UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

Estudio de complejos de ARNs largos no codificantes y proteínas asociadas en la determinación de la topología del genoma.

Lic. María Florencia Legascue

Director de Tesis: Dr. Federico Ariel Co-director de Tesis: Dr. Leandro Lucero

Laboratorio de Epigenética y ARNs no codificantes. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET) -2025-

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado.

A CONICET, por financiar este posgrado al otorgarme una beca doctoral para poder realizar la carrera de doctorado.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral de Santa Fe por cederme un espacio de trabajo y permitirme ser parte de su comunidad científica.

Al Dr. Federico Ariel por confiar en mí desde un principio, por dirigirme, por enseñarme y por transmitirme su pasión por el trabajo y por la ciencia. No solo es una inspiración, sino que también es ahora un gran amigo al que admiro profundamente. Gracias siempre por tu generosidad.

A Dr. Leandro Lucero y a mis compañeros de laboratorio, Flor, Cami, Mika, Johan, Nata, Luci, Andana, gracias por el compañerismo, el aguante, las risas, los consejos. Me llevo grandes amigos.

A mis amigos, los de siempre, los del IAL, gracias por los almuerzos, las charlas en la sala de becarios, las meriendas, por hacer de este camino más fácil y feliz.

A mi familia, por bancarme y acompañarme. Por enseñarme a insistir y a no bajar los brazos.

A Tana y Nina.

A Cata. Gracias.

Aportes Científico-Tecnológicos

Publicaciones

- Cai J, Zhang Y, He R, Jiang L, Qu Z, Gu J, Yang J, Legascue MF, Wang ZY, Ariel F, Adelson DL, Zhu Y, Wang D. LncRNA DANA1 promotes drought tolerance and histone deacetylation of drought responsive genes in *Arabidopsis*. EMBO Rep. 2024 Jan 2. doi: 10.1038/s44319-023-00030-4. Epub ahead of print. PMID: 38177920.
- Roulé T, Legascue MF, Barrios A, Gaggion N, Crespi M, Ariel F, Blein T. The long intergenic noncoding RNA ARES modulates root architecture in *Arabidopsis*. IUBMB Life. 2023 Oct;75(10):880-892. <u>doi: 10.1002/iub.2761</u>. Epub 2023 Jul 6. PMID: 37409758.
- Fonouni-Farde C, Christ A, Blein T, Legascue MF, Ferrero L, Moison M, Lucero L, Ramírez-Prado JS, Latrasse D, Gonzalez D, Benhamed M, Quadrana L, Crespi M, Ariel F. The *Arabidopsis APOLO* and human UPAT sequence-unrelated long noncoding RNAs can modulate DNA and histone methylation machineries in plants. Genome Biol. 2022 Aug 29;23(1):181. <u>doi: 10.1186/s13059-022-02750-7</u>. PMID: 36038910; PMCID: PMC9422110.
- Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, Ariel F, Crespi M. Splicing regulation by long noncoding RNAs. Nucleic Acids Res. 2018 Mar 16;46(5):2169-2184. <u>doi:</u> <u>10.1093/nar/gky095</u>. PMID: 29425321; PMCID: PMC5861421.

1. Índice

1.		Índice.		4
2.		Abrevia	aturas y símbolos	7
3.		Resum	en	.11
4.		Abstra	ct	.12
5.		Introdu	ucción	.13
	5.:	1.	ARNs largos no codificantes	.13
		5.1.1.	El ARN Inc <i>APOLO</i>	.14
		5.1.2.	Proteínas asociadas a la cromatina interactúan con APOLO	.16
	5.2	2.	Los factores de transcripción WRKY	.18
		5.2.1.	Estrés biótico	.18
		5.2.2.	Estrés abiótico	.19
		5.2.3. WRKY	Mecanismos de activación y represión de la transcripción por FTs de la famil 19	ia
		5.2.4.	El factor de transcripción WRKY42	.20
	5.3	3.	El fotorreceptor de UV-B: UVR8	.21
		5.3.1.	La vía mediada por el complejo UVR8-COP1	.21
		5.3.2.	Otros mecanismos de transducción de señales que involucran a UVR8	.22
		5.3.3.	Regulación de la transcripción mediada por UVR8	.25
	5.4	4.	Acetilación de histonas en plantas	.26
		5.4.1.	Acetiltransferasas de histonas	.27
		5.4.2.	El rol de la acetilación de histonas en la fotomorfogénesis	.27
		5.4.3.	La familia de acetiltransferasas de histonas CBP/p300 de A. thaliana	.28
	5.	5.	Apertura estomática	.29
		5.5.1.	La luz UV-B inhibe la apertura estomática	.30
6.		Objetiv	/OS	.32
7.		Materi	ales y métodos	.33
	7.1.		Plásmidos	.33
	7.	2.	Cepas bacterianas	.33
	7.3	3.	Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos	.34
7.		4.	Construcciones	.34
	7.	5.	Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la	
	Рс	olimeras	sa)	.35
7.6.		6.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	.35
7.		7.	Purificación de fragmentos de ADN	.36
	7.8	8.	Clonados en vectores de entrada y vectores destino	.36

