



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**Actividad *in vivo* de la ADN glicosilasa  
MBD4L de Arabidopsis bajo condiciones  
de estrés**

**Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas**

**Autor: Lic. José Roberto Torres**

**Directora de Tesis: Dra. María Elena Álvarez**

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba  
(CIQUIBIC-CONICET)

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

2022

**Director de Tesis:**

**Dra. María Elena Álvarez**  
**Prof. Titular FCQ UNC-Inv. Principal CONICET**  
**CIQUIBIC-CONICET**

**Comisión de Tesis:**

**Dr. José Luis Bocco**  
**Prof. Titular Plenario UNC-Inv. Superior CONICET**  
**CIBICI-CONICET**

**Dr. Carlos Argaraña**  
**Prof. Emérito UNC-Inv. Superior CONICET**  
**CIQUIBIC-CONICET**

**Dr. Ramón Asis**  
**Prof. Adjunto FCQ UNC-Inv. Independiente CONICET**  
**CIBICI-CONICET**

**Evaluador Externo:**

**Dra. Claudia Spampinato**  
**Prof. Adjunta FBIOyF UNR-Inv. Independiente CONICET**  
**CEFOBI-CONICET**

Esta Tesis de Doctorado fue realizada con el financiamiento y 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

- A mi mamá MET que siempre estuvo a mi lado apoyandome en mis decisiones y brindandome todo su amor. Muchas gracias por todo, y por transmitirme el amor por las plantas desde niño. Este camino no hubiese sido el mismo sin su presencia. Esta tesis ésta dedicada especialmente para ella.
- A mi hermano mayor MT por ser el mejor hermano, siempre buscando mí bien, ser mi guía, y trasmitirme su experiencia y sabiduría.
- A mis sobrinxs JPT, FT, JT, CT, JV por alegrarme los días, y estar siempre pendientes de mi vida.
- A mis abuelos LI y MT, que siempre estan presentes en mi corazón. Aún recuerdo cuando de pequeño mi abuela me decia que iba a ser doctor.
- A mis hermanos MT y LT que me hicieron el aguante viajando en auto las primeras veces que vine a Córdoba, y que de un momento a otro ya me habian conseguido hasta hospedaje.
- A los decanos de Córdoba, con quienes comparti muy lindos momentos y me hicieron sentir que estaba en Tucumán.
- A mis amigxs de Tucumán, que cada vez que volvia a Tucumán era como si nunca me hubiese ido. Alentandome continuamente a seguir con mis metas.
- A mis psicólogas, flor y vir, las cuales me ayudaron a ver las cosas de otra manera. Sin dudas contribuyeron a mejorar mi bienestar durante esta tesis.
- A todos mis amigxs de Córdoba, con quienes pase momentos inolvidables, y tuve la suerte de conocerlos. Gracias por toda esa compania y compartir. Los chicxs de la resi, fútbol, facu, inglés, de la vida, etc.
- A angi por su incondicionalidad y amor. Gracias por escucharme hablar horas sobre mis hipótesis y proyectos. Gracias por estar y acompañarme siempre.
- A romi que me brindo toda su experiencia sobre la tesis. Gracias por los constantes consejos.
- A nico cecchini por haberme cambiado la forma de ver la ciencia. Por haber sido un ejemplo a seguir. Gracias por haber estado siempre predispuesto a escucharme, enseñarme y trasmitirme tus conocimientos. Gracias de verdad por acompañarme y alentarme a seguir en este camino.
- A mis compañerxs de laboratorio por su compania y haber bancado mis cambios de humor constantes. Sin dudas con su presencia hicieron que mi estadia en el laboratorio sea enriquecedora. A silvina y yani las cuales con mucha dedicación me enseñaron mis primeras técnicas de biología molecular. Al damián por



transmitirme su pasión por la ciencia. Al Nacho por las discusiones sobre ciencia, la verdad que aprendí muchísimo de su experiencia y su presencia en el laboratorio fue muy favorable para mi tesis. A Mica por bancarme en las clases de biotec, escucharme y alentarme a seguir en mi camino. A Ana C por su buena energía y solidaridad siempre, y por su compañía en los largos días de trabajo. A FN por su constante buen humor, y brindarme su experiencia para mejorar mis experimentos. A FB por su solidaridad y empatía constante, siempre dispuesta a ayudarme. A Geor por tener siempre los conocimientos frescos y transmitir su pasión por la ciencia.

- A la Agus por hacerme el aguante tantos años en las clases de biotec.
- A Malena por haberme abierto las puertas del laboratorio y así poder conocer mucha gente interesante. Por haberme hecho conocer y estudiar un tema tan interesante como la epigenética. Por haberme enseñado a hacer mis primeros cálculos para preparar soluciones. Por las miles de discusiones que me ayudaron mucho a avanzar y proyectar mi camino. Por estar siempre dispuesta a charlar y sugerir cosas. Por sus correcciones científicas de la tesis, resúmenes, etc, que realmente me sirvieron para mejorar. Por haberme apoyado en mis participaciones a las olimpiadas de CONICET.
- Al Dr. Gus Nores por sus consejos y haber sido siempre solidario conmigo.
- Al Dr. C Mas por los consejos y las charlas que teníamos mientras estaba en el microscopio.
- A todos los científicos que conocí me inspiraron a seguir en ciencia.
- A todos los integrantes del CIQUIBIC que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano en lo que necesitaba. Muchas gracias a todos.
- Al CONICET por haberme otorgado la beca doctoral
- A la Dra. Schiavone que siempre me alentó para que haga el doctorado, y se puso muy contenta cuando lo empecé.
- A los olímpicos del CONICET con quien compartí momentos muy lindos en cada uno de los entrenamientos y competencias. A los amigos que me lleve de allí.
- A la provincia de Córdoba por ser tan linda y cómoda para vivir. Gracias.
- Al Club Atlético Tucumán (CAT) por los años de gloria que pasamos durante el período de la tesis. Muchas lágrimas y alegría.
- A la científica que me brindó sus tips para poner a punto el ensayo cometa. Gracias por tu ayuda.
- A los integrantes de la comisión de tesis, quienes siempre tuvieron una buena predisposición. Muchas gracias por sus aportes y por haberme agilizado las cosas cuando se los pedí.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN</b> .....	13
Agentes que inducen daño en el ADN.....	13
Vías de reparación del ADN en plantas.....	14
Mecanismos de detección y reparación del ADN .....	26
Reparación del ADN mitocondrial (ADNmt).....	31
Posibles sustratos de MBD4L <i>in vivo</i> .....	33
<b>CROMATINA Y METILACIÓN</b> .....	36
Características principales de la cromatina .....	36
Estados de la cromatina.....	37
Metilación del ADN.....	37
Desmetilación activa del ADN .....	39
Cromocentros de Arabidopsis .....	39
Daño del ADN en regiones heterocromáticas.....	40
Reparación del ADN en contextos de cromatina .....	41
<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>RESULTADOS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO I: ACTIVIDAD DE LA ADN GLICOSILASA MBD4L BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS GENOTÓXICO</b> .....	46
Caracterización molecular de mutantes del gen At3G07930 ( <i>MBD4L</i> ).....	46
Niveles de expresión de MBD4L en mutantes <i>mbd4l</i> .....	47
Respuesta de mutantes <i>mbd4l</i> a agentes genotóxicos .....	48
Germinación en 5-FU.....	48
Crecimiento de plántulas en 5-FU .....	51
Respuesta de plantas con niveles elevados de <i>MBD4L</i> a 5-FU .....	57
Germinación en 5-FU.....	57
Crecimiento de plántulas MBD4L-OE en 5-FU (sin trasplante).....	58
Crecimiento de plántulas MBD4L-OE <sup>330-445</sup> en 5-FU (sin trasplante).....	59
Muerte celular en mutantes de <i>mbd4l-1</i> expuestas a 5-FU .....	60
Reparación del ADN en mutantes <i>mbd4l-1</i> sometidas a 5-FU .....	62
Niveles de expresión de genes del BER en mutantes <i>mbd4l-1</i> expuestas a 5-FU .....	65

<b>CAPÍTULO II: CONTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LAS ADN GLICOSILASAS MBD4L y AtUNG EN LA REPARACIÓN DEL ADN NUCLEAR <i>IN VIVO</i></b> .....	67
Caracterización molecular de la mutante de <i>AtUNG</i> (At3G18630).....	68
Expresión de <i>AtUNG</i> en mutantes <i>ung</i> .....	69
Localización subcelular de <i>AtUNG</i> .....	71
Co-localización de <i>AtUNG</i> y <i>MBD4L</i> en núcleo .....	75
Análisis de regulación transcripcional entre <i>AtUNG</i> y <i>MBD4L</i> .....	76
<i>In silico</i> .....	76
<i>In vivo</i> .....	80
Reparación del ADN en mutantes <i>ung</i> sometidas a agentes genotóxicos .....	80
5-FU.....	80
5-BrU .....	82
<b>CAPÍTULO III: PARTICIPACIÓN DE MBD4L EN LAS ALTERACIONES DE LA HETEROCROMATINA CENTROMÉRICA Y GENERACIÓN DE CORTES EN EL ADN BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN CON <i>PSEUDOMONAS</i></b> .....	89
Caracterización de las mutantes de <i>AtOGG1</i> y <i>AtFPG</i> .....	89
Descondensación de cromocentros en mutantes <i>ogg1</i> y <i>fpg</i> .....	90
Rupturas en el ADN de <i>mbd4l</i> , <i>ogg1</i> y <i>fpg</i> infectadas con <i>Pst</i> .....	92
Blancos genómicos de <i>MBD4L</i> bajo condiciones de estrés biótico .....	94
Metilación de la secuencia pericentromérica 5S rDNA.....	101
<b>DISCUSIÓN</b> .....	105
Actividad <i>in vivo</i> de <i>MBD4L</i> en presencia de agentes genotóxicos.....	106
Participación de <i>MBD4L</i> en la estructura de la heterocromatina centromérica y rupturas del ADN en respuesta a estrés biótico.....	109
Blancos genómicos de <i>MBD4L</i> en respuesta a <i>Pst</i> .....	110
<b>CONCLUSIONES</b> .....	113
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	116
1- Condiciones de crecimiento de las plantas.....	117
2- Tratamientos con 5-FU y 5-BrU .....	117
2.1- Sin trasplante.....	117
2.2- Con trasplante.....	117
2.3- Medición de raíces .....	118
3- Tratamientos con <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000 ( <i>Pst</i> ) .....	118
4- Muerte celular.....	118
5- Ensayo cometa.....	119
5.1- Etapas del ensayo.....	119
5.2- Controles positivos.....	120
5.3- Detección de cometas.....	120
5.4- Cuantificación del ADN fragmentado.....	121
5.5- Protocolo optimizado para ensayos cometa .....	121

6- Extracción de ácidos nucleicos.....	122
6.1- Pulverización de las muestras.....	122
6.2- Extracción de ADN genómico.....	122
6.3- Extracción de ARN.....	123
7- RT-PCR.....	124
8- sqRT-PCR.....	124
9- Clonado de ADN glicosilasas.....	125
10- Expresión de <i>AtUNG</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Arabidopsis</i> .....	126
11- Microscopía confocal.....	127
11.1- Localización subcelular de 35S:AtUNG-GFP, 35S:AtUNG-RFP, 35S:MBD4L.3-RFP y 35S:MBD4L.4-RFP en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	127
11.2- Localización subcelular de 35S:AtUNG-GFP en tejidos de <i>Arabidopsis</i> .....	127
12- Determinación del contenido de heterocromatina nuclear .....	127
12.1- Número de cromocentros.....	127
12.2- Índices de heterocromatina .....	128
13- Ensayos de metilación.....	128
13.1- CHOP-PCR.....	128
13.2- Southern blot.....	128
13.3- Bisulfito .....	129
13.3.1- Clonado de productos de PCR bisulfitados .....	129
13.3.2- Alineamiento de secuencias bisulfito.....	130
14. Estadística y gráficos.....	130
<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	131
<b>ANEXOS</b> .....	141
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	148

**RESUMEN**

Las ADN glicosilasas son enzimas que catalizan el primer paso del sistema de reparación de bases por escisión (BER). En plantas, un homólogo de la enzima MBD4 de humanos llamada MBD4L tiene la capacidad de reconocer y escindir timina, uracilo y derivados halogenados de uracilo (5-FU, 5-BrU y 5-hmU) *in vitro*. La timina y el uracilo pueden ser generados por la desaminación de 5mC y C, respectivamente, mientras que 5-hmU se genera por desaminación/oxidación de 5mC. Esas bases modificadas podrían formarse durante condiciones de estrés. Como MBD4L presenta localización nuclear, la enzima podría reconocer y escindir tales bases modificadas del ADN genómico *in vivo*.

En este trabajo de tesis Doctoral se estudió la actividad *in vivo* de MBD4L y el efecto fenotípico de mutantes para el gen que codifica esta enzima bajo condiciones de estrés genotóxico por 5-FU y 5-BrU, y estrés biótico causado por infección bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* -*Pst*). Determinamos el rol diferencial entre MBD4L y AtUNG, otra ADN glicosilasa con capacidad de reconocer U *in vitro*. Nuestros resultados muestran que las mutantes *mbd4l* presentan niveles bajos de ADN fragmentado en presencia de 5-FU y 5-BrU. Curiosamente, estas plantas presentan un crecimiento reducido y una elevada muerte celular en sus ápices radicales. Por otro lado, determinamos que AtUNG está presente en el núcleo, y es activa en presencia de 5-FU, pero no frente a 5-BrU.

Por otra parte, debido a que MBD4L promueve la descondensación de cromocentros (CCs) en presencia de *Pst*, analizamos si otras ADN glicosilasas, que responden a daños oxidativos, podrían también participar de este proceso. Además, evaluamos qué relación existe entre la descondensación de CCs y la reparación del ADN bajo estas condiciones. En primer lugar, demostramos que OGG1 y FPG no son esenciales para descondensar los CCs en presencia de *Pst*. Por ello, MBD4 y OGG1/FPG tienen efectos diferenciales en la descondensación de CCs y reparación del ADN en respuesta a *Pst*. Más aún, MBD4L sería la principal ADN glicosilasa que media la reparación y alteración de la heterocromatina centromérica en plantas sometidas a este estrés biótico.

Finalmente analizamos los blancos genómicos de MBD4L. Para ello, seleccionamos secuencias peri/centroméricas (heterocromatina) y distales al centrómero (eucromatina) para evaluar los niveles de metilación bajo condiciones de daño de bases por desaminación y/o oxidación de 5mC (*Pst*). En mutantes *mbd4l* detectamos hipermetilación de secuencias peri/centroméricas tratadas con *Pst*. Sin embargo, también observamos hipometilación en algunos loci distales al centrómero. Estos resultados nos sugieren que MBD4L tendría un efecto dual (desmetilación y re-metilación) en la regulación de la metilación del ADN, dependiendo de las características de la cromatina en la que actúa.

Durante esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

- Cambiagno DA, **Torres JR** and Alvarez ME (2021). “Covergent Epigenetic Mechanisms Avoid Constitutive Expression of Immune Receptor Gene Subsets”. *Front. Plant Sci.* 12:703667. Doi: 10.3389/fpls.2021.703667
- Cecchini NM, **Torres JR**, Lescano López I, Cobo S, Nota F and Alvarez ME (2022). “Alternative Splicing of an Extron determines the subnuclear localization of the Arabidopsis DNA-glycosylase MBD4L under heat stress”. *The Plant Journal* <https://doi.org/10.1111/tpj.15675>
- **Torres JR**, Lescano López I and Alvarez ME (2022). “The functional activity of the Arabidopsis DNA-glycosylase MBD4L *in vivo*”. Manuscrito en preparación.

## ABREVIATURAS

- 3'P:** 3'-fosfato
- 3'PUA:** *3'-phospho- $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde*
- 5'dRP:** 5'-desoxirribosa-fosfato
- 5-BrU:** 5-bromouracilo
- 5-BrdU:** 5-deoxibromouridina
- 5-FU:** 5-fluorouracilo
- 5mC:** 5-metilcitosina
- 5hmC:** 5-hidroximetilcitosina
- 5-hmU:** 5-hidroximetiluracilo
- A:** Adenina
- ADNss:** AND simple cadena
- AP:** Apurínico/Apirimidínico
- APE1L:** *AP Endonuclease Like 1*
- ARP:** *Apurinic Endonuclease Redox*
- ATM:** *Ataxia Telangiectasia Mutated*
- MBD4L:** *Methyl Binding Domain 4- Like*
- ATR:** *RAD53-related*
- AtUNG:** *Arabidopsis thaliana Uracil DNA glycosylase*
- BER:** *Base Excision Repair*; Reparación por escisión de bases
- BRCA1:** *Breast Cancer 1*
- C:** Citosina
- CCs:** Cromocentros
- DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DSB:** *Double Strand Break*; rupturas dobles en hebras del ADN
- DSBR:** *Double Strand Break Repair*
- DDR:** *DNA Damage Response*; respuesta al ADN dañado
- DRM:** Región Metilada Diferencialmente
- dTMP:** desoxitimina-monofosfato
- dTTP:** desoxitimina-trifosfato
- dUMP:** desoxiuridina-monofosfato
- dUTP:** desoxiuridina-trifosfato
- FPG:** *Formamidopyrimidine DNA Glycosylase*
- GFP:** Proteína Fluorescente Verde
- HhH-GPD:** *Helix hairpin Helix-Glycine Proline Aspartic*
- hMBD4:** *human Methyl Binding Domain 4*
- HX:** *Heterochromatin Index*; índice de heterocromatina



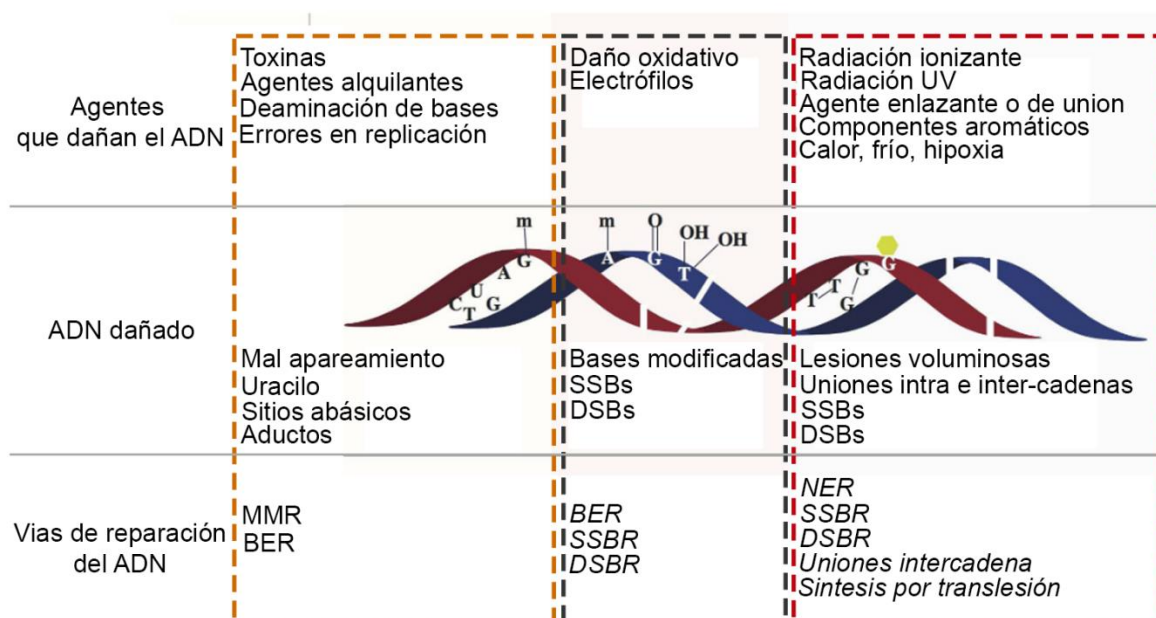
**IP:** Ioduro de Propidio  
**LIG1:** *DNA Ligase 1*  
**MBD4L:** *Methyl Binding Domain 4-like*  
**MMR:** *Mismatch Repair*  
**MutS:** *Mismatch DNA repair protein*  
**MRE11:** *Meiotic Recombination 11/Double-strand break repair protein*  
**MSH6:** *MutS Homolog 6*  
**MV:** Metil Viológeno  
**NER:** *Nucleotide Excision Repair*  
**NHEJ:** *Non-Homologous End Joining*  
**NLS:** *Nuclear Localization Signal*  
**OGG1:** *8-oxoguanine DNA glycosylase 1*  
**PARP2:** *Poly ADP-Ribose Polymerase 2*  
**PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen*  
**PQ:** Paraquat  
**Pol B:** *DNA polymerase Beta*  
*Pst. Pseudomonas syringae pv. tomato*  
**QC:** Centro Quiescente  
**RdDM:** *RNA directed DNA Methylation*; Metilación del ADN dirigida por ARN  
**RFH:** *Relative Heterochromatin Fraction*; fracción de heterocromatina relativa  
**ROS:** Especies reactivas del oxígeno  
**ROS1:** *Represor of Silencing 1*  
**SA:** Salicylic Acid; Ácido Salicílico  
**SMUG1:** *Single strand selective Monofunctional Uracil DNA glycosylase*  
**SQ:** Motivos Serina-Glutamina  
**SSB:** *Single Strand Break*; ruptura simple en una hebra de ADN  
**T:** Timina  
**TDG:** *Thymine DNA glycosylase*  
**UDGs:** *Uracil DNA Glycosylase*  
**U:** Uracilo  
**WEE1:** *WEE1 G2 checkpoint kinase*  
**ZDP:** *Zink 4 finger DNA 3'-phosphoesterase*

# **INTRODUCCIÓN**

## REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN

### Agentes que inducen daño en el ADN

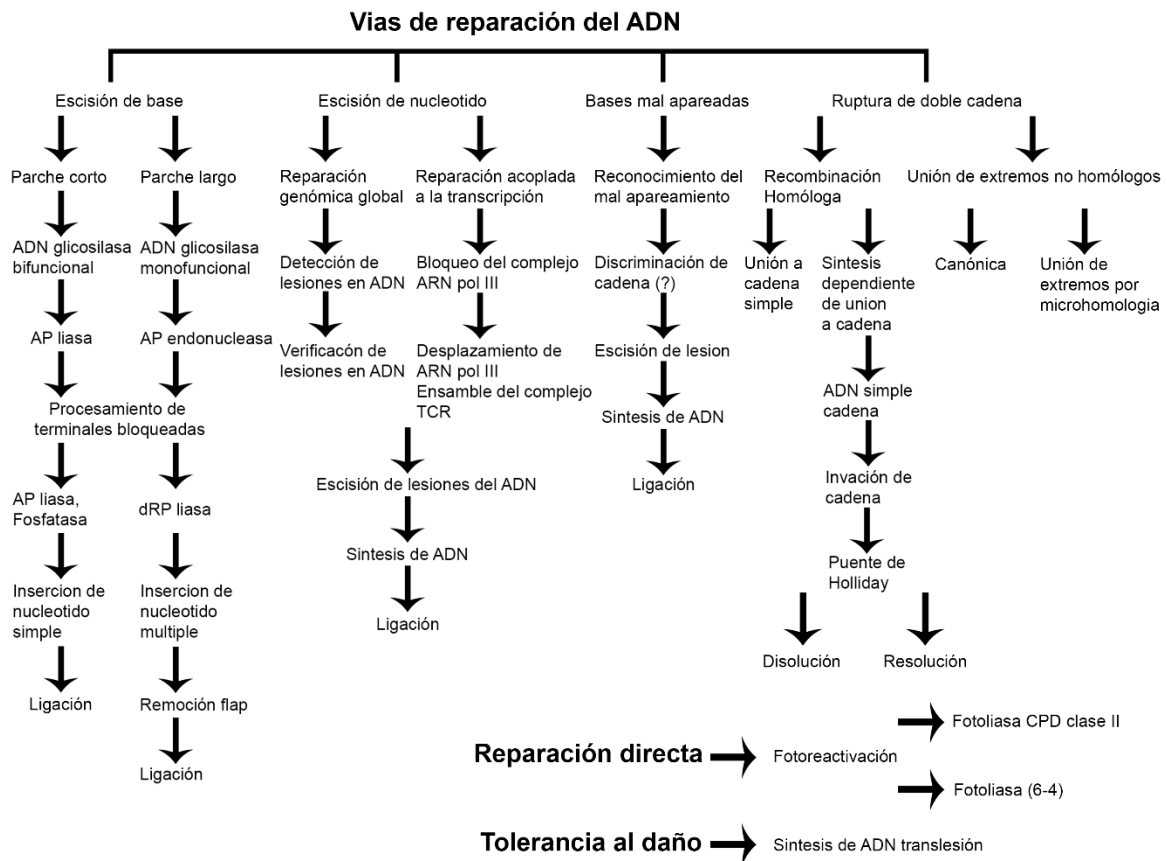
Las plantas al ser organismos sésiles están constantemente expuestas a agentes genotóxicos exógenos (e.g. radiación UV-B, radiación ionizante, químicos mutagénicos, temperatura y salinidad extrema, sequía), y también a factores endógenos tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS) o agentes alquilantes que inducen diferentes tipos de lesiones en el ADN (Roy et al. 2009; Roy, Choudhury, y Das 2012; Tuteja et al. 2009; Waterworth et al. 2011; Yoshiyama, Sakaguchi, y Kimura 2013) (Fig. 1). Si las lesiones en el ADN no son reparadas, pueden llegar a interrumpir las funciones celulares normales y afectar severamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los diferentes tipos de estrés ambiental pueden potencialmente contribuir a varias formas de lesiones en el ADN, como los cortes de simple (SSB) y doble cadena (DSB), uniones intra e inter-cadenas, y generación de sitios Apurínicos/Apirimidínicos (AP) (Balestrazzi et al. 2010). De estas variadas formas de daño, los DSB son considerados una de las lesiones más serias (West et al. 2004). Las células que se dividen activamente en la zona meristemática de la raíz y tallo son drásticamente afectadas por DSB (Fulcher and Sablowski 2009; Waterworth et al. 2011). Además, el ADN que presenta DSB, genera pérdidas de fragmentos cromosómicos durante la mitosis, por lo que las células indiferenciadas que se dividen activamente heredan esos defectos cromosómicos y generan una población de células mutantes. Las mutaciones que se generan por deleciones cromosómicas pueden inhibir los procesos de replicación y transcripción, que en última instancia afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta debido a pérdidas de la viabilidad celular (Fulcher y Sablowski 2009; Waterworth et al. 2011). Por esto, una eficiente detección y reparación de daños en el genoma resulta fundamental para mantener la integridad genómica bajo condiciones de estrés genotóxico.



**Figura 1. Principales agentes de daño al ADN y vías de reparación del ADN.** Modificado de Chatterjee y Walker 2017. SSBs: rupturas simples en una hebra del ADN. DSBs: rupturas dobles en hebras del ADN. MMR: reparación de bases mal apareadas. BER: reparación por escisión de base. NER: reparación por escisión de nucleótido. SSBR: reparación de rupturas simples en una hebra del ADN. DSBR: reparación de rupturas dobles en hebras del ADN.

## Vías de reparación del ADN en plantas

Los principales mecanismos de reparación del ADN en plantas son: reparación directa, reparación por escisión de base (BER), reparación por escisión de nucleótido (NER), reparación de bases mal apareadas (*Mismatch Repair*, MMR) y la reparación de rupturas dobles en el ADN (DSBR): recombinación homóloga (*Homologous Recombination*; HR) y unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining*; NHEJ) (Verma et al. 2020; Manova y Gruszka 2015) (Fig. 2).



**Figura 2. Vías de reparación del ADN en plantas.** Modificado de Verma et al. 2020.

## Reparación directa

La reparación directa involucra una reversión directa de las lesiones del ADN mediante reacciones enzimáticas, por lo que esta vía está libre de errores. El daño en el ADN generado por radiaciones ultravioletas (UV) puede ser reparado a través de una reparación directa dependiente (fotoreparación) o independiente (reparación oscura) de la luz. La fotorreactivación es uno de los mecanismos de reparación del ADN mejor estudiados en plantas, y es llevada a cabo por fotoliasas (Maul et al. 2008; Hitomi et al. 2012).

## Reparación por escisión de nucleótido (NER)

El NER es el principal mecanismo de reparación del ADN conservado entre los eucariotas, que se encarga de reparar lesiones simples o voluminosas del ADN inducidas por luz UV. La reparación por NER puede operar a nivel global (la lesión genera cambios en la estructura del ADN) y de transcripción (la lesión induce una inhibición de la transcripción) basado en el modo de identificación del daño del ADN. El NER involucra una serie de

pasos, tales como el reconocimiento de la lesión, verificación, escisión, síntesis de ADN y ligación (Verma et al. 2020; Canturk et al. 2016) (Fig. 2).

### **Reparación de bases mal apareadas (MMR)**

Este mecanismo corrige los apareamientos incorrectos que se generan en el ADN debido a la incorporación errónea de nucleótidos durante la replicación y recombinación. Los eventos moleculares del proceso en eucariotas fueron descifrados a partir del conocimiento del mismo en procariotas (Li 2008). Los principales participantes del MMR de *E. coli* y otras bacterias son las proteínas MutS y MutL (homodimérica) (Lamers, Winterwerp, y Sixma 2003; Spampinayo y Modrich 2000), y MutH (monomérica) (Ban y Yang 1998). MutS identifica la lesión y recluta a MutL, la cual a su vez recluta y activa a MutH. MutH distingue entre la cadena hija y parental uniéndose a la secuencia GATC hemimetilada más cercana (del lado 3' o 5') a la lesión (Lahue et al., 1989). A la unión de MutS le sigue la incisión de la cadena hija y el reclutamiento de otras enzimas entre las que se incluyen helicasas, exonucleasas, polimerasas y ligasas para completar el proceso de reparación (Li 2008). En eucariotas, solo se encuentran homólogos de MutS (MSH) (Culligan y Hays 2000) y MutL (MLH) (Wang, Kleckner, y Hunter 1999) (Fig. 2).

### **Reparación de rupturas dobles en el ADN (DSBR)**

Las rupturas de doble cadena (DSBs) son el tipo más letal de daño en el ADN. Existen dos mecanismos de reparación de DSBs: las vías del HR y NHEJ, que actúan conjuntamente. La reparación de DSBs por HR requiere información de secuencias homólogas, mientras que NHEJ no precisa ninguna información de secuencia por lo que es más propenso a generar errores comparado con HR (Manova y Gruzka 2015).

### **Recombinación Homóloga (HR)**

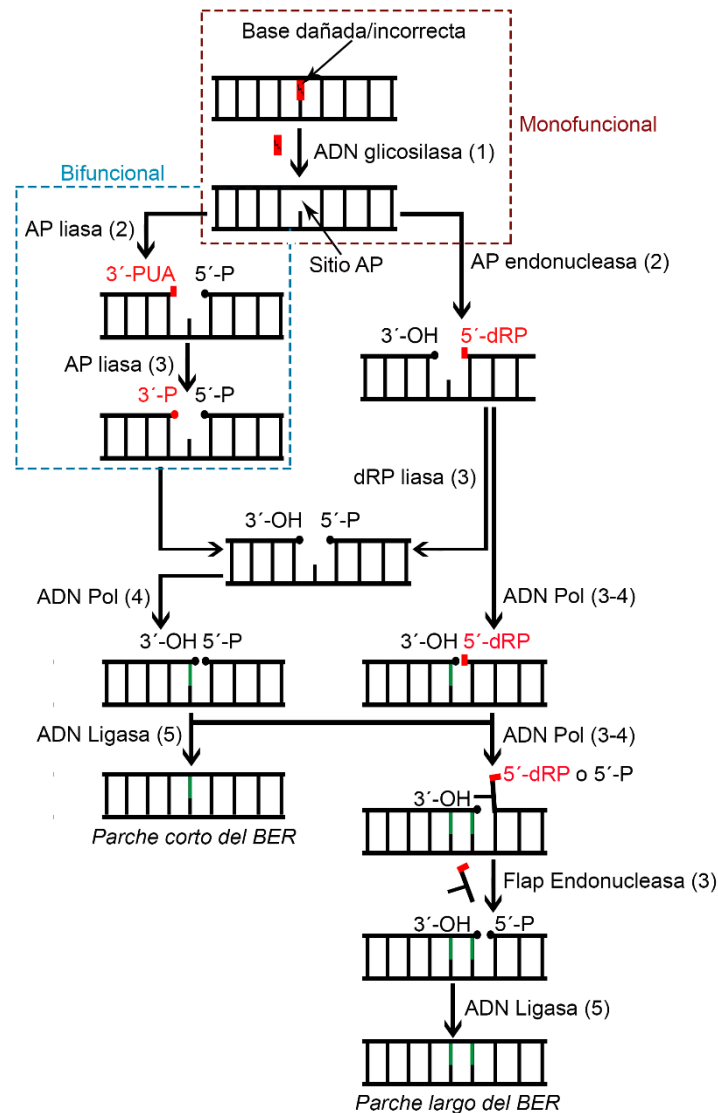
Este proceso tiene un rol importante en la reparación del ADN en células somáticas de planta, el cual opera mayormente durante las fases S y G2 del ciclo celular. Las dos principales vías HR- dependiente de reparación de DSBs en células somáticas de plantas son: unión a cadena simple (SSA) y síntesis dependiente de unión a cadena (SDSA) (Puchta 2005; Manova y Gruszka 2015). La reparación por SSA tiene lugar cuando los DSBs se encuentran entre secuencias homólogas (Puchta 2005), mientras que SDSA actúa sobre secuencias homólogas presentes en cromátidas hermanas o cromosomas homólogos (Akutsu et al. 2007) (Fig. 2).

**Unión de extremos no homólogos (NHEJ)**

A pesar de que la reparación de DSBs por NHEJ es independiente de la secuencia y también propensa a cometer errores, es el método más eficiente de reparación de DSBs en plantas (Puchta 2005). En el mecanismo canónico NHEJ, el heterodímero ku70/ku80 se une a los extremos de DSBs para evitar una mayor degradación y acercarlos. Una vía alternativa del NHEJ altamente mutagénica, la *Microhomology Mediated End Joining* (MMEJ), que utiliza secuencias micro-homólogas a las terminaciones de ADN para reparar los DSBs (Wang y Xu 2017) (Fig. 2).

**Reparación por escisión de base (BER)**

El sistema BER es un mecanismo que remueve bases mal apareadas o dañadas por oxidación, alquilación o desaminación (Krokan y Bjørås 2013). El BER en todos los casos es iniciado por una ADN glicosilasa que reconoce y escinde la base incorrecta o dañada, y cuenta con una serie de reacciones en donde se generan intermediarios de ADN, para finalmente incorporar una base correcta o sana. El sistema BER es un mecanismo complejo que tiene lugar en varios pasos: 1) reconocimiento y escisión de la base dañada, y generación de un sitio AP, 2) clivaje del esqueleto azúcar-fosfato en el sitio abásico, 3) procesamiento de los extremos de ADN resultantes, 4) síntesis de ADN, y 5) ligado del ADN (Fig. 2; Fig. 3).



**Figura 3. Sistema de reparación por escisión de base (BER) en plantas.** Adaptado de Roldán-Arjona, Ariza y Córdoba-Cañero 2019. (1) ADN glicosilasa reconoce y escinde una base dañada, dejando un sitio abásico (AP). (2) ADN glicosilasa bifuncional con actividad liasa o AP endonucleasa cliva el esqueleto azúcar-fosfato en el sitio AP. (3) Procesamiento enzimático de los extremos de ADN resultantes: 3'-P o 5'-dRP que bloquean la síntesis y ligado del ADN, respectivamente. (4) Síntesis de ADN mediado por una ADN polimerasa (Pol). (5) Ligado de los extremos 3'-OH y 5'-P por una ADN ligasa. Parche corto del BER: incorporación de 1 nucleótido. Parche largo del BER: incorporación de más de 1 nucleótido. Cuadro con punteado rojo: escisión de base por ADN glicosilasa monofuncional. Cuadro con punteado celeste: escisión de sitio AP por ADN glicosilasa bifuncional.



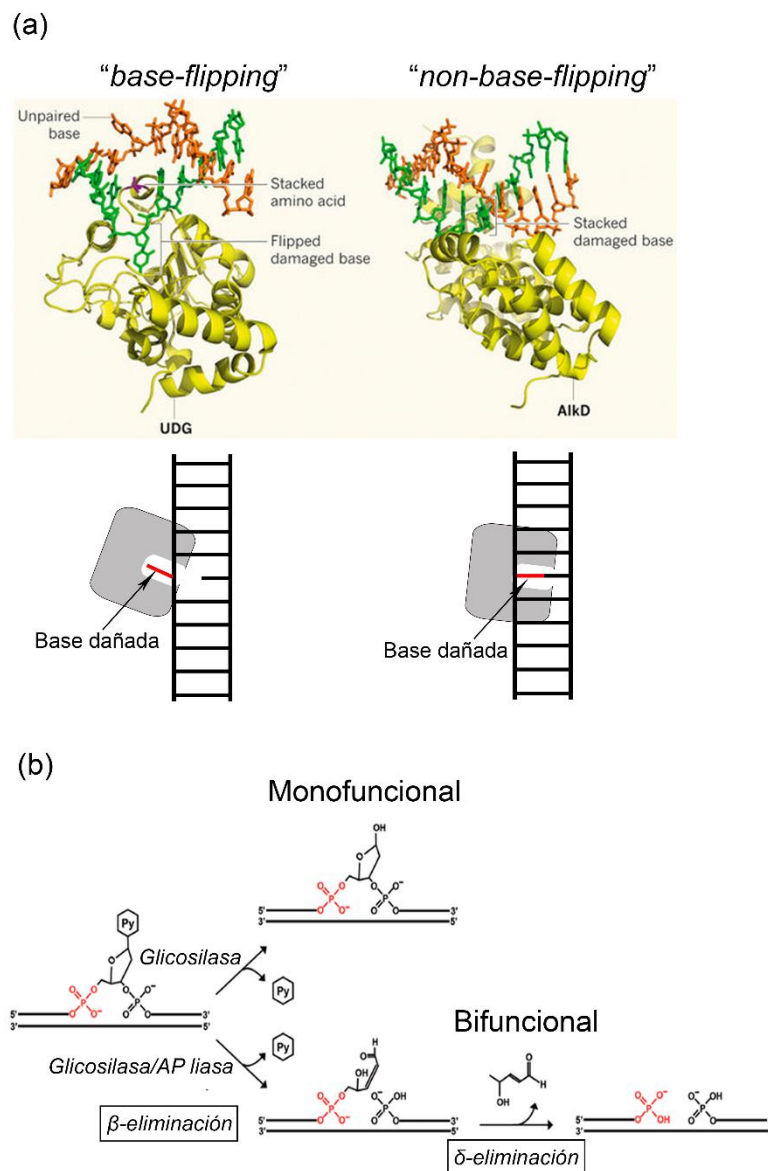
Dado que mi tesis está enfocada en el estudio de una ADN glicosilasa del sistema de reparación por escisión de bases, el mismo será descripto con mayor detalle:

### **ADN glicosilasas**

El primer paso del mecanismo BER involucra la escisión de una base modificada o incorrecta por medio de una ADN glicosilasa, la cual rompe el enlace N-glicosídico, dejando como resultado un sitio AP con el esqueleto azúcar-fosfato intacto (Fig. 3). La mayoría de las ADN glicosilasas reconocen y remueven la base a través de un mecanismo de “*base-flipping*” que involucra el doblado y distorsión del ADN para facilitar la eliminación de la base (Fig. 4 a). Luego la base es insertada dentro del bolsillo hidrofóbico de la enzima en donde los residuos catalíticos tienen acceso al enlace N-glicosídico (Huffman, Sundheim, y Tainer 2005; Dalhus et al. 2009; Mullins et al. 2015). Las ADN glicosilasas se clasifican en monofuncionales y bifuncionales basadas en su actividad catalítica. Las ADN glicosilasas monofuncionales son capaces únicamente de remover la base, y generan como resultado un sitio AP, mientras que las ADN glicosilasas bifuncionales, poseen, además, una actividad AP liasa, donde luego de escindir la base, pueden romper el esqueleto azúcar-fosfato en dirección 3’ al sitio AP (Fig. 3; Fig. 4 b). Cinco superfamilias de ADN glicosilasas fueron identificadas en base a una clasificación estructural: Uracilo ADN Glicosilasa (UDG), Alquiladenina ADN Glicosilasa (AAG), Hélice-horquilla-Hélice GPD ADN Glicosilasa (HhH-GPD), Hélice-dos giros-Hélice ADN Glicosilasa (H2TH) y HEAT-Like Repeat ADN Glicosilasa (HLR) (Dalhus et al. 2009; Krokan y Bjoras 2013; Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019) (Tabla 1). Las diferentes familias de ADN glicosilasas se distinguen a nivel estructural, por lo que cada ADN glicosilasa puede reconocer un determinado tipo de daño o varias lesiones relacionadas estructuralmente (Jacobs y Schär 2011) (Tabla 2). Cabe destacar que las ADN glicosilasas pertenecientes a la superfamilia HLR son las únicas que no utilizan el mecanismo “*base-flipping*” para reconocer y escindir las bases (Mullins et al. 2015; Shin y Tainer 2015; Shi et al. 2018) (Fig. 4b). Además, esta clase de ADN glicosilasas se encuentran mayormente en procariontes, pero no así en organismos multicelulares como las plantas (Dalhus et al. 2009; Shi et al. 2018) (Tabla 1). La superfamilia HhH-GPD es la más heterogénea de las ADN glicosilasas que incluye ADN glicosilasas mono y bifuncionales, que pueden actuar sobre un amplio espectro de lesiones, tales como bases alquiladas, desaminadas, oxidadas y también en sitios abásicos (Thayer et al. 1995; Doherty, Serpell, y Ponting 1996; Dianov y Hubscher 2013) (Tabla 2). Entre estas lesiones, la desaminación espontánea de 5-metilcitosina (5mC) en timina (T) da lugar a la presencia de bases erróneamente apareadas (“*mismatch*”) del tipo T:G las cuales son blanco de las ADN glicosilasas TDG “*Thymine DNA Glycosylase*” y MBD4 (“*Methyl-CpG*

*Domain Protein 4* en humanos y MIG (*Mismatch Glycosylase*) en bacterias (Horst y Fritz 1996; Hendrich et al. 1999; Sjolund, Senejani, y Sweasy 2013; Drohat y Coey 2017) (Tabla 2).

Curiosamente, la mayoría de las ADN glicosilasas se encuentran en núcleo y mitocondria, indicando la importancia de la integridad genómica en la supervivencia de las células (Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019) (Tabla 3).



**Figura 4. Mecanismo de acción de las ADN glicosilasas.** (a) Remoción de la base dañada o incorrecta mediante *base flipping* o *non-base flipping*. Adaptado de Mullins et al. 2015 (b) Actividad de ADN glicosilasas monofuncionales y bifuncionales. Adaptado de Lee et al. 2014.

**Tabla 1. Proteínas involucradas en el sistema BER de bacterias, humanos y Arabidopsis.** Modificado de Roldán-Arjona, Ariza y Córdoba-Cañero 2019).

Enzimas involucradas en el sistema BER	<i>E. Coli</i>	<i>H. Sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>
<b>Superfamilias de ADN glicosilasas</b>			
<b>Uracilo ADN glicosilasa</b>	Ung Mug	UNG TDG SMUG1	AtUNG (At3g18630)
<b>AAG H2TH</b>	MutM Nei	MPG NEIL1 NEIL2 NEIL3	AthAAG (At3g12040) AtFPG (At1g52500)
<b>HhH-GPD</b>	Nth  MutY AlkA Tag	NTHL1  OGG1 MYH  MBD4	AtNTH1 (At2g31450) AtNTH2 (At1g05900) AtOGG1 (At1g21710) AtMUTY (AT4G12740) AtAlkA (2 homólogos putativos) AtTag (9 homólogos putativos) AtMBD4L (At3g07930) ROS1 (At2g36490) DME (At5g04560) DML2 (At3g10010) DML3 (At4g34060)
<b>HLR</b>	<b>Procarionotas</b> AlkC AlkD AlkD2 AlkF		
<b>AP endonucleasas</b>			
Familia Xth	Xth	APE1 APE2	ARP (At2g41460) AtAPE1L (At3g48425) AtAPE2 (At4g36050)
Familia Nfo	Nfo		
<b>3'ADN fosfatasas</b>		PNKP	ZDP (At3g14890)
<b>ADN polimerasas</b>			
Familia A	Pol I	Pol $\gamma$	
Familia B		Pol $\theta$ Pol $\alpha$ Pol $\delta$ Pol $\epsilon$	AtPollA (At1g50840) AtPollB (At3g20540) AtPol $\theta$ (At4g32700) AtPol $\alpha$ (At1g67630) AtPol $\delta$ (At2g42120) AtPol $\epsilon$ (At1g08260)
Familia X		Pol $\beta$ Pol $\lambda$	AtPol $\lambda$ (At1g10520)
<b>Flap endonucleasas</b>		FEN1	AtFEN1 (At5g26680)
<b>ADN ligasas</b>			
Dependientes de NAD <sup>+</sup>	LigA	LIG1 LIG3 LIG4	AtLIG1 (At1g08130) AtLIG4 (At5g57160) AtLIG6 (At1g66730)
Dependientes de ATP			

### ***Methyl Binding Domain Like 4 (MBD4L)***

MBD4 es una ADN glicosilasa monofuncional que, en animales, posee un dominio de unión a citosina metilada (MBD) localizada en contextos CpG, así como un dominio activo HhH-GPD en el extremo C-terminal (Nota 2014; Ramiro-Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013). Esta enzima reconoce y escinde a las bases U o T erróneamente apareadas a G, con preferencia por las bases erróneamente apareadas de los contextos CpG (Bellacosa et al. 1999; Hendrich et al. 1999; Petronzelli et al. 2000a; Petronzelli et al. 2000b; Turner et al. 2006). Además, la MBD4 de animales es activa frente a pirimidinas halogenadas apareadas erróneamente con guanina. Tales pirimidinas halogenadas se originan como resultado de procesos inflamatorios mediados por peroxidasas (e.g. 5-clorouracilo y 5-bromouracilo) (Valinluck et al. 2005; Henderson et al. 2003), o que surgen como consecuencia de tratamientos de quimioterapia (5-fluorouracilo y 5-yododeoxiuridina) (Aziz, Schupp, y Kinsella 2009; Turner et al. 2006) (Tabla 2). Un homólogo de MBD4, llamado MBD4-like (*MBD4L*, AT3G07930) fue identificado y caracterizado en *Arabidopsis* (Ramiro Merina, Ariza, y Roldán Arjona 2013; Nota et al. 2015). MBD4L, como así también otros homólogos de MBD4 identificados en plantas, carecen del dominio MBD presente en la región N-terminal de la proteína de los metazoos, pero tienen un dominio C-terminal catalítico con residuos específicos conservados típicos de todas las ADN glicosilasas MBD4 (Ramiro Merina 2016). MBD4L tiene la capacidad de escindir uracilo y derivados halogenados de uracilo, tales como 5-BrU o 5-FU, de un modo más eficiente que timina *in vitro* (Ramiro Merina, Ariza, y Roldán Arjona 2013). Además, MBD4L muestra preferencia por los contextos CpG, uno de los sitios frecuentemente metilados en los transposones de plantas (Bartels et al. 2018; Bräutigam y Cronk 2018; Mbichi, Wang, y Wan 2020). Por esto MBD4L podría tener un rol importante en prevenir los potenciales efectos mutagénicos de la desaminación de 5mC (Ramiro Merina, Ariza, y Roldán Arjona 2013). Cuatro variantes de *splicing* fueron anotadas en los bancos para *MBD4L*, sin embargo, solo dos de estas: MBD4L.3 y MBD4L fueron detectadas mediante ensayos de sqRT-PCR en diversos tejidos (Nota et al. 2015). Además, fusiones de las isoformas MBD4L.3 y MBD4L.4 a GFP, se detectaron ambas en núcleo (Nota et al. 2015). Curiosamente, se detectó la presencia de un exitrón (intrón retenido con capacidad codificante) en la región N-terminal de MBD4L (Marquez et al. 2015). Este exitrón determinaría la localización nuclear de la proteína bajo condiciones de crecimiento estándar (Cecchini et al. 2022). En contraste, variaciones en el *splicing* de MBD4L, así como en la localización de la proteína fueron observadas luego de tratamientos con estrés térmico (Cecchini et al. 2022).

Los sitios AP, generados luego de la actividad de las ADN glicosilasas monofuncionales, son lesiones en el ADN con efectos altamente citotóxicos si no son reparados rápidamente,

debido a su capacidad de bloquear la replicación y la transcripción del ADN, y pueden llegar a tener consecuencias mutagénicas si es que son saltados o “bypassed” por las ADN polimerasas (Loeb 1985). El procesamiento de los sitios AP son usualmente llevados a cabo por AP endonucleasas o AP liasas, las cuales generan rupturas de cadena simple en el ADN (SSB), con extremos 5’ o 3’ bloqueados, respectivamente, que no pueden ser usados como sustratos por las ADN polimerasas o ADN ligasas (Fig. 3). Tales SSB pueden ser convertidos en rupturas de hebra doble en el ADN (DSB), las cuales son altamente tóxicas, si es que no son reparados antes de la replicación del ADN (Caldecott 2001). Las AP endonucleasas reconocen los sitios AP y rompen el esqueleto del ADN en una dirección 3’ al sitio AP, por lo que genera un SSB con extremos 3’-OH y 5’-desoxiribosa-5-fosfato (5’-dRP) (Levin y Demple 1990; Dianov, Price, y Lindahl 1992) (Fig. 3). Las principales AP endonucleasas de *E. coli* son clasificadas en dos familias: Exonucleasa III (Exo III) y Endonucleasa IV (Endo IV) en base a la similitud de estructura primaria y secundaria de las proteínas.

**Tabla 2. Principales sustratos de las ADN glicosilasas de mamíferos y Arabidopsis.**

Superfamilia	ADN glicosilasas	Mono(M)/bifuncional(B)		Sustratos principales (sustratos secundarios)	
		Mamíferos	Arabidopsis	Mamíferos	Arabidopsis
UDG	UNG2	M		U, 5-FU en ADNss y ADNds, en contextos U:A y U:G (5-hidroxiuracilo)	
	UNG1	M		U, 5-FU en ADNss y ADNds, en contextos U:A y U:G (5-hidroxiuracilo)	
	AtUNG		M		U, en contextos U:A y U:G
	SMUG1	M		5-hmU, U:G>U:A>Uss, 5-FU, εC en ADNss y ADNds	
AAG	MPG (AAG)	M		U:G>T:G (5-hmU en ADNds, 5-FU)	
	AthAAG		M	3-mA, 7-mG, 3-mG, Hx, εA	3-mA
H2TH	NEIL1	B		Tg, FapyG, FapyA, 8-oxo-G, 5-hU, DHU, Sp y Gh en ADNss y ADNds	
	NEIL2	B		Tg, FapyG, FapyA, 8-oxo-G, 5-hU, DHU, Sp y Gh en ADNss y ADNds	
	NEIL3	B		FapyG, FapyA, Sp y Gh en ADNss	
	AtFPG		B		8-oxoG
HhH-GPD	MBD4	M		U:G y T:G, 5-hmU en contexto CpG (εC, 5-FU en ADNds)	
	AtMBD4L		M		5-BrU>5-FU>U (T) muy eficiente en contexto CpG
	OGG1	B		8-oxo-G:C, Fapy:C	
	AtOGG1		B		8-oxo-G:C, FapyGua
	MUTYH	M		A opuesta a 8-oxo-G/C/G	
	AtMUTY		No caracterizado		No caracterizado
	NTL1	B		Tg, FapyG, 5-hC, 5-hU en ADNds	
	AtNTH1		B		Urea y timina glicol en ADNds
	AtNTH2		B		Timina glicol en ADNds
	DME		B		5-mC, T:G mas eficiente en contextos CpG
ROS1		B		5-mC, T:G mas eficiente en contextos CpG	
DML2		B		5-mC	
DML3		B		5-mC, T:G mas eficiente en contextos CpG	

## AP endonucleasas

En condiciones normales Exo III presenta la mayor actividad AP endonucleasa detectada en *E. coli* (Yajko y Weiss 1975), mientras que Endo IV es inducida bajo condiciones de estrés oxidativo (Chan y Weiss 1987). El genoma de mamíferos codifica para dos AP endonucleasas: APE1 y APE2, con similitud de secuencia a Exo III de *E. coli*. APE1 presenta la mayor actividad AP endonucleasa, realizando más del 95% de las incisiones de los sitios AP (Demple y Sung 2005), mientras que la actividad de APE2 es significativamente reducida (Hadi y Wilson 2000). Arabidopsis posee tres homólogos de la

AP endonucleasas Exo III: APE1L, ARP y AtAPE2. APE1 (At3G48425) y ARP (At2G41460) son similares a APE1 de humanos, mientras que AtAPE2 (At4G36050) es similar a APE2 de humanos (Murphy et al. 2009). Curiosamente, al analizar la actividad de incisión de ARP, se encontró que esta realiza una función esencial durante la reparación de sitios AP o de uracilo *in vitro* (Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2011). Sin embargo, líneas de T-DNA mutantes en *ARP* no muestran diferencias fenotípicas respecto a las plantas silvestres *in vivo* (Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2011; Murphy et al. 2009), a pesar de que ARP protege al ADN de los efectos adversos que ocasiona un aumento en los niveles de uracilo en el genoma luego de tratamientos con 5-FU (Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2011). Por otro lado, se demostró que ARP también puede procesar los sitios AP generados por ADN glicosilasas bifuncionales, tales como AtFPG o AtOGG1 durante la reparación de 8-oxoguanina (8-oxo-G), una lesión generada luego de exposiciones a estrés oxidativo (Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2014).

### **AP liasas**

Alternativamente los sitios AP pueden ser procesados por ADN glicosilasas bifuncionales/AP liasas, generando de este modo extremos no convencionales 3'bloqueados: 3'-PUA o 3'-P (Fig. 3). En estos casos las incisiones realizadas por  $\beta$ -eliminación generan terminales 3'-PUA, mientras que las incisiones causadas por  $\beta$ ,  $\delta$ -eliminación producen terminales 3'-P. En contraste, los extremos 5'-dRP bloqueados son generados luego de la incisión de sitios AP por AP endonucleasas que acompañan a ADN glicosilasas monofuncionales (Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019) (Fig. 3). Tanto los extremos 3'-PUA y 3'-P, como los 5'-dRP bloqueados necesitan ser procesados a extremos convencionales 3'-OH y 5'-P, respectivamente, para continuar con la vía de reparación (Fig. 3). En levaduras los sitios AP son inicialmente procesados por la actividad AP liasa de las ADN glicosilasa Ntg1 y Ntg2, que genera extremos bloqueados 3'PUA que son posteriormente procesados por AP endonucleasas (Li et al. 2015). En Arabidopsis también se registraron evidencias de procesamiento de sitios AP por AP liasas (Barbado et al. 2018). La depurinación espontánea de N7-meG inducida por MMS genera sitios AP que son exclusivamente reparados, a través de una ruta independiente de AP endonucleasas, que es iniciada por la actividad liasa de AtFPG (Barbado et al. 2018). La incisión del sitio AP catalizado por AtFPG genera extremos 3'-P que tienen que ser convertidos en extremos 3'-OH para continuar con el siguiente paso del BER. Curiosamente, AtFPG es la principal y probablemente la única ADN glicosilasa con actividad AP liasa detectable en extractos celulares de Arabidopsis (Barbado et al. 2018).

### Procesamiento de terminales 3'-PUA y 5'-P

En Arabidopsis, el procesamiento de las terminales 3'-PUA es realizado eficientemente por la actividad 3'-fosfodiesterasa de la AP endonucleasa APE1L (Lee et al. 2014; Li et al. 2015), mientras que el procesamiento de los extremos 5'-P puede ser realizado por la actividad 3'-fosfatasa de APE1L, AtAPE2 (Li et al. 2015; Li et al. 2018), y principalmente por la actividad de AtZDP (*Zing finger DNA 3'-Phosphoesterase*, At3G14890) (Martínez-Macías et al. 2012). Por otra parte, también se ha observado que ciertas ADN glicosilasas bifuncionales trabajan conjuntamente con determinadas AP endonucleasas para procesar más efectivamente los terminales P bloqueados (Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019). APE1L actúa en el procesamiento de los extremos 3'-PUA generados por las 5mC ADN glicosilasas de la familia DEMETER, por lo que APE1L estaría involucrada en la vía de desmetilación activa del ADN (Li et al. 2015). Por otro lado AtZDP participa en el procesamiento de las terminales 3'-P generados por AtFPG y AtOGG1 durante la reparación de 8-oxo-G, y también en las terminales 3'-P producidas por las 5mC ADN glicosilasas: ROS1 y DME, durante la desmetilación activa del ADN (Martínez-Macías et al. 2012; Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2014).

### Procesamiento de terminales 5'-dRP

Cuando los sitios abásicos generados por ADN glicosilasas monofuncionales son cortados por AP endonucleasas, se generan extremos de ADN con un grupo 3'-OH y un 5'-dRP bloqueado (Fig. 3). Para continuar con la reparación los extremos 5'-dRP tienen que ser procesados a 5'-P por la actividad dRP liasa de alguna enzima (Fig. 3). En mamíferos, la principal actividad dRP liasa está asociada a la ADN polimerasa  $\beta$  (pol  $\beta$ ) (Srivastava et al. 1998), mediante la presencia de un dominio N-terminal característico de la familia X de ADN polimerasas (Beard y Wilson 2000). A diferencia de los mamíferos, las plantas no poseen homólogos de la pol  $\beta$ , pero tienen una enzima relacionada denominada polimerasa  $\lambda$  (pol  $\lambda$ ). La pol  $\lambda$  que está también presente en mamíferos y es un miembro de la familia X de ADN polimerasas, presenta actividad dRP liasa, y se observó que en humanos puede funcionar como reservorio de la pol  $\beta$  en el BER (García-Díaz et al. 2000; García-Ortiz, Ariza, y Roldán-Arjona 2001; Braithwaite et al. 2010). En Arabidopsis no se encontró evidencia de actividad dRP liasa por parte de la pol  $\lambda$  (Amoroso et al. 2011; Roy et al. 2011), por lo que el procesamiento de los extremos 5'-dRP bloqueados se genera a través del desplazamiento e incisión de la cadena que contiene el extremo 5'-dRP bloqueado durante el "Long-Patch BER" o BER de múltiples nucleótidos (LP-BER) (Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba Cañero 2019) (Fig. 3).

