritos alternativos. Los productos proteicos derivados de ambos transcritos conservan intacto el dominio DNA glicosilasa (Fig. 4). La versión más pequeña de estas proteínas pierde el dominio MBD y la mayoría de las señales de localización nuclear que posee la forma completa, manteniendo la capacidad de remover U, pero no T (Owen y col., 2007). Esto implica que como consecuencia del *splicing* alternativo se generan dos transcritos que codifican para proteínas con capacidades diferenciales.

A nivel funcional, la MBD4 de mamíferos, afecta a varios procesos. Junto con TDG participa en la demetilación activa (Sjolund y col., 2013). Además, juega un rol central en la reparación del DNA por supresión de mutaciones en sitios CpG y formación de tumores. La deficiencia de MBD4 no genera la formación de tumores por sí misma, pero ratones mutantes presentan un incremento de 2 a 3 veces en el número de transiciones C por T en sitios CpG (Millar y col., 2002; Wong y col., 2002).

Por otro lado, MBD4 interacciona con MLH1, una enzima del sistema MMR (Bellacosa y col., 1999) por lo que puede estar asociada a la reparación del genoma no sólo a través del sistema BER sino también participando en el MMR (Cortellino y col., 2003).

MBD4 también fue asociada a apoptosis, debido a la interacción de la enzima con el dominio Fas de la proteína FADD, asociado a la muerte celular (Screaton y col., 2003). Además, ratones deficientes en MBD4, con niveles reducidos de varias proteínas del sistema MMR, presentan una respuesta disminuida a tratamientos con agentes apoptóticos (Cortellino y col., 2003; Sansom y col., 2003). Esta evidencia soporta una asociación entre la reparación del DNA o supervivencia del genoma y la apoptosis.

Finalmente, la MBD4 de mamíferos se une a sitios genómicos hipermetilados y participa en la represión transcripcional de genes (Kondo y col., 2005; Laget y col., 2014). MBD4 reprime la transcripción en células de humanos por interacción de su dominio MBD y su región central con varias proteínas, como DNMT1 y HDAC1 (Kondo y col., 2005). MBD4 junto con DNMT1 participan en la represión de *CDKN1A/p21*, un gen que responde al daño de DNA y *MSH4*, homólogo de *MutY*, involucrado en recombinación (Laget y col., 2014). Estos estudios también demuestran que MBD4 participa en respuestas a estrés oxidativo, ya que esta enzima se estabiliza y acumula en el núcleo en condiciones de estrés y la deficiencia

de MBD4 genera menor supervivencia de células animales expuestas a estrés oxidativo (Laget y col., 2014).

La estructura del gen, sus transcritos alternativos, niveles y patrones de expresión del homólogo de hMBD4 no habían sido caracterizados en ningún modelo vegetal hasta el inicio de esta Tesis. Paralelamente y de manera independiente otros autores describieron la existencia de este gen en *Arabidopsis*, y analizaron a la enzima codificada por el mismo, la cual fue denominada METHYL BINDING DOMAIN 4- Like (MBD4L) (Ramiro-Merina y col., 2013). En dicha publicación se describe que MBD4L presenta un dominio DNA glicosilasa estructuralmente relacionado a la superfamilia HhH-GPD y altamente conservado en diferentes reinos. Además se demuestra la actividad recombinante *in vitro* de MBD4L sobre U, T y derivados de 5-halógeno U y prácticamente nula sobre 5-mC o 5-hmC. El dominio DNA glicosilasa, ubicado en la porción C-terminal de la enzima, es responsable de la actividad monofuncional de MBD4L, ya que esta actividad no está disminuída (en todo caso es mayor) en la proteína mutante que carece de la porción N-terminal. Sin embargo, al presente aún no se han reportado estudios funcionales sobre el gen codificante de la MBD4L de *Arabidopsis*, sus transcritos y fenotipos asociados a su deficiencia.

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS HhH DNA GLICOSILASAS DE ARABIDOPSIS

En animales los patrones de expresión y la localización subcelular fueron muy bien descritos para la mayoría de las DNA glicosilasas. En muchos casos, los genes que codifican para dichas enzimas sufren *splicing* alternativo generando productos que se expresan diferencialmente en los tejidos o durante el desarrollo (Nishioka y col., 1999; Ohtsubo y col., 2000; Ichinoe y col., 2004). En plantas, sólo algunos estudios enfocan sobre los patrones de expresión génica y localización de las DNA glicosilasas, los cuales se describen a continuación divididos de acuerdo a la superfamilia a la que pertenece cada enzima y se analizan comparativamente en la Tabla II (pág. 22).

3-metil purina DNA glicosilasas (MPG)

En *Arabidopsis* un único transcripto fue observado para *aMAG* mediante experimentos de Northern blot donde se utilizó como sonda el clon aislado a partir de una librería de cDNA

(Shi y col., 1997). Este gen se expresa preferentemente en tejidos en división y crecimiento, lo que sugiere que dicha enzima es requerida durante estas dos etapas (Shi y col., 1997).

NEI/FPG DNA glicosilasas

El gen *AtFPG* presenta siete transcriptos alternativos (Ohtsubo y col., 1998; Murphy y Gao, 1998; Murphy y Gao, 2001), *AtFPG1* y *AtFPG2* constituyen los dos genes más estudiados que muestran un patrón de expresión diferencial. Mientras *AtFPG1* se expresa principalmente en inflorescencias y raíces, *AtFPG2* lo hace en inflorescencias y tallo (Murphy y Gao, 2001).

Genes homólogos a *FPG* fueron caracterizados también en otras especies vegetales. En caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) el gen que codifica para ScFPG está sujeto a *splicing* alternativo, generando dos transcriptos. Ambos genes se expresan en raíz, hojas, flores y meristema apical, aunque presentan diferencias en el nivel de expresión (Scortecci y col., 2007). En *Medicago trunculata* un único gen homólogo a *FPG*, (*MtFPG*) fue caracterizado hasta el momento (Macovei y col., 2011). *MtFPG* se expresa en nódulos, raíces, tallos, hojas y flores y es activado en condiciones de estrés (Macovei y col., 2011).

HhH-GPD DNA glicosilasas

Varios miembros de esta superfamilia fueron estudiados en *Arabidopsis*. *AtNTH1* presenta un único transcripto que se expresa en diversos tejidos, tales como raíz, hojas de roseta y caulinares, tallo y flores. (Roldán-Arjona y col., 2000). Por su parte, *AtNTH2* codifica para tres variantes de *splicing* alternativo cuyos patrones de expresión no han sido estudiados (Gutman y Niyogi, 2009). Ambos genes codifican para enzimas que se localizan exclusivamente en el cloroplasto, indicando que el daño oxidativo del genoma de esta organela es reparado por el sistema BER (Gutman y Niyogi, 2009).

El gen que codifica para *AtOGG1* se expresa en raíces, hojas de la roseta y caulinares, tallo, flores, silicuas y semillas y no presenta transcriptos alternativos (Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001; Chen y col., 2012). Este gen no se activa en condiciones de estrés oxidativo (Dany y Tissier, 2001), pero aumenta su transcripción durante la imbibición de la semilla (Chen y col., 2012). *AtOGG1* presenta una localización exclusivamente nuclear (Chen

y col., 2012) y plantas de *Arabidopsis* mutantes para *AtOGG1* tienen fenotipos normales de crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva (Murphy, 2005).

Respecto a la familia DME, el gen *DME* se expresa preferentemente en los gametófitos, exactamente en la célula central del gametófito femenino, progenitor del endosperma (Choi y col., 2002) y en la célula vegetativa del pólen (Schoft y col., 2011). El patrón de expresión de *DME* está relacionado con su función. Esta enzima es específicamente requerida para la expresión del alelo materno de *MEDEA*, *FLOWERING WAGENINGEN* y *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2* en la célula central del gametófito femenino y endosperma, un proceso que es esencial para la viabilidad del embrión y endosperma (Choi y col., 2002). La función de *DME* en la célula vegetativa del gametófito masculino no está clara, aunque podría estar relacionada con la fertilidad del pólen (Schoft y col., 2011).

Por su parte, *ROS1*, *DML2* y *DML3* presentan expresión constitutiva (Gong y col. 2002; Ortega-Galisteo y col., 2008), y mantienen los patrones de metilación en varias regiones del genoma de *Arabidopsis* (Penterman y col., 2007).

La expresión transcripcional de *DME* y *ROS1*, pero no de *DML2* y *DML3* están reguladas por metilación. Las mutantes *met1-3* de *Arabidopsis*, deficientes en la enzima METILTRANSFERASE 1 (*MET1*), encargada de mantener la metilación del DNA en contextos CpG, muestran represión transcripcional de *ROS1* y en menor medida de *DME* (Mathieu y col., 2007). Esto sugiere que la metilación del DNA es necesaria para la activación de *DME* y *ROS1*. Por su parte, la transcripción de *DML3* es reprimida por la expresión del micro RNA 402 (*miR402*) (Kim y col., 2010).

En referencia a la localización subcelular de las enzimas de la familia DME, las versiones nativas de *DME* y *ROS1* tendrían localización nuclear según lo demostrado mediante transformaciones de plantas con fusiones de estas proteínas a GFP (Choi y col., 2002; Gong y col., 2002). Por su parte, *DML2* y *DML3* poseen señales de localización nuclear en su secuencia primaria (Choi y col., 2002).

En síntesis, los miembros de la familia DME que son los mejor caracterizados, básicamente por su actividad 5-mC DNA glicosilasa, muestran diferencias en su patrón de expresión génica y tendrían un rol diferente sobre el genoma afectando distintos genes asociados al desarrollo de la planta. Mientras *DME* presenta un rol fundamental durante el desarrollo del embrión, *ROS1*, *DML2* y *DML3* juegan un papel fundamental durante el desarrollo vegetativo.

ACCIÓN DE DNA GLICOSILASAS DURANTE EL DESARROLLO Y EN RESPUESTA AL ESTRÉS

Fenotipos de desarrollo asociados a la falta de DNA glicosilasas

El rol de las DNA glicosilasas en los programas de desarrollo de las plantas ha sido poco estudiado. Como se describió anteriormente, los genes de *Arabidopsis* que codifican para DNA glicosilasas presentan distintos patrones de expresión, sugiriendo que estas enzimas actúan en diferentes procesos biológicos. En este modelo vegetal, las mutantes de falta de función *dml2-1*, *dml3-1*, *ung*, *nth1*, *nth2*, doble mutante *nth1 nth2*, *fpg*, *ogg1* y doble mutante *fpg ogg1* no muestran irregularidades fenotípicas durante el desarrollo (Penterman y col, 2007; Córdoba-Cañero y col., 2010; Gutman y Niyogi, 2009; Murphy, 2005). A diferencia de las anteriores, en la mutante nula *dme-1* y la mutante de falta de función *ros1-1* presentan anormalidades.

Las plantas mutantes *dme-1* homocigotas muestran fenotipos reproductivos anormales. Sus flores tienen modificaciones en el número, tamaño y disposición de las piezas florales. Las silicuas de las plantas mutantes *dme-1* presentan un alto porcentaje de semillas abortadas. Esto demuestra que la expresión de DME es necesaria para garantizar la producción de órganos reproductivos normales y la viabilidad del embrión (Choi y col., 2002).

Por su parte, plantas *ros1-1*, que presentan una mutación puntual que genera un codón de terminación prematuro en ROS1, tienen anormalidades en crecimiento vegetativos y reproductivos. Estas plantas muestran menor crecimiento de raíz, hojas estrechas y menor tamaño respecto a plantas control, fertilidad reducida determinada por anormalidades en la estructura de piezas florales y menor desarrollo de silicuas. Las anormalidades fenotípicas de la mutante *ros1-1* son evidentes a partir de la cuarta filial, lo que sugiere que los fenotipos aberrantes de la mutante *ros1-1* podrían estar dados por acumulación de epimutaciones en genes que intervienen en el desarrollo (Gong y col., 2002).

De esta manera, ambas, DME y ROS1 participan en procesos de desarrollo de *Arabidopsis* por regulación epigenética (demetilación del DNA) de genes que intervienen en los mismos.

Uno de los procesos del desarrollo reproductivo más estudiados en plantas es la floración. En *Arabidopsis* la floración está regulada a nivel genético y epigenético y puede ser inducida por señales ambientales, como el fotoperíodo, la baja temperatura, reguladores del

desarrollo (vía autónoma) o señales hormonales como giberelinas (Fig. 5) (Boss y col., 2004; Roux y col., 2006).

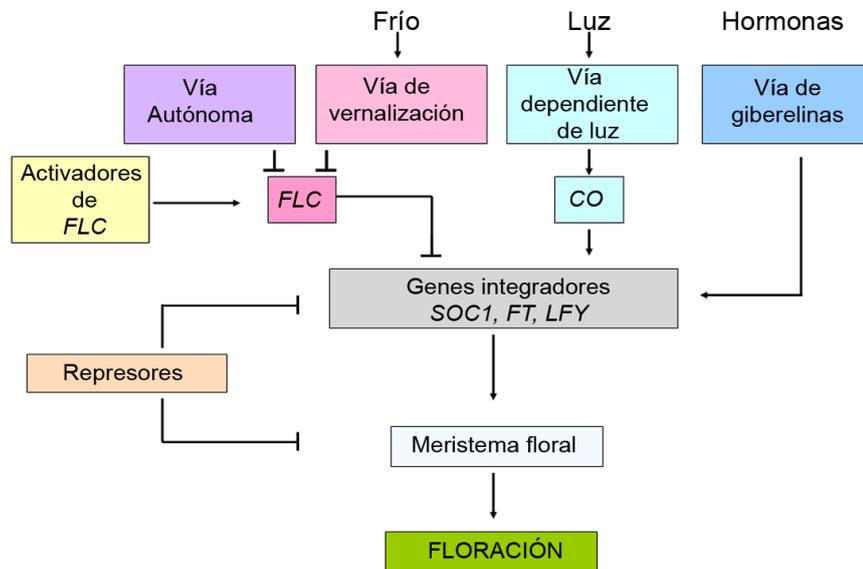


Figura 5. Vías que controlan la floración en Arabidopsis. Esquema de las vías y genes que interfieren en la determinación de la floración. Arriba se muestran los estímulos endógenos y exógenos que participan en la floración. *FLC*: FLOWERING LOCUS C; *CO*: CONSTANS; *SOC1*: SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS; *FT*: FLOWERING TIME; *LFY*: LEAFY. Adaptado de Roux y col., 2006.

El gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* es clave en la regulación de la floración inducida tanto por vernalización, como la vía denominada “autónoma” (Alexandre y col, 2008). El nivel de expresión de *FLC* se correlaciona con el retraso de la floración ya que la proteína codificada por este gen regula negativamente la expresión de otros genes que actúan abajo en la misma cascada, tales como *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)*.

Por otra parte, la expresión de *CONSTANTS (CO)*, un gen codificante de una proteína activadora de la floración, promueve la floración sensible a señales del fotoperíodo (Amassino, 2010) (Fig. 5).

A nivel epigenético *FLC* está regulado a través de miRNAs (Yaish y col., 2011; Heo y Sung, 2010; Schmitz y col., 2007), acetilación y metilación de histonas, monoubiquitinación de H2B, deposición de la variante de la histona H2A.Z (He, 2009), y metilación del DNA (Finnegan y col., 1998; Finnegan y col., 2005; Yaish y col., 2009). Ninguna DNA glicosilasa fue directamente correlacionada con la activación de *FLC* por procesos de demetilación activa hasta el momento. Sin embargo, las mutantes de la acetilasa de histonas *AtMBD9* muestran hipermetilación del promotor y la región 5' codificante del gen, represión de *FLC* y floración temprana (Yaish y col., 2009). En este trabajo los autores sugieren que *AtMBD9* reclutaría a una DNA glicosilasa para remover de forma activa la metilación de *FLC* (Yaish y col., 2009).

Participación de DNA glicosilasa en las respuesta al estrés

Las plantas, son más susceptibles que los animales a agentes mutagénicos y requieren sistemas de reparación más eficientes (Roldán-Arjona y Ariza, 2009). La exposición a agentes exógenos y productos que son consecuencia del propio metabolismo celular generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales constituyen la mayor fuente oxidativa de daño al DNA (Torres, 2010; Nanda y col, 2010; Tuteja y col., 2009). Las modificaciones en el DNA pueden ser genéticas, como mutaciones de bases o ruptura de las cadenas del DNA y epigenéticas, como por ejemplo la demetilación del DNA y las modificaciones de histonas). Las DNA glicosilasas están involucradas no sólo en la reparación de alteraciones de bases (Bray y Weat, 2005; Zharkov, 2008; Boyco y Kovalchuck, 2008; Krokan y Bjora, 2013), sino también en la generación de cambios epigenéticos bajo condiciones de estrés (Álvarez y col., 2010; Luo y col., 2012; Boyko y Kovalchuk, 2008).

Demetilación y decondensación del genoma de *Arabidopsis* en condiciones de estrés

Diversos cambios epigenéticos, tales como metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de la región N-terminal de histonas, remodelación de la cromatina por complejos proteicos y pequeños RNAs no codificantes ocurren como consecuencia de estrés biótico y abiótico (Tabla III).

Tabla III. Modificaciones epigenéticas en condiciones de estrés

Estrés	Efecto	Referencias
Modificaciones postraduccionales de histonas		
ABA, salinidad y frío	Demetilación de histona H4	Chinnusamy y col., 2008; Zhu y col., 2008
UV-B	Acetilación de histonas	Casati y col., 2006; Casati y col., 2008
<i>Cochiobolus carbonum</i>	Inactivación de HDACs	Brosch y col., 1995; Walton y col., 2006
<i>Alternaria brassicicola</i>	Activación de HDA19	Zhou y col 2005
	Activación de HDA6	Wu y col., 2008
	Inactivación de HDAC	Wight y col., 2009
<i>Botrytis cinerea</i> y <i>A. brassicicola</i>	Inhibición de la mono-ubiquitinación de H2B	Dhawan y col., 2009
<i>Pseudomonas syringae</i>	Activación de metilación de H3K4	Álvarez-Venegas y col., 2007
	Modificación de la deposición de la variante H2A.Z	March-Díaz y col., 2008
Complejos remodeladores de cromatina		
Sequía	SNF2/Brahma-type AtCHR12 modula el arresto de crecimiento durante el estrés MSI1 regula negativamente genes de tolerancia a sequía	Mlynárová y col., 2007; Alexandre y col., 2008
ABA	AtNAP1 regula la respuesta de ABA HAB1 y PKL regulan negativamente la respuesta a ABA	Liu y col., 2009 Saez y col., 2008; Perruc y col., 2007
Patógenos biótrosos	PIE1, SEF, H2A.Z, BRM y SNI1 mantienen represión constitutiva de la vía del ácido salicílico (SA)	March-Díaz y col., 2008; March-Díaz y Reyes, 2009; Bezhani y col., 2007; Durrant y col., 2007; Mosher y col., 2007
Patógenos necrótrofos	SYD aumenta la resistencia contra <i>B. cinerea</i> y activación de genes de la vía de jasmonato	Walley y col., 2008
RNAs Pequeños no codificantes		
Estrés oxidativo (luz, Cu ²⁺ , Fe ²⁺ y MV)	Represión de miR398, inducción de tolerancia a estrés oxidativo	Sunkar y col., 2006
Bajo nivel sulfato	Activación miR395, coordinación de cambios en traslocación y asimilación de sulfato	Jones-Rhoades y col., 2004; Allen y col., 2005
Bajo nivel fosfato	Activación miR399, mantención de homeostasis de fosfato	Fujii y col., 2005; Bari y col., 2006; Aung y col., 2006
Salinidad	Activación SRO5-P5CDH natsiRNA, estimula osmoprotección y menor generación de ROS	Borsani y col., 2005
Sequía	Activación de miR160, aumento de elongación de raíces y crecimiento de raíces secundarias	Wang y col., 2005
ABA	Activación miR159, represión de reguladores positivos de ABA Regulación dinámica miR398	Zhou y col., 2007; Reyes y col., 2007 Jia y col., 2009
Virus	Activación miR156, miR160, miR164, miR166, miR169 y miR171	Zhou y col., 2007; Bazzini y col., 2007
<i>Pseudomonas syringae DC3000</i>	Represión miR393 y miR396	Navarro y col., 2008
Flagelina	Activación miR393 disminución de degradación de proteínas y resistencia contra <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Navarro y col., 2006; Fahlgren y col., 2007

Abreviaturas: ABA, ácido absísico; HDAC, complejo de histonas deacetilasa; HDA, histona deacetilasa; H2B, Histona 2B; H3K4, lisina4 de histona H3; H2A.Z, variante de H2; AtCHR12, *Arabidopsis thaliana*

CHROMATIN_REMODELING GENE 12, un factor remodelador dependiente de ATP; MSI1, una subunidad del complejo de proteínas Polycomb; AtNAP1, *A. thaliana* NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1 ;HAB1, HYPERSENSITIVE TO ABA1; PKL, PICKLE, ; PIE1, photoperiod-independent early flowering 1; SEF, SERRATED LEAVES AND EARLY FLOWERING; BRM, BRAMMA; SNI1, SUPPRESSOR OF NPR1, INDUCIBLE1; SYD, SPLAYED; SRO5, SIMILAR TO RCD ONE 5; P5CDH, Δ^1 -PYRROLINE-5-CARBOXYLATE DEHYDROGENASE.

El nivel de condensación de la cromatina está íntimamente relacionado con la existencia de marcas epigenéticas represoras, tales como 5-mC y modificaciones de histonas (H3K9me2, H3K27me2). Mapas de alta resolución de metilación del DNA y modificaciones de histonas del genoma de *Arabidopsis* muestran que la heterocromatina altamente metilada y con marcas represivas de histonas se concentra a las regiones pericentroméricas y centroméricas de los cinco cromosomas y a las regiones organizadoras del nucleolo que se encuentran condensadas (Cokus y col., 2008; Lister y col., 2008; Zhang y col., 2006; Zilberman y col., 2007; Zhou y col., 2010).

Resultados publicados por Pavet y col., (2006) muestran que la infección de *Arabidopsis* con la bacteria *P. syringae* pv. *tomato* desencadena la demetilación masiva del genoma vegetal y la decondensación de la heterocromatina centromérica y pericentromérica a las 24 horas después de la inoculación del patógeno. La demetilación observada ocurre en contextos simétricos y asimétricos y alcanza el 60% de las C metiladas del genoma. Los tejidos infectados con la bacteria que sufren demetilación tienen una tasa de división celular muy reducida, por lo que la demetilación no parece ser pasiva (sin división celular) sino catalizada por alguna enzima (Pavet y col., 2006). Esta demetilación de la cromatina centromérica también fue descrita por otros autores para plantas expuestas a *P. syringae* pv. *tomato* avirulenta y a la hormona ácido salicílico (SA). En este caso, al analizar el patrón de metilación del genoma completo de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés se detectó una masiva demetilación del DNA centromérico en respuesta a SA y se sugirió que la demetilación podría ser responsable de la inducción de genes de defensa durante la infección de patógenos biótrosos (Downen y col., 2012). Además, la demetilación del genoma fue descrita en plantas de *Arabidopsis* tratadas con *flg22*, un péptido sintético derivado de la flagelina que actúa activando las defensas basales en plantas (Yu y col., 2013).

Asimismo, la demetilación del DNA y consecuente activación génica ha sido reportada en plantas expuestas a diversos tipos de estrés abiótico. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) bajo tratamiento con aluminio, metil viológeno (MV), cloruro de sodio (NaCl) y

bajas temperaturas (Choi y Sano, 2007); plantas de maíz (*Zea mays*) expuestas a bajas temperaturas (Steward y col., 2002) y plantas de soja (*Glicine max*; Karan y col., 2012) y arroz (*Oryza sativa*; Song y col., 2012) sometidas a estrés salino muestran demetilación y activación de diferentes *loci*.

Por su parte, la decondensación de la cromatina fue reportada en plantas de *Arabidopsis* sometidas a condiciones adversas como altas temperaturas (Pecinka y col., 2009; Wang y col., 2013) y baja intensidad de luz (Tessadori y col., 2009). Esto sugiere que cambios en la demetilación del DNA y en la estructura de la heterocromatina podrían ser inducidos por diversos estresores y eventualmente afectar la respuesta al estrés.

Se desconoce si existen componentes de la planta que participan en la demetilación y decondensación de la cromatina centromérica durante el estrés. A pesar que las 5-mC DNA glicosilasas han sido profundamente estudiadas en plantas, no existen trabajos que involucren a estas enzimas con la demetilación activa y/o decondensación de cromatina en estrés. Estudios sobre plantas mutantes *ros1-1* (Gong y col. 2002; Qüesta y col., 2013) y *dml3-1* (Kim y col., 2010) indican que ambas DNA glicosilasas participarían en respuestas a estrés abiótico. A pesar de ello, el mecanismo por el cual intervienen en dichos procesos no se conoce por el momento.

LAS DNA GLICOSILASAS PODRÍAN REMOVER 5-METIL CITOSINA (5-mC)

La capacidad de alterar marcas asociadas a la molécula de DNA (metilación de las bases; metilación, fosforilación, acetilación, ubiquitinación y ADP ribosilación de histonas) permite el control epigenético de la expresión de genes codificantes y secuencias repetitivas no codificantes (transposones, RNAs pequeños) (Feng y Jacobsen, 2011). Tal como se describió anteriormente, las DNA glicosilasas reparan las bases lesionadas y mantienen la integridad del genoma mediante la activación del sistema BER. Además, algunas DNA glicosilasas, particularmente las 5-mC DNA glicosilasas, alteran marcas epigenéticas y controlan la expresión de genes. El reemplazo de 5-mC por C reduce las marcas epigenéticas represivas, favoreciendo la decondensación de la cromatina y expresión génica. Sin embargo, los mecanismos por los que se produce este reemplazo siguen siendo discutidos, dado que se desconocen los sustratos endógenos para reacciones de demetilación de 5-mC. Aún así las

DNA glicosilasas siguen siendo consideradas como candidatos para mediar la demetilación activa del DNA en animales y plantas.

La búsqueda de enzimas causantes de la demetilación activa del DNA en mamíferos fue caracterizada por un desfile de putativas 5-mC demetilinasas, cada una muy diferente de la siguiente. De hecho, la existencia y la naturaleza de las demetilinasas del DNA en mamíferos ha sido un tema de recurrente incertidumbre y controversia. El primer hallazgo de una actividad demetilasa fue reportado en células de roedores (Gjerset y Martin, 1982), seguido por diferentes reportes en extractos totales de células de rata (Weiss y col., 1996) y extractos nucleares de pollo (Jost y col., 1997). Mientras que no se identificaron a las enzimas responsables de esta actividad en roedores, la actividad demetilasa en extractos nucleares de pollo fue atribuida posteriormente a TDG (Swisher y col., 1998), y fuertemente cuestionada (Cortázar y col., 2007). En 1999, la METHYL BINDING DOMAIN 2 B de humanos fue propuesta para catalizar el reemplazo del grupo metilo por un átomo de hidrógeno *in vitro* (Bhattacharya y col., 1999; Ramchandani y col., 1999). El método de aislamiento de la enzima, la reacción de corte del enlace entre metilo y la C, energéticamente desfavorable, y la incapacidad para reproducir los resultados pusieron en duda rápidamente la actividad de dicha enzima (Wade y col., 1999; Ng y col., 1999).

Actualmente, se asume que la remoción de la 5-mC está catalizada por DNA glicosilasas del sistema BER (Ooi y Bestor, 2008), que permiten reemplazar 5-mC por C. Distintos derivados de C, generados por metilación, oxidación o deaminación de esta base (Fig 6), podrían actuar como sustratos de estas DNA glicosilasas.

En animales TDG (Nedderman y col., 1993) y MBD4 (Hendrich y col., 1999; Bellacosa y col., 1999; Zhu y col., 2000b), fueron inicialmente propuestas para catalizar la remoción directa de la 5-mC (Fig. 7). Estas enzimas actúan principalmente sobre T, siendo además capaces de remover U y derivados del mismo (Sjolund y col., 2013). La actividad de TDG y MBD4 sobre la 5-mC es 30-40 veces menor que su actividad sobre el par T:G (Zhu, 2000). A pesar de esto, estudios cristalográficos recientes y estructurales del dominio DNA glicosilasa de MBD4 ponen en discusión la unión de 5-mC y sus derivados oxidados al sitio activo de dichas enzimas (Manvilla y col., 2012), cuestionando su acción directa sobre 5-mC.

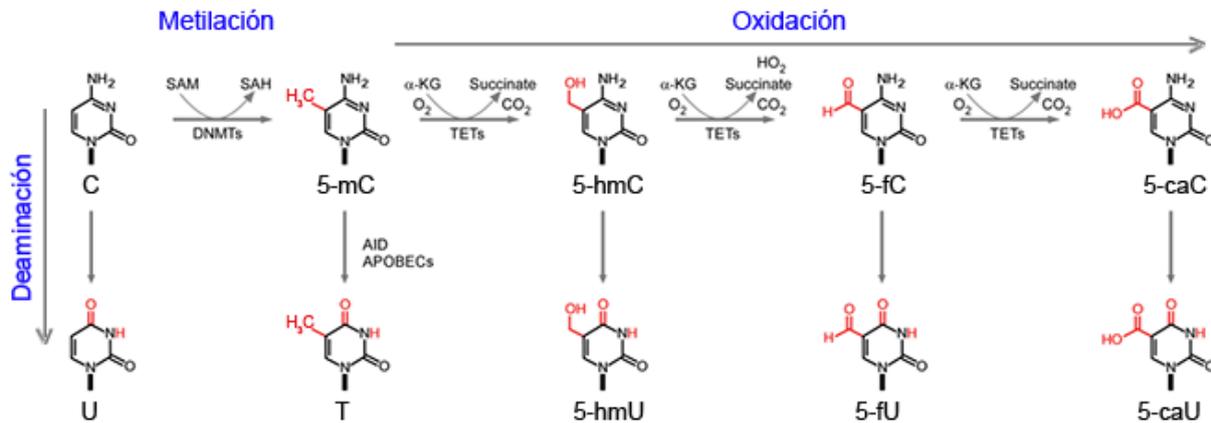


Figura 6. Productos de metilación, deaminación y oxidación de C. Las enzimas que catalizan cada uno de estos cambios caracterizadas en animales son DNA METHYL TRANSFERASES (DNMTs); TEN ELEVEN TRANSLOCATION 1 (TETs); ACTIVATION-INDUCED DEAMINASE (AID); APOLIPOPROTEIN B MRNA EDITING ENZYME, CATALYTIC POLIPEPTIDE (APOBECs). C, citosina; 5mC, 5-metil citosina; 5hmC, 5-hidoxi metil citosina; 5fC, 5-fluor citosina; 5caC, 5-carboxi citosina; U, uracilo; T, timina; 5hmU, 5-hidroxii metil uracilo; 5fU, 5-fluor uracilo; 5caU, 5-carboxi uracilo.

Sin embargo, tanto TDG como MBD4 están involucradas en demetilación activa del genoma de animales, por remoción de U y T. Se especula que estos dos sustratos resultarían de la deaminación de C y 5-mC, respectivamente (Sjolund y col., 2013) (Fig. 7). Esta vía de demetilación fue sustentada por estudios realizados en embriones de peces zebra (*Danio rerio*) (Rai y col., 2008).

A partir del año 2010, luego del descubrimiento de la 5-hidroximetil citosina (5-hmC) en genomas de células animales (Munzel y col., 2010; Song y col., 2011), TDG y MBD4 fueron implicadas en la demetilación activa desencadenada a partir de oxidación y deaminación de 5-mC en células animales que genera 5-hmU (Fig. 6) (Sjolund y col., 2013; Hashimoto y col., 2012b).

Tal como se esquematiza en la figura 7, las enzimas de la familia DME catalizan la demetilación activa por remoción directa de 5-mC (Zhu, 2009). Esta evidencia está fuertemente apoyada por ensayos bioquímicos (Choi y col. 2002; Gong y col., 2002; Gehring y col. 2006; Morales-Ruiz y col. 2006; Agius y col., 2006; Ortega-Galisteo y col., 2008) y genéticos (Penterman y col., 2007; Qian y col., 2012). Las mutantes simples de *Arabidopsis ros1*, *dml2*, *dml3* y la triple mutante que acumula estas tres fallas (*rdd*) no alteran en gran

escala los niveles globales de metilación del genoma, pero acumulan metilación en cientos de regiones discretas a lo largo de los cinco cromosomas, con excepción de las regiones pericentroméricas (Penterman y col., 2007; Qian y col., 2012). La mayoría de estas regiones blanco son compartidas por estas enzimas, sugiriendo redundancia de función (Penterman y col., 2007). Esto sugiere que aunque ROS1, DML2 y DML3 presentan numerosos blancos distribuidos en el genoma de *Arabidopsis* no actuarían sobre la heterocromatina centromérica.

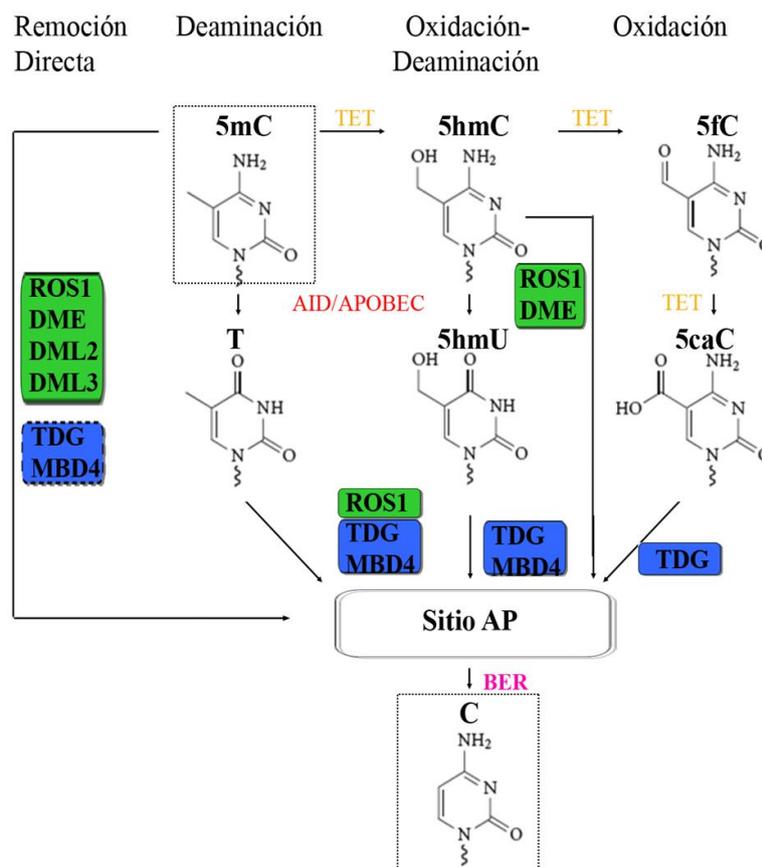


Figura 7. Mecanismos de reemplazo de 5-mC por C por DNA glicosilasas en plantas y animales. A la izquierda se esquematiza la remoción directa de la 5-metilcitosina (5mC). A continuación, la remoción de timina (T) derivada de la deaminación de la 5-mC, la remoción de 5-hidroxi metiluracilo (5hmU) derivado de la oxidación de la 5-mC a 5-hidroxi metilcitosina (5hmC) y posterior deaminación de la misma y la remoción de 5-carboxil citosina (5caC) derivado de sucesivos pasos de oxidación de la 5-mC. Las DNA glicosilasas de animales TDG y MBD4 se recuadran en azul y las DNA glicosilasa de plantas, ROS1, DME, DML2 y DML3, se indican en verde. Las líneas completas indican evidencia sustentada por ensayos *in vitro*, mientras que las líneas punteadas indican evidencia cuestionada. La oxidación de la 5-mC a 5-hmC, 5-fC y 5-caC está catalizada por TET, mientras AID/APOBEC es responsable de las reacciones de deaminación.

En resumen, se desconocen los mecanismos que producen decondensación de la cromatina centromérica en condiciones de infección bacteriana u otro estrés. Las DNA glicosilasas surgen como buenos candidatos ya que son las únicas enzimas conocidas hasta el momento que está involucradas en procesos de demetilación activa del DNA. En Arabidopsis, DME, ROS1, DML2 y DML3 catalizan la demetilación activa por escisión directa de la 5-mC, pero no alterarían a los centrómeros. En animales, MBD4 y TDG producen demetilación participando en vías alternativas que implican oxidación y deaminación de la 5-mC.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de esta Tesis doctoral es contribuir al conocimiento de las alteraciones de la heterocromatina de *Arabidopsis thaliana* inducida durante el ataque de *P. syringae* pv *tomato*, y estudiar el desarrollo de esta planta en condiciones basales y de estrés biótico y abiótico.

Los objetivos específicos planteados a este fin se describen a continuación:

- Seleccionar una proteína vegetal homóloga a MBD4 de humanos (MBD4L) involucrada en la decondensación de la heterocromatina centromérica durante la infección bacteriana.
- Caracterizar estructural y funcional el gen que codifica para MBD4L
- Analizar de la participación de MBD4L en el desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis*.
- Estudiar de la contribución de MBD4L al crecimiento de *Arabidopsis* en condiciones de estrés biótico y abiótico.

Las hipótesis planteadas en este trabajo se detallan a continuación:

- La decondensación de la heterocromatina centromérica de *Arabidopsis* inducida por infección con *P. syringae* pv. *tomato* involucra al menos una proteína de esta planta.
- La DNA glicosilasa MBD4L de *Arabidopsis* podría contribuir a la decondensación de la heterocromatina centromérica inducida por *P. syringae* pv. *tomato*.
-
- La deficiencia de la DNA glicosilasa MBD4L de *Arabidopsis* podría afectar el desarrollo vegetativo y/o reproductivo de la planta.
- MBD4L podría contribuir a la tolerancia de *Arabidopsis* en condiciones de estrés oxidativo o salino.
- La deficiencia de MBD4L podría modificar la resistencia de *Arabidopsis* a *P. syringae* pv. *tomato*

RESULTADOS

CAPÍTULO I:
**SELECCIÓN DE UNA DNA GLICOSILASA (MBD4L) QUE PARTICIPA EN
LA DECONDENSACIÓN DE HETEROCROMATINA CENTROMÉRICA EN
INFECCIÓN**

En este capítulo se describen estudios dirigidos a seleccionar una proteína homóloga a la DNA glicosilasa hMBD4 y analizar su participación en la decondensación de la heterocromatina centromérica que sufre el genoma de *Arabidopsis* en condiciones de infección con *P. syringae* pv. *tomato DC3000*.

En *Arabidopsis* la demetilación del DNA centromérico puede producir relajación de la heterocromatina centromérica (Fransz y col., 2002; Soppe y col., 2002; Probst y col., 2003). La decondensación del DNA centromérico inducida por la bacteria descrita por Pavet y col. (2006) parecía derivar de un proceso de demetilación activa. Las DNA glicosilasas ROS1, DME, DML2 y DML3 de *Arabidopsis* pertenecientes a la superfamilia HhH-GPD habían sido propuestas como enzimas responsables de la demetilación activa (Gong y col., 2002; Choi y col., 2002; Penterman y col., 2007). Sin embargo, estas enzimas no se perfilaban como candidatos capaces de catalizar la hipometilación y decondensación de la cromatina centromérica en condiciones de infección con *Pst*, básicamente porque las regiones centroméricas no habían sido descritas como blancos de estas enzimas (Choi y col., 2002; Penterman y col., 2007; Qian y col., 2012). Paralelamente, en animales las DNA glicosilasas TDG (Nedderman y col., 1993) y MBD4 (Hendrich y col., 1999; Bellacosa y col., 1999; Zhu y col., 2000b), habían sido designadas como responsables de la demetilación activa por remoción directa de 5-mC y de U producido por la deaminación de 5-mC.

En base a estos antecedentes, se evaluó si homólogos de TDG y MBD4 de animales podrían catalizar la decondensación centromérica del genoma de *Arabidopsis* durante infecciones con el patógeno bacteriano.

Utilizando el programa de acceso libre Basic Local Alignment Search (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se comparó la secuencia primaria de TDG de humanos con la de proteínas de *Arabidopsis* y se observó que la planta carece de proteínas homólogas a esta DNA glicosilasa. Del mismo modo se analizó la existencia de proteínas homólogas a MBD4, un homólogo de hMBD4 en *Arabidopsis*. El gen que codifica para esta proteína (*At3g07930*) se caracterizó durante el transcurso de esta Tesis, y como ya se

mencionó otros autores demostraron muy recientemente que el producto proteico codificado por el mismo funciona *in vitro* como una DNA glicosilasa activa que fue denominada MBD4L (METHYL BINDING DOMAIN 4-Like; Ramiro-Merina y col., 2013), nombre que será adoptado en el transcurso de este trabajo.

I.1 El gen *At3g07930* de *Arabidopsis* codifica para un homólogo de *hMBD4*

Inicialmente realizamos una serie de estudios informáticos para analizar al producto codificado por el gen *At3g07930*. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Biólogo Damián Cambiagno (Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

Utilizando el programa HHPred de MPI Bioinformática se comparó la secuencia de aa completa de la proteína hMBD4 con proteínas de diferentes especies disponibles en bases de datos (Protein Data Bank, InterPro, Pfam, COG, y SCOP). HHPred es una plataforma bioinformática libre que permite predecir proteínas homólogas a la secuencia aminoacídica de interés mediante de comparación de Hidden Markov Model (HMM) (Biegert y col., 2006). La proteína codificada por el gen de *Arabidopsis At3g07930* resultó ser la que presentó mayor identidad con la secuencia completa de hMBD4. Tal como puede observarse en el apilamiento de secuencias de la Figura 7, generado con el programa de acceso libre ClustalW, ambas proteínas comparten el 36 % de identidad en los aminoácidos, aunque la mayor homología se encuentra en la región del dominio DNA glicosilasa descrito para hMBD4.

Para evaluar la presencia y organización de dominios conservados en MBD4L, utilizamos la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Allí se dispone de una colección importante de familias de proteínas, cada una representada por múltiples alineamientos de secuencias y HMMs, que permite localizar diferentes dominios de manera comparativa a partir de la secuencia de aa de la proteína en cuestión.