	7.9.	Transformación de bacterias de E. coli con ADN plasmídico	.36
	7.10.	Transformación de bacterias de A. tumefaciens con ADN plasmídico	.37
	7.11.	Minipreparación de ADN plasmídico	.37
	7.12.	Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	.38
	7.13.	Extracción de ADN genómico de plantas de A. thaliana	.38
	7.14.	Inmunoprecipitación de la cromatina	.39
	7.15.	Inmunoprecipitación del ARN	.39
	7.16.	Inmunoprecipitación ADN-ARN	.40
	7.17.	Aislamiento de la cromatina mediante purificación del ARN	.40
	7.18.	Aislamiento de ARN	.41
	7.19.	Transcripción reversa (RT)	.41
	7.20.	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	.41
	7.21.	Transformación estable de plantas de A. thaliana por inmersión floral	.42
	7.22.	Transformación transitoria de plantas de N. benthamiana por agroinfiltración	.42
	7.23.	Tinción histoquímica GUS	.43
	7.24.	Extracción de proteínas totales de A. thaliana	.43
	7.25.	Separación de proteínas y análisis por Western blot	.44
	7.26.	Aislamiento de protoplastos de A. thaliana	.44
	7.27.	Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)	.45
	7.28.	Ensayo de doble híbrido en levaduras	.45
	7.29.	Ensayo de doble híbrido en levaduras	.45
	7.30.	Análisis de ChIP-Seq	.46
8.	Resulta	ados	.49
	8.1.	El ARN Inc APOLO se asocia con el fotorreceptor de UV-B UVR8 in vivo	.49
	8.1.	UVR8 se une a los sitios de inicio de la transcripción de sus genes blanco	.50
	8.2.	UVR8 y el FT WRKY42 comparten sitios de unión a la cromatina	.51
	8.3.	El ARN Inc APOLO también se asocia con COP1 in vivo	.52
	8.4.	El complejo UVR8-COP1 interactúa con el FT WRKY42	.53
	8.5. radiación	APOLO y WRKY42 regulan un subconjunto común de genes que responden a la UV-B de manera dependiente de UVR8, incluido HY5	55
	8.6.	WRKY42 reclutaría a UVR8 a través de COP1 en el locus HY5 y APOLO la aleja de	la
cromatina			
	8.7. B	APOLO, UVR8, COP1 y WRKY42 median en el cierre estomático en respuesta a U 62	IV-
	8.8. con la ace	APOLO modula la acetilación de histonas en el locus HY5 mediante la interacció etiltransferasa HAC5	n 65

8	. HY5 regula la inducción tardía de APOLO en respuesta UV-B promovie	ndo un bucle				
d	retroalimentación negativa transcripcional	71				
9.	Discusión	74				
10.	Conclusiones	81				
11.	Bibliografía	82				
Anexo						

2. Abreviaturas y símbolos

35S: promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S CaMV

3C: captura de conformación de cromatina (del inglés: *chromatin conformation capture*)

ABA: ácido absícico

AD: Dominio de Activación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNasa: Desoxiribonucleasa

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN Inc: ARN largo no codificante

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: ARN mensajero

ARNs nc: ARNs no codificantes

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: enzima que hidroliza a adenosina trifosfato

BD: Dominio de unión

BiFC: Complementación de fluorescencia bimolecular (del inglés: Bimolecular Fluorescence

Complementation)

BR: brasinoeteroides

Bucle-R: híbrido ARN:ADN (del inglés: R-loop)

CaMV: Virus del mosaico de la coliflor

CG: células de la guarda

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina

ChIRP: aislamiento de la cromatina mediante purificación del ARN (del inglés: Chromatin

Isolation by RNA Purification)

Cl⁻: anión cloro

cm: Centímetros

CO₂: dióxido de carbono

Col-0: Ecotipo Columbia

CsVMV: virus del mosaico de las venas de la yuca

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

C-terminal: dominio Carboxilo terminal de una proteína.

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

DRIP: inmunoprecipitación de ADN:ARN (*del inglés: DNA-RNA Immunoprecipitation*)

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético

EMSA: ensayos de movilidad electroforética (*del inglés EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

ETI: inmunidad asociada a efector (del inglés: effector-triggered immunity)

FT: factor de transcripción

g/L: Gramos de soluto en un litro de solución

g: Gravedad o gramos

GA: giberelinas

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés: green fluorescent protein)

g_s: conductancia estomática

H⁺: hidrón

H₂O₂: peróxido de hidrogeno

HAC: acetiltransferasa de histonas (del inglés: histone acetyltransferase)

HDAC: deacetilasa de histonas (del inglés histone deacetylase)

JA: ácido jasmónico

K⁺: catión potasio

kpb: kilopares de bases

L: Litro

LB: Luria-Bertani o Luz blanca

M: Molar

MEKK: MAP quinasa quinasa quinasa

mg: Miligramo

miARN: Micro ARN

miliQ: Agua calidad miliQ

MKK: MAP quinasa quinasa

ml: Mililitro

mM: Milimolar (milimoles/litro)

MP: membrana plasmática

MPK: MAP quinasa

MS: Medio de cultivo Murashige-Skoog y espectrometría de masas (del inglés *Mass Spectrometry*)

MTI: inmunidad asociada a patrones moleculares microbianos (del inglés: *microbe-associated molecular pattern-triggered immunity*)