### **Síntesis de nucleótidos: SP-BER y LP-BER**

Una vez de que las terminales bloqueadas fueron procesadas en extremos 5'-P y 3'-OH, el sitio vacío o “*gap*” puede ser sellado por la incorporación de un único nucleótido (“*short-patch BER*” o BER de simple nucleótido, SP-BER) o por la incorporación de 2-13 nucleótidos en el LP-BER. Estudios de especificidad sugieren que la elección entre el SP y LP-BER podría estar determinada por el tipo de lesión, la ADN glicosilasa que inicia el BER y/o el estadio del ciclo celular en que se encuentre la célula (Fortini y Dogliotti 2007).

### **ADN ligasas**

La culminación del BER es realizada por una ADN ligasa quien sella el corte o “*nick*” del ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster. Los eucariotas generalmente poseen 3 ADN ligasas dependientes de ATP (Lig I, Lig III y Lig IV en mamíferos). El paso de ligado final durante el LP-BER de mamíferos es realizado por Lig I, la cual es también esencial para la replicación del ADN. En contraste, el complejo formado por Lig III y XRCC1 participa en el sellado del corte en el SP-BER (Cappelli et al. 1997; Timson, Singleton, y Wigley 2000; Sleeth, Robson, y Dianov 2004). Arabidopsis también posee 3 ADN ligasas, AtLIG1, AtLIG4, y AtLIG6, pero carece de un homólogo de Lig III. AtLIG1 y AtLIG4 son ortólogos de la Lig I y Lig IV de mamíferos, respectivamente, mientras que AtLIG6 es una ADN ligasa específica de plantas (Bonatto et al. 2005). AtLIG4 está implicada en la vía de reparación de DSBs (West et al. 2000; Attikum et al. 2003), y junto con AtLIG6 resultan ser críticas para mantener la viabilidad de las semillas (Waterworth et al. 2010). Curiosamente, las mutantes de *AtLIG1* resultan letales, y las plantas que presentan una expresión disminuida del gen muestran alteraciones fenotípicas y deficiencias en la reparación de SSB y DSB (Waterworth et al. 2009). Además, se demostró que en extractos celulares de Arabidopsis, AtLIG1 es esencial para SP y LP (Córdoba-Cañero, Roldán-Arjona, y Ariza 2011). Curiosamente, niveles elevados de transcritos de AtLIG1 fueron registrados en plantas que expresan niveles incrementados de MBD4L (Nota 2014).

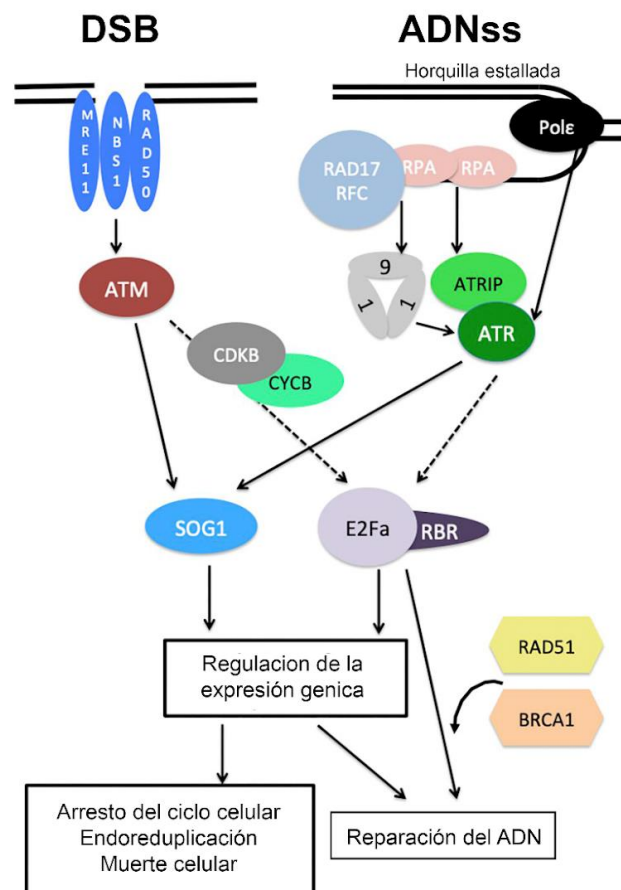
## **Mecanismos de detección y reparación del ADN**

### ***DNA Damage Response (DDR)***

Las plantas han evolucionado un complejo mecanismo de detección y reparación eficiente de daños en el ADN, asociado con procesos celulares altamente coordinados, conocidos como respuesta al ADN dañado (DDR) (Nisa et al. 2019). El DDR de plantas contiene varios componentes regulatorios claves, tales como sensores del ADN dañado, transductores de señales, mediadores y efectores (Fig. 5). Los sensores de ADN dañado y



los transductores de señales están conservados en plantas y animales (Fig. 6). Sin embargo, en plantas la cascada de respuesta al daño en el ADN diverge aguas abajo de los transductores (Nisa et al. 2019; Nikitaki et al. 2018). Curiosamente, las plantas carecen de homólogos a p53, un efector central del DDR en animales (Rutkowski, Hofmann, y Gartner 2010). El factor de transcripción p53 se une al ADN y juega un rol central en la regulación transcripcional de genes involucrados en regulación del ciclo celular y apoptosis debido a exposiciones a estrés genotóxico. Además, p53 juega un rol importante en la supresión de tumores, inhibiendo la división y crecimiento de células con ADN dañado (Williams y Schumacher 2016; Johmura y Nakanishi 2016).



**Figura 5. Respuesta al ADN dañado (DDR) en plantas.** DSB: rupturas de doble cadena; ADNss: ADN simple cadena. Adaptado de Nisa et al. 2019. MRE11: *MEIOTIC RECOMBINATION 11*. RAD50: *RADIATION SENSITIVITY ABNORMAL/YEAST RAD-RELATED 50*. NBS1: *NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1*. ATM: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED*. CDKB: *CYCLIN DEPENDENT KINASE B*. CYCB: *CYCLIN B*. SOG1: *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE*. . POLε: *DNA POLYMERASE ε*. RPA: *REPLICATION PROTEIN A*. RAD17: *RADIATION SENSITIVITY 17*. RFC: *REPLICATION FACTOR C*. ATRIP: *ATR INTERACTING PROTEIN*. ATR: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED*. RBR: *RETINOBLASTOMA-RELATED*. E2Fa: *TRANSCRIPTION FACTOR E2FA*. RAD 51: *RAS ASSOCIATED WITH DIABETES PROTEIN 51*. BRCA1: *BREST CANCER SUSCEPTIBILITY 1*.

### **Quinasas ATM y ATR**

Una vez percibido el daño las quinasas *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED* (ATM) y *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED* (ATR) son activadas y actúan como transductores en el DDR (Garcia et al. 2003; Culligan, Tissier, y Britt 2004; Yoshiyama, Sakaguchi, y Kimura 2013). La quinasa ATM regula la respuesta transcripcional al daño en el ADN ante la presencia de DSBs (vía de ATM), mientras que ATR responde a lesiones del ADN generadas por estrés en la replicación (vía de ATR). La percepción del daño en el ADN resulta crucial para minimizar los efectos deletéreos de varios agentes genotóxicos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que sensores específicos de daño se encuentran asociados con las vías de ATM y ATR. Algunos de estos sensores están conservados en plantas y animales (Nisa et al. 2019; Nikitaki et al. 2018; Yoshiyama, Sakaguchi, y Kimura 2013) (Fig. 6).

### **MNR complex**

Un complejo proteico ternario conocido como complejo MNR, constituido por las proteínas: *MEIOTIC RECOMBINATION 11* (MRE11), *RADIATION SENSITIVITY ABNORMAL/YEAST RAD-RELATED 50* (RAD50) y *NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1* (NBS1), está asociado con la percepción de DSBs en la vía mediada por ATM. Curiosamente, el dominio C-terminal de NBS1 está asociado con el reclutamiento y la activación de ATM en el sitio de daño (Puizina et al. 2004; Waterworth et al. 2007; Amiard et al. 2010; Hu, Cools, y De Veylder 2016). La activación de ATM desencadena la fosforilación de distintas proteínas tales como la variante de histona H2AX y SOG1 (Friesner et al. 2005; Yoshiyama et al. 2013; Yoshiyama et al. 2017). La vía de ATR también presenta sensores específicos de lesiones, tales como la proteína de replicación A (RPA) que posee una alta afinidad por ADN simple cadena (ADNss). El complejo RPA-ADNss recluta a ATR hacia el sitio de daño a través de la subunidad regulatoria *ATR INTERACTING PROTEIN* (ATRIP) (Sakamoto et al. 2009; Sweeney, Britt, y Culligan 2009; Saldivar, Cortez, y Cimprich 2017). Además, ATR también es capaz de fosforilar y activar a SOG1 en respuesta al daño en ADN (Sjogren, Bolaris, y Larsen 2015) (Fig. 5; Fig. 6).

### **SOG1: El regulador maestro de plantas**

En plantas el factor de transcripción *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE* (SOG1), con funciones similares a p53 de mamíferos, actúa como regulador central en DDR, afectando la actividad de las quinasas ATM y ATR durante la respuesta al daño en el ADN (Yoshiyama, Sakaguchi, y Kimura 2013; Yoshiyama et al. 2014; Yoshiyama 2016; Nikitaki et al. 2018; Hendrix et al. 2020). Además, SOG1 regula la actividad transcripcional de varios

genes en respuesta a daños en el ADN en las células meristemáticas de la raíz. Ensayos de microarreglos realizados en plantas silvestres mostraron un cambio de  $\geq 2$  veces en el nivel de transcritos de aproximadamente 442 genes, en donde 332 se encontraban activados y 100 reprimidos, en respuesta a tratamientos con zeomicina (agente inductor de DSB) (Ogita et al. 2018). Curiosamente, varios de los genes con transcripción aumentada corresponden a genes de respuesta al daño en el ADN. En contraste, en la mutante *sog1-1*, no se detectaron cambios transcripcionales en los 332 genes activados en la planta WT luego del tratamiento con zeomicina, por lo que se sugiere que SOG1 tiene un importante rol en la regulación transcripcional de genes que participan en la respuesta al daño en el ADN. Además, también se encontró que entre los genes regulados por SOG1, 146 son blancos directos, mientras que el resto parecen estar regulados indirectamente (Ogita et al. 2018).

### **Activación de SOG1: Participación de las quinasas ATM y ATR**

La activación de SOG1 está regulada a nivel postranscripcional, y la presencia de motivos SQ (Serina-Glutamina) en su extremo C-terminal es un requisito absoluto para su estimulación a través de la fosforilación por ATM bajo condiciones de estrés genotóxico (Yoshiyama et al. 2013). ATM es reclutada en respuesta al daño en el ADN, y la intensidad del daño regula la acumulación de la quinasa ATM quien subsecuentemente fosforila todos los motivos SQ de SOG1. Este evento de fosforilación está modulado por la disponibilidad y cantidad de ATM activa, que en efecto depende de la magnitud del daño en el ADN (Yoshiyama y Kimura 2018). Además, SOG1 también se activa por fosforilación mediada por ATR. Bajo estrés por aluminio, SOG1 es activado a través de una vía principal que involucra ATR-ALT2, con una participación marginal de ATM (Sjogren, Bolaris, y Larsen 2015).

### **SOG1 en el ciclo celular**

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* indican que SOG1 se une directamente a los promotores de genes que participan en la señalización del ADN dañado tales como *BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY 1* (BRCA1), *RAS ASSOCIATED WITH DIABETES PROTEIN 51* (RAD51) (Ogita et al. 2018; Sjogren, Bolaris, y Larsen 2015), *CYCLIN B1;1* (CYCB1;1) (Weimer et al. 2016), *SIAMESE-RELATED 5* (SRM5) y *SIAMESE-RELATED 7* (SRM7) (Yi et al. 2014) SOG1 también regula indirectamente la transcripción de varios otros genes blanco, incluidos los genes asociados con la muerte celular programada (Ogita et al. 2018). SOG1 activa el punto de control del ciclo celular y el arresto de los tejidos meristemáticos, dependiendo de la fase del ciclo celular en la que ocurre el daño en el ADN. Cuando ocurre un estrés durante la replicación, SOG1 promueve el arresto de la fase S,

umentando la expresión de la quinasa *WEE1-LIKE KINASE* (WEE1) que regula negativamente la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación, y por lo tanto la activación de CDK asociadas con la progresión de la fase S (De Schutter et al. 2007). SOG1 también promueve el arresto de la fase G2 directamente regulando la expresión de genes específicos del punto de control G2/M. A través de la vía ATM-SOG1, SOG1 aumenta la expresión de SMR5 y SMR7, uniéndose directamente a sus promotores. La familia SMR representa una subclase de inhibidores CDK específicos de plantas y son cruciales para inducir el arresto de G2/M. En presencia de DBSs, la vía de ATR-SOG1 juega un rol importante en la degradación de *CYCLIN-DEPENDENT KINASE B2;1* (CDKB2;1). CDKB2;1 se une específicamente a la ciclina *CYCLIN D4;1* (CYCD4;1) durante la transición G2/M vía ubiquitinación/proteosoma (Adachi et al. 2011). Además, SOG1 induce la expresión de una ciclina específica de la fase G2, la *CYCLIN B1* (CYCB1), uniéndose directamente a su promotor. De este modo, SOG1 puede propiciar una acumulación de CYCB1 en los meristemas radicales después de la exposición a agentes que dañan el ADN (Weimer et al. 2016). Por lo tanto, la inhibición simultánea de la transición G2/M y la acumulación de una ciclina específica de G2 indican que SOG1 puede extender la fase S, así como también retrasar el inicio de la fase mitótica en respuesta al daño en el ADN.

### **SOG1 activa la Recombinación Homóloga (HR)**

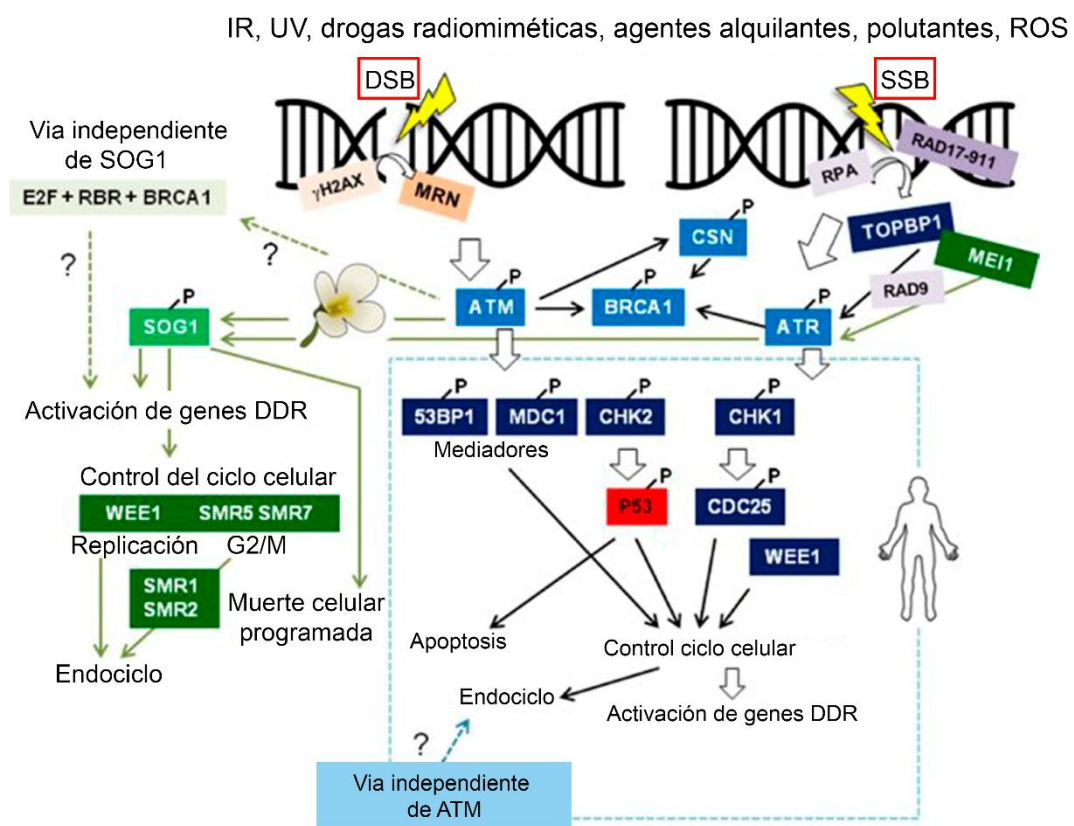
Por otra parte, SOG1 participa en la reparación de DSB y activa preferencialmente la vía HR. Varios genes asociados a la vía de HR están bajo el control de SOG1 (Ogita et al. 2018). SOG1 activa la proteína de unión a retinoblastoma Rbp8, la cual corta el ADN doble cadena para generar ADNss, un paso preliminar de la vía HR. La RPC, es también blanco de SOG1, y esta se une al ADNss y corta las terminales expuestas del ADN (Schwertman, Bekker-Jensen, y Mailand 2016). Además, SOG1 activa a BRCA1, que eventualmente estimula el desplazamiento de RPA con RAD51 sobre el ADNss. Subsecuentemente, esto permite que RAD51/RAD54 activado medie la reparación del ADN dañado por la vía HR (Prakash et al. 2015).

### **SOG1 regula genes de muerte celular programada y endoreduplicación**

La muerte celular programada (PCD) o apoptosis representa una de las estrategias más comunes e importantes para eliminar las células con daños severos en el ADN y reducir la posibilidad de acumular células con genoma anormal (Jackson y Bartek 2009). En mamíferos, la PCD es gobernada por p53, caspasas y endoproteasas (Ogita et al. 2018). En plantas algunas formas de PCD son activadas por SOG1 (Fulcher y Sablowski 2009; Furukawa et al. 2010). La PCD mediada por SOG1 es dependiente de la fosforilación de

esta proteína por ATM o ATR (Yoshiyama, Sakaguchi, y Kimura 2013). Curiosamente, SOG1 también cumple un rol importante regulando la entrada de aquellas células meristemáticas con DSB que se dividen activamente, dentro de los ciclos de endoreduplicación, por lo que provee una estrategia alternativa de supervivencia bajo condiciones de estrés genotóxico sin la necesidad de activar PCD (Adachi et al. 2011). Además, análisis transcriptómicos mostraron que SOG1 induce el comienzo del endociclo, arrestando el ciclo celular en G2/M y a través de la activación de inhibidores del ciclo celular tales como SMR1 y SMR5 (Adachi et al. 2011).

La activación del DDR y sus componentes aún están poco estudiados en mutantes de ADN glicosilasas y bajo condiciones de estrés.



**Figura 6. Respuesta al daño del ADN en animales y plantas.** En verde se muestran las principales vías del DDR dependientes de SOG1 en plantas. El cuadro celeste resalta los componentes del DDR de animales. Modificado de Nikitaki et al. 2018. DSB: ruptura doble en hebras de ADN. SSB: ruptura simple en hebra de ADN.

### Reparación del ADN mitocondrial (ADNmt)

Inicialmente se pensaba que las organelas carecían de mecanismos de reparación del ADN y que la elevada ploidía del ADNmt prevenía que daños de este genoma reduzcan la

supervivencia de la célula (Karol y Simpson 1968), dado que las copias dañadas serían posteriormente eliminadas y nuevas copias sanas se producirían por replicación. Sin embargo, actualmente se conoce que sí existen mecanismos de reparación en las organelas, los cuales varían en las distintas especies de organismos (Lui y Demple 2010; Boesch et al. 2009). En animales, el genoma mitocondrial presenta una tasa de mutación más elevada que el genoma nuclear, permitiendo una rápida evolución (Brown, George, y Wilson 1979). Esta elevada tasa de mutación se debe en parte al elevado ambiente oxidativo de la matriz mitocondrial que daña al ADNmt, y a la baja fidelidad de la ADN polimerasa mitocondrial. Sin embargo, los reducidos mecanismos de reparación que existen en la mitocondria de animales son una razón adicional para la elevada tasa de mutación encontrada en el ADNmt animal. En contraste, los genomas mitocondriales de plantas tienen una tasa de sustitución de bases muy baja pero se expanden y se re-arreglan rápidamente (Drouin, Daoud, y Xia 2008; Wolfe, Li, y Sharp 1987). A su vez, tanto la reducida tasa de sustitución como la elevada tasa de reordenamiento del genoma mitocondrial de plantas, pueden ser explicadas por la presencia de mecanismos de reparación del ADN. Es decir que la participación de estos mecanismos de reparación contribuirían a generar las expansiones genómicas frecuentemente observadas en plantas terrestres (Sloan et al. 2009). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los mecanismos de reparación que operan en la mitocondria comparado con los que se conocen en otras organelas como el núcleo y cloroplasto. No hay evidencias sobre alguna actividad del NER o MMR en mitocondrias de plantas (Boesch et al. 2009; Gualberto y Newton 2017), aun cuando MutS, enzima del MMR, se localiza en las mitocondrias (Xu et al. 2011). Algunos estudios sugieren que los tipos de daño que usualmente son reparados a través del NER y MMR son procesados a través de la vía del DSBR (Christensen 2014; 2018). Sin embargo, las mitocondrias de plantas sí poseen el BER, en donde la enzima *Uracil DNA Glycosylase* (UNG), codificada por un gen nuclear, participa activamente (Boesch et al. 2009). La actividad de UNG fue asociada a fracciones mitocondriales de maíz y papa (Bensen y Warner 1987; Ferrando et al. 2019), y experimentos *in vivo* revelan que UNG se encuentra en mitocondria de *Arabidopsis*, papa y en la gimnosperma *Araucaria angustifolia* (Boesch et al. 2009; Furlanetto et al. 2019). UNG es una enzima que puede reconocer y escindir uracilo del ADN simple o doble cadena (Córdoba-Cañero et al. 2010). El uracilo puede aparecer en el ADN debido a una desaminación espontánea de citosina o por la incorporación errónea de dUTP durante la replicación (Krokan, Standal, y Slupphaug 1997). Además, el uracilo no reparado en el ADN puede generar transiciones G-C a A-T dentro del genoma. Varios genes involucrados en DSBR se encuentran activados en ausencia de

UNG, sugiriendo que el DSBR es un sistema de reparación general en la mitocondria (Wynn, Purfeerst, y Christensen 2020).

## Posibles sustratos de MBD4L *in vivo*

Estudios *in vitro* demostraron que MBD4L no es capaz de escindir 5hmC (derivado de oxidación 5mC), pero si 5hmU (desaminación de 5hmC), U (desaminación de C) y T (desaminación de 5mC) (Ramiro Merina, Ariza, Roldán-Arjona 2013) (Fig. 7 b). Por ello, es probable que la enzima pueda reconocer y escindir tales sustratos del ADN *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo y/o desaminativo.

## Oxidación de 5mC

La oxidación de 5mC es catalizada por enzimas de la familia *Ten Eleven Translocation* (TET). Esas enzimas oxidan 5mC a 5hmC (Tahiliani et al. 2009), y luego a 5fC y 5caC (Ito et al. 2011). La oxidación de 5mC representa solo el paso inicial de desmetilación del ADN, mientras una desmetilación completa ocurre cuando la 5fC y 5caC son removidas por una timina ADN glicosilasa (TDG) y subsecuentemente el BER permite la incorporación de citosina (Maiti y Drohat 2011). A partir de estudios bioquímicos realizados en humanos, se determinó que la enzima *Methyl Binding Domain 4* (MBD4) no es capaz de escindir 5mC, 5hmC, 5fC o 5caC (Hendrich et al. 1999; Fiorella Petronzelli et al. 2000; Manvilla et al. 2012; Cortellino et al. 2011). Llamativamente, en presencia de una desaminasa, se puede convertir 5hmC a 5hmU, sustrato al que sí puede reconocer y escindir MBD4 (5hmU opuesto a G). Sin embargo, estudios donde determinan la tasa de desaminación de 5hmC *in vitro* (Rangam et al. 2012; Nabel et al. 2012) e *in vivo* (Nabel et al. 2012) no encontraron suficiente evidencia que soporte la existencia de una relación entre las vías TET-deaminasa-MBD4.

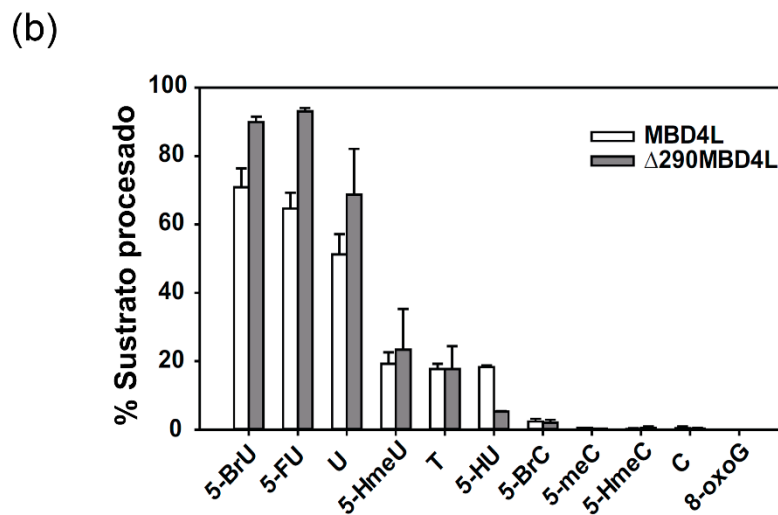
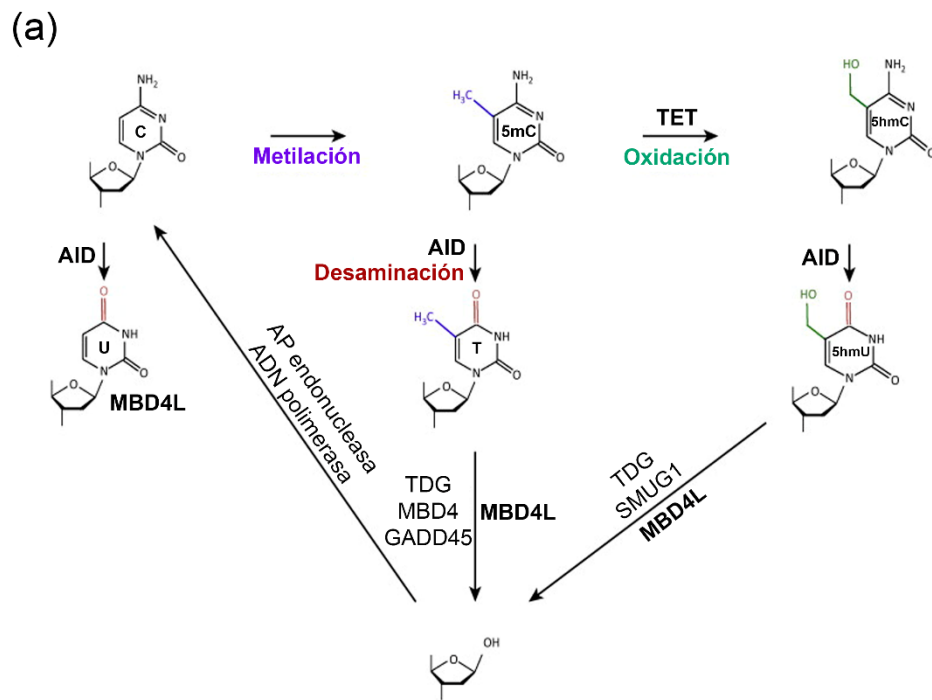
Las plantas carecen de homólogos de las proteínas TET (Roldán Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019). En contraste, la oxidación de 5mC a 5hmC puede ocurrir en presencia de niveles elevados de ROS, ya que las plantas producen constantemente ROS en diversos sitios de la célula tales como cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas en respuesta a sus procesos metabólicos: fotosíntesis y respiración celular. El aumento de ROS genera daños oxidativos en el ADN, proteínas y lípidos, y en última instancia causan muerte celular (Apel y Hirt 2004; Tripathy y Oelmüller 2012). Además, la producción de ROS puede aumentar como respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico como ser luz excesiva, temperaturas extremas, salinidad, sequía y deficiencia de nutrientes (Apel y Hirt 2004). Sorpresivamente, los niveles de ROS también incrementan rápidamente después del

ataque de patógenos (Pogány et al. 2009). Cabe destacar, que durante la interacción planta-patógeno, también se registran incrementos en los niveles de óxido nítrico (NO) (Magdalena Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek 2016; Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek 2014). Esto puede resultar en la desaminación de 5hmC a 5hmU, ya que el óxido nítrico es capaz de promover la desaminación de bases del ADN (Caulfield, Whishnok y Tannenbaum 1998). Alternativamente, la desaminación de 5hmC podría ser causada por acción de la citosina desaminasa, aunque solo hay registros de su actividad sobre C (Chen, Herde, y Witte 2016). Por todo esto, es posible especular que 5hmU, sustrato *in vitro* de MBD4L (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013), pueda llegar a generarse en presencia de eventos de oxidación-desaminación conjunta durante la infección con patógenos.

### **Desaminación de 5mC**

Las bases púricas y pirimidicas del ADN que presentan un grupo amino exocíclico son propensas a sufrir una desaminación hidrolítica. Las bases modificadas hipoxantina y xantina son generadas a una tasa relativamente baja como consecuencia de la desaminación de adenina y guanina, respectivamente, mientras que la desaminación de las pirimidinas es potencialmente mutagénica ya que estas ocurren a una tasa 50 veces más elevada (Shen et al. 1994). La desaminación de C y 5mC genera pares mal apareados G-U y G-T respectivamente, que luego de la replicación de ADN causa una mutación transicional C por T. Curiosamente, para los eventos de desaminación de 5mC, las mutaciones tendrán lugar principalmente en los contextos CpG. Sin embargo, la dinámica de 5mC en los sitios CpG es más compleja. En primer lugar, la tasa de desaminación de 5mC es tres veces mayor que la de C (Wang et al. 1982). Segundo, mientras que el uracilo puede ser reconocido eficientemente como un objeto extraño al ADN, la remoción enzimática de timina de los sitios mal apareados G-T tiene que ser balanceada contra la escisión errónea y mutagénica de timina de los sitios A-G. De modo similar, la desaminación de 5hmC a 5hmU, quien puede aparearse con A, también tiene el potencial de causar mutaciones transicionales en los sitios CpG. Sin embargo, el 5hmU puede ser escindido por TDG, MBD4, SMUG1 y NEIL1 (Brooks et al. 2013). En plantas, aumentos en los niveles de óxido nítrico en condiciones de infección con patógeno (Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek 2014), pueden desencadenar la desaminación de 5mC a T y C a U, ambos sustratos *in vitro* de MBD4L (T:G y U:G) (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013) (Fig. 7 a, b). Además, la enzima citosina desaminasa puede generar U a partir de la desaminación de C (Chen, Herde y Witte 2016).





**Figura 7. La proteína recombinante MBD4L escinde U y derivados halogenados *in vitro*.** (a) Vías endógenas de generación de sustratos de MBD4 en animales. Adaptado de Ramiro y Barreto 2015. (b) Sustratos *in vitro* de MBD4L. Barras blancas: proteína recombinante completa (MBD4L). Barras grises: proteína recombinante trunca (290MBD4L) Tomado de Ramiro Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013.

## CROMATINA Y METILACIÓN

En este apartado se describirán aspectos básicos sobre cromatina y sus principales marcas epigenéticas que servirán como base para comprender cómo MBD4L participa en la modificación de la estructura de la cromatina, reparación y metilación del ADN en presencia de estrés biótico.

### Características principales de la cromatina

En los eucariotas, el ADN genómico se encuentra enrollado alrededor de proteínas histonas para formar cromatina. El nucleosoma es la unidad estructural de la cromatina, y está compuesto de ocho proteínas histonas (2 pares de H2A, H2B, H3 y H4) y 147 pb de ADN enrollado alrededor de estas. Además, la histona H1 se une al ADN que enlaza los nucleosomas y tiene un papel fundamental en la compactación de la cromatina (Happel y Doenecke 2009). Dependiendo del grado de compactación la cromatina se clasifica en: eucromatina, menos condensada y rica en genes, y heterocromatina, altamente compacta y pobre en genes. Entre las regiones de heterocromatina, la heterocromatina facultativa se forma frecuentemente en genes regulados por el desarrollo y su nivel de compactación cambia en respuesta al desarrollo y/o señal ambiental (Law y Jacobsen 2010). En contraste, la heterocromatina constitutiva preferencialmente se ensambla sobre elementos repetitivos tales como ADN satélite y transposones, y mantiene elevados niveles de compactación (Simon et al. 2015). Cada uno de esos dominios de heterocromatina están definidos epigenéticamente por modificaciones post-traduccionales de las histonas tales como la acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, sumolación, carbonilación y glicosilación (Berger 2007; Kouzarides 2007) (Fig. 8 a), variantes de histonas como H2A.Z y H3.3, que son incorporadas con la ayuda de chaperonas y complejos de remodelación (Filipescu, Szenker, y Almouzni 2013; Skene y Henikoff 2013), y la metilación del ADN (Law y Jacobsen 2010) que tienen consecuencias sobre la transcripción genética (Berger 2007; Lee et al. 2010). Además, la estabilidad de las regiones heterocromáticas es esencial para evitar la recombinación entre regiones repetitivas y limitar la transcripción de los transposones, y de este modo mantener la integridad genómica (Allshire y Madhani 2018). En los núcleos interfásicos de *Arabidopsis*, la heterocromatina puede agruparse en dominios nucleares bien discernibles densamente condensados conocidos como cromocentros (Fig. 8 b). Los principales componentes genéticos de los cromocentros son repeticiones de ADN en tándem y transposones cuyas actividades son reprimidas normalmente por silenciamiento génico transcripcional (TGS) y postranscripcional (RdDM)

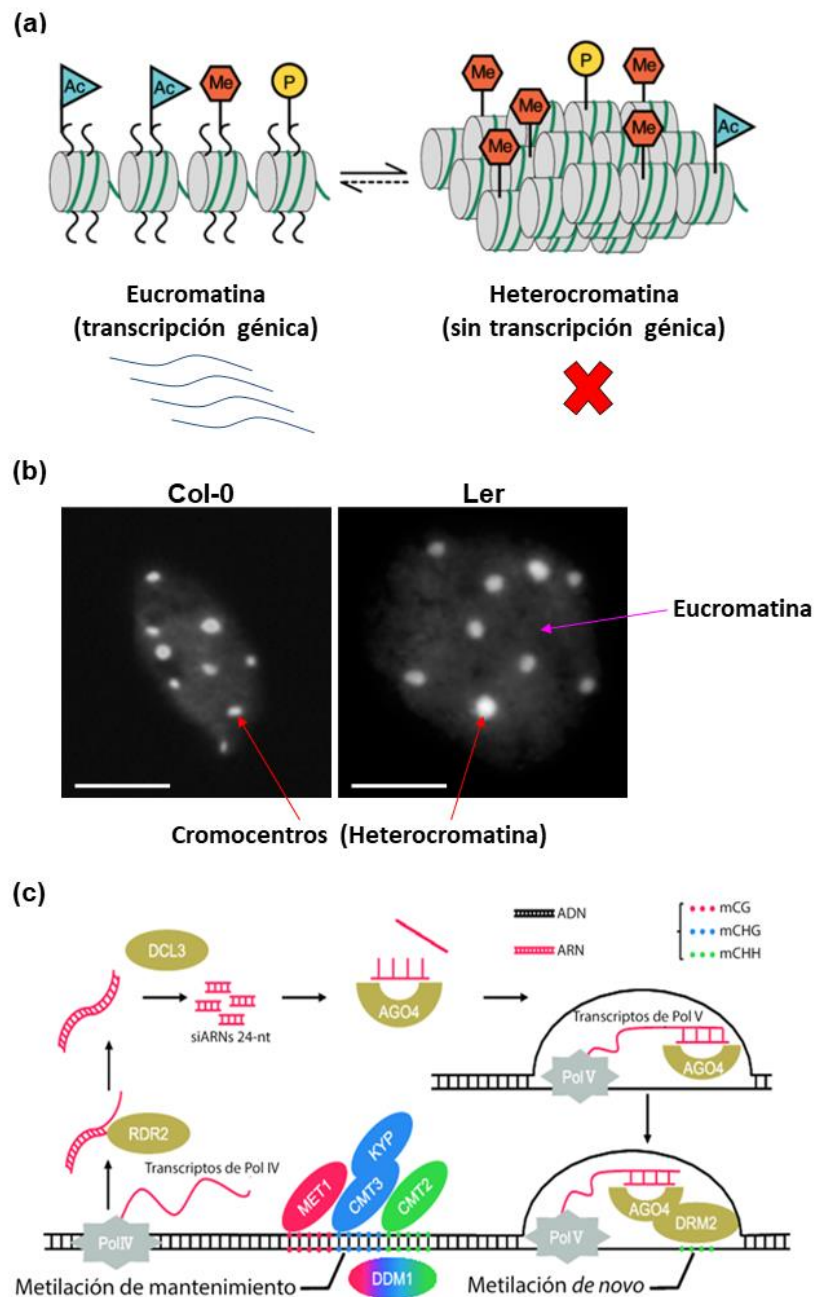
(Fransz, Soppe, y Schubert 2003). Curiosamente, varios estudios han demostrado que el estrés por calor (Lang-Mladek et al. 2010; Pecinka et al. 2010; Tittel-Elmer et al. 2010) y la infección con patógenos (Pavet et al. 2006), descondensan los cromocentros y reactivan las secuencias y/o genes localizados dentro de ellos. Además, también se demostró que la heterocromatina constitutiva es dinámicamente modificada en respuesta a estímulos tales como el envejecimiento o “*aging*” (Scaffidi y Misteli 2005; Schumaker et al. 2006).

## Estados de la cromatina

La cromatina tiene una elevada relevancia en procesos como la transcripción génica, recombinación, división celular y diferenciación, por lo que se determinaron estados de la cromatina teniendo en cuenta características tales como la secuencia de ADN, metilación del ADN, variantes de histonas y otras modificaciones. En *Arabidopsis*, la complejidad de la cromatina fue inicialmente reducida a 9 estados a partir de una combinación de 16 características epigenéticas (Sequeira-Mendes et al. 2014). Sin embargo, posteriormente se realizó un estudio más profundo en donde se analizaron 216 datos epigenéticos que permitió definir 36 estados de cromatina (Liu et al. 2018).

## Metilación del ADN

La metilación del ADN es una marca epigenética importante para la regulación de la transcripción génica, desarrollo embrionario, “*imprinting*” genómico, estabilidad genómica y estructura de la cromatina (Robertson 2005). La metilación se encuentra conservada en plantas y mamíferos, y es catalizada por ADN metiltransferasas que utilizan *S-Adenosyl-L-Methionine* (SAM) como dador de grupos metilo (Zhu 2009; He, Chen, y Zhu 2011). En *Arabidopsis*, la metilación del ADN afecta a las citosinas localizadas en todos los contextos: CG, CHG y CHH (donde H es A, T o C). Estudios de metilación global muestran regiones altamente metiladas en la heterocromatina (Zhang et al. 2006; Law y Jacobsen 2010). Curiosamente, la heterocromatina se encuentra enriquecida de elementos transponibles y otras secuencias de ADN repetido (Henderson y Jacobsen 2007; Zhang et al. 2006). Sin embargo, la metilación del ADN asociada a transposones también puede darse en regiones eucromáticas de los brazos cromosómicos (Zhang et al. 2006). En plantas, existen dos vías de metilación del ADN: (i) la metilación *de novo*, conocida como metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM), la cual involucra pequeños ARNs interferentes (siRNAs), *long non coding RNAs* (lncRNAs) y una variedad de proteínas, y (ii) la metilación de mantenimiento, que se encarga de mantener los niveles de metilación en determinados contextos e involucra una variedad de ADN metiltransferasas (Fig. 8c).



**Figura 8. Cromatina y metilación del ADN.** (a) Euromatina y heterocromatina, principales marcas epigenéticas, y su efecto en la transcripción génica. Modificado de Jenuwein y Allis 2001. Me: metilación. Ac: Acetilación. P: fosforilación. (b) Imágenes confocales de cromocentros de *Arabidopsis* de los ecotipos Col-0 (Pavet et al. 2006) y Ler (Tessadori et al. 2009). Núcleos de hoja fueron teñidos con solución de DAPI, y los puntos refringentes (DAPI positivos) corresponden a los cromocentros. Barra: 5  $\mu$ m. (c) Metilación del ADN *de novo* y mantenimiento en *Arabidopsis*. Modificado de Fujimoto et al. 2018. DCL3: *DICER LIKE 3*. AGO4: *ARGONAUTE 4*. RDR2: *RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 2*. MET1: *METHYLTRANSFERASE 1*. CMT3: *CHROMOMETHYLASE 3*. KYP: *KRYPTONITE*. CMT2: *CHROMOMETHYLASE 2*. POL IV: *RNA POLYMERASE IV*. POL V: *RNA POLYMERASE V*. DRM2: *DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2*. DDM1: *DECREASED DNA METHYLATION 1*.

## Desmetilación activa del ADN

La ausencia de DNA metiltransferasas o de dadores de grupos metilos luego de la replicación generan fallas en el mantenimiento de la metilación. Este proceso es conocido como desmetilación pasiva (Rocha et al. 2005). Sin embargo, la metilación del ADN también puede ser eliminada enzimáticamente a través de la desmetilación activa. A diferencia de la reacción de metilación del ADN, donde el evento es catalizado por una única enzima (ADN metiltransferasa), la desmetilación activa del ADN requiere de un grupo de enzimas. En plantas, una familia de bifuncional 5mC ADN glicosilasas inicia la desmetilación activa del ADN a través del sistema de reparación de bases (BER) (Gong et al. 2002; Ortega-Galisteo et al. 2008). En mamíferos, la desmetilación activa del ADN también involucra la participación de ADN glicosilasas y por lo tanto del sistema BER (Zhang y Zhu 2012; Wu y Zhang 2017; Gong y Zhu 2011). Sin embargo, las ADN glicosilasas de plantas pueden reconocer y remover directamente la 5mC del ADN, mientras que en mamíferos la 5mC debe ser primero oxidada para que las ADN glicosilasas puedan escindir la base (Zhang y Zhu 2012; Wu y Zhang 2017). En *A. thaliana* una familia de 4 5mC ADN glicosilasas bifuncionales que incluye a *REPRESSOR OF SILENCING 1* (ROS1), *TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR DEMETER* (DME), *DEMETER-LIKE PROTEIN 2* (DML2) y *DEMETER-LIKE PROTEIN 3* (DML3), puede escindir 5mC de todos los contextos de citosina (Gong et al. 2002; Ortega-Galisteo et al. 2008). Los blancos genómicos de la principal 5mC ADN glicosilasa ROS1 son regiones intergénicas y transposones que se encuentran cerca de genes codificantes, sugiriendo que esta enzima ayuda a establecer los límites de la metilación entre transposones y genes para prevenir la propagación del silenciamiento transcripcional de los transposones hacia los genes (Tang et al. 2016). Los transposones y otras regiones genómicas que son blanco de ROS1 están enriquecidas en H3K18 acetilada y H3K27me3, pero son pobres en H3K27me y H3K9me2 (Tang et al. 2016). Sin embargo, poco se sabe sobre las ADN glicosilasas que participan en la desmetilación de la heterocromatina centromérica.

## Cromocentros de Arabidopsis

Los centrómeros son estructuras cromosómicas esenciales que fueron inicialmente definidas como zonas de restricción central de los cromosomas mitóticos las cuales participan en la segregación cromosómica durante la división celular. Presentan una variante de histona específica conocida como CENH3. Las regiones centroméricas y pericentroméricas forman dominios de heterocromatina que permanecen condensados y agrupados en interfase (Heitz 1928), conformando estructuras denominadas cromocentros

(Fransz et al. 2002). El centrómero está compuesto en la mayoría de los organismos por secuencias cortas de ADN repetido organizadas en tándem y/o elementos transponibles (Plohl, Meštrović, y Mravinac 2014). En *Arabidopsis*, la región centromérica consiste principalmente de una secuencia de 178pb conocida como 180pb (Kumekawa et al. 2001; 2000; Nagaki et al. 2003) organizada en tándem extendiéndose de 0.4 a 3Mb en cada uno de los 5 cromosomas. Las repeticiones de 180 pb son interrumpidas por un fragmento de 398 pb correspondiente a ATHILA2 LTR llamada 106B (Thompson, Schmidt, y Dean 1996). Los centrómeros están flanqueados por una región pericentromérica, que en *Arabidopsis* contiene secuencias repetidas tales como retrotransposones ATHILA, repeticiones de 500 pb y 160 pb (Bauwens et al. 1991), *Transcriptional Silent Information* (TSI) compuesto por la mitad 3' de un retrotransposon ATHILA (Steimer et al. 2000), y en algunos cromosomas agrupaciones de 5S rDNA (Fransz et al. 1998; Cloix et al. 2000). La mayoría de las secuencias repetidas de la región pericentromérica y los transposones se encuentran silenciados, mientras que otras como los genes del 5S rDNA se transcriben activamente (Cloix et al. 2002).

## **Daño del ADN en regiones heterocromáticas**

El grado de organización de la cromatina en el núcleo de las células tiene un impacto significativo sobre la respuesta al daño en el ADN. En efecto, en células de mamíferos los “*loops*” de cromatina fueron identificados como sitios susceptibles a fragmentación por topoisomerasas, sugiriendo que la organización de la cromatina es clave para evitar la fragilidad del genoma (Canela et al. 2017). La heterocromatina impacta particularmente sobre la estabilidad genómica. Se observó que tanto la heterocromatina facultativa como la constitutiva presentan una tasa de mutación más elevada en células cancerosas de humanos (Schuster-Böckler y Lehner 2012; Jäger et al. 2013). Por ello, la formación y/o reparación del daño en el ADN estaría influenciada por órdenes de organización más elevadas de cromatina. Desde hace unos años se viene intentando responder como la organización tridimensional de la cromatina y el grado de compactación afecta la susceptibilidad del ADN al daño. Manipulaciones *in vitro* de la compactación de la cromatina en humanos revelan que los niveles de DSBs inducidos por radiación ionizante eran de 5 a 50 veces más bajos en la cromatina compacta que en la cromatina laxa, indicando que la compactación de la cromatina protege al ADN genómico de la radiación ionizante (Takata et al. 2013). La generación de DSBs en diferentes dominios de la cromatina fue abordada *in vivo* en células de ratón y humanos. Para esto, varias aproximaciones a nivel genómico fueron desarrolladas para detectar y mapear los DSBs en el genoma con una resolución de nucleótido simple, entre ellas BLESS, END-seq y DSBCapture (Crosetto et al. 2013; Canela

et al. 2016; Lensing et al. 2016), las cuales detectaron una susceptibilidad más elevada en la eucromatina, transcripcionalmente activa, a la formación de DBSs endógenos. En contraste, las rupturas inducidas por afidicolina fueron enriquecidas en la cromatina centromérica y pericentromérica, probablemente debido a la susceptibilidad más elevada de las repeticiones de ADN al estrés de replicación.

## **Reparación del ADN en contextos de cromatina**

La dinámica de la cromatina y particularmente de los nucleosomas es importante para la reparación, y también, para la percepción y señalización del daño en el ADN en eucariotas (Hauer y Gasser 2017; Agarwal y Miller 2016). La mayoría de las características del remodelado de la cromatina y reparación del ADN son comunes en hongos, animales y plantas (Donà y Mittelsten Scheid 2015; Kim 2019). La reparación de DSB requiere una remodelación de la cromatina extensa para promover la formación de estructuras de cromatina laxa, accesibles a la maquinaria de reparación del ADN, en los sitios de daño en hongos, animales y plantas (Roy 2014; Price y D'Andrea 2013; Choi et al. 2019). Sin embargo, las regiones de heterocromatina en plantas son sometidas a una remodelación a gran escala creando de este modo un compartimento de baja densidad de cromatina para reparar el ADN dañado (Feng et al. 2017). Los principales mecanismos de reparación del ADN tales como el HR, NHEJ, BER, NER y MMR están asociados a determinados remodeladores de la cromatina en eucariotas (Lans, Marteijn, y Vermeulen 2012). En *Arabidopsis* los remodeladores de la cromatina pertenecientes a la familia SWI2/SNF están involucrados en el DDR y HR (Shaked, Avivi-Ragolsky, y Levy 2006). Las proteínas DDM1 y RAD54 de *Arabidopsis*, que presentan los motivos característicos ATPasa/helicasa de la familia SWI2/SNF, contribuyen al DDR y reparación por HR luego de exposiciones a radiación gamma induciendo cambios estructurales de la cromatina a través de la interacción con AtRAD51 (Choi et al. 2019; Osakabe et al. 2006). La reparación del ADN por NHEJ en las células de los eucariotas requiere de la presencia de ATM e INO80 para desensamblar los nucleosomas alrededor de los DSB (Donà y Mittelsten Scheid 2015; Lans, Marteijn, y Vermeulen 2012). En el NER los complejos formados por SWI/SNF e INO80 promueven la remoción de lesiones en el ADN inducidas por UV y restauran la estructura de la cromatina mediante el remodelamiento dependiente de ATP durante y después del NER (Gong et al. 2002; Jiang et al. 2010). En el BER el remodelamiento de la cromatina inducido por SWI/SNF es también requerido para reparar 8-oxoG, la principal lesión de base inducida por especies reactivas del oxígeno en los nucleosomas, modificando las interacciones ADN-histonas que facilitan tanto la transcripción como la reparación del ADN (Menoni et al. 2007; Menoni et al. 2017). Además, otros trabajos observaron que procesos celulares

interdependientes como la modificación postraduccional de las histonas y el remodelamiento de la cromatina dependiente de ATP afectan la accesibilidad de las enzimas del BER al ADN nucleosomal (Balliano y Hayes 2015; Odell, Wallace, y Pederson 2013).



## **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el rol de la ADN glicosilasa MBD4L *in vivo* evaluando sus efectos sobre la reparación del ADN y la estructura de la cromatina bajo condiciones de estrés en *Arabidopsis*.

Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

**1- Determinar si MBD4L escinde el ADN *in vivo* bajo condiciones de daño de bases.**

1.1- Caracterizar la sensibilidad de mutantes de *MBD4L* al crecimiento en 5-FU y 5-BrU.

1.2- Analizar la muerte celular y grado de ruptura del ADN en plántulas sometidas a 5-FU y 5-BrU.

1.3- Evaluar los niveles de transcripción de genes del sistema BER y DDR bajo las mismas condiciones de estrés del apartado anterior.

**2- Diferenciar los roles de las ADN glicosilasas UNG y MBD4L bajo condiciones de estrés genotóxico.**

2.1- Determinar la localización subcelular de UNG.

2.2- Identificar el grado de colocalización entre UNG y MBD4L.

2.3- Evaluar los niveles de coexpresión entre los genes de AtUNG y MBD4L.

2.4- Analizar la ruptura del ADN en mutantes *ung* sometidas a 5-FU y 5-BrU.

**3- Examinar si existe alguna asociación entre la estructura de la cromatina centromérica y la reparación del ADN en mutantes de *MBD4L*, *OGG1* y *FPG* en condiciones de estrés biótico (infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 -*Pst*).**

3.1- Evaluar el estado de los cromocentros en mutantes *ogg1* y *fpg* en respuesta a *Pst*.

3.2- Identificar el grado de ruptura del ADN en mutantes *mbd4l*, *ogg1* y *fpg* en respuesta a *Pst*.

**4- Identificar blancos genómicos de MBD4L que presenten una metilación diferencial bajo condiciones de estrés biótico (infección con *Pst*).**

4.1- Seleccionar secuencias genómicas pertenecientes o cercanas al centrómero que se encuentren altamente metiladas.

4.2- Determinar el estado de metilación de las secuencias seleccionadas en mutantes *mbd4l*.

**RESULTADOS**

## CAPÍTULO I: ACTIVIDAD DE LA ADN GLICOSILASA MBD4L BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS GENOTÓXICO

En este capítulo, analizamos el rol *in vivo* de MBD4L en el reconocimiento y escisión de U y/o 5-FU sobre el genoma nuclear. Estudios previos habían demostrado que la proteína recombinante de MBD4L es capaz de reconocer y escindir U y 5-FU *in vitro* (Ramiro-Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013). Sin embargo, hasta la fecha no existían reportes sobre la actividad *in vivo* de MBD4L en presencia de 5-FU.

Para ello, tratamientos con 5-FU fueron utilizados para inducir la acumulación de U y 5-FU en el ADN nuclear (Fig. S7), y así, determinar la importancia de MBD4L en el crecimiento, supervivencia y reparación del ADN de plantas sometidas bajo estas condiciones.

### Caracterización molecular de mutantes del gen At3G07930 (*MBD4L*)

Para estudiar el rol *in vivo* de MBD4L fue necesario identificar y caracterizar mutantes que reduzcan o anulen la generación de la proteína. En *Arabidopsis* la enzima está codificada por 1 solo gen (At3g07930) que se encuentra en una región cromosómica rica en genes (Fig. S1 a). Para este gen se dispone de mutantes insercionales de T-DNA ubicadas exclusivamente en la región 3'UTR (Fig. S1 a, b, c). La ausencia de mutantes que afecten el extremo 5' del gen sugiere que este sería importante para la vida y supervivencia de la planta. Previo a esta tesis, las líneas mutantes FLAG\_249E06 y FLAG\_238F06, ambas correspondientes al ecotipo Wassilewskija (Ws), y denominadas *mbd4l* (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013) y *mbd4l-1* (Nota 2014) respectivamente, fueron caracterizadas a nivel molecular. Curiosamente, ambas inserciones FLAG se encuentran en el mismo lugar del gen (Fig. S1 a, b, c).

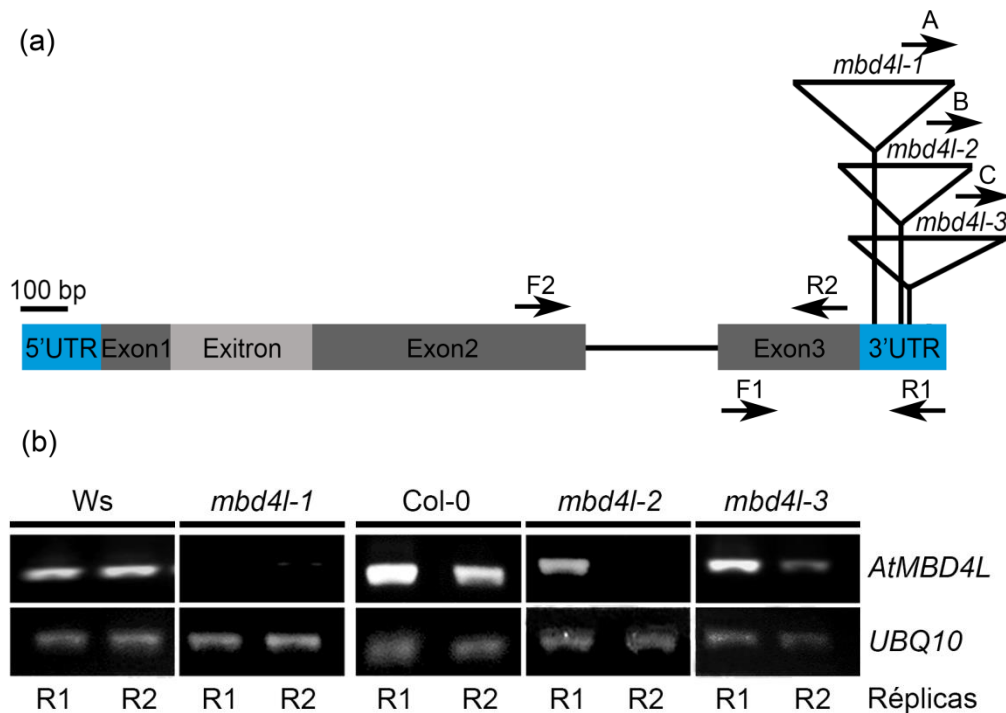
Durante esta tesis, las líneas mutantes de T-DNA, SAIL\_1252\_F09 y SALK\_104136.54.50.X, pertenecientes al ecotipo Columbia-0 (Col-0), fueron seleccionadas del banco de semillas "*Arabidopsis Biological Resource Center*" (ABRC; abrc.osu.edu), y denominadas *mbd4l-2* y *mbd4l-3* respectivamente. Ambas inserciones están ubicadas aguas arriba de las inserciones FLAG, dentro la región 3'UTR del gen *MBD4L* (Fig. S1 a, b, c; Fig. 9 a).

Para genotipificar y caracterizar a las plantas mutantes *mbd4l-2* y *mbd4l-3*, se realizaron dos ensayos de PCR, uno con los cebadores F1 y R1 que flanquean los sitios de inserción del T-DNA, y otro con los cebadores R1 y B (*mbd4l-2*) R1 y C (*mbd4l-3*) que son complementarios al borde derecho del T-DNA inserto (Fig. 9 a, b). Se utilizó como molde

ADN genómico extraído a partir de hojas de roseta de plantas adultas. La PCR del genotipado genera dos amplicones diferentes: un fragmento de 970 pb que indica la presencia del alelo silvestre y uno de 430 pb correspondiente al alelo mutante causado por la inserción del T-DNA (datos no mostrados). Estos resultados permiten distinguir entre las plantas portadoras del alelo mutante en homocigosis o heterocigosis, y las plantas silvestres.

### **Niveles de expresión de MBD4L en mutantes *mbd4l***

Para determinar si las mutaciones por inserción de T-DNA afectan los niveles de expresión del gen *MBD4L* de un modo similar en las mutantes *mbd4l-1*, *mbd4l-2* y *mbd4l-3*, los niveles del transcrito de *MBD4L* fueron evaluados en plantas homocigotas para cada alelo mutante, mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativa (sqRT-PCR). Para ello, se utilizaron los cebadores F2 (complementario al exón 2) y R2 (complementario al exón 3) para amplificar una región correspondiente al extremo 3' de la secuencia codificante del gen. Esto permitió, por un lado, detectar los niveles de ARNm total de *MBD4L* (transcritos *MBD4L.3* y *MBD4L.4*) y por el otro descartar posibles amplificaciones de *MBD4L* sobre el ADN genómico (Fig. 9 a). Los resultados mostraron que las plantas *mbd4l-1*, tienen niveles de transcrito casi indetectables comparado con Ws (Fig. 9 b). Las plantas *mbd4l-2*, presentaron niveles de transcrito moderadamente reducidos, mientras que las plantas *mbd4l-3*, mostraron niveles de transcrito levemente reducidos, comparado con Col-0 (Fig. 9 b) . Estos resultados indican que las mutantes de T-DNA seleccionadas y caracterizadas para el gen At3g07930: *mbd4l-1*, *mbd4l-2* y *mbd4l-3* son hipomórficas (con reducción parcial de función) y difieren en los niveles del ARNm del gen *MBD4L*. Las mutantes *mbd4l-1* y *mbd4l-2* por ser las que presentan una mayor reducción de transcritos fueron incluidas en los experimentos *in vivo* que se describen a continuación.