Un putativo dominio DNA glicosilasa (Pfam PF00730) fue hallado en la secuencia aminoacídica de MBD4L. Dicho dominio, ubicado en la región C-terminal de la proteína (330-445 aa., Fig. 7A-B), presenta un 43% de identidad respecto a la secuencia del dominio DNA glicosilasa de hMBD4 y está relacionado estructuralmente con la superfamilia HhH-GPD DNA glicosilasa

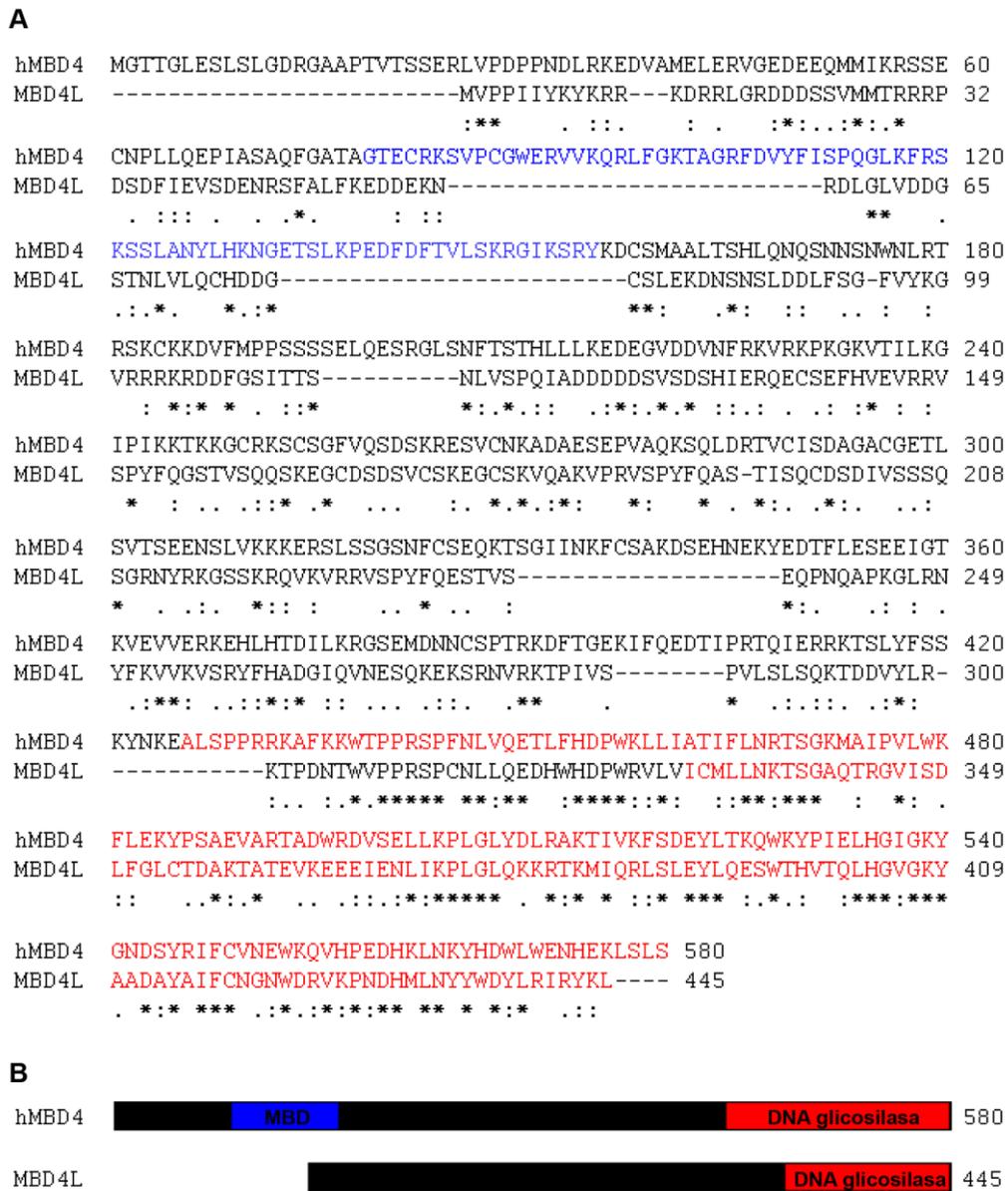


Figura 7. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de hMBD4 y su homólogo en Arabidopsis, MBD4L. A) El programa ClustalW2 se utilizó para realizar el alineamiento de secuencias aminoácidas. (*): residuos idénticos; (:) residuos con alta similitud (*score* > 0.5 en matriz Gonnet PAM 250); (.) residuos con baja similitud (*score* =< 0.5 en matriz Gonnet PAM 250). B) Esquema de proteínas y tamaño de hMBD4 y MBD4L. Para A y B el dominio MBD de hMBD4L se destaca en azul y el dominio DNA glicosilasa de ambas proteínas se indica en rojo.

A diferencia de hMBD4, que posee un dominio MBD en la porción N-terminal, MBD4L no contiene este dominio, ni ningún otro dominio conservado en su extremo amino terminal (Fig. 7B).

Con la finalidad de predecir posibles estructuras secundarias en el dominio DNA glicosilasa de MBD4L se utilizó la secuencia aminoacídica del dominio DNA glicosilasa (Pfam PF00730) y el programa bioinformático de acceso libre Pyre2 (Kelley y Sternberg, 2009). Con estas herramientas se obtuvo un modelo en el cual MBD4L presenta un dominio DNA glicosilasa compuesto por nueve α hélices (Fig. 8), similar al descrito para los miembros de la superfamilia HhH-GPD (Zharkov, 2008).

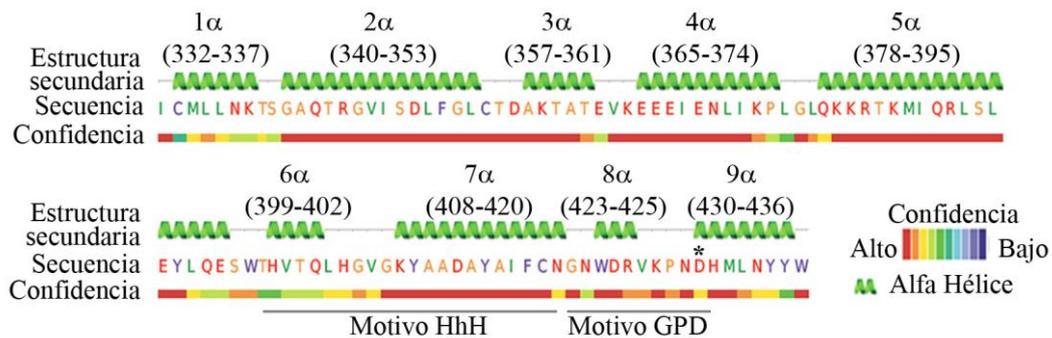


Figura 8. Estructura secundaria modelada para el dominio DNA glicosilasa de MBD4L. α hélices (verde) predichas para el dominio DNA glicosilasa de MBD4L. Arriba y entre paréntesis se indican los aminoácidos que forman cada α hélice. Abajo se indica la secuencia de aminoácidos y el nivel de confianza de predicción de la estructura secundaria con escala de colores. Se indican los motivos HhH y GPD (líneas) y el Asp (D) catalítico (asterisco).

Al analizar la estructura de este dominio de MBD4L se detectó el motivo HhH entre la sexta y la séptima α hélice y el motivo GPD entre la octava y novena α hélice. El ácido aspártico, descrito como esencial en la catálisis de la escisión de bases (Choi y col., 2004; Fromme y col., 2004; Jacob y Schär, 2012) se posicionó en el inicio de la novena α hélice (Fig. 8). Estos resultados indican que la estructura de MBD4L es altamente compatible con la de DNA glicosilasas pertenecientes a la superfamilia HhH-GPD.

Varias HhH-GPD DNA glicosilasas han sido purificadas y cristalizadas, incluyendo a MBD4 de ratón y humanos (Manvilla y col., 2012; Zhang y col., 2011; Morera y col., 2012). Las estructuras cristalográficas del dominio HhH-GPD de estas proteínas muestran α hélices que conforman un dominio simple con un bolsillo catalítico hidrofóbico, a través del cual la

proteína se une a la base dañada para generar el corte. Para predecir la estructura terciaria del dominio DNA glicosilasa de MBD4L se utilizaron herramientas del programa Phyre2. Este programa permite modelar la estructura terciaria de la proteína en cuestión, a partir de proteínas homólogas cuya estructura fue determinada de manera experimental.

Se observó que el dominio de MBD4L presenta una estructura globular de α hélices que forman un bolsillo hidrofóbico, donde estaría ubicado el motivo HhH y el aspártico indispensable para la actividad catalítica de la enzima (Fig. 9A, B). Nótese que en la Figura 9 el color de las α hélices se mantiene para A y B, permitiendo la ubicación del motivo HhH en la estructura globular predicha para MBD4L. Estos resultados sugieren que el dominio DNA glicosilasa de MBD4L presentaría una estructura terciaria que se ajusta muy bien a la que ha sido descrita para las DNA glicosilasas de la superfamilia HhH-GPD, tales como hMBD4 (Fig. 9C) (Zhang y col., 2011; Manvilla y col., 2012), reforzando la idea que MBD4L pertenece a la superfamilia de las HhH-GPD DNA glicosilasas.

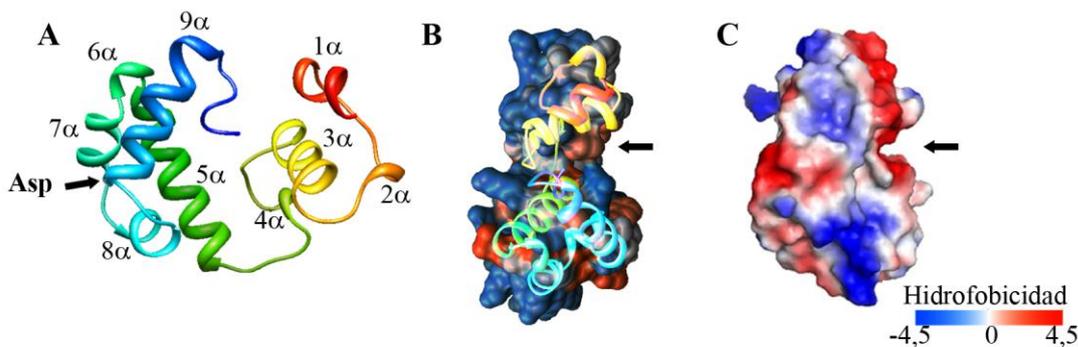


Figura 9. Estructura terciaria del dominio DNA glicosilasa de MBD4L. A) Estructura tridimensional modelada bioinformáticamente (Phyre2) para el dominio DNA glicosilasa de MBD4L. Cada α hélice es representada con un color diferente. La flecha indica el aspártico (Asp) del sitio catalítico. B-C) Comparación de estructuras predichas por Phyre2, según perfil de hidrofobicidad (Kyle y Doolittle, 1982) predicha para el dominio DNA glicosilasa de MBD4L (B) y determinada experimentalmente para hMBD4 (C, Zhang y col., 2011). Para MBD4L se muestran superpuestas las estructuras de α hélices e hidrofobicidad. Los colores de α hélices se mantienen igual que en A. Las flechas indican el bolsillo hidrofóbico catalítico predicho para MBD4L (B) y descrito para hMBD4 (C).

Por otro lado, para estudiar a MBD4L en el contexto de la superfamilia de las HhH-GPD DNA glicosilasas, se compararon todas las proteínas de Arabidopsis que pertenecen a dicho grupo. En Arabidopsis existen 13 genes que codifican para HhH-GPD DNA glicosilasas (Fig. 10A), todas ellas agrupadas por la presencia del dominio Pfam PF00730, que se representa en la figura 10A con cajas rojas (dominio DNA glicosilasa continuo) y azules (dominio DNA glicosilasa discontinuo). Sólo las proteínas de la familia DME poseen el dominio DNA glicosilasa discontinuo, interrumpido por una secuencia variable de aa que no afecta el sitio catalítico de estas enzimas (Ponferrada-Marín y col., 2011). Además del dominio DNA glicosilasa, algunas enzimas de esta superfamilia presentan dominios adicionales (Fig. 10A). Por su parte MBD4L demostró contener un dominio DNA glicosilasa continuo, que constituye el único dominio conservado, de manera similar a OGG1 y otros cinco miembros de la superfamilia HhH-GPD de Arabidopsis.

Debido a que la superfamilia HhH-GPD DNA glicosilasa cuenta con seis genes que no fueron caracterizados hasta el momento, incluyendo el gen *At3g07930* (*AtMBD4L*), se realizó una comparación y apilamiento de secuencias entre los dominios Pfam (PF00730) de todos los miembros de esta superfamilia (Fig. 10B). Las HhH-GPD DNA glicosilasas analizadas conservan el residuo Asp que resulta indispensable para la actividad DNA glicosilasa (Fig. 10B), lo que sugiere que todas ellas serían funcionales. Como se detalló en la Figura S1, el motivo HhH de las DNA glicosilasas monofuncionales presentan un residuo neutro y el de las bifuncionales un residuo Lys, responsable de la actividad liasa (Krwawicz y col., 2007; Jacob y Schär, 2012). De acuerdo a su secuencia primaria, la mayoría de las HhH-GPD DNA glicosilasas de Arabidopsis, tales como NTH1, NTH2, ROS1, DML2, DME, DML3, OGG1 y *At3g47830* serían bifuncionales. En cambio MBD4L y las proteínas codificadas por los genes *At4g12740*, *At1g19480*, *At1g75230* y *At3g50880* serían monofuncionales (Fig. 10B).

Con la finalidad de conocer la relación filogenética entre las proteínas de la superfamilia HhH-GPD de Arabidopsis, se utilizaron las secuencias del dominio DNA glicosilasa predichas por Pfam (PF00730) para diagramar un árbol filogenético (Fig. 10C). En este árbol también se incluyeron secuencias de dominios de enzimas HhH-GPD de bacterias (EndoIII y MutY de *E. coli*) y de mamíferos (MBD4 de *Mus musculus* y humanos y MutY de humanos) cuyos sustratos están bien caracterizados. En la figura 10C se muestran en letras azules las proteínas correspondientes a Arabidopsis y en negro las de otras especies.

colores indican los dominios presentes o predichos según PFam tales como DNA glicosilasa (rojo), DNA glicosilasa discontinuo (azul), unión hierro-azufre (celeste), unión al DNA (amarillo) y región rica en cisteínas (verde). B) Alineamiento de secuencias de aa de dominios DNA glicosilasas de proteínas de Arabidopsis. En negro se indican los aminoácidos conservados entre todas las proteínas; en gris, los que presentan menor nivel de conservación. El asterisco indica el residuo Lys (K) que determina la actividad liasa (bifuncional) de la enzima. El (+) indica el Asp (D) catalítico. Los motivos HhH y GPD están señalados con líneas. C) Árbol filogenético derivado del alineamiento de los dominios HhH-GPD de las proteínas descritas o predichas como HhH-GPD DNA glicosilasas en Arabidopsis (azul) y algunas enzimas representativas de dicha superfamilia en bacterias y animales (negro). El programa T-Coffee fue utilizado para realizar el árbol filogenético. Las cajas de diferentes colores demarcan los grupos de proteínas altamente relacionados. Con negrita se destaca MBD4L. Los genes que codifican para cada enzima en Arabidopsis se muestran entre paréntesis

Tal como puede observarse en la Fig. 10C, las HhH-GPD DNA glicosilasas de Arabidopsis se distribuyeron en siete grupos bien diferenciados:

- 1) OGG1;
- 2) NTH1/2 (homólogos a EndoIII de *E. coli*);
- 3) MBD4L (homóloga a hMBD4;
- 4) *At4g12740* (homóloga a MutY de *E. coli* y humanos);
- 5) *At1g19480*, *At1g75230* y *At3g50880* (sin homólogos conocidos);
- 6) ROS1, DME, DML2 y DML3, (familia DME);
- 7) *At3g47830*, con función desconocida.

La estructura de los siete grupos que se muestra en la Figura 10C, se mantuvo en un árbol filogenético derivado del alineamiento de los dominios de todas las HhH-GPD DNA glicosilasas del reino Viridiplantae (269 secuencias), incluyendo 32 especies vegetales (no mostrado).

Hasta el momento, no se reportó la existencia de secuencias de aa que determinen la especificidad de sustrato en las DNA glicosidasas. Sin embargo, las enzimas que comparten sustrato se dispusieron en un mismo grupo, apoyando la idea que las secuencias primarias podrían determinar aspectos funcionales. MBD4L resultó única en su grupo presentando mayor homología con enzimas de bacterias y animales que con las HhH-GPD de Arabidopsis, por lo que es posible que ninguna de las enzimas de esta superfamilia presente función redundante con MBD4L en esta planta.

Para evaluar la relación filogenética de MBD4L con proteínas de otras especies de plantas se realizaron análisis comparativos de secuencias (HHpred) y se obtuvo un árbol de homología de secuencia con el programa Pyre2, incluyendo las proteínas homólogas al dominio de MBD4L de diferentes especies vegetales (Fig. 11C). Dieciseis especies mostraron 35 proteínas con un alto porcentaje de identidad (mayor al 50%) con el dominio DNA glicosilasa de MBD4L. La mayoría de estas especies tienen importancia económica tales como soja, ricino (*Ricinus communis*), tomate (*Solanum lycopersicum*), vid (*Vitis vinífera*), álamo (*Populus trichocarpa*), banana (*Musa acuminata*), arroz, maíz, moha (*Setaria italica*) y sorgo (*Sorgum bicolor*). Además, se detectó homología entre el dominio DNA glicosilasa de MBD4L y proteínas de plantas primitivas como el musgo *Physcomitrella patens patens* y el pteridófito *Selaginella moellendorffii*. Una proteína homóloga a MBD4L fue hallada en *Chlorella variabilis*, un alga verde unicelular.

En conjunto estos resultados indican que MBD4L presenta un dominio DNA glicosilasa muy conservado evolutivamente en algas, helechos y plantas (mono y dicotiledóneas) y que presenta mayor homología con proteínas de otras especies vegetales que con proteínas propias de *Arabidopsis*.

Resumiendo, MBD4L carece de un dominio MBD y presenta un dominio DNA glicosilasa altamente homólogo a hMBD4 (63% de identidad), que formaría nueve α hélices, con motivos HhH y GPD y un bolsillo catalítico hidrofóbico característicos de la superfamilia HhH-GPD DNA glicosilasa. Esta superfamilia incluye siete grupos de enzimas que aparentemente comparten el sustrato que reconocen. MBD4L es única en su grupo, lo que sugiere que la superfamilia carece de proteínas con función similar a ella. El dominio DNA glicosilasa de MBD4L que no presenta alta homología con los miembros de la superfamilia HhH-GPD de *Arabidopsis*, está filogenéticamente conservado en otras especies de plantas, en bacterias y animales y presente en un alga unicelular.

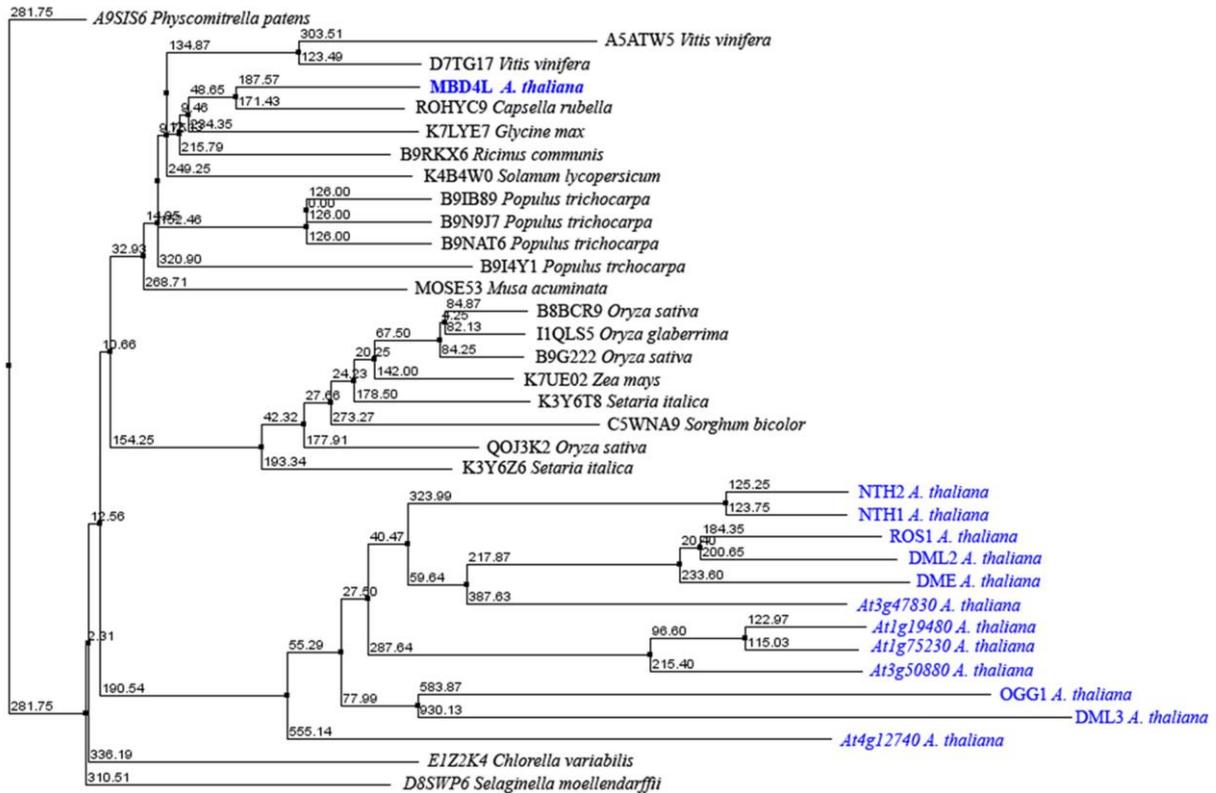


Figura 11. Conservación del dominio DNA glicosilasa de MBD4L en diversas especies de plantas. Árbol filogenético derivado de alineamientos T-Coffee de los dominios HhH-GPD de 35 secuencias de proteínas vegetales de 16 especies. Se destaca la especie y el número de acceso para cada proteína. En azul, las HhH-GPD DNA glicosilasas de Arabidopsis.

I.1.1 Efecto de MBD4L en la decondensación de cromatina

En animales TDG y MBD4 constituyen los únicos candidatos para catalizar la demetilación activa del DNA. La ausencia de proteínas homólogas a TDG en Arabidopsis y la identificación de un homólogo a hMBD4, sugerían a MBD4L como un buen candidato para intervenir en el fenómeno de la decondensación aparentemente derivado de la demetilación activa que sufre el genoma de Arabidopsis durante infección bacteriana. Además, la carencia de proteínas con alta homología a MBD4L en Arabidopsis facilitó el estudio funcional del gen utilizando plantas mutantes. Analizamos si *AtMBD4L* está involucrado en el fenómeno de decondensación de la heterocromatina centromérica desencadenada por el ataque del

patógeno, estudiando esta respuesta en mutantes homocigotas para el gen *At3g07930* (*AtMBD4L*).

I.1.1.1 Selección de plantas mutantes con inserción de T-DNA en *AtMBD4L*

Arabidopsis cuenta con numerosos bancos de recursos genéticos y colecciones de plantas mutantes que presentan inserciones T-DNA ubicadas al azar. En búsqueda de mutantes insercionales de *AtMBD4L* se analizó la base de datos del Centro de Recursos Biológicos de *Arabidopsis* (ABRC) y del Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA). Curiosamente, estos bancos no disponen de mutantes con inserciones de T-DNA dentro de la secuencia codificante del gen *AtMBD4L*. Esto sugirió inicialmente que la región del genoma donde se encuentra dicho gen podría ser refractaria a las inserciones de T-DNA. Sin embargo, existen inserciones de T-DNA distribuidas al azar en los genes colindantes a *AtMBD4L* (Fig. 12A). Por ende, la región del genoma donde se ubica *AtMBD4L* no presentaría problemas de accesibilidad para los insertos de T-DNA. Alternativamente, la ausencia de inserciones en el cuerpo de *AtMBD4L* podría sugerir que la interrupción de este gen resulta letal.

Debido a la ausencia de mutaciones insercionales en la secuencia codificante del gen, se seleccionó del banco de semillas INRA la línea FLAG_238F06, que presenta una inserción de T-DNA en la región 3'UTR de *AtMBD4L* (Fig. 12B). Dichas plantas mutantes fueron generadas en el ecotipo Wassilewskija (Ws).

Dichas plantas mutantes fueron generadas en el ecotipo Wassilewskija (Ws). Estas semillas Ws (T1) fueron crecidas y seleccionadas en medio suplementado con antibiótico y autofecundadas para recolectar sus semillas. Una segunda generación de semillas (T2) fue crecida y seleccionada del mismo modo hasta obtener plantas homocigotas con una única inserción de T-DNA en *AtMBD4L*. Estas plantas mutantes fueron denominadas *mbd4l*.

Para verificar que plantas *mbd4l* eran homocigotas, las mismas se genotificaron mediante PCR con los cebadores A, B y C (Fig. 12B), cuya secuencia, así como también la de todos los cebadores utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla SII (pág. 138). En el ensayo se incluyeron plantas salvajes (*MBD4L/MBD4L*), líneas T3 hemicigotas (*MBD4L/mbd4l*) y plantas T3 homocigotas (*mbd4l/mbd4l*) para la inserción de T-DNA. Varias líneas de plantas *mbd4l* con el inserto de T-DNA en homocigocis (genéticamente idénticas) fueron seleccionadas (Fig. 12C). Una sola de estas líneas, denominada *mbd4l-1*, fue utilizada en estudios posteriores.

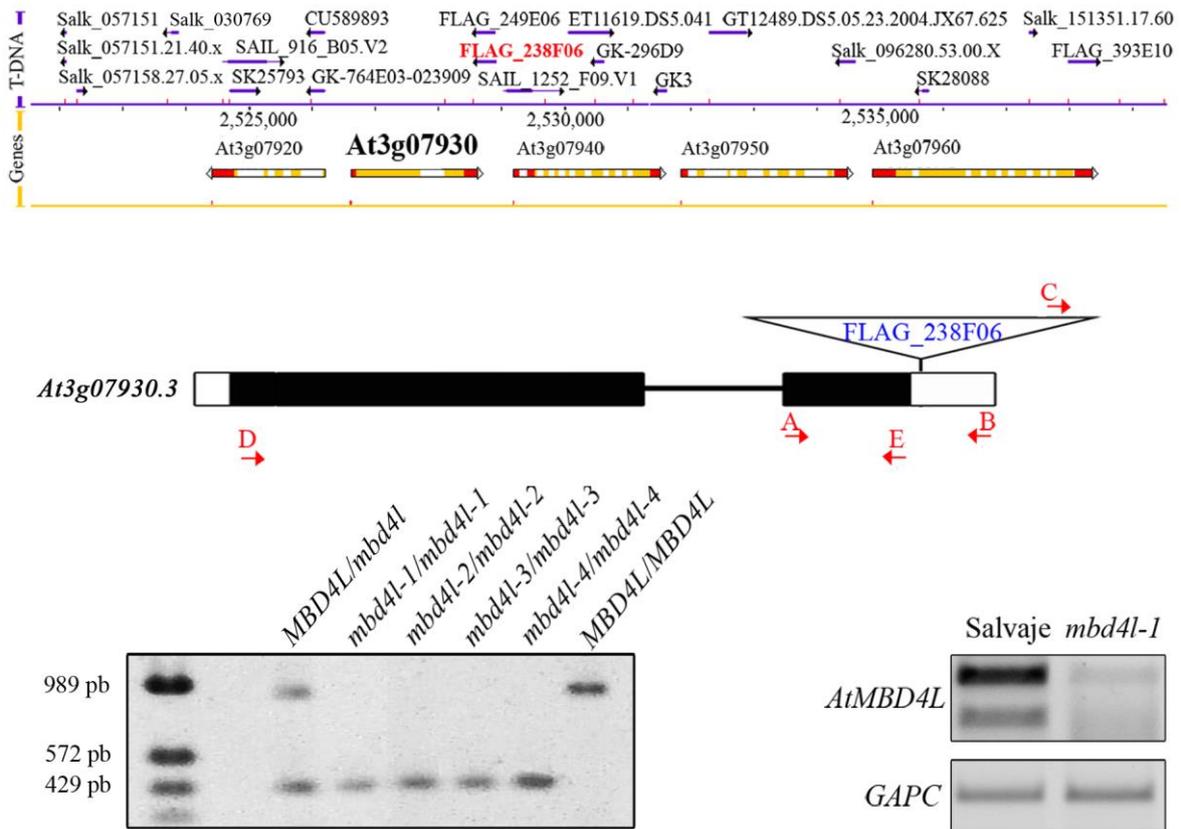


Figura 12. Inserciones de T-DNA en región que contiene al gen *At3g07930*. A) Región genómica donde se ubica el gen *At3g07930* (negrita) modificado del TAIR. Arriba, colección de mutantes insercionales (T-DNA). La flecha marca la dirección de inserción del T-DNA. La inserción elegida (FLAG_238F06) se resalta en rojo. Abajo, esquema de los genes: UTRs (rojo), exones (amarillo), intrones (blanco). B) Esquema del gen *At3g07930*. Los exones se indican con cajas: UTRs (blanco), codificantes (negro). El intrón se muestra con una línea. El triángulo sobre el gen representa la inserción de T-DNA (FLAG_238F06). Las flechas rojas indican los cebadores utilizados en C y D (Tabla SII, pág. 141). C) Genotipificación de la línea FLAG_238F06 mediante reacciones de PCR a partir de DNA genómico y cebadores específicos de la región genómica próxima a la inserción (Fig. 12B; Tabla SII) y cebador específico del T-DNA (Fig. 12C, Tabla SII). Plantas salvajes (*MBD4L/MBD4L*) y líneas hemicigotas (*MBD4L/mbd4l*) fueron usadas como control. C) Nivel transcripcional de *AtMBD4L* en hojas de plantas salvajes y mutantes *mbd4l-1* de 3-4 semanas obtenido mediante ensayo de RT-PCR semicuantitativa con cebadores D y E (Tabla SII) indicados en (B). El gen constitutivo *Gliceraldehído- 3-fosfato Deshidrogenasa subunidad C* (*GAPC*) se utilizó como control de carga.

A continuación se evaluó el nivel de transcripto de *AtMBD4L* en plantas mutantes homocigotas mediante ensayos de RT-PCR utilizando los cebadores D y E (Fig. 12B; Tabla

SII, pág. 141) que amplifican la región codificante completa de *AtMBD4L*. Niveles muy bajos de transcripto de *AtMBD4L* fueron detectados en tejido de hojas de *mbd4l-1* (Fig. 12C), indicando que dichas plantas no son mutantes nulas. La posición de la inserción de T-DNA en la región 3'UTR del gen *AtMBD4L* podría explicar el remanente de transcripto en plantas *mbd4l-1*. Por otra parte, se encontraron dos transcriptos alternativos para *AtMBD4L*, lo cual será discutido y ampliado más adelante.

En conjunto, la ausencia de mutantes nulas para el gen en estudio que carece de genes homólogos en *Arabidopsis*, sugieren que *AtMBD4L* podría tener un rol importante en el desarrollo, siendo posiblemente un gen esencial.

I.1.1.2 Decondensación de cromocentros (CCs) en plantas *mbd4l-1* durante infección con *P. syringae* pv. *tomato*

Analizamos si *AtMBD4L* participa en la decondensación de la heterocromatina centromérica de *Arabidopsis* en condiciones de infección con el patógeno, evaluando este rasgo en plantas salvajes (Ws) y mutantes *mbd4l-1*.

En núcleos interfásicos de *Arabidopsis* la heterocromatina se organiza como regiones altamente condensadas, que contienen secuencias repetitivas y transposones preferentemente centroméricos y con DNA altamente metilado. Luego de tinciones con 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), la heterocromatina puede ser observada por microscopía de fluorescencia como puntos brillantes llamados cromocentros (CCs). En condiciones basales, la mayoría de los núcleos interfásicos de *Arabidopsis* (5 cromosomas, 2n=10), presentan a nivel citológico entre 7 y 9 CCs por núcleo (Fransz y col., 2002) (Fig. 13A). La decondensación de la heterocromatina centromérica se analizó en condiciones de infección y análisis similares a las descritas por Pavet y col (2006). Las principales diferencias introducidas a este ensayo fueron el uso de tejido de hoja sin disgregar y el uso de yoduro de propidio, en lugar de DAPI para las tinciones de CCs. Las hojas de plantas mutantes *mbd4l-1* y salvajes fueron infiltradas en la parte central del envés de la hoja (Fig. 13A) con suspensiones de bacterias. Estas hojas fueron recolectadas 24 horas post infección (hpi), fijadas y teñidas con yoduro de propidio para luego ser montadas y analizadas por microscopía confocal. Para un mismo campo se adquirieron imágenes en varios planos del mesófilo para luego apilar todas las imágenes en una sola imagen. La utilización de la hoja completa permitió observar el fenómeno *in situ* y corroborar que el mismo ocurre sólo en la región que

está en contacto directo con el patógeno (Fig. 13A), ya que en regiones distantes al sitio de detección de colonias bacterianas no se presentó esta respuesta.

En primer lugar, se analizó el número y tamaño de CCs en condición basal (sin infección con patógeno) (Fig 13A). Los CCs de *mbd4l-1* presentaron un tamaño y número similar al de plantas salvajes. En plantas *Ws* y *mbd4l-1*, el 37,2 % y el 42,85 % de los núcleos mostraron entre 4 y 6 CCs, respectivamente, mientras que la mayoría de los núcleos de ambas plantas (53,48 % y 53,74 %, respectivamente) presentaron entre 7 y 9 CCs (Fig 13B). Esto sugiere que la disminución del nivel transcripcional de *AtMBD4L* no genera alteraciones citológicas en la condensación de la heterocromatina centromérica en condiciones basales.

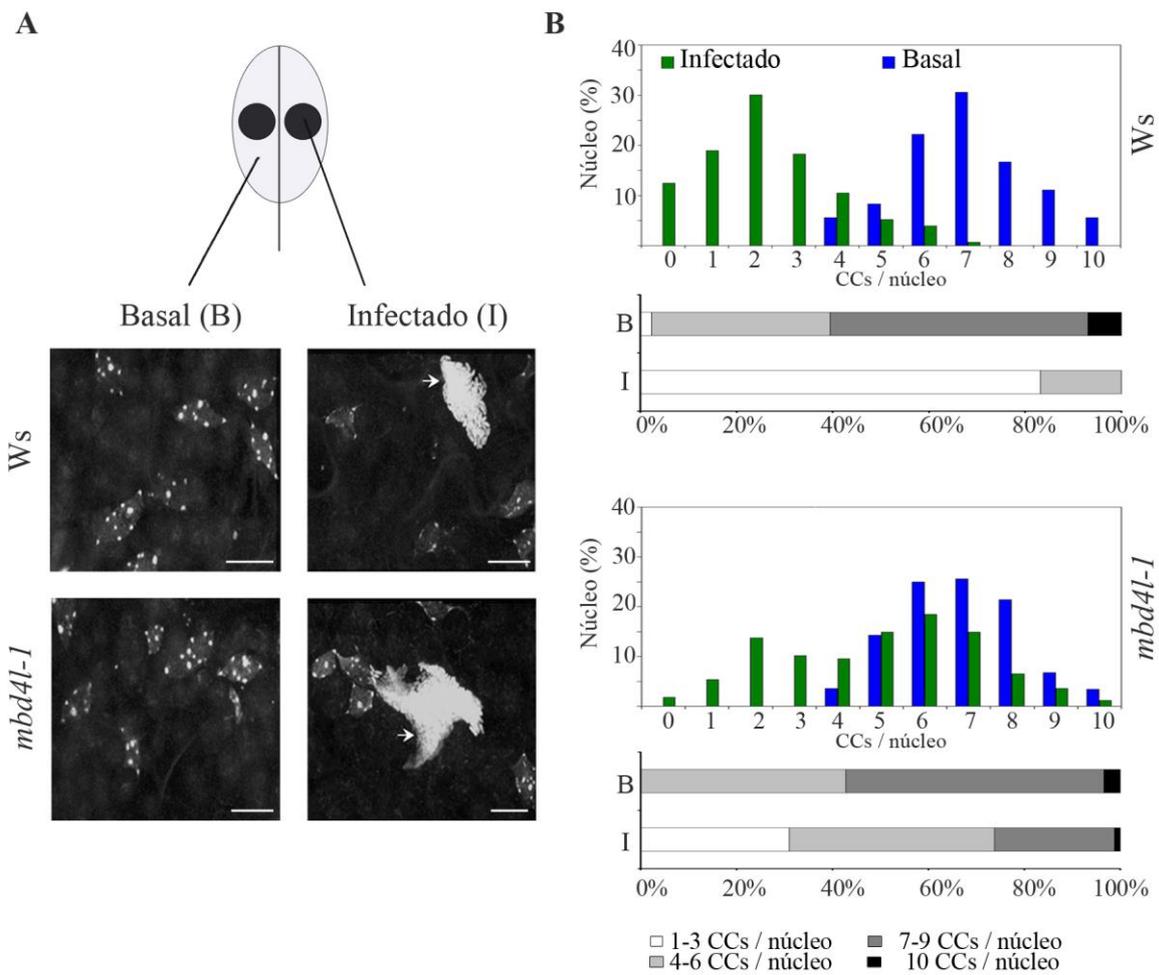


Figura 13. Decondensación de heterocromatina centromérica en hojas de plantas salvajes y mutantes *mbd4l-1* infectadas con *Pst*. A) Arriba, esquema de infección en hoja de *Arabidopsis*. Negro: tejido infiltrado con suspensiones de 5.10^6 unidades formadoras de colonia/ml (ufc/ml). Gris: zona no infiltrada (condición basal). Abajo, fotografías de microscopía confocal de tejido en condición basal o de infección en

plantas Ws y mutantes *mbd4l-1*. Las hojas se escindieron 24 horas post infiltración (hpi) y se tiñeron con yoduro de propidio. Los puntos brillantes dentro de los núcleos corresponden a CCs. Las flechas indican acúmulos de bacterias. Barra: 10 μ m. B) Histograma de frecuencia CCs por núcleo de células del mesófilo de plantas salvajes y mutantes. Abajo, se muestran gráfico de intervalos obtenido con los mismos valores. Se presenta un experimento representativo de al menos 3 réplicas realizadas mediante doble ciego

En condiciones de infección las mutantes *mbd4l-1* mostraron una respuesta diferente a las plantas salvajes. Las células de plantas salvajes (Ws) infectadas decondensaron la cromatina centromérica reduciendo el número y tamaño de CCs, tal como había sido descrito anteriormente por Pavet y col. (2006) para plantas salvajes de ecotipo Columbia (Col-0). Más del 70% de los núcleos analizados presentaron entre 1 y 3 CCs y sólo el 14,6% de los núcleos mostraron entre 4 y 6 CCs en plantas Ws infectadas (Fig. 13B). Por su parte, sólo el 30,75% de las células de plantas mutantes infectadas presentaron entre 1 y 3 CCs por núcleo, mientras que el 42,8% de los núcleos mostraron entre 4-6 CCs (Fig. 13B).

Estos resultados indican que *AtMBD4L* participa de la decondensación de heterocromatina centromérica que se induce por la infección bacteriana. La decondensación de CCs reducida, pero no nula, en plantas mutantes infectadas podría ser explicada por el remanente de transcripto de *AtMBD4L* presente en plantas *mbd4l-1* o bien por la presencia de alguna otra proteína que también participe en dicho proceso.

La reducción transcripcional de *AtMBD4L* no afecta el estado de condensación basal de la heterocromatina centromérica, sugiriendo que la acción de MBD4L se manifiesta sólo bajo condiciones de infección con *P. syringae* pv. *tomato*.

I.1.1.3 Decondensación de cromatina en plantas silenciadas para *AtMBD4L* (*siAtMBD4L*) durante la infección bacteriana

Para corroborar que el fenómeno se debe a la disminución del transcripto de *AtMBD4L* y no a otros efectos asociados a la inserción del T-DNA sobre el genoma de la línea FLAG_238F06, se estudió la decondensación de CCs en plantas *siAtMBD4L* con diferentes niveles transcripcionales de *AtMBD4L*. Las plantas silenciadas *siAtMBD4L* fueron generadas en el laboratorio por el Biól. Damián Cambiagno (Facultad de Ciencias Químicas, UNC). La descripción de la construcción y selección de dichas plantas transgénicas se describe detalladamente en el capítulo II.

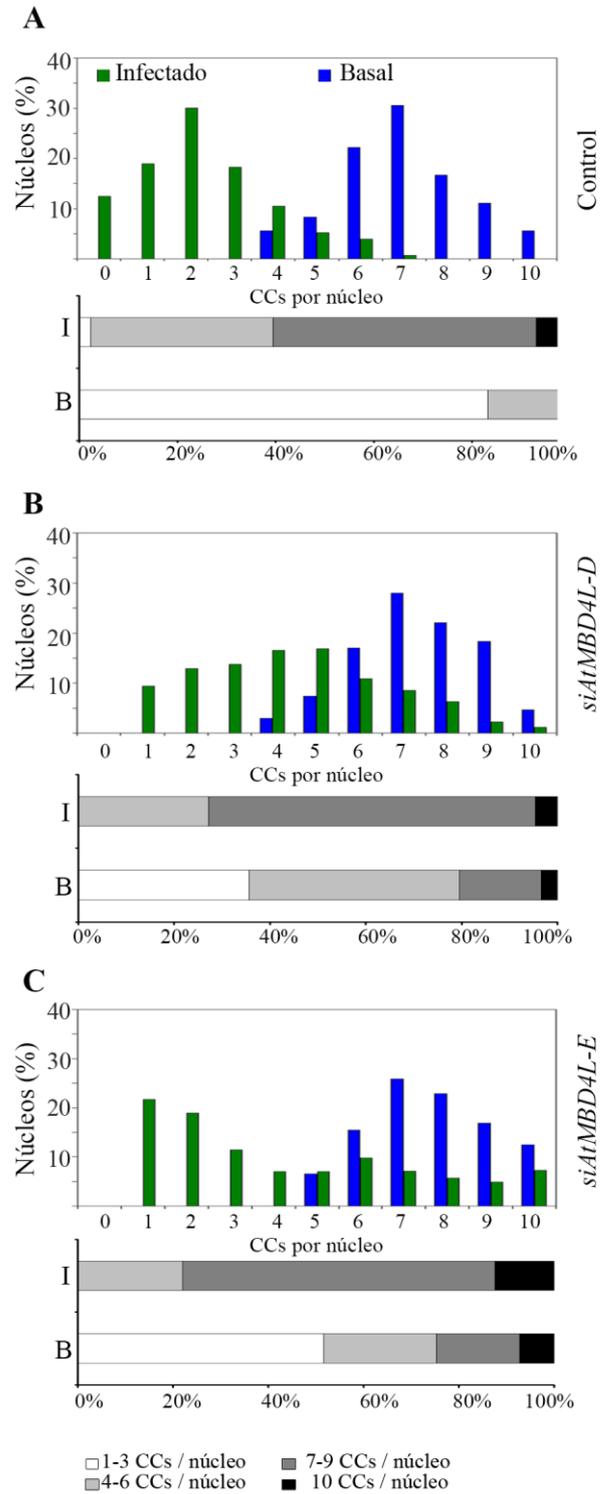


Figura 14. Decondensación CCs en plantas *siAtMBD4L* infectadas con *P. syringae* pv. *tomato*. Histogramas de frecuencia del número de CCs por núcleo de células del mesófilo de plantas control (Col-0, A), *siAtMBD4L-D* (B) y *siAtMBD4L-E* (C) en tejidos no infectados (basal, azul) e infiltrado con bacteria (verde) 24 hpi. Debajo de cada histograma se grafican los mismos resultados como intervalos de frecuencia del número de CCs por núcleo. Se muestra un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes realizados con doble ciego.