NAT: transcriptos naturales antisentido (*del inglés: Natural Antisense Transcripts*)

ng: nanogramos nm: Nanómetros NO: óxido nítrico NO³⁻: nitrato NR: nitrato reductasa N-terminal: dominio Amino terminal de una proteína. **OD:** Densidad óptica **p/v**: Gramos de soluto en 100 ml de solución PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos pb: Pares de bases PCR: Reacción en cadena de la polimerasa PRC1: complejo represivo polycomb 1 (del inglés: Polycomb Repressive Complex 1) **PRC2:** complejo represivo polycomb 2 (del inglés: *Polycomb Repressive Complex 2*) PTI: inmunidad asociada a patrones moleculares de patógenos (del inglés: pathogen-associated *molecular pattern-triggered immunity*) PVP: polivinilpirrolidona qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real RdDM: Metilación del ADN dependente de ARNs (del inglés RNA-directed DNA methylation). RID-P: aislamiento de ARN mediante purificación de ADN (del inglés: RNA Isolation by DNA Purification) R-loop: híbrido ARN: ADN RNA Seq: secuenciación del ARN ROS: especies reactivas de oxígeno RT: transcriptasa reversa (del inglés Reverse Transcriptase) o retrotranscripción RT-qPCR: RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés RetroTranscripted quantitative PCRs) SA: ácido salicílico SDS: Dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante TAE: Tris Acético EDTA TCA: Ácido tricloroacético TE: solución amortiguadora Tris-EDTA **TSS**: sitio de inicio de la transcripción (del inglés *Transcriptional Start Site*) **TTS**: sitio de terminación de la transcripción (del inglés *Transcriptional Termination Site*)

UV: luz ultravioleta

UV-B: luz ultravioleta-B
v/v: Militros de soluto en 100 ml de solución
V: Volts
W: watt
YFP: proteína amarilla fluorescente (del inglés YFP: yellow fluorescent protein).
μL: Microlitros
μM: Micromolar
μmoles: Micromoles

Resumen

3. Resumen

La radiación ultravioleta (UV) constituye aproximadamente el 8% de la radiación solar total que llega a la superficie de la Tierra, siendo el UV-B especialmente particular por su capacidad de causar daños en el ADN y afectar al crecimiento de las plantas. Arabidopsis thaliana percibe la radiación UV-B a través del fotorreceptor UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8), el homólogo vegetal más cercano a la proteína humana relacionada con la cromatina REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION 1 (RCC1). UVR8 se monomeriza y transloca al núcleo tras la exposición a UV-B, interactuando con la E3 ubiquitina ligasa COP1. Esta interacción media la fotomorfogénesis y la aclimatación de la planta a través de la activación transcripcional del factor de transcripción (FT) bZIP ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5). Además, la exposición a UV-B provoca un aumento de la acetilación de la histona H3 en los loci génicos regulados por UVR8, incluido HY5. En este estudio, demostramos que UVR8 interactúa con el ARN largo no codificante (ARN Inc) APOLO. Mediante un enfoque integrador multiómico, combinado con ensayos genéticos y bioquímicos, demostramos que UVR8 regula genes diana en respuesta a UV-B a través de la interacción indirecta con el FT WRKY42 por medio de COP1. Tanto UVR8, COP1 y WRKY42 interactúan con APOLO y la acumulación nuclear de éste, modula la unión de UVR8 en el locus HY5. Además, APOLO se asocia con la HISTONE ACETILTRANSFERASE 5 (HAC5) para modular la marca de activación H3K9ac sobre el locus HY5 tras la exposición a UV-B. Curiosamente, el promotor de APOLO es activado directamente por HY5, creando un mecanismo de retroalimentación transcripcional. La inducción de APOLO resulta en la separación del complejo de activación UVR8-COP1-WRKY42 de HY5 y modula la estabilidad de la proteína HAC5. Estos hallazgos revelan que UVR8 es una proteína que interactúa con el ARN y muestran un nuevo mecanismo de adaptación ambiental en Arabidopsis a través de la interacción entre ARNs asociados a R-loops, modificadores de histonas, factores de transcripción y el fotorreceptor UVR8.

Abstract

4. Abstract

Ultraviolet (UV) radiation constitutes approximately 8% of the total solar radiation reaching the Earth's surface, with UV-B being particularly impactful due to its ability to cause DNA damage and affect plant growth. Arabidopsis thaliana perceives UV-B through the UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) photoreceptor, the plant closest homolog of the human chromatin-related protein REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION 1 (RCC1). UVR8 monomerizes and translocates to the nucleus upon UV-B exposure, interacting with the E3 ubiquitin ligase COP1. This interaction mediates photomorphogenesis and plant acclimation via the bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5). Additionally, UV-B exposure leads to increased acetylation of histone H3 at UVR8-regulated gene loci, including HY5. In this study, we demonstrate that UVR8 interacts with the DNA-RNA duplex (R-loop) forming long noncoding RNA (IncRNA) APOLO. Through a multi-omic integrative approach, combined with genetics and biochemical assays, we show that UVR8 regulates target genes in response to UV-B due to an indirect interaction with WRKY42 trough COP1. UVR8, COP1 and WRKY42 interact with APOLO, whose nuclear accumulation modulates UVR8 binding at the HY5 locus. Furthermore, APOLO associates with HISTONE ACETYLTRANSFERASE 5 (HAC5) to modulate the activation mark H3K9ac over the HY5 locus after UV-B exposure. Interestingly, the APOLO promoter is directly activated by HY5, creating a transcriptional feedback mechanism. APOLO induction results in the decoy of the UVR8-COP1-WRKY42 activation complex away from HY5 and modulates HAC5 protein stability. These findings reveal UVR8 as an RNA-interacting protein and uncover a novel mechanism of environmental adaptation in Arabidopsis through the interaction between R-loop associated lncRNAs, histone modifiers, transcription factors, and the UV-B photoreceptor UVR8.