**Figura 9. Caracterización de mutantes del gen *At3g07930*.** (a) Esquema del gen y posición de los *primers* utilizados en los ensayos de PCR. (b) Niveles de expresión en mutantes de *mbd4l* por sqRT-PCR. Los *primers* F2 y R2 fueron utilizados en este estudio. R1 y R2 corresponden a dos réplicas biológicas distintas. El gen *UBQ10* se utilizó como control interno.

## Respuesta de mutantes *mbd4l* a agentes genotóxicos

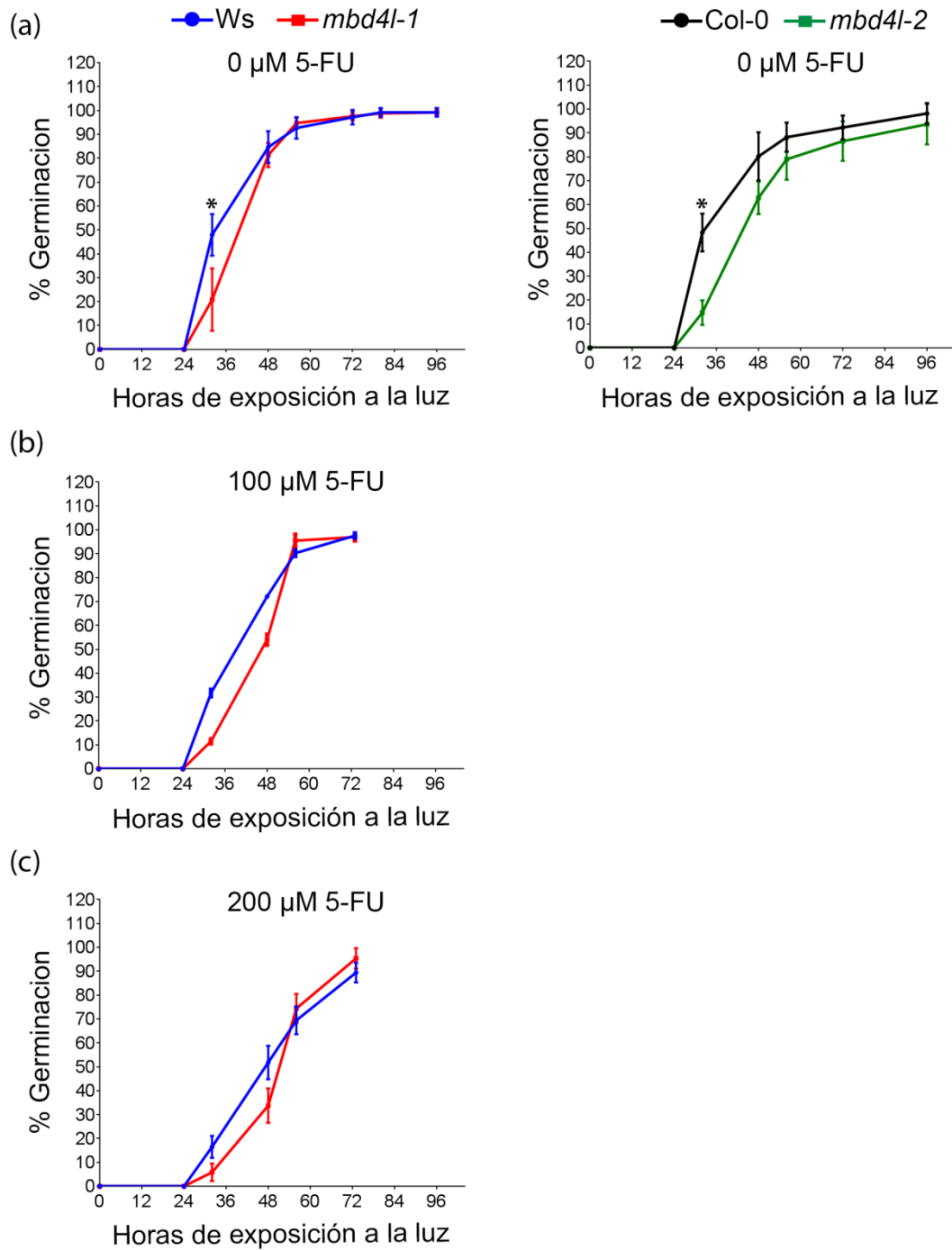
La ADN glicosilasa MBD4L tiene una localización nuclear (Nota et al. 2015), y puede reconocer y escindir eficientemente *in vitro* las pirimidinas halogenadas, 5-BrU y 5-FU, y también U (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013). En *Arabidopsis*, la presencia del U pero no de 5-FU, en el ADN nuclear, fue analizada luego de tratamientos con 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010). En base a estos antecedentes, nos preguntamos si MBD4L tiene la capacidad de reconocer y escindir *in vivo*, las bases U, 5-FU y/o 5-BrU del ADN nuclear. Determinamos el efecto sobre el fenotipo (germinación y crecimiento), viabilidad e integridad celular y la reparación del ADN de plantas silvestres y mutantes *mbd4l* expuestas a 5-FU.

### Germinación en 5-FU

Para analizar si los estadios iniciales del desarrollo del embrión se encuentran afectados en ausencia de MBD4L, observamos los niveles de germinación. Para ello, se sembraron semillas de plantas *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *mbd4l-2* en placas suplementadas o no con 5-

fluorouracilo (5-FU), y se determinó el porcentaje de germinación a diferentes tiempos (24, 32, 48, 56, 72 y 96 hs) luego de la exposición a la luz. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Dr. Ignacio Lescano (CIQUIBIC-CONICET). En ausencia de 5-FU, observamos diferencias significativas de germinación a las 32 hs de exposición a la luz, entre las plantas *Ws* (47.93%) y *mbd4l-1* (20.82%) (Fig. 10 a, panel izquierdo), así como entre *Col-0* (48.27%) y *mbd4l-2* (14.77%) (Fig. 10 a, panel derecho). Sin embargo, en los restantes tiempos examinados (24, 48, 56, 72 y 96 hs) la germinación fue similar entre plantas WT (*Ws* y *Col-0*) y mutantes (*mbd4l-1* y *mbd4l-2*) (Fig. 10 a).

En presencia de 5-FU (100  $\mu$ M o 200  $\mu$ M) detectamos una disminución, no significativa de la germinación, a las 32 y 48 hs luego de la exposición a la luz, en las semillas *mbd4l-1* comparado con WT (Fig. 10 b, c). En los restantes tiempos examinados, los valores de germinación fueron similares entre *mbd4l-1* y WT (Fig 10 b, c). Estos resultados sugieren que la falta de MBD4L tiende a reducir la germinación de las semillas y por lo tanto afectar el desarrollo inicial de las plantas en presencia de 5-FU.



**Figura 10. La presencia de MBD4L incrementa los niveles de germinación.** Porcentaje de germinación en *Ws* y *mbd4l-1* (panel izquierdo) y *Col-0* y *mbd4l-2* (panel derecho) en condiciones control (a). Germinación de *Ws* y *mbd4l-1* bajo 100 (b) y 200 (c)  $\mu$ M de 5-FU.



## Crecimiento de plántulas en 5-FU

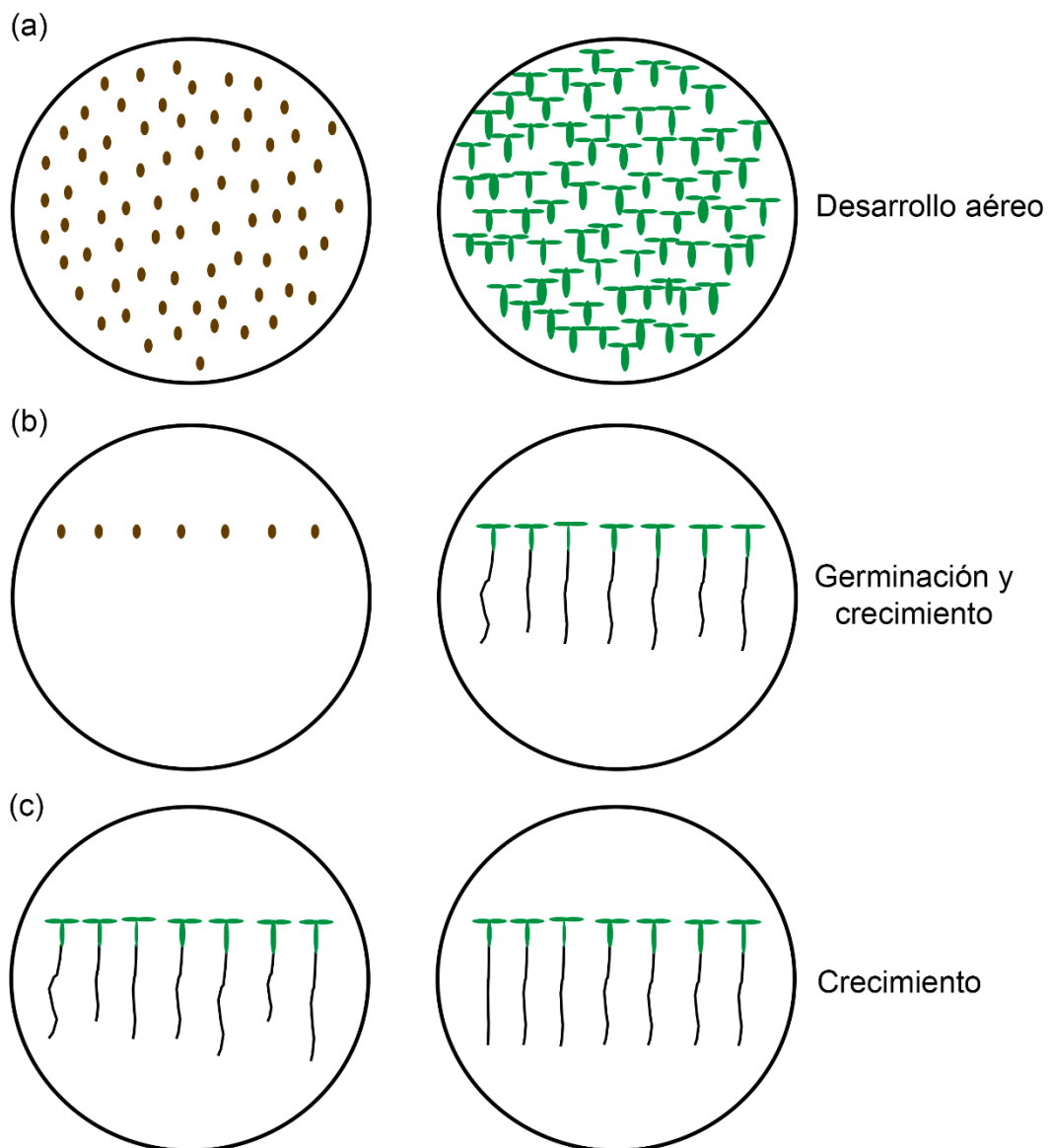
### Sin trasplante

Como MBD4L es requerida para mantener niveles óptimos de germinación, nos preguntamos si la enzima también afecta el crecimiento de las plantas bajo esa condición. Para ello, las semillas de plantas de *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *mbd4l-2* fueron embebidas, sembradas y germinadas sobre placas que contenían distintas dosis del mutágeno (0, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de 5-FU). Las placas fueron colocadas y mantenidas en posición horizontal, y el efecto en el crecimiento de las plántulas fue determinado a los 17 días después de la siembra (Fig. 11 a) (Materiales y Métodos, apartado 2.1).

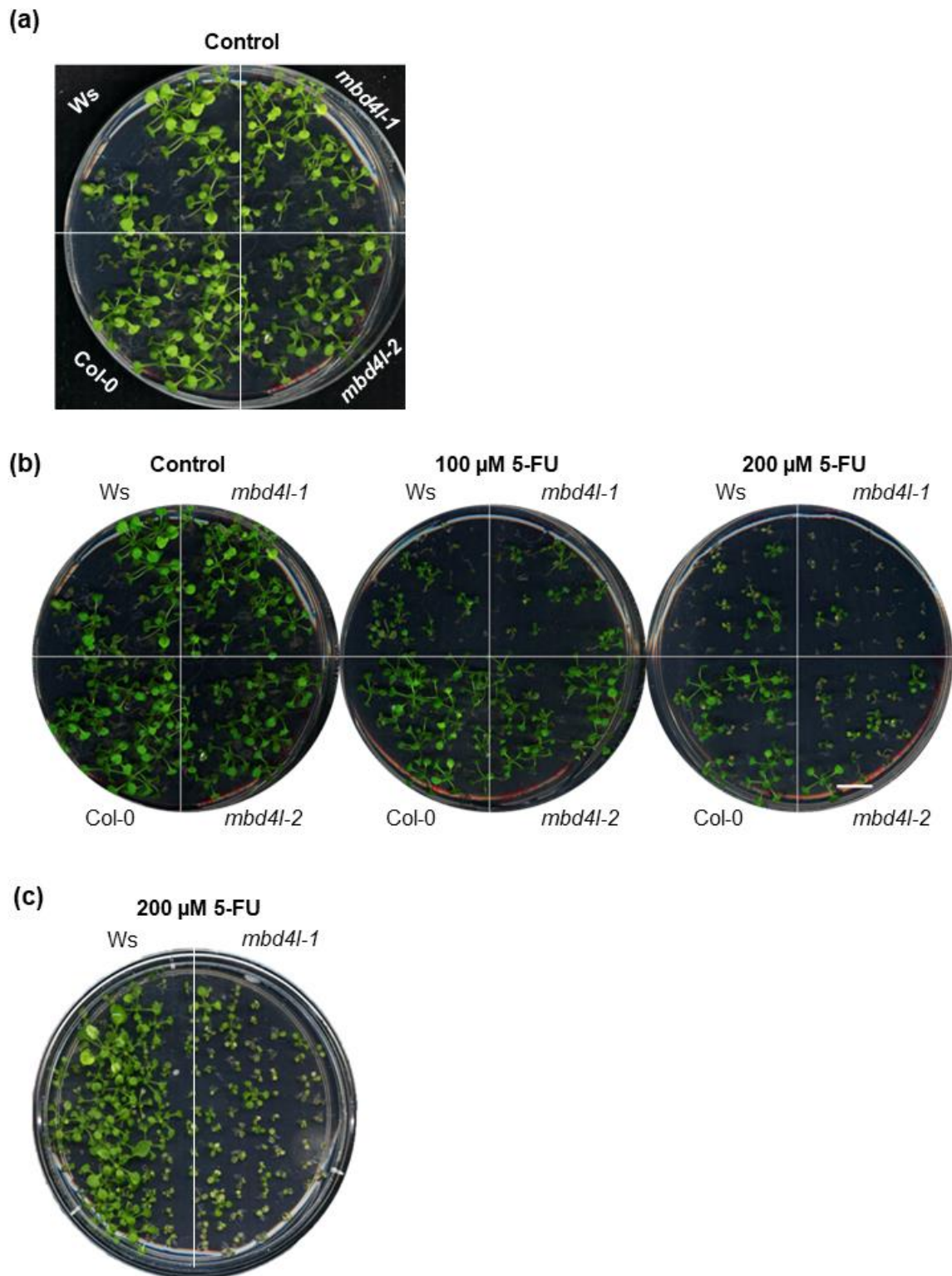
En ausencia de 5-FU, las plantas *Ws* y *mbd4l-1*, o *Col-0* y *mbd4l-2* mostraron un crecimiento similar (Fig. 12 a, b). Sin embargo, en presencia de 5-FU (100 o 200  $\mu\text{M}$ ), observamos una reducción significativa en el crecimiento de las mutantes, respecto a las plantas WT (Fig. 12 b). Además, periodos prolongados (28 días) bajo concentraciones elevadas de 5-FU (200  $\mu\text{M}$ ), potenciaron las diferencias de crecimiento observadas, principalmente entre *mbd4l-1* y *Ws* (Fig. 12 c). Estos resultados sugieren que el gen *MBD4L* afecta el crecimiento normal de las plantas sometidas a estrés genotóxico por tratamiento con 5-FU.

A continuación, nos propusimos analizar el efecto del 5-FU sobre el crecimiento radicular de las mutantes *mbd4l* a nivel cuantitativo. Para esto, semillas de los genotipos *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *mbd4l-2* fueron embebidas, sembradas y germinadas sobre placas con medio de cultivo con distintas dosis del mutágeno (0, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de 5-FU). Las placas fueron colocadas y mantenidas en posición vertical, y el crecimiento de la raíz primaria fue registrado desde el día 2 al 14 después de la siembra (Fig. 11 b). Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Ignacio Lescano (CIQUIBIC-CONICET).

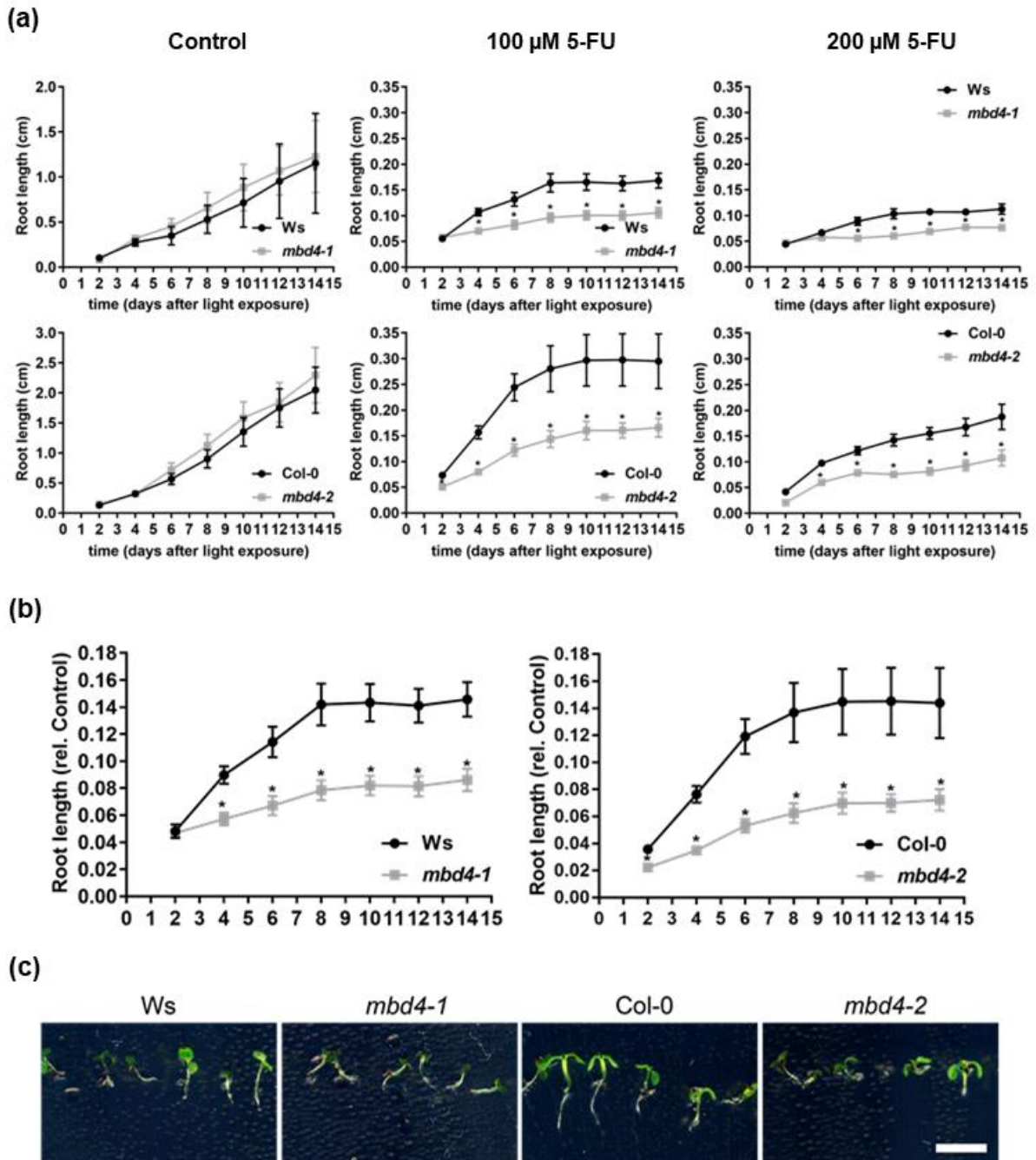
En ausencia de 5-FU, el crecimiento de la raíz principal fue sostenido a lo largo del periodo analizado, y similar entre las plantas *Ws* y *mbd4l-1*, así como entre *Col-0* y *mbd4l-2* (Fig. 13 a). Por el contrario, en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de 5-FU, observamos una drástica reducción en el crecimiento de la raíz principal de las plantas mutantes *mbd4l-1* y *mbd4l-2*, comparado con las WT (Fig. 13 a, b, c). Particularmente, en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de 5-FU, el crecimiento de la raíz principal fue prácticamente nulo en las mutantes *mbd4l-1* y *mbd4l-2*, comparado con las WT (Fig. 13 a, b, c). Estas observaciones sugieren que las plantas mutantes *mbd4l* son hipersensibles a tratamientos con 5-FU,



**Figura 11. Esquema experimental de los procedimientos utilizados para estudiar la susceptibilidad de las mutantes *mbd4I* al 5-FU.** (a) Crecimiento horizontal, las semillas fueron sembradas directamente sobre medio GM, y las plántulas fueron fotografiadas a un determinado tiempo. (b) Crecimiento vertical sin trasplante, las semillas fueron sembradas en la parte superior de la placa, y la longitud de las raíces de las plántulas fueron cuantificadas a diferentes tiempos. (c) Crecimiento vertical con trasplante, plántulas de 7-10 días de edad con crecimiento similar, fueron trasplantadas a una nueva placa conteniendo medio con distintas dosis de mutágeno para determinar el largo de raíces a diferentes tiempos.



**Figura 12. Susceptibilidad de mutantes *mbd4l* al 5-FU.** Fenotipo de plántulas de 14 días crecidas en condiciones control (0  $\mu$ M 5-FU) (a), y bajo diferentes concentraciones (100 y 200  $\mu$ M) de 5-FU (b). Desarrollo de plántulas de *mbd4l.1* sometidas por 21 días a 200  $\mu$ M de 5-FU (c).



**Figura 13. Crecimiento radicular reducido en mutantes *mbd4l* sometidas a 5-FU.** (a) Crecimiento absoluto de la raíz principal en plantas *mbd4l.1* (panel superior) y *mbd4l.2* (panel inferior), bajo condiciones control ( $0 \mu\text{M}$  5-FU) y tratamiento con  $100$  y  $200 \mu\text{M}$  5-FU, durante 14 días luego de exposición a la luz. Los gráficos representan la longitud de la raíz primaria de cada genotipo. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre genotipos ( $n=30$ ,  $p<0,05$  prueba Mann-Whitney U). (b) Crecimiento relativo (5-FU/control) de la raíz de *mbd4l.1* (panel izquierdo) y *mbd4l.2* (panel derecho) durante 14 días de exposición a la luz. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre genotipos ( $n=30$ ,  $p<0,05$  prueba Mann-Whitney). (c) Fenotipo de susceptibilidad de las plantas mutantes *mbd4l* luego de 21 días de crecimiento en  $100 \mu\text{M}$  5-FU. Barra:  $0.5$  cm.

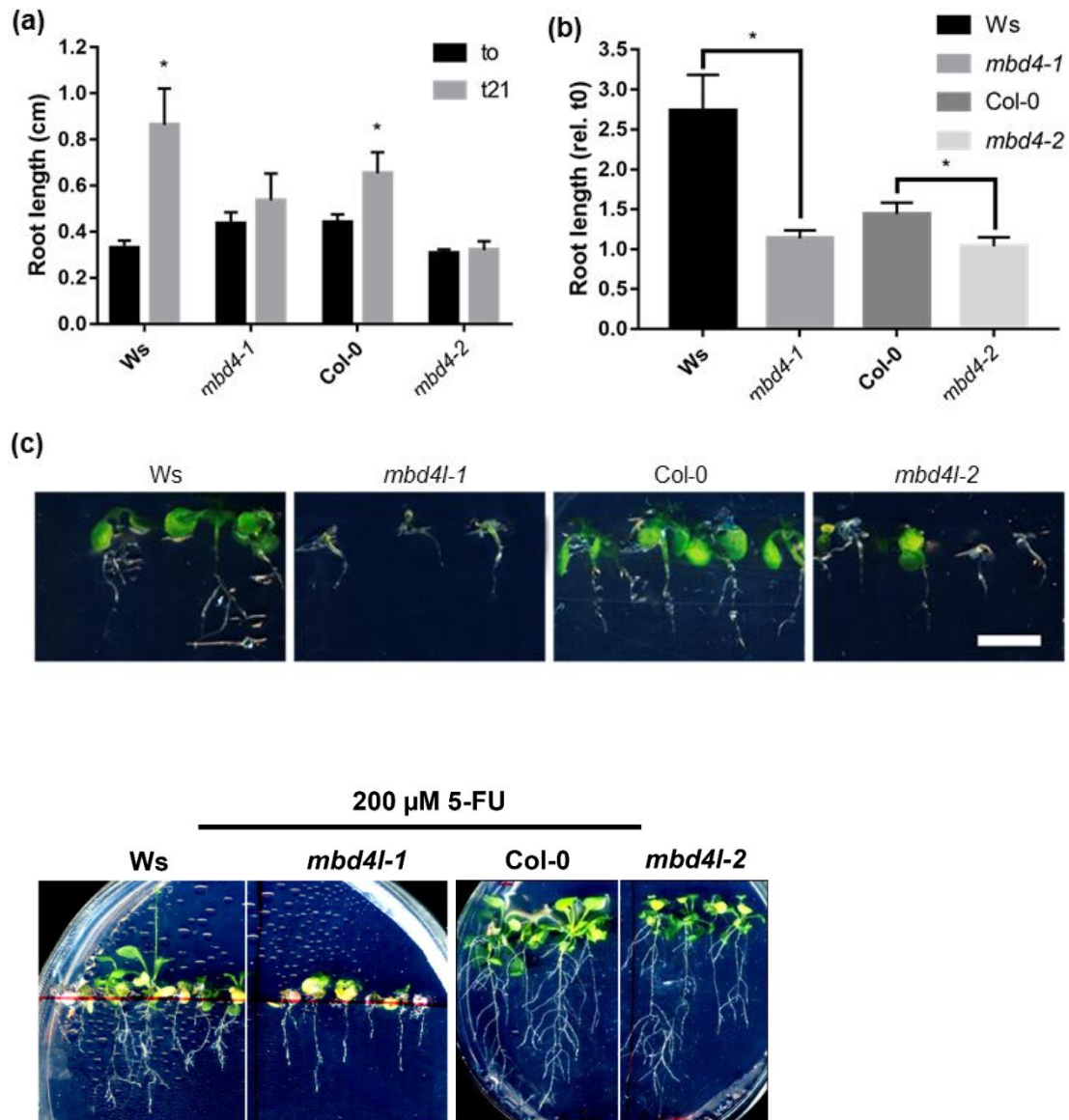
### **Con trasplante**

Para descartar que la hipersensibilidad de las mutantes *mbd4l* al 5-FU, sea debida a deficiencias en la germinación o al desarrollo inicial del embrión, realizamos experimentos de trasplante, en donde utilizamos plántulas de 7 días de edad y de tamaño similar entre los genotipos. Evaluamos y cuantificamos el efecto del 5-FU sobre la tasa de crecimiento de las raíces principales. Para esto, semillas de los genotipos *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *mbd4l-2* fueron embebidas, germinadas y crecidas sobre placas verticales conteniendo medio de crecimiento sin 5-FU durante 7 días. Luego las plántulas de 7 días de edad, fueron transferidas a nuevas placas verticales, que contenían medio de crecimiento suplementado con distintas dosis del mutágeno (0 y 100  $\mu\text{M}$  de 5-FU) (Fig. 11 c). El largo de la raíz principal fue determinado al día 21 después del trasplante. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Dr. Ignacio Lescano (CIQUIBIC-CONICET).

Observamos que, en presencia de 5-FU, las raíces principales de las plantas WT (*Ws* y *Col-0*) aumentaron significativamente su tamaño. En contraste, las raíces de las mutantes *mbd4l-1* y *mbd4l-2*, no mostraron cambios relativos de longitud al finalizar el periodo de estudio. A estos resultados los podemos observar, analizando tanto valores absolutos ( $t_0$  y  $t_{21}$ ) (Fig. 14 a) como relativos ( $t_{21}/t_0$ ) (Fig. 14 b) del crecimiento de la raíz. Además, una fuerte reducción de la biomasa aérea de las plántulas fue observada al día 21 de tratamiento con 5-FU (Fig. 14 c).

Curiosamente, observamos que a tiempos más largos (30 días) de tratamiento con dosis elevadas de 5-FU (200  $\mu\text{M}$ ), no se revierte el déficit de crecimiento observado en las mutantes *mbd4l*, y se afecta drásticamente su crecimiento y supervivencia (Fig. 14 d). Estos resultados sugieren que la tasa de crecimiento de las mutantes *mbd4l* en estadio post-germinativo está fuertemente afectada por tratamientos con 5-FU. Además, las mutantes expuestas al mutágeno por largos periodos no logran mejorar su estado, ni reiniciar su crecimiento. Más aún, esta condición, afecta la supervivencia de estas plantas.

Este conjunto de resultados provee la primera evidencia sobre la actividad *in vivo* de MBD4L. Ambos alelos mutantes de *mbd4l* mostraron fenotipos de hipersensibilidad frente al 5-FU, en estadios germinativos y post-germinativos. Esto sugiere que una reducción en los niveles transcripcionales de *MBD4L*, afecta negativamente la respuesta de las plantas al agente genotóxico 5-FU.



**Figura 14. Hipersusceptibilidad post-embrionaria de mutantes *mbd4l* al 5-FU.** La longitud de la raíz absoluta (a) y tasa de crecimiento (b) de *mbd4l-1* y *mbd4l-2* luego de 21 días después del trasplante a medio de crecimiento con 100  $\mu$ M 5-FU. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $n=30$ ,  $p<0,05$  prueba Mann-Whitney U) entre genotipos. Fenotipo de crecimiento de *mbd4l-1* y *mbd4l-2* luego de 21 días en 100  $\mu$ M 5-FU (c) y 30 días en 200  $\mu$ M 5-FU (d). Barra: 0.5 cm.



## Respuesta de plantas con niveles elevados de *MBD4L* a 5-FU

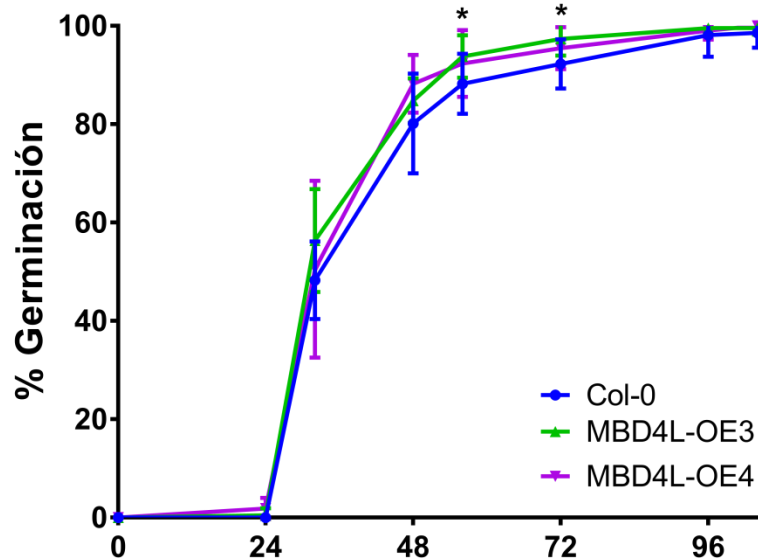
### MBD4L-OE3 y MBD4L-OE4

El gen *MBD4L* presenta 2 variantes de *splicing*, bien distinguidas en ensayos de sqRT-PCR (Nota et al. 2015; Cecchini et al. 2022), las cuales fueron clonadas y fusionadas a GFP para determinar su localización subcelular. Semillas homocigotas de ambas variantes del gen fueron obtenidas previamente en el laboratorio (Nota 2014). Se encontró que la versión más larga de la proteína (MBD4L-OE3) se localiza mayormente en nucleoplasma, mientras que la versión corta (MBD4L-OE4) es predominante en nucléolo (Nota et al. 2015; Cecchini et al. 2022).

### Germinación en 5-FU

Como la presencia de *MBD4L* resulta necesaria para la germinación de las semillas expuestas a 5-FU, nos preguntamos si las plantas que sobreexpresan *MBD4L* podrían tener una germinación más eficiente bajo dosis elevadas de 5-FU. Para analizar esto, semillas de los genotipos Col-0 y sobreexpresantes de *MBD4L* (*MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4*) fueron embebidas, germinadas y sembradas sobre placas que contenían distintas dosis de mutágeno (0, 100 y 200  $\mu$ M 5-FU). En este caso, el porcentaje de germinación se determinó a 24, 32, 48, 56, 72 y 96 hs de exposición a la luz. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Dr. Ignacio Lescano (CIQUIBIC-CONICET).

En ausencia de 5-FU, observamos un aumento significativo de germinación en las semillas de *MBD4L-OE3*, comparado con Col-0, a las 56 y 72 hs luego de la exposición a la luz (Fig. 15 a). En los restantes tiempos examinados, leves incrementos en el porcentaje de germinación, no significativos, fueron detectados en las semillas *MBD4L-OE3*, comparadas con Col-0 (Fig. 15). De modo similar, mayores porcentajes de germinación, no significativos, fueron observados en las semillas *MBD4L-OE4*, comparadas con Col-0, en todos los tiempos analizados (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *MBD4L* otorga una germinación más eficiente a las semillas crecidas bajo condiciones controladas.

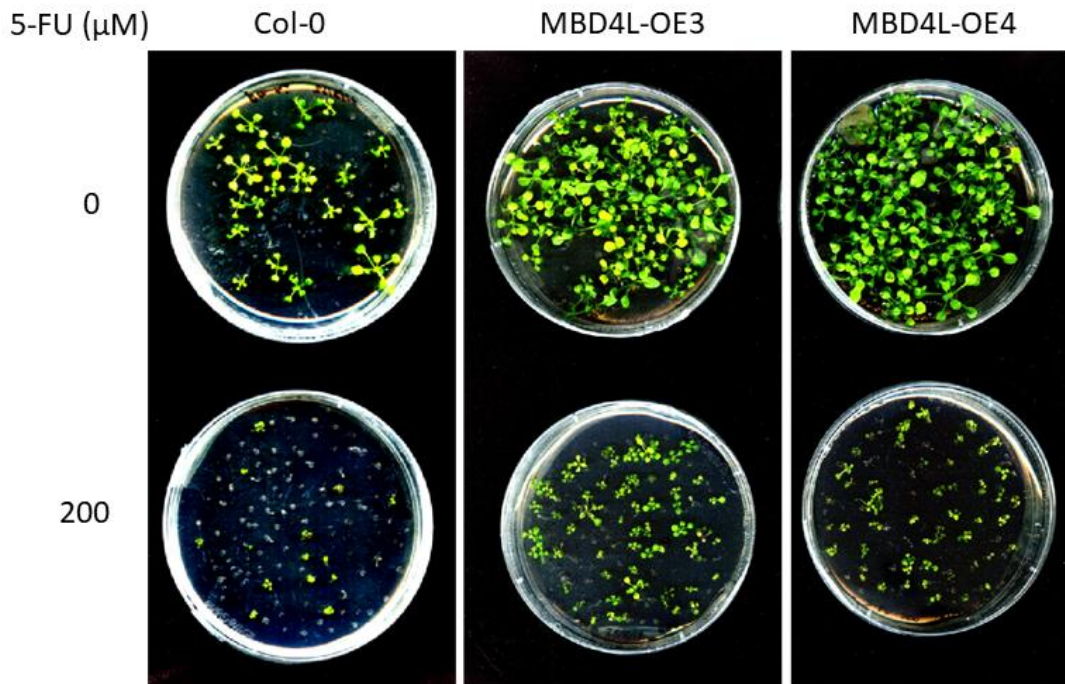


**Figura 15. Germinación de semillas que sobreexpresan *MBD4L* en condiciones control.** Porcentaje de germinación de Col-0, *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4* a diferentes tiempos de exposición a la luz. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre Col-0 y *MBD4L-OE3* ( $n = 250$ ,  $p < 0,05$  prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

### Crecimiento de plántulas *MBD4L-OE* en 5-FU (sin trasplante)

Debido a que la presencia y participación de *MBD4L* es importante para mantener el crecimiento de las plantas expuestas a 5-FU, y a que las plantas que poseen cantidades elevadas de *MBD4L* (*MBD4L-OE*) presentan una germinación más eficiente, nos preguntamos si la sobreexpresión de *MBD4L* mejoraría el crecimiento de plantas sometidas a 5-FU. Para determinar esto, placas con semillas de los genotipos Col-0, *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4*, fueron preparadas siguiendo el esquema de la figura 11 a. Para este experimento se utilizó la mayor dosis de 5-FU (200  $\mu$ M), y el efecto en el crecimiento de las plántulas fue determinado a los 14 días después de la siembra. En ausencia de 5-FU, observamos un crecimiento similar entre las plantas Col-0, *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4* (Fig. 16, panel superior). Sin embargo, en presencia de 200  $\mu$ M de 5-FU, observamos un mayor crecimiento de las plantas *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4*, comparado con Col-0 (Fig. 16, panel inferior). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *MBD4L* mejora el crecimiento de plantas expuestas a 5-FU.





**Figura 16.** Las plantas sobreexpresantes de MBD4L exhiben una elevada tolerancia al 5-FU. Plántulas de Col-0, *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE4* de 14 días crecidas bajo condiciones control (0  $\mu\text{M}$  5-FU) (panel superior), y 200  $\mu\text{M}$  5-FU (panel inferior).

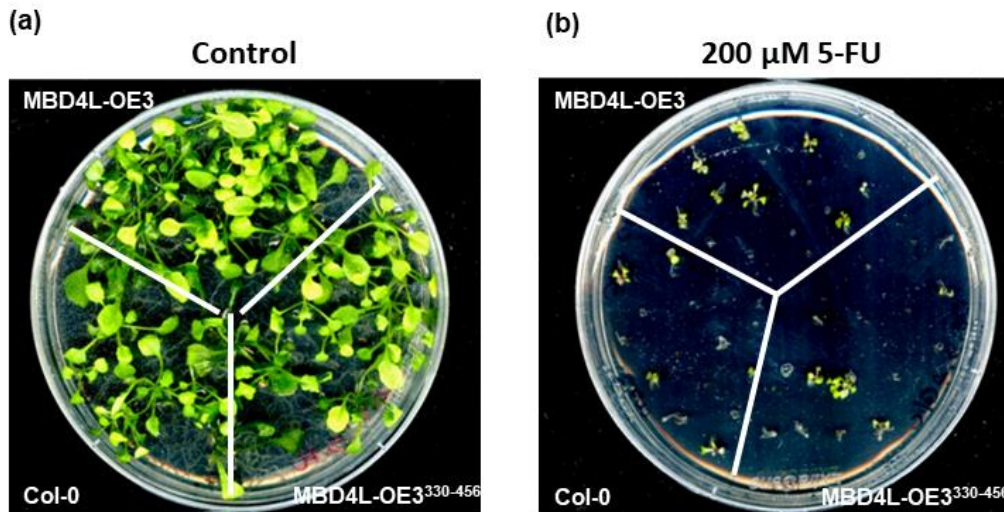
### Crecimiento de plántulas *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> en 5-FU (sin trasplante)

Trabajos previos donde analizaron la eficiencia en el reconocimiento de sustratos de MBD4L *in vitro*, determinaron que la presencia del dominio glicosilasa de MBD4L es de suma importancia para lograr un reconocimiento y escisión de sustratos de modo eficiente (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013).

Debido a que la sobreexpresión de MBD4L otorga un mejor crecimiento a las plantas crecidas bajo concentraciones elevadas de 5-FU, analizamos si MBD4L mediaría esta respuesta, requiriendo su dominio glicosilasa HhH-GPD. Para testear esto, placas con semillas de los genotipos Col-0 y *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> (*MBD4L-OE* sin el dominio glicosilasa), fueron preparadas siguiendo el esquema de la figura 11 a, y utilizando las mismas condiciones que en el ítem anterior. Las semillas homocigotas que sobreexpresan la versión trunca de *MBD4L-OE3*, la cual carece de la secuencia que codifica para el dominio glicosilasa (330-445 aa), fueron generadas previamente en el laboratorio (Nota 2014).

En ausencia de 5-FU, observamos un crecimiento similar entre las plantas Col-0 y *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> (Fig. 17 a). Llamativamente, en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de 5-FU, observamos una disminución del crecimiento, de modo semejante, en las plantas Col-0 y *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup>, pero menos notorio en la versión de la proteína completa *MBD4L-OE3*

(Fig. 17 b). Estos resultados sugieren que la presencia del dominio glicosilasa de MBD4L es importante para mejorar el desarrollo y crecimiento de las plantas en condiciones de 5-FU. No obstante, las plantas Col-0 y *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> parecieran mostrar una susceptibilidad similar a 5-FU.

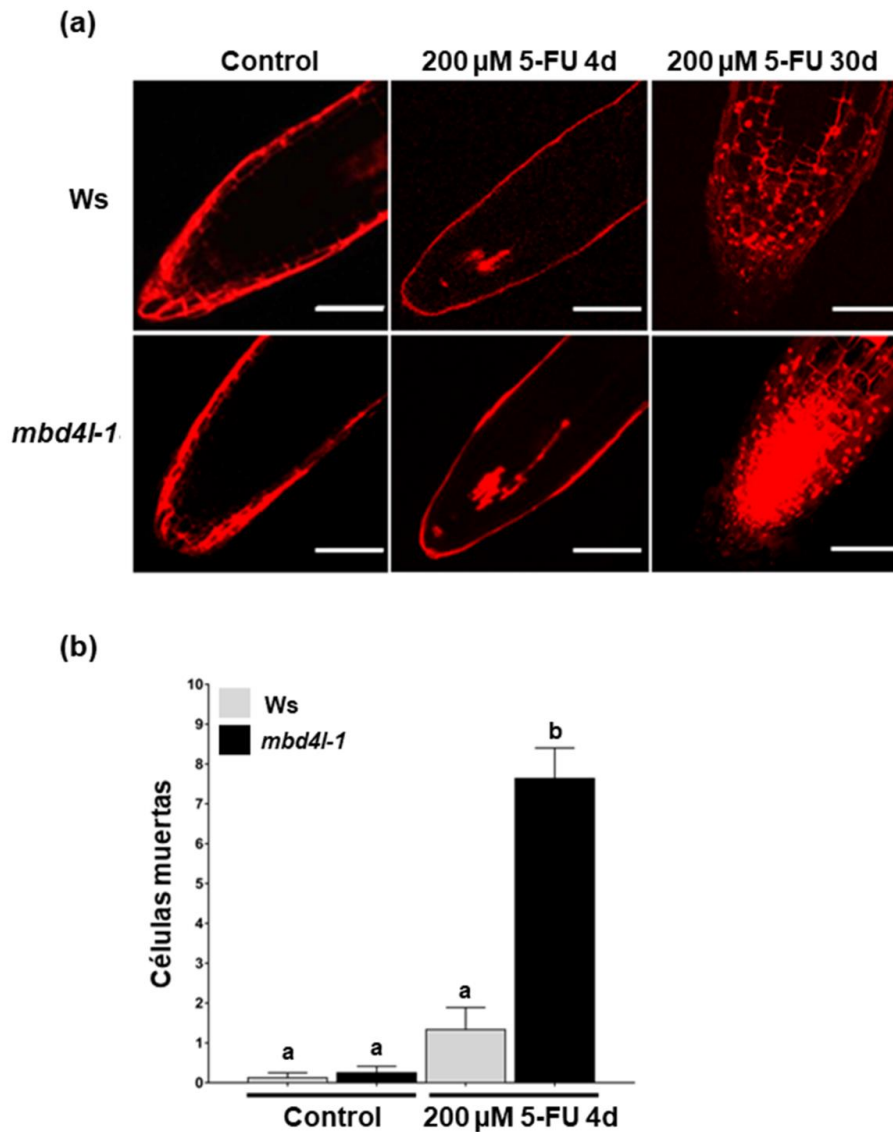


**Figura 17.** Plantas *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> que expresan la variante carente del dominio glicosilasa muestran una elevada susceptibilidad al 5-FU. Plántulas de Col-0, *MBD4L-OE3* y *MBD4L-OE3*<sup>330-445</sup> de 14 días crecidas bajo condiciones control (0  $\mu\text{M}$  5-FU) (a) y 200  $\mu\text{M}$  5-FU (b).

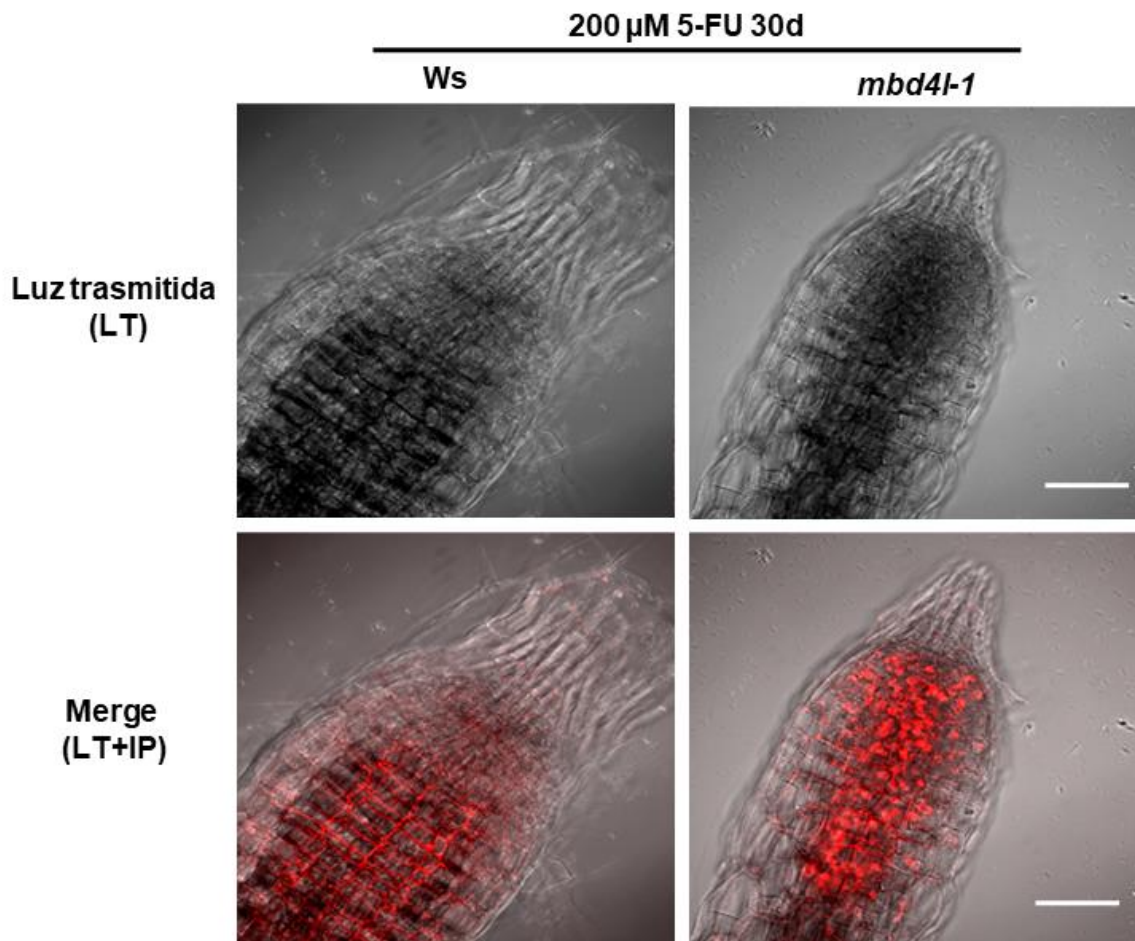
### Muerte celular en mutantes de *mbd4l-1* expuestas a 5-FU

Los ápices radicales presentan células meristemáticas que se dividen constantemente (Fig. S8), y por ello pueden incorporar 5-FU y/o U al ADN nuclear a través de la replicación. En base a esto, analizamos si la ausencia de MBD4L afecta la viabilidad e integridad de las células meristemáticas de la raíz en presencia de 5-FU. Para ello, placas de los genotipos *Ws* y *mbd4l-1* fueron preparadas acorde al esquema experimental mostrado en la figura 11 c, utilizando plántulas de 10 días expuestas a distintas dosis del mutágeno (0 y 200  $\mu\text{M}$  5-FU). Para detectar células no viables, las plántulas fueron colectadas al día 4 y 30 después del trasplante, y sus ápices fueron teñidos con Ioduro de Propidio (IP) (ver Materiales y Métodos, apartado 4). En ausencia de 5-FU, observamos un número muy reducido y similar de células no viables en las plantas *mbd4l-1* y *Ws* (Fig. 18a, b). Sin embargo, después de 4 días de tratamiento con 5-FU, los niveles de células muertas en los tejidos meristemáticos de la raíz fueron significativamente más altos (5 veces) en *mbd4l-1*, que en las plantas *Ws* (Fig. 18 a, b). Curiosamente, después de 30 días de tratamiento con 5-FU, una masiva muerte celular fue observada en los ápices de las raíces de *mbd4l-1*, pero no así en las plantas *Ws* (Fig. 18 a). Además, cambios morfológicos drásticos, tales como un lumen

celular reducido, fueron observados en las células de los ápices radiculares de *mbd4l-1*, pero no en las plantas *Ws* (Fig. 19). Estos resultados sugieren que MBD4L es necesaria para mantener la integridad y viabilidad de las células meristemáticas de la raíz, sometidas a dosis elevadas de 5-FU.



**Figura 18. Las plantas mutantes *mbd4l* exhiben una reducida viabilidad celular en los ápices radicuales en respuesta al efecto genotóxico de 5-FU.** (a) Microfotografías confocales de raíces de *Ws* y *mbd4l-1* bajo condiciones control (panel izquierdo), y tratamientos por 4 (panel del medio), y de 30 (panel derecho) días con 200 μM 5-FU. Barra: 50 μm. (b). Cuantificación del número absoluto de células no viables detectadas en condiciones control (0 μM 5-FU) y 200 μM 5-FU al 4 día de tratamiento. La cantidad de señal del IP (rojo) es proporcional al número de células no viables encontradas. La cuantificación fue realizada en las células adyacentes al centro quiescente (QC). La barra representa la media ± SEM (n=25). Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05, prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).



**Figura 19.** Las raíces de *mbd4l* muestran una morfología alterada en 5-FU. Fotografías de raíces de *Ws* y *mbd4l-1* crecidas en 200  $\mu$ M 5-FU por 30 días. LT: Luz Transmitida/Clara. IP: Ioduro de Propidio. Merge: LT+IP. Barra: 50  $\mu$ m.

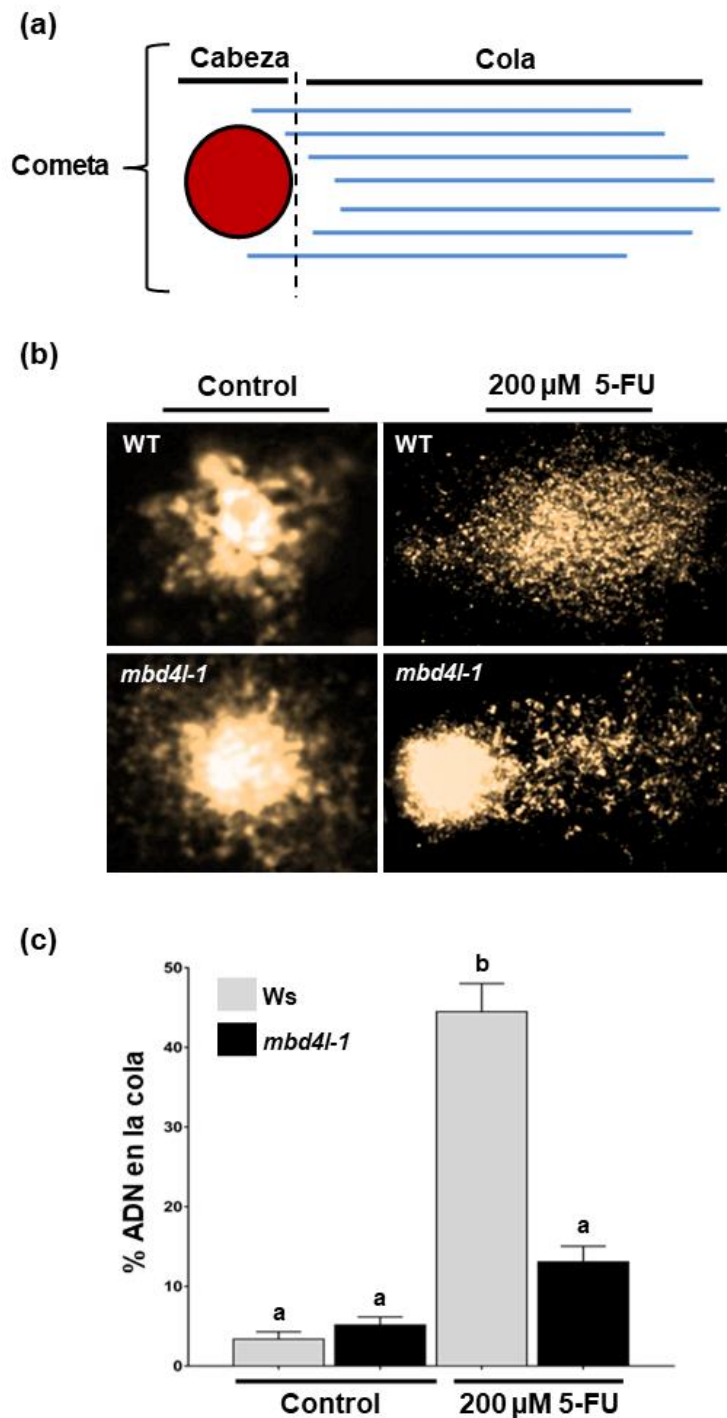
### Reparación del ADN en mutantes *mbd4l-1* sometidas a 5-FU

Debido a que en presencia de 5-FU, MBD4L es de vital importancia para mantener tanto la viabilidad como la integridad de las células meristemáticas de la raíz, determinamos si bajo esta condición, la enzima actúa activamente en la remoción de 5-FU y/o U que está/n siendo incorporado/s constantemente al ADN. Para evaluar esto, monitoreamos la integridad del ADN mediante el uso de ensayos cometa (Rodríguez et al. 2011; Rodríguez et al. 2018) (Materiales y Métodos, apartado 5). Semillas de los genotipos *Ws* y *mbd4l-1*, fueron preparadas y plaqueadas siguiendo el esquema de la figura 11 c. En este experimento se utilizaron plántulas de 10 días, y distintas dosis de 5-FU (0 y 200  $\mu$ M). Las plántulas enteras fueron colectadas al día 4 después del trasplante y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del procesamiento. El % de ADN en la cola de los cometas, fue utilizado como indicador del grado de ruptura de las hebras del ADN (Olive y Banáth 2006) (Fig. 20

a). En ausencia de 5-FU, detectamos niveles reducidos de ADN fragmentado, tanto en las plantas Ws (8%), como en *mbd4l-1* (8%) (Fig. 20 b, c). Sin embargo, luego del tratamiento con 5-FU, la ruptura del ADN incrementó considerablemente en las plantas Ws (42%), pero no así en las mutantes de *mbd4l-1* (12%) (Fig. 20 b, c). Estos resultados aportan la primera evidencia de la actividad ADN glicosilasa de MBD4L sobre el genoma nuclear *in vivo*.

En condiciones normales de crecimiento, la presencia del/los sustrato/s de MBD4L en el ADN sería escasa. En contraste, el tratamiento con 5-FU aumentaría el contenido de dichos sustratos en el ADN, por lo que la enzima aumentaría considerablemente su actividad sobre el ADN nuclear.