Dos líneas de plantas *siAtMBD4L* (*siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E*) fueron utilizadas para evaluar la decondensación de CCs durante la infección bacteriana. Las plantas *siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E* no presentaron diferencias en el número y tamaño de CCs en zonas no infiltradas respecto a plantas control (Col-0) (Fig. 14). En condiciones de infección estas plantas mostraron alteraciones en la decondensación de CCs respecto a plantas salvajes. Sólo el 14,6% de los núcleos de plantas salvajes presentaron entre 4 y 6 CCs (Fig. 14A), mientras que el 41,2 % y el 23 % de las células de plantas *siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E*, respectivamente presentaron 4-6 CCs por núcleo (Fig. 14B-C). Tal como se observa el porcentaje de núcleos con 4-6 CCs de las plantas *siAtMBD4L-D* es similar al obtenido en plantas *mbd4l-1* (42,8 %), mientras que el observado en plantas *siAtMBD4L-E* es considerablemente menor, aunque no alcanza los niveles de la plantas Col-0. Por esto se concluye que las plantas mutantes *mbd4l-1* y las plantas *siAtMBD4L* se comportaron de manera similar corroborando que *AtMBD4L* participa en la decondensación de la heterocromatina centromérica que ocurre en condiciones de infección.

I.1.1.4 Decondensación en plantas mutantes de DNA glicosilasas de la familia Demeter durante infección con *P. syringae* pv. *tomato*

Tal como se mostró anteriormente, la decondensación de CCs en plantas *mbd4l-1* infectadas no está completamente inhibida. Esto podría deberse por un lado, al remanente de transcripto *AtMBD4L* presente en plantas mutantes, o bien a la participación de otras enzimas en dicho proceso. Como se mencionó anteriormente, ROS1 participa en la demetilación y decondensación de la cromatina centromérica en los primeros días del desarrollo de plántulas de *Arabidopsis* (Douet y col., 2008). Dicha enzima conjuntamente con los demás miembros de la familia DME son las únicas enzimas capaces de escindir 5-mC, por lo cual podrían participar del fenómeno de demetilación activa que fue reportado en el genoma de *Arabidopsis* durante el ataque bacteriano (Pavet y col., 2006). Por esta razón, ROS1 y sus homólogos, DML2 y DML3, podrían actuar conjuntamente con MBD4L en respuestas de defensa.

Para estudiar si las 5-mC DNA glicosilasas participan en el fenómeno de la decondensación de la heterocromatina centromérica que ocurre en infección con el patógeno, se analizó el número y tamaño de CCs en plantas simples mutantes *ros1.3*, *dml2.1*, *dml3.1* y en la triple mutante *ro1.3; dml2.1; dml3.1 (rdd)* en regiones sanas e infectadas.

En primer lugar se analizaron los CCs de tejidos no infectados para cada planta mutante. No se encontraron diferencias en el número y tamaño de CCs en regiones sin infectar de plantas mutantes de la familia DME respecto a plantas control sin infectar. Asimismo, las células de plantas mutantes *ros1-3*, *dml2-1*, *dml3-1* cercanas a los acúmulos bacterianos presentaron núcleos con un nivel de decondensación similar al observado en plantas control (Fig. 15), sugiriendo que ni ROS1, ni DML2 ni DML3 participan en la decondensación de CCs.

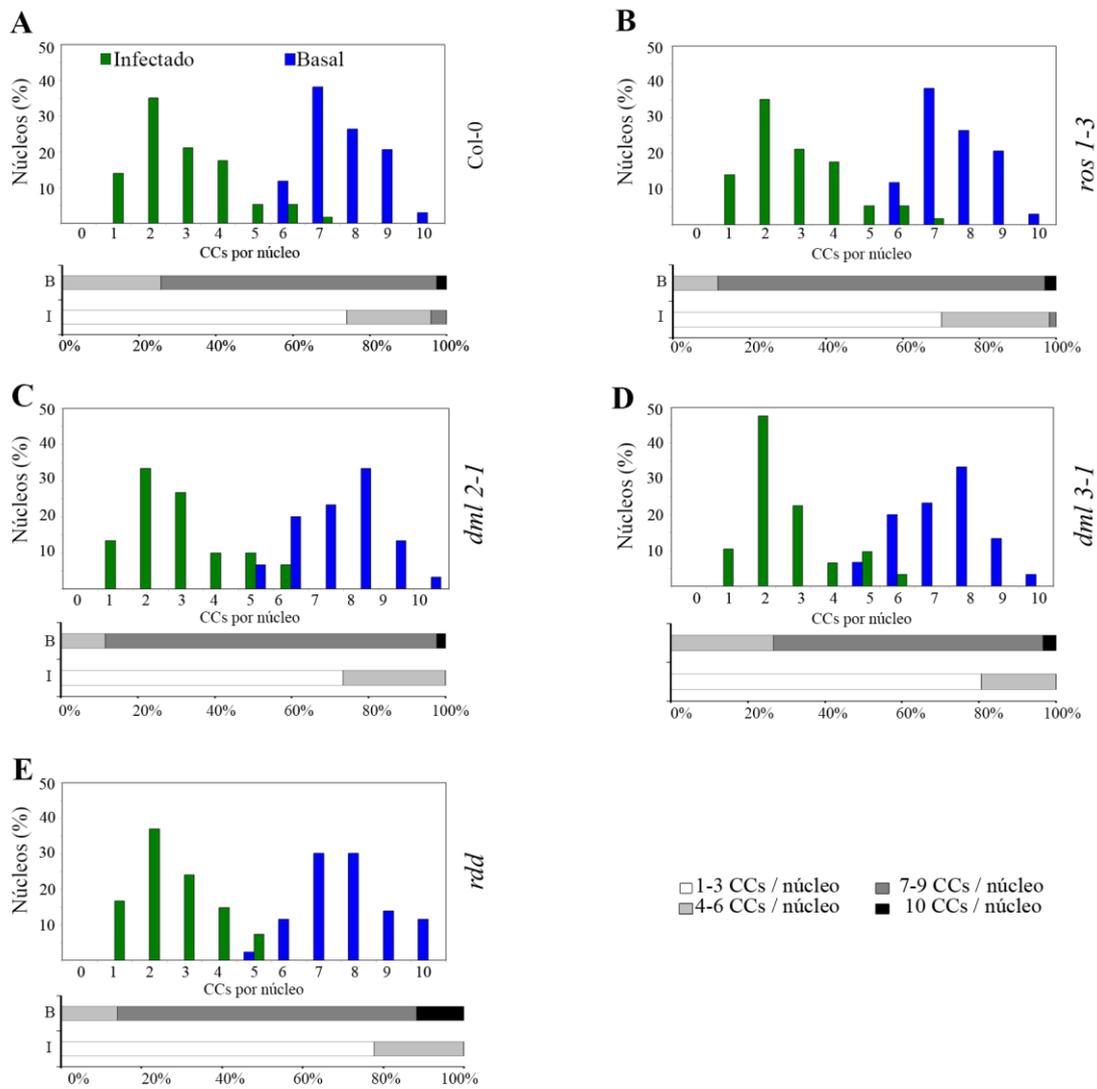


Figura 15. Decondensación CCs en plantas mutantes de DNA glicosilasas de la familia DME infectadas con *P. syringae* pv. *tomato*. Histograma de frecuencia del número de CCs por núcleo de células del mesófilo de plantas control (Col-0, A), simples mutantes *ros1-3* (B), *dml2-1* (C), *dml3-1* (D) y triple mutante *ros1-3*, *dml2-1*, *dml3-1* (*rdd*, E) en tejidos no infectados (basal, azul) e infiltrado con el patógeno (verde). Debajo

de cada histograma, los mismos resultados mostrados como intervalos de frecuencia del número de CCs por núcleo en tejidos infiltrados y basales. Se muestra un experimento representativo. Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes realizados con doble ciego.

Debido a la redundancia de función descripta para estas enzimas (Penterman y col., 2007), analizamos la decondensación de CCs en la triple mutante *rdd*. Del mismo modo que en simples mutantes, no se observaron diferencias en el número de CCs en condiciones de infección respecto a plantas control (Fig. 15).

Estos resultados indican que los miembros de la familia DME no participan en el fenómeno de decondensación de la heterocromatina centromérica de *Arabidopsis* en condiciones de infección bacteriana. Es decir, que si existiera alguna enzima que participe del fenómeno de decondensación junto a MBD4L dichas enzimas no serían responsables.

En síntesis, MBD4L, una DNA glicosilasa homóloga a hMBD4, presenta un dominio con estructura de α hélices y un bolsillo catalítico que contiene un Asp esencial para la actividad de dicha enzima. Este dominio está conservado desde bacterias hasta humanos, aunque no presenta homólogos cercanos en *Arabidopsis*. Además, MBD4L, pero no las DNA glicosilasas de la familia DME, participa en la decondensación centromérica inducida por el patógeno bacteriano.

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE *AtMBD4L* Y SU PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE ARABIDOPSIS

II.1 Caracterización del gen *AtMBD4L*

A continuación se describe estructural y funcionalmente el gen *AtMBD4L*, considerando que no había información acerca del mismo. En primer lugar se describe la estructura y el patrón de expresión de *AtMBD4L*. Posteriormente se analiza la participación de MBD4L en el desarrollo vegetativo y reproductivo mediante el análisis fenotípico de plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*.

II.1.1 Estructura y transcritos del gen *AtMBD4L*

El gen *AtMBD4L* (*At3g07930*) se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 3, entre las bases 2.526.630 y 2.528.633. La base de datos de TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>), predice dos exones y tres transcritos alternativos para este gen (*At3g07930.1*, *At3g07930.2*, *At3g07930.3*; Fig. 16A). Para conocer la presencia de dichos transcritos en tejido de hoja, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa.

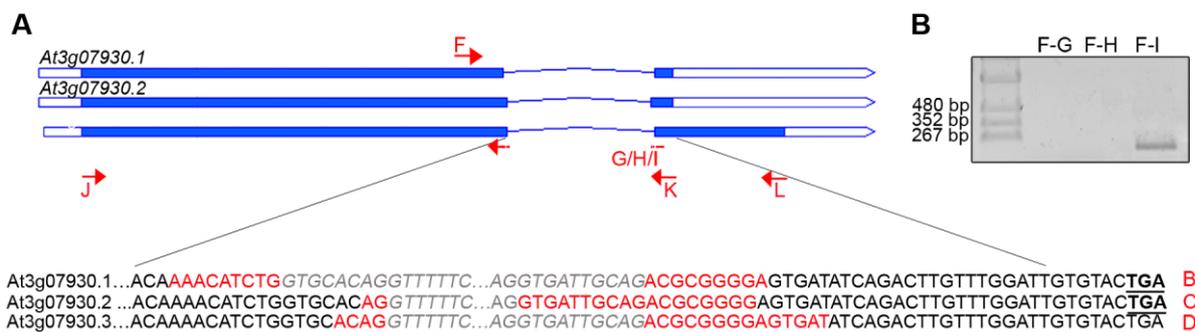


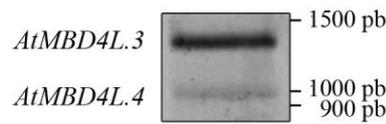
Figura 16. Transcritos alternativos de *At3g07930* A) Esquema de transcritos predichos por TAIR para *AtMBD4L*. Los exones se muestran con rectángulos: UTR (blanco), codificantes (azul) e intrones con líneas. Las flechas rojas indican la posición y dirección de los cebadores utilizados en reacciones de RT-PCR. Abajo, secuencia de zona de *splicing* alternativo de todas las variantes predichas. En gris y cursiva se muestran las secuencias correspondientes al intrón. Los cebadores G, H e I se muestran en rojo. El codón de stop para *At3g07930.1* y *At3g07930.2* es indicado en negrita y subrayado. B) Transcritos detectados por RT-PCR

semicuantitativa usando cebadores indicados en (A) y RNA de tejido de hojas de roseta de plantas salvajes. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla SII.

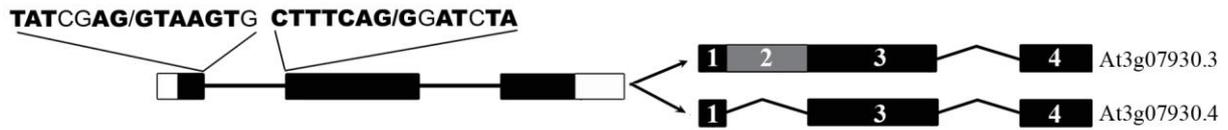
Inicialmente se combinó un cebador *forward* (F) con cada uno de los tres cebadores *reverse* específicos (G, H e I) (Fig. 16A; Tabla SII). Solamente se observó producto de reacción con la combinación F-I, el cual tenía un tamaño consistente con el esperado para *At3g07930.3* (Fig. 14B). Luego se utilizaron los cebadores J (*forward*), K y L (*reverse*) que son complementarios a todos los cDNAs predichos (Fig. 16A; Tabla SII) en nuevas reacciones de PCR. Los fragmentos amplificados con la combinación J-K y J-L (Fig. 16A) se clonaron, y un total de 18 clones derivados de reacciones de RT-PCR independientes se secuenciaron. Nuevamente se detectó el transcripto *At3g07930.3*, pero no los transcriptos *At3g07930.1* o *At3g07930.2*.

Sorpresivamente, los pares de cebadores J-K y J-L amplificaron un segundo producto además del correspondiente a *At3g07930.3* (Fig. 17A). El transcripto que genera este producto fue denominado *At3g07930.4*. El análisis de secuencias indicó que *At3g07930.4* difiere de *At3g07930.3* en un fragmento interno (nt 115-462 desde el ATG) que está limitado por un sitio donador y uno aceptor de *splicing* (Fig. 17B-C). El sitio donador se ubica entre los nt 107-121 de *At3g07930.3* y coincide en gran parte con la secuencia consenso RRRRNAG/GTAAGTT (exón/intrón; R: purina, N: cualquier base) descrita para dichos sitios en *Arabidopsis* (Reddy, 2007). En la Fig 17C en azul y subrayado se muestran los nt de los transcriptos de *AtMBD4L* que son idénticos a la secuencia consenso descrita por Reddy (2007). El sitio aceptor de *splicing* está ubicado entre los nt 454 y 468 de *At3g07930.3*. Los nt idénticos entre ésta y la secuencia descrita por Reddy (2007) como consenso para el sitio aceptor de *splicing* NTTNCAG/NRRRRRA (exón/intrón) se muestran en azul y subrayado en Fig. 17C. Además, se detectó a 74 nucleótidos del sitio 3' de *splicing* en *At3g07930.3* una secuencia que coincide con la secuencia CURAY (donde C: citosina; U: uracilo; R: purina; A: adenina; Y: pirimidina), que sería reconocida por el complejo proteico que genera el *splicing* alternativo (Reddy, 2007). Esta secuencia se muestra en rojo y subrayada en Fig. 17C. Estos módulos refuerzan la ocurrencia de un *splicing* alternativo que da lugar al transcripto *At3g07930.4*. Este evento de *splicing* no había sido predicho para este gen. Más aún, la existencia de *At3g07930.4* indica que *At3g07930.3* resulta de la retención de un intrón (Fig. 17B -C).

A



B



C

```

At3g07930.3 ATGGTTCCTCCATAATTTATAAGTATAAGCGAAGGAAAGATCGGCAGCTTGGTAGGGACGATGATAGTTCACTGATGATGACTCGTCGGAGACCCGACTCCGATTTATCGAGGTAAGT 120
At3g07930.4 ATGGTTCCTCCATAATTTATAAGTATAAGCGAAGGAAAGATCGGCAGCTTGGTAGGGACGATGATAGTTCACTGATGATGACTCGTCGGAGACCCGACTCCGATTTATCGAG----- 114
*****

At3g07930.3 GATGAGAATCGCTCGTTTTCCTTTAATTAAGGAGGATGATGAAAAAATCGTGATTTGGGTTTATTGTTGATGATGTTCCACAAATTTGGTTCCTCAATGTCATGATGATGGTTGTTCCTCA 240
At3g07930.4 -----

At3g07930.3 GAGAAGGATAATAACAATAGCTTGGATGATTTGTTCTCTGGGTTTGTATAAAGGTGTGAGGAGGAGGAAAGGGATGACTTTGGAAGTATAACAACAGTAATCTTGTTCCTCTCAA 360
At3g07930.4 -----

At3g07930.3 AITGCTGATGATGATGATGATGATGATGTTCTGATTCACATATTGAAAGGCAAGATGCAAGTAAATTCATGTTGAAGTAAAGAGAGTTTCCCATACCTTCAGGGATCTACTGTTTCACAA 480
At3g07930.4 -----GGATCTACTGTTTCACAA 132
*****

At3g07930.3 CAGTCCAAAGAAGGGTGTGATTCGTAGTGTGTTGTTCCAAAGAAGGATGCAAGAAAGTTCAAGTAAAGTCCACAGATTTTCCCATACTCCAGGCATCAACTATTTACAGTGTGAT 600
At3g07930.4 CAGTCCAAAGAAGGGTGTGATTCGTAGTGTGTTGTTCCAAAGAAGGATGCAAGAAAGTTCAAGTAAAGTCCACAGATTTTCCCATACTCCAGGCATCAACTATTTACAGTGTGAT 252
*****

At3g07930.3 TCTGACATTTGTTCTTCTCTCAAAGTGGAAAGAAATATCGAAAGGAAAGCAGCAAAAGTCAAGTTAAAGTCAAGAGATTTCCGCATATTTCCAGGAATCAACTGTTTCAGAACACGCA 720
At3g07930.4 TCTGACATTTGTTCTTCTCTCAAAGTGGAAAGAAATATCGAAAGGAAAGCAGCAAAAGTCAAGTTAAAGTCAAGAGATTTCCGCATATTTCCAGGAATCAACTGTTTCAGAACACGCA 372
*****

At3g07930.3 AACCAAGCTCCTAAAGGTTTGCCTAACTATTTTAAAGTTGTGAAAGTTTCAAGATATTTCCATGCTGATGGAATCCAAAGTCAATGAATCACAAGGAGAGAAATCAAGAAATGTGAGGAAA 840
At3g07930.4 AACCAAGCTCCTAAAGGTTTGCCTAACTATTTTAAAGTTGTGAAAGTTTCAAGATATTTCCATGCTGATGGAATCCAAAGTCAATGAATCACAAGGAGAGAAATCAAGAAATGTGAGGAAA 492
*****

At3g07930.3 ACTCCTATTGTGAGCCCTGTACTCTCGCTTTCTCAAAAGACCAGATGATGTATACCTGCGAAAAACGCCGGATAACACATGGGTGCCTCCACGATCTCCATGTAATCTGCTTCAAGAAAGAT 960
At3g07930.4 ACTCCTATTGTGAGCCCTGTACTCTCGCTTTCTCAAAAGACCAGATGATGTATACCTGCGAAAAACGCCGGATAACACATGGGTGCCTCCACGATCTCCATGTAATCTGCTTCAAGAAAGAT 612
*****

At3g07930.3 CATTGGCATGATCCATGCGGGGTGCTGGTCATATGATGCTTCTCAACAAAACATCTGGTGCACAGACGCGGGGAGTGATATCAGACTTGTGTTGGATTGTGACTGATGCAAAAGACTGCA 1080
At3g07930.4 CATTGGCATGATCCATGCGGGGTGCTGGTCATATGATGCTTCTCAACAAAACATCTGGTGCACAGACGCGGGGAGTGATATCAGACTTGTGTTGGATTGTGACTGATGCAAAAGACTGCA 732
*****

At3g07930.3 ACAGAAGTTAAAGAAAGAGGAGATAGAGAATCTAATAAAACCTCTTGGATTACAAAAGAAAGAGAACCAAAATGATTCACCGTTGTCTCTAGAGTATCTTCAAGAGAGCTGGACTCATGTC 1200
At3g07930.4 ACAGAAGTTAAAGAAAGAGGAGATAGAGAATCTAATAAAACCTCTTGGATTACAAAAGAAAGAGAACCAAAATGATTCACCGTTGTCTCTAGAGTATCTTCAAGAGAGCTGGACTCATGTC 852
*****

At3g07930.3 ACTCAACTGCATGGCGTTGGAAAGTATGCAGCGGATGCGTATGCGATATTCTGTACCGGAAATGGGATCGCGTGAAGCCTAATGATCATATGCTAACTATTACTGGGACTACCTCAGG 1320
At3g07930.4 ACTCAACTGCATGGCGTTGGAAAGTATGCAGCGGATGCGTATGCGATATTCTGTACCGGAAATGGGATCGCGTGAAGCCTAATGATCATATGCTAACTATTACTGGGACTACCTCAGG 972
*****

At3g07930.3 AITCGGTATAAAATTATGA 1338
At3g07930.4 AITCGGTATAAAATTATGA 990
*****
    
```

Figura 17. Variantes de *splicing* de *At3g07930* detectados en tejido de hoja. A) Transcritos detectados mediante RT-PCR semicuantitativa con cebadores J-L (Fig. 16A, Tabla SII). B) Esquema del gen y transcritos alternativos. Las cajas muestran exones: UTRs en blanco; exones codificantes en negro (1, 3 y 4) y gris (2). Las líneas muestran intrones. En negrita las secuencias que coinciden con el consenso descrito para el sitio donador y aceptor de *splicing* alternativo (Reddy, 2007). C) Alineamiento de secuencias de nucleótidos de los transcritos *At3g07930.3* y *At3g07930.4* obtenidas a partir de reacciones de clonado y secuenciación. Los nucleótidos idénticos al consenso de sitios de *splicing* alternativo se indican con color azul y subrayado. La putativa secuencia CURAY se muestra en rojo y subrayado.

II.1.2 Expresión y regulación transcripcional

La base de datos pública Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>; Laule y col., 2006) recopila información de experimentos realizados con micromatrices de Affymetrix y muestras de Arabidopsis. Esta base de datos informa patrones de expresión de genes individuales en diferentes órganos, estadíos de desarrollo y condiciones.

Según los datos publicados en Genevestigator, *AtMBD4L* presenta una expresión reducida en pólen, ovario, estigma, embrión, endosperma y algunos tejidos de la raíz (ápice, yemas laterales, endodremis, epidermis, estela). Su mayor expresión correspondería a las hojas senescentes, hipocotilo, xilema y floema (Fig. 18A).

Por otro lado, Genevestigator permitió comparar los patrones de expresión de distintos genes. Con esta herramienta cotejamos la expresión de *AtMBD4L* con la de otros genes que codifican para HhH-GPD DNA glicosilasas de Arabidopsis durante el desarrollo de la planta (Fig. 18B). Como referencia, se seleccionó a un único representante de cada grupo funcional derivado del árbol filogenético de las HhH-GPD DNA glicosilasas de Arabidopsis desarrollado en la Fig. 10C. La expresión de *Actina2* se utilizó como control por tratarse de un gen constitutivo de alta expresión. *AtMBD4L*, tal como *OGG1*, *NTH1*, *ROS1* y *At1g75230* mostraron un nivel de expresión intermedia, mientras que *DME* y *At4g12740* presentaron una expresión baja. La expresión reducida de *DME* es consistente con su especificidad en el gametofito femenino y masculino descrita para dicho gen (Choi y col., 2002; Schofft y col., 2011). Según estos datos, la expresión de *AtMBD4L* (rojo) *a priori* no se modificaría sustancialmente durante el desarrollo y, al igual que *At1g75230* (amarillo) y *NTH1* (violeta), mostraría un importante aumento durante la senescencia. Sin embargo, el análisis de expresión individual para *AtMBD4L* informa una inducción a partir de la floración que se incrementa durante el desarrollo de frutos para alcanzar el máximo nivel durante la senescencia (Fig. SII, pág 138).

En conjunto estos resultados sugieren que en la mayoría de los tejidos *AtMBD4L* presenta un nivel de expresión entre intermedio y bajo y no se modifica en mayor medida durante las primeras etapas del desarrollo, aunque sí a partir de la floración.

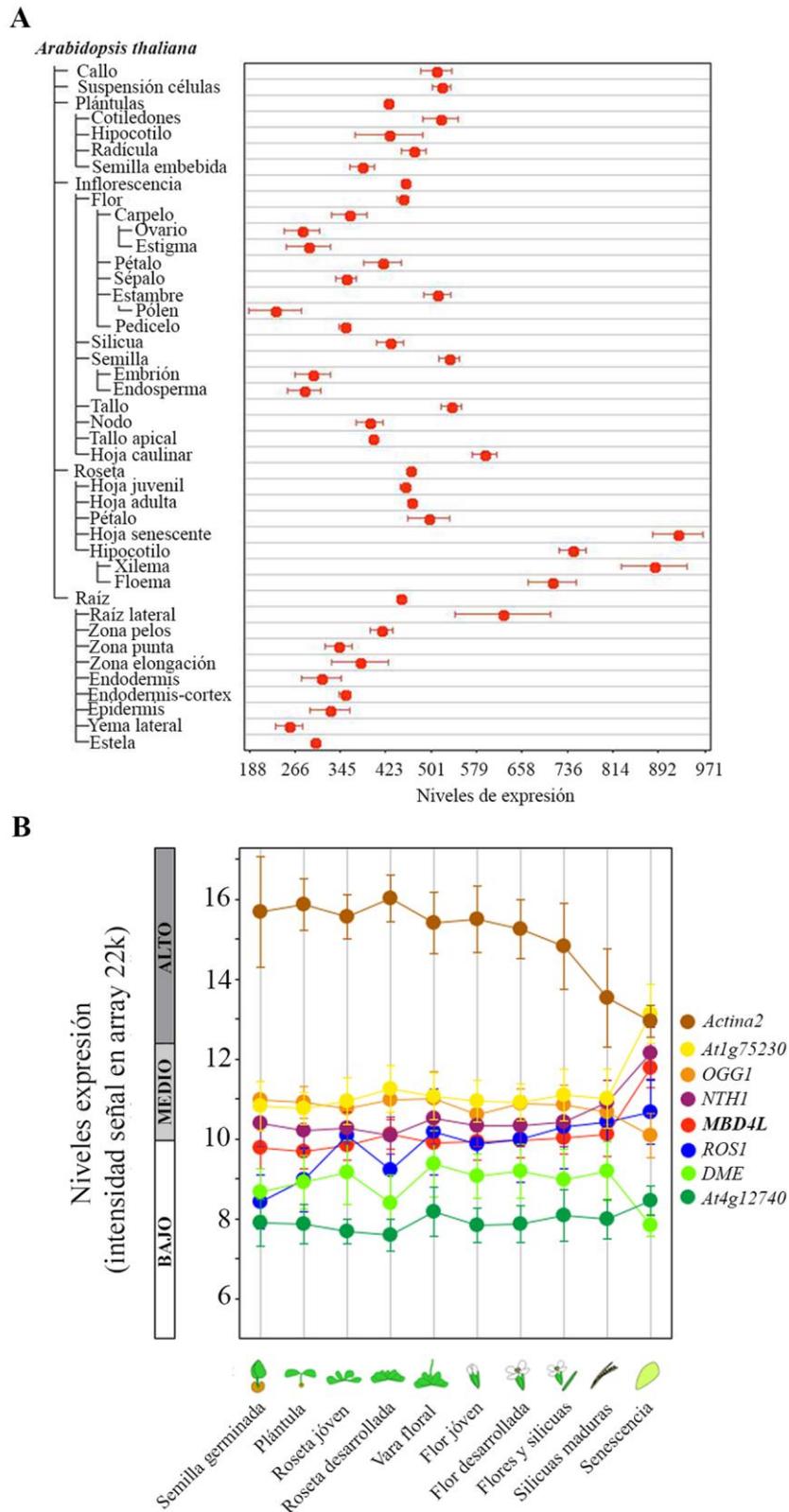


Figura 18. Expresión de *AtMBD4L* en *Arabidopsis* según experimentos de transcriptoma depositados en la base de datos Genevestigator. A) Nivel de expresión de *AtMBD4L* en diversos tejidos. B) Expresión absoluta de genes que codifican para algunas HhH-GPD DNA glicosilasas en diferentes estadios de desarrollo. El gen *Actina2* se usa como gen constitutivo de alta expresión.

II.1.2.1 Elementos regulatorios del promotor de *MBD4L*

Realizamos estudios *in silico* del promotor del *AtMBD4L* para identificar elementos reguladores ubicados en *cis*. Dichos elementos son secuencias reconocidas por factores de transcripción que regulan la transcripción del gen (Priest y col., 2009).

Dado que en *Arabidopsis* los promotores contienen de 500 a 2000 nt (Riechmann, 2002; Molina y Grotewold, 2005), se caracterizaron las secuencias regulatorias presentes en un fragmento de 1560 pares de bases (pb) localizado aguas arriba del sitio de inicio de traducción de *AtMBD4L*. A este fin, se utilizaron tres programas bioinformáticos de acceso libre que predicen la existencia de elementos regulatorios que fueron descriptos previamente y analizados de manera experimental en promotores de diversos genes. Los programas PlantCARE (Lescot y col., 2002), PLACE (Higo y col., 1999) y Agris (Davulury y col., 2003) detectaron una caja TATA, ubicada 35 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Tabla IV), lo cual es característico de este consenso en promotores de *Arabidopsis*. Además, se observó la presencia de elementos regulatorios conservados y previamente descriptos en promotores de genes que son regulados por deshidratación (MYB1AT, MYB2CONSENSUSAT, MYBCORE y MYCATRS22), luz (CCA1ATLHCB1, SORLIAT y TBOXATGAPB) y moléculas inductoras de defensas contra patógenos denominados elicitores (ELRECOREPCR1) (Tabla IV). Las secuencias asociadas a genes regulados por deshidratación fueron las más abundantes en el promotor de *AtMBD4L*, seguidas por las asociadas a regulación por luz.

II.1.2.2 Expresión del gen reportero *GUS* regulado por el promotor de *AtMBD4L*

En base a los estudios previos, se construyó un gen reportero que codifica para β -glucoronidasa (*GUS*) de *E. coli* dirigido por el promotor del gen *At3g07930* (-1560 pb desde el ATG). El transgen *AtMBD4L:GUS* fue utilizado para generar plantas transgénicas por transformación de primordios florales de plantas de *Arabidopsis* con *Agrobacterium tumefaciens* portadoras del constructo. Los experimentos de análisis *in silico* y caracterización de plantas *AtMBD4L:GUS* se realizaron de manera conjunta con la Lic. Pamela Ribone y parte de estos resultados fueron informados en su tesina de licenciatura (2012, Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

Tabla IV. Elementos regulatorios en *cis* del promotor de *AtMBD4L*.

Elementos regulatorios ^(*)	Secuencia ^(**)	Ubicación (pb desde ATG)	Función	Referencias
TATA BOX	ATATAAT	-35	Unión de la maquinaria de transcripción	Grace <i>et al.</i> , 2004
ELRECOREPCRPI	TTTGACC	-557	Expresión en respuesta a elicitores	Laloi <i>et al.</i> , 2004
MYB1AT	CTAACCAA	-363; -547; -674; -607	Expresión en respuesta a deshidratación	Abe <i>et al.</i> 2003
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	-619	Expresión en respuesta a deshidratación	Abe <i>et al.</i> 2003
MYBCORE	AAACNGTTA	-303	Expresión en respuesta a deshidratación	Urao <i>et al.</i> , 1993
MYCATRD22	CACATG	-1311	Expresión en respuesta a deshidratación	Abe <i>et al.</i> , 1997
CCA1ATLHCB1	AA(A/C)AATCT	-96	Expresión en respuesta a luz	Wang <i>et al.</i> , 1997
SORLIP1AT	GCCAC	-86; -768	Expresión en respuesta a luz	Hudson & Quail, 2003
TBOXATGAPB	ACTTTG	-1180	Expresión en respuesta a luz	Chan <i>et al.</i> , 2001

* Sólo se muestran los elementos regulatorios predichos en común por PlantCARE, PLACE y Agris.

** Y: pirimidina (T ó C); K: purina (A ó G); N: cualquier base (T, C, A ó T).

A partir del evento de transformación, se seleccionaron 5 líneas independientes de plantas *AtMBD4L:GUS* con una única inserción en el genoma. Para observar la expresión de *GUS* se realizaron ensayos de tinciones en plantas *AtMBD4L:GUS* de diferentes estadios de desarrollo y condiciones de crecimiento. El análisis histoquímico de esta actividad reveló que la expresión de *AtMBD4L* es baja, ya que fue requerido un largo tiempo de incubación para observar la actividad de *GUS*. Además, dicha expresión no es constitutiva, ya que se observó limitada a algunos tejidos, incluyendo órganos vegetativos y reproductivos.

Si bien no se detectó tinción positiva para *GUS* en láminas de hojas jóvenes, se halló expresión en hojas con signos de senescencia (Fig. 19A), en concordancia con la elevada expresión en hojas senescentes reflejada en experimentos publicados en Genevestigator. Además, *GUS* se expresó en hidatodos (Fig. 19B) y sistema vascular (Fig. 19C-E) de esta hojas senescentes. Este último patrón coincide con el nivel de expresión elevado en xilema y floema observado en Genevestigator. Además, estos patrones son consistentes con la regulación de la expresión de *AtMBD4L* por elementos en *cis* del promotor relacionados con deshidratación.

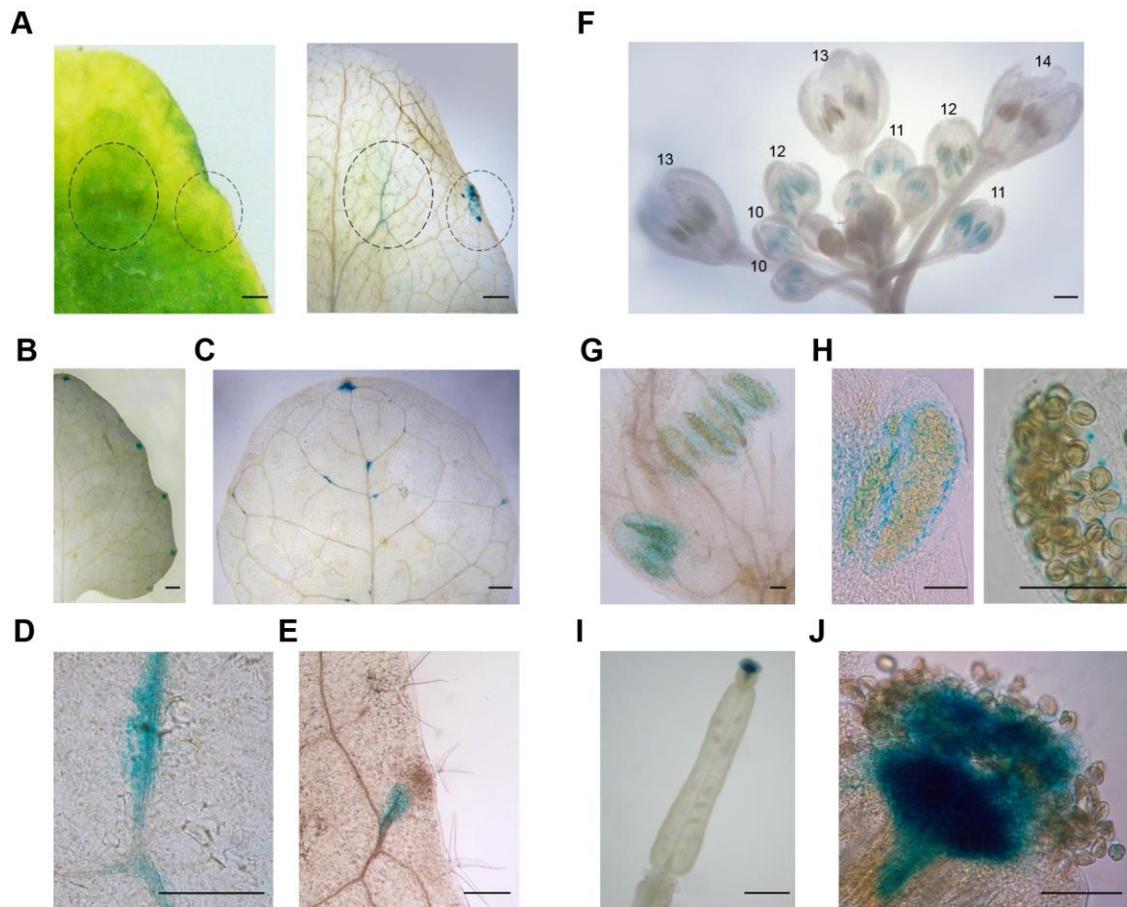


Figura 19. Expresión de *GUS* en plantas transgénicas *AtMBD4L:GUS*. Hojas de roseta (A,C) y caulinares (B) con signos de senescencia. Detalle de regiones central (D) y periféricas (E) de hojas senescentes. F) Inflorescencias conteniendo flores de diferentes estadios, indicadas por número según Smyth y col. (1990). G) Flores en estadio 12 de desarrollo. H) Anteras. I) Silicuas en estadio 17 de desarrollo (Roeder and Yanofsky, 2006). J) Magnificación de estigma. Barras de escala: 1 mm (A, B, C, D, E, F, I); 0,1 mm (G, H, I).

También se observó la expresión de *GUS* en órganos reproductivos, tales como flores. Sin embargo, no todas las flores que forman parte de la inflorescencia mostraron tinción positiva para *GUS*. Flores de entre 10 y 13 días, clasificadas como flores jóvenes según Smyth y col. (1990), mostraron expresión de *GUS* en el tapetum de las anteras (Fig 19F), pero no en granos de pólen, pistilo, pétalos o sépalos (Fig. 19G-H). Por su parte, flores en estadios más avanzados de desarrollo no mostraron expresión del transgen, sugiriendo expresión transiente y específica del estadio de desarrollo.

Por otra parte, se analizó la expresión de *GUS* en silicuas de plantas *AtMBD4L:GUS*. El desarrollo de frutos fue dividido en diferentes estadios (Roeder y Yanofsky, 2006). La expresión de *GUS* no fue detectada en todas estas etapas sino en silicuas correspondientes a la

etapa 17b del desarrollo (Fig. 19I). Además, la expresión del transgén estuvo limitada solo al estigma de la silicua (Fig. 19J).

En su conjunto, estos resultados sugieren que en su versión endógena *AtMBD4L* tiene expresión débil y una marcada regulación temporal y espacial. La mayoría de los tejidos en los cuales se detectó la expresión de *AtMBD4L* son sensibles a deshidratación, tales como hojas senescentes, tejido de anteras y estigma de la silicua.

II.1.2.3 Nivel de transcritos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* en diferentes tejidos

Con la finalidad de evaluar el nivel de los transcritos de *At3g07930.3* (*AtMBD4L.3*) y *At3g07930.4* (*AtMBD4L.4*) y una posible expresión diferencial en diversos tejidos, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa. La expresión de ambos fue observada en hojas de roseta y caulinares y flores, pero no en raíz y tallo (Fig. 20). En todos estos tejidos *AtMBD4L.3* presentó un nivel de transcritos significativamente mayor que *AtMBD4L.4*. Además, tanto *AtMBD4L.3* como *AtMBD4L.4* mostraron mayor nivel de transcritos en hojas caulinares, consistente con los datos publicados en Genevestigator. Esto sugiere una regulación transcripcional específica de tejido y estadio de desarrollo, así como también la coexistencia de ambos transcritos en hojas y flores.

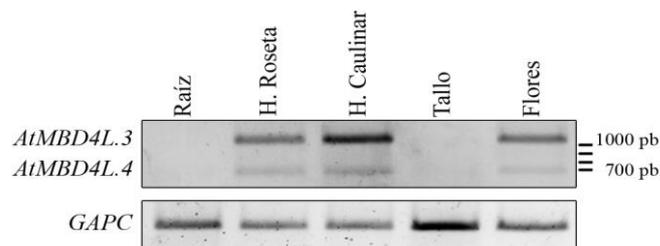


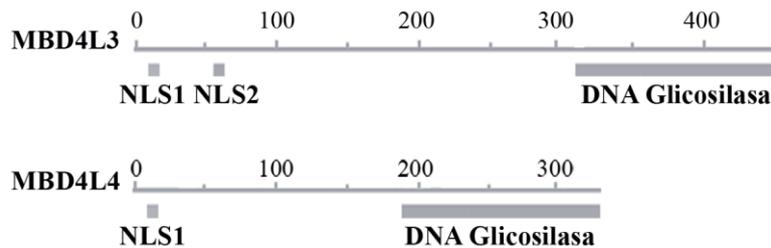
Figura 20. Expresión de *AtMBD4L* en distintos tejidos de *Arabidopsis*. RNA de hojas de roseta, caulinares, raíz, tallo y flores fue utilizado en ensayos de RT-PCR semicuantitativa con cebadores J-K (Tabla SII). El gen *GAPC* fue utilizado como control.

II.2 Proteínas codificadas por los transcritos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*

Los dos transcritos alternativos de *AtMBD4L* detectados en tejidos de *Arabidopsis* sugieren que existen, al menos, dos isoformas de la enzima. En este estudio denominamos

MBD4L3 y MBD4L4 a los productos proteicos codificados por *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*. Estas proteínas, de 446 y 330 aa, respectivamente (Fig. 21A) mantendrían intacto el dominio HhH-GPD DNA glicosilasa (Fig. 21B, letras verde). En este dominio el ácido aspártico indispensable para la actividad DNA glicosilasa correspondería al Asp⁴²⁹ de MBD4L3 y al Asp³¹³ de MBD4L4, respectivamente (Fig. 21B, D gris). Por su parte, el residuo que determina la actividad monofuncional de MBD4L corresponde a las Tyr⁴⁰⁹ y Tyr²⁹³ de MBD4L3 y MBD4L4, respectivamente (Fig. 21B, Y azul).

A



B

```

MBD4L3  M V P P I I Y K Y K R R K D R R L G R D D D S S V M M T R R R P D S D F I E V S D E N R S F A L F K E D D E K N R D L G L V D D G S T N L V L Q C H D D G C S L E K D N S N S L D D L F S G F V Y K G V R R R K R D D F G S I T T S N L V S P Q 120
MBD4L4  M V P P I I Y K Y K R R K D R R L G R D D D S S V M M T R R R P D S D F I E ----- 38
*****

MBD4L3  I A D D D D S V S D S H I E R Q E C E F H V E V R R V S P Y F Q G S T V S Q Q S K E G C D S D S V C S K E G C S K V Q A K V P R V S P Y F Q A S T I S Q C D S D I V S S S Q S G R N Y R K G S S K R Q V K V R R V S P Y F Q E S T V S E Q P 240
MBD4L4  ----- G S T V S Q Q S K E G C D S D S V C S K E G C S K V Q A K V P R V S P Y F Q A S T I S Q C D S D I V S S S Q S G R N Y R K G S S K R Q V K V R R V S P Y F Q E S T V S E Q P 124
*****

MBD4L3  N Q A P K G L R N Y F K V V K V S R Y F H A D G I Q V N E S Q K E K S R N V R K T P I V S P V L S L S Q K T D D V Y L R K T P D N I W P P R S P C N L L Q E D H W H D P W R V L V I C M L N K T S G A Q T R G V I S D L F G L C T D A K T A 360
MBD4L4  N Q A P K G L R N Y F K V V K V S R Y F H A D G I Q V N E S Q K E K S R N V R K T P I V S P V L S L S Q K T D D V Y L R K T P D N I W P P R S P C N L L Q E D H W H D P W R V L V I C M L N K T S G A Q T R G V I S D L F G L C T D A K T A 244
*****

MBD4L3  T E V K E E E I E N L I K P L G L Q K K R T R M I Q R L S L E Y L Q E S W I H V T Q L H G V G K Y A A D A Y A I F C N G N W D R V K P N D H M L N Y Y W D Y L R I R Y K L 445
MBD4L4  T E V K E E E I E N L I K P L G L Q K K R T R M I Q R L S L E Y L Q E S W I H V T Q L H G V G K Y A A D A Y A I F C N G N W D R V K P N D H M L N Y Y W D Y L R I R Y K L 329
*****
    
```

Figura 21. Estructura y secuencia de proteínas codificadas por *AtMBD4L*. A) Esquema de proteínas MBD4L3 y MBD4L4 incluyendo las señales de localización nuclear (NLS) y el dominio DNA glicosilasa (PF00730). B) Alineamiento de secuencias de aa de ambas proteínas realizado con ClustalW2. Se muestran las secuencias de NLS en rojo y la secuencia del dominio DNA glicosilasa en verde. Dentro del dominio DNA glicosilasas se indica el residuo que determina la actividad mono- o bi- funcional de la enzima (azul) y el Asp del sitio activo (gris). Los asteriscos indican coincidencia de aa entre ambas proteínas.