5.1. ARNs largos no codificantes

Los genomas eucariotas muestran una gran variabilidad en su tamaño (1) que no siempre se correlaciona con el número de genes que codifican proteínas (2). De hecho, sus transcriptomas incluyen una gran cantidad de componentes no codificantes (3). Aunque se estima que el 90% del genoma eucariota es transcripto durante el desarrollo, solo un 2% de los ARNs codifican proteínas (4). El genoma no codificante, durante mucho tiempo considerado como "ADN basura", codifica una gran cantidad de ARNs no codificantes (ARNs nc) con funciones biológicas indiscutibles (5). Estos comprenden ARNs ubicuos, ARNs pequeños (micro ARNs, ARNs de interferencia pequeños) y ARNs largos no codificantes (ARNs Inc), que también incluyen ARNs *enhancers*, ARNs derivados de transposones y ARNs circulares (6).

Los ARNs Inc exhiben una amplia gama de tamaños que varían desde los 200 pares de bases (pb) hasta más de 100 kpb de longitud. Se expresan en diversos tejidos, tipos y estadíos celulares, y se acumulan tanto en el núcleo como en el citoplasma (7). A su vez, los ARNs Inc se clasifican de acuerdo a su ubicación y orientación en relación a sus transcriptos vecinos que codifican proteínas (Figura 1). Los ARNs largos intrónicos se transcriben exclusivamente de regiones intrónicas, mientras que los ARNs intergénicos se encuentran fuera de los genes e incluyen ARNs derivados de promotores, enhancers, elementos transponibles y ARNs de doble cadena. Los ARNs Inc de doble cadena sentido y antisentido son transcriptos de las hebras sentido y antisentido, respectivamente, mientras que los transcriptos naturales antisentido NAT (del inglés: Natural Antisense Transcripts) se inician en la hebra antisentido de regiones codificantes sentido (cis-NAT) o son complementarios a un transcripto sentido ubicado en un locus distante (trans-NAT) (4,8). Los ARNs circulares constituyen una clase de ARNs Inc que consisten en moléculas simple cadena cerradas covalentemente, resultantes del back-splicing, una forma no canónica de empalme alternativo (9). Alternativamente, los ARNs lnc se pueden clasificar según sus funciones moleculares e interacciones con moléculas reguladoras tales como proteínas, ADN u otros ARNs (10,11).



Figura 1: Clasificación de los ARN largos no codificantes (ARNs Inc). Los ARN antisentido se inician dentro o a 30 nucleótidos de un gen codificante de proteínas, se transcriben en dirección opuesta y se superponen con al menos un exón codificante. Los ARNs Inc intrónicos se inician dentro de un intrón en cualquier dirección y terminan sin superponerse con un exón. Los ARNs Inc derivados de promotores son transcriptos de la región promotora de un gen codificante de proteínas Los ARNs Inc intergénicos son unidades de transcripción separadas a una distancia de al menos 1kpb de los genes codificantes de proteínas. Los exones se representan en verde y los intrones en negro. Las líneas rojas representan genes no codificantes, que se muestran sin intrones para mayor claridad. Las referencias para cada ejemplo son: *COOLAIR* (12), *COLDAIR* (13), Transcriptos de Pol V (14), *APOLO* (15), *ASCO* (16), *ENOD40* (17), y. *Figura modificada de Ariel* (4).

Los ARNs Inc participan en casi todos los aspectos de la expresión génica. En plantas se han descripto como reguladores de la transcripción génica, capaces de acondicionar el entorno epigenético de sus *targets* génicos y de modular la actividad de los complejos transcripcionales (18). Además, a nivel post-transcripcional, varios ARNs Inc se han asociado con la degradación del ARN diana complementario, el empalme alternativo, la promoción de la traducción, la localización subcelular de proteínas y diversas modificaciones post-traduccionales. En particular, las modificaciones post-traduccionales de histonas mediadas por ARNs Inc están relacionadas con la regulación transcripcional de los genes blanco (19).

5.1.1. El ARN Inc APOLO

APOLO (AUXIN REGULATED PROMOTER LOOP RNA) es un ARN Inc intergénico sensible a auxinas de Arabidopsis thaliana. Corriente arriba del locus de APOLO se encuentra otro gen sensible a auxinas, PINOID (PID), necesario para el desarrollo de las raíces. APOLO y PID están co-regulados. Normalmente, ambos están epigenéticamente reprimidos debido a la marca represora de la transcripción H3K27 mediada por Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), la

unión de la proteína LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) componente de Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1), la metilación de ADN y un bucle en la cromatina que abarca al *locus* de *PID* y *APOLO* (15). En presencia de auxinas, la metilación del ADN disminuye, con lo cual se inicia la transcripción de *APOLO* y el transcripto de *APOLO* se une físicamente y desplaza a LHP1; posteriormente, la trimetilación de H3K27 también se pierde y el bucle se relaja en la región *APOLO-PID*. De forma paralela, las auxinas inducen la producción de otros factores de transcripción (FTs), incluido el AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) que también se une al promotor de *APOLO* para activar aún más la transcripción medida por la Polimerasa II (20). En resumen, *APOLO* regula positivamente su propia transcripción y la del gen adyacente *PID* en *cis* en respuesta a auxinas (Figura 2). Gradualmente, la Polimerasa IV es reclutada en el locus, iniciando la metilación del ADN dependiente de ARNS (*RdDM: RNA-directed DNA methylation*) (21) y la metilación de histonas mediada por PRC2. La unión de LHP1 aumenta debido al reclutamiento de *APOLO*. Estos eventos resultan en el cierre del bucle de la cromatina y en el silenciamiento epigenético y transcripcional de los genes *APOLO* y *PID* (15). Por lo tanto, *APOLO* también actúa como regulador negativo de su propia transcripción.