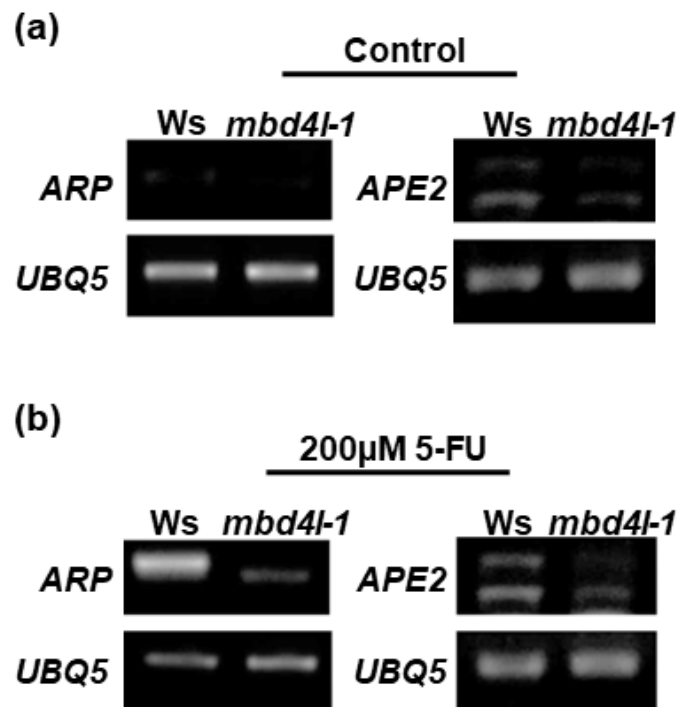




**Figura 20. *mbd4l* exhibe bajos niveles de ADN fragmentado luego del tratamiento con 5-FU.** (a) Esquema de las partes de un cometa luego del proceso de electroforesis. Cabeza: círculo rojo, ADN íntegro. Cola: líneas azules, ADN fragmentado. (b) Microfotografías de cometas de Ws y *mbd4l-1* bajo condiciones control (0  $\mu$ M 5-FU) (panel superior) y 200  $\mu$ M 5-FU (panel inferior). (c) Cuantificación del % de ADN en la cola en Ws y *mbd4l-1* sometidas a diferentes concentraciones (0 y 200  $\mu$ M) de 5-FU. La longitud de la cola es proporcional al nivel de ADN fragmentado. La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=250). Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

## **Niveles de expresión de genes del BER en mutantes *mbd4l-1* expuestas a 5-FU**

La ADN glicosilasa MBD4L es una enzima monofuncional que reconoce y escinde las bases U, 5-FU y/o 5-BrU, generando como producto sitios AP, sin modificar la integridad de las hebras del ADN (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013; Roldán-Arjona, Ariza, y Córdoba-Cañero 2019). Nuestros resultados indican que luego del tratamiento con los agentes genotóxicos 5-FU y 5-BrU, el ADN de las plantas *Ws* tiene mayor número de cortes que el de las plantas *mbd4l-1*. Los elevados porcentajes de cortes se deben probablemente a un aumento de actividad de AP endonucleasa/s que actúa/n aguas debajo de MBD4L, la/s cual/es procesaría/en los sitios AP, rompiendo el esqueleto azúcar-fosfato del ADN para continuar con la reparación del BER. Considerando que varias AP endonucleasas están reguladas a nivel transcripcional, cuantificamos los niveles de ARNm para ARP, APE1L y APE2, así como para la 3'-fosfatasa ZDP, mediante ensayos de sqRT-PCR. Las muestras fueron obtenidas de placas preparadas de la misma forma que para los ensayos cometa con 5-FU/5-BrU. En ausencia de 5-FU, detectamos niveles transcripcionales reducidos de ARP, que fueron similares en las plantas *Ws* y *mbd4l-1* (Fig. 21 a, panel izquierdo). En contraste, los niveles de transcritos de APE2, fueron levemente menores en *mbd4l-1* que en *Ws* (Fig. 21 a, panel derecho). En presencia de 5-FU, los niveles de expresión, tanto de ARP como de APE2, incrementaron considerablemente en las plantas *Ws*, pero no así en *mbd4l-1* (Fig. 21 b). Estos resultados sugieren que bajo condiciones de tratamiento con 5-FU, MBD4L actuaría sobre el ADN escindiendo su/s sustrato/s y esto generaría un aumento de sitios AP, que activaría la expresión de las AP endonucleasas ARP y APE2, las cuales podrían continuar con la vía de reparación del ADN iniciada por MBD4L.



**Figura 21.** *mbd4l* presenta bajos niveles de expresión de ARP y APE2 en condiciones de 5-FU. Imágenes de sqRT-PCR de los genes *ARP* (a) y *APE2* (b) bajo condiciones control (0 µM 5-FU) y 200 µM 5-FU.



## **CAPÍTULO II: CONTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LAS ADN GLICOSILASAS MBD4L y AtUNG EN LA REPARACIÓN DEL ADN NUCLEAR *IN VIVO***

En el capítulo anterior determinamos que MBD4L participa *in vivo* del reconocimiento y remoción del U/5-FU del ADN. Sin embargo, parecería que MBD4L no es la única enzima capaz de escindir estas bases, ya que detectamos niveles reducidos de ADN fragmentado en la mutante *mbd4l.1* luego del tratamiento con 5-FU. Esto nos indicaría que otra ADN glicosilasa participa en el proceso de reparación del ADN nuclear en presencia de 5-FU. La ADN glicosilasa AtUNG podría estar involucrada en evento, ya que tiene la capacidad de reconocer y escindir uracilo *in vitro* (Córdoba-Cañero et al. 2010). Sin embargo, a diferencia de otras ADN glicosilasas de Arabidopsis y de UNG2 de mamíferos, la presencia de AtUNG en el núcleo no fue reportada hasta la fecha (Tabla 3).

En este capítulo, nos ocupamos de determinar el grado de participación de la ADN glicosilasa AtUNG en la reparación del ADN *in vivo* en respuesta a 5-FU. Además, analizamos la actividad glicosilasa solo de MBD4L, excluyendo a UNG, mediante el uso del análogo de base 5-BrU, sustrato exclusivo de MBD4L *in vitro* (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013).

Tabla 3. Localización subcelular de ADN glicosilasas en mamíferos y Arabidopsis.

Superfamilia	ADN glicosilasas	Localización subcelular	
		Mamíferos	Arabidopsis
UDG	UNG2	Núcleo	
	UNG1	Mitocondrias	
	AtUNG		Mitocondrias; ¿Núcleo?
	SMUG1	Núcleo	
	TDG	Núcleo	
AAG	MPG (AAG)	Núcleo	
	AthAAG		No caracterizada
H2TH	NEIL1	Núcleo	
	NEIL2	Núcleo	
	NEIL3	Núcleo	
	AtFPG		No caracterizada-Variantes ARNm con y sin NLS (¿Núcleo y otras organelas?)
HhH-GPD	MBD4	Núcleo	
	AtMBD4L		Núcleo
	OGG1	Núcleo, Mitocondrias	
	AtOGG1		Núcleo, variante sin NLS (¿otra organela?)
	MUTYH	Núcleo	
	AtMUTY		No caracterizada
	NTHL1	Núcleo, Mitocondrias	
	AtNTH1		Nucleoides dentro de cloroplastos, y putativamente en Núcleo por NLS
	AtNTH2		Nucleoides dentro de cloroplastos
	DME		Núcleo
	ROS1		Núcleo
	DML2		Núcleo
	DML3		Núcleo

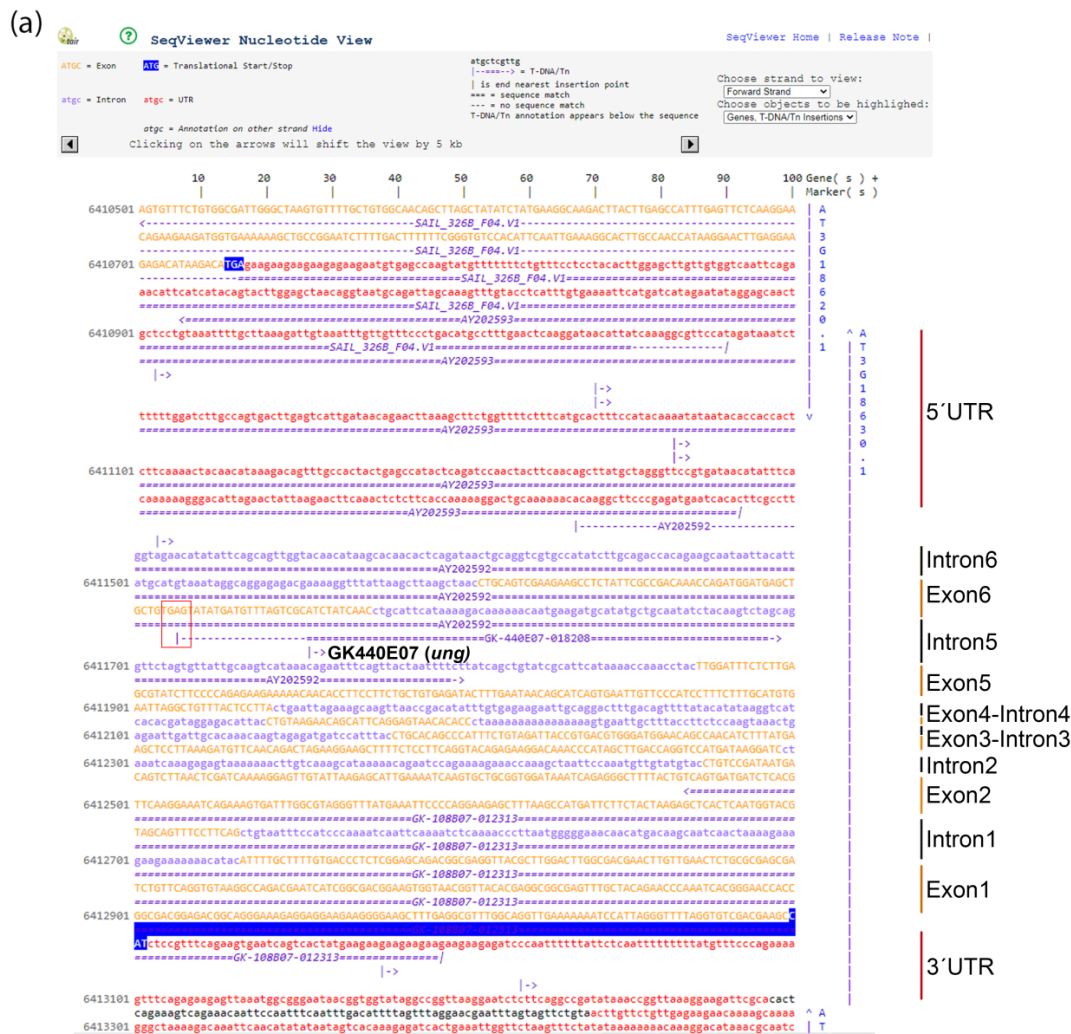
### Caracterización molecular de la mutante de *AtUNG* (At3G18630)

Para estudiar el rol *in vivo* de la ADN glicosilasa *AtUNG* y determinar el grado de participación en el reconocimiento y escisión del uracilo o sus derivados halogenados 5-FU y/o 5-BrU, del ADN nuclear, utilizamos una mutante con niveles reducidos de esta enzima. El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes (At3g18630 y At2g10550) que codifican polipéptidos con secuencia similar a la ADN glicosilasa UDG (Córdoba-Cañero et al. 2010). El gen At3G18630 que fue designado como *AtUNG* se encuentra en una región rica en genes, y cuenta con una serie de mutantes insercionales de T-DNA en la región 3'UTR y 5'UTR, así como con una mutante en el cuerpo del gen (Fig. 22 a; Fig. 23 a, b). Por otro

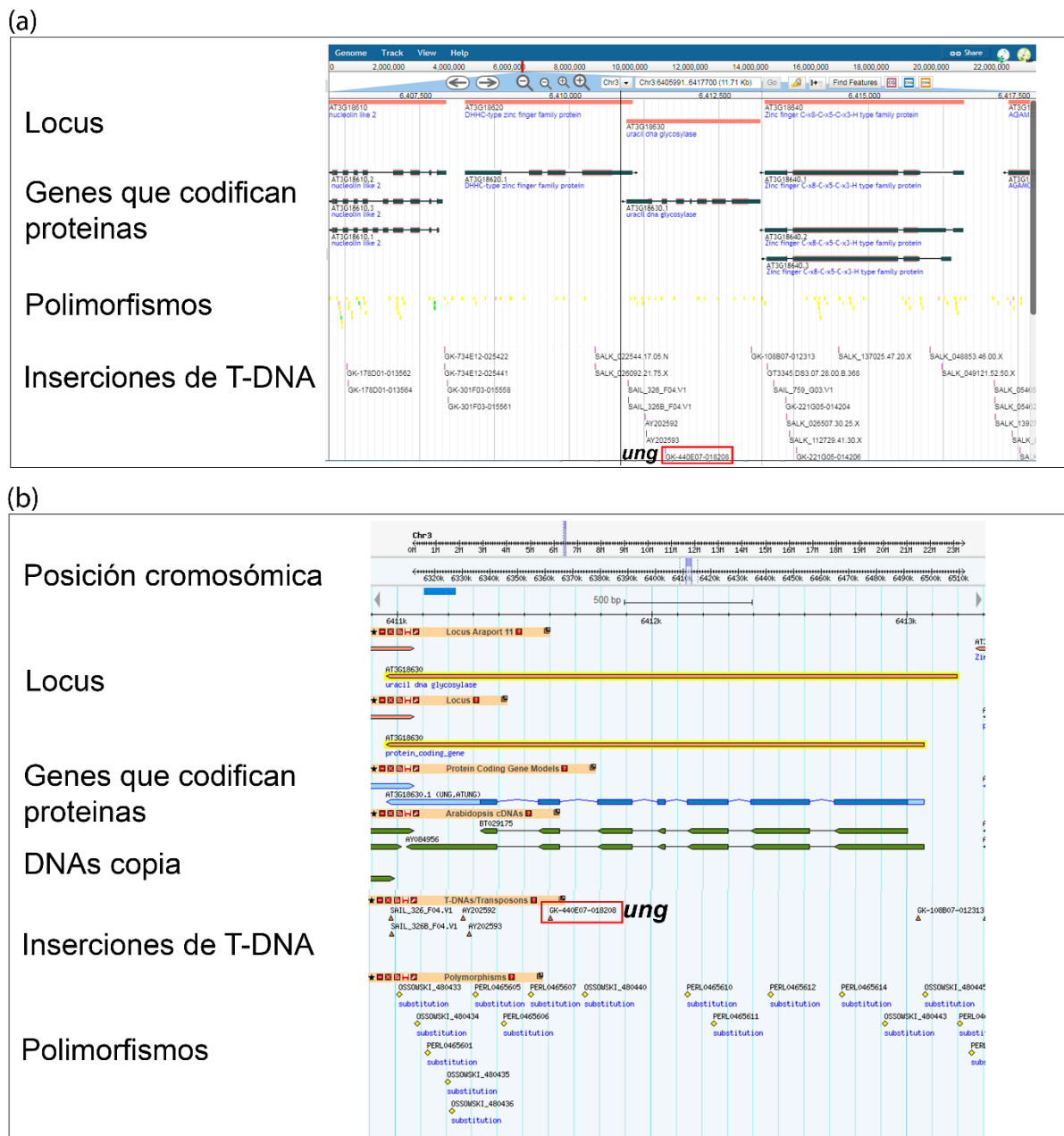
lado, el gen At2g10550 está localizado en una región cromosomal rica en secuencias repetitivas, y sería un parálogo inactivo de *AtUNG* generado en un evento de duplicación génica y subsecuente disrupción por la inserción de al menos 2 transposones (Córdoba-Cañero et al. 2010). Las semillas mutantes de *AtUNG* utilizadas en esta tesis (GK-440E07) fueron solicitadas al laboratorio de la Dra. Teresa Roldan-Arjona (Universidad de Córdoba, España), que previamente caracterizó esta línea a nivel molecular, y la utilizó en experimentos con 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010). Además, otro estudio analizó la capacidad de UNG de reconocer derivados desaminados de citosina sobre el ADN nuclear y mitocondrial, generados por la sobreexpresión de una citosina desaminasa, utilizando la misma línea mutante (Wynn, Purfeerst, y Christensen 2020), por lo que nos resultó útil utilizarla en nuestros ensayos. La mutante homocigota GK-440E07, del ecotipo Col-0, tiene una inserción de T-DNA en el sexto exón del gen *UNG*, y fue denominada *ung* (Fig. 22 a, b; Fig. 23 a). Estas semillas también están disponibles en el banco de semillas del ABRC cuyo número de referencia es CS442199. Los *primers* utilizados para genotipar esta mutante y los resultados del genotipado se muestran en la Fig. 22 b y Fig. 22 c, respectivamente.

### **Expresión de *AtUNG* en mutantes *ung***

La expresión del gen At3g18630 en las plantas mutantes *ung* no se muestra en trabajos previos (Córdoba-Cañero et al. 2010; Wynn, Purfeerst, y Christensen 2020), por lo que decidimos evaluar los niveles del transcripto de *AtUNG* en las mismas mediante ensayos de sqRT-PCR. Utilizando los cebadores F6 (hibrida sobre el exón 2) y R6 (hibrida sobre el exón 3) (Fig. 22 b) observamos que las plantas *ung* tienen niveles de transcripto indetectables comparado con las Col-0 (Fig. 22 c, derecha). Esto confirma que las semillas utilizadas en este estudio son deficientes en *AtUNG*.



**Figura 22. Mutantes de T-DNA en At3g1863.** (a) Esquema del gen At3g18630 obtenida del TAIR, en donde se muestran los sitios de inserción de T-DNA. 3'UTR y 5'UTR (rojo), exones (naranja) e intrones (azul). (b) Esquema del gen *at3g18630* en donde se indica la ubicación del T-DNA en la línea mutante *ung* utilizada en esta tesis. Los primers o8409/R5 y F6/R6, fueron utilizados para genotipar las mutantes *ung* (c, izquierda) y evaluar los niveles de expresión de *AtUNG* (c, derecha), respectivamente.



**Figura 23. Características del gen At3g18630.** Posición cromosómica, variantes de splicing, polimorfismos e inserciones de T-DNA obtenidas de la base de datos *ePLANT* (a) y TAIR (b). El cuadro rojo señala la mutante *ung* utilizada en los estudios.

### Localización subcelular de AtUNG

En mamíferos el gen nuclear que genera la proteína AtUNG es de copia única y codifica por *splicing* alternativo las isoformas UNG1 y UNG2 cuyas secuencias N-terminales son levemente diferentes (44 aa) (Nilsen et al. 1997). Curiosamente, se observó que esa diferencia en la región N-terminal de las isoformas determina la localización subcelular de las proteínas, siendo UNG1 encontrada en mitocondria y UNG2 en núcleo (Nilsen et al.

1997) (Tabla 3). En Arabidopsis la bibliografía y los bancos de datos reportan una única isoforma codificada por el gen At3G18630 (Fig. S2 a). Curiosamente, esta sería la única ADN glicosilasa de las que están caracterizadas funcionalmente hasta la fecha en esta planta que carece de *splicing* alternativo (Nimeth, Riegler, y Kalyna 2020) (Tabla 4).

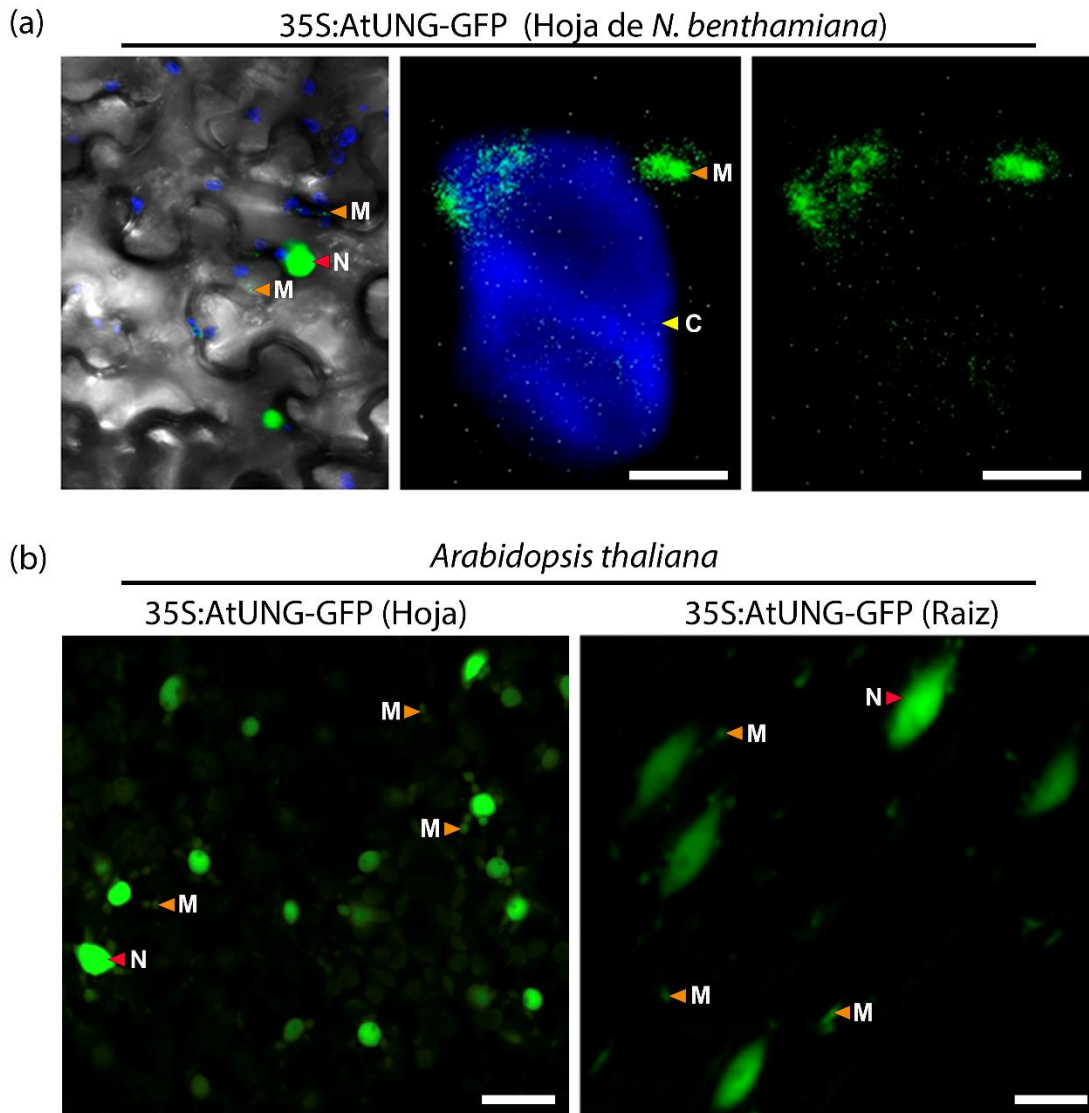
**Tabla 4. *Splicing* Alternativo de genes involucrados en el sistema BER de Arabidopsis.** Adaptado de Nimeth et al. 2020.

VER	Gen	ID	<i>Splicing</i> Alternativo (AtRTD2)
ADN glicosilasas	OGG1	At1g21710	+
	FPG	At1g52500	+
	NTH1	At2g31450	+
	NTH2	At1g05900	+
	DME	At5g04560	+
	ROS1	At2g36490	+
	DML3	At4g34060	+
	<b>UNG</b>	<b>At3g18630</b>	-
	MBD4L	At3g07930	+
Otos componentes	ARP	At2g41460	+
	APE1L	At3g48425	+
	APE2	At4g36050	+
	ZDP	At3g14890	+
	TDP1	At5g15170	+
	XRCC1	At1g80420	+
	SAV6	At5g26680	+
	PARP1	At2g31320	+
	PARP2	At4g02390	+
	Pol δ	At1g09815	-
		At2g42120	+
		At5g63960	+
	Pol ε	At1g08260	-
		At2g27120	+
		At5g22010	+
	LIG1	At1g08130	-
	At1g49250	-	

La localización de AtUNG fue predicha a partir del análisis con 22 programas diferentes obtenidos de la base de datos SUBA (*Subcellular Localization Database for Arabidopsis Proteins*), y esta se encontraría principalmente en plástidos, y en menor medida en núcleo,

mitocondria y citosol (Tabla 3). Sin embargo, existen muy pocos datos experimentales que describen la localización de AtUNG *in vivo*. Un estudio sugiere que AtUNG podría tener una localización nuclear debido a que en su extremo N-terminal presenta mayor similitud de secuencia con UNG2 que UNG1 de humanos, en donde se observa un motivo de unión a PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Córdoba-Cañero et al. 2010) (Fig. S2 b). PCNA es una proteína nuclear conservada en eucariotas que interviene en la replicación del ADN (Strzalka y Ziemienowicz 2011). En *Arabidopsis* PCNA1 y PCNA2 son codificadas por los genes At1g07370 y At2g29570, respectivamente (*Arabidopsis Genome Initiative* 2000). En contraste, otro estudio realizado casi en paralelo determinó experimentalmente la localización subcelular de los primeros 174 aa de AtUNG fusionada a GFP en protoplastos de *N. benthamiana*. En este caso se observó que la enzima presenta una localización exclusivamente mitocondrial (Boesch et al. 2009). En base a estos antecedentes, nos propusimos analizar la localización subcelular de la proteína AtUNG completa en plantas de *N. benthamiana* y *Arabidopsis in vivo*, lo cual es importante para evaluar sus potenciales efectos sobre el genoma nuclear.

Con este fin, clonamos la secuencia codificante completa de AtUNG (330 aa) fusionada a GFP, bajo el control de un promotor 35S. Luego, utilizamos este constructo (35S:AtUNG-GFP) para transformar de modo transiente hojas de *N. benthamiana* y analizar las muestras bajo un microscopio confocal. (Materiales y Métodos, apartado 10). Encontramos que 35S:AtUNG-GFP presenta una fuerte localización nuclear y mitocondrial (Fig. 24 a). Para determinar si este patrón se mantiene en *Arabidopsis*, generamos plantas transformadas de manera estable con el constructo 35S:AtUNG-GFP. Observamos que tanto en hojas como en raíces de *Arabidopsis*, 35S:AtUNG-GFP se encuentra principalmente en núcleos y mitocondrias (Fig. 24 b). Estos resultados indican que AtUNG se encuentra en núcleo en 2 especies de plantas distintas y que debido a esta localización podría participar en la reparación del genoma nuclear.

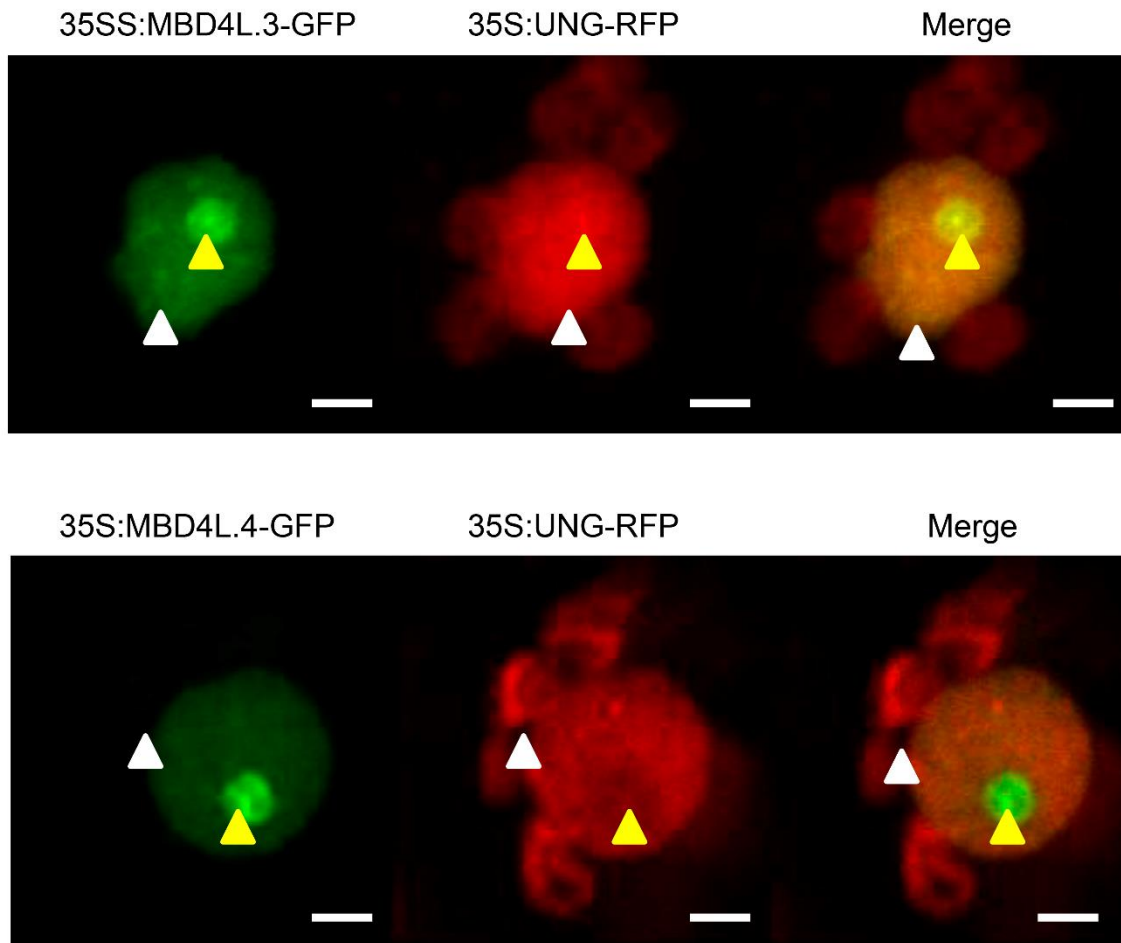


**Figura 24. Localización subcelular de AtUNG.** (a) 35S:AtUNG-GFP muestra una localización nuclear y mitocondrial en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas de forma transitoria. Panel izquierdo: vista panorámica de células epidermicas, en donde se observan núcleos (fluorescencia verde) y cloroplastos (fluorescencia azul). Panel medio: detalle de cloroplasto (fluorescencia azul) y mitocondrias periféricas (fluorescencia verde). Panel derecho: señal de mitocondrias (fluorescencia verde). Los triángulos naranja, rojo y amarillo indican mitocondria (M), núcleo (N) y cloroplasto (C), respectivamente. Barra: 2  $\mu$ . (b) 35S:AtUNG-GFP está presente en núcleo y mitocondrias de hoja (panel izquierdo) y raíz (panel derecho) de *Arabidopsis thaliana* transformada de manera estable. Los triángulos naranja, rojo y amarillo indican mitocondria (M), núcleo (N) y cloroplasto (C), respectivamente. Barra: 10  $\mu$ m.



## Co-localización de AtUNG y MBD4L en núcleo

Cómo AtUNG, al igual que MBD4L, está presente en núcleo, y además, ambas enzimas reconocen U *in vitro* (Córdoba-Cañero et al. 2010; Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013), nos preguntamos si tales enzimas podrían coexistir en determinados compartimentos nucleares. Evaluamos el grado de colocalización de ambas enzimas en el núcleo mediante la expresión transiente de AtUNG y MBD4L en *N. benthamiana*. Para eso, clonamos las secuencias codificantes de AtUNG (330 aa) fusionadas a RFP bajo el control de un promotor 35S (Materiales y Métodos, apartado 9). Los constructos 35S:MBD4L.3-GFP y 35S:MBD4L.4-GFP estaban disponibles en el laboratorio y habían sido utilizados en estudios previos (Nota et al. 2015). Como se mencionó previamente, 35S:MBD4L.3-GFP se localiza principalmente en nucleoplasma y en menor medida en nucléolo, mientras que 35S:MBD4L.4-GFP se encuentra preponderantemente en nucléolo (Cecchini et al. 2022). Infiltramos hojas de *N. benthamiana* con los vectores 35S:MBD4L.3-GFP y 35S:AtUNG-RFP o 35S:MBD4L.4-GFP y 35S:AtUNG-RFP y después de 36 hs las analizamos bajo el microscopio confocal. La expresión transiente de los pares 35S:MBD4L.3-GFP y 35S:AtUNG-RFP mostró una elevada co-localización en nucleoplasma (Fig. 25, panel superior). En contraste, los pares 35S:MBD4L.4-GFP y 35S:AtUNG-RFP mostraron una baja colocalización nucleoplásmica y prácticamente nula en nucléolo (Fig. 25, panel inferior). Esos resultados sugieren que AtUNG colocaliza parcialmente con MBD4L.3 en nucleoplasma.



**Figura 25. MBD4L.3 y AtUNG colocalizan en nucleoplasma.** Imágenes de microscopía confocal de núcleos provenientes de hojas de *Nicotiana benthamiana* transformada de modo transiente con los constructos 35S:MBD4L.3-GFP y 35S:AtUNG-RFP (panel superior), y 35S:MBD4L.4-GFP y 35S:AtUNG-RFP (panel inferior). Señal de GFP (verde), RFP (rojo), Merge (amarillo). Los triángulos indican: núcleo (blanco), nucléolo (amarillo). Barra: 4  $\mu$ m.

## **Análisis de regulación transcripcional entre *AtUNG* y *MBD4L***

### ***In silico***

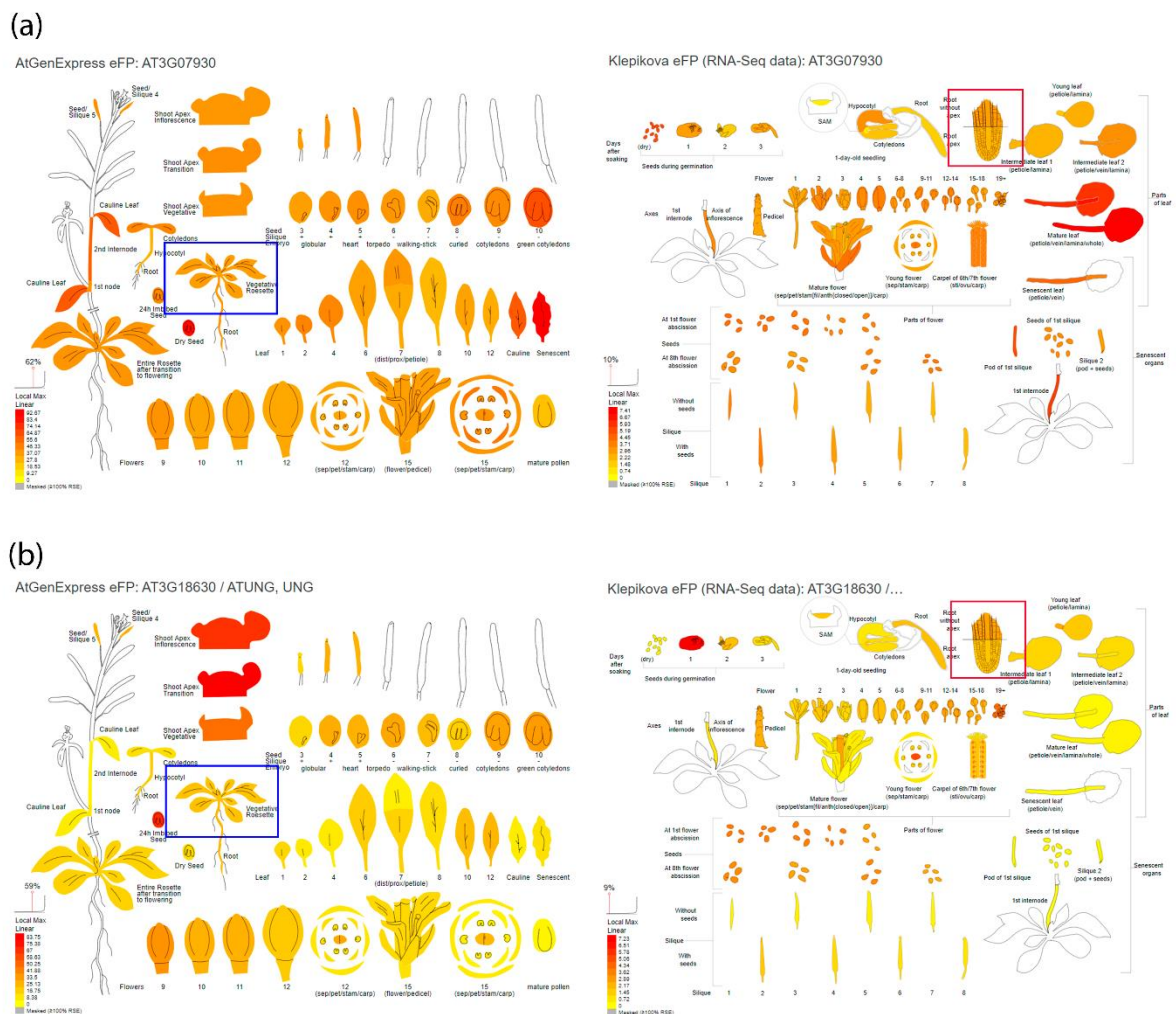
Debido a que AtUNG y MBD4L se encuentran en el núcleo, y a que ambas podrían remover del genoma nuclear lesiones causadas por exposición a 5-FU, nos preguntamos si estas enzimas presentan el mismo patrón de expresión, y si además, podrían estar co-reguladas a nivel transcripcional. Para determinar esto, en primer lugar, comparamos los niveles de expresión absolutos de las ADN glicosilasas MBD4L y AtUNG en los distintos tejidos/órganos a lo largo del desarrollo de la planta mediante el uso del programa *ePLANT* (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>).

*MBD4L* se expresa predominantemente en cotiledones, hojas caulinares y senescentes, piezas florales maduras, semillas secas, grano de polen maduro, protoplastos, xilema y floema (Fig. 26 a, panel izquierdo) mientras que *AtUNG* se expresa principalmente en ápices de tallos e inflorescencias, carpelos, óvulo y semillas embebidas (Fig. 26 b, panel izquierdo). Curiosamente, ambos genes se expresan con una intensidad similar en raíz (recuadro rojo) (Fig. 26 a, panel derecho; Fig. 26 b, panel derecho), y con diferentes niveles en plántulas (recuadro azul) (Fig. 26 a, panel izquierdo; Fig. 26 b, panel izquierdo). Patrones de expresión semejantes pueden observarse de la base de datos del programa *Genevestigator* (<https://genevestigator.com/>), en donde curiosamente se observa que *MBD4L* se expresa fuertemente en hojas senescentes, pero no así *AtUNG* (Fig. 27 b), mientras que *AtUNG* se expresa en semillas germinadas, pero no así *MBD4L* (Fig. 27 b).

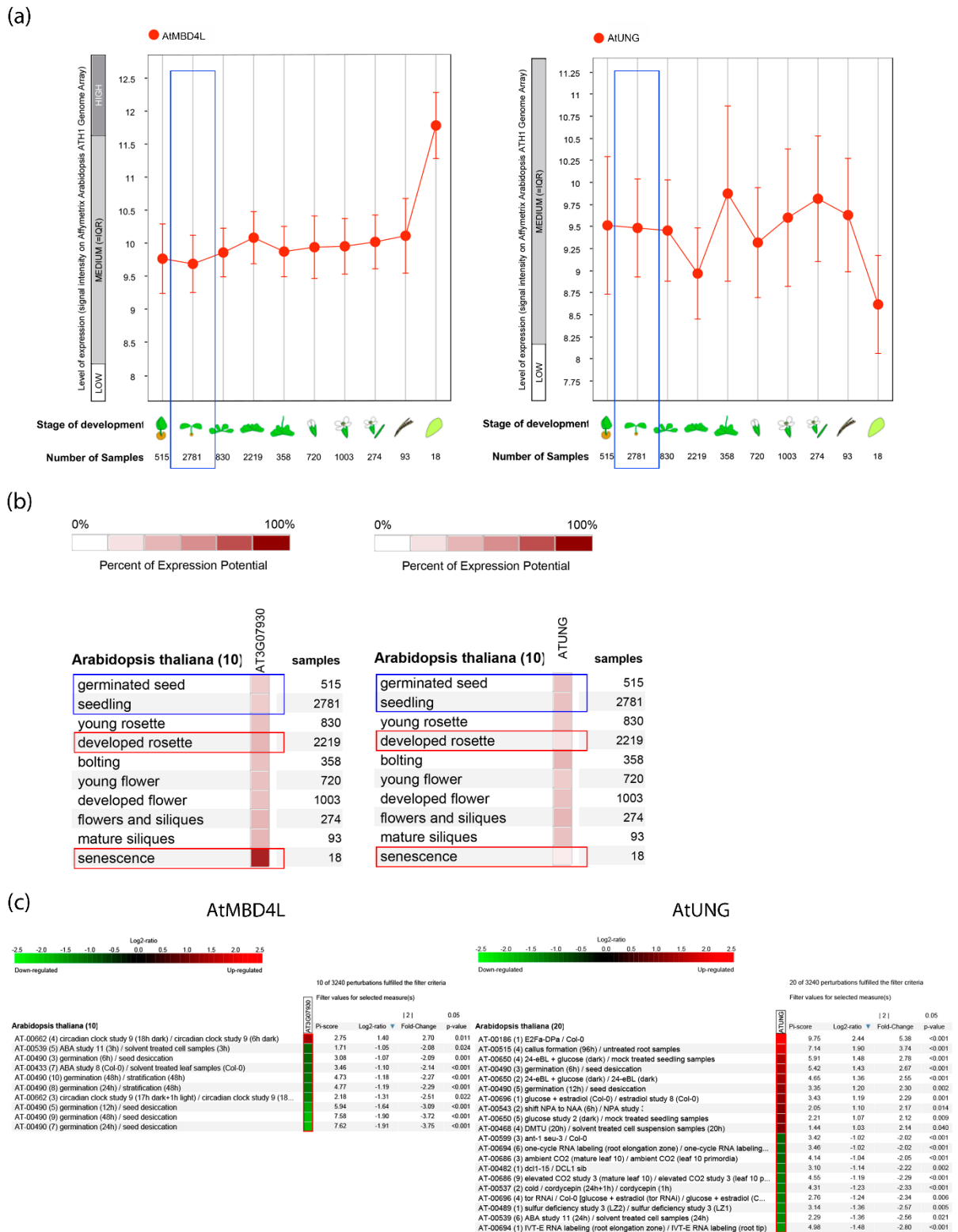
Por otro lado, también analizamos condiciones en las cuales la expresión de *MBD4L* y *AtUNG* se incrementa o reduce. Para ello, 3240 condiciones experimentales de la base de datos *Genevestigator* fueron analizadas modificando el umbral de veces de cambio de expresión (2 veces cambio, valor  $p < 0.05$ ) para detectar las principales condiciones en donde se expresan o reprimen predominantemente estos genes. El análisis arrojó 10 condiciones para *MBD4L*, en donde se activa únicamente en oscuridad y se reprime en algunas condiciones de semillas desecadas (Fig. 27 c, panel izquierdo). Por otro lado, de 20 condiciones obtenidas para *AtUNG*, se activa predominantemente en condiciones de formación de callos, semillas desecadas, y combinaciones de glucosa y oscuridad, mientras que se reprime con ABA, deficiencia de sulfuro y “*RNA labeling*” en raíz (Fig. 27 c, panel derecho).

Además, aún cuando *MBD4L* y *AtUNG* presentan patrones de expresión diferente, e incluso en algunos tejidos de manera opuesta (Fig. 27 a), nos preguntamos si estos genes podrían tener algún grado de coexpresión. Para esto, utilizamos la herramienta *Coex Viewer* del programa ATTED-II (<https://atted.jp/>). Al cargar el gen At3g07930, no detectamos al gen At3g18630 en la lista de genes co-expresados bajo ninguna de las condiciones que ofrece el programa. Resultados similares fueron obtenidos al buscar al gen At3g07930 en la lista de genes co-expresados de At3g18630. Para confirmar estos resultados, y además, incluir una base de datos más amplia utilizamos la herramienta *Co-Expression* del *Genevestigator*, en donde podemos analizar la coexpresión (positiva y negativa) de genes en diferentes condiciones experimentales (desarrollo, anatomía y perturbaciones). Con este programa tampoco pudimos detectar ningún tipo de coexpresión entre *MBD4L* y *AtUNG* en las condiciones analizadas. Curiosamente, del análisis realizado con ambos programas pudimos observar que los genes con valores de coexpresión positiva y/o negativa más elevados para *MBD4L* y *AtUNG* pertenecen a redes génicas diferentes. (Fig. S3). Estos

resultados sugieren que *MBD4L* y *AtUNG* se activan en tejidos y condiciones diferentes, estando *MBD4L* fuertemente expresada en hojas senescentes y oscuridad, mientras que *AtUNG* se expresa con mayor intensidad en semillas desecadas y germinadas. Sin embargo, ambos genes se expresan en estadios de plántula (Fig. 27 a). No fue posible detectar una coactivación entre estos genes en ningún estadio del desarrollo de la planta, ni en un tejido en particular, incluso tampoco en presencia de una perturbación, sugiriendo que estos genes responden y/o actúan en vías de reparación diferentes.



**Figura 26. Patrones de expresión de At3g18630 y At3g07930 obtenidos de la base de datos ePLANT.** (a) Niveles de expresión absoluto de *MBD4L* en diferentes estadios del desarrollo de la planta (panel izquierdo), y detalle de estadios de germinación y floración (panel derecho). (b) Niveles de expresión absoluto de *ATUNG* en diferentes estadios del desarrollo de la planta (panel izquierdo), y detalle de estadios de germinación y floración (panel derecho). La escala de colores indica la intensidad de la expresión génica: rojo (nivel elevado); naranja (nivel intermedio); amarillo (nivel bajo). Los cuadros azul y rojo resaltan el estadio de plántula y raíz, respectivamente.

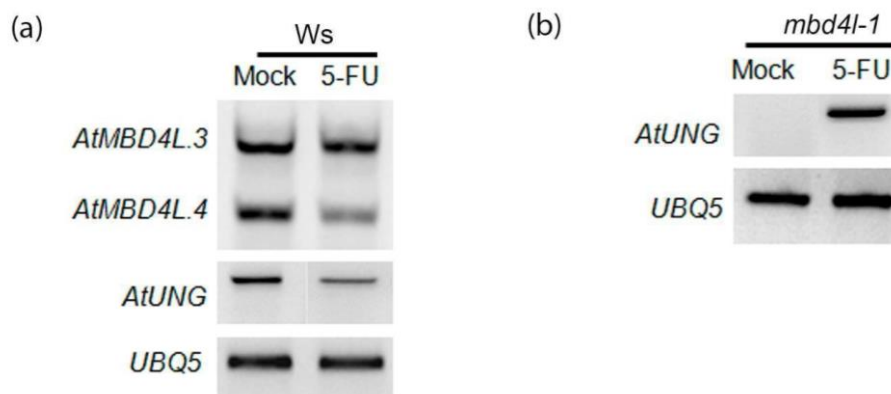


**Figura 27. Expresión de *AtUNG* y *MBD4L* en diferentes tejidos y condiciones.** Niveles de expresión de *MBD4L* y *AtUNG* en diferentes estadios del desarrollo de la planta (a). Diez principales tejidos (b) y condiciones experimentales (c) en donde se expresan mejor *MBD4L* o *AtUNG*. Los datos de expresión génica fueron obtenidos de la base de datos *Geneinvestigator*. La escala de colores indica: rojo (activación génica-mayores niveles de expresión); verde (represión génica-menores niveles de expresión).

**In vivo**

MBD4L y AtUNG carecen de coexpresión génica positiva y negativa en las condiciones analizadas *in silico*, pero ambas enzimas reconocen y escinden U *in vitro* (Córdoba-Cañero et al. 2010; Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013). Nos preguntamos si estas enzimas son activadas a nivel transcripcional en respuesta a 5-FU en plantas WT o mutantes *in vivo*. Para ello, plantas de los genotipos Ws, *mbd4l*, Col-0 y *ung* fueron preparadas siguiendo el esquema experimental de la figura 11 c. En este experimento se utilizaron distintas dosis de 5-FU (0 y 200  $\mu$ M). Las plántulas fueron colectadas al día 4 después del trasplante, y se las preservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del procesamiento. Los niveles de mRNA fueron determinados mediante sqRT-PCR.

En presencia de 5-FU, *MBD4L* y *AtUNG* redujeron levemente su expresión en las plantas WT (Fig. 28 a). Por otro lado, en la mutante *mbd4l* no se detectaron transcritos de *AtUNG* en ausencia de 5-FU, mientras que un drástico aumento de los mismos fue registrado luego del tratamiento con 5-FU (Fig. 28 b). Estos resultados sugieren que en ausencia de MBD4L, AtUNG serviría como un reservorio y participaría de la reparación del daño en el ADN generado por el 5-FU.



**Figura 28. *mbd4l* exhibe aumentos de expresión de *AtUNG* en respuesta a 5-FU.** (a) Niveles de expresión de *MBD4L.3*, *MBD4L.4* y *AtUNG* en plántulas de 14 días de Ws (a) y *mbd4l* (b) sometidas bajo condiciones control (mock; trasplante a medio sin 5-FU) y 5-FU (200  $\mu$ M 5-FU). El gen *UBQ5* se utilizó como control interno.

## Reparación del ADN en mutantes *ung* sometidas a agentes genotóxicos

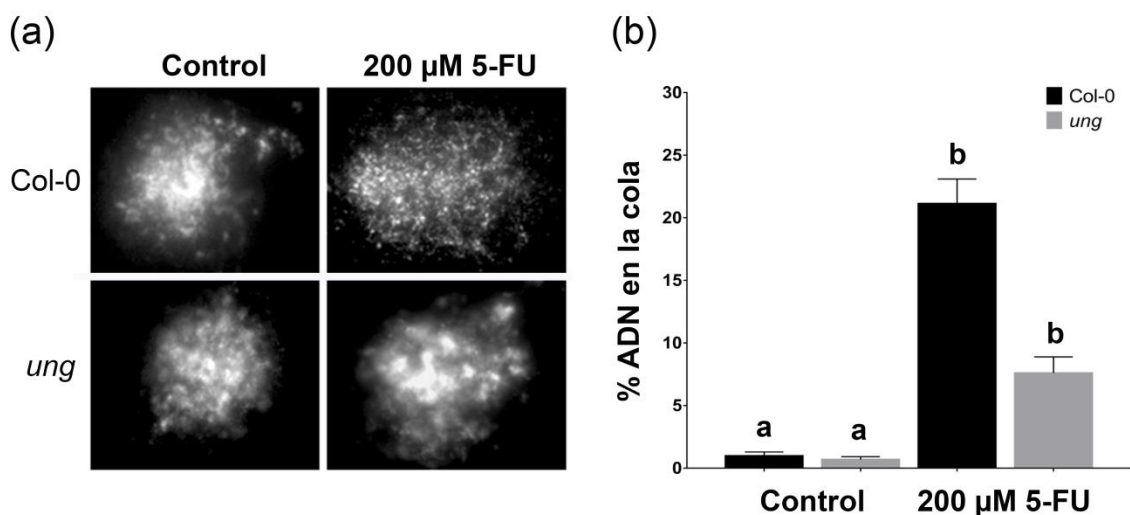
### 5-FU

Extractos celulares de *Arabidopsis* (que contienen AtUNG) muestran la capacidad de reconocer y escindir U exógeno, pero no así 5-FU, a partir de oligonucleótidos sintéticos *in vitro*. Además, las mutantes *ung* presentan ADN más íntegro que las plantas WT en



respuesta a 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010), sugiriendo que AtUNG remueve U *in vivo*. En base a esto nos preguntamos si AtUNG podría generar el remanente de ADN fragmentado que se observa en las plantas de *mbd4l* luego del tratamiento con 5-FU (Fig. 20 b, c). Para ello, las plantas Col-0 y *ung* fueron preparadas siguiendo el esquema de la figura 11 c, a fin de analizar en ellas el grado de ruptura en el ADN mediante ensayos cometa. En este experimento se utilizaron distintas dosis de 5-FU (0 y 200  $\mu$ M). Las plántulas fueron colectadas al día 4 después del trasplante, y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del procesamiento. El % de ADN en la cola de los cometas fue utilizado como indicador del grado de ruptura en las hebras de ADN (Olive y Banáth 2006; Rodríguez et al. 2018).

En ausencia de 5-FU el nivel de ADN cortado fue inferior al 5%, tanto en *ung* como en las plantas Col-0 (Fig. 29 a, b). En contraste, en presencia de 5-FU, el nivel de ADN cortado fue el 23% en plantas WT, y sólo el 8% en plantas *ung* (Fig. 29 a, b). Esto confirma que AtUNG actúa sobre el ADN nuclear *in vivo* y sugiere que esta enzima sería la responsable de fragmentar el ADN en plantas *mbd4l* sometidas a 5-FU. Sin embargo, resta determinar si el sustrato de AtUNG en esta condición es U y/o 5-FU.



**Figura 29. La mutante *ung* presenta niveles reducidos de ADN fragmentado en presencia de 5-FU.** Imágenes representativas (a) y cuantificación (b) de los cometas encontrados en plantas Col-0 y *ung* sometidas bajo condiciones control (0  $\mu$ M 5-FU) y 200  $\mu$ M 5-FU. La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=250). Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

## 5-BrU

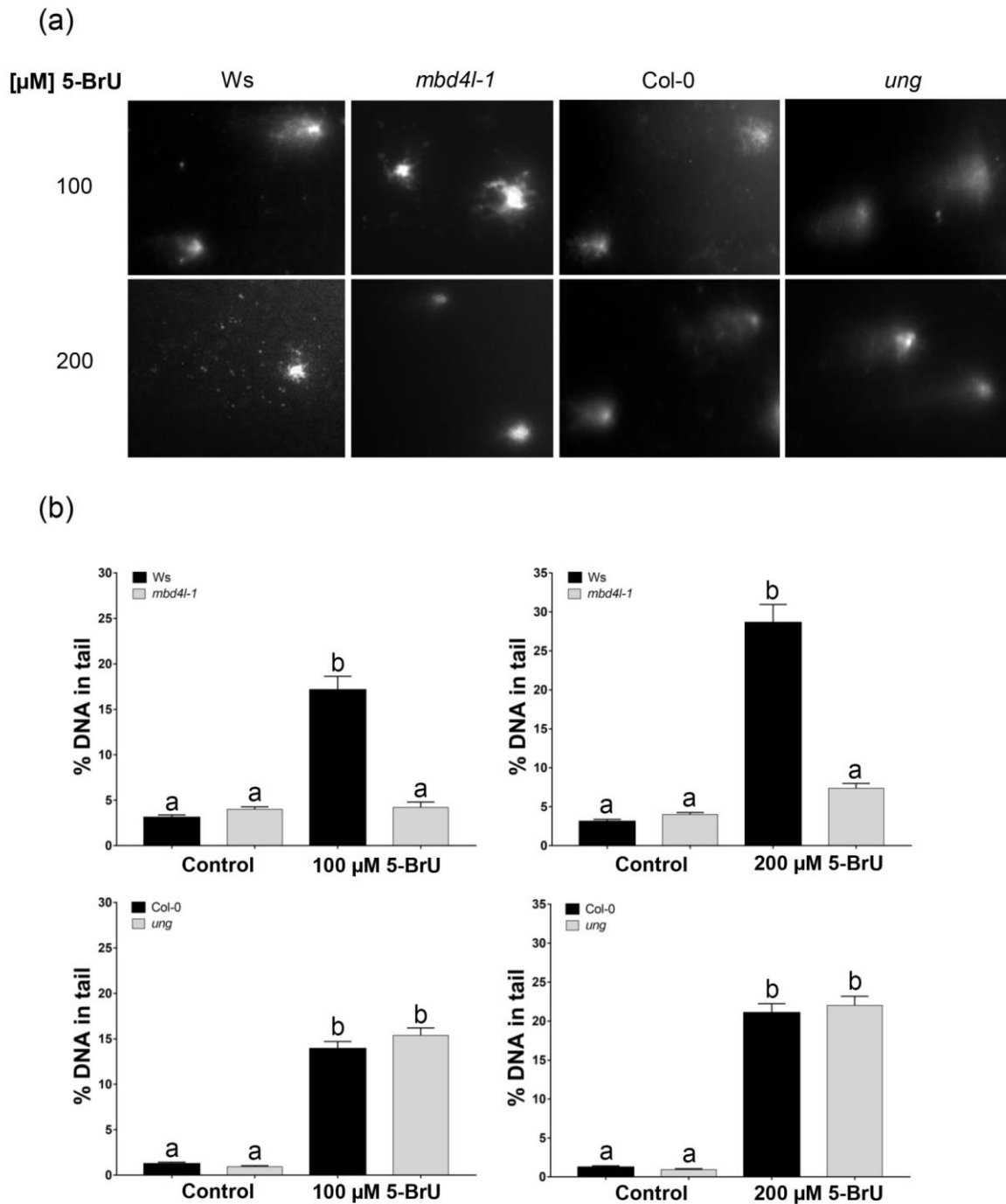
Como se describe previamente, nuestros resultados indican que AtUNG se encuentra en el núcleo, y en presencia de 5-FU participa en la fragmentación del ADN. Sin embargo, no podemos distinguir si en plantas WT los cortes sobre el genoma nuclear *in vivo* fueron generados a través de la participación de MBD4L o AtUNG.

Por el contrario, el tratamiento con 5-BrU nos permite estudiar solo el rol *in vivo* de MBD4L, dado que *in vitro* este compuesto es reconocido y escindido por MBD4L, pero no por AtUNG (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013; Córdoba-Cañero et al. 2010).

Por ello, analizamos si MBD4L desencadena de modo exclusivo la generación de cortes en respuesta a 5-BrU. Las plantas *Ws*, *mbd4l*, Col-0 y *ung* fueron preparadas siguiendo el esquema experimental de la figura 11 c, a fin de determinar el nivel de rupturas en las hebras del ADN mediante ensayos cometa. Se utilizaron plántulas de 7 días y distintas dosis de 5-BrU (0, 100 y 200  $\mu$ M). Las plántulas fueron colectadas al día 4 después del trasplante y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Nuevamente, el % de ADN en la cola del cometa se utilizó como indicador del grado de ruptura del ADN (Olive y Banáth 2006; Rodríguez et al. 2018).

Bajos niveles de fragmentación del ADN fueron detectados tanto en *Ws* (3%) y *mbd4l-1* (4%), como en Col-0 (2%) y *ung* (2%) en ausencia de 5-BrU (Fig. 30 a, b). En contraste, observamos un marcado aumento en la fragmentación del ADN en *Ws* (18%) y (28 %) pero no en *mbd4l-1* (4%) y (7%), luego del tratamiento con 100 y 200  $\mu$ M 5-BrU, respectivamente (Fig. 30 a, b panel superior). Curiosamente, similares niveles de ADN fragmentado fueron detectados en Col-0 (14%; 22%) y *ung* (16%; 23%) para las dosis de 100 y 200  $\mu$ M 5-BrU, respectivamente (Fig. 30 a, b panel inferior). Estos resultados indican que MBD4L, pero no AtUNG, es capaz de reconocer y remover 5-BrU del genoma nuclear *in vivo*.