MBD4L3 y MBD4L4 tendrían diferencias en el extremo N-terminal. En la región amino-terminal, los programas NLStradamus and NucPred predicen la presencia de dos señales de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS) para MBD4L3 (residuos 10-17 y 98-104; Fig. 21B, rojo) y solamente una NLS para MBD4L4 (residuos 10-17; Fig. 21B, rojo). Las NLS están conservadas en los eucariotas, incluyendo plantas. Típicamente

contienen una o más argininas (Arg) y lisinas (Lys) y no es clivada después de la importación de la proteína al núcleo (Raikhel y col., 1992). Además, las NLS pueden tener diferentes posiciones dentro de la proteína y en muchos casos, estar representadas varias veces (Owen y col., 2007). Los programas bioinformáticos BacelLo, Plant-mPloc and YLoc también predicen una localización nuclear para MBD4L3 y MBD4L4. Estos resultados sugieren que *a priori* ambas formas de MBD4L serían proteínas nucleares, a menos que la NLS ubicada entre los aminoácidos 98-104 sea indispensable. En este caso, solamente la isoforma MBD4L3 se localizaría en el núcleo.

II.2.1 Localización subcelular de MBD4L3 y MBD4L4

Las DNA glicosilasas participan en la reparación de bases dañadas del DNA, por lo cual es presumible que las mismas se localicen en compartimentos subcelulares que contengan DNA tales como el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto. En animales, numerosas DNA glicosilasas fueron localizadas en el núcleo, aunque también existen algunas que presentan actividad en mitocondrias (Liu y Demple, 2010). En *Arabidopsis* las HhH-GPD DNA glicosidasas DME (Choi y col., 2002), ROS1 (Gong y col., 2002) y OGG1 (Chen y col., 2012) muestran una localización exclusivamente nuclear, mientras que NTH1 y NTH2 son exclusivas de cloroplastos (Gutman y Niyogi, 2009).

Para determinar la localización subcelular de MBD4L, se construyeron plantas transgénicas que sobre-expresan *AtMBD4L* fusionado al gen reportero de la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (*Green Fluorescent Protein*, GFP). En plantas, GFP se localiza en el citosol y en el núcleo, ya que por su tamaño (26,9 kDa) es capaz de difundir a través del poro nuclear. El poro nuclear permite la difusión de proteínas de entre 40 y 60 kDa, mientras que aquellas que excedan dicho tamaño deben ser transportadas activamente al interior del núcleo (Raikhel, 1992).

Para analizar cada una de las isoformas de MBD4L se realizaron dos construcciones diferentes. Por un lado se clonó el cDNA de *AtMBD4L.3* completo en un vector con promotor de expresión fuerte y constitutiva derivado del virus del mosaico de la coliflor (35S) y GFP fusionada a la región C-terminal del gen, generando *35S:AtMBD4L.3-GFP*. Por otro lado, se realizó una construcción similar con el cDNA de *AtMBD4L.4* (Fig. 22A). A las proteínas de fusión se las denominó MBD4L3-GFP y MBD4L4-GFP, respectivamente.

Estas construcciones fueron utilizadas en la transformación de plantas de Arabidopsis, las cuales luego fueron segregadas en medio de crecimiento suplementado con antibióticos hasta conseguir líneas independientes con una única inserción del transgén en el genoma. Se seleccionaron diferentes líneas de plantas (hemicigotas) para ambos transgenes.

Se observó que las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* sobre-expresan ambos transcritos alternativos: *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* (Fig. 22B), mientras que plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* sólo sobre-expresan *AtMBD4L.4*. La ausencia del transcrito *AtMBD4L.3* podría deberse a la titulación de los cebadores J-K por exceso de transcrito *AtMBD4L.4*. Para verificar el nivel de transcrito *AtMBD4L.3* se realizaron reacciones de RT-PCR con cebadores específicos J-N (Fig. 10A, Tabla SII) para *AtMBD4L.3*. Observamos que dicho transcrito mantiene sus niveles endógenos (Fig. 22C).

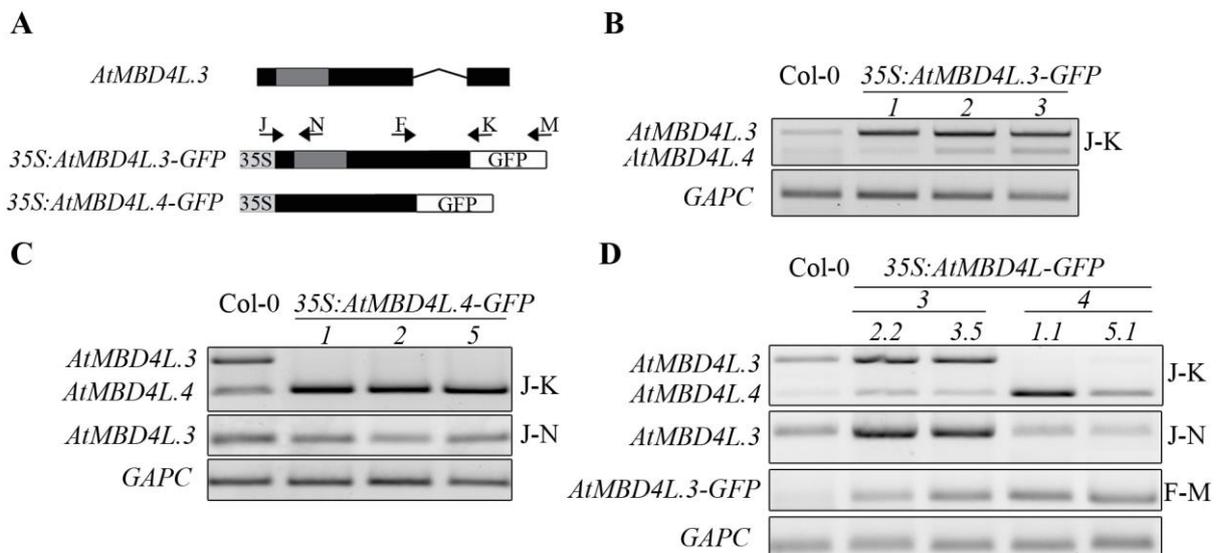


Figura 22. Nivel transcripcional de *AtMBD4L* en plantas transgénicas *35S:AtMBD4L-GFP*. A) Arriba, esquema del gen At3g07930.3. Abajo esquema de las fusiones *AtMBD4L-GFP*. Los exones se muestran con cajas negras y en gris oscuro el exón que sufre *splicing* alternativo en *AtMBD4L.3*. La línea representa el intrón. El promotor 35S se indica en gris claro y en blanco *GFP*. Las flechas y letras indican los cebadores usados en reacciones de RT-PCR (Tabla SII). B-D) El análisis de transcritos en plantas hemicigotas *35S:AtMBD4L.3-GFP* (B), *35S:AtMBD4L.4-GFP* (C) y homocigotas de ambas líneas (D) mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa con cebadores descritos en A y Tabla SII. El gen *GAPC* se utilizó como control de carga.

Para los experimentos subsiguientes se seleccionaron líneas de plantas homocigotas para ambas construcciones (Fig. 22D). Como control se utilizaron plantas de Arabidopsis

transformadas con el transgen *35S:GFP*, que sobre-expresan *GFP* y presentan fluorescencia citoplásmica y nuclear.

El análisis de imágenes obtenidas por microscopía confocal de las raíces de plántulas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* indica que MBD4L3 y MBD4L4 se localizan en el núcleo (Fig. 23). Además, ambas proteínas fueron observadas en núcleos de los extremos de raíces, zonas con alta tasa de división celular (Fig. 23A) y en zonas de elongación, caracterizadas por el crecimiento y expansión celular (Fig. 23B). En esta última región la disposición de GFP mostró diferencias entre ambas plantas.

En plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* la fluorescencia se detectó preferencialmente en núcleos que rodean el sistema vascular, mientras que los correspondientes a plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* se observaron en las células periféricas (Fig. 23B).

A continuación evaluamos la localización subcelular de MBD4L-GFP en hoja donde previamente habíamos estudiado el efecto de MBD4L sobre la decondensación de la heterocromatina centromérica y la expresión génica. En este caso sólo se evaluaron varios tipos celulares, como estomas, células epidermales y del mesófilo, de hojas de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* adultas. En estos tejidos fue necesario separar la fluorescencia correspondiente a la emitida por GFP (500-520 nm) de la autofluorescencia emitida por los cloroplastos (640-660 nm). Para ello se utilizó microscopía confocal y deconvolución espectral (Software Fluoview). En todos los tipos celulares de estas plantas se observó una localización nuclear (Fig. 24B). Dado que las plantas sobre-expresan ambos transcritos alternativos, la ausencia de GFP en otros compartimentos celulares como cloroplastos (Fig. 24B, mesófilo), sugiere que tanto MBD4L3 como MBD4L4 tendrían localización nuclear en dichos tejidos.

Además, se observó un nivel de fluorescencia significativamente menor en plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* respecto a plantas *35S:GFP* (Fig. 24A), sugiriendo que la fusión a MBD4L podría reducir la vida media de GFP. Posteriormente evaluamos si ambas proteínas de fusión presentaban la misma localización subnuclear.

En plantas *35S:GFP* (control) la mayoría de los núcleos mostró una distribución homogénea de GFP (Fig 24A). Por el contrario, los núcleos de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* mostraron la GFP excluida del nucleolo (Fig. 25B).

Por su parte, en los núcleos de plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* la GFP se observó notoriamente acumulada en el nucleolo (Fig. 25).

Curiosamente, las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP*, donde ambos transcritos están sobre-expresados, no muestran acumulación de GFP en el nucleolo, sugiriendo que MBD4L3 podría

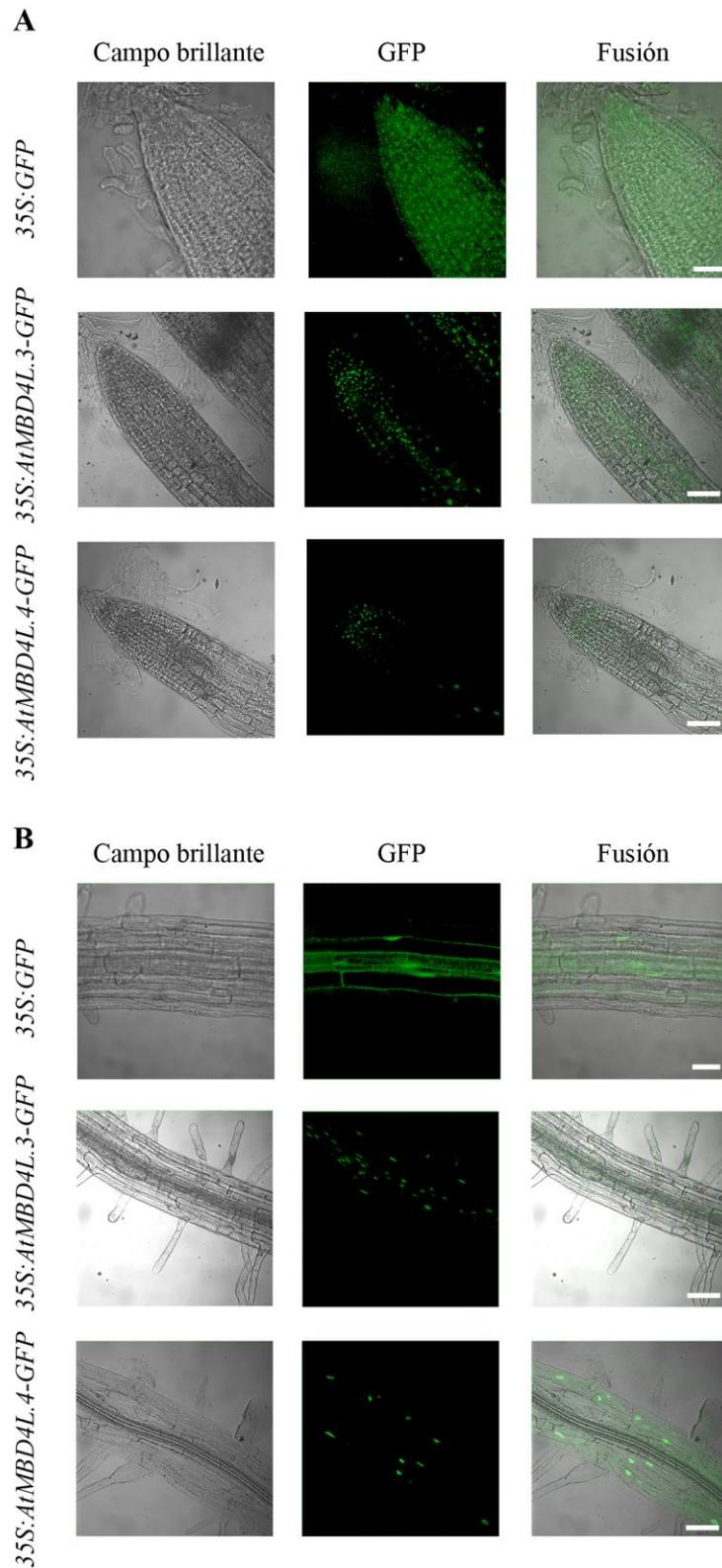


Figura 23. Localización subcelular de MBD4L3-GFP y MBD4L4-GFP en raíces. Fotografías de imágenes obtenidas por microscopía confocal (objetivo 40X aceite) que analizan extremos (A) y zonas de elongación (B) de raíces de plantas *35S::GFP*, *35S::AtMBD4L.3-GFP* y *35S::AtMBD4L.4-GFP*. Se muestran imágenes de campo brillante y fluorescencia de GFP. Escala: 50 μ m.

regular la acumulación o la presencia de MBD4L4 en dicho sitio, o bien que la expresión de MBD4L4-GFP en esta planta es demasiado débil para detectar dicha localización subnuclear. Estos resultados sugieren que aunque ambas isoformas son nucleares y ocupan distintos dominios en el núcleo.

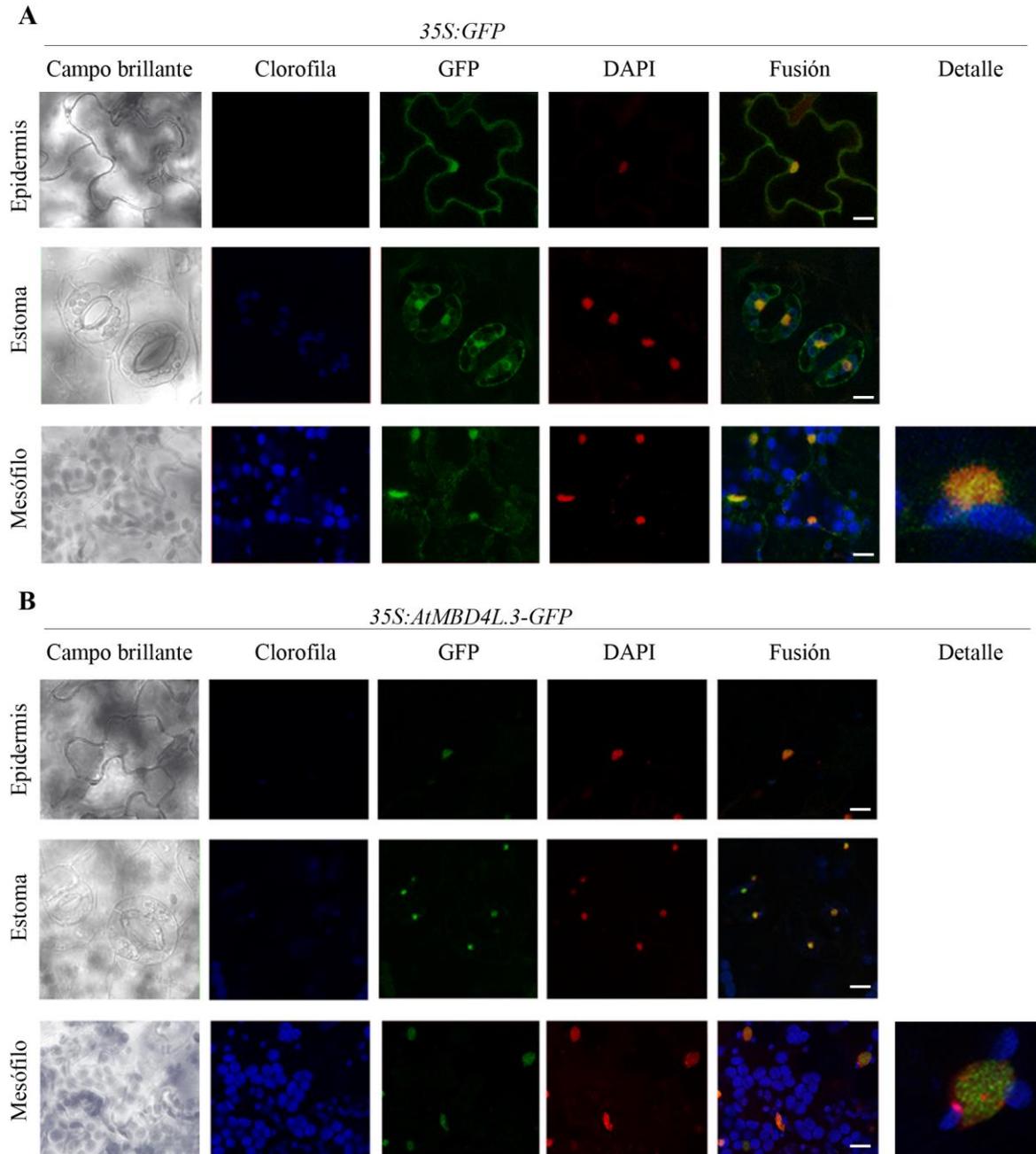


Figura 24. Localización subcelular de MBD4L3-GFP en diferentes células de hoja. Fotografías de imágenes confocales (objetivo 60X aceite) de tres tipos de células (epidermales, estomáticas y mesófilo) de hojas de plantas transgénicas *35S:GFP* (A) y *35S:AtMBD4.3-GFP* (B). Se muestran fotografías de campo brillante y de fluorescencia: clorofila (azul), GFP (verde), DAPI (rojo). Barra: 10 μ M.

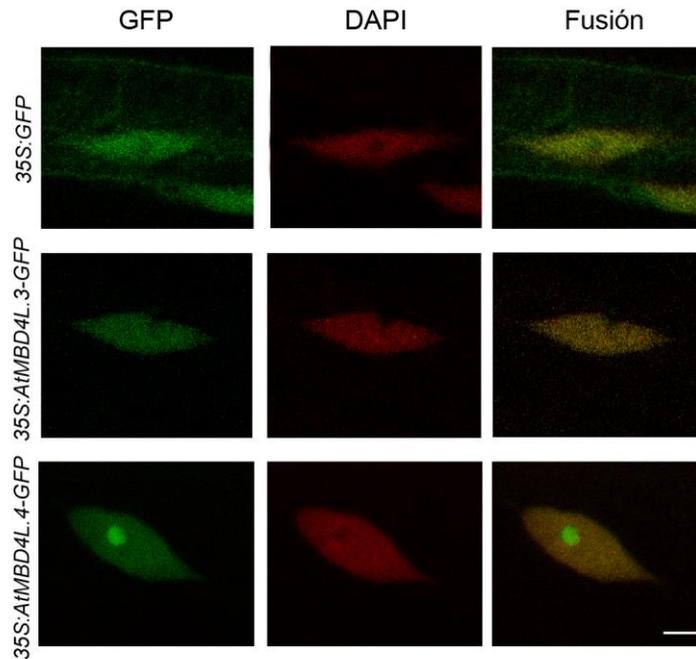


Figura 25. Localización subnuclear de MBD4L3-GFP y MBD4L4-GFP. Fotografías de imágenes confocales de núcleo de células de raíz de plantas *35S:GFP*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP*. Se utilizó un objetivo 100X aceite y zoom digital 3X. Se muestran fotografías de fluorescencia: verde: GFP; rojo: DAPI. Barra: 2 μ m.

II.2.2 Niveles de MBD4L en plantas transgénicas *35S:AtMBD4L-GFP*

Como se observó anteriormente, los transcritos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* tienen niveles considerablemente elevados en plantas homocigotas *35S:AtMBD4L.3-GFP* (Fig 22D). Sin embargo, estas plantas mostraron una expresión de GFP notablemente menor que la de plantas *35S:GFP* (Fig. 24), a pesar que en todas estas plantas la expresión de GFP está dirigida por el mismo promotor (35S). Esto sugiere que MBD4L3 y MBD4L4 podrían estar sometidas a algún tipo de regulación postraduccional, que mantendría niveles bajos de estas proteínas.

Para corroborar la presencia de las proteínas de fusión en las plantas transgénicas y determinar su nivel se realizaron ensayos de Western blot. Proteínas totales de hojas de plantas adultas *35S:GFP*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* fueron extraídas y sembradas en geles SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Se utilizó un anticuerpo comercial policlonal anti-GFP (Abcam290) para revelar el blot. La presencia de

GFP fue observada en extractos de proteínas totales de plantas control *35S:GFP*, pero no en plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* (Fig. 26A). Estos resultados corroboran que el contenido de GFP es menor en plantas *35S:AtMBD4L-GFP* respecto a plantas *35S:GFP*.

Posteriormente, se utilizaron plantas que sobre-expresan el gen *AtMBD4L.3* para inmunoprecipitar y concentrar las proteínas de fusión con anticuerpos comerciales. Extractos de proteínas totales obtenidas a partir de hojas se trataron con perlas de agarosa acopladas a un anticuerpo anti-GFP (GFP-Trap). Las plantas *35S:GFP* fueron utilizadas como control. Las fracciones de proteínas totales (input, I), no unidas al anticuerpo (soluble, S) y unidas a las perlas de agarosa con anti-GFP (precipitado, P) fueron utilizadas en un Western blot revelado con un anticuerpo anti GFP (Abcam290). Una proteína del tamaño correspondiente a GFP se encontró en todas las muestras de plantas *35S:GFP*, aunque dicha proteína se mostró enriquecida en la fracción de proteínas precipitadas (P) (Fig. 26B). Por su parte, no se detectó MBD4L3-GFP ni MBD4L4-GFP en la fracción correspondiente a proteínas totales de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP*, aunque sí se detectó una banda del tamaño correspondiente a MBD4L3 en la fracción que precipitó con el anticuerpo anti-GFP (Fig. 26B). Esto indica que existe un nivel muy bajo de MBD4L3 y que en estas plantas el nivel de MBD4L4 sería aún menor.

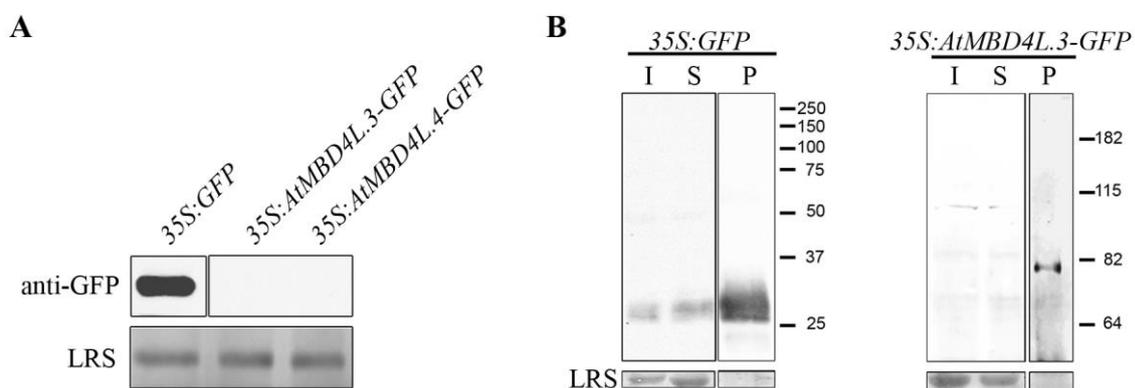


Figura 26. Expresión de GFP en plantas transgénicas *35S:AtMBD4L.3-GFP*. A) Ensayo de Western blot revelado con anticuerpos anti-GFP. Las muestras fueron obtenidas de hojas de plantas *35S:GFP*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP*. Las calles contienen 50 µg de proteínas totales. B) Western blot de proteínas inmunoprecipitadas con bolitas de agarosa recubiertas con anticuerpo anti GFP (GFP-Trap). Se muestran proteínas de fracciones totales (I), no unidas al anticuerpo (S) y precipitadas con anti-GFP (P). En A y

B, la subunidad grande de Rubisco (LRS) fue usada como control de carga. Las proteínas se separaron en gel de SDS-PAGE 10% v/v. Las flechas indican la posición de GFP (A) y MBD4L3-GFP (B).

En síntesis, en esta sección se mostró la caracterización estructural de *AtMBD4L* y se estudió su patrón de expresión. Se identificó un nuevo transcripto no predicho por TAIR, resultante de splicing alternativo que revela la presencia de un intrón no descrito anteriormente. Los dos transcriptos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* codifican para proteínas que conservan un dominio DNA glicosilasa estructural y funcionalmente relacionado con la superfamilia HhH-GPD. La expresión de *AtMBD4L* está altamente regulada y es específica para algunos tejidos, como hojas y flores y ciertos estadios del desarrollo de órganos vegetativos (hoja senescente) y reproductivos (flor y silicua). Ambas isoformas de MBD4L presentan localización nuclear, aunque difieren en la localización subnuclear y podrían ser reguladas post-traduccionalmente.

II. 3 Participación de *AtMBD4L* en el desarrollo de Arabidopsis

En mamíferos, no se reportó hasta el momento que la falta de función de alguna enzima del sistema BER ocasione letalidad. Sin embargo, mutaciones en genes que codifican para algunas de estas enzimas generan alteraciones en la división o metabolismo celular, ocasionando enfermedades, tales como infecciones y cáncer en diversos tejidos (Krokan y Bjoras, 2013). En plantas, la participación de las HhH-GPD DNA glicosilasas en procesos involucrados en el desarrollo no está muy estudiado. Como se detalló en la introducción las plantas mutantes para la mayoría de las DNA glicosilasas caracterizadas en Arabidopsis no presentan anomalías fenotípicas, probablemente por redundancia de función entre estas enzimas (Penterman y col, 2007; Córdoba-Cañero y col., 2010; Gutman y Niyogi, 2009; Murphy, 2005). Por el contrario, plantas mutantes para *DME* y *ROS1* muestran fenotipos aberrantes (Choi y col., 2002; Gong y col., 2002), sugiriendo que estas dos enzimas cumplirían roles únicos en el desarrollo.

En esta sección del capítulo se analiza la participación de *AtMBD4L* en procesos que regulan el desarrollo de Arabidopsis, mediante la caracterización de fenotipos vegetativos y reproductivos de plantas con niveles reducidos de los transcriptos de este gen.

II.3.1 Generación de plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*

Con el objetivo de estudiar si la expresión *AtMBD4L* es requerida para el normal desarrollo de *Arabidopsis* se evaluaron fenotipos en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*. Debido a la ausencia de mutantes nulas y a la escasez de alelos mutantes para este gen, se utilizó el alelo hipomórfico *mbd4l-1* (Fig. 12), y como complemento se generaron plantas transgénicas con diferentes niveles de transcripto logrado por silenciamiento postranscripcional de *AtMBD4L*, llamadas *siAtMBD4L*.

Las líneas transgénicas silenciadas en *AtMBD4L* contienen 2 copias de una secuencia de 300 pb complementaria a la secuencia del gen endógeno (nt 636-936). Una de estas copias se encuentra invertida de manera que al transcribirse se genera un RNA doble cadena que dispara la maquinaria de silenciamiento post transcripcional. La transcripción de dicha secuencia está regulada por un promotor constitutivo (35S), lo cual favorece el silenciamiento de *AtMBD4L* en todos los tejidos. Además, debido a que el transgén lleva una secuencia común entre *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*, ambos transcriptos deberían verse afectados por el silenciamiento.

A diferencia de las plantas mutantes *mbd4l-1*, las plantas *siAtMBD4L* fueron generadas en un ecotipo Col-0, lo que permite ampliar los estudios fenotípicos a dos ecotipos diferentes. Inicialmente se analizaron 4 plantas hemicigotas provenientes de eventos de transformación independientes (*siAtMBD4L-A, C, D, E*). Las mismas mostraron contener diferente nivel de ambos transcriptos de *AtMBD4L*, siendo *siAtMBD4L-A* la planta con mayor nivel de silenciamiento (Fig. 27A). *siAtMBD4L-A, siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E* presentaron una segregación mendeliana simple del transgen (3:1; resistentes: susceptibles a kanamicina), indicativo de un único evento de inserción del constructo en el genoma. Estas tres líneas fueron segregadas en medio selectivo (suplementado con kanamicina) hasta obtener el transgén en homocigosis. Las líneas *siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E* no mostraron ninguna anomalía durante la segregación. Por el contrario, las semillas de las plantas *siAtMBD4L-A* disminuyeron su capacidad germinativa en las sucesivas generaciones, perdiéndose la viabilidad de estas plantas, que mostraban el mayor nivel de silenciamiento del gen *AtMBD4L*.

Como puede observarse en la Fig. 27B, a nivel basal las plantas salvajes de los ecotipos Ws y Col-0 tienen una expresión similar de *AtMBD4L*, y conservan el tamaño y relación relativa de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*. Por otro lado, las líneas *siAtMBD4L* homocigotas

presentan un nivel de transcripto de *AtMBD4L* superior al observado en plantas mutantes *mbd4l-1*, aunque menor que el de plantas salvajes. Además, las plantas homocigotas *siAtMBD4L-D* muestran un mayor silenciamiento que las plantas *siAtMBD4L-E* (Fig. 27B).

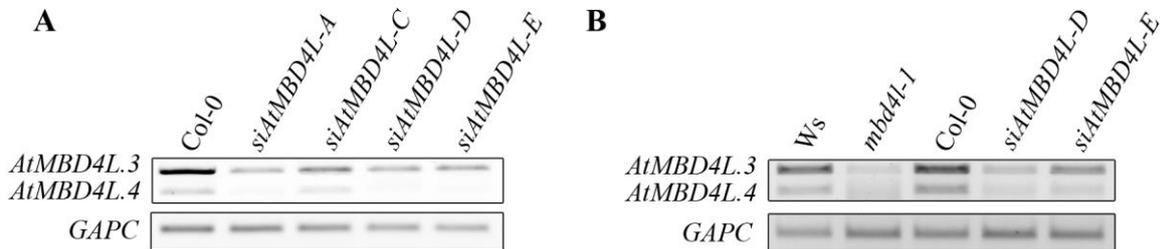


Figura 27. Nivel de *AtMBD4L* en plantas silenciadas (*siAtMBD4L*) y mutantes (*mbd4l-1*) para *AtMBD4L*. A) Nivel transcripcional de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* en plantas control, *mbd4l-1* y plantas transgénicas *siAtMBD4L-A*, *AtMBD4L-C*, *AtMBD4L-D* y *AtMBD4L-E*. Se analizan plantas hemicigotas (A) y homocigotas (B) para transgen. El RNA de las hojas de plantas *siAtMBD4L* y *mbd4l-1* de 3-4 semanas fue utilizado en ensayos de RT-PCR con cebadores J-K (Fig. 16, pág. 65; Tabla SII, pág. 141). Plantas Col-0 y Ws fueron utilizadas como control. El gen *GAPC* se utilizó como control de carga.

II.3.2 Desarrollo vegetativo

II.3.2.1 Crecimiento y número de células

Se analizaron diferentes parámetros de desarrollo vegetativo en plantas con niveles reducidos de los transcriptos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*. Si bien era predecible que no se manifestaran fenotipos claros dado que no contábamos con alelos nulos, observamos varias anomalías en el desarrollo.

El primer fenotipo analizado fue el crecimiento de la raíz primaria. Este es un fenotipo clásico de desarrollo que involucra división y crecimiento celular y está regulado hormonalmente (Petricka y col., 2012). Las semillas de plantas *mbd4l-1*, *siAtMBD4L-D*, *siAtMBD4L-E* y plantas control fueron depositadas en cajas de Petri cuadradas, ubicadas en posición vertical y crecidas durante 12 días. En esa condición la elongación de la raíz responde al geotropismo y permite medir el crecimiento.

Las plantas utilizadas como control (Ws y Col-0) mostraron un crecimiento similar de la raíz primaria a los 4 y 10 días post siembra (dps). Por su parte, tanto las plantas mutantes *mbd4l-1* como las silenciadas desarrollaron menor crecimiento de la raíz primaria respecto a las plantas control (Fig. 28A). A pesar que las diferencias observadas entre las plantas mutantes y silenciadas no resultan significativas, la longitud de la raíz primaria estuvo directamente relacionada con el nivel de expresión de *AtMBD4L*, siendo menor en plantas *mbd4l-1* que en ambas líneas *siAtMBD4L*. Las plantas mutantes, con el nivel más bajo para ambos transcritos, presentaron el menor crecimiento de raíz a los 4 y 10 dps, mientras que las plantas *siAtMBD4L-E*, con menor nivel de silenciamiento mostraron mayor longitud de la raíz primaria (Fig. 28A).

Por otro lado, se analizaron las raíces laterales, que en *Arabidopsis* aparecen entre los 9 y 12 dps (Péret y col., 2009). La aparición temprana de raíces laterales fue evidenciada en plantas *mbd4l-1*. Tres experimentos independientes que involucran en total al menos 20 plantas indicaron que aproximadamente el 52% de las plántulas *mbd4l-1* y el 22% de las plantas *siAtMBD4L* generaron raíces laterales a los 12 dps (no mostrado), mientras que las plantas control no produjeron raíces laterales en ese lapso.

A pesar que *AtMBD4L* no fue detectado mediante RT-PCR en raíces (Fig. 20, pág. 73) y que no se evidenció expresión en regiones meristemáticas, los resultados sugieren que este gen participa en procesos que controlan el crecimiento de raíces primarias y laterales en *Arabidopsis*, regulando posiblemente el metabolismo de una señal móvil u hormonal.

Por otro lado, se analizó el crecimiento aéreo de las plantas. Las mutantes *mbd4l-1* mostraron un tamaño reducido de roseta al ser comparada con las plantas control (Fig. 28B). A pesar de esto, no se observó diferencia significativa en el número de hojas entre plantas mutantes y salvajes durante la etapa vegetativa (Fig. 28B). Por su parte, las plantas *siAtMBD4L* no presentaron diferencias en el tamaño de la roseta ni en el número de hojas respecto a las plantas control (Fig. 28B). Esto sugiere que el nivel de expresión de *AtMBD4L* en las plantas mutantes no sería suficiente para alcanzar un tamaño normal de roseta, aunque sí lo sería en las plantas silenciadas.

El tamaño de los órganos vegetales está determinado por la tasa de división y expansión celular (Horiguchi y col., 2006). Para estudiar si el tamaño reducido de las hojas en plantas *mbd4l-1* está asociado a anomalías en el número y tamaño de las células, se analizaron estos parámetros en células del parénquima de la capa subepidérmica de las primeras dos hojas de plantas *mbd4l-1* de 20 días de edad (Fig. 28C). Se utilizó el programa ImageJ para la cuantificación del número y área de las células y hojas. Pese a que el área de las hojas de

plantas mutantes fue significativamente menor que el de las plantas control (Fig. 28D), el área de células de ambas plantas no mostró diferencias significativas (Fig. 28E). Además, el número de células por hoja de plantas *mbd4l-1* fue menor al de plantas Ws (Fig. 28F). Estos resultados indican que el menor tamaño de las hojas de plantas *mbd4l-1* se debe a que las hojas contienen menos células con un tamaño normal. Indicando, por ende, que las plantas *mbd4l-1* presentan un defecto en la división y no en la expansión celular.

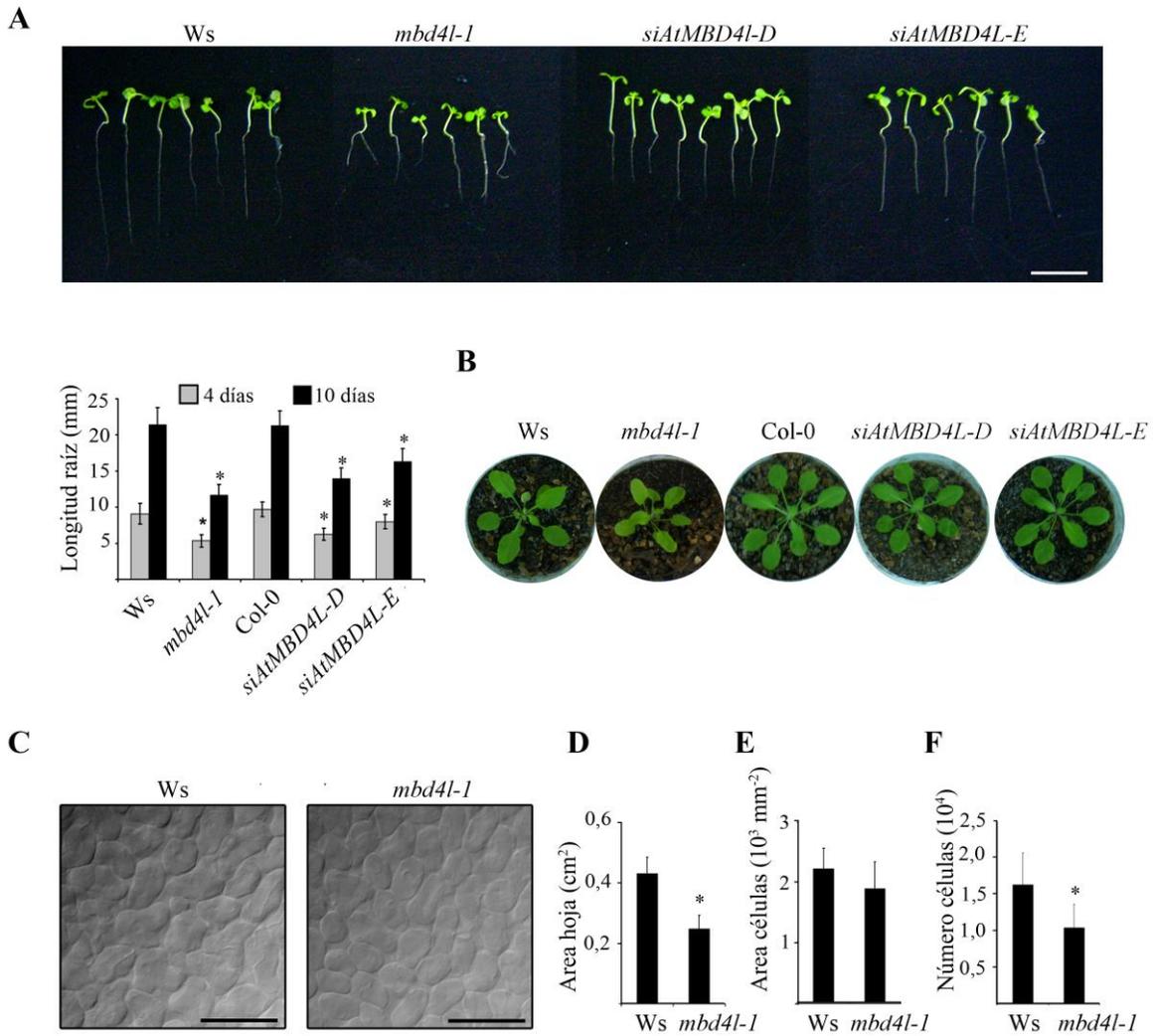


Figura 28. Fenotipos vegetativos de plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*. A) Crecimiento de raíz primaria en plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L-D* y *siAtMBD4L-E* y plantas control de 10 días crecidas en medio MS. Barra: 1cm. Abajo: cuantificación de longitud de raíz primaria 4 y 10 días post siembra. B) Roseta de plantas *mbd4l-1*, *siAtMBD4L* y sus respectivos controles (Ws y Col-0) de 3 semanas de edad crecidas en suelo y en condiciones de día corto. C) Imágenes de células de empalizada de la capa subepidérmica de la primera hoja de plantas de 20 días. Barra: 100 μ m. Área de la primera hoja (D), de células (E) y número de células por hoja de

plantas *mbd4l-1* y Ws de 20 días. Los valores representan la media \pm desvío estándar (n= 22 en A; n=5 en D; n=100 en E y F). *:diferencias significativas entre Ws y *mbd4l-1* o Col-0 y *siAtMBD4L* (Test *t*, $p < 0,001$).

En conjunto estos resultados muestran una relación entre el nivel de expresión de *AtMBD4L* y la aparición de anomalías de fenotipos vegetativos, lo que propone la existencia de un umbral en el nivel de transcripto del gen, por debajo del cual aparecen aberraciones fenotípicas. Además, los resultados sugieren que *AtMBD4L* participa de procesos relacionados con el crecimiento de raíz y la hoja, posiblemente involucrados en la división celular, pero no en la determinación del tamaño de las células.

II. 3.3 Desarrollo reproductivo

Se evaluó si *AtMBD4L* participa en procesos que regulan el desarrollo reproductivo analizando diferentes fenotipos, como tiempo de floración, número de varas florales, desarrollo de flores y silicuas en plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L*.

II.3.3.1 Tiempo de floración

La floración es un fenotipo altamente estudiado en *Arabidopsis*, determinado por genes activadores y represores (Fig. 5). A su vez, la expresión de estos genes está regulada por condiciones ambientales, procesos endógenos y epigenéticos (Roux y col., 2006), señales ambientales, como el fotoperíodo y la baja temperatura (Boss y col., 2004) y señales hormonales como giberelinas (Fig. 5). A nivel genético, *FLC* y *CO* fueron reportados como los principales reguladores de la floración (Alexandre y col, 2008; Amassino, 2010). *FLC* es un regulador negativo de la floración sensible a la vernalización y de la vía autónoma (Alexandre y col, 2008) y regula negativamente a *SOC1* y *FT* (Fig. 5). Por otra parte, *CO* es un gen activador de la floración regulado por el fotoperíodo (Fig. 5) (Amassino, 2010).

En primer lugar se analizó si las plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L* presentan anomalías en la floración. El tiempo de floración se determinó cuantificando dos parámetros: el número de hojas de la roseta y el momento (dps) en que la planta emite la primera vara floral, considerando varas de 1 cm de longitud.

La duración del fotoperíodo afecta el inicio de la floración por activación de *CO*, que regulan posteriormente la expresión de otros genes (*SOC1*, *FT* y *LFY*) (Rédei, 1961). Para estudiar si el fotoperíodo afecta el tiempo de floración en plantas *mbd4l-1*, ambos fenotipos fueron analizados en dos diferentes condiciones: día corto (8h luz/16 h oscuridad) y día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad).