Mediante diversas técnicas de secuenciación del ARN (*RNA Seq*), aislamiento de la cromatina mediante purificación del ARN (*ChIRP: Chromatin Isolation by RNA Purification*)(22), la captura de conformación de cromatina (*3C*) (23), la inmunoprecipitación de ADN:ARN (*DRIP: DNA-RNA Immunoprecipitation*) (24) y el aislamiento de ARN mediante purificación de ADN (*RID-P: RNA Isolation by DNA Purification*) (20) se demostró que *APOLO* reconoce múltiples *loci* independientes y sensibles a auxinas en *trans* para orquestar el desarrollo de las raíces en respuesta a esta hormona (20). *APOLO* se intercala en el ADN genómico para formar una estructura de bucle-R o *R-loop* (híbrido ARN:ADN) (24) y aleja a LHP1 para modular la conformación 3D de la cromatina y activar estos genes (Figura 2).



Figura 2: Acción en *trans* de *APOLO* sobre múltiples genes. En respuesta a las auxinas, el *locus APOLO* se desmetila (15) y el bucle de la cromatina se abre. La transcripción de *APOLO* y *PID* es activada directamente por ARF7. *APOLO* se une a su gen vecino *PID* formando un bucle-R y alejando a LHP1. *APOLO* también reconoce *WAG2*, *AZG2* y múltiples *loci* distantes formando bucles-R. Como resultado, *APOLO* también aleja a LHP1 modulando la conformación local de la cromatina. Alternativamente, la activación transcripcional mediada por *APOLO* puede desencadenar cambios en la conformación de la cromatina. Se desconoce qué componentes adicionales del complejo ribonucleoproteico se necesitan para la separación de las hebras del ADN que permiten la formación de bucles-R. *Figura modificada de Ariel* (20).

En resumen, los mecanismos descriptos de *APOLO* sugieren que es un integrador de múltiples señales y un coordinador de redes génicas. Tras su inducción, *APOLO* se activa a sí mismo y, de manera simultánea, desencadena la expresión de cientos de genes distantes. El papel principal de *APOLO* quizás sea aumentar la sensibilidad y la robustez del cambio epigenético/transcripcional en múltiples *loci* (25).

5.1.2. Proteínas asociadas a la cromatina interactúan con APOLO

Un subconjunto de ARNs Inc está enriquecido en el núcleo y especialmente dentro de la fracción asociada a la cromatina. En consecuencia, muchos de ellos han sido implicados en regulaciones epigenéticas, incluyendo la determinación dinámica de la organización tridimensional del núcleo (26). Curiosamente, las únicas modificaciones post-traduccionales

mediadas por ARNs Inc en plantas están relacionadas con histonas, afectando así el perfil epigenético y estado transcripcional de genes *target* (19).

Para indagar aún más en los eventos celulares en los que participa *APOLO* formando parte de uno o diversos complejos ribonucleoproteicos, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un ensayo de ChIRP (22,27), seguido de sucesivas precipitaciones y lavados con TCA y acetona, para purificar proteínas potencialmente asociadas a este ARN Inc. Mediante un análisis de Espectrometría de Masas, se identificaron 16 proteínas potencialmente asociadas a *APOLO*. Entre ellas, se identificaron FTs, proteínas de unión al ARN y proteínas relacionadas a la cromatina.

Recientemente, hemos demostrado que *APOLO* interactúa con la proteína de unión a metilcitosina VARIANT IN METHYLATION 1 (VIM1), un homólogo conservado del regulador de metilación de ADN en mamíferos UBIQUITIN-LIKE CONTAINING PHD AND RING FINGER DOMAINS 1 (UHRF1). El complejo *APOLO*-VIM1-LHP1 regula directamente la transcripción del gen involucrado en la biosíntesis de auxina *YUCCA2* coordinando dinámicamente la metilación del ADN y el depósito de H3K27me3 sobre su promotor durante la respuesta termomorfogénica de la planta. También, demostramos que el ARN Inc *UHRF1 Protein Associated Transcript (UPAT)*, un *partner* directo de UHRF1 en humanos, puede ser reconocido por VIM1 y LHP1 al ser expresado en células vegetales, a pesar de la falta de homología de secuencia entre *UPAT* y *APOLO*. Además, los niveles aumentados de *APOLO* o *UPAT* dificultan la unión de VIM1 y LHP1 al promotor de *YUCCA2* y alteran globalmente el transcriptoma de *Arabidopsis* de manera similar (25).

Por otro lado, *APOLO* se induce por el frío e interactúa con el FT WRKY42 para ayudar a su unión al promotor de *RHD6 (ROOT HAIR DEFECTIVE 6)* y aumentar su activación. *RHD6* codifica un FT clave del desarrollo de pelos radiculares. El locus de *RHD6* es un *target* típico de *APOLO* que muestra deposición de H3K27me3, unión de LHP1 y un motivo de reconocimiento de *APOLO*, que es capaz de formar bucles-R y un bucle de cromatina. El promotor de *RHD6* contiene motivos W-box de unión a WRKY. Sorprendentemente, la unión de WRKY42 al promotor de *RHD6* se vio afectada tanto en las líneas de *APOLO-RNAi* como en las líneas sobreexpresantes; la formación del bucle de cromatina de *RHD6* también se vio afectada en ambas líneas. Estas observaciones sugieren que, al igual que en el locus *PID–APOLO, APOLO* es necesario tanto para la regulación positiva como negativa en *trans* de *RHD6* a través de la unión de FTs y la remodelación de la estructura 3D de la cromatina en respuesta a cambios de temperatura (28).