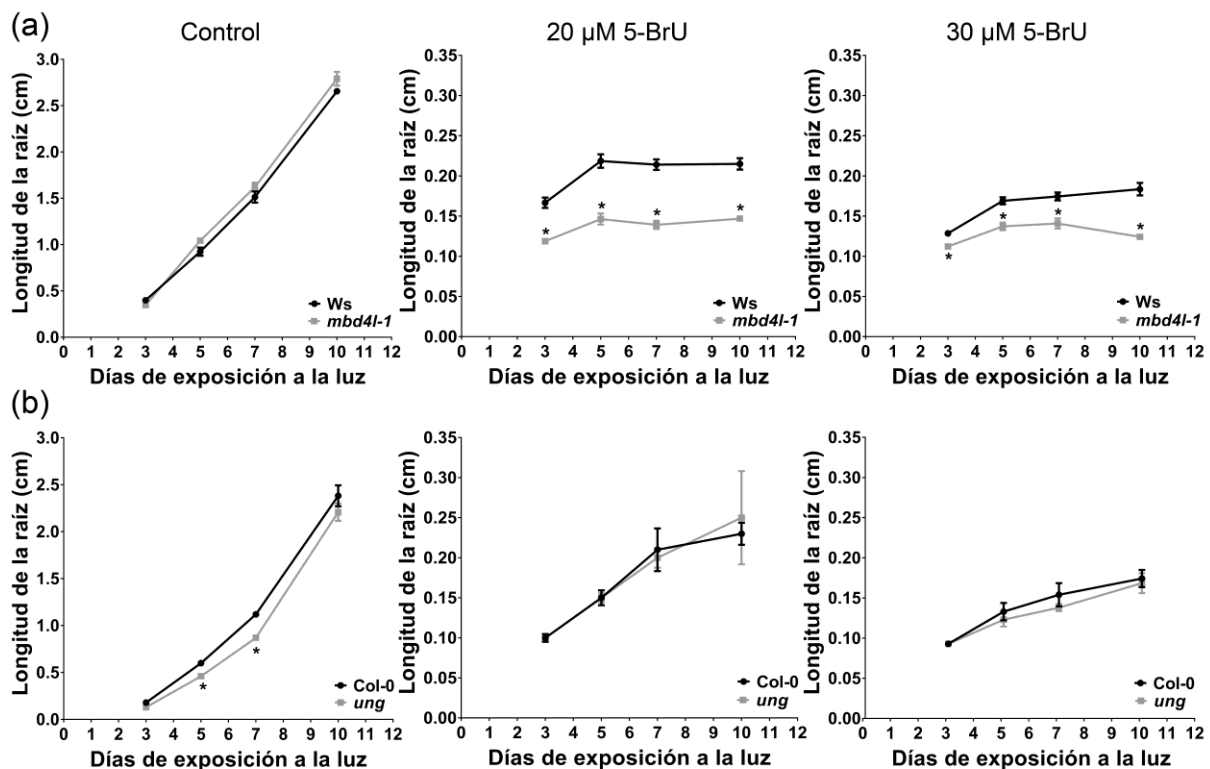


**Figura 30.** *mbd4* pero no *ung* exhibe niveles muy bajos de ADN fragmentado en respuesta a la genotoxicidad producida por 5-BrU. Imágenes representativas (a) y cuantificación (b) de los cometas detectados en *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *ung* bajo condiciones control (0  $\mu$ M 5-BrU) y tratamiento con 5-BrU (100 y 200  $\mu$ M). La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=250). Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

### Crecimiento de plántulas

Debido a que el 5-BrU actúa como sustrato de MBD4L *in vitro* (Ramiro-Merina, Ariza, y Roldán-Arjona 2013) e *in vivo* (Fig. 30), nos preguntamos si tratamientos con 5-BrU generan alguna modificación en el crecimiento de las plantas deficientes en *MBD4L*. Para esto, plantas *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *ung* fueron preparadas siguiendo el esquema descrito en la figura 11 b, utilizando distintas dosis de 5-BrU (0, 20 y 30  $\mu$ M). El largo de la raíz principal fue registrado a los 3, 5, 7 y 10 días luego de la exposición a la luz.

En ausencia de 5-BrU, observamos un desarrollo similar de las raíces de *Ws* y *mbd4l-1* (Fig. 31 a, izquierda), mientras que las raíces de *ung* se desarrollaron significativamente menos que las de *Col-0* a los 5 y 7 días (Fig. 31 b, izquierda). Notoriamente, tanto bajo condiciones de 20 y 30  $\mu$ M 5-BrU, las raíces de *mbd4l* fueron significativamente más reducidas que las de *Ws* en todos los días analizados (Fig. 31 a, medio y derecha). En contraste, las raíces de *Col-0* y *ung* crecieron de manera similar a lo largo del periodo de estudio (Fig. 31 b, medio y derecha). Estos resultados sugieren que MBD4L resulta necesaria para mantener el crecimiento de las plantas expuestas a 5-BrU.

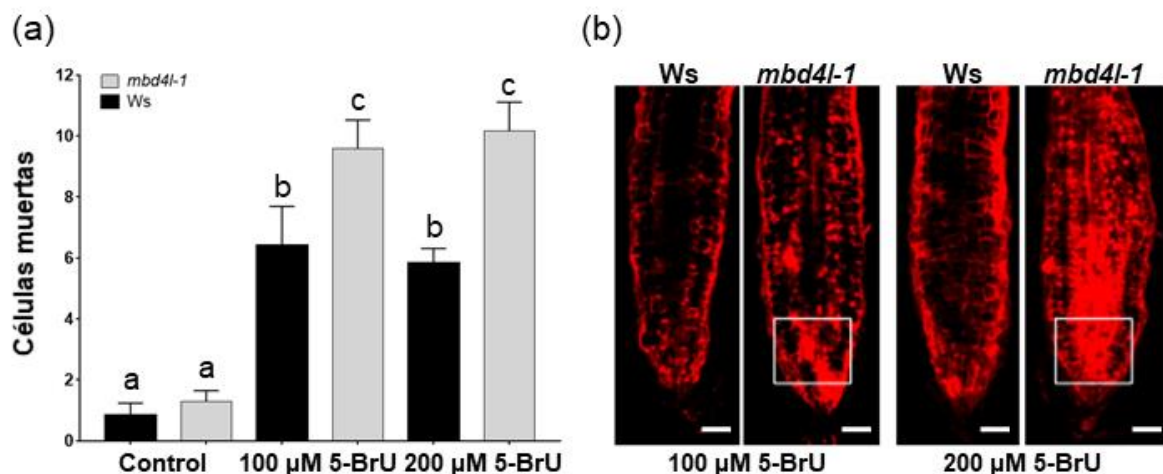


**Figura 31. Las raíces de *mbd4l* son hipersensibles a 5-BrU.** Tasa de crecimiento radicular en plantas de *Ws*, *mbd4l-1* (a), *Col-0* y *ung* (b) sometidas a diferentes concentraciones (0, 20 y 30  $\mu$ M) de 5-BrU a lo largo de 3, 5, 7, y 10 días. Los puntos del gráfico representan la media  $\pm$  SEM (n=30). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas (p<0,05, prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).

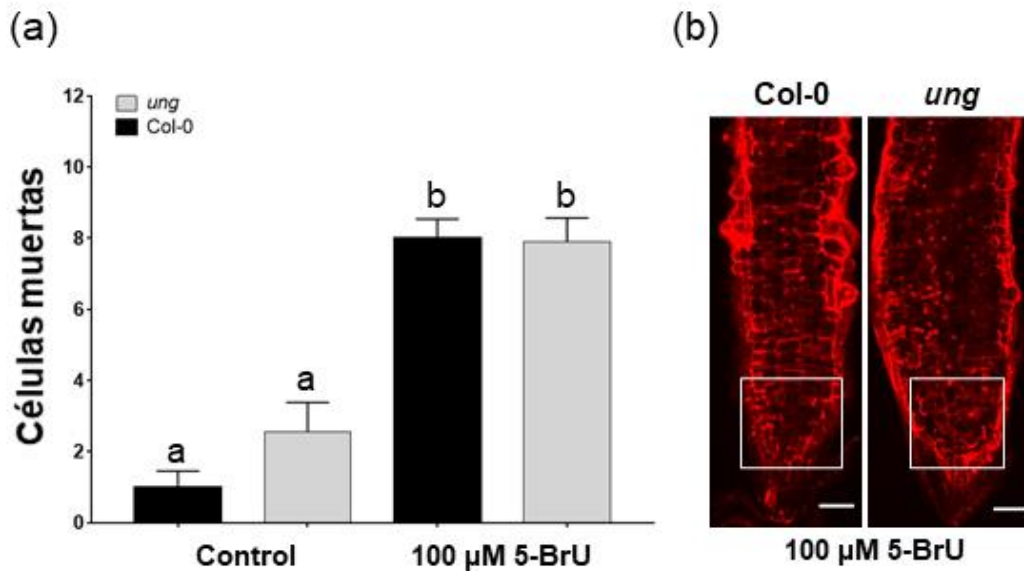
### Viabilidad celular

Como las plantas mutantes *mbd4l-1* expuestas a 5-BrU, muestran un desarrollo radicular deficiente, analizamos la viabilidad e integridad de sus tejidos meristemáticos de raíz. Para ello, semillas de plantas *Ws* y *mbd4l-1*, fueron preparadas y plaqueadas siguiendo el esquema de la figura 11 c. En este experimento, se utilizaron plántulas de 7 días de edad y distintas dosis de 5-BrU (0, 100 y 200  $\mu$ M). Para detectar células no viables, las plántulas fueron colectadas a los 4 días después del trasplante, y sus ápices radicales fueron teñidos con IP (Materiales y Métodos, apartado 4).

En ausencia de 5-BrU, observamos niveles bajos y similares de células no viables tanto en plantas *Ws* y *mbd4l-1* (Fig. 32 a, b), como en *Col-0* y *ung* (Fig. 33 a, b). Sin embargo, en presencia de 100 y 200  $\mu$ M 5-BrU, un aumento significativo de células no viables fue detectado en *mbd4l-1*, comparado con las plantas *Ws* (Fig. 32 a, b). En contraste, niveles similares de muerte fueron registrados en *Col-0* y *ung* (Fig. 33 a, b). Juntos estos resultados sugieren que la presencia de MBD4L es necesaria para mantener la viabilidad e integridad en las células meristemáticas de raíces expuestas a 5-BrU. MBD4L al reconocer y escindir *in vivo* al 5-BrU incorporado en el ADN, evitaría los efectos genotóxicos que desencadena su acumulación en el genoma nuclear.



**Figura 32. Los ápices radicales de *mbd4l* presentan una viabilidad celular reducida en respuesta a 5-BrU.** Cuantificación del número absoluto de células muertas (IP positivas) en el ápice de la raíz (a) e imágenes representativas (b) detectadas al día 4 de tratamiento con 0, 100 y 200  $\mu$ M 5-BrU. La intensidad de la señal roja es proporcional al número de células no viables. El rectángulo blanco indica la región de la raíz con un elevado número de células muertas. La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=12). Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , prueba no paramétrica Kruskal-Wallis). Barra 50  $\mu$ m.



**Figura 33. La mutante *ung* exhibe niveles de células no viables similares a WT en 5-BrU.** Cuantificación del número absoluto de células no viables (IP positivas) (a) e imágenes representativas detectadas al día 4 de tratamiento con 0 y 100 µM 5-BrU. La intensidad de la señal verde es proporcional al número de células no viables. La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=12). Las diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , prueba no paramétrica Kruskal-Wallis). Barra 50 µm.

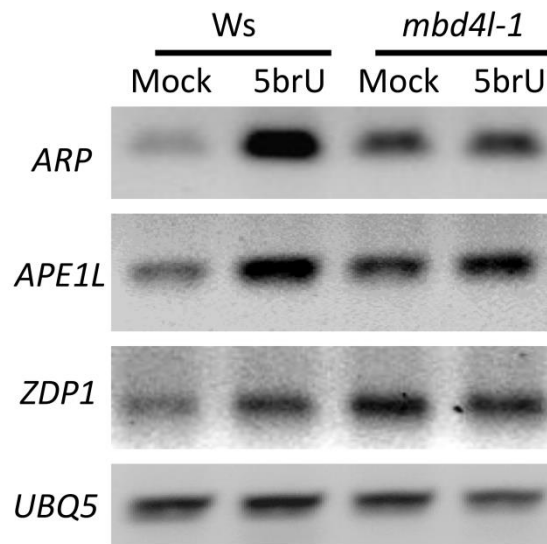
### Niveles de expresión de genes BER y DDR en *mbd4l-1* expuestas a 5-BrU

Al analizar la expresión de genes que actúan aguas abajo de ADN glicosilasas, observamos que en ausencia de 5-BrU, existen mayores niveles de transcritos de ARP, APE1L y ZDP en *mbd4l-1*, pero no así en las plantas Ws (Fig. 34). Curiosamente, en presencia de 5-BrU, los niveles de transcritos de ARP, APE1L y ZDP, incrementaron drásticamente en Ws, mientras que en *mbd4l-1*, no se observaron cambios en los niveles de expresión de estos genes (Fig. 34). Estos resultados sugieren que la presencia de MBD4L mejora la respuesta génica de ARP, APE1L y ZDP bajo condiciones de 5-BrU.

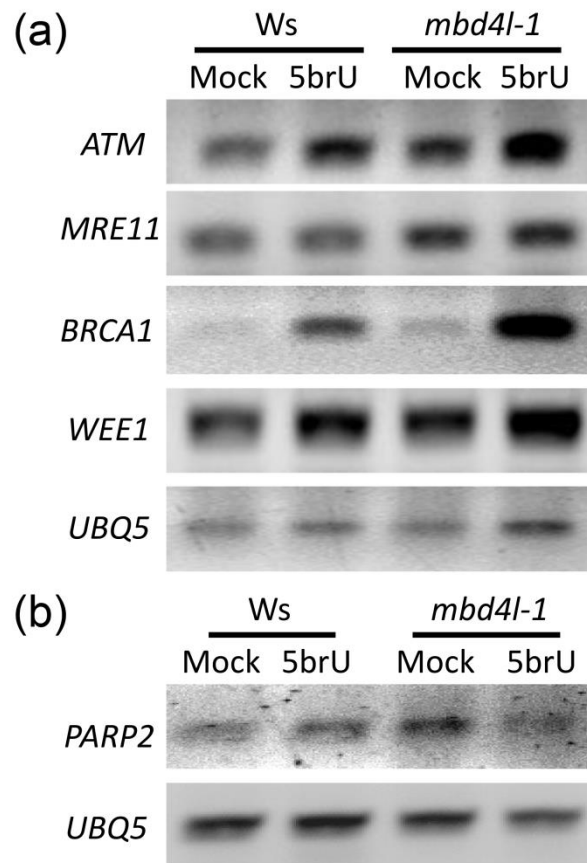
Por otro lado, *mbd4l-1* presenta una cantidad reducida de ADN fragmentado en presencia de 5-BrU (Fig. 30), lo que sugeriría que las plantas mutantes no reparan los daños generados por este agente genotóxico. Para evaluar esto, determinamos los niveles de expresión de algunos genes marcadores del DDR (ATM, BRCA1, WEE1 y PARP2), que se activan en respuesta a daño del ADN, mediante ensayos de sqRT-PCR. Las muestras fueron preparadas y procesadas de la misma forma que para los ensayos cometa.

En ausencia de 5-BrU, observamos que los niveles de expresión de ATM, BRCA1, WEE1 y PARP2, se encuentran levemente más elevados en *mbd4l-1* que en Ws (Fig. 35 a, b). Curiosamente, luego del tratamiento con 200 µM 5-BrU, los niveles de expresión de

ATM, BRCA1 y WEE1, incrementan considerablemente en *mbd4l-1*, comparado con *Ws* (Fig. 35 a). En contraste, los niveles de expresión de PARP2 aumentan discretamente, tanto en las plantas *Ws*, como en *mbd4l-1*, luego del tratamiento con 5-BrU (Fig. 35 b). Estos resultados sugieren que la ausencia de MBD4L, algunos genes DDR, se inducen bajo condiciones de 5-BrU. Esto podría deberse a una acumulación de 5-BrU en el genoma nuclear, lo cual sería interpretado como un daño en el ADN.



**Figura 34. La presencia de MBD4L favorece la expresión de AP endonucleasas en respuesta a 5-BrU.** Determinación de los niveles de transcritos de genes *ARP*, *APE1L* y *ZDP* en plantas *Ws* y *mbd4l-1* tratadas con mock y 200  $\mu$ M 5-BrU mediante sqRT-PCR. El gen *UBQ5* fue utilizado como control interno.



**Figura 35. Las plantas *mbd4l* exhiben un drástico aumento en los niveles de expresión de genes DDR en presencia de 5-BrU.** Análisis de los niveles de transcritos de *ATM*, *BRCA1*, *WEE1* (a) y *PARP2* (b) en plantas *Ws* y *mbd4l-1* bajo condiciones mock y 200  $\mu$ M 5-BrU a través de sqRT-PCR. El gen *UBQ5* fue utilizado como control interno.

## **CAPÍTULO III: PARTICIPACIÓN DE MBD4L EN LAS ALTERACIONES DE LA HETEROCROMATINA CENTROMÉRICA Y GENERACIÓN DE CORTES EN EL ADN BAJO CONDICIONES DE INFECCIÓN CON *PSEUDOMONAS***

Trabajos previos del grupo demostraron que hojas de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col-0 muestran una reducción en el número de cromocentros (CCs) a las 24 hs luego del tratamiento con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) (Pavet et al. 2006). Además, se pudo determinar que bajo esa condición la descondensación de CCs se asocia a una disminución global en los niveles de 5mC, la cual afecta a algunos transposones y repeticiones centroméricas (Pavet et al. 2006). Curiosamente, hace unos años se determinó también en el grupo que bajo esas condiciones de infección la ADN glicosilasa MBD4L media la descondensación de los CCs, pero no así las ADN glicosilasas de la familia DEMETER (Nota 2014). Sin embargo, el rol *in vivo* de las ADN glicosilasas AtOGG1 y AtFPG en ese proceso no fue determinado. Estas enzimas podrían activar el mecanismo BER ante un aumento en los niveles de bases oxidadas en el ADN que podrían generarse luego de infecciones con *Pst* y esto podría modificar la estructura de la heterocromatina centromérica.

### **Caracterización de las mutantes de *AtOGG1* y *AtFPG***

En *Arabidopsis* las proteínas AtOGG1 y AtFPG están codificadas por los genes At1g21710 y At1g52500 respectivamente. Las semillas de las mutantes *ogg1* y *fpg* fueron solicitadas al laboratorio de la Dra. Teresa Roldan-Arjona (Universidad de Córdoba, España), que previamente las obtuvo del Dr. Terence Murphy (Universidad de California, USA), quien caracterizó estas líneas a nivel molecular (Murphy 2005). Ambas mutantes de ADN glicosilasas fueron obtenidas en el fondo mutante *transparent testa 4* (*tt4*) del ecotipo Landsberg erecta, Ler, por lo que presentan semillas de coloración clara debido a la carencia en la síntesis de flavonoides (Buer y Muday 2004). Las semillas de la mutante *fpg* también están disponibles en el banco de semillas del ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) cuyo número de referencia es SALK 076932. Para *ogg1* también están disponibles en este banco otras líneas con inserciones de T-DNA.

Los niveles de expresión de *AtOGG1* y *AtFPG* fueron evaluados en las respectivas mutantes mediante sqRT-PCR. Las plantas mutantes *ogg1* y *fpg* mostraron niveles de

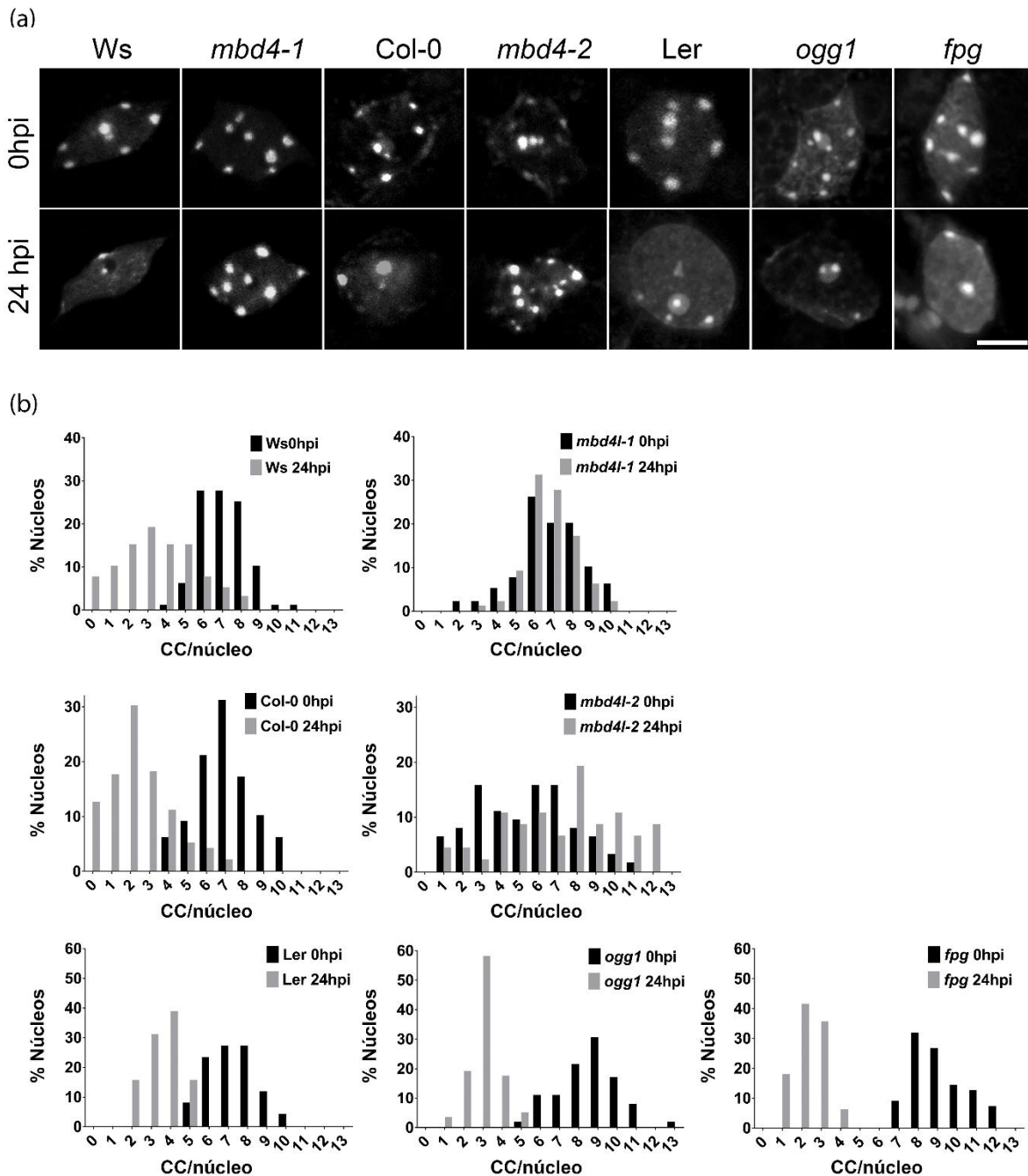
transcripto casi indetectables en comparación con Ler (datos no mostrados), verificando que las mismas son deficientes en *AtOGG1* y *AtFPG* respectivamente.

### **Descondensación de cromocentros en mutantes *ogg1* y *fpg***

Estudios previos demostraron que las plantas Col-0 atacadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 sufren una descondensación de CCs (Pavet et al. 2006), y que la mutante *mbd4l-1* no descondensa CCs bajo las mismas condiciones (Nota 2014). En esta tesis determinamos que la mutante *mbd4l-2*, tampoco descondensa los CCs luego del tratamiento con *Pst* (Fig. 36 a, b). En base a esto, decidimos evaluar la participación de las ADN glicosilasas *AtOGG1* y *AtFPG*, que responden a daños oxidativos en ADN, en la descondensación de CCs bajo condiciones de infección con *Pst*. Para ello, analizamos el grado de condensación de los cromocentros en hojas de las plantas Ler, *ogg1* y *fpg* no infectadas (tiempo 0, t0), o tratadas con *Pst* y colectadas 24 horas post infección (t24). Estas hojas fueron conservadas en una solución de etanol: ácido acético (2:1) hasta el momento del procesamiento (Materiales y Métodos, apartado 12). El número de CCs por núcleo fue utilizado como indicador del grado de condensación de la heterocromatina centromérica (Pavet et al. 2006).

En condición basal (t0), la mayor parte de los núcleos de plantas Ler presentan 7-8 CCs, y de manera similar las mutantes *ogg1* y *fpg* contienen 8-9 CCs por núcleo (Fig. 36 a, b). Curiosamente, sólo las mutantes mostraron una pequeña fracción de núcleos con más de 10 CCs (Fig. 36 b). Sin embargo, luego de la infección (t24) tanto las plantas Ler, como las mutantes *ogg1* y *fpg* modificaron este patrón mostrando un elevado número de núcleos con 2-3 CCs (Fig. 36 a, b), y la mayor frecuencia de núcleos con 3 CCs fue detectada en *ogg1*.

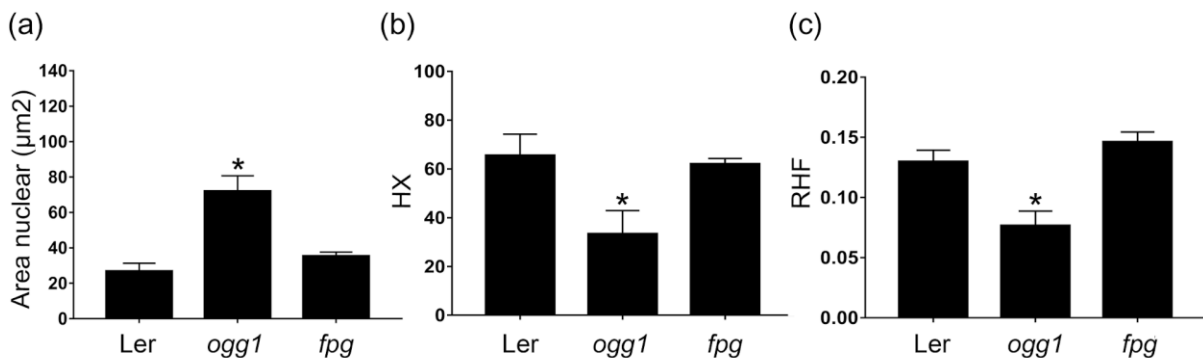




**Figura 36. AtOGG1 y AtFPG no participan en la descondensación de CCs bajo condiciones de *Pst*.** Imágenes representativas del número de cromocentros por núcleo (a) y su cuantificación (b) en hojas de plantas *Ws*, *mbd4-1*, *Col-0*, *mbd4-2*, *Ler*, *ogg1* y *fpg*. Barra:5µm.

Como las principales diferencias en el número de cromocentros entre *Ler* y mutantes *ogg1* y *fpg* se observan bajo condiciones basales (t0), decidimos profundizar el análisis determinando el área nuclear, el índice de heterocromatina (HX) y la fracción de heterocromatina relativa (RHF) bajo esta condición. Los dos últimos parámetros indican la

proporción de núcleos con CCs conspicuos (Tessadori et al. 2007), y la cantidad de heterocromatina en relación con el tamaño del núcleo (Tessadori et al. 2004; Soppe et al. 2002), respectivamente. Observamos que el área nuclear estaba drásticamente elevada en las mutantes *ogg1* ( $72 \mu\text{m}^2$ ) comparado con Ler ( $27 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. 37 a, panel izquierdo). Además, detectamos un nivel de heterocromatina significativamente reducido en *ogg1* (33%) comparado con Ler (66%) (Fig. 37 a, panel del medio). Curiosamente, el análisis de RHF mostró, de modo similar al índice HX, valores significativamente más reducidos en *ogg1* (0.08) que en Ler (0.13) (Fig. 37 a, panel derecho). Juntos estos resultados sugieren que las ADN glicosilasas AtOGG1 y AtFPG no participan en la relajación de la estructura de la heterocromatina centromérica inducida por infección con *Pst*, ya que el número de CCs disminuye de forma drástica y similar en todos los genotipos analizados. Sin embargo, bajo condiciones basales las mutantes *ogg1* y *fpg* presentan un mayor número de CCs por núcleo y área nuclear más elevada que Ler. Tanto la proporción de CCs bien definidos, conspicuos, como fracción de heterocromatina relativa se encuentran significativamente reducidas en *ogg1*, indicando que OGG1, y no FPG, podría participar en el mantenimiento de CCs al menos bajo esa condición.



**Figura 37. La mutante *ogg1* exhibe núcleos más grandes con menor heterocromatina nuclear en condiciones control.** (a) Cuantificación del área (a), índice HX (b) y RHF (c) en núcleos de hojas de Ler, *ogg1* y *fpg* en condiciones sin infección. La barra representa la media  $\pm$  SEM (n=20). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (prueba no paramétrica Kruskal-Wallis). Barra 50  $\mu\text{m}$ .

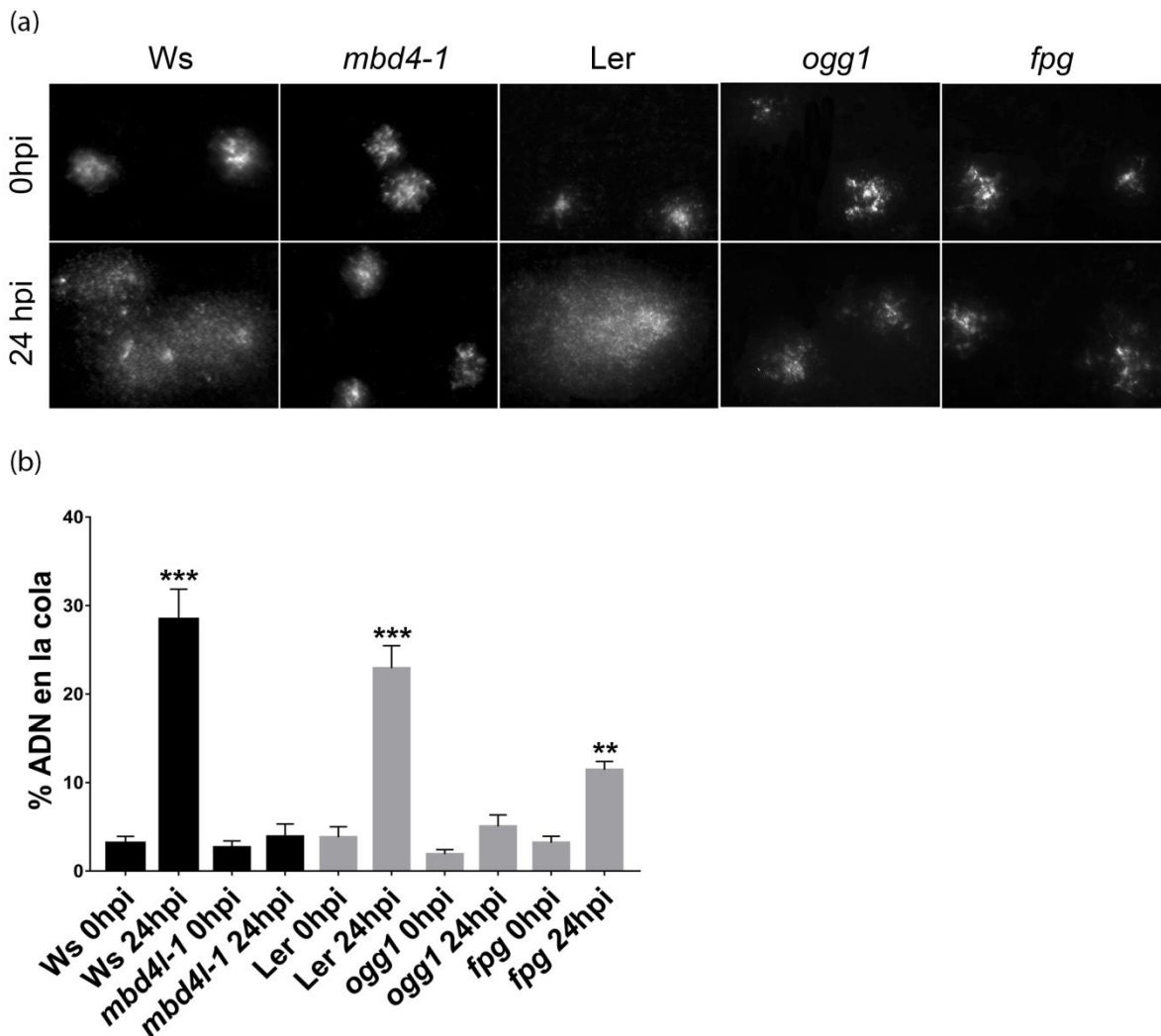
### Rupturas en el ADN de *mbd4l*, *ogg1* y *fpg* infectadas con *Pst*

Los tratamientos con *Pst* desencadenan rupturas de la doble hebra del ADN nuclear de Arabidopsis (Song y Bent 2014). Las ROS inducen la formación de bases oxidadas o sitios AP que posteriormente son procesados por el sistema BER (Hedge et al. 2008; Krokan y Bjoras 2013; Wallace 2014). Además, cuando el sistema BER opera sobre lesiones

cercanas situadas sobre cadenas opuestas se pueden producir SSBs en ambas cadenas dando lugar a la formación de DSBs tanto *in vitro* (Eccles, O'Neill, y Lomax 2011; Sage y Harrison 2011), como *in vivo* (Blaisdell, Harrison, y Wallace 2001; Blaisdell y Wallace 2001; Yang, Galick, y Wallace 2004; Yang, Chaudhry, y Wallace 2006).

Hay evidencias que indican que la mutación de las ADN glicosilasas que remueven bases oxidadas, tales como FPG de *E. coli* y OGG1 de humanos, reduce la frecuencia de formación de DSBs en células que fueron expuestas a radiaciones ionizantes. Contrariamente, la sobreexpresión de estas ADN glicosilasas incrementa los niveles de DSBs en las células (Blaisdell y Wallace 2001; Yang, Galick, y Wallace 2004; Yang, Chaudhry, y Wallace 2006). Por todo esto, analizamos si las ADN glicosilasas MBD4L, AtOGG1 y AtFPG potencian la formación de DSBs bajo condiciones de infección con *Pst*. En este experimento se utilizaron las mismas condiciones que en el ítem anterior. El grado de fragmentación del ADN se determinó mediante ensayos cometa que detectan SSBs y DSBs. El % de ADN en la cola de los cometas se utilizó como indicador del grado de ruptura del ADN (Olive y Banáth 2006; Rodríguez et al. 2018).

En condición basal, el contenido de ADN fragmentado fue menor al 3% tanto en *Ws* como *mbd4l* (Fig. 38 a, b). Sin embargo, luego del tratamiento con *Pst*, este valor aumentó drásticamente en *Ws* (28%), mientras que en *mbd4l* se mantuvo prácticamente igual al de los niveles basales (4%) (Fig. 38 a, b). Por otro lado, los niveles de ADN fragmentado fueron cercanos al 4% en *Ler* y mutantes *ogg1* y *fpg* bajo condiciones basales (Fig. 38 a, b). En contraste, detectamos un incremento significativo en el contenido de ADN fragmentado en *Ler* (23%), y uno de menor intensidad en las mutantes *ogg1* (5%) y *fpg* (11%) luego del tratamiento con *Pst* (Fig. 38 a, b). Estos resultados indican que en ausencia de las ADN glicosilasas MBD4L, AtOGG1 y AtFPG los niveles de rupturas en el ADN son similares a los de las plantas WT bajo condiciones control. Sin embargo, el grado de fragmentación del ADN en estas mutantes es menor que el de las WT luego del tratamiento con *Pst*. Esto sugería que tales enzimas podrían actuar de manera conjunta en la reparación de lesiones generadas durante el proceso de infección.



**Figura 38. Las mutantes *mbd4l*, *ogg1* y *fpg* exhiben niveles reducidos de ADN fragmentado luego del tratamiento con *Pst*. Imágenes representativas de los cometas (a) y cuantificación del % de ADN en la cola (b) de Ws, *mbd4l-1*, Ler, *ogg1* y *fpg*. Las barras representan la media  $\pm$  SD (n=150). Los asteriscos \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias significativas  $p < 0,05$ ,  $0,01$  o  $0,001$ , respectivamente, prueba no paramétrica Kruskal-Wallis).**

### Blancos genómicos de MBD4L bajo condiciones de estrés biótico

Los centrómeros y pericentrómeros contienen cantidades elevadas de secuencias repetidas y elementos transponibles (TE), los cuales concentran marcas represivas de la transcripción tales como la metilación de las citosinas (5mC). Esta metilación permite mantener la compactación de la heterocromatina peri/centromérica y de esta forma evitar tanto la expresión/activación de TEs como recombinación de estas y otras repeticiones, manteniendo así la integridad genómica (Vaillant y Paszkowski. 2007; Sigman y Slotkin.

2016; Brautigam y Cronk. 2018). Sin embargo, diversas condiciones de estrés tales como la infección con *Pst*, salinidad, sequía, radiación UV, IR, anegamiento, calor alteran el estado de metilación del ADN basal del peri/centrómero (Pavet et al. 2006; Downen et al. 2012; Sahu et al. 2013; Kinoshita y Seki. 2014; Laanen et al. 2021). Sorpresivamente, eventos de hipometilación e hipermetilación en secuencias peri/centroméricas fueron registrados luego de 24 horas (Pavet et al. 2006) y 5 días (Downen et al. 2012) de tratamiento con *Pst*, respectivamente. La hipometilación del peri/centrómero luego del tratamiento con *Pst* parece desencadenar la descondensación de los cromocentros y la activación de ciertos TE pericentroméricos (Pavet et al. 2006). En contraste, la hipermetilación observada bajo condiciones de estrés (infección tardía con patógenos, salinidad y radiación ionizante) (Kovalchuk et al. 2003; Boyko et al. 2007; Bilichak et al. 2012; Volkova et al. 2018), podría ser un mecanismo eficiente para re-establecer el silenciamiento de los TEs y evitar así su expresión y movilización (Sigman y Slotkin. 2016; Laanen et al. 2021). El estado de metilación de estas regiones cambia de manera dinámica. En la infección con *Pst*, los TE pericentroméricos se hipometilan y luego re-metilan por el mecanismo de RdDM (*RNA-directed DNA Methylation*) (Cambiagno et al. 2018). Sin embargo, las enzimas que generan la hipometilación y re-metilación de estos elementos no han sido completamente caracterizadas.

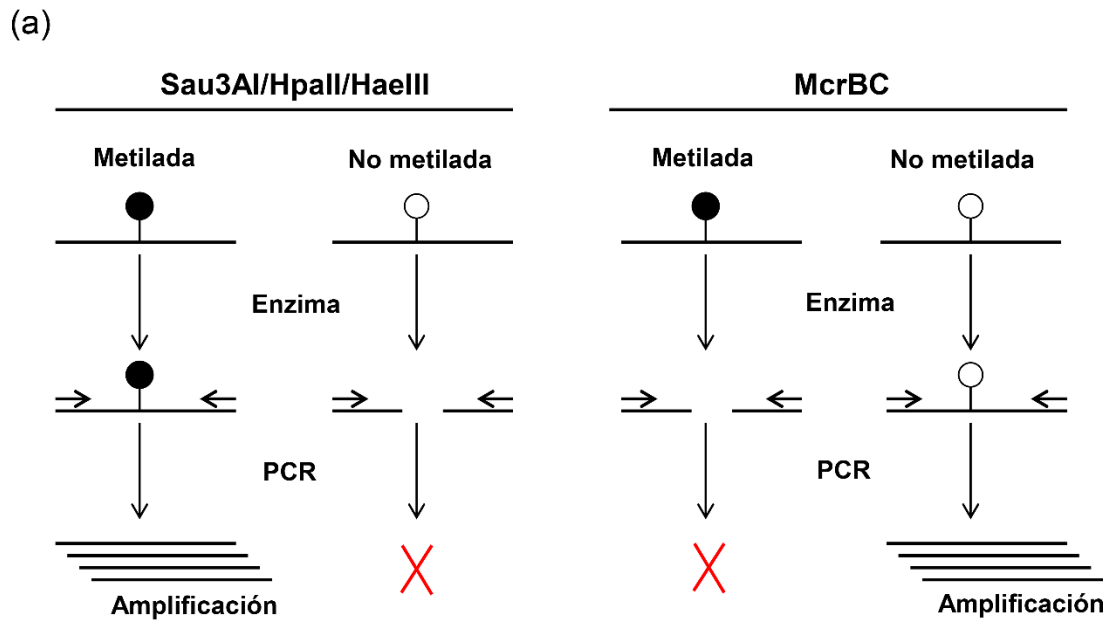
Algunos trabajos sugieren que la hipometilación del ADN desencadenada en respuesta al estrés podría estar asociada a la actividad de ADN glicosilasas (Kim et al. 2019), o a variaciones en los niveles de expresión de algunas ADN metiltransferasas (Sahu et al. 2013; Sidler et al. 2015). Hasta el momento, no existen evidencias que indiquen que MBD4L afecta la metilación del ADN. Considerando que la ausencia de la enzima de Arabidopsis evita la descondensación de los cromocentros en presencia de *Pst*, y que esto podría estar asociado a fallas en la desmetilación del ADN (acumulación de un intermediario de desmetilación, tal como T), determinamos si la ausencia de MBD4L afecta o modifica el contenido de 5mC. Esto sería consistente con lo descrito para su homólogo en humanos, donde se observó que MBD4 actúa sobre T, producto de la desaminación de 5mC, generando sitios AP que son procesados por enzimas del sistema BER, dando como resultado la incorporación de una C que puede o no ser metilada *de novo* (Dadd et al. 2018).

En consecuencia, analizamos el contenido de 5mC en un grupo de secuencias que fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: (i) metilación alterada en mutantes de cromatina o alguna condición de estrés (ii) distintos estados de cromatina y (iii) localización en el genoma. En la tabla 5 se describe con detalle la identidad de las

secuencias seleccionadas, su ubicación en el cromosoma, su estado de cromatina según Sequeira-Mendes et al. 2014, y los reguladores de la cromatina que las afectan.

En cuanto a su localización cromosómica, definimos específicamente “centrómero” o “core” a la región del cromosoma involucrada en la formación del cinetocoro, y “pericentrómero” a la zona de cromatina adyacente al centrómero, tal como lo describen Gent y Dawe 2012. Las coordenadas del core y pericentrómero fueron obtenidas de *The Arabidopsis Genome Initiative* 2000 (Tabla S2). Por otro lado, las secuencias ubicadas fuera del centrómero fueron clasificadas arbitrariamente según su cercanía al mismo como: “proximales”, aquellas que se ubican a una distancia igual o menor a 3 Mb desde el centrómero, o “distales”, las posicionadas a una distancia mayor a 3 Mb del centrómero (Fig. 39 a). Sin embargo, las secuencias localizadas en los NOR (*Nucleolus Organizer Region*), región del cromosoma con un elevado número de copias metiladas del 45S rDNA (Durut et al. 2014; Pontvianne et al. 2007), fueron registradas con su propia identidad (Tabla 5). En total, trabajamos con 21 secuencias, entre las cuales 7 son peri/centroméricas (2 core y 5 pericentrómero), 2 del NOR, 7 proximales y 5 distales (Tabla 5).

El estado de metilación de las secuencias fue analizado en plantas *Ws* y *mbd4l.1*, bajo condición basal y de infección (24 horas post-inoculación con *Pst*), utilizando ADN extraído de hojas. En una primera instancia, utilizamos ensayos de CHOP-PCR (*methylation-sensitive enzyme digestion followed by PCR*) (Zhang et al. 2014) para determinar cambios diferenciales de metilación entre *Ws* y *mbd4l* en las 21 secuencias seleccionadas de un modo rápido y simple. Además, para algunos loci muy repetitivos, tales como el TE ATHILA6A, el grado de metilación fue determinado mediante Southern blot (Materiales y Métodos, apartado 13.2). Los patrones de corte de las diferentes enzimas utilizadas en estos ensayos, como así también sus sitios de restricción y grado de sensibilidad a metilación del ADN son descritos la figura 39 a, b.



(b)

Enzima	Secuencia que reconoce	Sitio de clivaje bloqueado por metilación
Sau3AI	*GATC	GAT <sup>5m</sup> CG
HpaII	C*CGG	C <sup>5m</sup> CGG
HaeIII	GG*CC	GGC <sup>5m</sup> C
McrBC	(Pu)mCG 5mC, 5hmC	No

**Figura 39. Enzimas sensibles y no sensibles a metilación.** (a) Esquema de corte de SAU3AI/HpaII/HaeIII (panel izquierdo) y McrBC (panel derecho) en presencia/ausencia de metilación. (b) Secuencia de reconocimiento de las enzimas y sitio de clivaje bloqueado o no por metilación.

**Tabla 5. Características de las putativas secuencias sobre las que actúa MBD4L.**

Loci	Ubicación cromosómica #	Tipo de secuencia	Vía de regulación	Estado de cromatina *	Metilación basal (t0) ( <i>mbd4l</i> /Ws) §	Metilación Pst (24 hpi) ( <i>mbd4l</i> /Ws)
ATHILA6A	core	retrotransposon	RdDM-DDM1	9	-	+
ATLINE	core	retrotransposon	RdDM	9	-	+
180 bp	core	Secuencia repetida	DDM1	9	+	+
TSI	pericentrómero	retrotrasposon	MOM1	9	-	+
5s rDNA	pericentrómero	gene	RdDM-DDM1	9	+	+
18s rDNA	pericentrómero	Secuencia repetida	RdDM-DDM1 DRM2-MBD6-	9	-	+
45s rDNA	pericentrómero	Secuencia repetida	MBD10- NUCLEOLIN	8	-	-
DNAmt	pericentrómero	gen	RdDM	8	-	+
IGN5	pericentrómero	intergenica	RdDM	8	-	+
HMC5	pericentrómero	gene	MBD7	5	+	-
SDC	proximal	gene	MBD6	2	-	-
ERT7	proximal	gene	RdDM	8	-	-
HMC9	proximal	gene	MBD7	4	+	
DT76	proximal	gene	ROS1-IDM1	5	+	
IGN25	proximal	intergenica	RdDM	4	-	-
JT1- Chr3: 18069200- 18070400 bp	proximal	transposon a ADN	RdDM	8	+	-
AT5TE30795	proximal	transposon a ADN	RdDM	5	+	+
ATSN1	proximal	retrotransposon	RdDM	8	+	+
HMC14	distal	gene	MBD7	7	+	
ATLANTHYS2A	distal	retrotransposon	?	8	-	-
ONSEN	distal	retrotrasposon	RdDM	8	-	-

#La posición de los centrómeros se define en la tabla S3.

\*Los estados de cromatina se definen en Sequeira y Méndez et al. 2014. Estados 8 y 9 son heterocromatina. Estados 2, 4 y 5 son eucromatina. Estado 7 es un intermedio entre eucromatina y heterocromatina.

§El signo (+) indica diferencia de metilación (hipo o hipermetilación) entre *mbd4l* y Ws. El signo (-) indica similares niveles de metilación entre *mbd4l* y Ws.

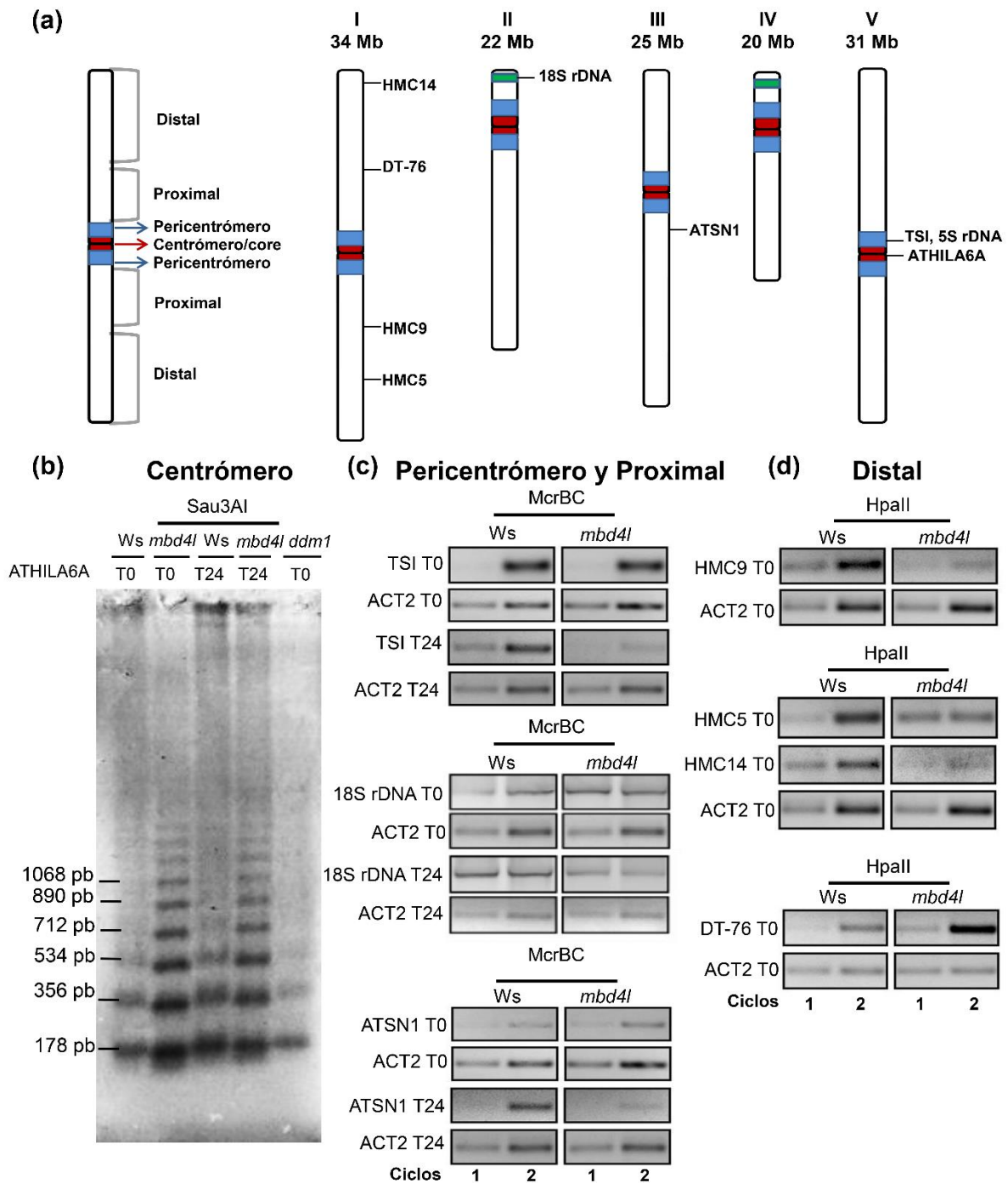
Encontramos que 15/21 secuencias presentan cambios diferenciales de metilación entre WT y *mbd4l.1* en alguna condición (indicado con “+” en Tabla 5). Curiosamente, 9 de las 15 secuencias muestran cambios bajo condición basal, entre las cuales, solo 2 pertenecen a la



región peri/centromérica (repetición de 180 pb y 5S rDNA), y 7 están fuera del centrómero. Por otra parte, bajo condiciones de infección con *Pst*, detectamos 10/21 secuencias que exhiben cambios de metilación entre WT y *mbd4l.1*, en donde 8 de ellas, son exclusivamente centroméricas. Estos resultados indican que algunas diferencias de metilación inducidas por *Pst* que dependen de MBD4L ocurren en dominios heterocromáticos peri/centroméricos.

La Figura 40 muestra resultados representativos de la metilación diferencial entre Ws y *mbd4l* en secuencias centroméricas (ATHILA6A) (Fig. 40 b), pericentroméricas (TSI) y proximales (18S rDNA y ATSN1) (Fig. 40 c) y distales a los pericentrómeros (HMC9, HMC5, HMC14 y DT-76) (Fig. 40 d) bajo condiciones basales y/o de infección con *Pst*.

Los resultados indican que la carencia de MBD4L desencadena hipermetilación del TE ATHILA6A, tanto en condición basal como de infección. También se detecta hipermetilación en las secuencias pericentroméricas (TSI) y proximales (ATSN1 y 18S rDNA) luego del tratamiento con *Pst* (menos producto de PCR luego de digestión con McrBC). En contraste, las secuencias distales (HMC5, 9, 14 y DT-76) muestran eventos de hipometilación bajo condición basal (menos producto de PCR luego de digestión con HpaII).



**Figura 40. Secuencias con metilación diferencial en *mbd4l*.** (a) Clasificación de las secuencias según la posición del centrómero (izquierda) y posicionamiento de las secuencias analizadas en los distintos cromosomas de Arabidopsis (derecha). (b) Southern blot de la secuencia centromérica ATHILA6A en Ws y *mbd4l-1* bajo condiciones control e infección con *Pst*. La mutante *ddm1* fue utilizada como control de corte de la enzima Sau3AI. CHOP-PCR de secuencias pericentroméricas y proximales (c), y distales (d). El gen ACT2 fue utilizado como control. Los números 1 y 2 en cada imagen corresponden a replicas técnicas con diferentes ciclos de amplificación.

Estos resultados sugieren que MBD4L modula diferencialmente el estado de metilación de las secuencias peri/centroméricas y de aquellas ubicadas sobre los brazos cromosómicos bajo condiciones control. Más aún, MBD4L tiende a modificar particularmente la metilación de las secuencias peri/centroméricas luego de la infección con *Pst*.

## Metilación de la secuencia pericentromérica 5S rDNA

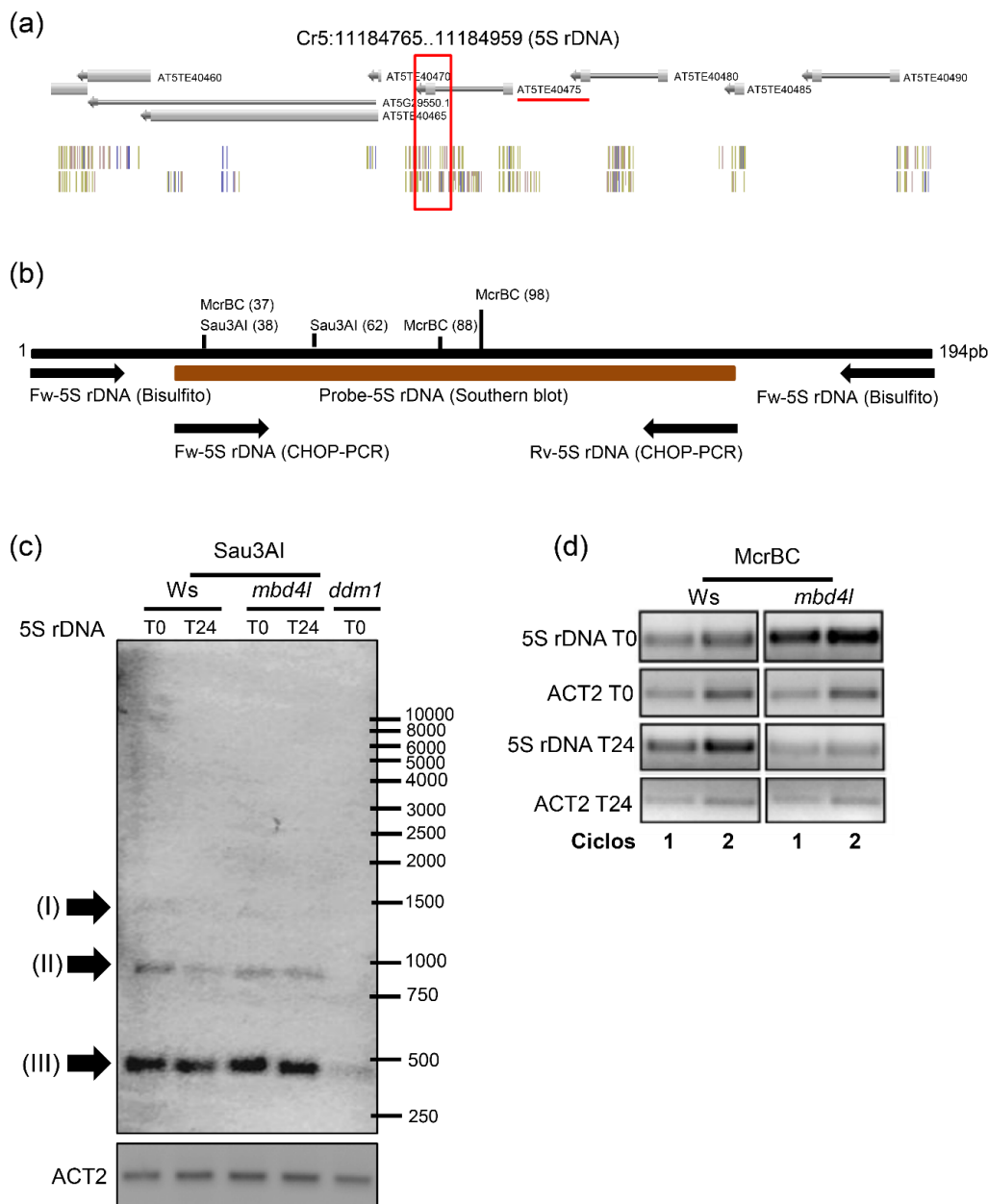
En base a los resultados observados en el ítem anterior, decidimos analizar con mayor profundidad los niveles de metilación de una secuencia pericentromérica bien caracterizada como el 5S rDNA. El genoma de *Arabidopsis* contiene unas 2000 copias del gen 5S rDNA ordenadas en tándem y distribuidas entre los cromosomas 2, 4 y 5 (Simon et al. 2018). Mecanismos epigenéticos tales como la metilación del ADN están involucrados en el silenciamiento de algunas de estas copias (Vaillant et al. 2007). En este estudio analizamos el estado de metilación de un fragmento del 5S rDNA localizado en el cromosoma 5 mediante ensayos de Southern blot, CHOP-PCR y bisulfito bajo condiciones control y de infección con *Pst* para plantas *Ws* y *mbd4l* (Materiales y Métodos, apartado 13).

La Figura 41 a muestra la región del cromosoma 5 que contiene la copia (subrayada en rojo) y secuencia del 5S rDNA (recuadro en rojo) que fue analizada. En la figura 41 b se muestra un esquema de este fragmento (194 pb), donde se puede observar la ubicación de los *primers* utilizados para ensayos de CHOP-PCR y bisulfito, así como la región de hibridización del *probe* y los sitios de restricción *Sau3AI* analizados por Southern blot.

Detectamos niveles de metilación modestamente similares entre las copias del 5S rDNA de *Ws* y *mbd4l* (banda II), bajo condiciones basales (Fig. 41 c). En contraste, los niveles de metilación del 5S rDNA se reducen en *Ws*, pero no así en *mbd4l* (banda II), luego del tratamiento con *Pst* (Fig. 41 c).

En el ensayo de Southern blot observamos que bajo las condiciones analizadas la banda III tiene mayor intensidad que las bandas I y II, indicando que las C de los sitios *Sau3A* están parcialmente metiladas en *WS* y *mbd4l* (Fig. 41 c). Además, como control de corte de la enzima *Sau3AI*, utilizamos la mutante *ddm1* en donde las copias del 5S rDNA se encuentran desmetiladas (Mathieu et al. 2003), por lo que solo se puede detectar la banda III (Fig. 41 c). En condiciones de infección con *Pst*, la intensidad de la banda II se redujo en *Ws* pero no así en *mbd4l* indicando que las C de los sitios *Sau3AI* tienen mayor metilación en *mbd4l*. Por otro lado, de modo similar, los ensayos de CHOP-PCR realizados con la enzima de restricción *McrBC* (reconoce y escinde ADN metilado) también muestran diferencias de metilación en 5S rDNA de *Ws* y *mbd4l* (Fig. 41 d). Llamativamente, mayores niveles de metilación en el 5S rDNA fueron detectados en *mbd4l* (menor amplificación del

producto de PCR luego de la digestión enzimática) comparado con Ws, luego del tratamiento con *Pst* (Fig. 41 d).