En condiciones de día corto, las plantas mutantes *mbd4l-1* emitieron la primera vara floral antes que las plantas control. Mientras que en las plantas control la vara floral se desarrolló en rosetas con $33,22 \pm 1,39$ hojas, las plantas *mbd4l-1* mostraron $18,30 \pm 1,49$ hojas al momento de la emisión de la vara floral (Fig. 29A). Concomitantemente, las plantas mutantes generaron la vara floral a los $35,10 \pm 1,10$ dps, mientras que en plantas control dicha estructura se detectó a los $57,30 \pm 1,80$ dps (Fig. 29B). Por su parte, las plantas *siAtMBD4L* mostraron una floración ligeramente temprana en condiciones de día corto, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En condiciones de día largo, las plantas *mbd4l-1* también presentaron floración temprana (Fig. 27C-D), generando una vara floral con $6,84 \pm 0,50$ hojas (Fig. 29C) y a los $22,15 \pm 2,85$ dps (Fig. 29D), a diferencia de plantas salvajes, las cuales emitieron la vara floral con $10,26 \pm 1,25$ hojas y a los $28,65 \pm 2,67$ dps. Por su parte, las plantas *siAtMBD4L* no mostraron diferencias en la floración respecto a plantas control en esta condición de fotoperíodo.

Estos resultados indican que *AtMBD4L* regula la floración de manera independiente al fotoperíodo. El nivel de transcritos de *AtMBD4L* parece estar relacionado de manera directa con la regulación de la floración ya que las plantas *mbd4l-1* presentaron una floración marcadamente anticipada, mientras que las plantas silenciadas presentaron una tendencia a la floración temprana en fotoperíodos cortos.

Para conocer en mayor detalle el rol de *AtMBD4L* en la floración se monitoreó la expresión de los genes que regulan dicho proceso en plantas *mbd4l-1*, utilizando RT-PCR semicuantitativa. Una considerable represión transcripcional de *FLC* fue detectada en las plantas mutantes *mbd4l-1* (Fig. 30A). Por el contrario, el nivel de transcritos de *CO* no fue afectado en estas plantas, reforzando la idea de una regulación de la floración independiente del fotoperíodo. Consistente con la represión de *FLC*, las plantas *mbd4l-1* presentaron activación transcripcional de *SOC1*.

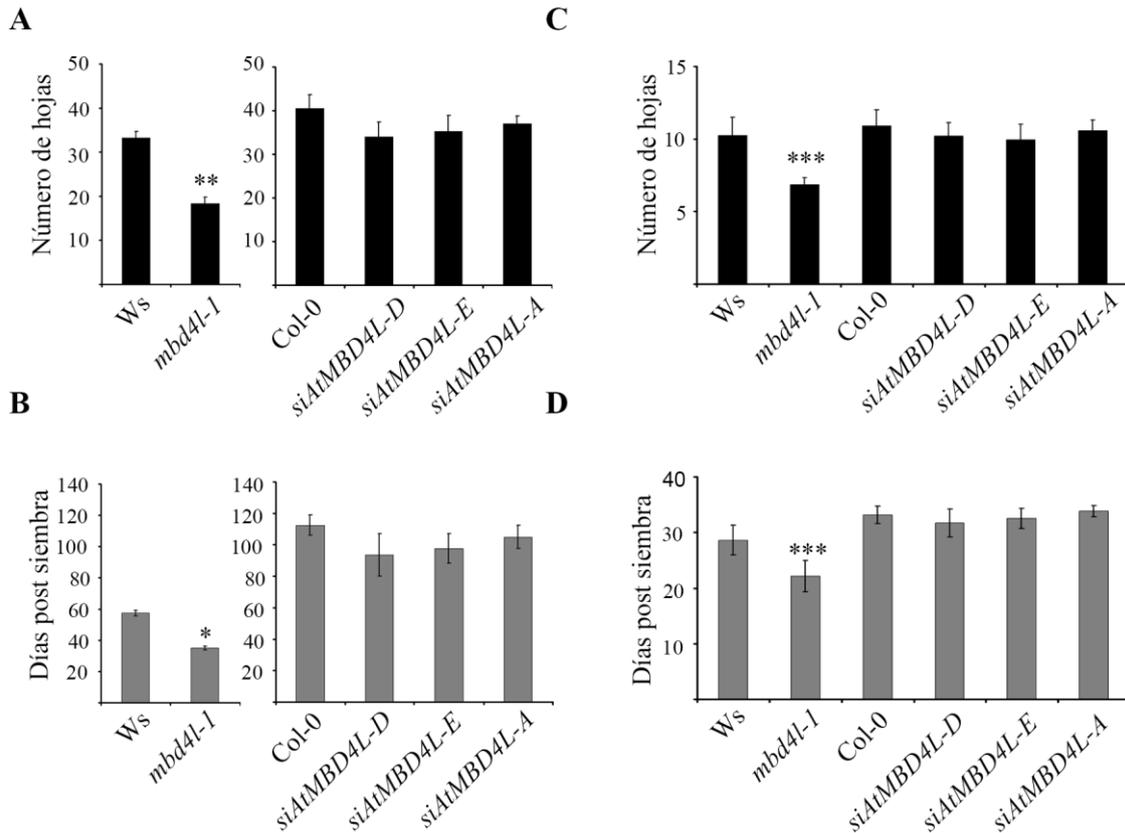


Figura 29. Floración en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*. Número de hojas y días de plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L* al emitir la vara floral (1 cm). Plantas Ws y Col-0 fueron utilizadas como control. A, B) Plantas crecidas en fotoperíodos cortos. C, D) Plantas crecidas en condiciones de día largo. Los valores representan la media \pm desvío estándar de un experimento representativo. *, ** y ***: diferencias significativas entre Ws y *mbd4l-1* plantas (Test *t* $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron en tres experimentos independientes ($n > 12$ plantas cada uno).

Estos resultados sugieren que la floración temprana observada en plantas mutantes se debe a la represión de *FLC* y no a la activación de *CO*. Por su parte, plantas *siAtMBD4L* presentaron leves alteraciones en el nivel de expresión de *FLC* (Fig. 30B). Sólo algunas líneas mostraron reducción en el nivel de transcritos de *FLC*, observándose diferentes niveles de dicho transcritos entre plantas derivadas de la misma línea (Fig. 30B). Probablemente, la reducción transcripcional de *FLC* en plantas *siAtMBD4L* no resulte suficiente para regular la floración de manera significativa. Asimismo, excepto en la línea *siAtMBD4L-D*, el nivel de transcritos de *AtMBD4L* en plantas *siAtMBD4L* pareciera estar correlacionado con el nivel de expresión de *FLC*.

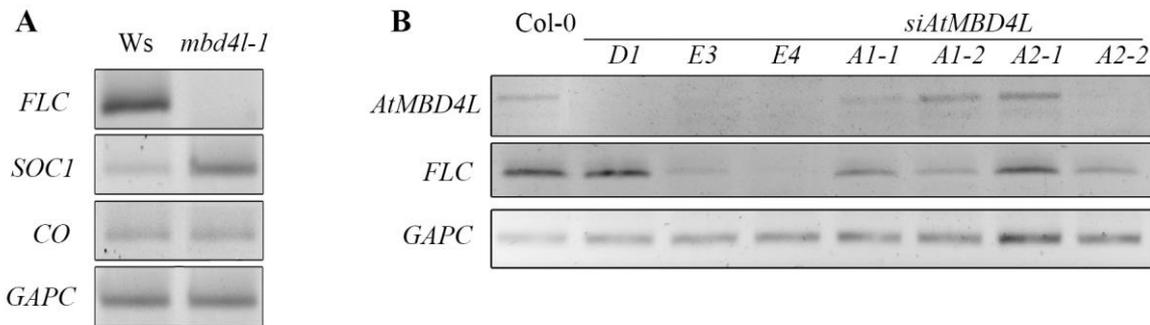


Figura 30. Genes de floración en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*. A) Expresión de genes de floración *FLC*, *SOCI* y *CO* en plantas *mbd4l-1* y *Ws*. B) Nivel de transcritos de *FLC* y *AtMBD4L* en plantas *siAtMBD4L* hermanas de las líneas D, E y A. El RNA de la parte aérea completa de plantas de 20 días fue utilizado en ensayos de RT-PCR semicuantitativa.

La floración temprana y represión transcripcional de *FLC* observada en plantas mutantes *mbd4l-1* sugieren que en plantas salvajes *AtMBD4L* participa en procesos que determinan la floración de manera independiente al fotoperíodo y que esto resultaría de la expresión de *FLC*, pero no de la activación de *CO*. Además, la regulación de *FLC* podría depender del nivel transcripcional de *AtMBD4L*, mostrando un umbral crítico por debajo del cual la transcripción de *FLC* no es activada. Sin embargo, los resultados son insuficientes para determinar si *MBD4L* actúa sobre el gen *FLC* en forma directa, pero como se discutirá más adelante existe evidencia de la demetilación activa del promotor de dicho gen, aunque la enzima responsable no fue descrita hasta el momento.

II.3.3.2 Dominancia apical y desarrollo de frutos

La inhibición del desarrollo de tallos laterales que deriva del ápice del tallo principal, es un fenómeno conocido como dominancia apical (Doamgalska y Leyser, 2011). El patrón de ramificación del tallo depende no sólo de la iniciación de los meristemas axilares, sino también de la regulación de la extensión del tallo. Durante el desarrollo reproductivo, los meristemas laterales juegan un papel crucial en el establecimiento de las diferentes estructuras de la inflorescencia que condicionan el éxito reproductivo de una planta (Schmitz y Theres, 2005). Para analizar si plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L* muestran alteraciones en la

dominancia apical se analizó el número de varas florales presentes en plantas *mbd4l-1* respecto a plantas control. Las plantas mutantes mostraron una dominancia apical menor que las plantas Ws (Fig. 31A), dado que a las 7-8 semanas presentaron $4,97 \pm 0,81$ varas florales, a diferencia de $3,01 \pm 0,45$ varas florales observadas en plantas Ws. Esto sugiere que *AtMBD4L* participa en la regulación de la dominancia apical.

Por otra parte, se conoce que algunas DNA glicosilasas de Arabidopsis, como ROS1 y DME, participan en el desarrollo de estructuras florales y frutos (Gong y col., 2002; Choi y col., 2002). De acuerdo a los datos publicados en Genevestigator, la expresión de *AtMBD4L* aumenta ligeramente a partir de la floración y formación de frutos (Fig. 16B, pág. 65; Fig. SI, pág. 139). Esto es consistente con la expresión de GUS observada en flores y silicuas (Fig. 19F-J, pág. 72) y podría sugerir la participación del gen en procesos relacionados al desarrollo de estos órganos.

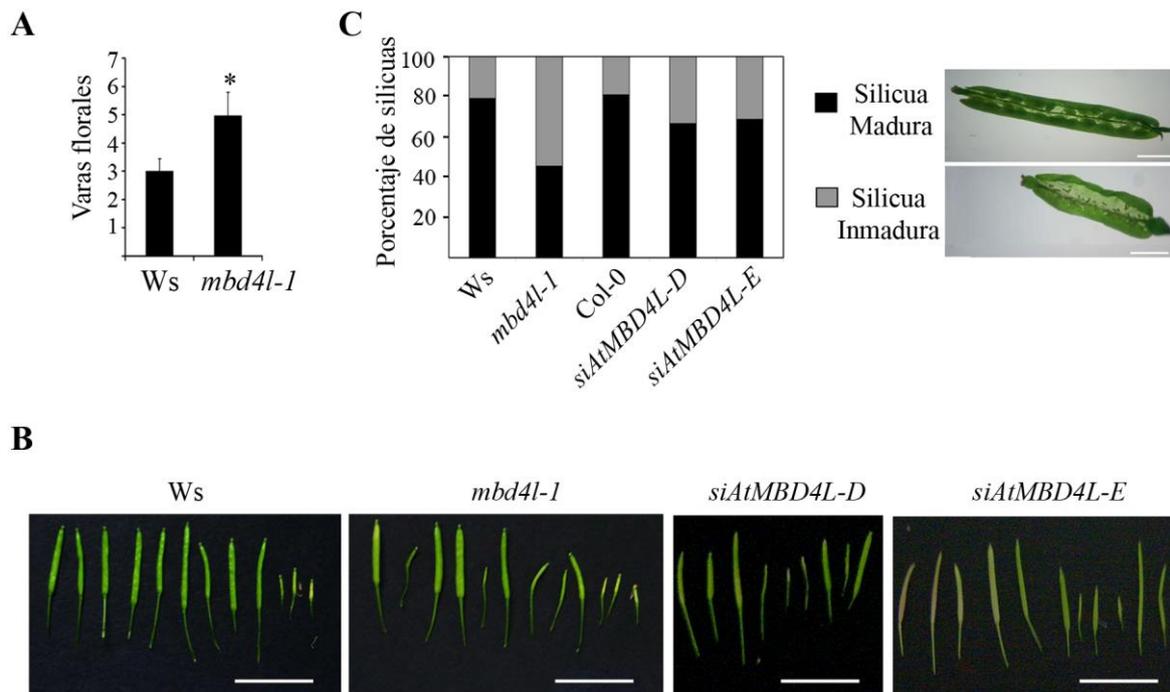


Figura 31. Dominancia apical y desarrollo de frutos en plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L*. A) Número de varas florales de planta *mbd4l-1* y Ws de 6-8 semanas. B-C) Todas las silicuas de plantas Ws, *mbd4l-1* y *siAtMBD4L* (líneas D y E) correspondientes a una vara floral representativa, ordenadas de más vieja a más joven. Barra: 1 cm. C) Cuantificación de silicuas maduras e inmaduras de plantas de 3 meses crecidas en condiciones de día corto. Los valores representan la media ± desvío estándar de un experimento representativo (n= 22 en A; n=100 en C). *:diferencias significativas entre Ws y *mbd4l-1* (Test *t*, *p*< 0,05). Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes.

Para conocer si *AtMBD4L* afecta el desarrollo de flores, frutos y semillas, se analizó la estructura de dichos órganos en plantas con niveles reducidos de ambos transcritos de *AtMBD4L*. Las plantas mutantes *mbd4l-1* y *siAtMBD4L* no presentaron modificaciones en el número y estructura de pétalos, sépalos, estambres y gineceo de flores respecto a plantas control (no mostrado), sugiriendo que *AtMBD4L* no es necesaria para el desarrollo de las estructuras ni la identidad de órganos florales.

Por otro lado, se estudiaron diferentes parámetros del desarrollo de frutos, como el porcentaje de silicuas inmaduras, la longitud y el número de semillas de silicuas maduras. Las plantas *mbd4l-1* y dos líneas de plantas *siAtMBD4L* mostraron un alto porcentaje de silicuas inmaduras respecto a plantas control (Fig. 29B, C). Las silicuas inmaduras fueron definidas como frutos de menor longitud, incapaces de desarrollar semillas. Por su parte, las silicuas maduras (normales) de plantas *mbd4l-1* no mostraron diferencias en la longitud y en el número de embriones de las mismas respecto a plantas control (Tabla V). Estos resultados sugieren que *AtMBD4L* participa en el desarrollo de silicuas. Del mismo modo, experimentos publicados en Genevestigator muestran que el nivel de *AtMBD4L* aumenta durante la generación de frutos (Fig. SI), sugiriendo que durante esta etapa del desarrollo *AtMBD4L* resulta importante.

Tabla V. Longitud de silicuas maduras y número de embriones de plantas *mbd4l-1* de diferentes generaciones.

Fenotipo	Ws	<i>mbd4l-1 4X</i>	<i>mbd4l-1 5X</i>	<i>mbd4l-1 6X</i>
Longitud silicuas maduras (mm)	6,49 ± 1,17	6,34 ± 1,17	5,35 ± 1,49	6,13 ± 1,53
Número embriones	25,1 ± 9,25	21,6 ± 9,25	19,54 ± 10,21	25,16 ± 10,19

Valor promedio ± desvío estándar (n=30 silicuas; n ≥ 80 embriones).
Los datos no presentan diferencias significativas.

II.3.4 Anormalidades fenotípicas durante diferentes generaciones de plantas *mbd4l-1*

La carencia de DDM1 (Finnegan y col., 1996) y ROS1 (Gong y col., 2002), genera anormalidades fenotípicas que pueden no manifestarse en las primeras generaciones, pero sí en la progenie con sucesivas autocruzas donde incluso pueden intensificarse. Estos fenotipos

podrían ser producto de la acumulación de epimutaciones en diversos genes responsables de procesos que determinan el desarrollo de *Arabidopsis*.

Para estudiar si la disminución de transcritos de *AtMBD4L* genera fenotipos que incrementan su severidad en sucesivas rondas de autofecundación, estudiamos algunos de los fenotipos descritos anteriormente en la cuarta, quinta y sexta generación de plantas *mbd4l-1*.

En primer lugar se analizó el tamaño de las plantas de cada una de estas tres generaciones. Si bien las plantas mutantes mostraron menor tamaño que plantas control, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes generaciones de plantas mutantes *mbd4l-1* (Fig. 32A). Cabe aclarar que el tamaño reducido de la roseta en plantas mutantes había sido evidenciado (no cuantificado) a partir de la segunda generación.

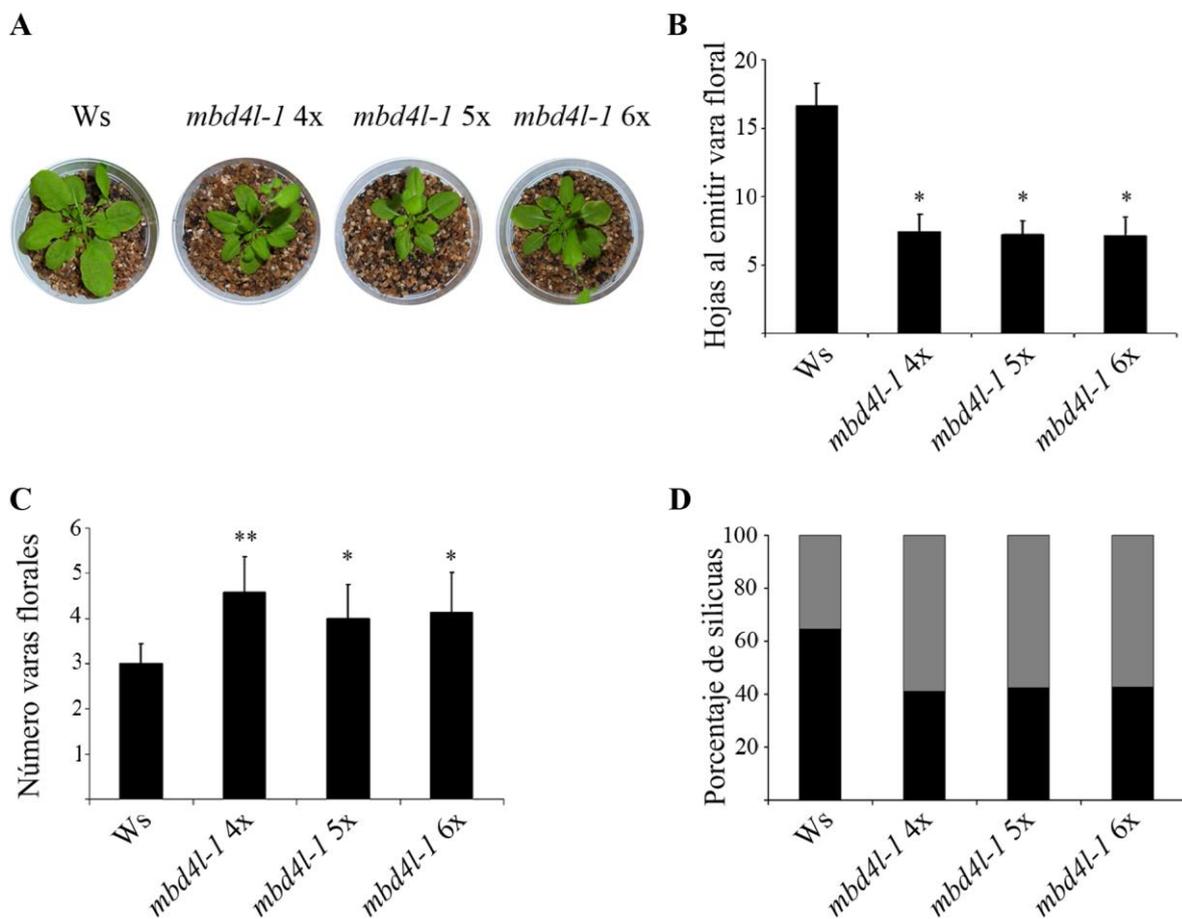


Figura 32. Fenotipos vegetativos y reproductivos de plantas *mbd4l-1* de diferentes generaciones. A) Tamaño de roseta de 3 generaciones sucesivas de plantas *mbd4l-1* de 3 semanas crecidas en condiciones de día corto. B) Número de hojas al emitir la primera vara floral y número de varas florales (C) en plantas Ws y tres generaciones de mutantes *mbd4l-1*. D) Cuantificación de silicuas maduras (negro) e inmaduras (gris) en plantas Ws y *mbd4l-1*. Los valores representan la media \pm desvío estándar de un experimento representativo (n= 12 en

B; n=12 en C; n=100 en D). * y **:diferencias significativas entre Ws y *mbd4l-1* (Test *t*, *: $p < 0,05$ y **: $p < 0,01$).

Otros fenotipos de desarrollo reproductivo fueron analizados en diferentes generaciones de plantas *mbd4l-1*. No se observaron diferencias significativas en el tiempo de floración (Fig. 32B) y dominancia apical (Fig. 32C) y desarrollo de frutos (Fig. 32D), longitud de silicuas normales ni número de embriones desarrollados (Tabla V) entre las diferentes generaciones de plantas mutantes *mbd4l-1*. Estos resultados indican que la disminución del nivel de transcripto de *AtMBD4L* no genera acumulación de mutaciones en las sucesivas generaciones.

En resumen, los resultados presentados en esta sección del capítulo II muestran que *AtMBD4L* está involucrado en procesos que regulan tanto el desarrollo vegetativo (crecimiento de raíces y hojas) como reproductivo (floración, dominancia apical y maduración de frutos) de *Arabidopsis*.

A diferencia de ROS1 y DME, los resultados indican que MBD4L participa en la regulación de procesos de desarrollo de raíces laterales, división de células en hojas y dominancia apical (Tabla VI). Al igual que ROS1, MBD4L regula el crecimiento de la raíz primaria y al igual que DME, participaría en el desarrollo de embriones. Más aún, la ausencia de líneas mutantes sugiere que la expresión de dicho gen podría ser esencial para el correcto desarrollo de plantas de *Arabidopsis*.

Tabla VI. Procesos de desarrollo en los que participan las DNA glicosilasas DME, ROS1 y MBD4L.

Procesos ^(a)	DME ^(b)	ROS1 ^(c)	MBD4L ^(d)
Crecimiento raíz primaria			
Desarrollo raíces laterales			
Crecimiento de hojas			
División celular en hojas			
Dominancia apical			
Estructura floral			
Longitud silicuas			
Desarrollo de embriones			

^(a) La participación de las enzimas en cada proceso está representada en verde.

^(b) Choi y col., 2002. ^(c) Gong y col., 2002. ^(d) Resultados obtenidos en esta Tesis doctoral

**CAPÍTULO III:
RESPUESTAS AL ESTRÉS EN ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO AFECTADAS
POR *AtMBD4L***

Bajo condiciones de estrés el genoma vegetal puede incrementar su exposición a agentes que generan daño en los diferentes componentes del DNA produciendo modificaciones genéticas y epigenéticas. Las DNA glicosilasas, que participan en la reparación de daños y pueden producir cambios epigenéticos, podrían afectar las respuestas al estrés.

En este capítulo se evaluará el rol de MBD4L en respuestas al estrés biótico y abiótico. En el primer caso se analizarán en respuestas de defensa contra *P. syringae* pv. *tomato*, tales como la resistencia a patógenos bacterianos en plantas con niveles reducidos del gen. En el segundo caso se evaluarán respuestas al estrés salino y oxidativo en distintos estadios de desarrollo. En todos los experimentos se utilizan plantas con niveles reducidos de expresión de *AtMBD4L* y plantas que sobre-expresan tanto a *AtMBD4L.3* como a *AtMBD4L.4* o solamente al transcripto más corto.

III. 1 Estrés biótico

III.1.1 Nivel de transcriptos de *AtMBD4L* en condiciones de infección con *P. syringae* pv. *tomato*

En el primer capítulo se demostró que *AtMBD4L* participa en la decondensación de CCs durante la infección inducida por la bacteria. Se analizó aquí la respuesta de las plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L* al patógeno. Antes de esto, se monitoreó la expresión del gen salvaje en condiciones de infección.

Las hojas de plantas salvajes adultas fueron infiltradas con suspensiones de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ($5 \cdot 10^6$ ufc/ml) y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpC* ($1 \cdot 10^7$ ufc/ml) en MgCl₂ 10 mM. A diferencia de la cepa virulenta que introducen proteínas bacterianas (efectores) al interior de la célula vegetal, las bacterias *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpC* presentan mutaciones en el sistema de secreción de efectores. Además, estos últimos patógenos son incapaces de generar decondensación de CCs (Pavet y col., 2006) y el

crecimiento de los mismos en la planta hospedadora es reducido respecto a la cepa normal. Diferentes concentraciones de bacterias fueron utilizadas debido a la diferencia en el crecimiento de ambas cepas y con la finalidad de lograr una concentración comparable de bacterias en el tejido vegetal para los tiempos analizados. Las concentraciones se establecieron según lo establecido en la bibliografía (Navarro y col., 2008).

Las muestras de hojas infiltradas se colectaron 6 y 24 hpi. Como control se infiltró MgCl_2 10 mM (mock). Los resultados indicaron que durante la infección con ambos patógenos el nivel de expresión de los transcritos de *AtMBD4L* no se incrementa. Contrariamente, una leve represión de ambos transcritos fue observada 24 hpi con ambos patógenos (Fig. 33). Esto sugiere que a tiempos largos de infección, la modificación del nivel de ambos transcritos no depende de efectores bacterianos.

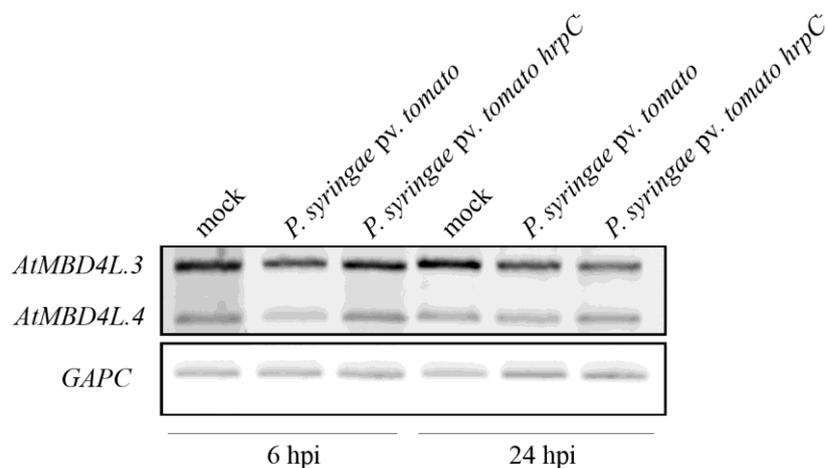


Figura 33. Expresión de *AtMBD4L* en plantas infectadas con *Pst*. Nivel de transcritos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* en plantas infectadas con *Pst* y *Pst hrpC*-. Las hojas fueron colectadas 6 y 24 horas post infiltración de suspensiones de bacterias ($5 \cdot 10^6$ ufc/ml) en MgCl_2 10mM. Las hojas infiltradas con MgCl_2 10 mM (mock) fueron utilizadas como control del estrés mecánico producido por la infiltración del patógeno en la hoja. El gen *GAPC* se usó como control de carga.

III.1.2 Crecimiento de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas con expresión reducida de *AtMBD4L*

Durante el análisis de la decondensación de CCs notamos que en los tejidos infectados de plantas *mbd4l-1* el tamaño promedio de los acúmulos de bacterias era más reducido respecto a plantas Ws infectadas. Esto sugirió que esta planta podría ser más susceptible a la infección con *Pst*.

Para estudiar el nivel de susceptibilidad de plantas con expresión reducida de *AtMBD4L*, se analizaron los síntomas de las hojas infectadas con *P. syringae* pv. *tomato* ($5 \cdot 10^6$ ufc/ml). Plantas con niveles reducidos del gen (*mbd4l-1* y *siAtMBD4L-D*) mostraron menor severidad de los síntomas durante la infección (Fig. 34A). Las hojas de las plantas salvajes mostraron clorosis marcada y muerte del tejido infectado de la mayoría de las hojas a las 72 hpi, mientras que alrededor del 50 y 60 % de las hojas de plantas mutantes y silenciadas mostraron signos cloróticos. Además, el área de las lesiones en estas plantas fue menor que la observada en plantas control (Fig. 34A). Esto sugiere que en plantas salvajes *AtMBD4L* favorece el crecimiento del patógeno.

Para corroborar esto se analizó el crecimiento del patógeno en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*. Para ello las hojas de plantas mutantes *mbd4l-1*, *siAtMBD4L-D*, *siAtMBD4L-E* y las correspondientes plantas control fueron infiltradas con suspensiones de la bacteria ($5 \cdot 10^5$ ufc/ml). Posteriormente, se cortaron discos de las hojas infectadas 2, 3 y 5 días post infiltración (dpi) y se maceraron con el objetivo de eluir las bacterias presentes en los mismos. Las muestras se sembraron en diluciones seriadas sobre cajas de Petri con medio de crecimiento suplementado con antibióticos. De este modo se cuantificó el número ufc por disco de hoja a distintos días post infección, generando una curva de crecimiento del patógeno *in planta*. Las plantas *mbd4l-1* presentaron un crecimiento bacteriano 5 veces menor al de plantas Ws a los 2, 3 y 5 dpi (Fig 34B), mostrando una resistencia sostenida en el tiempo. Por su parte, plantas *siAtMBD4L-D*, mostraron un crecimiento del patógeno similar al descrito en plantas *mbd4l-1* (Fig. 34B), mientras que en plantas *siAtMBD4L-E*, el número de ufc/disco resultó similar al de plantas salvajes (Fig. 34C).

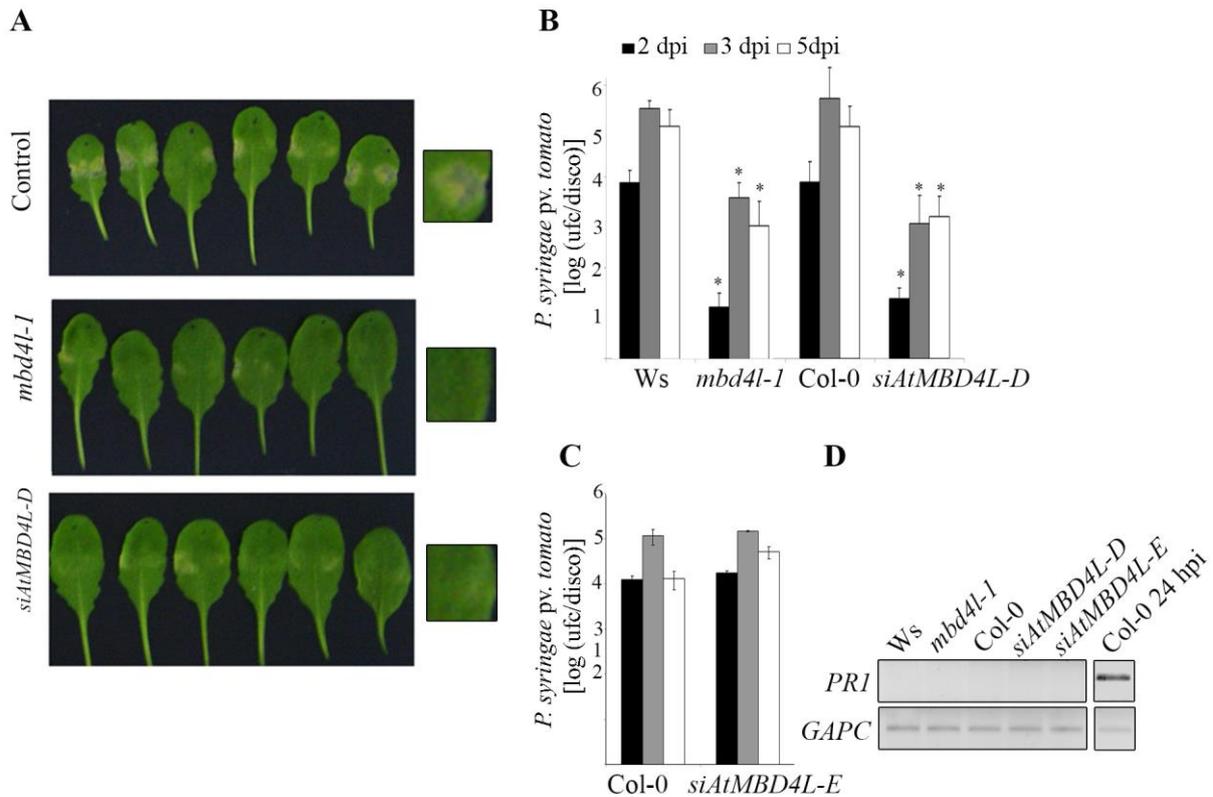


Figura 34. Crecimiento de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas *mbd4l-1* y *siAtMBD4L*. A) Lesiones generadas por la infección bacteriana (5.10^6 ufc/ml) 72 hpi en plantas Ws (control), *mbd4l-1* y *siAtMBD4L-D*. B,C) Crecimiento *in planta* de *P. syringae* pv. *tomato* en hojas de *mbd4l-1*, *siAtMBD4L-D* (B) y *siAtMBD4L-E* (C) y respectivos controles (Ws y Col-0). Las infiltraciones se realizaron con una suspensión de bacterias de 5.10^5 ufc/ml de $MgCl_2$. Para monitorear el crecimiento bacteriano 6 discos de hoja de 4 mm^2 de diámetro provenientes de tres plantas diferentes se analizaron 2, 3 y 5 días post-infiltración (dpi). Se muestran los resultados de un experimento representativo. * :diferencias significativas entre Ws y *mbd4l-1* y Col-0 y *siAtMBD4L-D* (Test *t*, $p < 0,01$). Resultados similares se obtuvieron en al menos tres réplicas biológicas independientes. D) Expresión de *PRI* en plantas control (Ws y Col-0), *mbd4l-1* y *siAtMBD4L* (líneas D y E) sin infectar. Plantas control infectadas con el patógeno (Col-0 24 hpi) fueron utilizadas como control de inducción de *PRI*. El gen *GAPC* fue utilizado como control endógeno.

Estos resultados muestran que *AtMBD4L* favorece el crecimiento de *P. syringae* pv. *tomato* en Arabidopsis. Además, la susceptibilidad de la planta ante el ataque del patógeno estaría directamente correlacionada con el nivel de expresión de *AtMBD4L*.

Ante la infección de patógenos bacterianos ocurre la inducción de numerosos genes de defensa que contribuyen a la defensa de la planta restringiendo el crecimiento del patógeno. En infecciones bacterianas ocurre un aumento en los niveles de ácido salicílico (SA), generando la activación de un gran número de genes sensibles a esta hormona incluido *PR1* (Glazebrook, 2005). Plantas mutantes que presentan una activación basal de estos genes sensibles a SA muestran una resistencia frente al ataque de patógenos biótrosos (Glazebrook, 2005; Kim y col., 2008). El crecimiento reducido de *P. syringae* pv. *tomato* en plantas con bajos niveles de *AtMBD4L* sugirió que esto podría deberse a la expresión basal de genes de defensa sensibles a SA en condiciones normales. Ensayos de RT-PCR de plantas *mbd4l-1* y líneas *siAtMBD4L* sin infectar (Fig. 34D) no muestran activación de *PR1* en esta condición, sugiriendo que la resistencia observada en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L* no se debe a la alteración basal de genes de defensa sino a una respuesta desencadenada luego de la infección.

III.2 Estrés abiótico

Plantas mutantes *ros1-1* son hipersensibles a la exposición a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y metil metano sulfonato (MMS), agentes que generan daño oxidativo y ruptura de hebras del DNA (Gong y col., 2002). Además, AtOGG1 presenta un rol importante en la reparación del DNA generado por estrés salino, deshidratación, altas temperaturas y daño oxidativo, ya que la sobre-expresión de esta enzima confiere resistencia a plantas sometidas a dichas fuentes de estrés (Chen y col., 2012). Por su parte, la regulación negativa de DML3 mediante la acción del microRNA miR402 es necesaria para una adecuada germinación en los primeros estadios de desarrollo de la planta (Kim y col., 2010).

Con el objetivo de analizar si MBD4L participa en respuestas al estrés abiótico se utilizaron plantas mutantes *mbd4l-1* y plantas que sobre-expresan el gen *AtMBD4L* sometidas a diferentes condiciones adversas. Como líneas sobre-expresantes se utilizaron las plantas homocigotas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* (Fig. 22A, pág. 76). La primera de estas plantas presenta mayores niveles de ambos transcritos de *AtMBD4L*, mientras que la segunda, sólo sobreexpresa el transcrito *AtMBD4L.4*, manteniendo niveles normales de *AtMBD4L.3* (Fig. 22D).

III.2.1 MBD4L en estrés oxidativo

Como se describió anteriormente, AtOGG1, NTH1 y NTH2 participan de la reparación de daños oxidativos del DNA generados por agentes genotóxicos (Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001; Roldán-Arjona y col., 2001; Gutman y Niyogi, 2009) y mutantes *ros 1-1* son más susceptibles a tratamientos con H₂O₂ (Gong y col., 2002). Para estudiar si MBD4L participa en respuestas al estrés oxidativo analizamos el comportamiento de plantas mutantes y sobre-expresantes para dicho gen durante las fases de germinación, crecimiento de plántulas y plantas adultas.

III.2.1.1 Germinación y plántulas

Semillas de *mbd4l-1* y *35S-AtMBD4L-GFP* fueron sembradas en medio de crecimiento MS suplementado con metil viológeno (MV), inhibidor de la reducción de ferredoxina en el fotosistema I, que promueve la acumulación de radicales libres que resultan en la producción de O₂⁻ y H₂O₂ en cloroplastos (Babbs y col., 1989). Para cada línea se cuantificó el porcentaje de germinación durante los primeros 7 dps, considerando germinadas aquellas semillas que emitieron la raíz primaria. Semillas de plantas salvajes Ws y *35S:GFP* fueron sembradas con y sin MV como control. Se observó un porcentaje de germinación similar para ambas plantas control en cada una de las condiciones ensayadas.

En general, todas las semillas presentaron un alto porcentaje de germinación en medio MS sin MV 7 dps (superior al 80%). Las semillas de *mbd4l-1* mostraron una germinación más rápida que las del resto de las plantas con y sin MV (Fig. 35). Por su parte, las semillas de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* expuestas a 25 μM de MV germinaron más tarde (Fig. 35 A-B).

A los 7 dps sólo el 62,39 % de las semillas de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y más del 79 % del resto de las plantas germinaron en medio suplementado con 25 μM de MV. Las semillas de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* mostraron una relación considerablemente baja de plantas germinadas bajo estrés y en condiciones normales (Fig. 35B). Esto indica que la sobre expresión de *AtMBD4L.3* reduce la germinación en condiciones de estrés oxidativo. A diferencias de éstas, las plantas *mbd4l-1* mostraron un porcentaje levemente mayor de plantas germinadas con MV respecto a plantas control (Fig 35A). La susceptibilidad de las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* también fue observada en experimentos con mayores concentraciones de MV (100 μM), aunque esta dosis resultó muy nociva para todas las plantas.

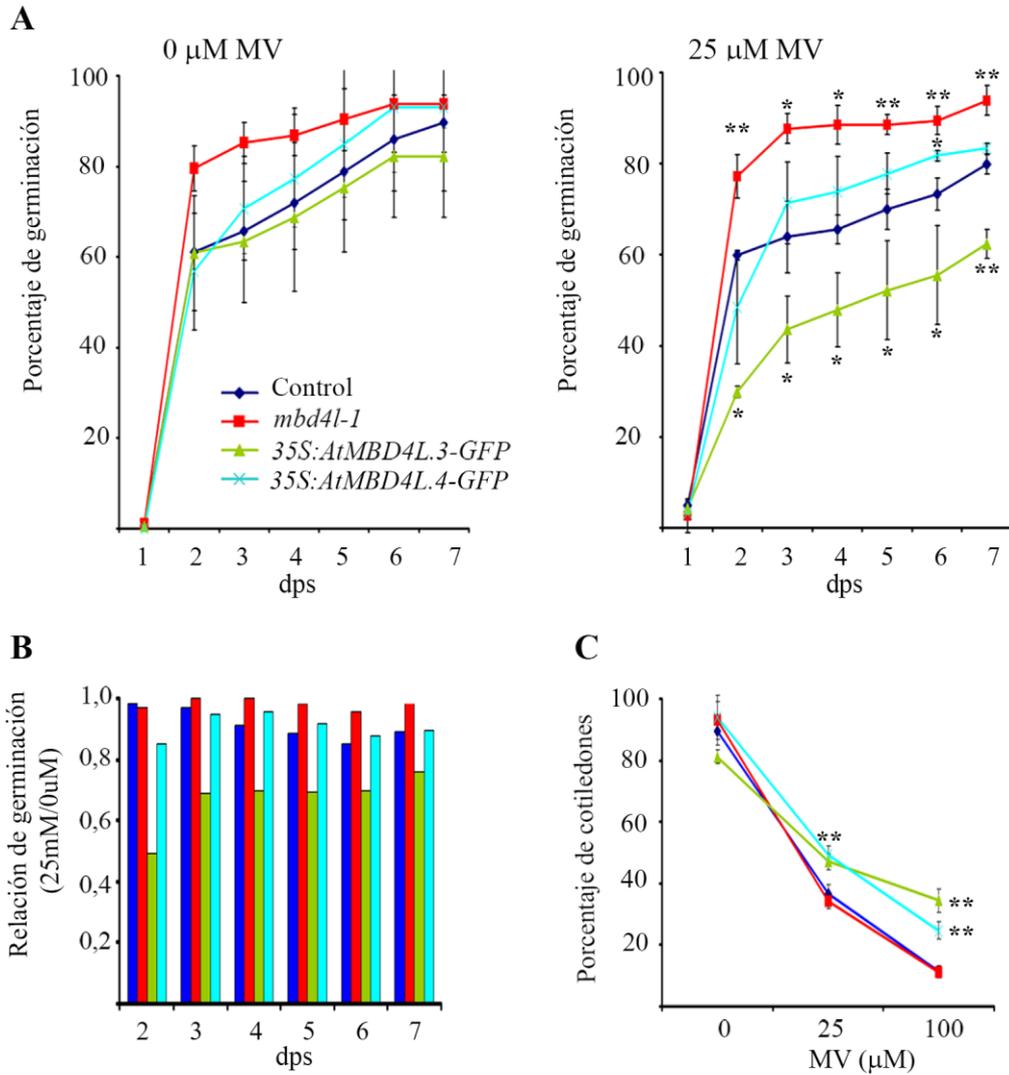


Figura 35. *AtMBD4L* afecta la respuesta al estrés oxidativo durante la germinación. A) Porcentaje de germinación de plantas *35S:GFP* (control), *mbd4l-1* y *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* en medio de crecimiento MS con 0 y 25 μM de metil viológeno (MV). B) Relación entre porcentaje de germinación de las plantas descritas en A crecidas en 25 μM y 0 μM de MV. C) Porcentaje de plantas con cotiledones verdes germinadas en MS suplementado con 0, 25 y 100 μM de MV. Los valores representan la media \pm desvío estándar ($n \geq 100$). * y **:diferencias significativas entre plantas control y *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* o *35S:AtMBD4L.4-GFP* (Test *t*, *: $p < 0,01$ y **: $p < 0,001$).