Entre las proteínas que potencialmente interactúan con *APOLO*, también identificamos a UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) y HAC5 (HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE CBP FAMILY 5)

17

por lo que decidimos comenzar a trabajar con éstas ya que se ha demostrado que la exposición a UV-B aumenta la acetilación de las lisinas K9 y/o K14 de la histona H3 (H3K9,14diac) en los *loci* de genes regulados por UVR8 (29). Si bien la interacción de estas proteínas en particular con el ARN no había sido observada aún, nuestros datos preliminares sugerían que existe un mecanismo molecular que involucra a este ARN Inc.

5.2. Los factores de transcripción WRKY

Los FTs WRKY son una de las familias más grandes de reguladores transcripcionales y forman parte de redes de señalización que modulan muchos procesos en las plantas. Estos pueden actuar como represores o activadores, y un mismo FT WRKY podría estar involucrado en la regulación de varios procesos diferentes (30).

5.2.1. Estrés biótico

La mayoría de los trabajos sobre los FTs WRKY indican que numerosos miembros de la familia desempeñan funciones en la reprogramación transcripcional asociada con la respuesta inmune de las plantas. Estos factores son componentes centrales de muchos aspectos del sistema inmunitario innato de la planta, incluyendo la inmunidad asociada a patrones moleculares microbianos (del inglés: microbe-associated molecular pattern-triggered immunity, MTI), inmunidad asociada a patrones moleculares de patógenos (del inglés: pathogenassociated molecular pattern-triggered immunity, PTI), la inmunidad asociada a efector (del inglés: effector-triggered immunity, ETI), la defensa basal y la resistencia adquirida sistémica (31). La sobreexpresión o la represión de la expresión génica de diversos WRKY tienen efectos en la defensa de la planta, lo que ha permitido desentrañar algunos componentes de la red de señalización (32). A su vez, un estudio reciente en arroz ha revelado que el par de genes alélicos OsWRKY45-1 y OsWRKY45-2, que codifican proteínas que difieren en diez aminoácidos, desempeñan roles opuestos en la interacción de la planta con bacterias (33). La sobreexpresión de ambos alelos muestra que regulan positivamente la resistencia al patógeno fúngico del arroz Magnaporthe grisea, pero regulan diferencialmente la resistencia a Xanthomonas oryzae (tizón bacteriano del arroz). OsWRKY45-1 parece ser un regulador negativo, mientras que OsWRKY45-2 sería un regulador positivo de la respuesta de la planta a X. oryzae. Además, estos genes actuarían a través de diferentes vías, ya que la expresión diferencial de OsWRKY45-1 modula los niveles de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), mientras que la expresión diferencial de OsWRKY45-2 parece modular significativamente solo los niveles de JA (34).

5.2.2. Estrés abiótico

Los Fts WRKY desempeñan roles fundamentales en la regulación de muchas reacciones de estrés en las plantas. Por ejemplo, en el arroz, la sobreexpresión de *OsWRKY11* inducida por el promotor *HSP101* condujo a una mayor tolerancia al calor y a la sequía. Del mismo modo, la sobreexpresión de *OsWRKY45* aumentó la tolerancia a la sal y la sequía, además de la resistencia a enfermedades (30) . En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de *AtWRKY25* o *AtWRKY33* aumenta la tolerancia a la sal y la sequía (30). Trabajos adicionales sobre *AtWRKY25* utilizando tanto mutantes nulos como líneas de sobreexpresión demostraron que también está implicado en la respuesta al estrés térmico. Estos ejemplos ilustran que los factores WRKY forman parte de los procesos de señalización asociados con la reprogramación transcripcional cuando las plantas se enfrentan a un alto nivel de sal, calor, estrés osmótico, altos niveles de CO₂, altas concentraciones de ozono, frío o sequía (30).

5.2.3. Mecanismos de activación y represión de la transcripción por FTs de la familia WRKY

Los FTs WRKY pueden activar y/o reprimir la transcripción, incluso, algunos factores poseen ambas funciones. Por ejemplo, mediante ensayos en levaduras, se descubrió que *At*WRKY53 activa o reprime la transcripción de un gen reportero según el contexto del promotor. *AtWRKY53* cotransformado con constructos reporteros en protoplastos de *Arabidopsis* reguló negativamente su propio promotor mientras actuaba como activador en otros promotores, lo que es consistente con los resultados en levaduras (35). De manera similar, en *Arabidopsis*, AtWRKY6 autorregula negativamente su propio promotor mientras actuaba como activa la transcripción de *SIRK/FRK1* (36). A través de estudios de expresión transitoria, se ha demostrado que *Os*WRKY72 y *Os*WRKY77 son activadores de la señalización de ácido absicico (ABA), pero reprimen la señalización de giberelinas (GA) en células de aleurona (37).