**Figura 41. 5S rDNA exhibe cambios de metilación en *mbd4l*.** (a) Posición genómica (raya roja) y región de la copia del 5S rDNA (recuadro rojo) analizada. (b) Esquema de la región analizada en donde se indican los sitios de corte de las enzimas Sau3AI y McrBC (CG), y la posición de los *primers* (CHOP-PCR y bisulfito) y *probe* (Southern blot) utilizados. (c) Southern blot del 5S rDNA realizado en Ws y *mbd4l-1* bajo condiciones control e infección con *Pst*. La mutante *ddm1* fue utilizada como control de corte de la enzima Sau3AI. El gen ACT2 fue utilizado como control de carga de las diferentes muestras. Las flechas negras indican las bandas I, II y III del 5S rDNA. (d) CHOP-PCR del 5S rDNA en Ws y *mbd4l-1* en condiciones control y tratamiento con *Pst*. La enzima McrBC no sensible a metilación fue utilizada. El gen ACT2 fue utilizado como control de carga de las diferentes

muestras. Los números 1 y 2 en cada imagen corresponden a replicas técnicas con diferentes ciclos de amplificación.

Por último, analizamos los niveles de metilación mediante ensayos de bisulfito, los cuales suelen ser una herramienta muy utilizada para conocer el estado de metilación de cada citosina en el genoma o secuencia (Cokus et al. 2008). Además, se puede determinar los contextos de metilación a los que pertenece cada citosina (CG, CHG o CHH, siendo H=C, G o T), e inferir la vía de metilación asociada a cada uno de ellos (Cokus et al. 2008). Las condiciones de bisulfito, amplificación por PCR, clonado, selección de clones positivos y alineamiento de secuencias son descriptas en Materiales y Métodos, apartado 13.

Mediante este análisis evaluamos la metilación de todas las C presentes en la región de 194 pb del 5S rDNA ya descripta (Fig. 41 b). Los colores indican C localizadas en contextos CG (verde), CHG (azul) y CHH (rojo). Los círculos llenos y vacíos indican un estado metilado y desmetilado de las C, respectivamente (Fig. 42).

Detectamos 3 regiones metiladas diferencialmente (DRM) entre los genotipos (*Ws/mbd4l*) y/o condiciones (*t0/Pst*) (DRM 1-3). Observamos diferencias entre condiciones en *Ws* en donde DRM1 muestra hipometilación CG y CHH en presencia de *Pst*. DRM2 hipometilación CG, CHG y CHH en *Pst* y DRM3 hipometilación CG en *Pst* (Fig. 42). Sólo leves diferencias de metilación fueron registradas en DRM1 y DRM2 del par *mbd4l t0/mbd4l Pst* (menor metilación CG, CHG y CHH en *Pst*), mientras que DRM3 muestra una marcada diferencia entre *mbd4l t0/ mbd4l Pst* (mayor y menor metilación CG) (Fig. 42).

Por otro lado, al comparar entre genotipos (*Ws* y *mbd4l*), bajo condición control, observamos niveles similares en DRM1, mientras que en DRM2 leves diferencias fueron detectadas (mayor metilación CG en *mbd4l*). En contraste, bajo condición de infección con *Pst*, detectamos leves diferencias en DRM1 y DRM2 (mayor metilación CG, CHG y CHH en *mbd4l*), y una diferencia más marcada en DRM3. En esta última, se destaca un evento de hipermetilación (Fig. 42, triángulos) y otro menor de hipometilación (Fig. 42, flecha), ambos en contexto CG, en *mbd4l*.

Analizamos el patrón de bandas del 5S rDNA obtenido en los ensayos de Southern blot (Fig. 41 c), junto a los niveles de metilación de las citosinas correspondientes a los sitios de restricción *Sau3AI* 38 y 62 de la secuencia del 5S rDNA (marcadas con asterisco en Fig. 42). El grado de metilación de estas citosinas se redujo en plantas *Ws* luego de la infección con el patógeno (*to vs Pst*), y esta reducción fue menos notoria en plantas *mbd4l* (Fig. 42).



**DISCUSIÓN**

Los resultados de esta tesis muestran nuevas evidencias sobre la actividad ADN glicosilasa *in vivo* de MBD4L bajo condiciones de estrés genotóxico y biótico. Además, este trabajo evalúa posibles blancos genómicos de esta enzima.

### **Actividad *in vivo* de MBD4L en presencia de agentes genotóxicos**

Los tratamientos con 5-FU generan diferentes metabolitos que pueden afectar directa o indirectamente al ADN y el ARN (Pettersen et al. 2011). De modo indirecto, el 5-FU es capaz de inhibir la timidilato sintasa, y por lo tanto la síntesis *de novo* de dTMP, propiciando la incorporación de dUTP en el ADN. Por otro lado, el metabolito activo FdUTP también es incorporado de manera directa al ADN durante la replicación (Van Laar et al. 1998). Durante este proceso, el U y/o 5-FU pueden aparearse con A o G, generando modificaciones en la estructura del ADN, que inmediatamente son reconocidas y reparadas a través del sistema BER o MMR (Pettersen et al. 2011). En humanos, U y 5-FU es reconocido y escindido por ADN glicosilasas del sistema BER tales como UNG1, UNG2, SMUG1, TDG y MBD4 (Kavli et al. 2002; Hardeland et al. 2000; Turner et al. 2006; Kavli et al. 2007). En Arabidopsis, AtUNG es la principal enzima que reconoce y escinde U *in vitro* (Córdoba-Cañero et al. 2010). MBD4L también actúa sobre este sustrato *in vitro* (Ramiro Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013). Sin embargo, no se conoce todavía el rol diferencial entre MBD4L y AtUNG *in vivo*.

Nuestros resultados arrojaron que la ausencia de MBD4L incrementa la susceptibilidad de las plantas a los tratamientos con 5-FU, afectando tanto los estadios iniciales del desarrollo como en la tasa de crecimiento radicular de plántulas (Fig. 12; 13; 14). Esto indica que la remoción de 5-FU y/U del genoma nuclear mediada por MBD4L resulta esencial para la supervivencia de las plantas. Estos resultados son consistentes con datos *in vitro* que describen que MBD4L pero no AtUNG escinde eficientemente derivados halogenados de uracilo (Ramiro Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013; Roldán-Arjona, Ariza y Córdoba-Cañero 2019). En el mismo sentido, estudios en células humanas observaron una correlación entre la acumulación de 5-FU en el genoma y el aumento de citotoxicidad (An et al. 2007). Sin embargo, nuestros resultados son opuestos a lo observado en mutantes *ung*, las cuales exhiben una mayor tolerancia a 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010). Esto podría deberse a que MBD4L se mantiene activa en estas mutantes removiendo el 5-FU del genoma nuclear. Esta posibilidad es coherente con nuestros resultados donde encontramos que los niveles de *MBD4L* se elevan drásticamente en *ung* luego del tratamiento con 5-FU (datos no mostrados). En contraste, debido a que AtUNG no reconoce ni escinde 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010), se inducirá la acumulación de 5-FU en el genoma nuclear de *mbd4l* incrementando de este modo la citotoxicidad y por consiguiente



una hipersusceptibilidad en las plantas frente a 5-FU, tal como se observa en nuestros resultados (Fig. 12; 13; 14). Por ello, MBD4L muestra ser activa bajo condiciones de 5-FU *in vivo*, y su participación resulta necesaria para propiciar la viabilidad celular y el crecimiento de las plantas bajo estas condiciones.

Además, en concordancia con lo anterior, observamos que las plantas que presentan cantidades elevadas de MBD4L (*MBD4L-OE3*) fueron más tolerantes a 5-FU que las WT (Fig. 16). Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en células humanas, donde se observa que la sobreexpresión de la ADN glicosilasa SMUG1 incrementa notoriamente la tolerancia de las células al 5-FU (An et al. 2007).

Por otro lado, observamos niveles reducidos de ADN fragmentado en las mutantes *mbd4l* expuestas a 5-FU (Fig. 20). Tales niveles fueron un poco más elevados que los encontrados en plantas *mbd4l* cultivadas bajo condición control (Fig. 20). El remanente de ADN fragmentado en *mbd4l* tratada con 5-FU podría haberse generado por la actividad de AtUNG, la cual es capaz de escindir U *in vitro* (Córdoba-Cañero et al. 2010). Además, llamativamente observamos un aumento de transcritos de AtUNG en *mbd4l* luego del tratamiento con 5-FU (Fig. 28). Sin embargo, un estudio previo determinó que AtUNG se localiza en mitocondrias y cloroplastos, pero no en el núcleo (Boesh et al. 2009). Curiosamente, la actividad AtUNG fue detectada en extractos nucleares y mitocondriales (Boesh et al. 2009). En otro trabajo se mencionó que la secuencia de aa de AtUNG es muy parecida a UNG nuclear de humanos (UNG2) (Córdoba-Cañero et al. 2010). En base a estos antecedentes, no quedaba confirmada la presencia y actividad de AtUNG en núcleo. Por ello, analizamos la localización subcelular de AtUNG y observamos que efectivamente se encuentra presente en núcleos y mitocondrias tanto de *Arabidopsis* como de *Nicotiana benthamiana* (Fig. 24). Además, observamos que AtUNG y MBD4L colocalizan en nucleoplasma (Fig. 25), y ambas se expresan en plántulas WT de *Arabidopsis* (Fig. 26; 28). En base a estos resultados podemos inferir que ambas enzimas tienen la posibilidad de actuar sobre el ADN nuclear. El aumento de transcritos de AtUNG en *mbd4l* bajo condiciones de 5-FU estaría principalmente asociado a la actividad de remoción de U del ADN nuclear. Sin embargo, estudios realizados en otros organismos diferentes a plantas sugieren que la ausencia, inhibición, o sobreexpresión de UNG no tiene efecto sobre la citotoxicidad del 5-FU, 5-FdUrd u otros inhibidores de TS (An et al. 2007; Grogan et al. 2011; Luo et al. 2008; Welsh et al. 2003; Pettersen et al. 2011). Curiosamente, estos resultados coinciden con nuestras observaciones en donde registramos un mayor número de células muertas en los ápices de raíces de *mbd4l* tratadas con 5-FU (Fig. 18), aún cuando AtUNG muestra un aumento de transcritos en *mbd4l* bajo esta condición (Fig. 28). Sin embargo, son opuestos a estudios previos en donde la mutante *ung* presenta mayor

tolerancia al 5-FU (Córdoba-Cañero et al. 2010). Esto podría explicarse debido a la sobreexpresión de MBD4L que detectamos en *ung* crecidas en 5-FU (datos no mostrados). Por consiguiente, la participación de AtUNG en los ciclos de incorporación/remoción/BER del U (Aherne y Brown. 1999; Longley et al. 2003) explicaría en parte los niveles moderados de ADN fragmentado registrados en plantas de *mbd4l* sometidas a 5-FU, pero su única actividad no sería suficiente para contrarrestar los efectos citotóxicos que desencadena la acumulación de 5-FU en el genoma de *mbd4l*.

Para estudiar la actividad de MBD4L y excluir a AtUNG utilizamos los tratamientos con 5-BrU, el cual es sustrato *in vitro* de MBD4L pero no de AtUNG (Ramiro-Merina, Ariza y Roldan-Arjona 2013). Nuestros resultados muestran que efectivamente MBD4L y no AtUNG es activa frente a 5-BrU (Fig. 30), otorgándole a la planta una mejor tolerancia y viabilidad (Fig. 31; 32; 33).

Por otro lado, se conoce bien que los errores durante la replicación del ADN generan modificaciones en las horquillas de replicación y causan estrés replicativo (Mazouzi et al. 2014), y los tratamientos con 5-FU suelen exacerbar esta condición de estrés (Sampath et al. 2003; Hills y Diffley 2014). El estrés replicativo representa un cambio en la estabilidad genómica, por lo que la identificación y resolución del daño asociado a la replicación son necesarias para la supervivencia de las células. El programa de DDR incluye una cascada de señalización coordinada que responde ante el daño en el ADN, y consta de una serie de proteínas que ayudan a las células a reparar el ADN dañado o enviarlas a apoptosis (Cimprich y Cortez 2008). Entre ellas las más importantes son las quinasas ATM y ATR, las cuales modulan una amplia variedad de proteínas involucradas de la DDR (Cimprich y Cortez 2008). Estudios realizados en cáncer de colon demostraron que las quinasas ATM y ATR son activadas luego del tratamiento con derivados halogenados de uracilo (Adamsen et al. 2011). Curiosamente, al evaluar los niveles de transcritos de genes de respuesta al daño en el ADN (DDR) en plantas de *mbd4l* expuestas a 5-BrU, observamos un aumento de transcritos en BRCA1 y ATM (Fig. 35). Esto es consistente con otros estudios donde se demostró que el 5-FU no es capaz de bloquear la primera ronda de replicación del ADN, pero puede arrestar a las células en fase G1/S cuando vuelven a replicar. En este punto, se activa la recombinación homóloga (HR) para promover la reparación del ADN y por lo tanto la supervivencia de las células (Huehls et al. 2016). Además, la quinasa WEE1 (que controla el ciclo celular) presenta mayores niveles de expresión en plantas *mbd4l* al ser sometidas a estrés genotóxico por 5-BrU (Fig. 35). Estos resultados podrían explicar el reducido crecimiento de las raíces de *mbd4l* con 5-BrU, ya que WEE1 regula negativamente la entrada a mitosis, arrojando el ciclo celular en respuesta a daño en el ADN (Sánchez et al. 2003; Sorensen y Syljuasen 2012). Los reducidos cortes del ADN encontrados en *mbd4l*

con 5-BrU, podrían también estar asociados a la función regulatoria de WEE1. Trabajos previos observaron que disminuciones de WEE1 inducen daño en el ADN en las zonas de replicación en la fase S del ciclo celular, lo cual es acompañado por una marcada acumulación de ssDNA (Beck et al. 2010). Además, pérdidas o niveles más bajos de WEE1 o ATR permiten incrementar la actividad CDK, lo que induce la generación masivos inicios de replicación no programados y estructuras de replicación aberrantes que son propensas a ser fragmentarse dando como resultado DSBs (Sorensen y Syljuasen 2012). Por lo tanto, la falta de actividad de MBD4L ante la sostenida acumulación de 5-FU o 5-BrU en el genoma de *mbd4l* induce un drástico incremento en los niveles de ADN dañado, y por lo tanto una rápida activación de DDR que inducen el arresto del ciclo celular y apoptosis. Esto coincide con un estudio en donde observaron daños en ADN debido a la acción de agentes citotóxicos como el 5-FU, que además, genera el arresto del ciclo celular para prevenir la proliferación celular y desencadenar apoptosis (Didelot et al. 2003).

### **Participación de MBD4L en la estructura de la heterocromatina centromérica y rupturas del ADN en respuesta a estrés biótico**

Se conoce que los tratamientos con *Pst* inducen la descondensación de la heterocromatina pericentromérica (Pavet et al. 2006). Llamativamente, DSBs también fueron detectados en el ADN nuclear de Arabidopsis en presencia de *Pst* (Song y Bent. 2014). Sin embargo, aún se discute si ambos eventos están funcionalmente relacionados. Recientemente, se demostró que en algunas condiciones, la remodelación de los cromocentros ocurre como consecuencia de sucesivos eventos de replicación que como bien se conoce tienden a fragmentar el ADN a los fines de reclutar componentes de reparación del ADN (Feng et al. 2019). En contraste, otros trabajos consideran que en primera medida tiene lugar la remodelación o relajación de la cromatina para iniciar la reparación del ADN dañado (Shaked, Avivi-Ragolsky, y Levy 2006; Liu, Yip, y Zhou 2012; Sellou et al. 2016; Choi et al. 2019). Nuestros resultados podrían contribuir a estudiar estos dos fenómenos en forma conjunta. Como describimos previamente, la mutante *mbd4l* es la única de las ADN glicosilasas aquí analizadas que no muestra un fenotipo de descondensación de CCs ni tampoco rupturas en el ADN luego del tratamiento con *Pst* (Fig. 36, 38). Esto es consistente a lo observado en animales, donde la ausencia de MBD4 reduce la formación de DSB en el ADN (Grigera, Wuerffel, y Kenter 2017). Por otro lado, estudios *in silico* indican que *MBD4L* es la ADN glicosilasa que mejor se expresa luego de 24 horas de tratamiento con *Pst* (Fig. S9). Por ello la presencia de MBD4L resultaría fundamental para modificar la cromatina y reparar el ADN en presencia de estrés biótico.

En base a estos resultados proponemos que las bases modificadas generadas por oxidación y/o desaminación del ADN a partir de las ROS y/o NO producidos durante la infección con *Pst* (Torres 2010; Lamb y Dixon 1997; Delledonne et al. 1998) serían reconocidas principalmente por MBD4L y en menor medida por OGG1 y FPG, dando como resultado un aumento en la actividad de escisión y la concomitante formación de rupturas en el ADN (Blaisdell y Wallace 2001; Yang, Galick, y Wallace 2004; Yang, Chaudhry, y Wallace 2006). Sin embargo, OGG1 y FPG1 no participan de la remodelación de los cromocentros como MBD4L (Fig. 36). Esto podría suceder ya que bajo condiciones de infección con *Pst*, los niveles de ROS y NO incrementan considerablemente, modificando la 5mC en T y/o 5-hmC, cuyas bases pueden ser reconocidas específicamente por MBD4L. La remoción de los derivados de 5mC generados en contextos CG, muy abundantes en CCs, daría como resultado una hipometilación de la cromatina centromérica y por lo tanto una evidente descondensación de CCs. Al ser el centrómero un lugar con elevado contenido de citosinas metiladas en sitios CG, se esperaría que las manifestaciones citológicas producto de ataques oxidativos o desaminativos sean más evidentes que en otras regiones.

Estudios en células de mamíferos demostraron que MBD4 es reclutada a sitios con daño oxidativo (Laget et al. 2014). Sin embargo, estudios con sustratos *in vitro* de MBD4L no demuestran actividad sobre 8-oxoG (Ramiro Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013). Pero esto no descarta la posibilidad de que oxidaciones en G o A de regiones centroméricas puedan ser sustratos *in vivo* de MBD4L.

En base a estos resultados, y a estudios previos (Nota 2014), podemos sugerir que MBD4L, pero no OGG1, FPG, y glicosilasas de la familia DEMETER, media la descondensación de la cromatina centromérica en condiciones de estrés biótico. Eventualmente, los blancos de MBD4 podrían estar concentrados en esta región y la actividad de la enzima podría incrementar la accesibilidad de la maquinaria de reparación a los sitios de daño, similar a lo propuesto por Feng et al. 2019.

### **Blancos genómicos de MBD4L en respuesta a *Pst***

Estudios previos demuestran que las secuencias peri/centroméricas 5S rDNA y DNAmT sufren desmetilación luego del tratamiento con *Pst* (Pavet et al. 2006). Sin embargo, la/s enzima/s responsable/s de este evento aún no se conoce/n. ROS1, la ADN glicosilasa con actividad desmetilasa mejor estudiada en plantas, no muestra blancos centroméricos (Tang et al. 2016). Esto podría deberse a que ROS1 escinde eficientemente 5mC, pero solo muy poco los apareamientos T/G, de los sitios CG (Agius, Kapoor, y Zhu 2006; Morales-Ruiz et al. 2006), y que durante los eventos de infección con *Pst* incrementan los niveles de NO y ROS dando como resultado conversiones de 5mC a T o 5-hmU por eventos de

desaminación u oxidación, respectivamente (Magdalena Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek 2016; Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek 2014; Pogány et al. 2009). En contraste, MBD4L reconoce y escinde las bases T y 5-hmU en contexto CG de modo eficiente *in vitro* (Ramiro Merina, Ariza y Roldán Arjona 2013). Tal como sucede con la MBD4 de mamíferos la cual escinde T de los apareamientos T/G, pero es incapaz de reconocer 5mC (Hendrich et al. 1999; Fiorella Petronzelli et al. 2000; Manvilla et al. 2012; Cortellino et al. 2011). Por lo que se cree que MBD4L habría evolucionado para contrarrestar los efectos de la desaminación de 5mC en los sitios CG muy abundantes en plantas (Jordano-Raya et al. 2021). Nuestros resultados de ensayos de metilación, donde analizamos una serie de locus con diferentes estados de cromatina y posición respecto al centrómero (Tabla 5), arrojaron que las mutantes *mbd4l-1* tenían alterados los niveles de metilación en varios loci (Fig. 40; 41; 42). Las secuencias ATHILA6A, TSI y 5S rDNA, características del peri/centrómero de *Arabidopsis*, altamente metiladas, heterocromáticas, muestran hipermetilación en *mbd4l-1* sometidas a *Pst* (Fig. 40 b, c; Fig. 41 c, d; Fig. 42). Estos resultados son coherentes con algunos estudios de la MBD4 de humanos donde observan que promotores de ciertos genes están hipermetilados en ausencia de la enzima (Kondo et al. 2005). Sin embargo, no hay datos sobre la participación de MBD4 sobre la metilación de secuencias repetidas en animales. Tampoco se ha demostrado fehacientemente qué bases modificadas del genoma podrían ser removidas por esta enzima.

Por otro lado, los loci HMC5, HMC9 y HMC14, secuencias que se encuentran en los brazos del cromosoma de *Arabidopsis*, con características de eucromatina, presentaron eventos hipometilación en *mbd4l-1*, incluso ya bajo condiciones control (Fig. 40 d). Curiosamente, eventos de hipometilación también fueron registrados en las repeticiones de 180 pb (centroméricas) y 45S rDNA (NOR) luego del tratamiento con SA y calor, respectivamente (Fig. S10). Estas observaciones son consistentes con lo observado en células animales, donde la falta de MBD4 genera hipometilación en determinados promotores de genes (Liao et al. 2017). Tales eventos de hipometilación estarían asociados a la interacción de MBD4 con la ADN metiltransferasa DNMT1, ya que MBD4 tiene la capacidad de unirse al ADN metilado y reclutar componentes que propician el silenciamiento génico (Wei-Min et al. 2009; Laget et al. 2014). En contraste, en plantas MBD4L carece por completo de un dominio MBD (Ramiro Merina 2016), por lo que otras marcas reclutarían a MBD4L hacia sus sitios de acción. Además, nuestras observaciones podrían explicarse a través del rol glicosilasa de MBD4L en el mecanismo BER, ya que ante ausencias de MBD4L se generaría una acumulación de T en el ADN (producto de la desaminación de 5mC), y además, el pool de T en el ADN podría incrementarse bajo

condiciones de daño de bases, tales como el calor (NO y ROS) o SA (ROS) que generan desaminación/oxidación de 5mC (Cvjetko et al. 2013; Mateo et al. 2006; Herrera-Vásquez, Salinas, and Holuigue 2015). Ante estas circunstancias, las enzimas que están aguas abajo de MBD4L en el sistema BER no pueden actuar, por lo que no continúa con la reparación y posterior incorporación de una C sana, propensa a ser nuevamente metilada, tal como sucede en animales (Dodd et al. 2018; Hashimoto 2014). Por esto MBD4L es importante para la reparación del ADN *in vivo*, evitando la acumulación de bases mal apareadas o modificadas, en consistencia con estudios realizados en rata donde la ausencia de MBD4 desencadena un incremento de transiciones C-T en sitios CG (Wong et al. 2002; Millar et al. 2002).

**CONCLUSIONES**

En este trabajo de tesis se estudió por primera vez la actividad de la ADN glicosilasa MBD4L *in vivo* bajo condiciones de estrés genotóxico y biótico. Los tratamientos con 5-FU y 5-BrU indicaron que MBD4L participa en los eventos de remoción de estas bases propiciando la supervivencia de las plantas, ya que las mutantes *mbd4l* presentan niveles bajos de ADN fragmentado, y un crecimiento y viabilidad celular muy reducidos. Además, determinamos por primera vez, la contribución diferencial de MBD4L y AtUNG. Encontramos que AtUNG está presente en núcleos tanto de *Nicotiana benthamiana* como de *Arabidopsis*, y que es activa frente a tratamientos con 5-FU, pero no ante 5-BrU. Por otra parte, observamos que AtUNG y MBD4L colocalizan en núcleo, y que AtUNG incrementa sus niveles de expresión (ARNm) en ausencia de MBD4L ante la exposición a 5-FU. Esto nos sugiere que MBD4L y AtUNG podrían actuar en conjunto en respuesta a 5-FU, reconociendo y escindiendo de modo similar U. Sin embargo, solo MBD4 sería capaz de escindir 5-FU y 5-BrU, tal como se observó en experimentos previos realizados *in vitro* (Ramiro Merina, Ariza y Roldán-Arjona 2013; Córdoba-Cañero et al. 2010). Ensayos donde se evalúe la acumulación diferencial de 5-FU y 5-BrU en el genoma de *mbd4l*, *ung* y doble mutante *mbd4l-ung* serán esenciales para confirmar esta hipótesis.

La descondensación de los CCs en mutantes de ADN glicosilasas de la vía oxidativa (*ogg1* y *fpg*) en condiciones de infección con *Pst*, nos indica que MBD4L es la única ADN glicosilasa hasta la fecha que es capaz de mediar este proceso. Además, en esta tesis demostramos que otro alelo mutante de MBD4L llamado *mbd4l-2* tampoco descondensa los CCs bajo condiciones de infección con *Pst*. Esta función exclusiva de MBD4L estaría asociada a la generación de su/s sustrato/s durante el proceso de infección. Experimentos que nos permitan medir los niveles de T y 5-hmU en el ADN bajo estas condiciones resultan determinantes para poder apoyar con más sustento esta hipótesis.

MBD4L, OGG1 y FPG muestran niveles reducidos de ADN fragmentado en presencia de *Pst*. Esto indicaría que estas enzimas podrían estar formando un complejo de acción sobre las bases modificadas en respuesta al estrés. Eventos de sobreexpresión de una glicosilasa sobre el *background* mutante de otra nos ayudaría a dilucidar mejor este interrogante.

Los blancos genómicos de MBD4L son descritos por primera vez en esta tesis. MBD4L presenta blancos genómicos peri/centroméricos (heterocromáticos) que muestran eventos de hipermetilación en condiciones de *Pst*. Curiosamente, MBD4L también manifiesta blancos distales al centrómero (eucromáticos), los cuales se encuentran hipometilados, incluso bajo condición control. Estos resultados sugieren que MBD4L tendría un rol dual dependiendo de las características de la cromatina sobre la que actúa. Ensayos de metilación con doble o triple mutantes generadas por cruza entre *mbd4l* y mutantes de ADN metiltransferasas; experimentos de interacción entre proteínas y/o ChIP-Seq, nos



aportarán resultados interesantes para discutir mejor sobre este posible mecanismo de acción de MBD4L.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1- Condiciones de crecimiento de las plantas**

En primera instancia, las semillas fueron colocadas en un eppendorf de 1.5 ml y tratadas con 70% etanol durante 10 minutos. Posteriormente, se descartó el etanol y se les agregó una solución de 25% hipoclorito de sodio y 1% Tween 20, dejando reposar 10 minutos. Luego fueron lavadas 3-4 veces con agua estéril, y colocadas en heladera (4-8°C) envueltas en papel metálico por 4 días. Pasado este tiempo, las semillas fueron sembradas en placas de Petri con medio de cultivo Gamborg's (GM) (1X sales de Murashige y Skoog -MS-, 1X vitaminas de Gamborg, 0.5X MES pH 5.7, 2% sacarosa y 0.8-1% agar), con o sin antibióticos, y mantenidas a 22°C con ciclos 10/14 h de luz/oscuridad. En experimentos con plantas adultas, las plántulas fueron trasplantadas a suelo (tierra:vermiculita, 1:1) a los 10-12 días post-germinación, y crecidas por 6-8 semanas en las mismas condiciones de temperatura y luz utilizadas para las placas. Algunas modificaciones en la concentración/composición del medio de cultivo y/o condiciones de germinación/crecimiento de las plantas se indican para tratamientos específicos.

## **2- Tratamientos con 5-FU y 5-BrU**

### **2.1- Sin trasplante**

Los experimentos con los agentes genotóxicos 5-FU y 5-BrU fueron llevados a cabo a través de dos aproximaciones distintas. Por un lado, las semillas de los genotipos: *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *mbd4l-2* fueron embebidas y germinadas directamente sobre placas verticales con medio MS 0.5X suplementado con 0, 100 y 200  $\mu$ M de 5-FU. Por otra parte, las semillas de los genotipos *Ws*, *mbd4l-1*, *Col-0* y *ung* fueron germinadas en placas verticales con medio MS 0.5X suplementado con 0, 100 y 200  $\mu$ M de 5-BrU. En todos los casos, la longitud de la raíz primaria fue registrada durante 14 días.

### **2.2- Con trasplante**

Las semillas de distintos genotipos fueron embebidas, germinadas y crecidas durante 7 días sobre placas verticales con medio MS 0.5X y luego transferidas a nuevas placas verticales con medio MS 0.5X que contenía 0, 100 o 200  $\mu$ M de 5-FU o 5-BrU, y la longitud de la raíz primaria fue registrada a los 21 días después del trasplante.

Las plántulas trasplantadas a 0 y 200  $\mu$ M de 5-FU o 5-BrU fueron colectadas al 4° día de tratamiento para ser: a) congeladas en aire líquido y mantenidas a -80°C hasta el momento de su uso (ensayos cometa y/o extracción de ARN/ ADN); b) observar muerte celular en ápice de raíz (microscopía confocal).

### **2.3- Medición de raíces**

Se tomaron fotografías de las raíces con un Scanner. El programa Fiji/ImageJ (Schindelin et al. 2012) fue utilizado para medir la longitud de las raíces. En los análisis estadísticos se utilizó un test no paramétrico (Kruskal-Wallis) utilizando el programa InfoStat versión 2011 (Di Rienzo et al. 2011).

### **3- Tratamientos con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*)**

Para estos experimentos, la cepa virulenta *Pst* DC3000 (Whalen et al. 2001) fue crecida en medio de cultivo King's B -KB- (2% p/v proteasa peptona, 1% v/v glicerol, 0.5% p/v  $K_2HPO_4$ , 0.15% p/v  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.5% p/v agar y agua destilada) sólido suplementado con rifampicina ( $100 \mu g ml^{-1}$ ) y kanamicina ( $50 \mu g ml^{-1}$ ) por 16 h a 28°C. Para las infecciones, las bacterias fueron cultivadas en medio KB líquido con agitación constante (120 rpm) por 16 h a 28°C, y 1 ml de ese cultivo fue centrifugado durante 3 minutos a 4000 rpm. El sedimento resultante fue resuspendido en 10 mM  $MgCl_2$  pH 7, diluido 1/10, y se cuantificó el contenido de bacterias por turbidimetría ( $1A_{600 nm} = 1 \times 10^8$  ufc/ml). Para inocular las bacterias en las hojas, la suspensión bacteriana se infiltró con una jeringa de 1 ml sin aguja por la cara abaxial de hojas de plantas de *Arabidopsis* de 6-8 semanas de edad (Álvarez et al. 1998). Para experimentos de metilación del ADN, descondensación de cromocentros (CCs), expresión génica y niveles de fragmentación del ADN, se infectó la hoja completa con una solución de bacterias a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/ml (Pavet et al. 2006; Nota 2014).

### **4- Muerte celular**

Para analizar la muerte celular se utilizaron ápices de raíces, tal como se describe en Ferreyra et al. 2016 y Furukawa et al. 2010, con algunas modificaciones. Los ápices radiculares de 4-5 plántulas fueron teñidos, directamente sobre la placa donde crecieron, con 20  $\mu l$  de una solución de 20  $\mu g ml^{-1}$  de Ioduro de Propidio (IP) por 2 minutos. Luego, las raíces fueron montadas sobre un portaobjetos, y cubiertas con un cubreobjetos de 24 mm x 50 mm. Durante el montaje de las raíces, la parte foliar de las plántulas fue retirada con la ayuda de un bisturí. Las muestras teñidas fueron observadas bajo un microscopio confocal Olympus (FV1200/FV1000), en donde se capturó la fluorescencia del ioduro de propidio (excitación: 543 nm; adquisición: 625 a 636 nm). Las imágenes fueron tomadas usando un objetivo LDC 40x de aceite de inmersión / 1.1 apertura numérica. El número de células muertas alrededor del centro quiescente (QC) (Fig. S8 b) fue determinado usando el programa Fiji/ImageJ (Schindelin et al. 2012).

## 5- Ensayo cometa

Este ensayo fue puesto a punto en el laboratorio y requirió de cierto esfuerzo para su optimización. Tomando como base la bibliografía disponible para plantas (Rodríguez et al. 2018, Rodríguez et al. 2011, Bent y Song 2014; Gichner et al. 2004), se analizaron experimentalmente cada una de las etapas limitantes de la técnica. Una serie de modificaciones al protocolo fueron incorporadas en base a la disponibilidad de reactivos y materiales del laboratorio. En primera instancia optimizamos la preparación de los vidrios (portaobjetos con capas de agarosa), el cual consideramos que es el principal paso crítico del ensayo. Luego, la cantidad e integridad de núcleos fueron evaluadas en cada una de las etapas del ensayo (mezcla de núcleos con agarosa *Low Melting Point* (LMP), desnaturalización, electroforesis y neutralización). Diferentes agentes genotóxicos que inducen daño en el ADN fueron utilizados como controles positivos. Posteriormente, la detección de los cometas fue determinada mediante la tinción con agentes intercalantes del ADN (bromuro de etidio y Sybr green) y el uso de diferentes objetivos de detección (20x, 40x y 60x) en microscopio de epifluorescencia. Por último, se seleccionó un programa gratuito optimizado para analizar las imágenes microscópicas obtenidas, el cual arroja una tabla con diferentes métricas del estado del ADN. El porcentaje de ADN en la cola fue utilizado para cuantificar y posteriormente reportar el grado de ruptura del ADN en las muestras.

En los siguientes apartados se describen con mayor detalle las condiciones optimizadas utilizadas y sus correspondientes resultados de cada una de las etapas del ensayo.

### **5.1- Etapas del ensayo**

1. Preparación de vidrios: se utilizaron portaobjetos de vidrio comunes, que fueron preparados tal como se indica en la figura S4 a. La mezcla de núcleos + 1% agarosa LMP + una capa de 0.75% de agarosa LMP, mostró ser la mejor combinación para obtener una buena cantidad de núcleos íntegros. (Fig. S4 b).
2. Desnaturalización: se llevó a cabo en condiciones alcalinas para separar las hebras del ADN (Gichner et al. 2003). Una buena cantidad de núcleos desnaturalizados fue observada en los vidrios sometidos a desnaturalización en NaOH por 30 minutos (Fig. S4 c)
3. Electroforesis: se llevó a cabo en la misma solución desnaturalizante alcalina, a los fines de detectar los SSB y/o DBS presentes en el ADN (Gichner et al. 2003). Observamos nucleoides dispersos en vidrios sometidos a electroforesis alcalina durante 30 minutos (Fig. S4 d).
4. Neutralización: se realizó para re-naturalizar las hebras del ADN una vez finalizada la electroforesis alcalina (Gichner et al. 2003). La incubación en Tris-HCl 400 mM por 5 minutos permitió preservar núcleos íntegros (Fig. S4 e)

Nota: Aunque el análisis de núcleos en cada uno de estos pasos fue realizado únicamente para extractos provenientes de plántulas, dado que permitieron detectar una buena cantidad de núcleos en el paso final del ensayo con dichas muestras, las mismas condiciones también resultaron adecuadas para analizar tejidos de hojas adultas (Fig. S5 a).

### **5.2- Controles positivos**

1. *Exposición a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):* el tratamiento de núcleos aislados con concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utiliza como control positivo del ensayo en diversos organismos (Gichner et al. 2008a; Wang et al. 2014; Pourrut et al. 2015). Extractos nucleares de plántulas de Arabidopsis, fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 25, 50 µM) por 1 hora a 4°C. En ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se observaron cometas en los vidrios (Fig. S6 a), indicando que la ruptura del ADN que podría inducirse por factores extrínsecos (intensidad lumínica, temperatura y/o humedad elevadas) o intrínsecos (cortes del tejido, filtrado excesivo), (Olive y Benath. 2006; Pourrut et al. 2015), no es significativa bajo las condiciones de trabajo seleccionadas y no llevaría a la aparición de falsos positivos. Como era previsible, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 y 50 µM), se observaron cometas con diferentes grados de migración del ADN (Fig. S6 b, c) y se determinó que la exposición de extractos nucleares a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25µM por 1 hora a 4°C genera cometas fácilmente detectables.

2. *Exposición a altas temperaturas:* las plantas tratadas con calor son propensas a sufrir daños en el ADN (Cvjetko et al. 2014), por lo que se utilizó este tratamiento para inducir daño genómico por estrés. Se analizó la respuesta de plantas adultas incubadas o no a 37°C por 18 horas. En ausencia de calor, no se detectaron cometas (Fig. S5 a), mientras que luego de la incubación de plantas de Arabidopsis a 37°C por 18 horas la formación de cometas fue fácilmente detectable (Fig. S5 b).

### **5.3- Detección de cometas**

La incubación de muestras con concentraciones bajas de EtBr (dilución 1/1000 del stock: 1 mg/ml) permitió teñir adecuadamente el ADN (en 3 minutos), mientras que concentraciones elevadas (dilución 1/100 del stock: 1 mg/ml) generaron demasiado fondo de tinción, no pudiéndose distinguir los cometas, incluso en tiempos más cortos de incubación (1 minuto). Por eso seleccionamos la primera condición.

Las imágenes de cometas obtenidas con el objetivo 20x fueron difíciles de procesar. El objetivo 40x permitió detectar 1-3 cometas bien definidos por campo (Fig. S5 b; Fig. S6 b) y fue utilizado en la mayor parte de los estudios.. El objetivo 60x, se utilizó para analizar pocos cometas por campo (1 grande, 2-3 pequeños; Fig. S6 c).

#### **5.4- Cuantificación del ADN fragmentado**

Para cuantificar el grado de ruptura en el ADN accedimos a plataformas que ofrecen programas gratuitos, como CometScore (TriTek; <http://rexhoover.com/>) y OpenComet (<http://www.cometbio.org/>). Estos permiten obtener parámetros que son ampliamente utilizados para informar la integridad del ADN en una muestra, tales como el porcentaje (%) de ADN en la cola, la longitud del ADN en la cola, la longitud del cometa total e intensidad de la cola (Kumaravel et al. 2007; Kayaalti et al. 2015; Rodríguez et al. 2018). Nosotros elegimos utilizar el programa CometScore (TriTek) y cuantificar el % de ADN en la cola, ya que este parámetro es usualmente utilizado en la bibliografía de plantas (Gichner et al. 2003; Gichner et al. 2008; Bent y Song 2014; Rodríguez et al. 2015; Rodríguez et al. 2018)

#### **5.5- Protocolo optimizado para ensayos cometa**

Los procedimientos fueron realizados bajo condiciones de baja luminosidad, en un cuarto oscuro acondicionado a 22°C, bajo luz roja, para evitar la ruptura del ADN causada por luz clara o alta temperatura (Pourrut et al. 2015). Las plántulas previamente tratadas/no tratadas, colectadas y congeladas a -80°C, o bien aquellas colectadas y congeladas en aire líquido, fueron colocadas en una placa de Petri de 100 mm x 15 mm, previamente enfriada y mantenida en hielo. Inmediatamente, las plántulas fueron bañadas con 500 µl de PBS 1X suplementado con 400 mM de EDTA y cortadas rápidamente en pequeñas piezas durante 45 segundos con la ayuda de una cuchilla (Gillette) o bisturí. La suspensión nuclear resultante fue filtrada a través de un *miracloth* de 60 µm de porosidad. Posteriormente, 100 µl de la suspensión nuclear filtrada, fueron mezclados con 200 µl de agarosa 1% con bajo punto de fusión (LMP), la cual fue preparada previamente en PBS 0.5X, pre-calentada y mantenida a 42°C. La suspensión de núcleos en agarosa LMP fue mezclada suavemente por pipeteo, y 90 µl de la misma fueron distribuidos a lo largo de un portaobjeto, previamente tratado con una capa de agarosa 1% con punto de fusión normal (NPA), y cubierto con un cubreobjeto de 24 mm x 50 mm. Los portaobjetos preparados (vidrios) fueron incubados sobre hielo durante al menos 10 minutos, para generar una capa fina y homogénea de núcleos. Después de esto, los cubreobjetos fueron removidos, deslizándose cuidadosamente hacia un extremo con la ayuda del dedo índice, para entonces añadir 70 µl de agarosa 0.75% LMP a lo largo de la primera capa generada, y cubrir lentamente el preparado con un nuevo cubreobjetos. Los vidrios fueron incubados nuevamente por 10 minutos sobre hielo y pasado ese tiempo, los cubreobjetos fueron retirados tal como se indicó anteriormente. Los vidrios se trasladaron al interior de un recipiente que contenía 120 ml de solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS, 1% Tritón X-100, pH 10) mantenida a 4°C, y fueron incubados por 1 hora a 4-6°C (heladera). Luego, los vidrios fueron transferidos e incubados por 25 minutos en una cuba de

electroforesis, previamente montada y enfriada sobre hielo, que contenía la solución desnaturalizante (300 mM NaOH, 5 mM EDTA, pH >13) fría a 4°C, para permitir la desnaturalización del ADN. Luego, los vidrios fueron sometidos a electroforesis por 25 minutos a 0.7 V/cm en la misma solución desnaturalizante fría. A continuación fueron retirados de la solución desnaturalizante y transferidos a la solución de neutralización (400 mM Tris-HCl, pH 7.4) donde fueron incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los vidrios fueron retirados de esta solución y posicionados verticalmente sobre una superficie, en donde se secaron por completo a temperatura ambiente. Finalmente, los vidrios secos fueron conservados en el interior de una caja limpia hasta el momento de la tinción y observación en el microscopio. Para la tinción de los vidrios se utilizó 50 µl de una solución acuosa de bromuro de etidio (BrEt; 20 µg ml<sup>-1</sup>) distribuida a lo largo del vidrio (agregando un cubreobjeto de 24 mm x 50 mm) e incubados por 5 minutos. Las imágenes de los cometas fueron tomadas con un microscopio Zeiss Axioplan, con un filtro de excitación de BP 546/10 nm y las rupturas en las hebras del ADN fueron cuantificadas a partir de estas imágenes usando el programa TriTek Comet score freeware 2.0.0.38 (TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA). El porcentaje de ADN en la cola de los cometas fue calculado y utilizado como un indicador del grado de ruptura en el ADN.

## **6- Extracción de ácidos nucleicos**

### **6.1- Pulverización de las muestras**

Las muestras de hojas o plántulas fueron colectadas en tubos eppendorf de 1.5 ml y congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento del procesamiento. Luego, las muestras fueron pulverizadas con la ayuda de un taladro portador de un *pestel* o mecha plástica fueron congeladas y mantenidas a -80°C hasta el momento de su uso.

### **6.2- Extracción de ADN genómico**

Las extracciones de ADN para CHOP-PCR, Southern blot y bisulfito fueron realizadas siguiendo el protocolo de Delledonne et al. 1983. En todos los casos, se utilizó un tratamiento con ARNasa (1 µg/ml) y la adición a la mezcla de un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).

Para los ensayos de genotipificación de líneas mutantes de T-DNA se utilizó un método de extracción con buffer CTAB (modificada de Allen et al. 2006; Clarke 2009; Zhang et al. 2014). Se incubó el material disuelto con 250 µl de CTAB a 65°C por 10 minutos, se agregó a la mezcla un volumen de cloroformo y se homogeneizó bien con vórtex para luego centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos, y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Se agregó 0.7 volúmenes de isopropanol (2-propanol) e incubó 10 minutos a -



20°C. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, y se lavó el pellet con 0.5 ml de etanol 80% frío. Por último, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos, para dejar secar el pellet, y añadir 40 µl de agua MQ.

La cuantificación del ADN genómico fue realizada por espectrofotometría (Epoch<sup>TM</sup>/Take3<sup>TM</sup> Multi-volumen Spectrophotometer System, Biotek Instruments, Inc.)

### **6.3- Extracción de ARN**

Se realizaron extracciones de ARN para determinar los niveles de ARNm de genes seleccionados en diferentes muestras, genotipos y condiciones. Se tomó como guía el protocolo de Verwoerd et al. 1989, con algunas modificaciones. Las muestras fueron colectadas y congeladas inmediatamente en aire líquido, y posteriormente guardadas a -80°C. Para disgregar el material congelado, se utilizaron puntas plásticas y un taladro manual. Las muestras fueron colectadas en tubos eppendorf y congeladas a -80°C. Luego de agregar una pequeña cantidad de aire líquido sobre estos tubos se disgregó el tejido con pulsos del taladro de 10-15 segundos o hasta pulverización completa. Los tubos portadores del material pulverizado fueron mantenidos en aire líquido hasta el momento de ser resuspendidos con la mezcla de extracción. Para esto, 500 µl de la mezcla de extracción [relación 1:1, entre buffer de extracción (100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, 1% SDS) y fenol ácido (pH 5,5)] precalentada y mantenida a 80°C, fueron agregados a cada tubo, y homogeneizados con un vórtex. Luego, 250 µl de cloroformo (saturado en agua) preservado a temperatura ambiente, fueron agregados, y mezclados por inversión (4-6 rondas), y posteriormente centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (lo más limpia posible), y se la colocó en un nuevo tubo estéril, donde se agregaron 250 µl de cloroformo, se mezcló con un vórtex, y se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa fue recuperada (con precaución de no tocar la interfase), y colocada en un nuevo tubo estéril, al cual se le agregó 0.625 volúmenes de LiCl 8 M. Inmediatamente, las muestras fueron incubadas por 16 horas a 4°C. Posteriormente, el ARN se precipitó centrifugando las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de ARN fue lavado con 500 µl de etanol 80% en agua DEPC frío. Nuevamente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue secado en estufa a 37°C durante 15-20 minutos. Finalmente, el precipitado seco de ARN fue resuspendido en 12 µl de agua DEPC y mantenido a -80°C. La cantidad de ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría por su absorbancia de 260 nm utilizando un Epoch<sup>TM</sup>/Take3<sup>TM</sup> Multi-volumen Spectrophotometer System (Biotek Instruments, Inc.) Solamente se utilizaron las muestras con una relación

260/280 nm mayor a 1,8, y con una concentración de ARN superior a 500 ng/μl. La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en geles de agarosa 1%.

### 7- RT-PCR

Las reacciones fueron realizadas utilizando dos metodologías: a) uso de baño húmedo, y b) termociclador Biometra TOne. En primer lugar 2 μg de ARN total fue tratado con 2 U de ADNasa RQ1 (Promega), 1X buffer de DNAasa (Invitrogen) y agua DEPC en volumen final de 10 μl, para eliminar el ADN genómico de las muestras. La mezcla de reacción fue incubada durante 30 minutos a 37°C. Luego, se incorporó a la reacción 1 μl de EDTA 25 μM, incubándose por 10 minutos a 65 °C para interrumpir la reacción. Después de eso, 1 μg de cebadores de 6 bases aleatorias (*random primers*), fueron agregados, mezclados e incubados durante 5 minutos a 70°C, y posteriormente por 1 minuto a 4°C. Luego, se agregó la mezcla que contiene la transcriptasa reversa [1 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), 1X Buffer M-MLV (Promega), 0,25 mM de dNTPs y agua DEPC] hasta 20 μl de volumen final. Finalmente, las muestras fueron incubadas por 15 minutos a 25°C, luego 60 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C. Los cDNA resultantes fueron utilizados inmediatamente o mantenidos a -20°C.

### 8- sqRT-PCR

Para la cuantificación de transcritos por PCR semicuantitativa (sqRT-PCR) se utilizaron: 0.5 μl de cDNA, 12 pmol de cada cebador, 0.4 U de Pfu/Taq Polimerasa (producción casera), 1X de buffer de Pfu/Taq (producción casera), 400 μM de dNTPs, y agua hasta 20 μl de volumen final. Las condiciones de incubación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de ciclos de desnaturalización: 30 segundos a 95°C; apareamiento de cebadores: 30 segundos a temperatura variable (dependiendo del cebador utilizado; tabla S1); y extensión: tiempo variable (dependiendo de la longitud del amplicón, tabla S1) a 72°C. Por último se realizó una extensión final de 2 minutos a 72°C. El número de ciclos utilizados varía dependiendo de la eficiencia de los *primers*, número de copias y nivel de expresión del gen, como así también de la cantidad de cDNA utilizado. Los genes de expresión constitutiva: *UBQ5* (*Ubiquitin 5*; At3g62250) o *EF1α* (*Elongation Factor 1 alpha*; At5g60390), fueron utilizados para controlar la cantidad de cDNA utilizado en cada reacción.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración variable (1 - 2,5 %) dependiendo del tamaño del amplicón. Los geles de agarosa fueron preparados en buffer TAE 0.5X y 10 μl de una dilución 1/100 de bromuro de etidio (stock: 1 mg/ml) a 50 ml de gel.

## 9- Clonado de ADN glicosilasas

En esta tesis se generaron las siguientes construcciones: *35S:MBD4L.3-RFP*, *35S:MBD4L.4-RFP*, *35S:AtUNG-RFP* y *35S:AtUNG-GFP*.

La secuencia codificante de *AtUNG* fue amplificada por PCR con los pares de cebadores P1 y R1 (Tabla S1), usando cDNA de plantas Col-0 como molde. La banda correspondiente al producto de PCR fue cortada del gel de agarosa, purificada (kit de purificación AP biotech) y cuantificada por espectrofotometría (Epoch<sup>TM</sup>/Take3<sup>TM</sup> Multi-volumen Spectrophotometer System, Biotek Instruments, Inc.). En las reacciones de clonado se utilizaron 100 ng del fragmento de ADN eluido, 0.5 ng del vector de entrada TOPO pENTR® (Thermo Fisher, USA), 0.5 µl de solución salina (NaCl 1.2M y MgCl<sub>2</sub> 0.06M) y agua MQ hasta 4 µl de volumen final. La reacción fue incubada durante 60 minutos a temperatura ambiente y utilizada para transformar células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes. La selección de clones se realizó por plaqueo en medio LB suplementado con kanamicina (Km; 50 µg ml<sup>-1</sup>) e incubación por 16 horas a 37°C. Se seleccionaron 10-12 clones y la presencia del vector de entrada portador del transgén se analizó por ensayos de PCR de colonias (PCRC) utilizando los cebadores P1 y M13rv o M13fv y M13rv. Para esto, las colonias positivas fueron tocadas con un palillo, y añadidas a 50 µl de agua MQ, para utilizar 1 µl de esta suspensión en las reacciones de PCRC. El fragmento amplificado con los cebadores M13fv y M13rv (posee la secuencia del transgén y los sitios de recombinación attL) se subclonó por recombinación en el vector de destino Gateway pGWB5 (recombinación LR entre los sitios attL provenientes del vector de entrada y sitios attR presentes en el vector de destino; Nakagawa et al. 2007). Para la recombinación LR, fueron mezclados 200 ng del fragmento con los sitios attL, 600 ng del vector binario Gateway pGWB5, 1 µl de LR clonasa (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) y agua MQ hasta 5 µl de volumen final. La reacción fue incubada durante 4-16 horas a 22°C. Luego, 0.5 µl de proteinasa K (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) fueron agregados a la reacción, e incubados por 10 minutos a 37°C. Después de eso, bacterias *E. coli* DH5α quimio-competentes fueron transformadas con la totalidad de la reacción de LR, distribuidas en placas con medio LB suplementado con de kanamicina (Km; 50 µg ml<sup>-1</sup>) e incubadas por 16 horas a 37°C. En todos los casos de clonado, entre 3-5 clones positivos (resistentes a Km), confirmados por PCR de colonias, fueron secuenciados (*Comprehensive Cancer Center DNA sequencing and Genotyping Facility, University of Chicago, USA*), y posteriormente analizados (identidad de secuencia) con el programa *SnapGene viewer*.

Cuando el transgén se transfiere desde un vector de entrada TOPO pENTR® (ig., pENTR-UNG) hacia un vector binario Gateway pGWB460-RFP(Nakagawa et al. 2007), la reacción de recombinación LR se realiza mezclando ambos vectores, ya que presentan distintos genes de resistencia a antibióticos (Km y Spc, respectivamente). De este modo, luego de la

recombinación LR la selección de clones positivos en Spc excluye el crecimiento de falsos positivos. Por ello, en la reacción de recombinación LR fueron mezclados 200 ng del vector de entrada pENTR-UNG, 300 ng del vector binario Gateway pGWB460-RFP, 1  $\mu$ l de LR clonasa y agua MQ hasta 5  $\mu$ l de volumen final. El resto del procedimiento es igual al descrito en el párrafo anterior.

Los vectores de entrada pENTR-MBD4L.3 y pENTR-MBD4L.4 fueron generados, secuenciados y purificados previamente a esta tesis (Nota 2014), y estaban disponibles para usar. Tales vectores fueron utilizados para transferir por recombinación LR las regiones codificantes de *MBD4L.3* y *MBD4L.4* hacia el vector binario Gateway pGWB460-RFP obteniendo los constructos *35S:MBD4L.3-RFP* y *35S:MBD4L.4-RFP* respectivamente. Los *primers* utilizados en este apartado se encuentran listados en la tabla S1.

### **10- Expresión de *AtUNG* en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis***

Los constructos *35S:MBD4L.3-RFP*, *35S:MBD4L.4-RFP*, *35S:AtUNG-RFP* y *35S:AtUNG-GFP* fueron transformados en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediante electroporación y selección en medio LB suplementado con gentamicina (Gm; 25  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y Km (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

*Transformaciones transientes de Nicotiana benthamiana:* los cultivos de *Agrobacterium* fueron crecidos en placa durante 48 horas a 28°C. Luego, distintas cantidades de bacterias fueron diluidas y homogeneizadas en 1 ml buffer de infiltración (10 mM MgCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O y 100  $\mu$ M acetosiringona; Sigma GmbH, Erlangen, Alemania) hasta alcanzar una OD a 600 nm de 0,3. Para los estudios de coexpresión, volúmenes iguales de diferentes cultivos con la densidad mencionada, fueron mezclados para ser infiltrados juntos. El lado abaxial de hojas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad fue infiltrado con una jeringa de 1 ml para ser analizadas luego de 36 horas en el microscopio confocal.

*Transformaciones estables de Arabidopsis:* plantas salvajes (T0) de 8-10 semanas de edad, fueron transformadas con las cepas GV3103 de *Agrobacterium*, portadoras de los constructos: *35S:AtUNG-RFP* y *35S:AtUNG-GFP*, mediante el método de inmersión floral o "floral dip" (Clough y Bent 1998). Las semillas de las plantas transformadas (T1) fueron sembradas en placas de Petri con medio GM sin sacarosa (-suc) y suplementadas con Km (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Luego de 15-20 días, las plántulas que presentaron mayor crecimiento foliar y radicular (Km<sup>R</sup>) fueron trasplantadas y crecidas hasta obtener semillas por autofecundación (T2), las cuales fueron sembradas en placas con medio GM (-suc) suplementado con Km (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Las plántulas T2 que mostraron un patrón de segregación compatible con una única inserción del transgén (3:1 para Km<sup>R</sup>:Km<sup>S</sup>) fueron seleccionadas, trasplantadas, y crecidas hasta la obtención de sus semillas (T3). Las líneas T3 homocigotas para el transgén (100% de semillas Km<sup>R</sup>) fueron seleccionadas.

## **11- Microscopía confocal**

### **11.1- Localización subcelular de 35S:AtUNG-GFP, 35S:AtUNG-RFP, 35S:MBD4L.3-RFP y 35S:MBD4L.4-RFP en hojas de *Nicotiana benthamiana***

Para detectar la fluorescencia de GFP y RFP, se utilizó un microscopio confocal Olympus FV 1200 (Olympus, América Latina), con láser de excitación de 488 nm y 561 nm respectivamente. La fluorescencia fue adquirida a 505-530 nm para GFP y 570-620 nm para RFP. Las imágenes fueron capturadas usando un objetivo PLAPON 60x de aceite de inmersión/1.42 de apertura numérica (Olympus, Japón), con un zoom digital de 1x (imágenes de campo completo) o 5x (detalle).

### **11.2- Localización subcelular de 35S:AtUNG-GFP en tejidos de *Arabidopsis***

La detección de *AtUNG-GFP* en hojas y raíces de *Arabidopsis* fue realizada con un microscopio confocal Olympus FV 1200 (Olympus, América Latina). Se capturaron las fluorescencias de GFP (excitación: 488 nm; adquisición: 505-530 nm), DAPI (excitación: 405 nm; adquisición: 420-475 nm) y autofluorescencia de los cloroplastos (excitación: 633 nm; adquisición: 650-750 nm) en las distintas muestras. Las imágenes fueron tomadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

## **12- Determinación del contenido de heterocromatina nuclear**

### **12.1- Número de cromocentros**

Las hojas de plantas control e infiltradas con una solución bacteriana de *Pst*  $1 \times 10^7$  ufc/ml fueron cortadas y fijadas en la solución de Carnoy (etanol 96% y ácido acético, 3:1) por 24 horas a 4°C. Luego, las hojas fueron lavadas en una batería de alcohol (90%, 75%, 50%, 25% y agua destilada), montadas sin cortar sobre un portaobjeto y teñidas con yoduro de propidio  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Las microfotografías de núcleos pertenecientes al mesófilo de las hojas fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Olympus FV1200/1000 (Olympus, América Latina) con un objetivo PLAPON 60x de aceite de inmersión/1.42 de apertura numérica. La fluorescencia del yoduro de propidio fue capturada a una excitación de 543 nm y adquisición de 625 a 636 nm. A partir de las fotografías obtenidas se cuantificó el número de cromocentros por núcleo.

Nota: En las hojas infectadas, se utilizaron los núcleos colindantes a los acúmulos o *clusters* de bacterias para cuantificar los cromocentros (Pavet et al. 2006).

## **12.2- Índices de heterocromatina**

Los núcleos de la mayoría de las células exhiben un patrón clásico de cromocentros (8-10 cromocentros conspicuos) (Fransz et al. 2002). El índice de heterocromatina (HX), definido como el porcentaje de núcleos que contienen un patrón clásico de cromocentros bien compactados, fue utilizado para cuantificar la distribución de la heterocromatina (Fransz et al. 2003). Además, el RHF, definida como la intensidad de la fluorescencia de los cromocentros DAPI positivos relativo a la fluorescencia del núcleo entero, fue cuantificada para cada muestra como se describe en Tessadori y Fransz 2004; y Soppe et al. 2002.