Posteriormente se analizó la capacidad de emitir cotiledones en condiciones de estrés oxidativo para cada una de las plantas a los 7 dps. Para todas las plantas dicha capacidad se vio afectada en tratamientos con MV. Sin embargo, ambas líneas sobre-expresantes para *AtMBD4L* crecidas con 25 μM de MV mostraron mayor porcentaje de plantas con cotiledones

respecto a plantas control. Además, con mayores concentraciones del químico, se observó que el 34,45 % de las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* fueron capaces de desarrollar cotiledones, mientras sólo el 24,64 % de las plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP*.

En conjunto los resultados sugieren que MBD4L3 afectaría negativamente la germinación bajo estrés oxidativo, mientras que tanto MBD4L3 como MBD4L4 podrían jugar un rol importante en la tolerancia al estrés oxidativo después de la germinación en la etapa de desarrollo de cotiledones.

III.2.1.2 .Plantas adultas

Para analizar si MBD4L afecta la resistencia al estrés oxidativo en etapas avanzadas de desarrollo, hojas de plantas de 4 semanas que habían sido germinadas en condiciones normales y crecidas en tierra se trataron con diferentes concentraciones de MV. Las hojas de plantas *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L3-GFP*, *35S:AtMBD4L4-GFP* y control fueron colocadas en soluciones con diferentes concentraciones de MV durante 24 hs en ciclos de 8 h luz/ 16 h oscuridad. No se observaron diferencias en la respuesta al tratamiento con el químico entre las plantas salvajes *Ws* y *35S:GFP*. . Además, las plantas *mbd4l-1* no presentaron mayores diferencias respecto a plantas salvajes en las concentraciones de MV analizadas, aunque el tejido de las hojas de plantas mutantes tratadas con 100 μ M parecieran desarrollar mayor lesión que las plantas control en la misma condición (Fig. 36A).

Por su parte, las dos plantas sobre-expresantes para *AtMBD4L* presentaron una marcada resistencia al estrés oxidativo, siendo claramente visible con altas concentraciones de MV (Fig. 36A). Además, las plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* mostraron menor daño en el tejido después del tratamiento respecto a las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP*, sugiriendo que MBD4L4 podría tener mayor incidencia en la respuesta al estrés oxidativo generado por el MV.

Por otra parte, las hojas de plantas crecidas en condiciones normales fueron expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 durante 6 horas.

Las hojas de plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* mostraron mayor tolerancia al tratamiento con H_2O_2 que las hojas de plantas control (Fig. 36B). Además, el daño observado en el tejido de la hoja de la planta *35S:AtMBD4L.4-GFP* es levemente menor que el que alcanza la hoja de *35S:AtMBD4L.3-GFP*.

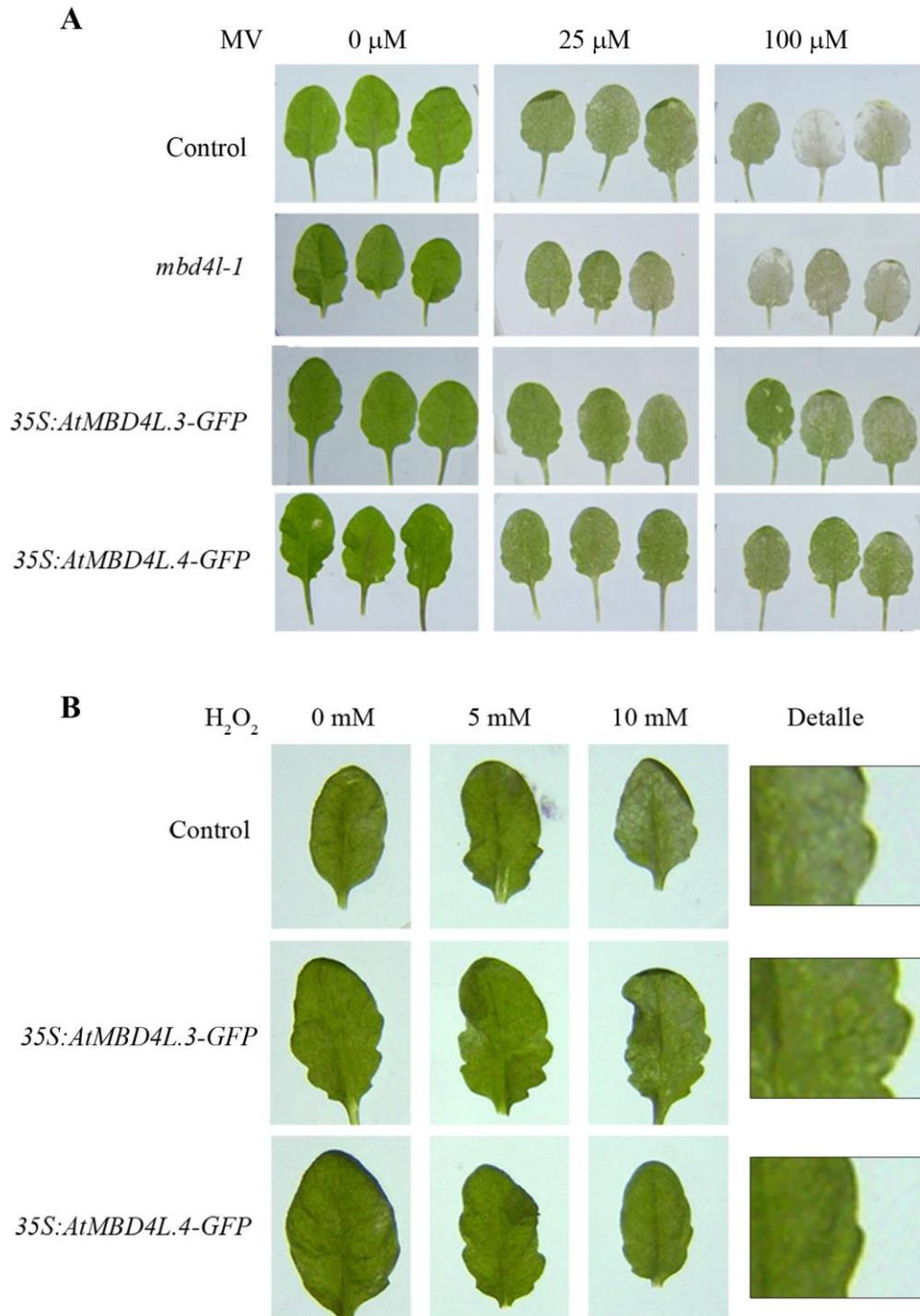


Figura 36. *AtMBD4L* afecta las respuestas a estrés oxidativo en estadio de plantas adultas. A) Las hojas de plantas control, *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* de 4 semanas crecidas en condiciones normales fueron tratadas con 0, 25 y 100 μM de MV durante 24 horas. Resultados similares se obtuvieron en experimentos independientes. B) Tratamientos con H_2O_2 sobre hojas de plantas control, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP*. Las hojas fueron tratadas con 0, 5 y 10 mM de H_2O_2 y colectadas 6 hpt.

En síntesis, durante la germinación en condiciones de estrés salino la sobre-expresión del transcripto *AtMBD4L.3* resulta negativa. Sin embargo, después de la germinación las plantas que sobre-expresan ambos transcriptos presentan mayor capacidad de desarrollar cotiledones que las plantas control en condiciones de estrés. Asimismo, en etapas tardías de desarrollo la sobre expresión tanto de *AtMBD4L.3* como de *AtMBD4L.4*, principalmente esta última, generaron mayor tolerancia al MV y al H₂O₂, sugiriendo que ambas isoformas de MBD4L favorecen la tolerancia al daño oxidativo a partir de las 6 horas de tratamiento, aunque con diferente nivel de contribución.

III.2.2 MBD4L en estrés salino

III.2.2.1 Germinación y plántulas

Para analizar si MBD4L afecta la respuesta a otro tipo de estrés, se evaluaron los fenotipos de plantas mutantes y sobre-expresantes de *AtMBD4L* expuestas a salinidad. Inicialmente determinamos el porcentaje de germinación de plantas *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* en medio MS suplementados con NaCl, considerando plantas germinadas aquellas con la raíz primaria fuera de la cubierta de la semilla.

Las plantas salvajes Ws y *35S:GFP* fueron sembradas como control. No se observaron diferencias en la germinación entre ambas plantas con o sin NaCl. Las plantas mutantes y ambas líneas sobre-expresantes no presentaron problemas de germinación en medio MS sin sal, ya que todas alcanzaron una germinación superior al 87% a los 7 dps (Fig. 37A). En ausencia de NaCl el inicio de la germinación estuvo levemente favorecido en las mutantes (Fig. 37A; 2 dps).

En presencia de NaCl, la germinación fue similar, o incluso algo mayor (6 y 7 dps) en plantas *mbd4l-1* respecto a plantas control (Fig. 37A-B). Por su parte, las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* presentaron una germinación tardía respecto a plantas control en esa condición (Fig. 37A-B). Sólo el 50,7 % y el 30,7% de las plantas que sobre expresan *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*, respectivamente germinaron 7 dps (Fig 37A). Además, las plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* mostraron mayor susceptibilidad a la sal durante esta etapa del crecimiento. Este resultado sugiere, por un lado que la expresión de ambos transcriptos contribuyen negativamente durante la germinación en salinidad, y por otro lado,

que la sobre-expresión de *AtMBD4L.4* genera un efecto más negativo que la de *AtMBD4L.3* en esta condición (Fig. 37B).

Por otro lado, para conocer la supervivencia de las plántulas bajo estrés salino las mismas fueron sembradas y crecidas durante 20 días en cajas de Petri con diferentes concentraciones de NaCl. En condición basal (0 mM de NaCl) las plantas no mostraron diferencias en el crecimiento (Fig. 37C). En condiciones de salinidad, las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* fueron capaces de sobrevivir manteniendo cotiledones verdes, mientras que las plantas salvajes y *mbd4l-1* mostraron susceptibilidad (Fig. 37C). Esto indica que aunque la sobre-expresión de *AtMBD4L* no resulta favorable durante la germinación, sí lo es durante el desarrollo de la plántula.

III.2.2.2 Plantas adultas

Plantas de 3 semanas germinadas en condiciones normales fueron sometidas a 2 riegos consecutivos de 300 mM de NaCl y luego mantenidas 10 días en condiciones normales. Las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* mantuvieron sus hojas verdes y continuaron su crecimiento luego de tratamiento con NaCl, mientras que las plantas control no se recuperaron luego del estrés (Fig. 37C).

En síntesis, las plantas *mbd4l-1* mostraron un porcentaje de germinación levemente mayor en condiciones de estrés oxidativo y salinidad. La germinación de las plantas que sobre-expresan ambos transcritos de *AtMBD4L* fue afectada en estas condiciones. En tratamientos con MV las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* mostraron menor porcentaje de germinación, mientras que las plantas *35S:AtMBD4L.4-GFP* presentaron mayor susceptibilidad a la salinidad durante la germinación. Los resultados indican que *AtMBD4L* no participa en la germinación bajo estrés, incluso la expresión de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* resulta desfavorable en condiciones oxidativas y de salinidad, respectivamente. En estadios más avanzados de desarrollo, la sobre-expresión de ambos transcritos aumenta la tolerancia a MV, H₂O₂ y NaCl, siendo la expresión de *AtMBD4L.4* la mayor responsable de la supervivencia de las plantas en estrés oxidativo.

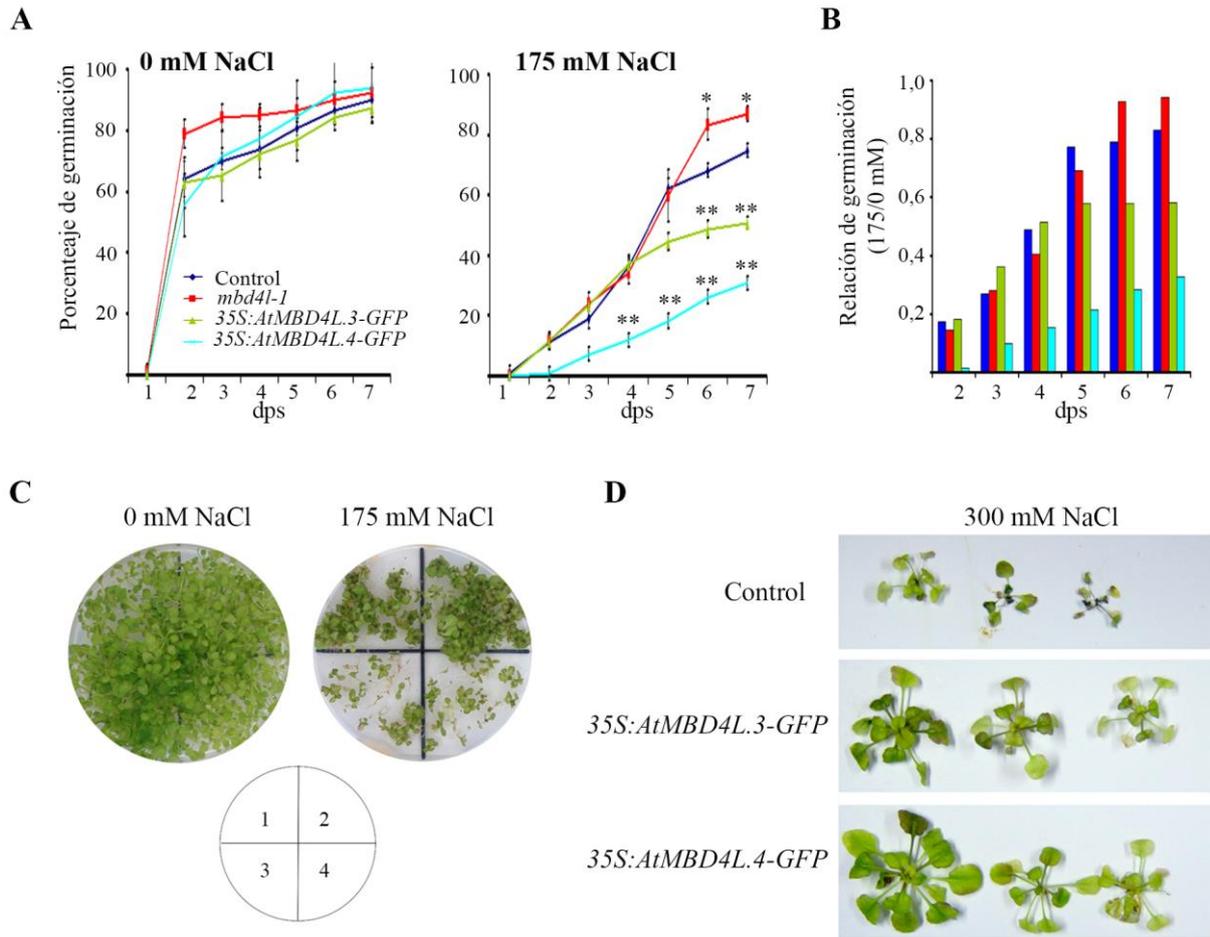


Figura 37. *AtMBD4L* aumenta la tolerancia a salinidad. A) Porcentaje de germinación de plantas *35S:GFP* (control), *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* en medio de crecimiento MS con 0 y 175 mM de NaCl durante los primeros 7 días post siembra (dps). Los valores representan la media \pm desvío estándar ($n \geq 100$). * y **:diferencias significativas entre plantas control y *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* o *35S:AtMBD4L.4-GFP* (Test *t*, *: $p < 0,01$ y **: $p < 0,001$). B) Relación entre porcentajes de germinación de plantas crecidas en 25 μ M y 0 μ M de MV. C) Crecimiento y supervivencia de plantas control (4), *mbd4l-1* (3), *35S:AtMBD4L.3-GFP* (1) y *35S:AtMBD4L.4-GFP* (2) en medio MS suplementado con 0 y 175 mM NaCl durante 30 días. Aproximadamente el mismo número de semillas fueron depositados para cada planta en cada una de las placas. D) Tres plantas de 3 semanas crecidas en condiciones normales, regadas dos veces consecutivas con 300 mM de NaCl y recuperadas durante 10 días.

III.3 Participación de MBD4L en el sistema BER

Se desconoce el mecanismo por el cual *AtMBD4L* contribuye al estrés abióticos analizados. Debido a su actividad DNA glicosilasa, se especula que MBD4L podría reparar mutaciones en el genoma que surgen como resultado de los mismos.

Analizando el nivel de los transcriptos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* en hojas adultas de plantas Col-0 tratadas con MV (5 μ M; 6 horas). no se observaron aumentos significativos de éstos en esa condición. En tres experimentos independientes una disminución transcripcional de *AtMBD4L.3* fue acompañada de un aumento de *AtMBD4L.4* 6 horas luego de la aplicación de MV (Fig. 38A).

Considerando que en estrés MBD4L podría actuar junto a enzimas del sistema BER que participan aguas debajo de la escisión de la base mutada, analizamos el nivel transcripcional de APURINIC ENDONUCLEASE-REDOX (ARP) y de DNA LIGASE I de Arabidopsis (*AtLIG1*), dos genes que codifican para enzimas de este sistema. ARP es la principal endonucleasa encargada de generar cortes del enlace fosfodiéster luego de la acción de DNA glicosilasas monofuncionales o modificar los extremos productos de la actividad liasa de las DNA glicosilasas bifuncionales (Córdoba-Cañero et al., 2011). *AtLIG1* es la enzima con mayor actividad ligasa en extractos celulares de Arabidopsis (Córdoba-Cañero y col., 2011). Cabe destacar que la inducción transcripcional de ambos genes ha sido reportada en condiciones de estrés oxidativo en plantas de Arabidopsis que sobre-expresan *AtOGG1* (Chen y col., 2012).

Ensayos de RT-PCR mostraron una leve inducción basal de dichos genes en plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* (Fig. 38B), mientras que plantas *mbd4l-1* no mostraron cambios transcripcionales. El aumento transcripcional de ambos genes podría sugerir acumulación de estas proteínas en plantas con mayor cantidad de MBD4L. La mutante no muestra cambios en los niveles de transcriptos que codifican para estas proteínas, sugiriendo que un nivel disminuído de MBD4L no alteraría la función de las mismas y por ende de dicho sistema de reparación.

Por otra parte, dos genes que se activan transcripcionalmente en respuesta a la presencia de DNA dañado son *AtRAD51* y *POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE 2 (AtPARP2)*. *AtRAD51*, el gen de Arabidopsis homólogo a *RAD51* de levaduras, juega un papel importante en la recombinación homóloga de DNA durante la reparación de roturas de doble cadena (Pradillo y col., 2012), mientras que *AtPARP2* participa en la reparación de cortes de doble hebra en el DNA y se induce durante estrés genotóxico (Doucet-Chabeud y col., 2001). El nivel transcripcional de estos dos genes se analizó en plantas con niveles alterados de

AtMBD4L. Las plantas *mbd4l-1* mostraron inducción de ambos genes. Por su parte, las plantas *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP* presentaron un nivel transcripcional de *RAD51* levemente reducido, respecto a plantas control (Fig. 37C). Además, no se observaron cambios transcripcionales en *PARP2* en ninguna de estas plantas. Estos resultados preliminares sugieren que MBD4L podría actuar junto a otros componentes del sistema BER y bajo estrés la DNA glicosilasa podría contribuir a reparar las mutaciones generadas en el DNA.

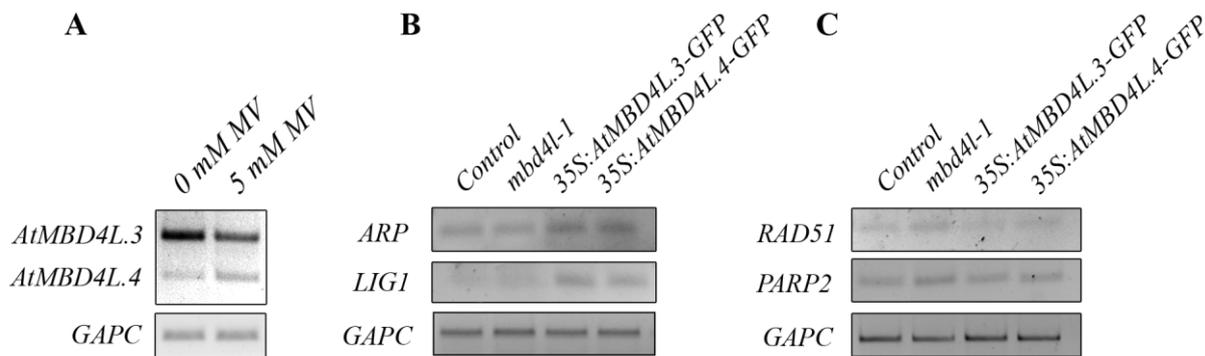


Figura 38. *AtMBD4L* y su posible asociación con componentes del sistema BER. A) Niveles de transcritos de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* en hojas de plantas Col-0 adultas tratadas con 5 μ M de MV durante 6 horas. B) Nivel de transcritos de *ARP* y *LIG1*, dos genes implicados en el sistema BER aguas debajo de la acción de DNA glicosilasas. C) Expresión de los genes sensibles al daño en el DNA *RAD51* y *PARP2*. En todos los casos el gen *GAPC* se utilizó como control de carga.

Resumiendo, *AtMBD4L* participa en respuestas al estrés biótico y abiótico. En infecciones con *P. syringae* pv. *tomato* favorece el crecimiento del patógeno en plantas de *Arabidopsis*. En condiciones de estrés oxidativo y salino, aumenta la tolerancia a MV, H₂O₂ y NaCl en estados avanzados de desarrollo. Un leve aumento de la expresión de genes que participan en el sistema BER se detecta en plantas sobre-expresantes para *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*. Asimismo, un aumento de expresión de *RAD51* se observa en plantas *mbd4l-1*. Por esto MBD4L podría contribuir al estrés abiótico participando del sistema BER.

DISCUSIÓN

MBD4L es una HhH-DNA glicosilasa de Arabidopsis homóloga a hMBD4

Este trabajo de Tesis doctoral constituye la primera caracterización estructural y funcional del gen *AtMBD4L* (*At3g07930*), un gen de Arabidopsis homólogo a hMBD4. La proteína MBD4L fue seleccionada a partir de la homología con hMBD4, en búsqueda de un candidato capaz de participar en reacciones de decondensación y demetilación activa que sufre la heterocromatina centromérica de Arabidopsis luego del ataque de *Pst*, considerando la ausencia de proteínas homólogas a TDG (enzima que conjuntamente con MBD4 cataliza la demetilación del DNA en animales) en Arabidopsis. Los estudios realizados *in silico* mostraron la presencia de un dominio DNA glicosilasa con estructura de α hélices y la presencia del Asp indispensable para la actividad catalítica ubicado en un bolsillo hidrofóbico (Fig. 8-9), sugiriendo que MBD4L sería una enzima monofuncional de la superfamilia HhH-GPD. Además, el análisis filogenético de dominios de los miembros de la superfamilia HhH-GPD de Arabidopsis, mostró baja homología, siendo MBD4L única en su grupo (Fig. 10C, pág. 52). Esto sugiere que en esta superfamilia no existirían enzimas con funciones redundantes a MBD4L. El dominio HhH-GPD presentó mayor nivel de conservación con DNA glicosilasas de otras especies vegetales, bacterias y animales que de Arabidopsis (Fig. 11, pág. 55), sugiriendo que MBD4L es única en Arabidopsis. Sustentando los resultados de este trabajo sobre estructura y conservación del dominio DNA glicosilasa de MBD4L, recientemente Ramiro-Merina y colaboradores (2013) demostraron la actividad DNA glicosilasa *in vitro* de la proteína recombinante MBD4L sobre U, T y 5-hmU, productos de la deaminación de la C, 5-mC y 5-hmC, respectivamente.

MBD4L participa en la decondensación de la heterocromatina centromérica del genoma de Arabidopsis que ocurre durante la infección con *P. syringae* pv. *tomato*

La decondensación reducida de la heterocromatina centromérica generada por el ataque de la bacteria en plantas *mbd4l-1* (Fig. 13, pág. 59) indica que *AtMBD4L* participa en este fenómeno. Esto también fue evidenciado, aunque en menor grado, en plantas *siAtMBD4L* (Fig. 14, pág. 61), donde se observó una relación entre el nivel de expresión de *AtMBD4L* y el grado de relajación de la cromatina. La decondensación parcial y no total observada en plantas *mbd4l-1* (Fig. 13) podría deberse al transcripto remanente en plantas mutantes no nulas o a la presencia de alguna enzima con actividad redundante a MBD4L, aunque por el

momento no hay reportes de proteínas involucradas en dicho proceso. HEAT-INTOLERANT-4 (HIT4) podría eventualmente realizar esta función, ya que actúa en la decondensación de CCs inducida por altas temperaturas sin generar modificaciones de histonas y metilación al DNA (Pecinka y col., 2009; Tittel-Elmer y col., 2010; Wang y col., 2013). HIT4 constituye la única enzima reportada que presenta un rol fundamental en la decondensación de la heterocromatina centromérica durante la exposición de plantas a altas temperaturas (Wang y col., 2013). Aunque no presenta dominios ni función caracterizada, HIT4 es una enzima nuclear exclusiva de plantas, aunque muy conservada entre diversas especies vegetales sin proteínas con secuencias homólogas en *Arabidopsis*. MBD4L y HIT4 son las primeras proteínas de plantas que afectan la decondensación de la heterocromatina centromérica en condiciones de estrés.

Se desconoce el mecanismo por el cual MBD4L actuaría sobre la heterocromatina centromérica, promoviendo la decondensación durante la infección con el patógeno bacteriano. Esta DNA glicosilasa podría formar parte de un complejo enzimático que promueva la apertura de la cromatina en infección, pero no en condición basal (Fig. 39).

Numerosas proteínas como la ATPasa MORC (Moissiardet y col., 2012), una proteína de unión a la metil citosina VARIANT IN METHYLATION 1 (Woo y col., 2007) y H3K27 monometiltransferasas ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED PROTEIN 5 Y 6 (Jacob y col., 2009) aportan a la condensación centromérica en condición basal, pero esto no fue estudiado en infección bacteriana. Se desconoce si alguna de ellas actuaría con MBD4L en tejidos infectados.

Por otro lado, MBD4L podría catalizar la decondensación de la heterocromatina centromérica, favoreciendo la apertura de la cromatina por demetilación del DNA (Fig. 39). Existen pocos antecedentes de enzimas capaces de participar en ambos procesos. A pesar que ROS1 no presenta blancos centroméricos para la demetilación (Penterman y col. 2007), se reportó que participa en la demetilación activa y en la decondensación de CCs de plántulas de 3 a 5 días post-germinación (Douet y col., 2008). Los resultados de este trabajo indican que ROS1, DML2 y DML3 no participan en procesos relacionados con la decondensación de CCs en infección con *P. syringae* pv. *tomato* (Fig. 15, pág. 63), lo cual resulta consistente con la ausencia de blancos centroméricos reportados anteriormente para estas enzimas (Penterman y col. 2007; Qian y col., 2012). En *Arabidopsis*, los centrómeros son las regiones con mayor

nivel de metilación del genoma y aparentemente no serían afectados por las 5-mC DNA glicosilasas descritas en plantas adultas.

Aunque MBD4L no cataliza la remoción de 5-mC ni 5-hmC (Ramiro-Merina y col., 2013), esta enzima podría remover derivados de estas bases generados por deaminación, tales como T y 5-hmU, respectivamente. En animales, este proceso es catalizado por TDG y MBD4 (Sjolund y col., 2013). En plantas la demetilación por deaminación no fue reportada hasta el momento, mientras que la demetilación por oxidación (remoción de 5-hmC derivada de 5-mC) ha sido más estudiada. La presencia de 5-hmC fue detectada recientemente en el genoma de *Arabidopsis* (Yao y col., 2012) y la remoción *in vitro* de dicho sustrato catalizada por ROS1 y DME también fue descrita (Jang y col., 2014).

Ninguna de las DNA glicosilasa estudiadas en *Arabidopsis*, excepto MBD4L, presenta actividad sobre 5-hmU *in vitro*, lo que sugiere que dicha enzima podría ser responsable de la remoción de derivados de 5-mC generados por oxidación y deaminación, de manera similar a MBD4 en mamíferos. La remoción activa de marcas represivas durante la infección bacteriana podría estar asociada con la decondensación de CCs observada durante el ataque del patógeno, en la cual interviene MBD4L (Fig. 39). La participación de MBD4L y/o de las 5-mC DNA glicosilasas en la demetilación activa del DNA centromérico durante la infección con *P. syringae* pv. *tomato* no fue analizada exhaustivamente hasta el momento. Sólo se realizaron experimentos de *Southern blot* con enzimas sensibles a metilación que fueron revelados con sondas centroméricas. En esos experimentos no se detectó diferencias de metilación entre plantas Ws y *mbd4l-1* infectadas. Sin embargo, se requieren métodos más sensibles para evaluar esto, ya que sólo se abarcó una base del sitio de restricción y un solo tipo de repeticiones centroméricas. Por otro lado, análisis inmunocitoquímicos usando anticuerpos anti 5-mC y anti 5-hmC en plantas mutantes en condiciones basales e infectadas, ayudarían a dilucidar la participación de dichas enzimas en la demetilación activa del genoma de *Arabidopsis* en condiciones de infección. Además, resultaría importante para entender si la decondensación y la demetilación de la heterocromatina son fenómenos necesariamente relacionados u ocurren de manera independientes durante la infección.

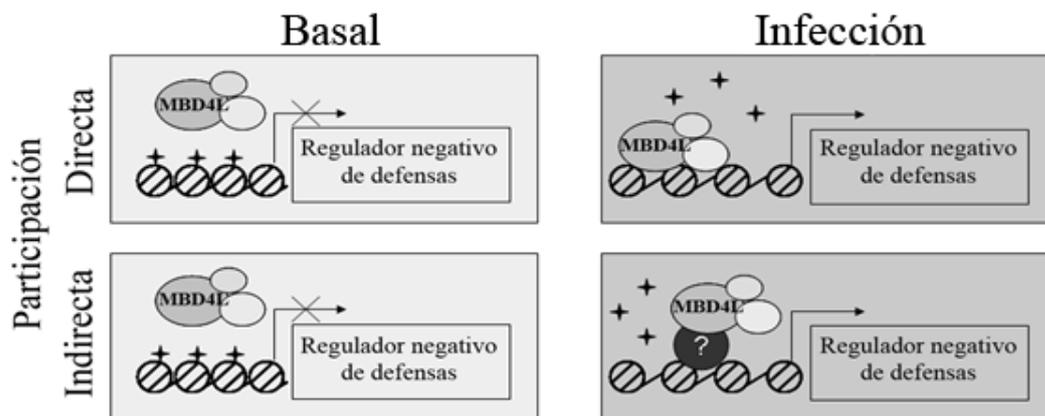


Figura 39. Posible modelo de acción de MBD4L sobre la cromatina centromérica en condiciones de infección con *P. syringae* pv. *tomato*. MBD4L participa de la decondensación centromérica, regulando directamente la demetilación del DNA a través de demetilación por deaminación u oxidación-deaminación (Participación Directa).

MBD4L cataliza la relajación de la heterocromatina centromérica durante la infección sin intervenir en la demetilación del DNA centromérico (Participación Indirecta), uniéndose o actuando con alguna enzima capaz de demetilar. En ambos modelos MBD4L activaría transcripcionalmente un regulador negativo de las defensas, propiciando el crecimiento del patógeno en la planta. Las estrellas representan T o 5-hmU, productos de la deaminación de 5-mC y 5-hmC, respectivamente.

***AtMBD4L* es funcional y presenta expresión regulada espacial y temporalmente**

Este trabajo de Tesis analiza los productos derivados de la expresión de *AtMBD4L*. Mientras que los transcritos predichos por TAIR (Fig. 16, pág. 65) no fueron observados en los tejidos analizados, en este trabajo se describe que dicho gen codifica para dos transcritos alternativos. *AtMBD4L.3* deriva aparentemente de una retención del primer intrón y *AtMBD4L.4* pierde una secuencia interna de *AtMBD4L.3* correspondiente a un intrón inadvertido anteriormente (Fig. 17, pág. 67). Además, un estudio del sitio de *splicing* predicho para *At3g07930.1* y *At3g07930.2* no mostró coincidencias significativas con las secuencias consensos del sitio donador y aceptor descriptas para *Arabidopsis*. En plantas la retención de un intrón constituye el evento frecuente durante el *splicing* alternativo, afectando al 40 % de los genes de *Arabidopsis*, 33 % de los genes de arroz y 35 % de los genes de maíz afectado por

splicing (Barbazuk y col., 2008; Reddy y col., 2012). En cambio, en animales este evento sólo se observa en el 9 % de los genes afectados por dicho proceso (Kim y col., 2007).

Alguno de los genes que codifican para HhH-GPD DNA glicosilasas en animales se ven afectados por *splicing* alternativo (Owen y col., 2007; Nishioka y col., 1999; Ohtsubo y col., 2000; Ohtsubo y col., 2000). En la mayoría de los casos las variantes de *splicing* se expresan de manera diferencial durante el desarrollo. En plantas, a pesar que 60 % de los genes que presentan intrones están afectados por *splicing* alternativo (Reddy y col., 2013), poco se conoce sobre la generación y expresión diferencial de transcritos alternativos de genes que codifican para DNA glicosilasas (Ohtsubo y col., 1998; Murphy y Gao., 2001; Scortecci y col., 2007). La expresión diferencial de los transcritos alternativos podría permitir la actividad enzimática de dichos productos en diferentes tejidos, condiciones o estadios del desarrollo, o bien en diferentes compartimentos celulares.

Los resultados de RT-PCR y análisis del promotor de *AtMBD4L* indican por un lado que los transcritos alternativos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* presentan diferente nivel de expresión, siendo *AtMBD4L.3* el más abundante. Sin embargo, la relación de expresión de ambos transcritos alternativos en condición basal se mantiene en diversos tejidos, sugiriendo que la expresión del gen en los tejidos no está regulada por *splicing* alternativo, a pesar que este fenómeno resulta común en plantas (Iida y col., 2004). Sin embargo, ante la exposición a estrés oxidativo se observaron cambios diferenciales en la expresión de los mismos (Fig. 38A, pág. 108). Esto sugiere que el *splicing* alternativo participa en la regulación de ambos transcritos en condiciones de estrés. Este es un fenómeno que también fue descrito en plantas sometidas a altas temperaturas (Sugio y col., 2009; Matsukura y col., 2010; Liu y col., 2013) y estrés biótico (Zhang y Gassmann, 2007; Marone y col., 2013).

A través del análisis del promotor se observó una expresión baja y transitoria para *AtMBD4L*, siendo mayor en tejidos aéreos que en raíces, principalmente en etapas tardías del desarrollo, tales como la floración, desarrollo de frutos y senescencia (Fig. 18, pág. xx). Consistentemente, diversos resultados de experimentos realizados con micromatrices de Affymetrix (www.genevestigator.com) muestran un patrón de expresión similar a lo observado experimentalmente (Fig. 18 ; SII, pág. 141). De manera concordante con lo predicho a partir del análisis de elementos *cis* en el promotor de *AtMBD4L* (Tabla IV, pág. 71), la expresión de dicho gen fue observada en tejidos que presentan signos de deshidratación mayor o menor grado, como hojas senescentes, tejido de anteras y estigma de silicuas (Fig. 19, pág. 72). A diferencia de *AtMBD4L*, los genes *NTH1* (Gutman y Niyogi,

2009), *ROS1* (Gong y col., 2002), *DML2* y *DML3* (Ortega-Galisteo y col., 2008) presentan una expresión constitutiva.

La baja expresión del gen y su limitación a ciertos tejidos sugieren la presencia de otra/s enzima/s con sustrato similar al de MBD4L, capaz de actuar en tejidos donde la primera no se expresa basalmente. Como fue descrito recientemente por Ramiro-Merina y col (2013), MBD4L escinde U y T opuestos a G, con una alta actividad en 5-halógenos de uracilo (5-BrU, 5-fU), actividad media en U, y baja el 5-hmU, 5-hU y T. A juzgar por el análisis filogenético, dentro de la superfamilia HhH-GPD no existirían enzimas con actividad redundante a MBD4L. A pesar de eso, ROS1 y DME también catalizan la remoción de T:G, aunque con baja afinidad (Agius y col., 2006). Además, varios estudios muestran que ROS1 y DME presentan un patrón de expresión diferente al observado para MBD4L (Gong y col, 2002; Ortega-Galisteo y col., 2008; Choi y col., 2002; Schoft y col., 2011). Si bien hasta el momento no se han reportado DNA glicosilasas capaces de eliminar U modificados en *Arabidopsis*, la actividad de la DNA glicosilasa UNG sobre U fue demostrada *in vitro* (Córdoba-Cañero y col., 2010), aunque el patrón de expresión de *AtUNG* no ha sido analizado. Resulta necesaria la realización de nuevos estudios que permitan identificar una DNA glicosilasa con actividad similar a MBD4L, capaz de actuar en órganos donde *AtMBD4L* no se expresa.

A nivel proteico, los transcritos alternativos de *AtMBD4L* codifican para dos productos: MBD4L3 y MBD4L4 de 445 y 329 aminoácidos, respectivamente. Ambas proteínas difieren solo en el extremo amino, mientras que conservan intacto el dominio DNA glicosilasa (Fig. 21, pág. 74). La presencia de dos productos alternativos que mantienen intacto el dominio DNA glicosilasa fue descrito también para hMBD4 (Owen y col., 2007).

Ensayos *in vitro* realizados por Ramiro-Merina y col. (2013) con MBD4L completa recombinante y una proteína mutante, que sólo conserva la región C-terminal (dominio DNA glicosilasa), muestran que ambas proteínas son funcionales sobre los mismos sustratos, sugiriendo que la función está determinada por el dominio HhH-GPD. La forma más corta resultó más eficiente en la remoción de los sustratos ensayados. Considerando estos resultados, ambas variantes derivadas de *AtMBD4L*, MBD4L3 y MBD4L4, serían funcionales *in vivo*.

Como la mayoría de las DNA glicosilasas tanto animales como de *Arabidopsis* (Tabla II), ambas proteínas, MBD4L3 y MBD4L4 se localizan en el núcleo aunque difieren en la localización subnuclear. Esto podría determinar una función diferencial entre ambas enzimas.

Por otro lado y de acuerdo a los resultados obtenidos en plantas transgénicas mediante microscopía confocal y en ensayos de *Western blot*, tanto MBD4L3-GFP como MBD4L4-GFP parecen estar sujetas a una importante regulación post traduccional, mostrando un nivel de expresión muy bajo (Fig. 23-24, pág. 78-79), no detectable en extractos totales de proteínas (Fig. 26, pág. 81).

MBD4L participa en procesos de desarrollo

La ausencia de mutantes nulos o plantas completamente silenciadas viables y la observación de alteraciones fenotípicas en el crecimiento vegetativo y reproductivo de plantas *mbd4l-1*, sugieren que *AtMBD4L* es un gen fuertemente involucrado en procesos que regulan el desarrollo de Arabidopsis. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que *AtMBD4L* afectan el crecimiento de raíces y hojas, como así también en la floración, la dominancia apical y el desarrollo de frutos.

En mamíferos, ciertos defectos en el desarrollo que desencadenan distintos tipos de enfermedades fueron observados en organismos mutantes para algunas DNA glicosilasas y enzimas de reparación, sugiriendo que las mismas son importantes durante esta etapa, posiblemente catalizando la reparación de mutaciones del DNA (Krokan y Bjoras, 2013; Robertson y col., 2009). La ausencia de TDG resulta letal en estadio embrionario (Cortazar y col., 2011; Cortellino y col., 2011), mientras los ratones mutantes nulos para MBD4 son viables y fértiles, aunque presentan un aumento de transiciones C → T y anomalías en la división celular, formando tumores en diversos tejidos (Riccio y col., 1999).

En plantas, la participación de las DNA glicosilasas en procesos que regulan el desarrollo no fue estudiada en profundidad, principalmente por la falta de fenotipos aberrantes en plantas mutantes de estos genes durante el desarrollo (Córdoba-Cañero y col., 2010; Murphy, 2005; Gutman y Niyogi, 2009; Penterman y col., 2007). Solamente plantas mutantes *dme-1* y *ros1-1* presentan alteraciones en el desarrollo (Choi y col., 2002; Gong y col., 2002) (Tabla VI). Debido a que presentan diferencias en el patrón de expresión, *ROSI*, *DME* y *MBD4L* podrían tener diferentes efectos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, probablemente modulando distintos subconjuntos de genes.

Desarrollo vegetativo

Las hormonas vegetales, como auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno entre otras, son reguladores clave del desarrollo (Rubio y col., 2009). A pesar que experimentos de RT-PCR y GUS no mostraron expresión de *AtMBD4L* en raíces, una disminución del nivel transcripcional de ambos transcriptos alternativos de dicho gen afecta el crecimiento de la raíz primaria y generación de raíces secundarias. Esto sugiere que MBD4L podría intervenir en la generación, transporte o captación de una señal móvil, generada en otro tejido. El crecimiento reducido de raíces primarias (Fig. 28A, pág. 86) y el desarrollo temprano de raíces laterales en plantas con bajo nivel transcripcional de *AtMBD4L*, así como también una dominancia apical reducida en plantas *mbd4l-1* (Fig. 31A, pág. 91) sugieren la participación de dicho gen directa o indirectamente en la señalización de auxinas. Las auxinas juegan un rol central en el desarrollo de raíces (Petricka y col., 2012) y en el establecimiento de la dominancia apical, a través de la cual se inhibe la producción de yemas axilares y se determina la arquitectura de la planta (Leyser, 2003). Las plantas mutantes en *SHOOT ROOT* (*SHR*), gen responsable de la regulación postraducciona de transportadores de auxinas PIN-FORMED, presentan raíces principales cortas y mayor desarrollo de raíces laterales (Lucas y col., 2011), similar al fenotipo observado en plantas *mbd4l-1*. Por otra parte, estudios genéticos de dos mutantes *axr1-12* y *axr3-1*, con respuestas alteradas a auxinas demuestran el rol esencial de auxinas en la ramificación de *Arabidopsis*. Mientras que *axr1-12* presenta defectos en la señalización de auxinas y muestra mayor número de tallos de roseta (Leyser y col., 1993), plantas mutantes *axr3-1*, que resultan hipersensible a tratamientos con auxinas, presentan una marcada dominancia apical y menor longitud de raíces (Leyser, 1996). Por otro lado, una vía hormonal independiente a auxinas fue propuesta como activadora de la dominancia apical (Booker y col., 2004). Mutaciones en genes MORE AXILLARY BRANCHES (*MAX*), involucrados en la síntesis de una señal móvil derivada de carotenoides generan un fenotipo con numerosas varas florales (Stirnberg y col., 2002; Booker y col., 2004; Booker y col., 2005), similar al reportado para *mbd4l-1*. Dichos genes *MAX* parecen estar regulados epigenéticamente por *AtMBD9*, una acetiltransferasa de histonas, cuya mutante presenta disminución en la dominancia apical (Peng y col., 2006). El análisis de expresión de genes involucrados en la vía de auxinas y genes *MAX* en plantas *mbd4l-1* permitirá dilucidar si MBD4L participa del crecimiento de raíces y varas axilares regulando la vía de auxinas. Además, el estudio de fenotipos en plantas dobles y/o triples para *AtMBD4L*, *AXR* y *MAX* ayudará a establecer la vía a través de la que actuaría MBD4L en el desarrollo radicular.