Las vías de las MAP quinasas están implicadas en el control de la actividad de los factores de transcripción WRKY. En *Arabiopsis*, un informe ha demostrado que AtWRKY33 existe en complejos nucleares con la MAP quinasa MPK4. La percepción de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) activa un módulo MEKK1-MKK1/2-MPK4 formado por una MAP quinasa (MPK), una MAP quinasa quinasa (MKK) y una MAP quinasa quinasa quinasa (MEKK). Esto conduce a la disociación nuclear de un complejo MPK4-MKS1-WRKY33 y a la liberación de AtWRKY33 y MKS1. AtWRKY33 activa entonces la expresión de PAD3 necesaria para la síntesis del antimicrobiano camalexina (38)

19

Las modificaciones de las histonas también pueden participar en estos procesos de represión y des-represión. Los genes *AtWRKY38, AtWRKY53, AtWRKY62* y *AtWRKY70* han sido involucrados en vías que implican modificaciones covalentes de histonas (38–40). *AtWRKY70* es un blanco primario para el homólogo de Trithorax en *Arabidopsis* (ATX1). ATX1 activa la expresión de *AtWRKY70* estableciendo la marca de trimetilación de histonas H3K4, y se ha sugerido que los genes de defensa *PR-1* y *THI2.1* están controlados a través de esta regulación epigenética del locus *AtWRKY70* (39)

5.2.4. El factor de transcripción WRKY42

En Arabidopsis, WRKY42 codifica un FT que alberga un solo dominio de unión a ADN WRKY y se localiza exclusivamente en el núcleo. Según un ensayo de levadura de doble híbrido y un ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC), se determinó que WRKY42 interactúa consigo misma. Este FT regula positivamente la senescencia de las hojas al activar directamente la transcripción de genes relacionados a la síntesis de SA y especies reactivas de oxígeno (ROS) (41).

La senescencia foliar representa la etapa final del crecimiento y desarrollo de las hojas, y su inicio y progresión están estrictamente regulados. En un estudio, se encontró que *WRKY42* se induce en gran medida durante la senescencia foliar. Los mutantes *wrky42* mostraron una senescencia foliar retrasada, mientras que la sobreexpresión de *WRKY42* aceleró la senescencia. Tanto los ensayos de movilidad electroforética (*del inglés EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay*) como los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina demostraron que WRKY42 se une directamente a los promotores de *ISOCHORISMATO SYNTHASE 1 (ICS1)* y *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG F (RBOHF)*, así como a algunos genes asociados a la senescencia para activar su expresión regulando positivamente la senescencia foliar.

Como fue mencionado anteriormente, el complejo formado por WRKY42 y APOLO modula el entorno epigenético del gen *RHD6*, activándolo y promoviendo así la expansión celular en las raíces en condiciones de baja temperatura. Esta activación de *RHD6* a su vez desencadena una cascada de eventos moleculares que regulan el programa transcripcional de los pelos radiculares en respuesta al frío (28).

A su vez, cabe mencionar que el FT WRKY36 ha sido el único miembro de la familia WRKY en *Arabidopsis* involucrado en una vía relacionada con la radiación UV-B (6). Sin embargo, en *Mirabilis himalaica*, una planta de uso medicinal, se ha observado que WRKY42 es uno de los FTs involucrados en el aumento del contenido de flavonoides luego del tratamiento con UV-B

20

(42). Hasta el presente trabajo de tesis doctoral, la relación entre AtWRKY42 y la respuesta al UV-B permanecía inexplorada.

5.3. El fotorreceptor de UV-B: UVR8

De la luz solar, la luz ultravioleta-B (UV-B) comprende un rango de longitud de onda comprendido entre los 280-315 nm. La exposición al UV-B tiene efectos significativos en la vida de las plantas. Este tipo de radiación, no solo implica un potencial estrés, sino que también es una señal para regular su crecimiento y desarrollo (43). Esta señal regula una respuesta de fotomorfogénesis en las plantas, incluyendo la inhibición de la elongación del hipocotilo, la acumulación de flavonoides y antocianinas, e induciendo la expresión de genes en respuesta al UV-B. En Arabidopsis, UVR8 es el fotorreceptor UV-B responsable de activar la fotomorfogénesis y la aclimatación (44–49). El UV-B no afecta la abundancia de la proteína UVR8, pero sí induce su monomerización y su acumulación en el núcleo (46,50). En ausencia de UV-B, UVR8 forma un homodímero, mientras que ante la percepción de UV-B por la planta, UVR8 absorbe esta radiación, utilizando sus triptófanos como cromóforos, sufriendo cambios estructurales para inmediatamente resultar en monómeros activos (46-48,51,52). En ausencia de UV-B, UVR8 se localiza tanto en el citosol como en el núcleo, mientras que en respuesta a UV-B, se acumula mayoritariamente en el núcleo (50,53,54) y tanto la monomerización como la acumulación nuclear de UVR8 son críticas para el control de la fotomorfogénesis (46,50). La redimerización de UVR8 es promovida por proteínas con repeticiones WD40 conocidas como REPRESSOR OF UV-B PHOTOMORPHOGÉNESIS 1 Y 2 (RUP1 y RUP2) (55,56). El UV-B induce la transcripción de los genes que codifican a las RUPs y a su vez, estas proteínas pueden interactuar físicamente con UVR8 y mediar su redimerización, regulando de forma negativa la transducción de señales UV-B (56). La interacción directa entre fotorreceptores y sus respectivos targets constituye un mecanismo fundamental subyacente a la transducción de señales iniciada por estos receptores. Además de COP1 y RUPs, UVR8 también puede interactuar con múltiples FTs, como WRKY36, BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1) y BES1-INTERACTINGMYC-LIKE 1 (BIM1) para regular directamente la expresión génica.