## **13- Ensayos de metilación**

### **13.1- CHOP-PCR**

Los ensayos de CHOP-PCR (*methylation-sensitive enzyme digestion followed by PCR*) fueron realizados siguiendo las instrucciones de Zhang et al. 2014 y Finke et al. 2018, con algunas modificaciones. Brevemente, 500 µg de ADN genómico fueron digeridos con enzimas sensibles/ no sensibles a metilación en 50 µl de volumen de reacción.

Las enzimas utilizadas fueron:

1. HpaII, sitio de corte C/CGG (*New England BioLabs*). Sensible a metilación CpG.
2. HaeIII, sitio de corte GG/CC (*New England BioLabs*). Sensible a metilación CHH.
3. McrBC, sitio de corte Pu<sup>m</sup>CG (*New England BioLabs*). No sensible a metilación.

Detecta citosinas metiladas en todos los contextos. CG preponderantemente.

Las reacciones de digestión fueron realizadas en estufa de 37°C durante 16 horas. Luego, analizamos los niveles de metilación en una serie de locus (Tabla 5) por PCR. Para las reacciones de PCR semicuantitativa, utilizamos 1 µl de ADN digerido en 20 µl de mezcla de reacción. Además, cada uno de los locus usó 2 réplicas técnicas, las cuales fueron retiradas a distintos ciclos de PCR del termociclador. El gen Actina 2 (ACT2) fue utilizado como control de carga de ADN en las diferentes muestras y tratamientos. Los *primers* utilizados para cada locus son descritos en tabla S1.

### **13.2- Southern blot**

Para los ensayos de Southern blot, 20 µg de ADN genómico fueron digeridos con la enzima Sau3AI: sitio de corte /GATC (*New England BioLabs*), sensible a metilación CpG. Los procedimientos de siembra, electroforesis, transferencia y *crosslinking* fueron realizados acorde a Pavet et al. 2006. El marcado de la sonda con digoxigenina, hibridación del ADN con la sonda y revelado por colorimetría con NBT/BCIP, se realizaron con el kit no radiactivo *DIG High prime DNA labeling and detection starter kit 1* (Roche), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. En todos los casos, la reacción de revelado fue realizada durante 16 horas. Las imágenes de los blots fueron obtenidas con un scanner.

### **13.3- Bisulfito**

En los tratamientos de bisulfito se utilizó ADN purificado de los siguientes genotipos y condiciones: *Ws* basal, *mbd4l.1* basal, *Ws Pst* y *mbd4l.1 Pst*. El procedimiento de bisulfito fue realizado siguiendo las instrucciones descritas en Pavet et al 2006, con una serie de modificaciones. Primero, 500 ng de ADN purificado fue tratado con la enzima EcoRI a 37°C durante 1 hora. Luego, el ADN digerido fue bisulfitado utilizando el kit *EZ DNA Methylation Gold* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de bisulfito fueron realizadas a 95°C por 10 minutos y 65°C por 2.5 horas en un termociclador BIOMETRA TONE. 1 ul del ADN bisulfitado fue utilizado en las reacciones de PCR junto con los *primers* específicos para cada secuencia. En todos los casos de PCR, la cadena *forward* fue enriquecida previamente mediante ciclos de amplificación (8-10X) utilizando únicamente el *primer reverse*. Posteriormente, ambos *primers forward* y *reverse* fueron añadidos a la reacción de PCR.

En general las reacciones de PCR fueron las siguientes:

1. 95°C 5 minutos
2. 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 45 segundos (8-10X). Solo *primer reverse*.
3. 21°C (tiempo variable hasta agregar *primers*)
4. 95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 45 segundos (30X). Ambos *primers (forward y reverse)*.
5. 72°C 2 minutos

Los *primers* utilizados para cada secuencias se encuentran descritos en la tabla S1. Los productos de PCR resultantes fueron revelados en geles de agarosa con densidad variable (1-2%) dependiendo del tamaño del amplicón (Tabla S1). Las bandas correspondientes a las secuencias de interés fueron cortadas y posteriormente purificadas utilizando un kit de purificación (Ap biotech).

#### **13.3.1- Clonado de productos de PCR bisulfitados**

Los amplicones purificados fueron clonados en un vector pCR™ 2.1-TOPO™ TA (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, bacterias DH5alfa transformadas con la reacción de clonado fueron sembradas en placas conteniendo ampicilina (50 ug/ml) y crecidas a 37°C ON. Las bacterias crecidas fueron inmediatamente repicadas y crecidas en nuevas placas con X-al y ampicilina (50 ug/ml) para distinguir visualmente los clones positivos (blanco/azul claro) y negativos (azul oscuro). Diez clones

positivos provenientes de cada amplicón, genotipo y condición fueron enviados a secuenciar al servicio de secuenciación de la Universidad de Chicago, Estados Unidos (<http://cancer-seqbase.uchicago.edu>).

### **13.3.2- Alineamiento de secuencias bisulfito**

El estado de metilación de 39 citosinas fue observado en las diferentes secuencias del 5s rDNA provenientes del secuenciamiento de 10 clones por cada genotipo y condición: Ws basal, *mbd4l.1* basal, Ws *Pst* y *mbd4l.1 Pst*. Para eso, primero realizamos un alineamiento entre las secuencias del mismo genotipo y condición en el programa *clustal* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) para observar la calidad de las secuencias y eliminar las que presentan poca información de bases (muchas N). Luego, realizamos un alineamiento entre la secuencia de referencia del 5s rDNA (194 pb), y las secuencias del 5s rDNA provenientes de los clones bisulfitados (en formato fasta, sin los *primers*), mediante el uso del programa Kismeth (<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>). Gráficos de *dot blot* arrojados por el mismo programa fueron seleccionados para representar el estado de metilación de cada citosina en los diferentes clones de cada genotipo y condición. Las regiones con metilación diferencial entre genotipos y/o condición fueron definidas como DRMs (Regiones Metiladas Diferencialmente). Las secuencias de los clones obtenidas y analizadas en este estudio pueden encontrarse en el anexo 1.

## **14. Estadística y gráficos**

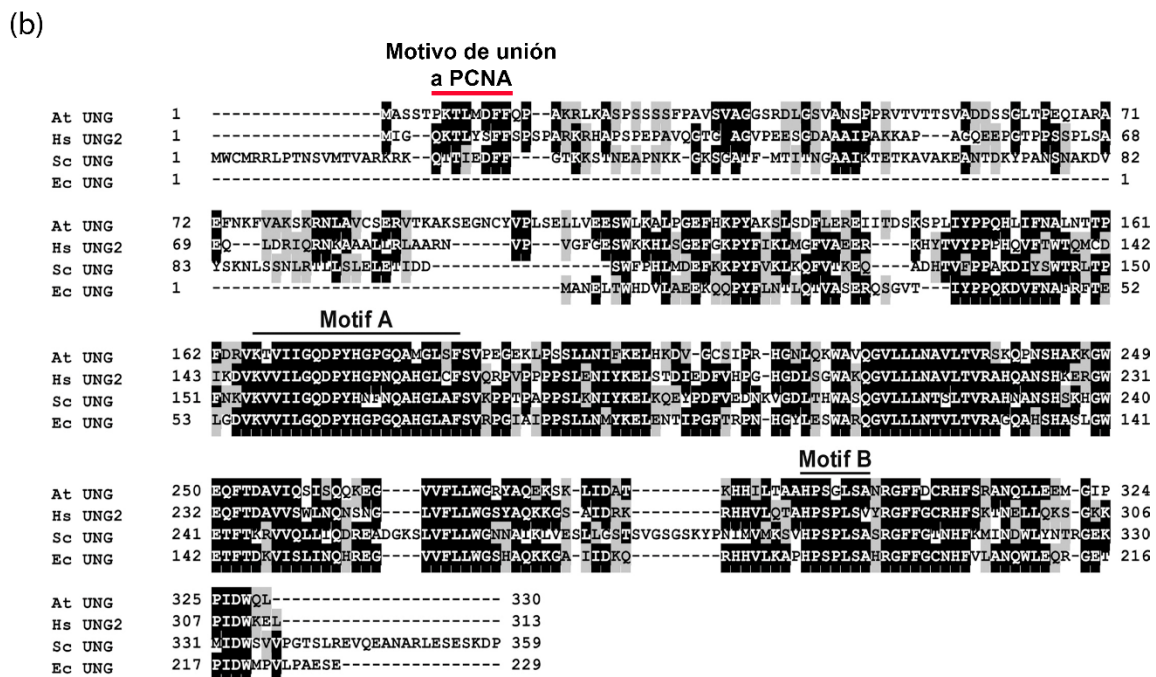
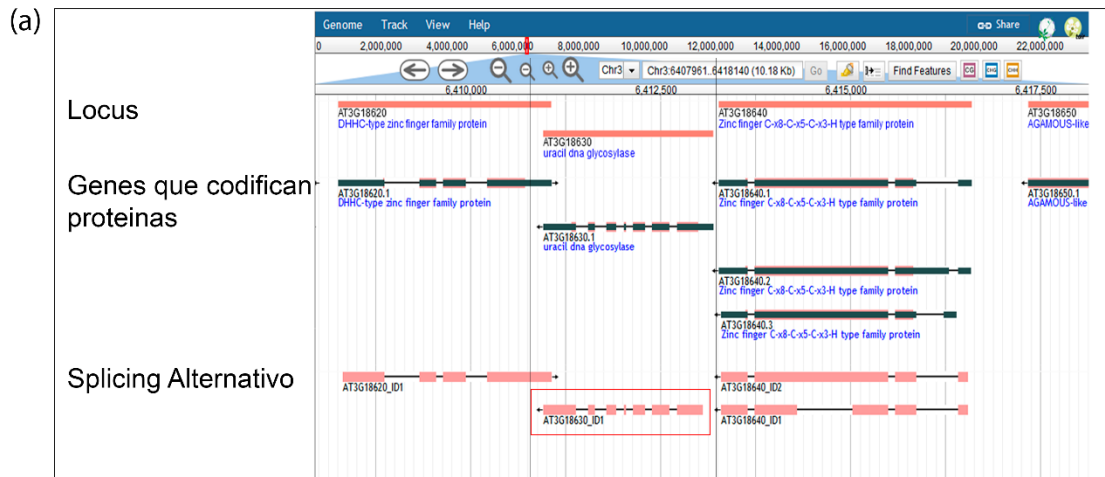
En los análisis estadísticos se utilizó el programa InfoStat Versión 2020 (Di Rienzo et al. 2011), <http://www.infostat.com.ar>. En todos los casos test no paramétrico Kruskal-Wallis fue utilizado para comparar entre muestras y/o tratamientos.

Los gráficos fueron construidos con el programa *GraphPad prism 7* ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).



**FIGURAS SUPLEMENTARIAS**





**Figura S2. Isoformas de *splicing* y homología de AtUNG con UNG2 de humanos.** (a) El gen At3g18630 presenta una sola isoforma de *splicing* (cuadro rojo). Datos obtenidos de ePLANT. (b) Comparación de la secuencia aminoácidos de AtUNG con UNG2 de humanos, UNG de *E.coli* y UNG de *Saccharomyces cerevisiae*. La línea roja indica el sitio donde se encuentra el motivo de unión a PCNA.

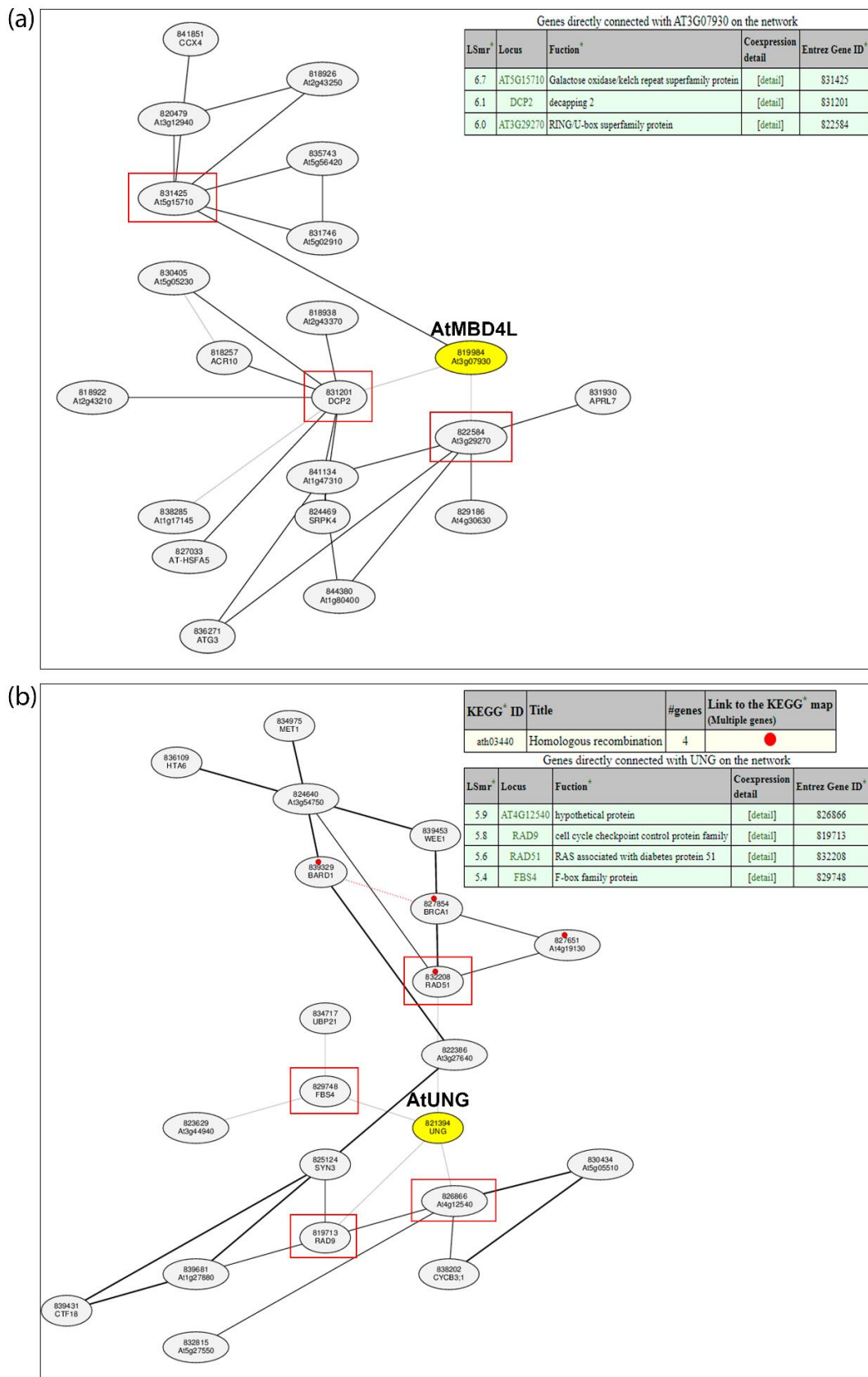
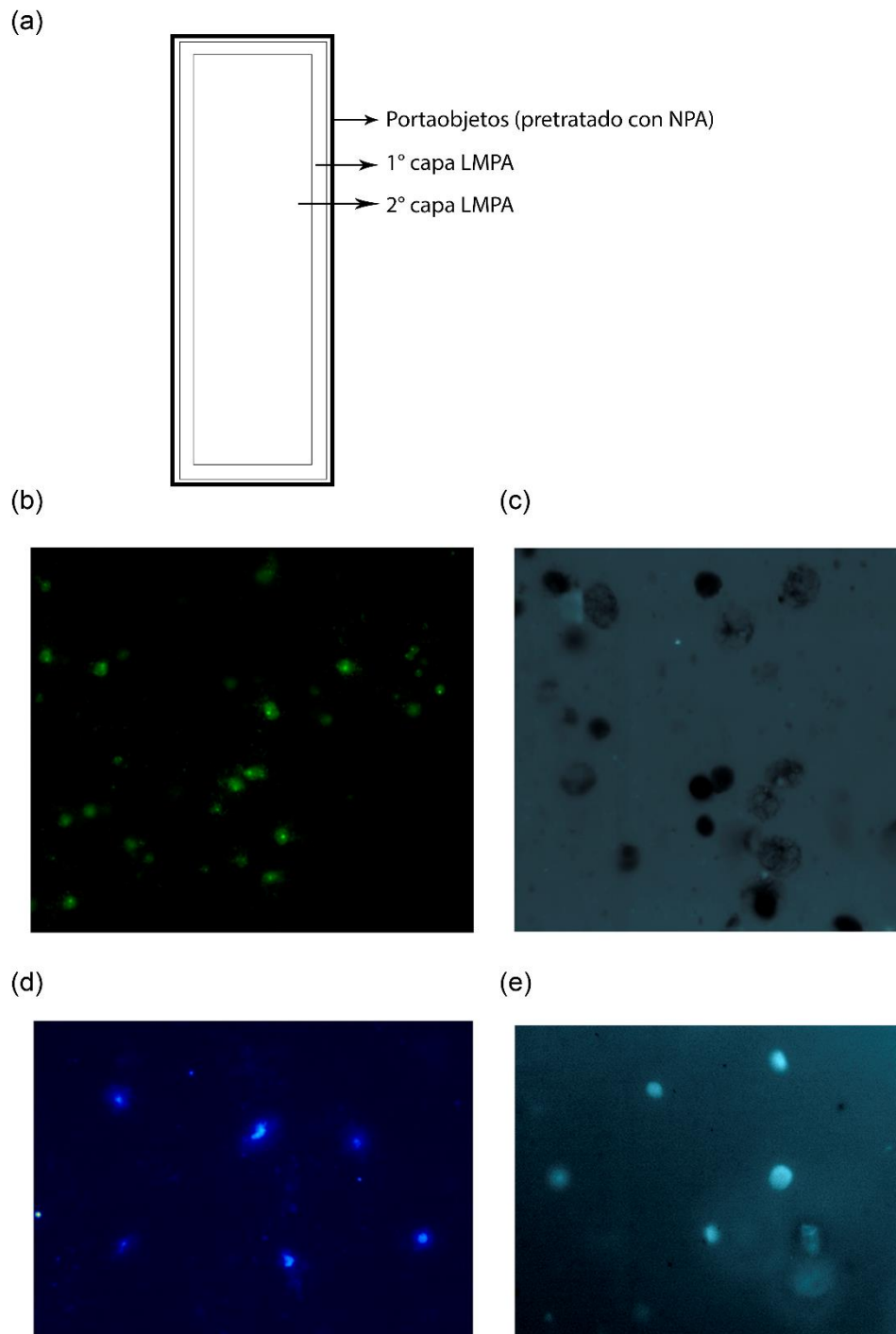
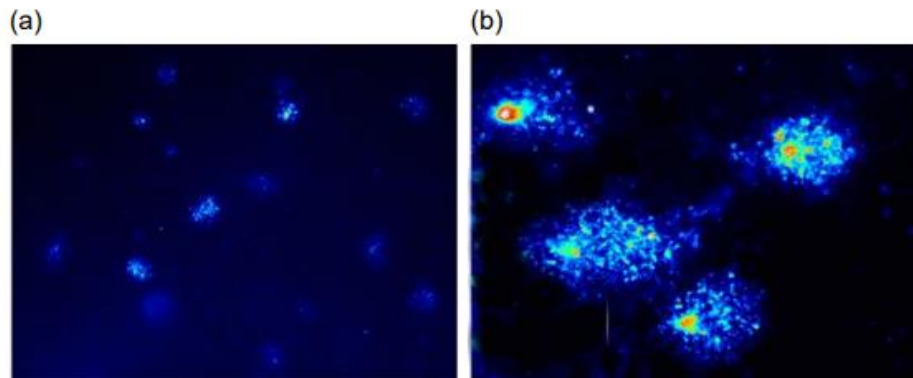


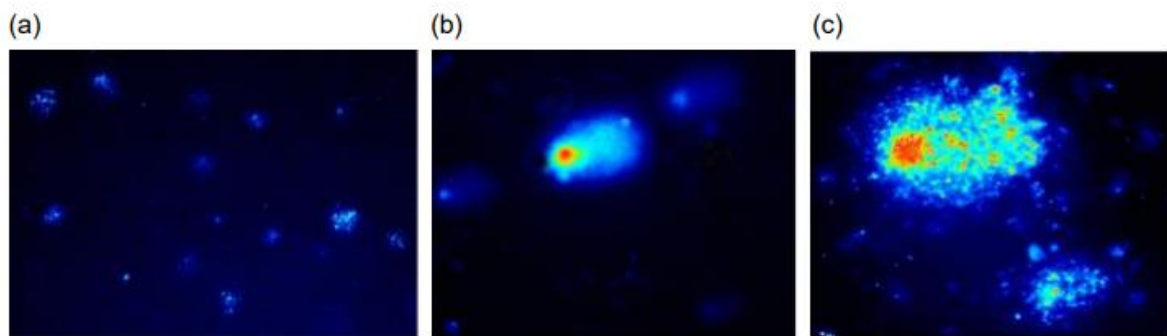
Figura S3. Principales redes génicas de MBD4L y AtUNG. Genes coexpresados con MBD4L (a) y AtUNG (b).



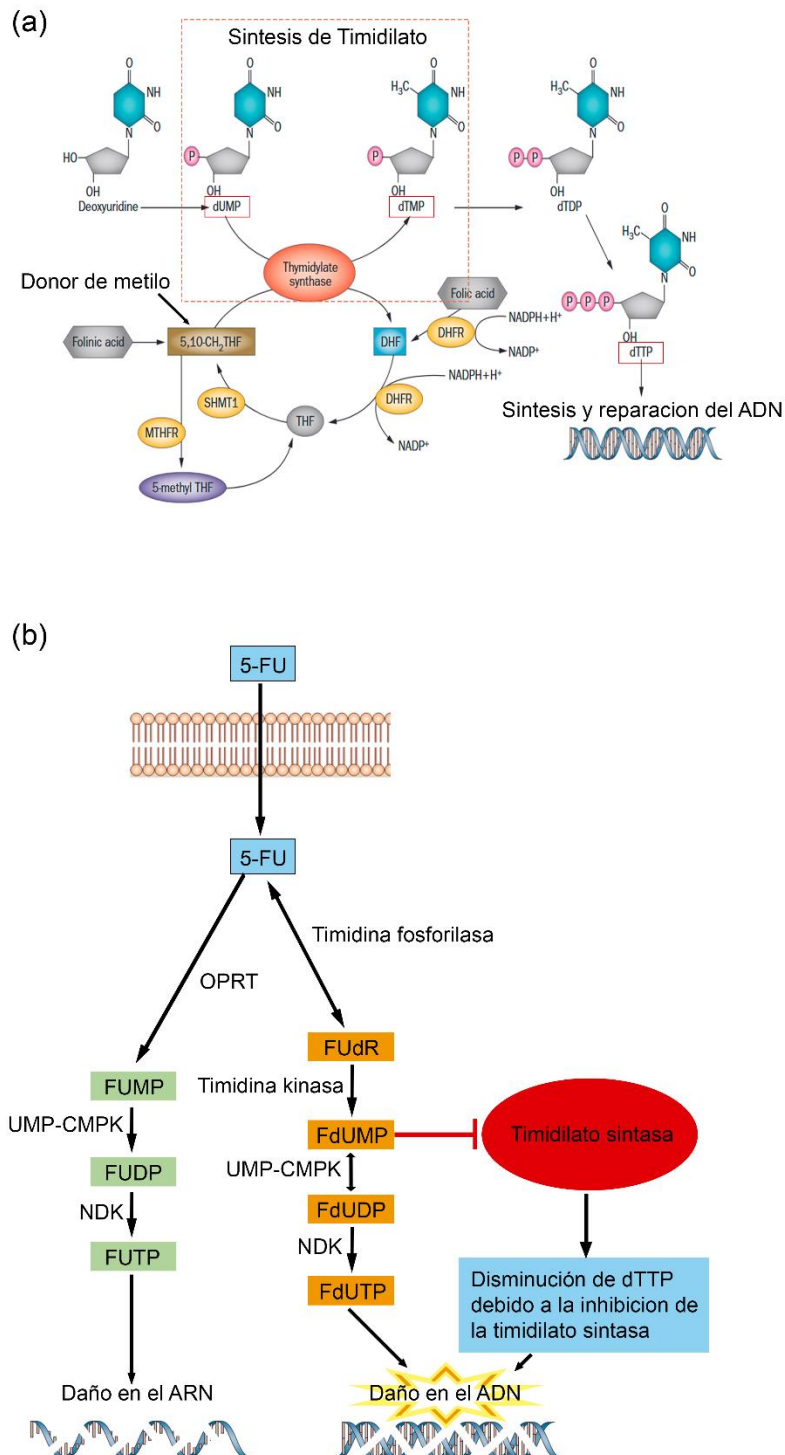
**Figura S4. Pasos determinantes del ensayo cometa.** Esquema de un vidrio donde se muestran el número de capas de agarosa (a). Núcleos íntegros luego de los pasos: mezcla con agarosa LMP (b), desnaturalización (c), electroforesis alcalina (d) y neutralización en Tris-HCl (e).



**Figura S5. Cometas de hojas de Arabidopsis.** Imágenes representativas de núcleos íntegros (a) y ADN fragmentado (b) de tejido aéreo adulto de plantas de Col-0 expuestas (b) o no (a) a calor.

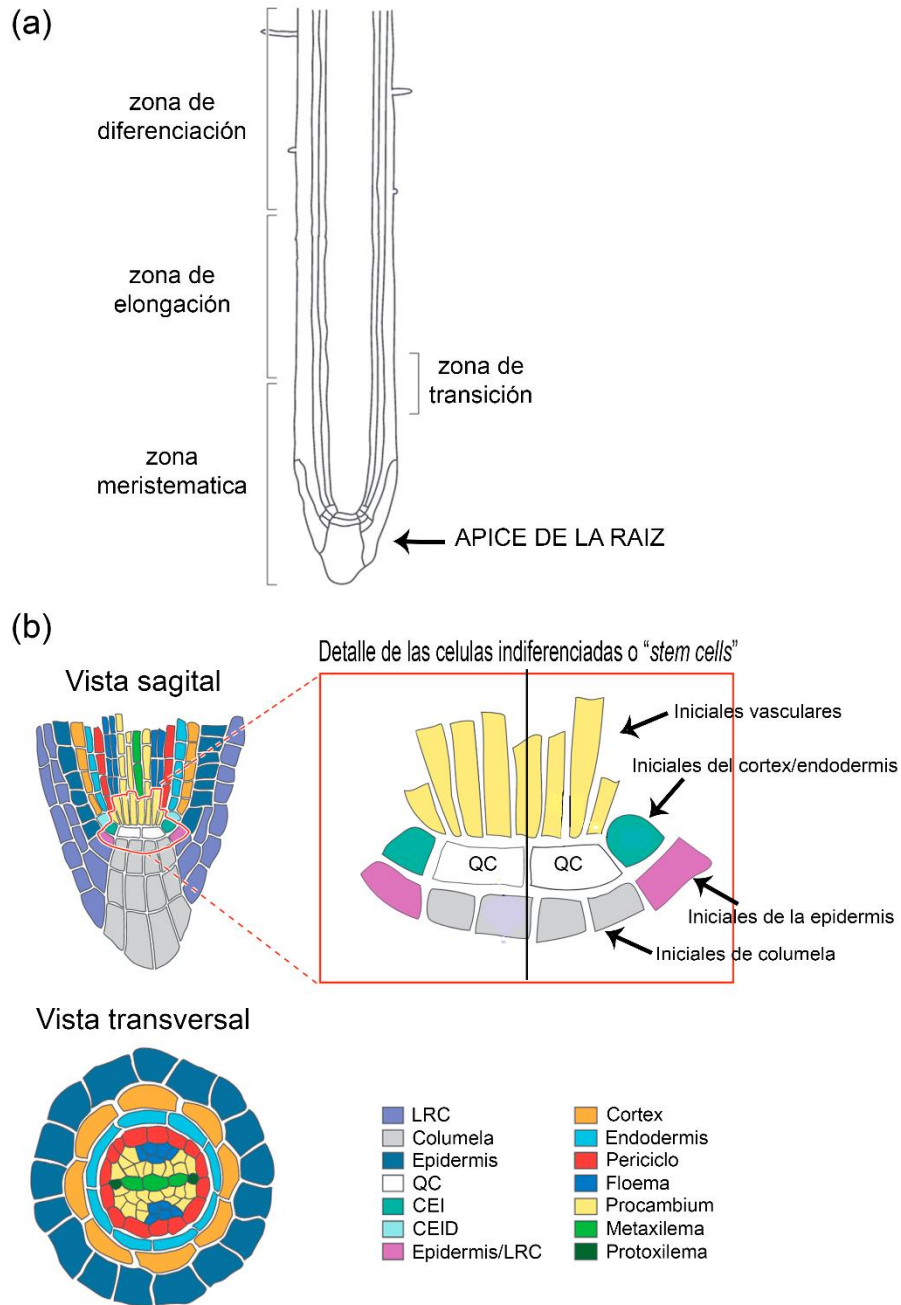


**Figura S6. Cometas de plántulas de Arabidopsis.** Imágenes representativas de núcleos íntegros (a), ADN fragmentado con objetivo 40x (b) y 60x (c) de plántulas de Col-0 de 14 días de edad.



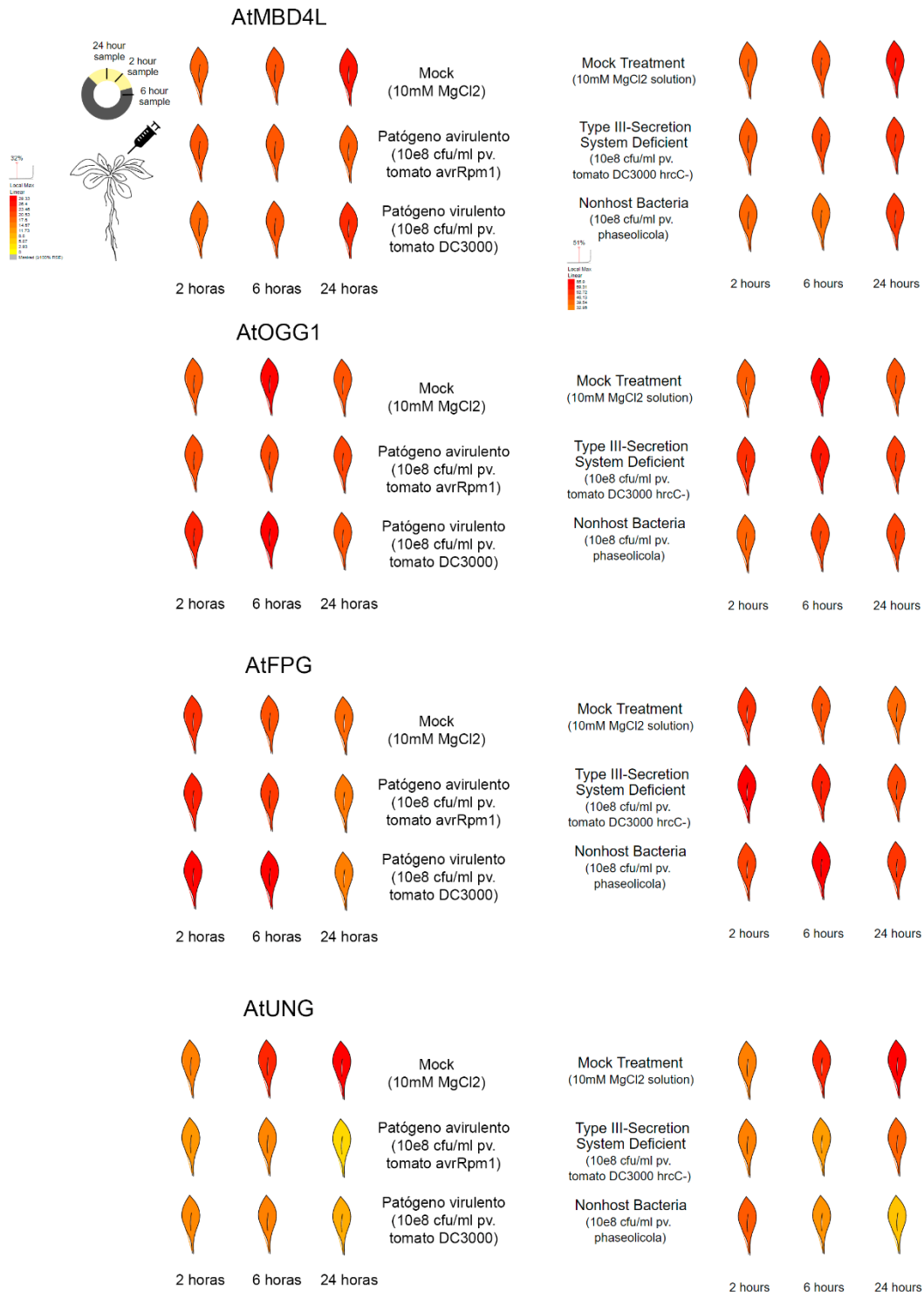
**Figura S7. Efecto del tratamiento con 5-FU en la célula.** (a) Síntesis de dTTP catalizada por la timidilato sintasa. (b) Inhibición de la timidilato sintasa e incorporación de U y 5-FU en el ADN. Modificado de Wilson et al. 2014.



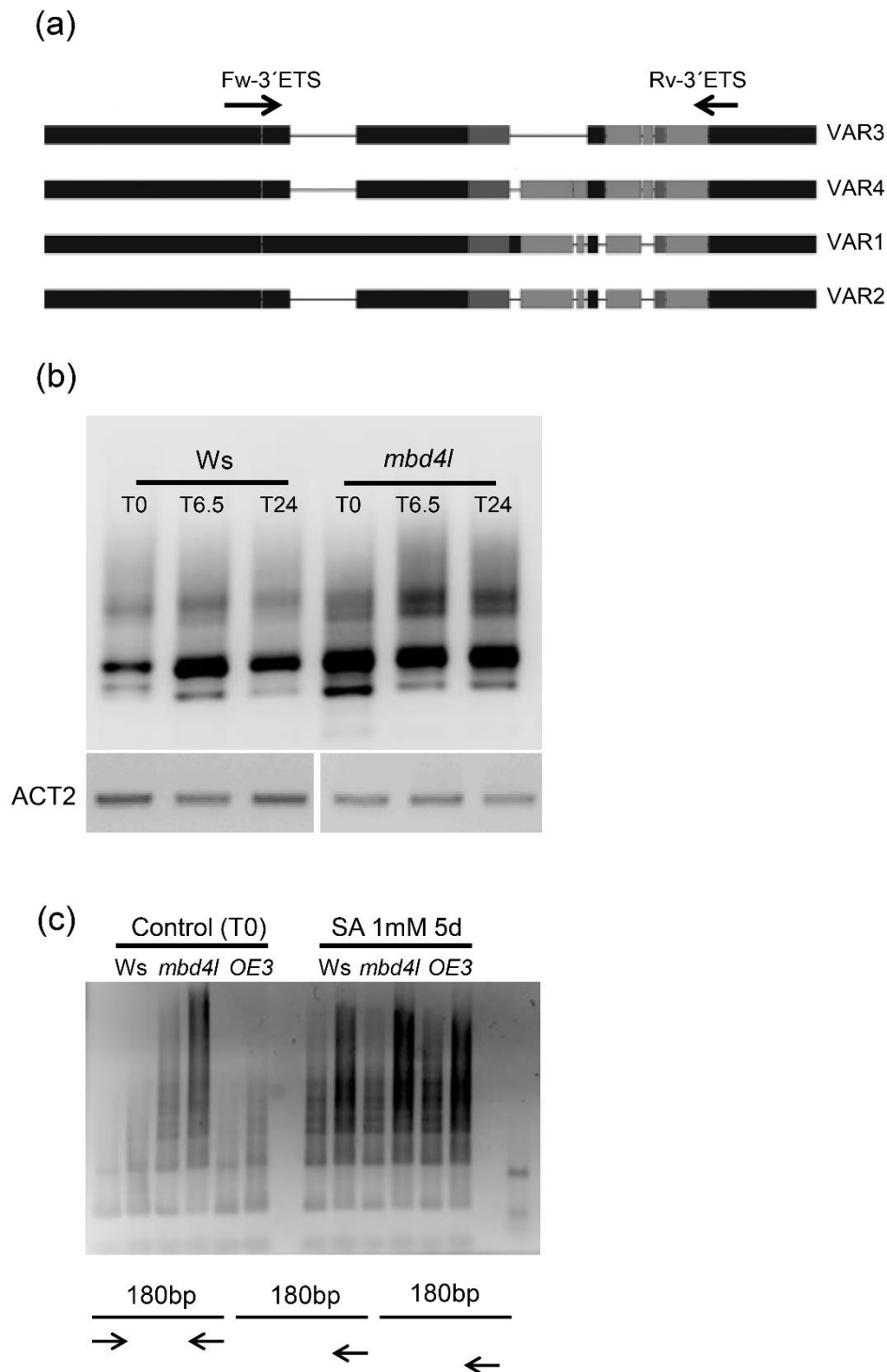


**Figura S8. Morfología de la raíz de Arabidopsis.** (a) Principales partes de la raíz. (b) Detalle del ápice de la raíz, donde se observan los distintos tipos celulares que contiene. Modificado de Petricka, Winter, y Benfey 2012. QC: centro quiescente.





**Figura S9. Niveles absolutos de expresión de las principales ADN glicosilasas de Arabidopsis en respuesta a *Pst*.** Extraído de la base de datos del *eFP Browser*. Escala de colores: rojo (expresión elevada), naranja (expresión intermedia), amarillo (baja expresión).



**Figura S10. Hipometilación en loci heterocromáticos de *mbd4l* inducida por estrés abiótico.** (a) Esquema de las distintas variantes del 45S rDNA, y posición de los *primers* utilizados en los ensayos de metilación. (b) CHOP-PCR con McrBC de la secuencia del NOR 45S rDNA de plántulas de *Ws* y *mbd4l-1* de 14 días bajo condiciones control y tratamiento con 37°C por 24hs. (c) CHOP-PCR con McrBC de la secuencia centromérica 180 pb de plantas de *Ws* y *mbd4l-1* sometidas bajo condiciones control y tratamiento con SA por 5 días.

**ANEXOS**

**Anexo 1. Secuencias de los clones bisulfitados en formato fasta.**

Colonias Ws control (t0)

&gt;B3

GAATATATATGATTGTATTGTATATACTAACGGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACC  
 GGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGG  
 TGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTATGTTTAACTTTTTTTTTTTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTANTTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC

&gt;B4

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT

&gt;B6

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAANCCTGGCANTGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCNNGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT

&gt;B7

GAATATATATGATTGTATTGCATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG

&gt;B8

GAATATATATGATTGTATTGTATATACTAACGGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACC  
 GGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGG  
 TGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTGCATCCCTCTTTTATGTTTAACTTTTTTTTTTTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCA

&gt;B9

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG

&gt;B10

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

Colonias Ws *Pst* (t24)

&gt;B18

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAACT  
 GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
 CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCCTGTGTG  
 GTTAAACTTTGATGATAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
 AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT

&gt;B20

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

>B21

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

>B22

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGATAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC

>B25

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC

>B26

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGNCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTC

Colonias *mbd4l* control (t0)

>B32

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGGGGCGAAGCGTGGCAAGGGCAAGGAGGGCGG  
TTCAGCGCGCAGGTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAAWAACCATTCTGT  
GTGGTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTA  
GTG

>B33

GAATATATATGATTGTATTGCATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTTAAACTTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
A

>B35

GAATATATATGATTGTATTGTATATACTAACGGATGCNATCATACCAGCACTAATGCACC  
GGATCCCATCAGAAGTCCGCGNCTTANCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGG  
TGACCTCCCGGGAAGTCCCTCGTGTTCATCCCTCTTTTATGTTTAACTTTTTTTTTGGT  
TAAACTTTGATGACNAGGGCGAATTCNTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAG  
GGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGT

>B38

GAATATATATGATTGTATTGCATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG

GTAAAACTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG

>B39

GAATATATATGATTGTATTGTATATACTAACGGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACC  
GGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGGG  
TGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTTTTTTTTTTTGGTTAAACTTGATGACA  
AGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCTGAGCT  
TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAA

Colonias *mbd4I Pst* (t24)

>B44

GAATATATATGATTGTATTGCATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTAAAACTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT

>B45

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTAAAACTTGATGATAAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG

>B46

GAATATATATGATTGTATTGTATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTT  
CAGCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTG  
GTAAAACTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTG  
AGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC

>B47

GAATATATATGATTGTATTGNATATATGGCCGATGTTATGGATCAGAAGTCCGTTAAACT  
GGGAACATCATCAGCCCTGTGTGCGTGGCGAGCGTGGCAATGGCAAGGATTGCGTTTC  
ANCGCGCACTGGCCTTTACAAGGTAGCAACGATAAAGGAAATAACCATTCTGTGTGGT  
TAAACTTGATGACAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAG  
GGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATANCTGTTTCC

>B50

GAATATATACGATTGTATTGCATATACTAACGGATGCGATCATACCAGCACTAATGCACC  
GGATCCCATCAGAACTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTANTAGGAAGGG  
TGACCTCCCGGGAAGTCCTNGTGTTCATCCCTCTNTNATGTTTAACTTTTTTTTTTTG  
GTAAAACTTGATGACAAGGNNGAATTCGCGGGCCGCTAAATCAAATNGCCN

Secuencia 5s rDNA analizada

>5s

GAATATATACGATTGCATTGCATATACTAACGGATGCGATCATACCAGCACTAATGCAC  
CGGATCCCATCAGAACTCCGCAGTCAAGCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGATGG  
GTGACCTCCCGGGAAGTCCTCGTGTTCATCCCTCTTTATGTTTAACTTTTTTTTTTT  
GGTTAAACTTGATGAC

**Tabla S1. Lista de *primers* utilizados en los diferentes estudios. \*Alelo salvaje.**

Secuencia	<i>Primers</i> (5'-3')	Ensayo	Tm	pb
ATLINE_FW	CCGATGGTGACCAAGAGTTT	CHOP-PCR	58	163
ATLINE_RV	TCAATGTCGGAGACCTCCTC	CHOP-PCR		
180 pb_FW	ACCATCAAAGCCTTGAGAAGCA	CHOP-PCR	60	167
180 pb_RV	CCGTATGAGTCTTTGTCTTTGTATCTTCT	CHOP-PCR		
TSI_FW	TGGTTCACCAGATAAGCTCAGTGCCCTC	CHOP-PCR	60	129
TSI_RV	GGGAATGGTATCAGATCCTAACAGTGTGG	CHOP-PCR		
5S rDNA_FW	GGATGCGATCATACCAGCAC	CHOP-PCR	60	121
5S rDNA_RV	GAGGGATGCAACACGAGGAC	CHOP-PCR		
3' ETS/45S rDNA_FW	GACAGACTTGTCAAAACGCCACC	CHOP-PCR	60	430
3' ETS/45S rDNA_RV	CTGGTCGAGGAATCCTGGACGATT	CHOP-PCR		
DNAmt_FW	TGAGTGGAYTTYTAAGTAAAGGA	CHOP-PCR	60	271
DNAmt_RV	CTCAARATTCACACCCAACTA	CHOP-PCR		
IGN5_FW	TCCCGAGAAGAGTAGAACAAATGCTAAAA	CHOP-PCR		210
IGN5_RV	CTGAGGTATTCATAGCCCCTGATCC	CHOP-PCR	60	
SDC_FW	CTCGCCTCCTCTCCGGACCA	CHOP-PCR		659
SDC_RV	CGATGAGCCTGAGCAGCGAA	CHOP-PCR		
ETR7_FW	CGCCGCCTGTATTTAGGGTTACC	CHOP-PCR	60	269
ETR7_RV	GGATAGAAACGTCTCTGCCTTGATAG	CHOP-PCR		
18S rDNA_FW	TGTGGCGGGGAATTGCCGTGA	CHOP-PCR	60	471
18S rDNA_RV	GCGCGCCTGCTGCCTTCCTT	CHOP-PCR		
HMC9_FW	TGGAGCCACAGTCTACTCAGCA	CHOP-PCR	58	156
HMC9_RV	CGTGATTCCCCGCTAACGGAT	CHOP-PCR		
DT-76_FW	ATGCCACATAGCTTATT	CHOP-PCR	58	198
DT-76_RV	GAGACAAACGTGGATGA	CHOP-PCR		
IGN25_FW	CTTCTTATCGTGTTACATTGAGAACTCTTCC	CHOP-PCR	58	180
IGN25_RV	ATTCGTGTGGGCTTGCCCTCTT	CHOP-PCR		
JT1_FW	CCAAGCGCAACAACGAAAGT	CHOP-PCR	60	412
JT1_RV	ACGGTTATCAGTTGTAAGTAAGGGA	CHOP-PCR		
AT5TE30795_FW	TGGAAGTACTCGGTTGAGCAA	CHOP-PCR	58	162
AT5TE30795_RV	AGCTGCGTTTGAGTGGAGAGTA	CHOP-PCR		
ATSN1_FW	ACTTAATTAGCACTCAAATTAACAAAATAAGT	CHOP-PCR	60	322
ATSN1_RV	TTTAAACATAAGAAGAAGTTCCTTTTTTCATCTAC	CHOP-PCR		
HMC5_FW	CTGCCAATGGTCTTGAAGAAC	CHOP-PCR	58	176
HMC5_RV	CATCAGCGACATTTGCATCC	CHOP-PCR		
HMC14_FW	TGGTGAGTCCTCCAATGACA	CHOP-PCR	58	171
HMC14_RV	TACGCTGCCTCCAAGGTTAT	CHOP-PCR		
ATLANTYS_FW	GATGCTGAGGTAATCTTAATCGCT	CHOP-PCR	60	183
ATLANTYS_RV	TTCGGATGGTCGATTATCCTTGGA	CHOP-PCR		

ONSEN_FW	CGGTGCTCACAAAGAGCAACTATG	CHOP-PCR	60	198
ONSEN_RV	ATCCTTGATAGATTAGACAGAGAGCT	CHOP-PCR		
ACT2_FW	CTAAGCTCTCAAGATCAAAGGCTTA	CHOP-PCR	60	211
ACT2_RV	ACTAAAACGCAAAACGAAAGCGGTT	CHOP-PCR		
probe_Athila	TTTGATGGTTTGTAGCCGAAGTCCATATGAGTCTT	Southern blot		
PARP2_FW	CGTATTCTGCGTCCTGTATTGT	sqRT-PCR	60	235
PARP_RV	CGTCTCTGATATCTGTCAGTCCAC	sqRT-PCR		
APE1L_FW	CGGTATCTACACAAGGAGCAAG	sqRT-PCR	58	76
APE1L_RV	TTCCCCGGTACTTTCCAATG	sqRT-PCR		
BRCA1_FW	CCATGTATTTTGAATGCGTG	sqRT-PCR	58	105
BRCA1_RV	TGTGGAGCACCTCGAATCTCT	sqRT-PCR		
MRE11_FW	ACACTTCGAGTACTTGTGCAACTG	sqRT-PCR	58	147
MRE11_RV	ATCACCTCCGAGGAGTAAGAAGTC	sqRT-PCR		
ARP_FW	TATCAACAACAGCAAGCGAA	sqRT-PCR	55	147
ARP_RV	TTCTTGAACAGTCTCGCCTC	sqRT-PCR		
eIF1a-FW	CTAAGGATGGTCAGACCCG	sqRT-PCR	56	155
eIF1a-RV	CTTCAGGTATGAAGACACC	sqRT-PCR		
UNG_P1_FW	CACCATGGCTTCGTCGACACCTAAAACC	clonado	60	990
UNG_R1_RV	AAGTTGCCAGTCTATGGGAGGAATC	clonado		
AtUNG_F5_FW	ACTTGGAGAAGGTAAGCAATTCA	genotipado	55	*1021
AtUNG_R5_RV	CCATACAAAATATAATACACCACCACTC	genotipado		
o8409_LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC	genotipado		
UNG_F6_FW	CCTACGCCAAATCACTTTCTGATTTT	sqRT-PCR	58	204
UNG_R6_RV	CTCCTTCAGGTACAGAGAAGGAC	sqRT-PCR		
UBQ5_FW	GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA	sqRT-PCR	60	251
UBQ5_RV	TCAAGCTTCAACTCCTTCTTT	sqRT-PCR		
F1_FW	TTAAAAGGTGATTGCAGACGC	genotipado	50	*989
R1_RV	CCTGCAGACAAGAAGATGGAG	genotipado		
F2_FW	TCTCATATGGTGAGGAAAACCTCC	sqRT-PCR	55	263
R2_RV	TCAGTACACAATCCAAACAAG	sqRT-PCR		
5S rDNA-FW	GAATATATAYGATTGYATTGYATATA	bisulfito	55	194
5S rDNA-RV	RTCATCAARTTTTAACCAAAAA	bisulfito		
PBKS-FW	GTATACTAGTTTTTGAGTGAGTTGATAT	bisulfito	55	300
PBKS-RV	CATAATCATAACTAGTTCCTATATAAATT	bisulfito		

Tm: temperatura de *melting* utilizada para los pares de *primers*.  
pb: Longitud del amplicón en pares de bases.



**Tabla S2. Coordenadas de los centrómeros de Arabidopsis.** Datos obtenidos de *The Arabidopsis Genome Initiative 2000*.

Cromosoma	Posición del centrómero (Col-0)	BAC clone inicial	Coordenadas inicio	BAC clone final	Coordenadas fin	Tamaño aproximado
Cr1	14586546-15586545	F28L22	14083487- 14217985 pb	F5A13	15603208- 15697825 pb	1MB
Cr2	3607930-3608929	T25N22	2926909- 3007799 pb	T15D9	3845702- 3948032 pb	0.8MB
Cr3	13161120-14547047	F6H9	13161120- 13256800 pb	T14K23	14445262- 14547047 pb	1MB
Cr4	3956022-3957021	T27D20	2002440- 2082885 pb	F28D6	4150387- 4263015 pb	2MB
Cr5	11725025-11726024	F3F24	10927735- 11079562 pb	F19N2	12546152- 12662612 pb	1.5MB

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Adachi, S, K Minamisawa, Y Okushima, S Inagaki, K Yoshiyama, Y Kondou, E Kaminuma, et al. 2011. "Programmed Induction of Endoreduplication by DNA Double-Strand Breaks in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (24): 10004–9. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1103584108>.
- Agarwal, P, and KM Miller. 2016. "The Nucleosome: Orchestrating DNA Damage Signaling and Repair within Chromatin." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 94 (5): 381–95. <https://doi.org/10.1139/BCB-2016-0017>.
- Akutsu, Noriyuki, Kenta Iijima, Takeo Hinata, and Hiroshi Tauchi. 2007. "Characterization of the Plant Homolog of Nijmegen Breakage Syndrome 1: Involvement in DNA Repair and Recombination." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353 (2): 394–98. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.12.030>.
- Allshire, Robin C., and Hiten D. Madhani. 2018. "Ten Principles of Heterochromatin Formation and Function." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (4): 229. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.119>.
- Amiard, Simon, Cyril Charbonnel, Elisabeth Allain, Annie Depeiges, Charles I. White, and Maria Eugenia Gallego. 2010. "Distinct Roles of the ATR Kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex in the Maintenance of Chromosomal Stability in Arabidopsis." *The Plant Cell* 22 (9): 3020–33. <https://doi.org/10.1105/TPC.110.078527>.
- Amoroso, Alessandra, Lorenzo Concia, Caterina Maggio, Cécile Raynaud, Catherine Bergounioux, Emmanuele Crespan, Rino Cella, and Giovanni Maga. 2011. "Oxidative DNA Damage Bypass in Arabidopsis Thaliana Requires DNA Polymerase  $\lambda$  and Proliferating Cell Nuclear Antigen 2." *The Plant Cell* 23 (2): 806–22. <https://doi.org/10.1105/TPC.110.081455>.
- Apel, Klaus, and Heribert Hirt. 2004. "REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Arplant.55.031903.141701](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Arplant.55.031903.141701) 55 (April): 373–99. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.55.031903.141701>.
- Arasimowicz-Jelonek, M, and J Floryszak-Wieczorek. 2014. "Nitric Oxide: An Effective Weapon of the Plant or the Pathogen?" *Molecular Plant Pathology* 15 (4): 406–16. <https://doi.org/10.1111/MPP.12095>.
- Arasimowicz-Jelonek, Magdalena, and Jolanta Floryszak-Wieczorek. 2016. "Nitric Oxide in the Offensive Strategy of Fungal and Oomycete Plant Pathogens." *Frontiers in Plant Science* 7 (MAR2016). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00252>.
- Attikum, Haico van, Paul Bundock, René M. Overmeer, Lan-Ying Lee, Stanton B. Gelvin, and Paul J. J. Hooykaas. 2003. "The Arabidopsis AtLIG4 Gene Is Required for the Repair of DNA Damage, but Not for the Integration of Agrobacterium T-DNA." *Nucleic Acids Research* 31 (14): 4247–55. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG458>.

- Aziz, MA, JE Schupp, and TJ Kinsella. 2009. "Modulation of the Activity of Methyl Binding Domain Protein 4 (MBD4/MED1) While Processing Iododeoxyuridine Generated DNA Mispairs." *Cancer Biology & Therapy* 8 (12): 1156–63. <https://doi.org/10.4161/CBT.8.12.8536>.
- Balestrazzi, Alma, Massimo Confalonieri, Anca Macovei, Mattia Donà, and Daniela Carbonera. 2010. "Genotoxic Stress and DNA Repair in Plants: Emerging Functions and Tools for Improving Crop Productivity." *Plant Cell Reports* 2010 30:3 30 (3): 287–95. <https://doi.org/10.1007/S00299-010-0975-9>.
- Balliano, Angela J., and Jeffrey J. Hayes. 2015. "Base Excision Repair in Chromatin: Insights from Reconstituted Systems." *DNA Repair* 36 (December): 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2015.09.009>.
- Ban, Changill, and Wei Yang. 1998. "Crystal Structure and ATPase Activity of MutL: Implications for DNA Repair and Mutagenesis." *Cell* 95 (4): 541–52. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81621-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81621-9).
- Barbado, Casimiro, Dolores Córdoba-Cañero, Rafael R. Ariza, and Teresa Roldán-Arjona. 2018. "Nonenzymatic Release of N7-Methylguanine Channels Repair of Abasic Sites into an AP Endonuclease-Independent Pathway in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (5): E916–24. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1719497115>.
- Bartels, A, Q Han, P Nair, L Stacey, H Gaynier, M Mosley, QQ Huang, et al. 2018. "Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7). <https://doi.org/10.3390/IJMS19072144>.
- Bauwens, S, P Van Oostveldt, G Engler, and M Van Montagu. 1991. "Distribution of the RDNA and Three Classes of Highly Repetitive DNA in the Chromatin of Interphase Nuclei of Arabidopsis Thaliana." *Chromosoma* 101 (1): 41–48. <https://doi.org/10.1007/BF00360685>.
- Beard, William A., and Samuel H. Wilson. 2000. "Structural Design of a Eukaryotic DNA Repair Polymerase: DNA Polymerase  $\beta$ ." *Mutation Research/DNA Repair* 460 (3–4): 231–44. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00029-X).
- Bellacosa, Alfonso, Lucia Cicchillitti, Filippo Schepis, Antonio Riccio, Anthony T. Yeung, Yoshihiro Matsumoto, Erica A. Golemis, Maurizio Genuardi, and Giovanni Neri. 1999. "MED1, a Novel Human Methyl-CpG-Binding Endonuclease, Interacts with DNA Mismatch Repair Protein MLH1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3969–74. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.7.3969>.
- Bensen, Robert J., and Huber R. Warner. 1987. "The Partial Purification and Characterization of Nuclear and Mitochondrial Uracil-DNA Glycosylase Activities from

- Zea Mays Seedlings.” *Plant Physiology* 83 (1): 149–54.  
<https://doi.org/10.1104/PP.83.1.149>.
- Berger, SL. 2007. “The Complex Language of Chromatin Regulation during Transcription.” *Nature* 447 (7143): 407–12. <https://doi.org/10.1038/NATURE05915>.
- Blaisdell, J. O., and S. S. Wallace. 2001. “Abortive Base-Excision Repair of Radiation-Induced Clustered DNA Lesions in Escherichia Coli.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7426–30. <https://doi.org/10.1073/PNAS.131077798>.
- Blaisdell, JO, L Harrison, and SS Wallace. 2001. “Base Excision Repair Processing of Radiation-Induced Clustered DNA Lesions.” *Radiation Protection Dosimetry* 97 (1): 25–31. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.RPD.A006634>.
- Boesch, Pierre, Noha Ibrahim, François Paulus, Anne Cosset, Vladislav Tarasenko, and André Dietrich. 2009. “Plant Mitochondria Possess a Short-Patch Base Excision DNA Repair Pathway.” *Nucleic Acids Research* 37 (17): 5690–5700. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP606>.
- Bonato, Diego, Martin Brendel, João Antonio Pêgas Henriques, Diego Bonatto, Martin Brendel, and João Antonio Pêgas Henriques. 2005. “A New Group of Plant-Specific ATP-Dependent DNA Ligases Identified by Protein Phylogeny, Hydrophobic Cluster Analysis and 3-Dimensional Modelling.” *Functional Plant Biology* 32 (2): 161–74. <https://doi.org/10.1071/FP04143>.
- Braithwaite, Elena K., Padmini S. Kedar, Deborah J. Stumpo, Barbara Bertocci, Jonathan H. Freedman, Leona D. Samson, and Samuel H. Wilson. 2010. “DNA Polymerases  $\beta$  and  $\lambda$  Mediate Overlapping and Independent Roles in Base Excision Repair in Mouse Embryonic Fibroblasts.” *PLOS ONE* 5 (8): e12229. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0012229>.
- Bräutigam, Katharina, and Quentin Cronk. 2018. “DNA Methylation and the Evolution of Developmental Complexity in Plants.” *Frontiers in Plant Science* 0 (October): 1447. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01447>.
- Brooks, SC, Adhikary S, Rubinson EH, and Eichman BF. 2013. “Recent Advances in the Structural Mechanisms of DNA Glycosylases.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1834 (1): 247–71. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2012.10.005>.
- Brown, WM, M George, and AC Wilson. 1979. “Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (4): 1967–71. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.4.1967>.
- Buer, CS, and GK Muday. 2004. “The Transparent Testa4 Mutation Prevents Flavonoid Synthesis and Alters Auxin Transport and the Response of Arabidopsis Roots to

- Gravity and Light.” *The Plant Cell* 16 (5): 1191–1205. <https://doi.org/10.1105/TPC.020313>.
- Caldecott, Keith W. 2001. “Mammalian DNA Single-Strand Break Repair: An X-Ra(y)Ted Affair.” *BioEssays* 23 (5): 447–55. <https://doi.org/10.1002/BIES.1063>.
- Canela, A, Y Maman, S Jung, N Wong, E Callen, A Day, KR Kieffer-Kwon, et al. 2017. “Genome Organization Drives Chromosome Fragility.” *Cell* 170 (3): 507-521.e18. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.06.034>.
- Canela, Andrés, Sriram Sridharan, Nicholas Sciascia, Anthony Tubbs, Paul Meltzer, Barry P. Sleckman, and André Nussenzweig. 2016. “DNA Breaks and End Resection Measured Genome-Wide by End Sequencing.” *Molecular Cell* 63 (5): 898–911. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.06.034>.
- Canturk, F, M Karaman, CP Selby, MG Kemp, G Kulaksiz-Erkmen, J Hu, W Li, LA Lindsey-Boltz, and A Sancar. 2016. “Nucleotide Excision Repair by Dual Incisions in Plants.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (17): 4706–10. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1604097113>.
- Cappelli, Enrico, Richard Taylor, Michela Cevasco, Angelo Abbondandolo, Keith Caldecott, and Guido Frosina. 1997. “Involvement of XRCC1 and DNA Ligase III Gene Products in DNA Base Excision Repair \*.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23970–75. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.38.23970>.
- Cecchini, Nicolas Miguel, José Roberto Torres, Ignacio Lescano López, Santiago Cobo, Florencia Nota and Maria Elena Alvarez. 2022. “Alternative splicing of an exon determines the subnuclear localization of the Arabidopsis DNA-glycosylase MBD4L under heat stress” *The Plant Journal* (0) <https://doi.org/10.1111/tpj.15675>
- Chan, E, and B Weiss. 1987. “Endonuclease IV of Escherichia Coli Is Induced by Paraquat.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (10): 3189–93. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.10.3189>. Chen, M, M Herde, and CP Witte. 2016. “Of the Nine Cytidine Deaminase-Like Genes in Arabidopsis, Eight Are Pseudogenes and Only One Is Required to Maintain Pyrimidine Homeostasis in Vivo.” *Plant Physiology* 171 (2): 799–809. <https://doi.org/10.1104/PP.15.02031>.
- Choi, Seung Hee, Tae Ho Ryu, Jeong-Il Kim, Sungbeom Lee, Seung Sik Lee, and Jin-Hong Kim. 2019. “Mutation in DDM1 Inhibits the Homology Directed Repair of Double Strand Breaks.” *PLOS ONE* 14 (2): e0211878. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0211878>.
- Christensen, Alan C. 2014. “Genes and Junk in Plant Mitochondria Repair Mechanisms and Selection.” *Genome Biology and Evolution* 6 (6): 1448–53. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVU115>.