Por otro lado, los resultados sugieren que *AtMBD4L* está implicado en el desarrollo de hojas, ya que las plantas mutantes *mbd4l-1* mostraron reducción en el tamaño de las hojas de roseta (Fig. 28B). La forma y el tamaño final de una hoja está determinado por la interacción entre la proliferación y la elongación de las células (Tsukaya, 2005; Horiguchi y col., 2006). Aunque aún no se conocen completamente las causas, la disminución en la proliferación de las células aparece generalmente acompañada de un aumento del volumen de las mismas, en un fenómeno que se conoce como compensación (Tsukaya, 2005). A pesar de esto, la compensación no es un fenómeno general. Plantas mutantes para ARABIDOPSIS SKP1-LIKE (Zhao y col., 1999); GROWTH FACTOR 5 (Horiguchi y col., 2005; HISTIDIN KINASE HOMOLOG (Nishimura y col., 2004) y AUXIN RESISTENT 1 (Lincoln y col., 1990), presentan tamaño reducido de hojas, determinado por disminución del número y no del tamaño de células, similar a lo observado en *mbd4l-1* (Fig. 28C-F). Esto sugiere que en plantas salvajes MBD4L podría afectar la división celular, pero no la expansión, actuando tempranamente en la morfogénesis de la hoja en Arabidopsis. De manera similar, MBD4 afecta la regulación de la división celular en diversos tejidos, generando tumores en ratones mutantes (Riccio y col., 1999; Bellacosa, 2001).

Desarrollo reproductivo

Los resultados obtenidos indican que *AtMBD4L* regula también el desarrollo reproductivo en Arabidopsis, particularmente el desarrollo de frutos y la floración. La presencia de frutos inmaduros, sin desarrollo de semillas en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L* indican que la expresión de este gen es importante en el desarrollo de embriones en algunas silicuas (Fig. 31B-C, pág. 91). De manera similar a lo observado en plantas *mbd4l-1* y líneas *siAtMBD4L*, la mutación del gen que codifica para el homólogo de MutL en Arabidopsis (*AtMLH1*) genera reducción significativa en la fertilidad (Dion y col., 2007). Además de formar parte del MMR, este gen previene la recombinación homóloga entre secuencias divergentes (Dion y col., 2007). En animales, la interacción entre MLH1 y MBD4 está bien documentada (Bellacosa y col., 1999), mientras que en plantas esta interacción fue predicha bioinformáticamente (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Sería interesante evaluar si MBD4L y AtMLH1 actúan conjuntamente durante el desarrollo de embriones manteniendo la integridad del genoma.

Además del desarrollo de frutos, *AtMBD4L* participa en la floración a través de la regulación del gen *FLC*. En Arabidopsis, la floración está regulada principalmente por la

expresión de *FLC* y *CO* (Deng y col., 2011), los cuales regulan a su vez otros genes, como *SOC1*, *FT* y *LFY* (Roux y col., 2006). La floración temprana reportada en plantas mutantes *mbd4l-1* es probablemente producida por la represión de *FLC* (Fig. 2, pág. 17) y consecuente activación de *SOC1*, pero no por la inducción de *CO*. Una leve reducción del transcripto de *FLC* fue observada en plantas *siAtMBD4L*, aunque el nivel de transcripto de *FLC* resulta suficiente para disparar la floración, sugiriendo una relación entre el nivel de transcripto de *AtMBD4L* y la activación de *FLC*. La regulación de este gen ocurre en múltiples niveles e implica tanto mecanismo genético como epigenético. Mutaciones en los genes de la biosíntesis de miRNAs incrementan el nivel transcripcional de *FLC*, generando una floración tardía (Schmitz y col., 2007). Por su parte, plantas mutantes de *AtMBD9* (Peng y col., 2006; Yaish y col., 2009), metiltransferasas ARABIDOPSIS Ash2 RELATIVE, Jiang y col., 2001), SET DOMAIN GROUP 25 (Berr y col., 2009), UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE26 (Schmitz y col., 2009) y en proteínas del complejo SWR1, responsable de la deposición de la variante H2A.Z (Choi y col., 2007) presentan floración temprana y nivel transcripcional reducido de *FLC*.

Por otro lado, la expresión de *FLC* está reprimida en plantas con bajos niveles de metilación del DNA, lo que resulta en floración temprana (Kakutani y col., 1996; Finnegan y col., 1996; Finnegan y col., 2005), aunque la secuencia de *FLC* ni de su promotor están metiladas basalmente (Zhang y col., 2006; Cokus y col., 2008). Sin embargo, plantas mutantes *Atmbd9* muestran una hipermetilación de promotor y región 5' de *FLC*, sugiriendo una remoción activa de la 5-mC y consecuente activación del gen. Debido a que *AtMBD9* no demetila el DNA, Yaish y col. (2009) proponen que dicha enzima podría reclutar una demetilasa, responsable de mantener activamente demetilado a dicho. Solamente la mutante puntual *ros1-1*, aunque no la mutante insersional *ros1-3* ni la triple mutante *ros1-3, dml2-1, dml3-1*, presentan floración anticipada (Gong y col., 2002). Sin embargo, nuestros resultados demostraron que ninguna de estas enzimas regula la expresión de *FLC*. Debido a que ninguna de las plantas mutantes de las DNA glicosilasas de Arabidopsis presenta floración temprana asociada a represión de *FLC*, proponemos que *MBD4L* podría actuar sobre este gen (Fig. 40). El análisis del patrón de metilación del promotor de *FLC* en plantas *mbd4l-1* que se encuentra actualmente en curso y permitirá determinar si *MBD4L* regula a *FLC* a través de demetilación activa de su promotor o de manera independiente de la misma.

Finalmente, los fenotipos observados en plantas *mbd4l-1* no se deben a la acumulación de epimutaciones, ya que se observan en las primeras generaciones y no sufren cambios durante las sucesivas autocruzas (Fig. 32, pág. 93). En plantas mutantes *ros1-1* las

anormalidades en el desarrollo son visibles a partir de la cuarta generación (Gong y col., 2002), mientras que en *ddm1-2* los fenotipos aberrantes se intensifican con las sucesivas generaciones (Kakutani y col., 1996).

En síntesis, *AtMBD4L* participa en procesos que regulan el crecimiento de raíces, la división celular en hojas, la dominancia apical, el desarrollo de frutos. Además, el gen regula el tiempo de floración, participando en la activación de *FLC*, posiblemente a través de demetilación del promotor de dicho gen (Fig. 40).

FLC sería un blanco de MBD4L y podría ser utilizado para dilucidar el mecanismo por el cual esta DNA glicosilasa regula la expresión de dicho gen. Asimismo definir el contexto molecular (tipo de C afectada) en este gen por MBD4L.

Por otro lado, experimentos de complementación de fenotipos por transformación de plantas *mbd4l-1* con constructos para cada una de las variantes del gen *AtMBD4L* ayudarán a conocer cuál es la contribución de cada isoforma de la enzima en los procesos mencionados anteriormente. Estos experimentos están siendo abordados en el laboratorio.

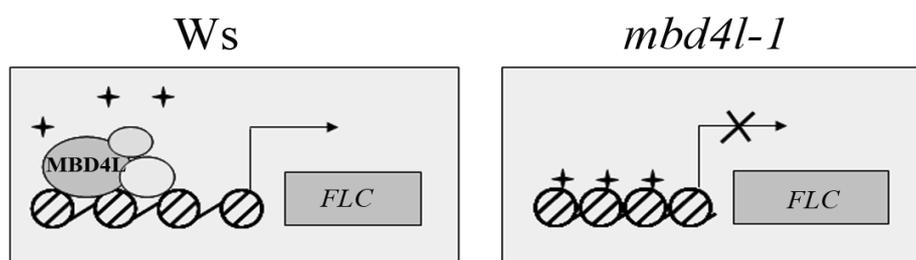


Figura 40. Putativas estructuras del promotor de *FLC* en presencia y ausencia de MBD4L. La activación de *FLC* podría estar mediada por demetilación del promotor regulada por MBD4L. Las estrellas representan T o 5-hmU, productos de la deaminación de 5-mC y 5-hmC, respectivamente.

MBD4L está involucrado en respuestas ante patógenos biótropos

Resultados de esta Tesis demuestran que MBD4L participa en respuestas de defensa contra *P. syringae* pv. *tomato*, contribuyendo al crecimiento del patógeno en la planta (Fig.

34, pág. 98). a través de un mecanismo desconocido. Durante la decondensación que ocurre en infección bacteriana, MBD4L podría actuar sobre las repeticiones centroméricas y transposones, que son ricas en dicha región, promoviendo la generación de algún RNA pequeño no codificante o la activación de un regulador negativo de la defensa que facilite el desarrollo del patógeno en la planta. MBD4L podría actuar mediando la demetilación de genes, transposones o repeticiones centroméricas activa alternativa (por deaminación y/u oxidación-deaminación de la 5-mC) de dicha región o de manera independiente de ésta (Fig. 39). Actualmente están en curso estudios para analizar si la expresión de repeticiones o transposones centroméricos se ven afectados por un nivel reducido de ambos transcriptos alternativos de *AtMBD4L* durante la infección.

MBD4L participa en respuestas al estrés abiótico

MBD4L favorece la tolerancia a estrés oxidativo y salino durante el crecimiento de las plantas. La participación de DNA glicosilasas en respuestas a estrés abiótico ha sido reportada previamente. En humanos, MBD4 se acumula y estabiliza luego de tratamientos con H₂O₂, contribuyendo a la tolerancia al estrés oxidativo (Laget y col., 2014). En Arabidopsis, plantas mutantes para ROS1 son más sensibles a agentes genotóxicos como MMS y H₂O₂ (Gong y col., 2002). Además, las plantas mutantes *ros1-1* son ligeramente sensibles a UV-B y acumulan más estrés oxidativo y fotoproductos que plantas control luego del tratamiento con UV-B (Qüesta y col., 2013). Estos resultados sugieren que ROS1 participa de la reparación del daño ocasionado por estrés oxidativo en el DNA. Por otro lado, AtOGG1 participa de procesos relacionados con diferentes tipos de estrés abiótico. Aunque la deficiencia de *AtOGG1* no genera fenotipos aberrantes en condiciones adversas, probablemente debido a la presencia de otras enzimas con actividad redundante (Murphy, 2005), la sobre-expresión del mismo genera tolerancia incrementada a MV, NaCl, manitol y altas temperaturas durante la germinación e inducción del sistema BER. Esto muestra la participación de AtOGG1 en la reparación del DNA dañado *in vivo* (Chen y col., 2012).

La sobre-expresión de *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4* no resulta favorable durante la germinación de las semillas bajo condiciones de estrés oxidativo y salino (Fig. 35 y 37A, pág. 101 y 106) y la reducción de la enzima incrementa la tasa de germinación en estrés. Esto sugiere que durante esta etapa del desarrollo y estas condiciones MBD4L podría contribuir

negativamente a la germinación. De manera similar, DML3 contribuye negativamente a la germinación en diferentes condiciones de estrés (Kim y col., 2010).

Sin embargo, durante etapas más avanzadas de desarrollo la sobre-expresión de ambos transcritos alternativos de *AtMBD4L* generan tolerancia al estrés oxidativo y salino (Fig. 36A-B y 37B-C, pág. 103 y 106). El aporte de *AtMBD4L.4* resultó ser mayor principalmente en la tolerancia al estrés oxidativo. Esto es concordante con el aumento en el nivel transcripcional observado para *AtMBD4L.4* luego de tratamientos con MV (Fig. 38A, pág. 108) y sugiere una actividad diferencial para ambas isoformas en condiciones de estrés oxidativo.

Poco se conoce sobre los mecanismos por el cual las DNA glicosilasas favorecen la tolerancia a diferentes tipos de estrés. La reparación de daños generados en el DNA durante el estrés aparece como la causa más probable (David y col., 2007). En células de mamíferos, MBD4 conjuntamente con DNMT1 son reclutadas a islas con metilación CpG durante tratamientos con H₂O₂. Aunque el mecanismo por el cual MBD4 contribuye a la tolerancia del estrés oxidativo en células de mamíferos no ha sido dilucidado aún, Laget y col. (2014) propone que MBD4 podría participar en la eliminación de bases dañadas, restauración de la estructura de la cromatina original, prevención de la hipermetilación de islas CpG por DNMT1, restablecimiento del patrón de metilación CpG en el genoma mediante la reparación y re-metilación. En animales, hace tiempo se describió que la deaminación de bases del DNA aumenta como consecuencia de la acción de los radicales libres, constituyendo una porción relativamente pequeña del daño oxidativo total inducido por ROS (Kon, 2002). Aunque la deaminación de bases es un fenómeno que ocurre en plantas, el incremento de este proceso por ROS no fue descrito hasta el momento. Sin embargo, MBD4L cataliza la remoción de U, T y 5-hmU, productos de deaminación de la C, 5-mC y 5-hmC, respectivamente (Ramiro-Merina y col., 2013). Los niveles de estos productos podrían incrementarse durante el estrés. En esta condición MBD4L actuaría reparando el genoma de *Arabidopsis* y previniendo la acumulación de daños generados por estrés oxidativo, a través del reclutamiento de las enzimas que participan en el sistema BER (Fig. 41). La mayor contribución de MBD4L4 podría estar relacionada con la mayor actividad de la versión más corta de la enzima recombinante, que sólo conserva el dominio DNA glicosilasa, descrita por Ramiro-Merina y col. (2013).

Aunque el mecanismo por el cual MBD4L genera tolerancia al estrés no se conoce, basado en la actividad DNA glicosilasa descrita *in vitro* para MBD4L, se propone que

MBD4L podría reparar las mutaciones del DNA ocasionadas por especies reactivas de oxígeno que se generan durante el estrés mediante el sistema BER (Fig. 41).

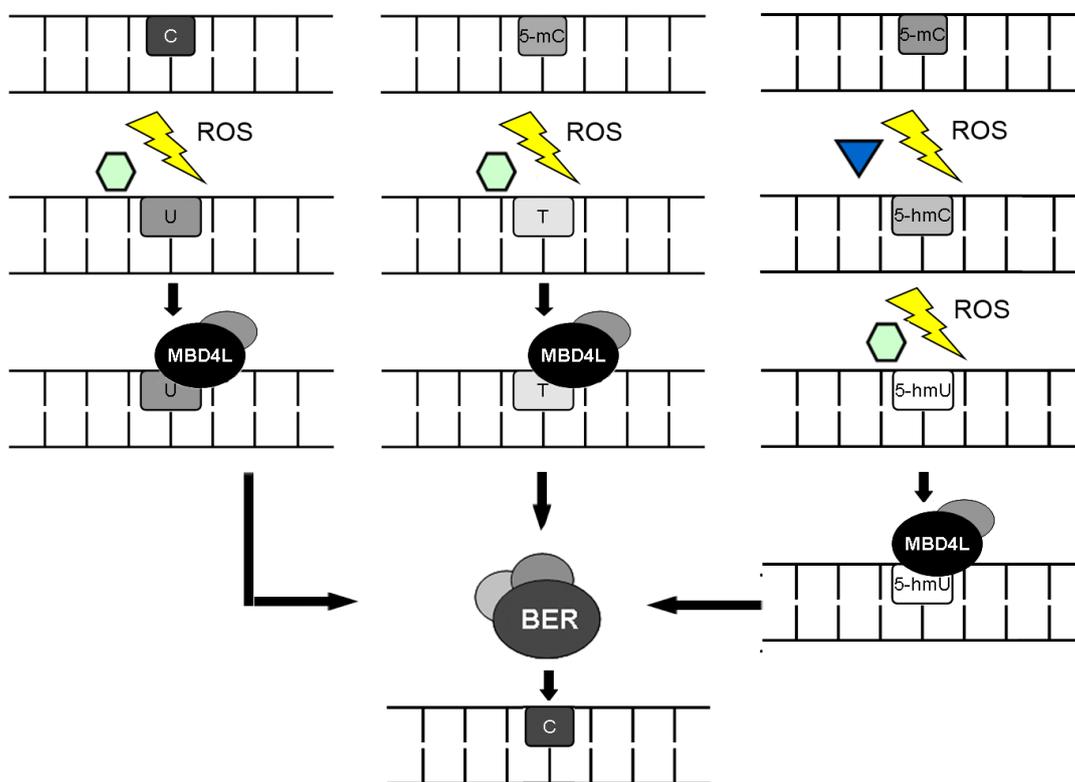


Figura 41. Posibles vías de reparación mediada por MBD4L durante condiciones de estrés. Esquema de las modificaciones de bases favorecidas posiblemente por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en condiciones de estrés salino y oxidativo. Los productos de la deaminación de la C (A) y 5-mC (B) y de la oxidación de la 5-mC y posterior deaminación de la 5-hmC (C) podrían ser reparadas por MBD4L y enzimas del sistema BER. Los hexágonos representan posibles enzimas con actividad deaminasa, aunque ninguna fue escrita en plantas hasta el momento. El triángulo representa alguna enzima con actividad similar a TET, aunque no existen homólogos estructurales en *Arabidopsis*.

CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis se caracterizó estructural y funcionalmente a *AtMBD4L*, un gen que codifica para una proteína homóloga a hMBD4 del cual no existen reportes previos en ningún modelo vegetal. El análisis estructural de dicho gen sugirió una función DNA glicosilasa monofuncional conservada en varios reinos, pero sin homólogos en Arabidopsis. Estos resultados obtenidos en paralelo y de manera independiente por Ramiro-Merina y col. (2013), conjuntamente con la actividad *in vitro* de la enzima. Por otro lado y de manera similar a MBD4 de mamíferos, los resultados obtenidos sugieren que dicho gen es multifuncional, ya que participa en diversos procesos que abarcan el desarrollo (vegetativo y reproductivo) y respuestas desencadenadas por estrés biótico y abiótico.

La floración temprana dada por la represión de *FLC* en plantas mutantes *mbd4l-1*, sugieren que el mismo es un blanco de MBD4L. La demetilación activa del promotor de *FLC* fue reportada previamente (Yaish y col., 2009). Se propone que MBD4L podría actuar de manera directa demetilando el promotor de *FLC*, mediante un mecanismo mediado por deaminación, o bien de manera indirecta, participando de la relajación de la cromatina en dicha región y facilitando la demetilación. Experimentos que permitan analizar el estado de metilación del promotor de *FLC* en plantas con niveles reducidos de *AtMBD4L*, tales como tratamiento del DNA con bisulfito de sodio están en curso y permitirán dilucidar la participación de dicho gen en procesos de demetilación activa.

Durante la infección con *P. syringae* pv. *tomato*, MBD4L participa de la decondensación de CCs, afectando la estructura de la heterocromatina centromérica. Además, contribuye positivamente al crecimiento del patógeno en plantas de Arabidopsis. Las repeticiones centroméricas surgen como putativos blancos de MBD4L en condiciones de infección con patógenos. Por un lado, MBD4L podría participar en la demetilación de dichas repeticiones, favoreciendo de esta manera la relajación de la heterocromatina centromérica, aunque MBD4L podría no participar de la demetilación de dichas regiones. Por otro lado, MBD4L podría participar de manera indirecta sobre estas repeticiones, modificando la estructura de la cromatina durante la infección y el acceso de diferentes factores de transcripción. De una u otra manera, MBD4L activaría algún regulador negativo de las defensas durante la infección que estimula el crecimiento del patógeno en la planta.

Finalmente, la participación de MBD4L en estrés oxidativo sugiere un rol en la reparación del DNA. En condiciones de estrés oxidativo MBD4L podría actuar removiendo la incorporación de mutaciones en el DNA genómico, tales como U, T:G y 5-hmU, productos de la deaminación de C, 5mC y 5-hmC, respectivamente. La activación de genes que participan en el sistema BER en plantas que sobre expresan *AtMBD4L* apoyan esta hipótesis.

En este trabajo se han identificado dos putativos blancos de acción de MBD4L en el genoma vegetal: *FLC* y repeticiones centroméricas. Estos blancos serán esenciales para evaluar en un futuro el mecanismo de acción de MBD4L que aún no fue descrito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de Crecimiento de plantas

Las semillas de *A. thaliana* fueron desinfectadas con una solución 25% hipoclorito de sodio, 1 µl Tween 20 durante 7 minutos y lavadas con agua estéril. Las mismas fueron germinadas en cápsulas de Petri con medio de crecimiento GM (1x sales de Murashige y Skoog -MS-, 1x vitaminas de Gamborg, sacarosa 2 %, agar 1,6 %, agua destilada) durante 10-15 días con temperatura controlada (22°C) en ciclos de 8 h de luz / 16 h de oscuridad (ciclo corto) o ciclos de 16 h luz / 8 h oscuridad (ciclo largo) según cada caso. Las plántulas fueron transferidas a suelo (tierra:vermiculita 1:1) y crecidas durante 6-8 semanas en condiciones de estricta higiene (Pavet y col., 2006). Plantas de los ecotipos Columbia (Col-0) y Wassilewskija (Ws) fueron utilizados. Las plantas mutantes *mbd4l-1* (FLAG_238F06, ecotipo Ws) fueron obtenidas del banco de semillas INRA Versailles.

Plantas mutante *mbd4l-1* con un único evento de inserción del transgen en el genoma fueron seleccionadas mediante crecimiento en GM suplementado con kanamicina (50 µg ml⁻¹). Las plantas hemi y homocigotas para la inserción fueron identificadas por ensayos de PCR con los cebadores A, B y C (Tabla SII).

Las semillas de plantas mutantes *ros1-3*, *dml2-1*, *dml3-1* y triple mutante *ros1-3;dml2-1; dml3-1 (rdd)* fueron cedidas gentilmente por el laboratorio deL Dr. Robert L. Fischer (Department of Plant and Microbial Biology, University of California).

Construcción de plantas transgénicas

Para la realización de este trabajo se realizaron las siguientes construcciones: *AtMBD4L:GUS*, *siAtMBD4L*, *35S:AtMBD4L.3* y *35S:AtMBD4L.4*.

Cada uno de los transgenes fue clonado en el plásmido pENTR / D-TOPO (vector de entrada; sistema Gateway, Invitrogen) y posteriormente transferido por recombinación al vector binario destino Gateway. Para cada paso de clonado se utilizaron células de *E. coli* DH5α para la amplificación de cada constructo.

Para el análisis del promotor de *AtMBD4L* se amplificaron 1560 pb aguas arriba del ATG del gen *AtMBD4L*, utilizando los cebadores: *pAtMBD4L* FW y RV (Tabla SII). La construcción fue transferida al vector binario destino Gateway pKGWFS7 (Karimi y col., 2002).

Para la construcción de plantas silenciadas *siAtMBD4L* se amplifica un fragmento de 300 pb (nt 636-936), idéntico en ambos transcritos alternativos *AtMBD4L.3* y *AtMBD4L.4*, utilizando los cebadores: *siAtMBD4L* FW y RV (Tabla SII). El constructo fue transferido

desde el plásmido de entrada al vector destino Gateway pK7GWIWG2D (II) (Karimi y col., 2002).

Para la construcción de plantas *35S:AtMBD4L.3* y *35S:AtMBD4L.4*, se amplificó la secuencia completa de cada transcripto, utilizando el mismo par de cebadores J-K (Tabla SII). El vector binario de destino utilizado fue pKGWFS7 (Karimi y col., 2002).

La integridad y secuencia de todos los vectores usados fue confirmada por secuenciación (University of Chicago Comprehensive Cancer Center DNA Sequencing and Genotyping Facility, <http://cancer-seqbase.uchicago.edu/>).

Transformación y selección de líneas transgénicas

Cada una de las construcciones fueron introducidos en la cepa GV3101 pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación. Los clones seleccionados fueron utilizados para la transformación de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) utilizando el método de inmersión (Clough y Bent, 1998). Las semillas de las plantas transformadas (progenie T1) fueron sembradas en cajas de Petri con medio de crecimiento MS suplementado con el antibiótico kanamicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). Plantas T2 fueron obtenidas por autofecundación de plantas T1 y posterior selección en medio con antibiótico. Sólo se seleccionaron aquellas plantas T2 con un único evento de transformación, es decir con un patrón de 3:1 (resistentes:susceptibles al antibiótico) en la segregación, las cuales se autofecundaron para obtener plantas T3. Se seleccionaron como líneas homocigotas aquellas plantas T2 cuya progenie (T3) fue completamente resistente al antibiótico.

Extracción de DNA y RNA

El DNA genómico de *A. thaliana* utilizado en la genotipificación de plantas hemicigotas (*MBD4L/mbd4l*) y homocigotas (*mbd4l/mbd4l*) para la inserción de T-DNA fue purificado por extracción fenólica (Pavet y col., 2006).

El RNA total utilizado en ensayos de expresión génica fue aislado utilizando el protocolo adaptado de Verwoerd y col. (1989). Muestras de tejidos de plantas de *Arabidopsis* fueron congeladas en nitrógeno líquido. Posteriormente, el material fue pulverizado utilizando puntas plásticas adaptadas a un taladro de mesa o utilizando un homogenizador TMD1500 (Tombo). El material pulverizado fue resuspendido en 500 μl de mezcla de extracción [1:1 del buffer de extracción (100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA, 1 % SDS) y fenol ácido (pH 5)] precalentada a 80 °C. Luego de la agitación del tejido y la mezcla de extracción se adicionaron 250 μl de cloroformo. Esta mezcla fue agitada por inversión rápida

y centrifugada a 13000 rpm por 5 min a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada y colocada en un nuevo tubo al cual se le agregó 200 µl de LiCl 8 M cada 320 µl de muestra. Las muestras se colocaron durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente se precipitó el RNA por centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con etanol 80 % en agua DEPC y finalmente fue resuspendido en agua DEPC y mantenido a –80 °C.

La cuantificación de RNA se realizó mediante espectrofotometría (absorbancia 260 nm). Como indicador de contaminación y pureza se consideró una relación entre la absorbancia 260/280 nm >1.8. Además, la integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles de agarosa 1%.

Análisis de Transcriptos (RT-PCR semicuantitativa)

Para la transcripción reversa de los genes se utilizaron 2 µg de RNA total proveniente de diferentes tejidos según cada caso. El RNA total fue digerido con 5 U de Dnasa I (Invitrogen) durante 20 minutos a temperatura ambiente (25 °C). El RNA y cebadores al azar (hexámeros) se mezclaron y calentaron durante 10 minutos a 65 °C. Posteriormente se agregó Buffer RT 1X, 0,25 mM dNTPs y 1 U de transcriptasa reversa (M-MLV, Promega, Madison, WI, USA) en 20 µl de volumen final. Finalmente las muestras fueron colocadas durante 15 minutos a 25 °C, luego 60 minutos a 37 °C y 15 min a 70 °C. Los cDNA resultantes fueron mantenidos a –20 °C.

Para la amplificación del cDNA en reacciones de PCR se agregó 1 µl de cDNA, 15 pmoles de cada uno de los cebadores correspondientes, 0,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 2,5 µl de buffer de PCR 10X (Invitrogen), 500 µM de dNTPs en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización durante 2 min a 95 °C, seguido de ciclos de desnaturalización: 2 min a 94 °C; apareamiento de cebadores y cadena molde: 35 s a temperatura variable (según los cebadores utilizados, ver Tabla SII) y extensión: 50 – 60 min a 72 °C. El número de ciclos utilizado varía según los cebadores y cantidad de cDNA utilizado en cada caso, garantizando reacciones en fase la fase exponencial, para posibilitar el análisis y comparación de los niveles transcripcionales de distintos genes (PCR semi- cuantitativa). El gen *GAPC*, expresado de manera constitutiva fue utilizado para controlar la cantidad de cDNA utilizado en cada reacción.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de 1 – 1,5 %, según el tamaño de los amplicones.

Tinción para GUS

Para la detección de la actividad de GUS, diferentes tejidos de plantas transgénicas *AtMBD4L:GUS* y plantas control fueron cortados y sumergidos en solución de tinción [Solución tampón de fosfato de sodio 100 mM pH:7,2; Tritón 0,1%; EDTA 10mM; 55-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) 2mM]. Dichos tejidos fueron infiltrados por vacío durante 5 minutos e incubados durante 72 h a 36 °C. Posteriormente las muestras fueron fijadas con solución de fijación (formaldehído 10% v/v, etanol 20% v/v, ácido acético 5% v/v) durante 10 minutos y luego desteñidas con etanol 70%.

Microscopía

Análisis de decondensación de Cromocentros (CCs)

Para el análisis de la decondensación de CCs, las hojas de plantas infiltradas con suspensiones bacterianas (centro de la hoja) fueron cortadas y fijadas en etanol 96 % y ácido acético (3:1) por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada 3 veces, montadas sin cortar sobre un portaobjeto y teñidas con yoduro de propidio (20 μ g/ml). Imágenes confocales fueron obtenidas usando LSM5 Pascal y un objetivo 100X aceite (NA 1.4). El yoduro de propidio fue detectado usando un láser de excitación de 543 nm.

A partir de las fotografías obtenidas se cuantificó el número de CCs por núcleos en regiones infectadas, considerando núcleos ubicados cercanos a acúmulos de bacterias. Como control se utilizaron regiones sin infiltrar de la misma hoja.

Determinación de localización subcelular mediante GFP

Imágenes confocales fueron obtenidas con microscopio confocal láser Olympus FluoView FV1000 (Olympus América Latina). Se utilizó un objetivo PLAPON 60X de inmersión de aceite /1.42 apertura numérica (Olympus, Japón) con zoom digital de 1X o 3,5X. Para la fluorescencia de GFP y la autofluorescencia de la clorofila se excitó con láser de 488 nm. La fluorescencia fue adquirida a 500-520 nm para GFP y 640-600 nm para la clorofila. La separación espectral lineal se realizó utilizando la aplicación de deconvolución espectral del Software Fluoview.

Para la obtención de imágenes de tinciones con DAPI se utilizó un láser de excitación a 405 nm, con un 405/488 nm espejo dicróico de excitación y emisión recogidos entre 420-475 nm.

Análisis de número y tamaño de células en hojas

La primer hoja de plantas *Ws* y *mbd41-1* de 20 días de edad fueron colectadas y fijadas y clarificadas como se describe Horiguchi y col. (2005). Para fijar se utilizó solución FAA (etanol 50% v/v, ácido acético 5% v/v y formaldehído 3,7% v/v) durante al menos 2 horas. Posteriormente las hojas fueron clarificadas con solución de hidrato de cloral (4g/l de hidrato de cloral, 0,4g/ml de glicerol) hasta lograr una decoloración completa del tejido. Para la obtención de imágenes se utilizó microscopía DIC (Fluoview 300, Olympus) para fotografiar las células. El programa ImageJ fue utilizado para cuantificar el área de las hojas y de las células.

Purificación de proteínas y ensayos de *Western blot*

Para ensayos de Western blot se purificaron proteínas de extractos totales a partir de 50 mg de tejido de hojas. El tejido se pulverizó en nitrógeno líquido y se resuspendió en buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH=6.8, SDS 3% p/v, glicerol 30% v/v, β -mercaptoetanol 2% v/v, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF; Promega) 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas para plantas (Sigma). Las muestras fueron colocadas durante 5 min a 85 °C, luego enfriadas en hielo y centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 10000 g.

Para ensayos de inmunoprecipitación de proteínas fusionadas a GFP (GFP-Trap_A, Chromotek), 1 g de tejido fue pulverizado en nitrógeno líquido y resuspendido en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH7,5; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM; NP-40 0,5%; PMSF 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas para plantas. Las muestras fueron colocadas en hielo durante 30 minutos y centrifugadas a 20000g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo con buffer de dilución (Tris-HCl 10mm pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM) hasta un volumen final de 1000 μ l. En este paso se obtuvo la muestra de proteínas totales (I).

Una alícuota de 25 μ l de las perlitas de agarosa unidas al anticuerpo fueron lavadas 3 veces con 500 μ l de buffer de dilución y centrifugadas a 2500g por 2 min a 4 °C. Las las proteínas extraídas fueron incubadas con las bolitas en movimiento constante por 2 h a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 2500g por 2 min a 4 °C. El pellet, donde se encuentran las proteínas unidas al anticuerpo (P) fue separado del sobrenadante (proteínas no unidas; S). Las proteínas P fueron lavadas 3 veces con 500 μ l de buffer de dilución frío.

Posteriormente, las muestras fueron separadas en geles SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Sigma). La cantidad de proteínas sembradas fue monitoreada mediante los niveles de Rubisco mediante en el canal 680 nm (Odyssey, Li-COR Bioscience). Las membranas fueron bloqueadas con leche con bajo contenido graso 5% v/v en buffer PBS 1h a 25°C y luego incubadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP Abcam 290 (1/1000)

durante 16 h a 4 °C. Anticuerpos comerciales de cabra antiIgG de conejo (IRDye 800CW; Li-COR Bioscience) fueron utilizados como anticuerpo secundario. Su emisión fue detectada a 800 nm usando el Sistema de Imágenes Infrarrojas Odyssey (Li-COR Bioscience).

Manipulación de bacteria patógena

Cepas y condiciones de crecimiento

Para los experimentos de infección bacteriana, las hojas de *Arabidopsis* fueron infiltradas con la cepa virulenta de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Whalen y col., 1991). Se utilizaron además *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mutante en el cluster *hrpC*. Las cepas fueron mantenidas a -80 °C en medio King's B (proteosapeptona 2% p/v, glicerol 1% v/v, K₂HPO₄ 0.15% p/v, MgSO₄·7H₂O 0.15% p/v, agar 1,5% p/v, agua destilada) y 15% de glicerol. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio sólido King's B suplementado con los antibióticos apropiados (50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de rifampicina para la cepa *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, y 100 µg/ml de rifampicina para *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *hrpC*-) durante 24-48 horas a 28 °C. Al momento de la infiltración de hojas de *Arabidopsis*, se inocularon colonias aisladas en medio King's B líquido suplementado con los antibióticos y fueron crecidas con agitación (120-200 rpm) a 28 °C por 16 hs.

Para las infecciones de hojas de plantas adultas de *Arabidopsis* (6-8 semanas) 1 ml del cultivo líquido fue centrifugado a 4000 rpm por 3 min y lavado tres veces en MgCl₂ 10 mM pH 7. Las bacterias recuperadas en el sedimento fueron nuevamente resuspendidas en 1 ml de MgCl₂ 10 mM. La concentración bacteriana de una dilución 1/10 de este material fue determinada mediante su absorbancia a 600 nm ($A_{600} = 1 \times 10^8$ ufc/ml). Diluciones seriadas del cultivo fueron sembradas en placas de Petri. El número de ufc/ml obtenido fue estandarizado al valor de absorbancia. Suspensiones bacterianas a una concentración de 5×10^6 ufc/ml (excepto infecciones para la realización de curvas de crecimiento bacteriano) fueron infiltradas por presión sobre la cara abaxial de las hojas mediante la utilización de una jeringa de 1 ml sin aguja (Alvarez y col., 1998).

Curvas de crecimiento *in vivo*

El crecimiento de *P. syringae* pv. *tomato in planta* se realizó según lo descrito por Alvarez y col. (1998). Para cada tiempo post-infección se cortaron dos discos de 4 mm de diámetro por cada hoja infiltrada, y los discos de seis hojas provenientes de al menos tres plantas diferentes, se agruparon y homogeneizaron en 10 mM de MgCl₂ para extraer las bacterias. Diluciones seriadas de los extractos se sembraron, por duplicado, en medio King's

B suplementado con los antibióticos apropiados. Las colonias en las placas fueron contadas después de la incubación durante 48 horas a 28 °C.

Tratamientos con estresores

Para el análisis de la tasa de germinación y supervivencia de plantas sometidas a estrés oxidativo y salino se utilizaron semillas de plantas control (Ws y *35S:GFP*), *mbd4l-1*, *35S:AtMBD4L.3-GFP* y *35S:AtMBD4L.4-GFP*. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri con medio de crecimiento MS suplementado con diferentes concentraciones de MV (0, 25 y 50 μ M) y NaCl (0 y 175 mM). El porcentaje de germinación en cada caso se determinó contando el número de plantas germinadas (con raíz fuera de la cubierta seminal). De la misma manera se cuantificaron las plantas germinadas en MS suplementado con MV que emitieron cotiledones fuera de la cubierta de la semilla. Se cuantificó el número de plantas sembradas en 2 cajas de Petri que con 50 semillas de cada una de las líneas analizadas. Cada experimento se repitió al menos 3 veces de manera independiente.

Para estudiar la tolerancia al estrés oxidativo en plantas adultas, las hojas de plantas de 3 -4 semanas crecidas en condiciones normales fueron cortadas y sumergidas en solución con diferentes concentraciones de MV (0, 25 y 100 μ M) y H₂O₂ (0, 5 y 10 mM) durante 24 y 6 horas, respectivamente.

Para el análisis de tolerancia a la salinidad, plantas germinadas y crecidas durante 30 días en MS con 175 mM de NaCl. Además, plantas adultas de 3 semanas crecidas en condiciones normales fueron regadas con NaCl 300 mM dos veces y posteriormente mantenidas con riego normal durante 10 días.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

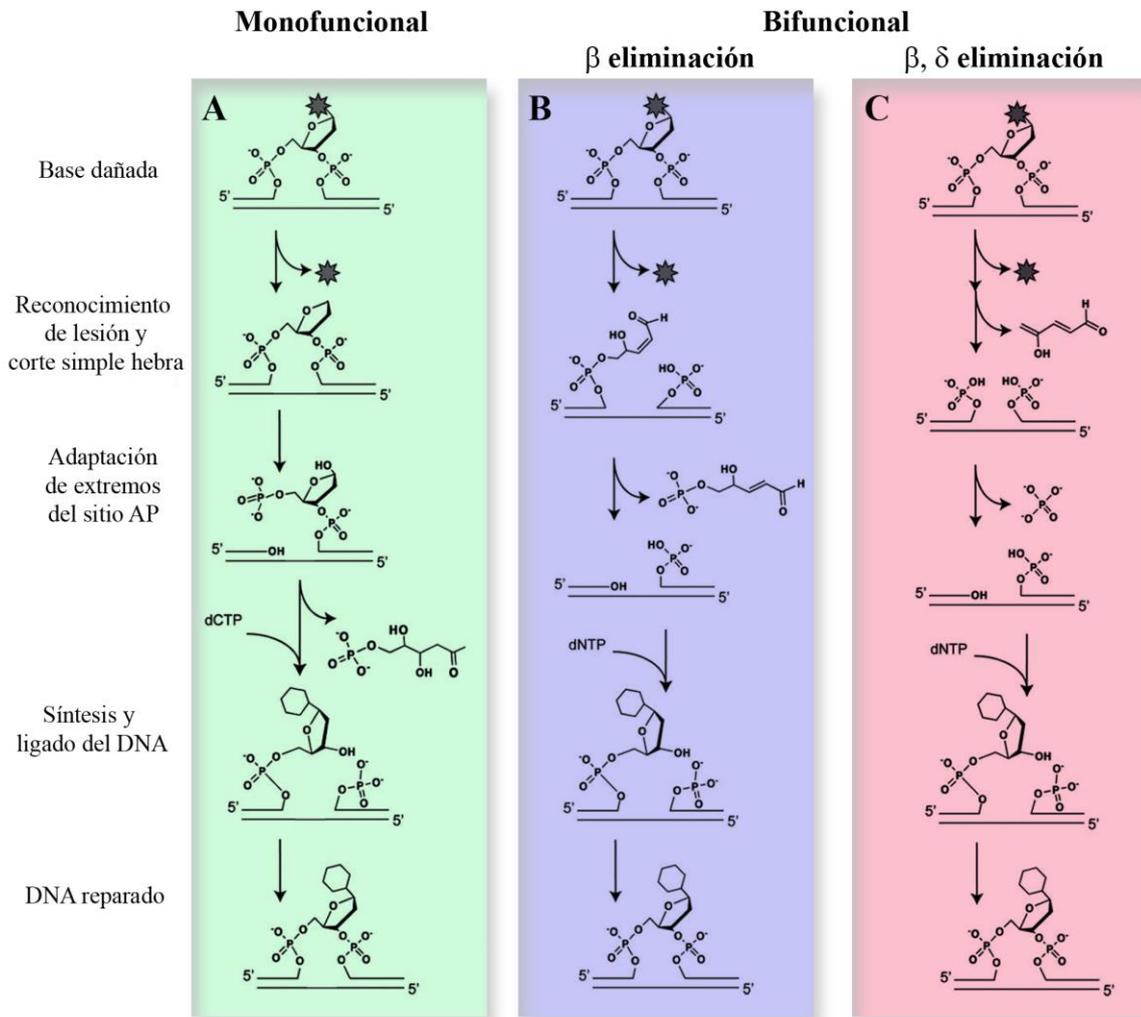


Figura SI. Mecanismos de acción de las DNA glicosilasas y posteriores etapas de reparación del sistema BER. El mecanismo de acción de las DNA glicosilasas clasificadas como monofuncionales (A), bifuncionales (actividad DNA glicosilasa/liasa) con eliminación β (B) o eliminación β, δ (C).

Las DNA glicosilasas monofuncionales utilizan el posicionamiento y desprotonación de una molécula de agua por un aspártico catalítico altamente conservado, que ataca al carbono 1 de la desoxirribosa de la base dañada, promoviendo la liberación de la misma y generando un sitio AP (Jacobs y Schär. 2012). Posteriormente, el enlace fosfodiéster del sitio AP es clivado por acción de una APE que genera un corte en la simple hebra del DNA, generando extremos 3' OH y 5' desoxirribosa-fosfato (5'dRP) en el sitio AP. El terminal 5'dRP ubicado en el margen de la lesión es escindido por acción de una 5' liasa dRP, o por la actividad 5' liasa dRP de la polimerasa Pol β , que es responsable de la síntesis del DNA. A continuación la hebra de DNA es sellada por la DNA LIGASA I (LIG I) o por un complejo en el que participa la DNA LIGASA III (LIG III) (Svilar y col., 2011).

Las DNA glicosilasas bifuncionales utilizan un grupo amino de la cadena lateral de la lisina como nucleófilo para la escisión del enlace N-glicosilico en lugar de una molécula de agua, (Jacobs & Schär. 2012). Debido a su actividad liasa,

pueden generar extremos con un aldehído insaturado en 3' y un terminal 5' fosfato (β eliminación, Fig. S1B) o extremos fosfato en 3' y 5' (β , δ eliminación, Fig. S1C) (Fromme y col., 2004; Jacobs y Schär, 2012).