- Christensen, A. C. 2018. "Mitochondrial DNA Repair and Genome Evolution." *Annual Plant Reviews Online*, April, 11–32. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.APR0544>.
- Cloix, C, S Tutois, O Mathieu, C Cuvillier, Espagnol. MC, G Picard, and S Tourmente. 2000. "Analysis of 5S rDNA Arrays in Arabidopsis Thaliana: Physical Mapping and Chromosome-Specific Polymorphisms." *Genome Research* 10 (5): 679–90. <https://doi.org/10.1101/GR.10.5.679>.
- Cloix, Catherine, Sylvie Tutois, Yasushi Yukawa, Olivier Mathieu, Claudine Cuvillier, Marie-Claude Espagnol, Georges Picard, and Sylvette Tourmente. 2002. "Analysis of the 5S RNA Pool in Arabidopsis Thaliana: RNAs Are Heterogeneous and Only Two of the Genomic 5S Loci Produce Mature 5S RNA." *Genome Research* 12 (1): 132–44. <https://doi.org/10.1101/GR.181301>.
- Coey, CT, and AC Drohat. 2017. "Kinetic Methods for Studying DNA Glycosylases Functioning in Base Excision Repair." *Methods in Enzymology* 592: 357–76. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2017.03.016>.
- Cokus, Shawn J., Suhua Feng, Xiaoyu Zhang, Zugen Chen, Barry Merriman, Christian D. Haudenschild, Sriharsa Pradhan, Stanley F. Nelson, Matteo Pellegrini, and Steven E. Jacobsen. 2008. "Shotgun Bisulfite Sequencing of the Arabidopsis Genome Reveals DNA Methylation Patterning." *Nature* 452 (7184): 215. <https://doi.org/10.1038/NATURE06745>.
- Córdoba-Cañero, Dolores, Emeline Dubois, Rafael R. Ariza, Marie-Pascale Doutriaux, and Teresa Roldán-Arjona. 2010. "Arabidopsis Uracil DNA Glycosylase (UNG) Is Required for Base Excision Repair of Uracil and Increases Plant Sensitivity to 5-Fluorouracil \*." *Journal of Biological Chemistry* 285 (10): 7475–83. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.067173>.
- Córdoba-Cañero, Dolores, Teresa Roldán-Arjona, and Rafael R. Ariza. 2011. "Arabidopsis ARP Endonuclease Functions in a Branched Base Excision DNA Repair Pathway Completed by LIG1." *The Plant Journal* 68 (4): 693–702. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04720.X>.
- Córdoba-Cañero, Dolores, Teresa Roldán-Arjona, and Rafael R. Ariza. 2014. "Arabidopsis ZDP DNA 3'-Phosphatase and ARP Endonuclease Function in 8-OxoG Repair Initiated by FPG and OGG1 DNA Glycosylases." *The Plant Journal* 79 (5): 824–34. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12588>.
- Cortellino, Salvatore, Jinfei Xu, Mara Sannai, Robert Moore, Elena Caretti, Antonio Cigliano, Madeleine Le Coz, et al. 2011. "Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair." *Cell* 146 (1): 67–79. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.06.020>.

- Crosetto, Nicola, Abhishek Mitra, Maria Joao Silva, Magda Bienko, Norbert Dojer, Qi Wang, Elif Karaca, et al. 2013. "Nucleotide-Resolution DNA Double-Strand Break Mapping by next-Generation Sequencing." *Nature Methods* 10 (4): 361–65. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2408>.
- Culligan, K, A Tissier, and A Britt. 2004. "ATR Regulates a G2-Phase Cell-Cycle Checkpoint in *Arabidopsis Thaliana*." *The Plant Cell* 16 (5): 1091–1104. <https://doi.org/10.1105/TPC.018903>.
- Culligan, Kevin M., and John B. Hays. 2000. "Arabidopsis MutS Homologs—AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a Novel AtMSH7—Form Three Distinct Protein Heterodimers with Different Specificities for Mismatched DNA." *The Plant Cell* 12 (6): 991. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.6.991>.
- Dalhus, Bjørn, Jon K. Laerdahl, Paul H. Backe, and Magnar Bjørås. 2009. "DNA Base Repair – Recognition and Initiation of Catalysis." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (6): 1044–78. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2009.00188.X>.
- Delledonne, M, Y Xia, RA Dixon, and C Lamb. 1998. "Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance." *Nature* 394 (6693): 585–88. <https://doi.org/10.1038/29087>.
- Demple, Bruce, and Jung Suk Sung. 2005. "Molecular and Biological Roles of Ape1 Protein in Mammalian Base Excision Repair." *DNA Repair* 4 (12): 1442–49. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2005.09.004>.
- Dextraze, Marie Eve, Tsvetan Gantchev, Sonia Girouard, and Darel Hunting. 2010. "DNA Interstrand Cross-Links Induced by Ionizing Radiation: An Unsung Lesion." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704 (1–3): 101–7. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2009.12.007>.
- Dianov, G, A Price, and T Lindahl. 1992. "Generation of Single-Nucleotide Repair Patches Following Excision of Uracil Residues from DNA." *Molecular and Cellular Biology* 12 (4): 1605–12. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.4.1605-1612.1992>.
- Dianov, GL, and U Hübscher. 2013. "Mammalian Base Excision Repair: The Forgotten Archangel." *Nucleic Acids Research* 41 (6): 3483–90. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT076>.
- Di Rienzo, J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M and Robledo C. "InfoStat versión 2011". *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. <http://www.infostat.com.ar>.
- Doherty, Aidan J., Louise C. Serpell, and Christopher P. Ponting. 1996. "The Helix-Hairpin-Helix DNA-Binding Motif: A Structural Basis for Non-Sequence-Specific Recognition of DNA." *Nucleic Acids Research* 24 (13): 2488–97. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.13.2488>.



- Donà, M, and O Mittelsten Scheid. 2015. "DNA Damage Repair in the Context of Plant Chromatin." *Plant Physiology* 168 (4): 1206–18. <https://doi.org/10.1104/PP.15.00538>.
- Drouin, Guy, Hanane Daoud, and Junnan Xia. 2008. "Relative Rates of Synonymous Substitutions in the Mitochondrial, Chloroplast and Nuclear Genomes of Seed Plants." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (3): 827–31. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2008.09.009>.
- Durut, Nathalie, Mohamed Abou-Ellail, Frédéric Pontvianne, Sadhan Das, Hisae Kojima, Seiko Ukai, Anne de Bures, et al. 2014. "A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S RDNA in Arabidopsis." *The Plant Cell* 26 (3): 1330–44. <https://doi.org/10.1105/TPC.114.123893>.
- Eccles, Laura J., Peter O'Neill, and Martine E. Lomax. 2011. "Delayed Repair of Radiation Induced Clustered DNA Damage: Friend or Foe?" *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711 (1–2): 134–41. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2010.11.003>.
- Feng, Wei, Christopher J. Hale, Ryan S. Over, Shawn J. Cokus, Steven E. Jacobsen, and Scott D. Michaels. 2017. "Large-Scale Heterochromatin Remodeling Linked to Overreplication-Associated DNA Damage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (2): 406–11. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1619774114>.
- Ferrando, Beatriz, Ana L.D.M. Furlanetto, Ricardo Gredilla, Jesper F. Havelund, Kim H. Hebelstrup, Ian M. Møller, and Tinna Stevnsner. 2019. "DNA Repair in Plant Mitochondria a Complete Base Excision Repair Pathway in Potato Tuber Mitochondria." *Physiologia Plantarum* 166 (2): 494–512. <https://doi.org/10.1111/PPL.12801>.
- Filipescu, D, E Szenker, and G Almouzni. 2013. "Developmental Roles of Histone H3 Variants and Their Chaperones." *Trends in Genetics: TIG* 29 (11): 630–40. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2013.06.002>.
- Fortini, Paola, and Eugenia Dogliotti. 2007. "Base Damage and Single-Strand Break Repair: Mechanisms and Functional Significance of Short- and Long-Patch Repair Subpathways." *DNA Repair* 6 (4): 398–409. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2006.10.008>.
- Fransz, P, S Armstrong, C Alonso-Blanco, TC Fischer, RA Torres-Ruiz, and G Jones. 1998. "Cytogenetics for the Model System Arabidopsis Thaliana." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 13 (6): 867–76. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00086.X>.
- Fransz, P, W Soppe, and I Schubert. 2003. "Heterochromatin in Interphase Nuclei of Arabidopsis Thaliana." *Chromosome Research: An International Journal on the*

- Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 11 (3): 227–40. <https://doi.org/10.1023/A:1022835825899>.
- Fransz, Paul, J. Hans de Jong, Martin Lysak, Monica Ruffini Castiglione, and Ingo Schubert. 2002. “Interphase Chromosomes in Arabidopsis Are Organized as Well Defined Chromocenters from Which Euchromatin Loops Emanate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (22): 14584–89. <https://doi.org/10.1073/PNAS.212325299>.
- Friesner, JD, B Liu, K Culligan, and AB Britt. 2005. “Ionizing Radiation-Dependent Gamma-H2AX Focus Formation Requires Ataxia Telangiectasia Mutated and Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-Related.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (5): 2566–76. <https://doi.org/10.1091/MBC.E04-10-0890>.
- Fulcher, Nick, and Robert Sablowski. 2009. “Hypersensitivity to DNA Damage in Plant Stem Cell Niches.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (49): 20984–88. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909218106>.
- Furlanetto, Ana L. D. M., Silvia M. S. C. Cadena, Glauca R. Martinez, Beatriz Ferrando, Tinna Stevnsner, and Ian M. Møller. 2019. “Short-Term High Temperature Treatment Reduces Viability and Inhibits Respiration and DNA Repair Enzymes in Araucaria Angustifolia Cells.” *Physiologia Plantarum* 166 (2): 513–24. <https://doi.org/10.1111/PPL.12793>.
- Furukawa, T, MJ Curtis, CM Tominey, YH Duong, BW Wilcox, D Aggoune, JB Hays, and AB Britt. 2010. “A Shared DNA-Damage-Response Pathway for Induction of Stem-Cell Death by UVB and by Gamma Irradiation.” *DNA Repair* 9 (9): 940–48. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2010.06.006>.
- García-Díaz, Miguel, Orlando Domínguez, Luis A. López-Fernández, Laín Teresa De Lera, María L. Saniger, José F. Ruiz, Mario Párraga, et al. 2000. “DNA Polymerase Lambda (Pol  $\lambda$ ), a Novel Eukaryotic DNA Polymerase with a Potential Role in Meiosis.” *Journal of Molecular Biology* 301 (4): 851–67. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4005>.
- García-Ortiz, Maria-Victoria, Rafael R. Ariza, and Teresa Roldán-Arjona. 2001. “An OGG1 Orthologue Encoding a Functional 8-Oxoguanine DNA Glycosylase/Lyase in Arabidopsis Thaliana.” *Plant Molecular Biology* 2001 47:6 47 (6): 795–804. <https://doi.org/10.1023/A:1013644026132>.
- Garcia, V, H Bruchet, D Camescasse, F Granier, D Bouchez, and A Tissier. 2003. “AtATM Is Essential for Meiosis and the Somatic Response to DNA Damage in Plants.” *The Plant Cell* 15 (1): 119–32. <https://doi.org/10.1105/TPC.006577>.
- Gent, Jonathan I., and R. Kelly Dawe. 2012. “RNA as a Structural and Regulatory Component of the Centromere.” [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Genet-110711-155419](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Genet-110711-155419) 46 (November): 443–53. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-110711-155419>

155419.

- Gong, Zhizhong, Teresa Morales-Ruiz, Rafael R. Ariza, Teresa Roldán-Arjona, Lisa David, and Jian-Kang Zhu. 2002. "ROS1, a Repressor of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis, Encodes a DNA Glycosylase/Lyase." *Cell* 111 (6): 803–14. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01133-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01133-9).
- Gualberto, José M., and Kathleen J. Newton. 2017. "Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation." <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112232> 68 (April): 225–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112232>.
- Hadi, MZ, DM Wilson III - Environmental and molecular, and undefined 2000. n.d. "Second Human Protein with Homology to the Escherichia Coli Abasic Endonuclease Exonuclease III." *Wiley Online Library*. Accessed September 17, 2021. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1098-2280\(2000\)36:4%3C312::AID-EM7%3E3.0.CO;2-K](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1098-2280(2000)36:4%3C312::AID-EM7%3E3.0.CO;2-K).
- Happel, N, and D Doenecke. 2009. "Histone H1 and Its Isoforms: Contribution to Chromatin Structure and Function." *Gene* 431 (1–2): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003>.
- Hauer, MH, and SM Gasser. 2017. "Chromatin and Nucleosome Dynamics in DNA Damage and Repair." *Genes & Development* 31 (22): 2204–21. <https://doi.org/10.1101/GAD.307702.117>.
- He, Xin-Jian, Taiping Chen, and Jian-Kang Zhu. 2011. "Regulation and Function of DNA Methylation in Plants and Animals." *Cell Research* 21:3 21 (3): 442–65. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.23>.
- Heitz, E. 1928. "Das Heterochromatin Der Moose." *Jahrb. Wiss. Bot.* 69. 1928. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?author=E.+Heitz&publication\\_year=1928&title=Das+Heterochromatin+der+Moose&journal=Jahrb.+Wiss.+Bot.&volume=69&pages=762-818](https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=E.+Heitz&publication_year=1928&title=Das+Heterochromatin+der+Moose&journal=Jahrb.+Wiss.+Bot.&volume=69&pages=762-818).
- Henderson, IR, and SE Jacobsen. 2007. "Epigenetic Inheritance in Plants." *Nature* 447 (7143): 418–24. <https://doi.org/10.1038/NATURE05917>.
- Henderson, JP, J Byun, J Takeshita, and JW Heinecke. 2003. "Phagocytes Produce 5-Chlorouracil and 5-Bromouracil, Two Mutagenic Products of Myeloperoxidase, in Human Inflammatory Tissue." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23522–28. <https://doi.org/10.1074/JBC.M303928200>.
- Hendrich, Brian, Ulrike Hardeland, Huck-Hui Ng, Josef Jiricny, and Adrian Bird. 1999. "The Thymine Glycosylase MBD4 Can Bind to the Product of Deamination at Methylated CpG Sites." *Nature* 1999 401:6750 401 (6750): 301–4. <https://doi.org/10.1038/45843>.

- Hendrix, Sophie, Verena Iven, Thomas Eekhout, Michiel Huybrechts, Ingeborg Pecqueur, Nele Horemans, Els Keunen, Lieven De Veylder, Jaco Vangronsveld, and Ann Cuypers. 2020. "Suppressor of Gamma Response 1 Modulates the DNA Damage Response and Oxidative Stress Response in Leaves of Cadmium-Exposed *Arabidopsis Thaliana*." *Frontiers in Plant Science* 0 (April): 366. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00366>.
- Hitomi, Kenichi, Andrew S. Arvai, Junpei Yamamoto, Chiharu Hitomi, Mika Teranishi, Tokuhisa Hirouchi, Kazuo Yamamoto, et al. 2012. "Eukaryotic Class II Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase Structure Reveals Basis for Improved Ultraviolet Tolerance in Plants." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (15): 12060. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.244020>.
- Horst, J. P., and H. J. Fritz. 1996. "Counteracting the Mutagenic Effect of Hydrolytic Deamination of DNA 5-Methylcytosine Residues at High Temperature: DNA Mismatch N-Glycosylase Mig.Mth of the Thermophilic Archaeon *Methanobacterium Thermoautotrophicum THF*." *The EMBO Journal* 15 (19): 5459–69. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00929.X>.
- Hu, Z, T Cools, and L De Veylder. 2016. "Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage." *Annual Review of Plant Biology* 67 (April): 439–62. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-043015-111902>.
- Huffman, Joy L., Ottar Sundheim, and John A. Tainer. 2005. "DNA Base Damage Recognition and Removal: New Twists and Grooves." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577 (1–2): 55–76. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2005.03.012>.
- Ito, S, L Shen, Q Dai, SC Wu, LB Collins, JA Swenberg, C He, and Y Zhang. 2011. "Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine." *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1210597>.
- Jackson, Stephen P., and Jiri Bartek. 2009. "The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease." *Nature* 2009 461:7267 461 (7267): 1071–78. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- Jacobs, Angelika L., and Primo Schär. 2011. "DNA Glycosylases: In DNA Repair and Beyond." *Chromosoma* 2011 121:1 121 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1007/S00412-011-0347-4>.
- Jäger, Natalie, Matthias Schlesner, David T.W. Jones, Simon Raffel, Jan Philipp Mallm, Kristin M. Junge, Dieter Weichenhan, et al. 2013. "XHypermutation of the Inactive X Chromosome Is a Frequent Event in Cancer." *Cell* 155 (3): 567.

- <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.09.042>.
- Jiang, Yingjun, Xin Wang, Shilai Bao, Ruifeng Guo, David G. Johnson, Xuotong Shen, and Lei Li. 2010. "INO80 Chromatin Remodeling Complex Promotes the Removal of UV Lesions by the Nucleotide Excision Repair Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (40): 17274–79. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1008388107>.
- Johmura, Y, and M Nakanishi. 2016. "Multiple Facets of P53 in Senescence Induction and Maintenance." *Cancer Science* 107 (11): 1550–55. <https://doi.org/10.1111/CAS.13060>.
- Karol, M. H., and M. V. Simpson. 1968. "DNA Biosynthesis by Isolated Mitochondria: A Replicative Rather than a Repair Process." *Science* 162 (852): 470–73. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.162.3852.470>.
- Kate M. Sleeth, ‡,§, § and Robert L. Robson, and ‡ Grigory L. Dianov\*. 2004. "Exchangeability of Mammalian DNA Ligases between Base Excision Repair Pathways." *Biochemistry* 43 (40): 12924–30. <https://doi.org/10.1021/BI0492612>.
- Kim, JH. 2019. "Chromatin Remodeling and Epigenetic Regulation in Plant DNA Damage Repair." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (17). <https://doi.org/10.3390/IJMS20174093>.
- Kouzarides, T. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4): 693–705. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.02.005>.
- Krokan, Hans E., and Magnar Bjørås. 2013. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): 1–22. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012583>.
- Krokan, Hans E., Rune Standal, and Geir Slupphaug. 1997. "DNA Glycosylases in the Base Excision Repair of DNA." *Biochemical Journal* 325 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1042/BJ3250001>.
- Krokan, HE, and M Bjørås. 2013. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): 1–22. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A012583>.
- Kumekawa, Norikazu, Tsutomu Hosouchi, Hisano Tsuruoka, and Hirokazu Kotani. 2000. "The Size and Sequence Organization of the Centromeric Region of Arabidopsis Thaliana Chromosome 5." *DNA Research* 7 (6): 315–21. <https://doi.org/10.1093/DNARES/7.6.315>.
- Kumekawa, Norikazu, Tsutomu Hosouchi, Hisano Tsuruoka, and Hirokazu Kotani. 2001. "The Size and Sequence Organization of the Centromeric Region of Arabidopsis Thaliana Chromosome 4." *DNA Research* 8 (6): 285–90. <https://doi.org/10.1093/DNARES/8.6.285>.
- Lamb, C, and RA Dixon. 1997. "THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–75. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.48.1.251>.

- Lamers, Meindert H., Herrie H.K. Winterwerp, and Titia K. Sixma. 2003. "The Alternating ATPase Domains of MutS Control DNA Mismatch Repair." *The EMBO Journal* 22 (3): 746. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG064>.
- Lang-Mladek, C, O Popova, K Kiok, M Berlinger, B Rakic, W Aufsatz, Jonak C, Hauser MT, and Luschnig C. 2010. "Transgenerational Inheritance and Resetting of Stress-Induced Loss of Epigenetic Gene Silencing in Arabidopsis." *Molecular Plant* 3 (3): 594–602. <https://doi.org/10.1093/MP/SSQ014>.
- Lans, H, JA Marteijn, and W Vermeulen. 2012. "ATP-Dependent Chromatin Remodeling in the DNA-Damage Response." *Epigenetics & Chromatin* 5 (1). <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-4>.
- Law, Julie A., and Steven E. Jacobsen. 2010. "Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals." *Nature Reviews Genetics* 2010 11:3 11 (3): 204–20. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>.
- Lee, GE, JH Kim, M Taylor, and MT Muller. 2010. "DNA Methyltransferase 1-Associated Protein (DMAP1) Is a Co-Repressor That Stimulates DNA Methylation Globally and Locally at Sites of Double Strand Break Repair." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (48): 37630–40. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.148536>.
- Lee, Jiyeon, Hosung Jang, Hosub Shin, Woo Lee Choi, Young Geun Mok, and Jin Hoe Huh. 2014. "AP Endonucleases Process 5-Methylcytosine Excision Intermediates during Active DNA Demethylation in Arabidopsis." *Nucleic Acids Research* 42 (18): 11408–18. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU834>.
- Lensing, Stefanie V., Giovanni Marsico, Robert Hänsel-Hertsch, Enid Y. Lam, David Tannahill, and Shankar Balasubramanian. 2016. "DSBCapture: In Situ Capture and Sequencing of DNA Breaks." *Nature Methods* 13 (10): 855–57. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3960>.
- Levin, Joshua D., and Bruce Demple. 1990. "Analysis of Class II (Hydrolytic) and Class I ( $\beta$ -Lyase) Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases with a Synthetic DNA Substrate." *Nucleic Acids Research* 18 (17): 5069–75. <https://doi.org/10.1093/NAR/18.17.5069>.
- Li, GM. 2008. "Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair." *Cell Research* 18 (1): 85–98. <https://doi.org/10.1038/CR.2007.115>.
- Li, Jinchao, Wenjie Liang, Yan Li, and Weiqiang Qian. 2018. "APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE2 and ZINC FINGER DNA 3'-PHOSPHOESTERASE Play Overlapping Roles in the Maintenance of Epigenome and Genome Stability." *The Plant Cell* 30 (9): 1954–70. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00287>.
- Li, Yan, Dolores Córdoba-Cañero, Weiqiang Qian, Xiaohong Zhu, Kai Tang, Huiming Zhang, Rafael R. Ariza, Teresa Roldán-Arjona, and Jian-Kang Zhu. 2015. "An AP

- Endonuclease Functions in Active DNA Demethylation and Gene Imprinting in Arabidopsis.” *PLOS Genetics* 11 (1): e1004905. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004905>.
- Lindahl, T. 1979. “DNA Glycosylases, Endonucleases for Apurinic/Apyrimidinic Sites, and Base Excision-Repair.” *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 22 (C): 135–92. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60800-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60800-4).
- Lindahl, Tomas. 1993. “Instability and Decay of the Primary Structure of DNA.” *Nature* 1993 362:6422 362 (6422): 709–15. <https://doi.org/10.1038/362709a0>.
- Liu, Baohua, Raymond KH Yip, and Zhongjun Zhou. 2012. “Chromatin Remodeling, DNA Damage Repair and Aging.” *Current Genomics* 13 (7): 533. <https://doi.org/10.2174/138920212803251373>.
- Liu, P, and B Demple. 2010. “DNA Repair in Mammalian Mitochondria: Much More than We Thought?” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51 (5): 417–26. <https://doi.org/10.1002/EM.20576>.
- Liu, Yue, Tian Tian, Kang Zhang, Qi You, Hengyu Yan, Nannan Zhao, Xin Yi, Wenying Xu, and Zhen Su. 2018. “PCSD: A Plant Chromatin State Database.” *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D1157–67. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX919>.
- Loeb, Lawrence A. 1985. “Apurinic Sites as Mutagenic Intermediates.” *Cell* 40 (3): 483–84. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90191-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90191-6).
- Maiti, Atanu, and Alexander C. Drohat. 2011. “Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES \*.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35334–38. <https://doi.org/10.1074/JBC.C111.284620>.
- Manova, V, and D Gruszka. 2015. “DNA Damage and Repair in Plants - from Models to Crops.” *Frontiers in Plant Science* 6 (OCTOBER). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00885>.
- Manvilla, BA, A Maiti, MC Begley, EA Toth, and AC Drohat. 2012. “Crystal Structure of Human Methyl-Binding Domain IV Glycosylase Bound to Abasic DNA.” *Journal of Molecular Biology* 420 (3): 164–75. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2012.04.028>.
- Marquez, Y, M Höpfler, Z Ayatollahi, A Barta, and M Kalyna. 2015. “Unmasking Alternative Splicing inside Protein-Coding Exons Defines Exitrons and Their Role in Proteome Plasticity.” *Genome Research* 25 (7): 995–1007. <https://doi.org/10.1101/GR.186585.114>.
- Martínez-Macías, María Isabel, Weiqiang Qian, Daisuke Miki, Olga Pontes, Yunhua Liu, Kai Tang, Renyi Liu, et al. 2012. “A DNA 3’ Phosphatase Functions in Active DNA Demethylation in Arabidopsis.” *Molecular Cell* 45 (3): 357–70.

- <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.11.034>.
- Maul, MJ, TR Barends, AF Glas, MJ Cryle, T Domratcheva, S Schneider, I Schlichting, and T Carell. 2008. "Crystal Structure and Mechanism of a DNA (6-4) Photolyase." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 47 (52): 10076–80. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200804268>.
- Menoni, H, D Gasparutto, A Hamiche, J Cadet, S Dimitrov, P Bouvet, and D Angelov. 2007. "ATP-Dependent Chromatin Remodeling Is Required for Base Excision Repair in Conventional but Not in Variant H2A.Bbd Nucleosomes." *Molecular and Cellular Biology* 27 (17): 5949–56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00376-07>.
- Menoni, Hervé, Paolo Di Mascio, Jean Cadet, Stefan Dimitrov, and Dimitar Angelov. 2017. "Chromatin Associated Mechanisms in Base Excision Repair - Nucleosome Remodeling and DNA Transcription, Two Key Players." *Free Radical Biology and Medicine* 107 (June): 159–69. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.12.026>.
- Mullins, Elwood A., Rongxin Shi, Lyle A. Kotsch, and Brandt F. Eichman. 2015. "A New Family of HEAT-Like Repeat Proteins Lacking a Critical Substrate Recognition Motif Present in Related DNA Glycosylases." *PLOS ONE* 10 (5): e0127733. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127733>.
- Murphy, Terence M., Mark Belmonte, Stephanie Shu, Anne B. Britt, and James Hatteroth. 2009. "Requirement for Abasic Endonuclease Gene Homologues in Arabidopsis Seed Development." *PLOS ONE* 4 (1): e4297. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0004297>.
- Nabel, CS, H Jia, Y Ye, L Shen, HL Goldschmidt, JT Stivers, Y Zhang, and RM Kohli. 2012. "AID/APOBEC Deaminases Disfavor Modified Cytosines Implicated in DNA Demethylation." *Nature Chemical Biology* 8 (9): 751–58. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.1042>.
- Nagaki, Kiyotaka, Paul B Talbert, Cathy Xiaoyan Zhong, R Kelly Dawe, Steven Henikoff, and Jiming Jiang. 2003. "Chromatin Immunoprecipitation Reveals That the 180-Bp Satellite Repeat Is the Key Functional DNA Element of Arabidopsis Thaliana Centromeres." *Genetics* 163 (3): 1221. [/pmc/articles/PMC1462492/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1462492/).
- Nikitaki, Z, M Holá, M Donà, A Pavlopoulou, I Michalopoulos, KJ Angelis, AG Georgakilas, A Macovei, and A Balestrazzi. 2018. "Integrating Plant and Animal Biology for the Search of Novel DNA Damage Biomarkers." *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 775 (January): 21–38. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2018.01.001>.
- Nilsen, H, M Otterlei, T Haug, K Solum, TA Nagelhus, F Skorpen, and HE Krokan. 1997. "Nuclear and Mitochondrial Uracil-DNA Glycosylases Are Generated by Alternative



- Splicing and Transcription from Different Positions in the UNG Gene.” *Nucleic Acids Research* 25 (4): 750–55. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.4.750>.
- Nimeth, Barbara Anna, Stefan Riegler, and Maria Kalyna. 2020. “Alternative Splicing and DNA Damage Response in Plants.” *Frontiers in Plant Science* 0 (February): 91. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00091>.
- Nisa, Maher-Un, Ying Huang, Moussa Benhamed, and Cécile Raynaud. 2019. “The Plant DNA Damage Response: Signaling Pathways Leading to Growth Inhibition and Putative Role in Response to Stress Conditions.” *Frontiers in Plant Science* 0 (April): 653. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00653>.
- Nota, Florencia, Damián A. Cambiagno, Pamela Ribone, and María E. Alvarez. 2015. “Expression and Function of AtMBD4L, the Single Gene Encoding the Nuclear DNA Glycosylase MBD4L in Arabidopsis.” *Plant Science* 235 (June): 122–29. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2015.03.011>.
- Nota, María Florencia. 2014. “Caracterización Molecular y Funcional Del Gen *AtMBD4L*, Codificante de Una Nueva DNA Glicosilasa de Arabidopsis Thaliana.” <https://drive.google.com/drive/priority>.
- Odell, ID, SS Wallace, and DS Pederson. 2013. “Rules of Engagement for Base Excision Repair in Chromatin.” *Journal of Cellular Physiology* 228 (2): 258–66. <https://doi.org/10.1002/JCP.24134>.
- Ogita, N, Y Okushima, M Tokizawa, YY Yamamoto, M Tanaka, M Seki, Y Makita, et al. 2018. “Identifying the Target Genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a Master Transcription Factor Controlling DNA Damage Response in Arabidopsis.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 94 (3): 439–53. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13866>.
- Olive, PL, and JP Banáth. 2006. “The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells.” *Nature Protocols* 1 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.5>.
- Ortega-Galisteo, AP, T Morales-Ruiz, RR Ariza, and T Roldán-Arjona. 2008. “Arabidopsis DEMETER-LIKE Proteins DML2 and DML3 Are Required for Appropriate Distribution of DNA Methylation Marks.” *Plant Molecular Biology* 67 (6): 671–81. <https://doi.org/10.1007/S11103-008-9346-0>.
- Osakabe, Keishi, Kiyomi Abe, Toji Yoshioka, Yuriko Osakabe, Setsuko Todoriki, Hiroaki Ichikawa, Barbara Hohn, and Seiichi Toki. 2006. “Isolation and Characterization of the RAD54 Gene from Arabidopsis Thaliana.” *The Plant Journal* 48 (6): 827–42. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02927.X>.
- Pavet, Valeria, Cristián Quintero, Nicolás M Cecchini, Alberto L Rosa, and María E Alvarez. 2006. “Arabidopsis Displays Centromeric DNA Hypomethylation and Cytological

- Alterations of Heterochromatin Upon Attack by *Pseudomonas Syringae*." / *577 MPMI* 19 (6): 577–87. <https://doi.org/10.1094/MPMI>.
- Pecinka, Ales, Huy Q. Dinh, Tuncay Baubec, Marisa Rosa, Nicole Lettner, and Ortrun Mittelsten Scheid. 2010. "Epigenetic Regulation of Repetitive Elements Is Attenuated by Prolonged Heat Stress in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 22 (9): 3118–29. <https://doi.org/10.1105/TPC.110.078493>.
- Petronzelli, F, A Riccio, GD Markham - Journal of cellular, and undefined 2000. n.d. "Investigation of the Substrate Spectrum of the Human Mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): Fundamental Role of the Catalytic Domain." *Wiley Online Library*. Accessed September 17, 2021. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4652\(200012\)185:3%3C473::AID-JCP19%3E3.0.CO;2-%23](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-4652(200012)185:3%3C473::AID-JCP19%3E3.0.CO;2-%23).
- Petronzelli, Fiorella, Antonio Riccio, George D. Markham, Steven H. Seeholzer, Jay Stoerker, Maurizio Genuardi, Anthony T. Yeung, Yoshihiro Matsumoto, and Alfonso Bellacosa. 2000. "Biphasic Kinetics of the Human DNA Repair Protein MED1 (MBD4), a Mismatch-Specific DNA N-Glycosylase \*." *Journal of Biological Chemistry* 275 (42): 32422–29. <https://doi.org/10.1074/JBC.M004535200>.
- Plohl, M, N Meštrović, and B Mravinac. 2014. "Centromere Identity from the DNA Point of View." *Chromosoma* 123 (4): 313–25. <https://doi.org/10.1007/S00412-014-0462-0>.
- Pogány, Miklós, Uta von Rad, Sebastian Grün, Anita Dongó, Alexandra Pintye, Philippe Simoneau, Günther Bahnweg, Levente Kiss, Balázs Barna, and Jörg Durner. 2009. "Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an *Arabidopsis*-*Alternaria* Pathosystem." *Plant Physiology* 151 (3): 1459. <https://doi.org/10.1104/PP.109.141994>.
- Pontvianne, Frederic, Isabel Matía, Julien Douet, Sylvette Tourmente, Francisco J. Medina, Manuel Echeverria, and Julio Sáez-Vásquez. 2007. "Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in *Arabidopsis*." *Molecular Biology of the Cell* 18 (2): 369–79. <https://doi.org/10.1091/MBC.E06-08-0751>.
- Prakash, Rohit, Yu Zhang, Weiran Feng, and Maria Jasin. 2015. "Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (4): a016600. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016600>.
- Price, BD, and AD D'Andrea. 2013. "Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks." *Cell* 152 (6): 1344–54. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.02.011>.
- Puchta, Holger. 2005. "The Repair of Double-Strand Breaks in Plants: Mechanisms and

- Consequences for Genome Evolution.” *Journal of Experimental Botany* 56 (409): 1–14. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERI025>.
- Puizina, Jasna, Jiri Siroky, Petr Mokros, Dieter Schweizer, and Karel Riha. 2004. “Mre11 Deficiency in Arabidopsis Is Associated with Chromosomal Instability in Somatic Cells and Spo11-Dependent Genome Fragmentation during Meiosis.” *The Plant Cell* 16 (8): 1968–78. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.022749>.
- Ramiro-Merina, A, RR Ariza, and T Roldán-Arjona. 2013. “Molecular Characterization of a Putative Plant Homolog of MBD4 DNA Glycosylase.” *DNA Repair* 12 (11): 890–98. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2013.08.002>.
- Rangam, G, KM Schmitz, AJ Cobb, and SK Petersen-Mahrt. 2012. “AID Enzymatic Activity Is Inversely Proportional to the Size of Cytosine C5 Orbital Cloud.” *PloS One* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0043279>.
- Robertson, KD. 2005. “DNA Methylation and Human Disease.” *Nature Reviews. Genetics* 6 (8): 597–610. <https://doi.org/10.1038/NRG1655>.
- Rocha, PS, M Sheikh, R Melchiorre, M Fagard, S Boutet, R Loach, B Moffatt, C Wagner, H Vaucheret, and I Furner. 2005. “The Arabidopsis HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1 Gene Codes for an S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Required for DNA Methylation-Dependent Gene Silencing.” *The Plant Cell* 17 (2): 404–17. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.028332>.
- Rodríguez, E, R Azevedo, P Fernandes, and C Santos. 2011. “Cr(VI) Induces DNA Damage, Cell Cycle Arrest and Polyploidization: A Flow Cytometric and Comet Assay Study in *Pisum Sativum*.” *Chemical Research in Toxicology* 24 (7): 1040–47. <https://doi.org/10.1021/TX2001465>.
- Rodríguez, Eleazar, Jonathan Chevalier, Hassan El Ghouli, Kristoffer Voldum-Clausen, John Mundy, and Morten Petersen. 2018. “DNA Damage as a Consequence of NLR Activation.” *PLOS Genetics* 14 (2): e1007235. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007235>.
- Roldán-Arjona, T, RR Ariza, and D Córdoba-Cañero. 2019. “DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters.” *Frontiers in Plant Science* 10 (August). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01055>.
- Roy, Sujit. 2014. “Maintenance of Genome Stability in Plants: Repairing DNA Double Strand Breaks and Chromatin Structure Stability.” *Frontiers in Plant Science* 5 (1). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00487>.
- Roy, Sujit, Swarup Roy Choudhury, and Kalipada Das. 2012. “The Interplay of DNA Polymerase  $\lambda$  in Diverse DNA Damage Repair Pathways in Higher Plant Genome in Response to Environmental and Genotoxic Stress Factors.”

- <https://doi.org/10.4161/Psb.22715> 8 (1): 113–15. <https://doi.org/10.4161/PSB.22715>.
- Roy, Sujit, Swarup Roy Choudhury, Sanjay Kumar Singh, and Kali Pada Das. 2011. “AtPol $\lambda$ , A Homolog of Mammalian DNA Polymerase  $\lambda$  in Arabidopsis Thaliana, Is Involved in the Repair of UV-B Induced DNA Damage Through the Dark Repair Pathway.” *Plant and Cell Physiology* 52 (2): 448–67. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCR002>.
- Roy, Sujit, Sanjay Kumar Singh, Swarup Roy Choudhury, and Dibyendu N. Sengupta. 2009. “An Insight into the Biological Functions of Family X-DNA Polymerase in DNA Replication and Repair of Plant Genome.” <https://doi.org/10.4161/Psb.4.7.9077> 4 (7): 678–81. <https://doi.org/10.4161/PSB.4.7.9077>.
- Rutkowski, R, K Hofmann, and A Gartner. 2010. “Phylogeny and Function of the Invertebrate P53 Superfamily.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (7). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001131>.
- Sage, E, and L Harrison. 2011. “Clustered DNA Lesion Repair in Eukaryotes: Relevance to Mutagenesis and Cell Survival.” *Mutation Research* 711 (1–2): 123–33. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2010.12.010>.
- Sakamoto, Ayako N., Vo Thi Thuong Lan, Vichai Puripunyanich, Yoshihiro Hase, Yuichiro Yokota, Naoya Shikazono, Mayu Nakagawa, Issay Narumi, and Atsushi Tanaka. 2009. “A UVB-Hypersensitive Mutant in Arabidopsis Thaliana Is Defective in the DNA Damage Response.” *The Plant Journal* 60 (3): 509–17. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.03974.X>.
- Saldivar, JC, D Cortez, and KA Cimprich. 2017. “The Essential Kinase ATR: Ensuring Faithful Duplication of a Challenging Genome.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (10): 622–36. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.67>.
- Scaffidi, P, and T Misteli. 2005. “Reversal of the Cellular Phenotype in the Premature Aging Disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome.” *Nature Medicine* 11 (4): 440–45. <https://doi.org/10.1038/NM1204>.
- Schuermann, D, J Molinier, O Fritsch, and B Hohn. 2005. “The Dual Nature of Homologous Recombination in Plants.” *Trends in Genetics: TIG* 21 (3): 172–81. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2005.01.002>.
- Schuster-Böckler, B, and B Lehner. 2012. “Chromatin Organization Is a Major Influence on Regional Mutation Rates in Human Cancer Cells.” *Nature* 488 (7412): 504–7. <https://doi.org/10.1038/NATURE11273>.
- Schutter, Kristof De, Jérôme Joubès, Toon Cools, Aurine Verkest, Florence Corellou, Elena Babychuk, Els Van Der Schueren, et al. 2007. “Arabidopsis WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint.” *Plant Cell* 19 (1): 211–25. <https://doi.org/10.1105/TPC.106.045047>.

- Schwertman, P, S Bekker-Jensen, and N Mailand. 2016. "Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (6): 379–94. <https://doi.org/10.1038/NRM.2016.58>.
- Sellou, H, T Lebeauvin, C Chapuis, R Smith, A Hegele, HR Singh, M Kozlowski, et al. 2016. "The Poly (ADP-Ribose)-Dependent Chromatin Remodeler Alc1 Induces Local Chromatin Relaxation upon DNA Damage." *Molecular Biology of the Cell* 27 (24): 3791–99. <https://doi.org/10.1091/MBC.E16-05-0269>.
- Sequeira-Mendes, J, I Aragüez, R Peiró, R Mendez-Giraldez, X Zhang, SE Jacobsen, U Bastolla, and C Gutierrez. 2014. "The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States." *The Plant Cell* 26 (6): 2351–66. <https://doi.org/10.1105/TPC.114.124578>.
- Shaked, Hezi, Naomi Avivi-Ragolsky, and Avraham A Levy. 2006. "Involvement of the Arabidopsis SWI2/SNF2 Chromatin Remodeling Gene Family in DNA Damage Response and Recombination." *Genetics* 173 (2): 985–94. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.105.051664>.
- Shen, J C, W M Rideout, 3rd, and P A Jones. 1994. "The Rate of Hydrolytic Deamination of 5-Methylcytosine in Double-Stranded DNA." *Nucleic Acids Research* 22 (6): 972. <https://doi.org/10.1093/NAR/22.6.972>.
- Shi, R, XX Shen, A Rokas, and BF Eichman. 2018. "Structural Biology of the HEAT-Like Repeat Family of DNA Glycosylases." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 40 (11). <https://doi.org/10.1002/BIES.201800133>.
- Shin, DS, and JA Tainer. 2015. "Molecular Biology: DNA Repair without Flipping Out." *Nature* 527 (7577): 168–69. <https://doi.org/10.1038/NATURE15646>.
- Shumaker, DK, T Dechat, A Kohlmaier, SA Adam, MR Bozovsky, MR Erdos, M Eriksson, et al. 2006. "Mutant Nuclear Lamin A Leads to Progressive Alterations of Epigenetic Control in Premature Aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (23): 8703–8. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602569103>.
- Simon, Lauriane, Maxime Voisin, Christophe Tatout, and Aline V. Probst. 2015. "Structure and Function of Centromeric and Pericentromeric Heterochromatin in Arabidopsis Thaliana." *Frontiers in Plant Science* 6 (NOVEMBER): 1049. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.01049>.
- Sjogren, CA, SC Bolaris, and PB Larsen. 2015. "Aluminum-Dependent Terminal Differentiation of the Arabidopsis Root Tip Is Mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-Regulated Transcriptional Response." *The Plant Cell* 27 (9): 2501–15. <https://doi.org/10.1105/TPC.15.00172>.
- Sjolund, AB, AG Senejani, and JB Sweasy. 2013. "MBD4 and TDG: Multifaceted DNA

- Glycosylases with Ever Expanding Biological Roles.” *Mutation Research* 743–744 (March): 12–25. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2012.11.001>.
- Skene, PJ, and S Henikoff. 2013. “Histone Variants in Pluripotency and Disease.” *Development (Cambridge, England)* 140 (12): 2513–24. <https://doi.org/10.1242/DEV.091439>.
- Sloan, Daniel B, Bengt Oxelman, Anja Rautenberg, and Douglas R Taylor. 2009. “Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Substitution Rate Variation in the Angiosperm Tribe Sileneae.” *BMC Evolutionary Biology* 2009 9:1 9 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-260>.
- Song, Junqi, and Andrew F Bent. 2014. “Microbial Pathogens Trigger Host DNA Double-Strand Breaks Whose Abundance Is Reduced by Plant Defense Responses.” *PLoS Pathog* 10 (4): 1004030. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004030>.
- Spampinato, C, and P Modrich. 2000. “The MutL ATPase Is Required for Mismatch Repair.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9863–69. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.13.9863>.
- Srivastava, Deepak K., Brian J. Vande Berg, Rajendra Prasad, James T. Molina, William A. Beard, Alan E. Tomkinson, and Samuel H. Wilson. 1998. “Mammalian Abasic Site Base Excision Repair: IDENTIFICATION OF THE REACTION SEQUENCE AND RATE-DETERMINING STEPS \*.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (33): 21203–9. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.33.21203>.
- Steimer, Andrea, Paolo Amedeo, Karin Afsar, Paul Fransz, Ortrun Mittelsten Scheid, and Jerzy Paszkowski. 2000. “Endogenous Targets of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis.” *The Plant Cell* 12 (7): 1165–78. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.7.1165>.
- Strzalka, W, and A Ziemienowicz. 2011. “Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): A Key Factor in DNA Replication and Cell Cycle Regulation.” *Annals of Botany* 107 (7): 1127–40. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCQ243>.
- Sweeney, Paul R., Anne B. Britt, and Kevin M. Culligan. 2009. “The Arabidopsis ATRIP Ortholog Is Required for a Programmed Response to Replication Inhibitors.” *The Plant Journal* 60 (3): 518–26. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.03975.X>.
- Tahiliani, M, KP Koh, Y Shen, WA Pastor, H Bandukwala, Y Brudno, S Agarwal, et al. 2009. “Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1.” *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 930–35. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1170116>.
- Takata, Hideaki, Tomo Hanafusa, Toshiaki Mori, Mari Shimura, Yutaka Iida, Kenichi Ishikawa, Kenichi Yoshikawa, Yuko Yoshikawa, and Kazuhiro Maeshima. 2013. “Chromatin Compaction Protects Genomic DNA from Radiation Damage.” *PLoS ONE* 8

- (10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0075622>.
- Tang, Kai, Zhaobo Lang, Heng Zhang, and Jian-Kang Zhu. 2016. "The DNA Demethylase ROS1 Targets Genomic Regions with Distinct Chromatin Modifications." *Nature Plants* 2016 2:11 2 (11): 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.169>.
- Tessadori, Federico, Roeland Kees Schulkes, Roel van Driel, and Paul Fransz. 2007. "Light-Regulated Large-Scale Reorganization of Chromatin during the Floral Transition in Arabidopsis." *The Plant Journal* 50 (5): 848–57. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03093.X>.
- Thayer, M. M., H. Ahern, D. Xing, R. P. Cunningham, and J. A. Tainer. 1995. "Novel DNA Binding Motifs in the DNA Repair Enzyme Endonuclease III Crystal Structure." *The EMBO Journal* 14 (16): 4108–20. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB00083.X>.
- Thompson, H L, R Schmidt, and C Dean. 1996. "Identification and Distribution of Seven Classes of Middle-Repetitive DNA in the Arabidopsis Thaliana Genome." *Nucleic Acids Research* 24 (15): 3017. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.15.3017>.
- Timson, David J., Martin R. Singleton, and Dale B. Wigley. 2000. "DNA Ligases in the Repair and Replication of DNA." *Mutation Research/DNA Repair* 460 (3–4): 301–18. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00033-1).
- Tittel-Elmer, Mireille, Etienne Bucher, Larissa Broger, Olivier Mathieu, Jerzy Paszkowski, and Isabelle Vaillant. 2010. "Stress-Induced Activation of Heterochromatic Transcription." *PLOS Genetics* 6 (10): e1001175. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1001175>.
- Torres, MA. 2010. "ROS in Biotic Interactions." *Physiologia Plantarum* 138 (4): 414–29. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2009.01326.X>.
- Tripathy, BC, and R Oelmüller. 2012. "Reactive Oxygen Species Generation and Signaling in Plants." *Plant Signaling & Behavior* 7 (12). <https://doi.org/10.4161/PSB.22455>.
- Turner, David P., Salvatore Cortellino, Jane E. Schupp, Elena Caretti, Tamalette Loh, Timothy J. Kinsella, and Alfonso Bellacosa. 2006. "The DNA N-Glycosylase MED1 Exhibits Preference for Halogenated Pyrimidines and Is Involved in the Cytotoxicity of 5-Iododeoxyuridine." *Cancer Research* 66 (15): 7686–93. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4488>.
- Tuteja, Narendra, Parvaiz Ahmad, Brahma B. Panda, and Renu Tuteja. 2009. "Genotoxic Stress in Plants: Shedding Light on DNA Damage, Repair and DNA Repair Helicases." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681 (2–3): 134–49. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2008.06.004>.
- Valinluck, Victoria, Pingfang Liu, Joseph I. Kang, Jr, Artur Burdzy, and Lawrence C. Sowers. 2005. "5-Halogenated Pyrimidine Lesions within a CpG Sequence Context Mimic 5-

- Methylcytosine by Enhancing the Binding of the Methyl-CpG-Binding Domain of Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MeCP2).” *Nucleic Acids Research* 33 (9): 3057. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI612>.
- Verma, Prabha, Reetika Tandon, Gitanjali Yadav, and Vineet Gaur. 2020. “Structural Aspects of DNA Repair and Recombination in Crop Improvement.” *Frontiers in Genetics* 11 (September). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.574549>.
- Wambui Mbichi, R., Qing-Feng Wang, and Tao Wan. 2020. “RNA Directed DNA Methylation and Seed Plant Genome Evolution.” *Plant Cell Reports 2020* 39:8 39 (8): 983–96. <https://doi.org/10.1007/S00299-020-02558-4>.
- Wang, Hailong, and Xingzhi Xu. 2017. “Microhomology-Mediated End Joining: New Players Join the Team.” *Cell & Bioscience 2017* 7:1 7 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13578-017-0136-8>.
- Wang, Richard Y.H., Kenneth C. Kuo, Charles W. Gehrke, Lan Hsiang Huang, and Melanie Ehrlich. 1982. “Heat- and Alkali-Induced Deamination of 5-Methylcytosine and Cytosine Residues in DNA.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 697 (3): 371–77. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(82\)90101-4](https://doi.org/10.1016/0167-4781(82)90101-4).
- Wang, Ting-Fang, Nancy Kleckner, and Neil Hunter. 1999. “Functional Specificity of MutL Homologs in Yeast: Evidence for Three Mlh1-Based Heterocomplexes with Distinct Roles during Meiosis in Recombination and Mismatch Correction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13914–19. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13914>.
- Waterworth, Wanda M., Georgina E. Drury, Clifford M. Bray, and Christopher E. West. 2011. “Repairing Breaks in the Plant Genome: The Importance of Keeping It Together.” *New Phytologist* 192 (4): 805–22. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2011.03926.X>.
- Waterworth, Wanda M., Ghzaleh Masnavi, Rajni M. Bhardwaj, Qing Jiang, Clifford M. Bray, and Christopher E. West. 2010. “A Plant DNA Ligase Is an Important Determinant of Seed Longevity.” *The Plant Journal* 63 (5): 848–60. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04285.X>.
- Waterworth, Wanda M, Jaroslav Kozak, Claire M Provost, Clifford M Bray, Karel J Angelis, and Christopher E West. 2009. “DNA Ligase 1 Deficient Plants Display Severe Growth Defects and Delayed Repair of Both DNA Single and Double Strand Breaks.” *BMC Plant Biology 2009* 9:1 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-79>.
- Waterworth, WM, C Altun, SJ Armstrong, N Roberts, PJ Dean, K Young, CF Weil, CM Bray, and CE West. 2007. “NBS1 Is Involved in DNA Repair and Plays a Synergistic Role with ATM in Mediating Meiotic Homologous Recombination in Plants.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 52 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04285.X>.



313X.2007.03220.X.

- Weimer, AK, S Biedermann, H Harashima, F Roodbarkelari, N Takahashi, J Foreman, Y Guan, et al. 2016. "The Plant-Specific CDKB1-CYCB1 Complex Mediates Homologous Recombination Repair in Arabidopsis." *The EMBO Journal* 35 (19): 2068–86. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201593083>.
- West, C.E., W.M. Waterworth, P.A. Sunderland, and C.M. Bray. 2004. "Arabidopsis DNA Double-Strand Break Repair Pathways." *Biochemical Society Transactions* 32 (6): 964–66. <https://doi.org/10.1042/BST0320964>.
- West, Christopher E., Wanda M. Waterworth, Qing Jiang, and Clifford M. Bray. 2000. "Arabidopsis DNA Ligase IV Is Induced by  $\gamma$ -Irradiation and Interacts with an Arabidopsis Homologue of the Double Strand Break Repair Protein XRCC4." *The Plant Journal* 24 (1): 67–78. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00856.X>.
- Williams, Ashley B., and Björn Schumacher. 2016. "P53 in the DNA-Damage-Repair Process." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (5). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A026070>.
- Wolfe, K H, W H Li, and P M Sharp. 1987. "Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly among Plant Mitochondrial, Chloroplast, and Nuclear DNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24): 9054–58. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.24.9054>.
- Wu, X, and Y Zhang. 2017. "TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond." *Nature Reviews. Genetics* 18 (9): 517–34. <https://doi.org/10.1038/NRG.2017.33>.
- Wynn, Emily, Emma Purfeerst, and Alan Christensen. 2020. "Mitochondrial DNA Repair in an Arabidopsis Thaliana Uracil N-Glycosylase Mutant." *Plants* 2020, Vol. 9, Page 261 9 (2): 261. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9020261>.
- Xu, Ying-Zhi, Maria P. Arrieta-Montiel, Kamaldeep S. Viridi, Wilson B.M. de Paula, Joshua R. Widhalm, Gilles J. Basset, Jaime I. Davila, et al. 2011. "MutS HOMOLOG1 Is a Nucleoid Protein That Alters Mitochondrial and Plastid Properties and Plant Response to High Light." *The Plant Cell* 23 (9): 3428–41. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.089136>.
- Yajko, D M, and B Weiss. 1975. "Mutations Simultaneously Affecting Endonuclease II and Exonuclease III in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (2): 688–92. <https://doi.org/10.1073/PNAS.72.2.688>.
- Yang, N, MA Chaudhry, and SS Wallace. 2006. "Base Excision Repair by HNT1 and HOGG1: A Two Edged Sword in the Processing of DNA Damage in Gamma-Irradiated Human Cells." *DNA Repair* 5 (1): 43–51. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2005.07.003>.

- Yang, N, H Galick, and SS Wallace. 2004. "Attempted Base Excision Repair of Ionizing Radiation Damage in Human Lymphoblastoid Cells Produces Lethal and Mutagenic Double Strand Breaks." *DNA Repair* 3 (10): 1323–34. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2004.04.014>.
- Yi, D, CL Alvim Kamei, T Cools, S Vanderauwera, N Takahashi, Y Okushima, T Eekhout, et al. 2014. "The Arabidopsis SIAMESE-RELATED Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors SMR5 and SMR7 Regulate the DNA Damage Checkpoint in Response to Reactive Oxygen Species." *The Plant Cell* 26 (1): 296–309. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.118943>.
- Yoshiyama, Kaoru O., Junya Kobayashi, Nobuo Ogita, Minako Ueda, Seisuke Kimura, Hisaji Maki, and Masaaki Umeda. 2013. "ATM-Mediated Phosphorylation of SOG1 Is Essential for the DNA Damage Response in Arabidopsis." *EMBO Reports* 14 (9): 817–22. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2013.112>.
- Yoshiyama, Kaoru O, Seisuke Kimura, Hisaji Maki, Anne B Britt, and Masaaki Umeda. 2014. "The Role of SOG1, a Plant-Specific Transcriptional Regulator, in the DNA Damage Response." *Https://Doi.Org/10.4161/Psb.28889* 9 (APR). <https://doi.org/10.4161/PSB.28889>.
- Yoshiyama, Kaoru Okamoto, Kengo Sakaguchi, and Seisuke Kimura. 2013. "DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals." *Biology* 2013, Vol. 2, Pages 1338-1356 2 (4): 1338–56. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY2041338>.
- Yoshiyama, KO. 2016. "SOG1: A Master Regulator of the DNA Damage Response in Plants." *Genes & Genetic Systems* 90 (4): 209–16. <https://doi.org/10.1266/GGS.15-00011>.
- Yoshiyama, KO, K Kaminoyama, T Sakamoto, and S Kimura. 2017. "Increased Phosphorylation of Ser-Gln Sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 Strengthens the DNA Damage Response in Arabidopsis Thaliana." *The Plant Cell* 29 (12): 3255–68. <https://doi.org/10.1105/TPC.17.00267>.
- Yoshiyama, KO, and S Kimura. 2018. "Ser-Gln Sites of SOG1 Are Rapidly Hyperphosphorylated in Response to DNA Double-Strand Breaks." *Plant Signaling & Behavior* 13 (6). <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1477904>.
- Zhang, H., and J. K. Zhu. 2012. "Active DNA Demethylation in Plants and Animals." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 77: 161–73. <https://doi.org/10.1101/SQB.2012.77.014936>.
- Zhang, Xiaoyu, Junshi Yazaki, Ambika Sundaresan, Shawn Cokus, Simon W.-L. Chan, Huaming Chen, Ian R. Henderson, et al. 2006. "Genome-Wide High-Resolution

- Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis.” *Cell* 126 (6): 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.08.003>.
- Zhu, JK. 2009. “Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases.” *Annual Review of Genetics* 43 (December): 143–66. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-102108-134205>.