Los extremos derivados de la actividad DNA glicosilasa/liasa deben ser modificados para transformarse en sustrato de la DNA polimerasa. Los extremos con un aldehído insaturado en el terminal 3', producto de la actividad β -liasa (Fig. S1B), son adaptados por la actividad 3' fosfodiesterasa de APE1. Posteriormente la Pol β sintetiza nuevamente el DNA que es sellado por LIG1 o por un complejo de LIGIII/XRCC1. Por su parte, el extremo 3' fosfato originados por la actividad β , δ liasa es removido por una fosfatasa (Fig. S1C), preparando el sustrato para la síntesis del DNA por Pol β o por el complejo XRCC1/LIGIII y posterior ligado (Svilar y col., 2011). La estrella indica la base dañada

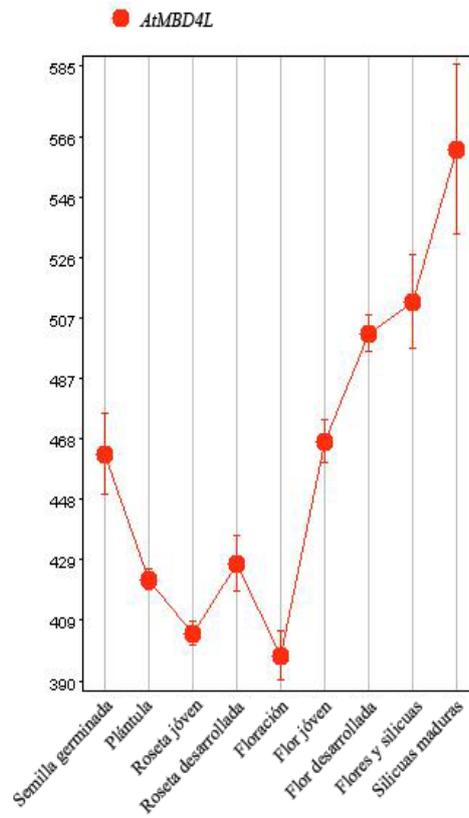


Figura SII. Expresión de *AtMBD4L* en *Arabidopsis* según experimentos de transcriptoma depositados en la base de datos Genevestigator. Nivel de expresión de *AtMBD4L* en diferentes estadios de desarrollo.

Tabla SI. Superfamilias de DNA glicosilasas implicadas en el sistema BER

Superfamilia y miembros	Sigla	Sustrato ^(c)	Organismos	Referencias
Uracilo DNA glicosilasa (UDG)				
URACIL DNA GLYCOSYLASE ^(a)	UNG	ssU,U:G, U:A,5-FU, pirimidinas oxidadas	Bacterias, levaduras, vertebrados	Dizdaroglu y col., 1996; Krokan y col., 2001; Zharcov y col., 2010
THYMINE DNA GLYCOSYLASE ^(a)	TDG	U:G,T:G, O6-meG:T, 5FU:G, 5-hmU, 5fU:G	Bacterias, levaduras, vertebrados, insectos	Hardeland y col., 2003; Cortázar y col., 2007
SINGLE-STRAND-SELECTIVE MONOFUNCTIONAL UDG 1 ^(a)	SMUG1	ssU,U:G, U:A, pirimidinas oxidadas, εC:G, 5FU	Vertebrados, insectos, procariontas	Nilsen y col., 2001
URACIL DNA GLYCOSYLASE ^(a)	UDG	ssU, U:T, U:G, U:A, U:G, 8-oxoG	Bacterias, arqueas	Chung y col., 2003
URACIL DNA GLYCOSYLASE A ^(a)	UDGa	ssU,U:G, U:A	Arqueas	Sartori y col., 2002
URACIL DNA GLYCOSYLASE B ^(a)	UDGb	U:G, εC:G, 5-hmU, U:A	Bacterias, arqueas	Sartori y col., 2002
3-metil purina DNA glicosilasa (MPG)				
N-METHYL PURINE ^(a) , ALKYL- PURINE DNA GLYCOSYLASE	MPG AAG/ANPG	3-meA, 7-meA, 7-meG, εA, HX	Vertebrados, bacterias, plantas	Samson y col., 1991; Dosanjh y col., 1994; Saparbaev y Laval, 1994
NEI/FPG				
FORMAMIDOPYRIMIDINE DNA GLYCOSYLASE ^(b)	FPG/ MutM	8-oxoG:C, FapyG, FapyA, 5-hC, 5-hU, Tg, 5-fU	Bacterias, plantas	Karahalil y col., 1998; Ohtsubo y col., 1998; Murphy y Gao, 1998
ENDONUCLEASE VIII	Nei/ NEIL	8-oxoG, Tg, Ug, 5-hC, 5-hmU, FapyG, FapyA	Bacterias, vertebrados	Hazra y col., 2002; Hailer y col., 2005
HhH-GPD DNA glicosilasas				
METHYL BINDING DOMAIN 4 ^(a)	MBD4	G:T, G:U, 5FU:G, 5IU:G, Tg:G, O6-meG:T, 5-hmU	Vertebrados	Petronzelli y col., 2000, Turner y col., 2006; Ramiro-Merina y col., 2013
3-meA DNA GLYCOSYLASE II ^(a)	AlkA/MAGI	3-meA, 7-meG, 3-meG, 7-meA, εA, HX, 5-fU	Bacterias, arqueas, levaduras, plantas	Bjelland y col., 1994; Bjelland y Seeberg, 1996; Santerre y Britt, 1994
3-meA DNA GLYCOSYLASE II ^(a)	MGPII	7-meG, 3-meA	Bacterias, arqueas	Begley y col., 1999
ENDONUCLEASE III ^(b)	Endo III/ NTH	5-hC, Tg, 5-hU, FapyG	Bacterias, levaduras, vertebrados, plantas	Hazra y col., 2007; Roldán-Arjona y col., 2000; Gutman y Niyogi, 2009
MutY/MUTYH ^(b)	MutY/ MUTYH	8-oxoG:A, G:A, C:A, 2-hA	Bacteria, vertebrados	Au y col., 1989 ; Ohtsubo y col., 2000
8-oxoG DNA GLYCOSYLASE I ^(b)	OGG1	8-oxoG:C, FapyG:C, 8-oxoG:T, 8oxoG:G	Vertebrados, arqueas, plantas	Tchou y col., 1991; Dany y Tissier, 2001; García-Ortiz y col., 2001

REPRESSOR OF SILENCING 1 ^(b)	ROS1	5-mC, T:G, 5-hmC	Plantas	Gong et al., 2002, Gehring y col., 2007, Jang y col., 2014
DEMETER ^(b)	DME	5-mC, T:G, 5-hmC	Plantas	Choi y col., 2002, Gehring y col., 2006, Jang y col., 2014
DEMETER-LIKE 2 ^(b)	DML2	5-mC	Plantas	Penterman y col., 2007
DEMETER-LIKE 3 ^(b)	DML3	5-mC	Plantas	Penterman y col., 2007

(a) Monofuncional DNA glicosilasas; (b) Bifuncional DNA glicosilasas; (c) Los sustratos se listan por orden de afinidad.

Abreviaturas: 5FU, 5-fluoro uracilo; 5IU, 5-iodo uracilo; Tg, timina glicol; O6-meG, O6-metil guanina; ssU, uracilo simple cadena; 8-oxoG, 7,8-dihidro-8-oxo guanina; 5-mC, 5-metil citosina; 3-meA, 3-metil adenina; 3-meG, 3-metil guanina; 7-meG, 7-metil guanina; 7-meA, 7-metil adenina; εA, eteno adenina; HX, hipoxantina; 2-hA, 2-hidroxi adenina; FapyG, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamido pirimidina; Ug, uracilo glicol, 5-hC, 5-hidroxi citosina; 5-hU, 5-hidroxi uracilo; FapyA, 4,6-diamino-5-formamido pirimidina; εC, eteno citosina; 5-hmU, 5-hidroxi metil uracilo; 5-fU, 5-formil uracilo.

Table SII. Oligonucleótidos cebadores y condiciones usadas en reacciones de PCR

Cebador (Dirección)	Secuencia	Tamaño producto (pb)	T (°C)	Cic los
A (FW)	5'-TTAAAAGGTGATTGCAGACGC-3'			
B (RV)	5'-CCTGCAGACAAGAAGATGGAG-3'	A-B-C: 989** y	50	40
C (FW)	5'- CGTGTGCCAGGTGCCCACGGAATAGT- 3'	430***		
F (FW)	5'- <u>TCTCATATGGT</u> GAGGAAAACCTCC-3'			
G (RV)	* 5'-CTCCCCGCGTCAGATGTTT-3'	F-G: 206	60	40
H (RV)	5'-CCCCGCGTCTGCAATCACCT-3'	F-H: 222	60	40
I (RV)	5'-ATCACTCCCCGCGTCTGTGC-3'	F-I: 218	60	40
J (FW)	5'-CACCTAAATTGAGATGGTTCCTCCC- 3'	J-K: 1080 y 732	55	34
K (RV)	5'-TCAGTACACAATCCAAACAAG-3'			
L (RV)	5'-TCATAATTTATACCGAATCCTG-3'	J-L: 1351 y 1003	55	34
M (RV)	5'-TTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGG- 3'	F-M: 683	55	34
<i>AtMBD4Lp</i> (FW)	5'-CACCAGCAGCTTTCCTATTCAATCA- 3'	<i>AtMBD4Lp</i> : 1564	55	40
<i>AtMBD4Lp</i> (RV)	5'-CTCAATTTATACACAGAGAAT-3'			
<i>siAtMBD4L</i> (FW)	5'-CACCAAAGTTCAAGCTAAAGTCCCA- 3'	<i>siAtMBD4L</i> : 304	50	40
<i>siAtMBD4L</i> (RV)	5'-CACATTTCTTGATTTCTCCTT-3'			
<i>FLC</i> (FW)	5'-TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC-3'	<i>FLC</i> : 492	60	35
<i>FLC</i> (RV)	5'-GATTTGTCCAGCAGGTGACATCTC-3'			
<i>CO</i> (FW)	5'-ACGCCATCAGCGAGTTCC-3'	<i>CO</i> : 479	62	35
<i>CO</i> (RV)	5'-AAATGTATGCGTTATGGTTAATGG-3'			
<i>SOC1</i> (FW)	5'-CTGAGGCATACTAAGGATCG-3'	<i>SOC1</i> : 425	64	30
<i>SOC1</i> (RV)	5'-GAACAAGGTAACCCAATGAA-3'			
<i>PR1</i> (FW)	5'-GTAGGTGCTCTTGTCTTCCC-3'	<i>PR1</i> : 602	60	25
<i>PR1</i> (RV)	5'-CACATAATTCCCACGAGGATC-3'			
<i>ARP</i> (FW)	5'-TATCAACAACAGCAAGCGAA-3'	<i>ARP</i> : 147	55	30
<i>ARP</i> (RV)	5'-TTCTTGAACAGTCTCGCCTC-3'			
<i>LIG1</i> (FW)	5'-GCGGTTAGGGTTCTCAGGT-3'	<i>LIG1</i> : 193	60	30
<i>LIG1</i> (RV)	5'-TCCACACACCGCCACTTAG-3'			
<i>RAD51</i> (FW)	5'-TGAGGGAACATTCAGGCCAC-3'	<i>RAD51</i> : 196	60	35
<i>RAD51</i> (RV)	5'-AGAGAGCGGTAGCACTATCG-3'			
<i>PARP2</i> (FW)	5'-CGTATTCTGCGTCCTGTATTGT-3'	<i>PARP2</i> : 234	60	30
<i>PARP2</i> (RV)	5'-CGTCTCTGATATCTGTCACTCCAC-3'			
<i>GAPC</i> (FW)	5'-CACTTGAAGGGTGGTGCCAAG-3'	<i>GAPC</i> : 543	60	24
<i>GAPC</i> (RV)	5'-CCTGTTGTGCGCAACGAAGTC-3'			

* Los nucleótidos subrayados incluyen el sitio de restricción para NdeI que no está presente en el gen *AtMBD4L*.

** Alelo salvaje; *** Alelo mutante

BIBLIOGRAFÍA

- Agius F, Kapoor A, Zhu JK. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Aug 1;103(31):11796-801.
- Alexandre C, Moller-Steinbach Y, Schonrock N, Gruissem W, Hennig L. Arabidopsis MSI1 is required for negative regulation of the response to drought stress. *Mol Plant* 2009 Jul;2(4):675-87.
- Alexandre CM, Hennig L. *FLC* or not *FLC*: the other side of vernalization. *J Exp Bot* 2008;59(6):1127-35.
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 2005 Apr 22;121(2):207-21.
- Alvarez-Venegas R, Abdallat AA, Guo M, Alfano JR, Avramova Z. Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. *Epigenetics* 2007 Apr;2(2):106-13.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 1998 Mar 20;92(6):773-84.
- Alvarez ME, Nota F, Cambiagno DA. Epigenetic control of plant immunity. *Mol Plant Pathol* 2010 Jul;11(4):563-76.
- Amasino R. Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* 2010 Mar;61(6):1001-13.
- Asahara H, Wistort PM, Bank JF, Bakerian RH, Cunningham RP. Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochemistry* 1989 May 16;28(10):4444-9.
- Au KG, Clark S, Miller JH, Modrich P. *Escherichia coli* *mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Nov;86(22):8877-81.
- Aung K, Lin SI, Wu CC, Huang YT, Su CL, Chiou TJ. *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* 2006 Jul;141(3):1000-11.
- Babbs CF, Pham JA, Coolbaugh RC. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* 1989 Aug;90(4):1267-70.
- Barbazuk WB, Schnable PS. SNP discovery by transcriptome pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2011;729:225-46.
- Barbazuk WB, Fu Y, McGinnis KM. Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. *Genome Res* 2008 Sep;18(9):1381-92.
- Bari R, Datt PB, Stitt M, Scheible WR. *PHO2*, microRNA399, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* 2006 Jul;141(3):988-99.
- Baute J, Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2008 Jul;43(4):239-76.
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jul 17;104(29):12157-62.
- Begley TJ, Haas BJ, Noel J, Shekhtman A, Williams WA, Cunningham RP. A new member of the endonuclease III family of DNA repair enzymes that removes methylated purines from DNA. *Curr Biol* 1999 Jun 17;9(12):653-6.
- Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, et al. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 30;96(7):3969-74.
- Bellacosa A. Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol* 2001 May;187(2):137-44.

- Berr A, Xu L, Gao J, Cognat V, Steinmetz A, Dong A, et al. SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in FLOWERING LOCUS C activation and repression of flowering. *Plant Physiol* 2009 Nov;151(3):1476-85.
- Bezhan S, Winter C, Hershman S, Wagner JD, Kennedy JF, Kwon CS, et al. Unique, shared, and redundant roles for the Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell* 2007 Feb;19(2):403-16.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999 Feb 18;397(6720):579-83.
- Biegert A, Mayer C, Remmert M, Soding J, Lupas AN. The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W335-W339.
- Bjelland S, Birkeland NK, Benneche T, Volden G, Seeberg E. DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994 Dec 2;269(48):30489-95.
- Bjelland S, Seeberg E. Different efficiencies of the Tag and AlkA DNA glycosylases from *Escherichia coli* in the removal of 3-methyladenine from single-stranded DNA. *FEBS Lett* 1996 Nov 11;397(1):127-9.
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* 2004 Jul 27;14(14):1232-8.
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, et al. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* 2005 Mar;8(3):443-9.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 2005 Dec 29;123(7):1279-91.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 2004;16 Suppl:S18-S31.
- Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response. *Environ Mol Mutagen* 2008 Jan;49(1):61-72.
- Bray CM, West CE. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 2005 Dec;168(3):511-28.
- Brosch G, Ransom R, Lechner T, Walton JD, Loidl P. Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* 1995 Nov;7(11):1941-50.
- Cao X, Jacobsen SE. Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 2002 Jul 9;12(13):1138-44.
- Casati P, Stapleton AE, Blum JE, Walbot V. Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant J* 2006 May;46(4):613-27.
- Casati P, Campi M, Chu F, Suzuki N, Maltby D, Guan S, et al. Histone acetylation and chromatin remodeling are required for UV-B-dependent transcriptional activation of regulated genes in maize. *Plant Cell* 2008 Apr;20(4):827-42.
- Chen H, Chu P, Zhou Y, Li Y, Liu J, Ding Y, et al. Overexpression of *AtOGGI*, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *J Exp Bot* 2012 Jun;63(11):4107-21.
- Chinnusamy V, Gong Z, Zhu JK. Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol* 2008 Oct;50(10):1187-95.
- Choi CS, Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 2007 May;277(5):589-600.

- Choi K, Park C, Lee J, Oh M, Noh B, Lee I. Arabidopsis homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* 2007 May;134(10):1931-41.
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, et al. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell* 2002 Jul 12;110(1):33-42.
- Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. An invariant aspartic acid in the DNA glycosylase domain of DEMETER is necessary for transcriptional activation of the imprinted MEDEA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 May 11;101(19):7481-6.
- Chung JH, Im EK, Park HY, Kwon JH, Lee S, Oh J, et al. A novel uracil-DNA glycosylase family related to the helix-hairpin-helix DNA glycosylase superfamily. *Nucleic Acids Res* 2003 Apr 15;31(8):2045-55.
- Cline SD, Hanawalt PC. Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 May;4(5):361-72.
- Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998 Dec;16(6):735-43.
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 2008 Mar 13;452(7184):215-9.
- Cordoba-Canero D, Dubois E, Ariza RR, Doutriaux MP, Roldan-Arjona T. Arabidopsis uracil DNA glycosylase (UNG) is required for base excision repair of uracil and increases plant sensitivity to 5-fluorouracil. *J Biol Chem* 2010 Mar 5;285(10):7475-83.
- Cordoba-Canero D, Roldan-Arjona T, Ariza RR. Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J* 2011 Nov;68(4):693-702.
- Cortazar D, Kunz C, Saito Y, Steinacher R, Schar P. The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 2007 Apr 1;6(4):489-504.
- Cortazar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, et al. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 2011 Feb 17;470(7334):419-23.
- Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, et al. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 9;100(25):15071-6.
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 2011 Jul 8;146(1):67-79.
- Cunningham RP, Weiss B. Endonuclease III (nth) mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Jan;82(2):474-8.
- Dany AL, Tissier A. A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 2001 Apr;265(2):293-301.
- David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007 Jun 21;447(7147):941-50.
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M, et al. AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* 2003 Jun 23;4:25.
- Deng W, Ying H, Helliwell CA, Taylor JM, Peacock WJ, Dennis ES. FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Apr 19;108(16):6680-5.

- Denver DR, Swenson SL, Lynch M. An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases. *Mol Biol Evol* 2003 Oct;20(10):1603-11.
- Dhawan R, Luo H, Foerster AM, Abuqamar S, Du HN, Briggs SD, et al. HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in Arabidopsis. *Plant Cell* 2009 Mar;21(3):1000-19.
- Dion E, Li L, Jean M, Belzile F. An Arabidopsis *MLH1* mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *Plant J* 2007 Aug;51(3):431-40.
- Dizdaroglu M, Karakaya A, Jaruga P, Slupphaug G, Krokan HE. Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 1996 Feb 1;24(3):418-22.
- Dosanjh MK, Chenna A, Kim E, Fraenkel-Conrat H, Samson L, Singer B. All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Feb 1;91(3):1024-8.
- Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutesco C, de MG, Kazmaier M. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* 2001 Aug;265(6):954-63.
- Douet J, Blanchard B, Cuvillier C, Tourmente S. Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. *Plant Cell Physiol* 2008 Dec;49(12):1783-91.
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Aug 7;109(32):E2183-E2191.
- Durrant WE, Wang S, Dong X. Arabidopsis SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Mar 6;104(10):4223-7.
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, et al. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One* 2007;2(2):e219.
- Feng S, Jacobsen SE. Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biol* 2011 Apr;14(2):179-86.
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Aug 6;93(16):8449-54.
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 May 12;95(10):5824-9.
- Finnegan EJ, Kovac KA, Jaligot E, Sheldon CC, James PW, Dennis ES. The downregulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *Plant J* 2005 Nov;44(3):420-32.
- Franco D, Sgrignani J, Bussi G, Magistrato A. Structural role of uracil DNA glycosylase for the recognition of uracil in DNA duplexes. Clues from atomistic simulations. *J Chem Inf Model* 2013 Jun 24;53(6):1371-87.
- Franz P, de Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I. Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Oct 29;99(22):14584-9.
- Fromme JC, Banerjee A, Verdine GL. DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 2004 Feb;14(1):43-9.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK. A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr Biol* 2005 Nov 22;15(22):2038-43.

- Gao MJ, Murphy TM. Alternative forms of formamidopyrimidine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol* 2001 Feb;73(2):128-34.
- Garcia-Ortiz MV, Ariza RR, Roldan-Arjona T. An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2001 Dec;47(6):795-804.
- Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, et al. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 2006 Feb 10;124(3):495-506.
- Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim Biophys Acta* 2007 May;1769(5-6):276-86.
- Gjerset RA, Martin DW, Jr. Presence of a DNA demethylating activity in the nucleus of murine erythroleukemic cells. *J Biol Chem* 1982 Aug 10;257(15):8581-3.
- Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:205-27.
- Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldan-Arjona T, David L, Zhu JK. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 2002 Dec 13;111(6):803-14.
- Gutman BL, Niyogi KK. Evidence for base excision repair of oxidative DNA damage in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2009 Jun 19;284(25):17006-12.
- Hailer MK, Slade PG, Martin BD, Rosenquist TA, Sugden KD. Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydroantoin and guanidinohydroantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair (Amst)* 2005 Jan 2;4(1):41-50.
- Hardeland U, Bentele M, Jiricny J, Schar P. The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* 2003 May 1;31(9):2261-71.
- Hashimoto H, Hong S, Bhagwat AS, Zhang X, Cheng X. Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 2012b Nov 1;40(20):10203-14.
- Hashimoto H, Zhang X, Cheng X. Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 2012 Sep 1;40(17):8276-84.
- Hazra TK, Kow YW, Hatahet Z, Imhoff B, Boldogh I, Mokkalapati SK, et al. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J Biol Chem* 2002 Aug 23;277(34):30417-20.
- Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)* 2007 Apr 1;6(4):470-80.
- He Y. Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Mol Plant* 2009 Jul;2(4):554-64.
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998 Nov;18(11):6538-47.
- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 1999 Sep 16;401(6750):301-4.
- Heo JB, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 2011 Jan 7;331(6013):76-9.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 1999 Jan 1;27(1):297-300.

- Hitomi K, Iwai S, Tainer JA. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 2007 Apr 1;6(4):410-28.
- Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2005 Jul;43(1):68-78.
- Horiguchi G, Ferjani A, Fujikura U, Tsukaya H. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 2006 Jan;119(1):37-42.
- Ichinoe A, Behmanesh M, Tominaga Y, Ushijima Y, Hirano S, Sakai Y, et al. Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Nucleic Acids Res* 2004;32(2):477-87.
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, et al. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2004;32(17):5096-103.
- Iyama T, Wilson DM, III. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* 2013 Aug;12(8):620-36.
- Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, et al. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 2009 Jul;16(7):763-8.
- Jacobs AL, Schar P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 2012 Feb;121(1):1-20.
- Jang H, Shin H, Eichman BF, Huh JH. Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2014 Apr 18;446(4):1067-72.
- Jia X, Wang WX, Ren L, Chen QJ, Mendu V, Willcut B, et al. Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2009 Sep;71(1-2):51-9.
- Jiang D, Kong NC, Gu X, Li Z, He Y. *Arabidopsis* COMPASS-like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development. *PLoS Genet* 2011 Mar;7(3):e1001330.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 2004 Jun 18;14(6):787-99.
- Jost JP, Fremont M, Siegmann M, Hofsteenge J. The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine- DNA glycosylase targets DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 1997 Nov 15;25(22):4545-50.
- Kakutani T, Jeddloh JA, Flowers SK, Munakata K, Richards EJ. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 29;93(22):12406-11.
- Karahalil B, Girard PM, Boiteux S, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucleic Acids Res* 1998 Mar 1;26(5):1228-33.
- Karan R, DeLeon T, Biradar H, Subudhi PK. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLoS One* 2012;7(6):e40203.
- Karimi M, Inze D, Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 2002 May;7(5):193-5.
- Kathe SD, Barrantes-Reynolds R, Jaruga P, Newton MR, Burrows CJ, Bandaru V, et al. Plant and fungal Fpg homologs are formamidopyrimidine DNA glycosylases but not 8-oxoguanine DNA glycosylases. *DNA Repair (Amst)* 2009 May 1;8(5):643-53.

- Kelley LA, Sternberg MJ. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009;4(3):363-71.
- Kim E, Magen A, Ast G. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2007;35(1):125-31.
- Kim JY, Kwak KJ, Jung HJ, Lee HJ, Kang H. MicroRNA402 affects seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions via targeting DEMETER-LIKE Protein3 mRNA. *Plant Cell Physiol* 2010 Jun;51(6):1079-83.
- Kim MG, Kim SY, Kim WY, Mackey D, Lee SY. Responses of *Arabidopsis thaliana* to challenge by *Pseudomonas syringae*. *Mol Cells* 2008 May 31;25(3):323-31.
- Kim YJ, Wilson DM, III. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 2012 Jan;5(1):3-13.
- Klungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 1997 Jun 2;16(11):3341-8.
- Kondo E, Gu Z, Horii A, Fukushige S. The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated *p16(INK4a)* and *hMLH1* genes. *Mol Cell Biol* 2005 Jun;25(11):4388-96.
- Krokan HE, Otterlei M, Nilsen H, Kavli B, Skorpen F, Andersen S, et al. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the *UNG* gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;68:365-86.
- Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013 Apr;5(4):a012583.
- Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A, Grzesiuk E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol* 2007;54(3):413-34.
- Kuo CF, McRee DE, Cunningham RP, Tainer JA. Crystallization and crystallographic characterization of the iron-sulfur-containing DNA-repair enzyme endonuclease III from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1992 Sep 5;227(1):347-51.
- Laget S, Miotto B, Chin HG, Esteve PO, Roberts RJ, Pradhan S, et al. MBD4 cooperates with DNMT1 to mediate methyl-DNA repression and protects mammalian cells from oxidative stress. *Epigenetics* 2014 Jan 16;9(4).
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de PY, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 2002 Jan 1;30(1):325-7.
- Leyser HM, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M. *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 1993 Jul 8;364(6433):161-4.
- Leyser HM, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M. Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* 1996 Sep;10(3):403-13.
- Leyser O. Regulation of shoot branching by auxin. *Trends Plant Sci* 2003 Nov;8(11):541-5.
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1990 Nov;2(11):1071-80.
- Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974 Sep;71(9):3649-53.
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 2008 May 2;133(3):523-36.

- Liu J, Sun N, Liu M, Liu J, Du B, Wang X, et al. An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant Physiol* 2013 May;162(1):512-21.
- Liu P, Demple B. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environ Mol Mutagen* 2010 Jun;51(5):417-26.
- Liu ZQ, Gao J, Dong AW, Shen WH. A truncated Arabidopsis NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the *Atnap1;3-2* mutant. *Mol Plant* 2009 Jul;2(4):688-99.
- Lucas M, Swarup R, Paponov IA, Swarup K, Casimiro I, Lake D, et al. Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2011 Jan;155(1):384-98.
- Luo M, Liu X, Singh P, Cui Y, Zimmerli L, Wu K. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta* 2012 Feb;1819(2):129-36.
- Macovei A, Balestrazzi A, Confalonieri M, Fae M, Carbonera D. New insights on the barrel medic MtOGG1 and MtFPG functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition. *Plant Physiol Biochem* 2011 Sep;49(9):1040-50.
- Manvilla BA, Maiti A, Begley MC, Toth EA, Drohat AC. Crystal structure of human methyl-binding domain IV glycosylase bound to abasic DNA. *J Mol Biol* 2012 Jul 13;420(3):164-75.
- March-Diaz R, Garcia-Dominguez M, Lozano-Juste J, Leon J, Florencio FJ, Reyes JC. Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in Arabidopsis. *Plant J* 2008 Feb;53(3):475-87.
- March-Diaz R, Reyes JC. The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. *Mol Plant* 2009 Jul;2(4):565-77.
- Marone D, Russo MA, Laido G, De Leonardis AM, Mastrangelo AM. Plant Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):7302-26.
- Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J. Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* 2007 Sep 7;130(5):851-62.
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, et al. Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics* 2010 Feb;283(2):185-96.
- Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, et al. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 2002 Jul 19;297(5580):403-5.
- Mlynarova L, Nap JP, Bisseling T. The SWI/SNF chromatin-remodeling gene *AtCHR12* mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. *Plant J* 2007 Sep;51(5):874-85.
- Moissiard G, Cokus SJ, Cary J, Feng S, Billi AC, Stroud H, et al. MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science* 2012 Jun 15;336(6087):1448-51.
- Molina C, Grotewold E. Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC Genomics* 2005;6:25.
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin MI, Martinez-Macias MI, Ariza RR, Roldan-Arjona T. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 May 2;103(18):6853-8.
- Morera S, Grin I, Vigouroux A, Couve S, Henriot V, Sapparbaev M, et al. Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyluracil-containing DNA. *Nucleic Acids Res* 2012 Oct;40(19):9917-26.

- Munzel M, Globisch D, Bruckl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakis S, et al. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010 Jul 19;49(31):5375-7.
- Murphy TM. What is base excision repair good for?: knockout mutants for FPG and OGG glycosylase genes in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 2005 Feb;123(2):227-232.
- Murphy TM, Gao MJ. Multiple forms of formamidopyrimidine-DNA glycosylase produced by alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *J Photochem Photobiol B* 2001 Aug 30;61(3):87-93.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* 2010 Feb;52(2):195-204.
- Nash HM, Bruner SD, Scharer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, et al. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 1996 Aug 1;6(8):968-80.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 2006 Apr 21;312(5772):436-9.
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 2008 Aug 15;321(5891):964-7.
- Nedderman AN, Stone MJ, Williams DH, Lin PK, Brown DM. Molecular basis for methoxyamine-initiated mutagenesis: 1H nuclear magnetic resonance studies of oligonucleotide duplexes containing base-modified cytosine residues. *J Mol Biol* 1993 Apr 5;230(3):1068-76.
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999 Sep;23(1):58-61.
- Nilsen H, Haushalter KA, Robins P, Barnes DE, Verdine GL, Lindahl T. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 2001 Aug 1;20(15):4278-86.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004 Jun;16(6):1365-77.
- Nishioka K, Ohtsubo T, Oda H, Fujiwara T, Kang D, Sugimachi K, et al. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced *OGG1* mRNAs. *Mol Biol Cell* 1999 May;10(5):1637-52.
- Ohtsubo T, Matsuda O, Iba K, Terashima I, Sekiguchi M, Nakabeppu Y. Molecular cloning of AtMMH, an *Arabidopsis thaliana* ortholog of the *Escherichia coli mutM* gene, and analysis of functional domains of its product. *Mol Gen Genet* 1998 Oct;259(6):577-90.
- Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, et al. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2000 Mar 15;28(6):1355-64.
- Olsen LC, Aasland R, Wittwer CU, Krokan HE, Helland DE. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J* 1989 Oct;8(10):3121-5.
- Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 2008 Jun 27;133(7):1145-8.
- Ortega-Galisteo AP, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldan-Arjona T. *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol* 2008 Aug;67(6):671-81.
- Owen RM, Baker RD, Bader S, Dunlop MG, Nicholl ID. The identification of a novel alternatively spliced form of the MBD4 DNA glycosylase. *Oncol Rep* 2007 Jan;17(1):111-6.

- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME. Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 2006 Jun;19(6):577-87.
- Pecinka A, Rosa M, Schikora A, Berlinger M, Hirt H, Luschnig C, et al. Transgenerational stress memory is not a general response in Arabidopsis. *PLoS One* 2009;4(4):e5202.
- Peng M, Cui Y, Bi YM, Rothstein SJ. AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in Arabidopsis. *Plant J* 2006 Apr;46(2):282-96.
- Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 17;104(16):6752-7.
- Peret B, De RB, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, et al. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* 2009 Jul;14(7):399-408.
- Perruc E, Kinoshita N, Lopez-Molina L. The role of chromatin-remodeling factor PKL in balancing osmotic stress responses during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 2007 Dec;52(5):927-36.
- Petermann E, Ziegler M, Oei SL. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2003 Oct 7;2(10):1101-14.
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. Control of Arabidopsis root development. *Annu Rev Plant Biol* 2012;63:563-90.
- Petronzelli F, Riccio A, Markham GD, Seeholzer SH, Genuardi M, Karbowski M, et al. Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol* 2000 Dec;185(3):473-80.
- Ponferrada-Marin MI, Parrilla-Doblas JT, Roldan-Arjona T, Ariza RR. A discontinuous DNA glycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res* 2011 Mar;39(4):1473-84.
- Pradillo M, Lopez E, Linacero R, Romero C, Cunado N, Sanchez-Moran E, et al. Together yes, but not coupled: new insights into the roles of RAD51 and DMC1 in plant meiotic recombination. *Plant J* 2012 Mar;69(6):921-33.
- Priest HD, Filichkin SA, Mockler TC. Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2009 Oct;12(5):643-9.
- Probst AV, Fransz PF, Paszkowski J, Mittelsten SO. Two means of transcriptional reactivation within heterochromatin. *Plant J* 2003 Feb;33(4):743-9.
- Qian W, Miki D, Zhang H, Liu Y, Zhang X, Tang K, et al. A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in Arabidopsis. *Science* 2012 Jun 15;336(6087):1445-8.
- Questa JI, Fina JP, Casati P. DDM1 and ROS1 have a role in UV-B induced- and oxidative DNA damage in *A. thaliana*. *Front Plant Sci* 2013;4:420.
- Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* 2008 Dec 26;135(7):1201-12.
- Raikhel N. Nuclear targeting in plants. *Plant Physiol* 1992 Dec;100(4):1627-32.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 25;96(11):6107-12.
- Ramiro-Merina A, Ariza RR, Roldan-Arjona T. Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 2013 Nov;12(11):890-8.

- Reddy AS. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol* 2007;58:267-94.
- Reddy AS, Day IS, Gohring J, Barta A. Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant Physiol* 2012 Jan;158(1):67-77.
- Reddy AS, Marquez Y, Kalyna M, Barta A. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* 2013 Oct;25(10):3657-83.
- Redei GP. Supervital Mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 1962 Apr;47(4):443-60.
- Reyes JL, Chua NH. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 2007 Feb;49(4):592-606.
- Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet* 1999 Nov;23(3):266-8.
- Riechmann JL. Transcriptional regulation: a genomic overview. *Arabidopsis Book* 2002;1:e0085.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 2009 Mar;66(6):981-93.
- Roeder AH, Yanofsky MF. Fruit development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 2006;4:e0075.
- Rogers PA, Eide L, Klungland A, Ding H. Reversible inactivation of *E. coli* endonuclease III via modification of its [4Fe-4S] cluster by nitric oxide. *DNA Repair (Amst)* 2003 Jul 16;2(7):809-17.
- Roldan-Arjona T, Garcia-Ortiz MV, Ruiz-Rubio M, Ariza RR. cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol* 2000 Sep;44(1):43-52.
- Roldan-Arjona T, Ariza RR. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat Res* 2009 Mar;681(2-3):169-79.
- Roux F, Touzet P, Cuguen J, Le C, V. How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* 2006 Aug;11(8):375-81.
- Rubio V, Bustos R, Irigoyen ML, Cardona-Lopez X, Rojas-Triana M, Paz-Ares J. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol Biol* 2009 Mar;69(4):361-73.
- Saez A, Rodrigues A, Santiago J, Rubio S, Rodriguez PL. HAB1-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008 Nov;20(11):2972-88.
- Samson L, Derfler B, Boosalis M, Call K. Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 15;88(20):9127-31.
- Sansom OJ, Zabkiewicz J, Bishop SM, Guy J, Bird A, Clarke AR. MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine. *Oncogene* 2003 Oct 16;22(46):7130-6.
- Santerre A, Britt AB. Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 15;91(6):2240-4.
- Saparbaev M, Laval J. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jun 21;91(13):5873-7.
- Sartori AA, Fitz-Gibbon S, Yang H, Miller JH, Jiricny J. A novel uracil-DNA glycosylase with broad substrate specificity and an unusual active site. *EMBO J* 2002 Jun 17;21(12):3182-91.

- Schmitz G, Theres K. Shoot and inflorescence branching. *Curr Opin Plant Biol* 2005 Oct;8(5):506-11.
- Schmitz RJ, Amasino RM. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* 2007 May;1769(5-6):269-75.
- Schmitz RJ, Tamada Y, Doyle MR, Zhang X, Amasino RM. Histone H2B deubiquitination is required for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C and for proper control of flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2009 Feb;149(2):1196-204.
- Schoft VK, Chumak N, Choi Y, Hannon M, Garcia-Aguilar M, Machlicova A, et al. Function of the DEMETER DNA glycosylase in the *Arabidopsis thaliana* male gametophyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 May 10;108(19):8042-7.
- Scortecci KC, Lima AF, Carvalho FM, Silva UB, gnez-Lima LF, Batistuzzo dM, Sr. A characterization of a MutM/Fpg ortholog in sugarcane--A monocot plant. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Oct 5;361(4):1054-60.
- Screaton RA, Kiessling S, Sansom OJ, Millar CB, Maddison K, Bird A, et al. Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr 29;100(9):5211-6.
- Shi L, Kent R, Bence N, Britt AB. Developmental expression of a DNA repair gene in Arabidopsis. *Mutat Res* 1997 Sep;384(3):145-56.
- Sjolund AB, Senejani AG, Sweasy JB. MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutat Res* 2013 Mar;743-744:12-25.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 1990 Aug;2(8):755-67.
- Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 2011 Jan;29(1):68-72.
- Song Y, Ji D, Li S, Wang P, Li Q, Xiang F. The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLoS One* 2012;7(7):e41274.
- Soppe WJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, et al. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J* 2002 Dec 2;21(23):6549-59.
- Spampinato CP, Gomez RL, Galles C, Lario LD. From bacteria to plants: a compendium of mismatch repair assays. *Mutat Res* 2009 Sep;682(2-3):110-28.
- Staiger D, Brown JW. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *Plant Cell* 2013 Oct;25(10):3640-56.
- Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *J Biol Chem* 2002 Oct 4;277(40):37741-6.
- Stirnberg P, van De SK, Leyser HM. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* 2002 Mar;129(5):1131-41.
- Sugio A, Dreos R, Aparicio F, Maule AJ. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *Plant Cell* 2009 Feb;21(2):642-54.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 2006 Aug;18(8):2051-65.

- Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* 2011 Jun 15;14(12):2491-507.
- Talpaert-Borle M, Liuzzi M. Base-excision repair in carrot cells. Partial purification and characterization of uracil-DNA glycosylase and apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease. *Eur J Biochem* 1982 Jun;124(3):435-40.
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, et al. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 1;88(11):4690-4.
- Tessadori F, van ZM, Pavlova P, Clifton R, Pontvianne F, Snoek LB, et al. Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 2009 Sep;5(9):e1000638.
- Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, Mathieu O, Paszkowski J, Vaillant I. Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS Genet* 2010 Oct;6(10):e1001175.
- Tsukaya H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *Int J Dev Biol* 2005;49(5-6):547-55.
- Turner DP, Cortellino S, Schupp JE, Caretti E, Loh T, Kinsella TJ, et al. The DNA N-glycosylase MED1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine. *Cancer Res* 2006 Aug 1;66(15):7686-93.
- Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res* 2009 Mar;681(2-3):134-49.
- Uchiyama Y, Kimura S, Yamamoto T, Ishibashi T, Sakaguchi K. Plant DNA polymerase lambda, a DNA repair enzyme that functions in plant meristematic and meiotic tissues. *Eur J Biochem* 2004 Jul;271(13):2799-807.
- van der Kemp PA, Thomas D, Barbey R, de OR, Boiteux S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 May 28;93(11):5197-202.
- Verwoerd TC, Dekker BM, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res* 1989 Mar 25;17(6):2362.
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 1999 Sep;23(1):62-6.
- Walley JW, Rowe HC, Xiao Y, Chehab EW, Kliebenstein DJ, Wagner D, et al. The chromatin remodeler SPLAYED regulates specific stress signaling pathways. *PLoS Pathog* 2008 Dec;4(12):e1000237.
- Walton JD. HC-toxin. *Phytochemistry* 2006 Jul;67(14):1406-13.
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005 Aug;17(8):2204-16.
- Wang LC, Wu JR, Chang WL, Yeh CH, Ke YT, Lu CA, et al. *Arabidopsis* HIT4 encodes a novel chromocentre-localized protein involved in the heat reactivation of transcriptionally silent loci and is essential for heat tolerance in plants. *J Exp Bot* 2013 Apr;64(6):1689-701.
- Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H. DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell* 1996 Sep 6;86(5):709-18.
- Whalen MC, Innes RW, Bent AF, Staskawicz BJ. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* 1991 Jan;3(1):49-59.

- Wight WD, Kim KH, Lawrence CB, Walton JD. Biosynthesis and role in virulence of the histone deacetylase inhibitor depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 2009 Oct;22(10):1258-67.
- Wong E, Yang K, Kuraguchi M, Werling U, Avdievich E, Fan K, et al. Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12;99(23):14937-42.
- Woo HR, Pontes O, Pikaard CS, Richards EJ. VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev* 2007 Feb 1;21(3):267-77.
- Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu CW, Chaikam V. HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in Arabidopsis. *J Exp Bot* 2008;59(2):225-34.
- Wu P, Qiu C, Sohail A, Zhang X, Bhagwat AS, Cheng X. Mismatch repair in methylated DNA. Structure and activity of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of methyl-CpG-binding protein MBD4. *J Biol Chem* 2003 Feb 14;278(7):5285-91.
- Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, Samson LD. 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays* 1999 Aug;21(8):668-76.
- Yaish MW, Peng M, Rothstein SJ. AtMBD9 modulates Arabidopsis development through the dual epigenetic pathways of DNA methylation and histone acetylation. *Plant J* 2009 Jul;59(1):123-35.
- Yaish MW, Colasanti J, Rothstein SJ. The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *J Exp Bot* 2011 Jul;62(11):3727-35.
- Yang Z, Waldman AS, Wyatt MD. DNA damage and homologous recombination signaling induced by thymidylate deprivation. *Biochem Pharmacol* 2008 Oct 15;76(8):987-96.
- Yao Y, Bilichak A, Golubov A, Kovalchuk I. ddm1 plants are sensitive to methyl methane sulfonate and NaCl stresses and are deficient in DNA repair. *Plant Cell Rep* 2012 Sep;31(9):1549-61.
- Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, et al. Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Feb 5;110(6):2389-94.
- Zhang W, Liu Z, Crombet L, Amaya MF, Liu Y, Zhang X, et al. Crystal structure of the mismatch-specific thymine glycosylase domain of human methyl-CpG-binding protein MBD4. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Sep 2;412(3):425-8.
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. *Cell* 2006 Sep 22;126(6):1189-201.
- Zhang XC, Gassmann W. Alternative splicing and mRNA levels of the disease resistance gene RPS4 are induced during defense responses. *Plant Physiol* 2007 Dec;145(4):1577-87.
- Zhao D, Yang M, Solava J, Ma H. The ASK1 gene regulates development and interacts with the UFO gene to control floral organ identity in Arabidopsis. *Dev Genet* 1999 Sep;25(3):209-23.
- Zharkov DO. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* 2008 May;65(10):1544-65.
- Zharkov DO, Mechetin GV, Nevinsky GA. Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition. *Mutat Res* 2010 Mar 1;685(1-2):11-20.
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K. HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. *Plant Cell* 2005 Apr;17(4):1196-204.
- Zhou J, Wang X, He K, Charron JB, Elling AA, Deng XW. Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol Biol* 2010 Apr;72(6):585-95.

Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 2007 Mar 9;3(3):e37.

Zhu B, Zheng Y, Angliker H, Schwarz S, Thiry S, Siegmann M, et al. 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* 2000b Nov 1;28(21):4157-65.

Zhu B, Zheng Y, Hess D, Angliker H, Schwarz S, Siegmann M, et al. 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5135-9.

Zhu J, Jeong JC, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, et al. Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Mar 25;105(12):4945-50.

Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 2009;43:143-66.

Zilberman D, Henikoff S. Epigenetic inheritance in Arabidopsis: selective silence. *Curr Opin Genet Dev* 2005 Oct;15(5):557-62.

Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 2007 Jan;39(1):61-9.