5.3.1. La vía mediada por el complejo UVR8-COP1

La E3 ubiquitina ligasa CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), conocida por reprimir la fotomorfogénesis, participa en múltiples vías de señalización de la luz (57). COP1 interactúa con SUPRESSOR OF PHYA (SPA1) y otros componentes de los complejos E3 ubiquitina ligasa para promover la ubiquitinación y degradación del FT ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) y

su homólogo, HOMOLOG HY5 (HYH) (58). Sin embargo, en la vía de señalización UV-B, COP1 funciona para promover la expresión de HY5 y la estabilización de proteínas involucradas en la respuesta a UV-B (59). El monómero UVR8 interactúa físicamente con COP1, lo que es indispensable para la transducción de señales de este receptor (60). Dicha interacción posiblemente induce la disociación del complejo COP1-SPA del complejo ubiquitina ligasa E3 y la formación de un nuevo complejo que contiene UVR8-COP1-SPA1 lo que reduce la ubiquitinación y degradación de HY5 (61). Por otro lado, HY5 y su homólogo HYH se unen a la caja T/G en el promotor de HY5 y actúan de forma redundante para inducir su expresión luego de la exposición al UV-B (62). En resumen, la radiación UV-B desencadena la interacción entre UVR8 y COP1 para promover la expresión de HY5 y la estabilización de la proteína, para luego inducir la expresión génica sensible a UV-B y la fotomorfogénesis. Además de la transducción de señales, la interacción UVR8-COP1 es requerida para la acumulación nuclear de UVR8 (53,54). UVR8 nuclear es crítico para inducción de HY5, mientras que su versión citoplasmática, no puede hacerlo (50,52,53). La acumulación nuclear de UVR8 depende de su monomerización y es regulada por COP1 y las RUPs. La misma se interrumpe en la mutante cop1-4 pero se ve inducida en el mutante rup1 rup2, indicando que la acumulación de UVR8 es promovida por COP1 pero reprimida por las RUPs (53,54). Cómo COP1 facilita la acumulación nuclear de UVR8 es una cuestión por dilucidar. Se plantearon dos modelos que podrían explicar las observaciones celulares y moleculares: el primero es el modelo de co-importación nuclear, en el que el UV-B desencadena la monomerización de UVR8 e interactúa con COP1 en el citosol y la secuencia de localización nuclear que contiene COP1 guía la importación nuclear de UVR8. El otro, es el modelo de retención nuclear: el UV-B promueve la monomerización de UVR8 y su translocación al núcleo por un mecanismo desconocido, mientras que COP1 nuclear actúa para inhibir la exportación inmediata de UVR8 al citoplasma (63).

5.3.2. Otros mecanismos de transducción de señales que involucran a UVR8

Como fue mencionado anteriormente, además de asociarse con COP1, UVR8 también interactúa con el FT WRKY36. Dicha interacción fue identificada a partir de un ensayo de doble híbrido en levaduras independientemente si UVR8 se encuentra como dímero o monómero. Adicionalmente, se observó que los transcriptos de *WRKY36* aumentan durante la primera hora de exposición al UV-B y luego disminuyen en ausencia de UVR8, lo que indica que posiblemente otros fotorreceptores de UV-B estén involucrados en esta inducción transcripcional. WRKY36 promueve la elongación del hipocotilo inhibiendo la transcripción de *HY5*. Se cree que podría interactuar directamente con el promotor de *HY5* y reprimir su expresión mientras que UVR8

nuclear inhibe la unión al ADN de WRKY36 para suprimir la represión de *HY5*. Sin UV-B, UVR8 se localiza principalmente en el citosol, mientras que WRKY36 se localiza en el núcleo para inhibir la transcripción de *HY5* y promover la elongación del hipocotilo. Con UV-B, UVR8 monomeriza y se acumula en el núcleo para interactuar con el FT WRKY36 y así inhibir su capacidad de unión al ADN y, por lo tanto, para promover la transcripción de *HY5* e inhibir el alargamiento del hipocotilo (56).

UVR8 también interactúa con FTs de la vía de brasinoesteroides (BR) como BES1 y BIM1 (55). Los BR son hormonas esteroideas críticas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas como la escotomorfogénesis, fotomorfogénesis, y en la regulación del estrés biótico y abiótico (64). Los BR son percibidos por el receptor de superficie quinasa BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), que inicia una cascada de señalización para activar el FT corriente abajo BES1 y BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) (65-67). En ausencia de BR, la quinasa BR-INSENSITIVE 2 (BIN2) fosforila e inhibe la función de BES1 y BZR1 (68); en presencia de BR, la actividad BIN2 es inhibida, lo que lleva a la acumulación de BES1 y BZR1 desfosforilados en el núcleo (69), lo que promueve la expresión de genes de respuesta a BR (70,71). BIM1 podría interactuar con BES1 y actuar juntos para regular coordinadamente la expresión génica inducida por BR y la elongación del hipocotilo (72). Al mismo tiempo, BIM1 y BES1 también interactúan con UVR8 independientemente del tratamiento UV-B (73) (Figura 3). Incluso, la interacción con UVR8 es mayor cuando BES1 se encuentra defosforilado, es decir en su forma activa en la vía de BR y con unión al ADN (74). Como FTs, BIM1 y BES1 desfosforilados se localizan en el núcleo, mientras que UVR8 se acumula en el núcleo en respuesta a UV-B, por lo que la acumulación nuclear de UVR8 y también la formación del complejo UVR8-BES1 en el núcleo es promovida por el UV-B. BIM1 y BES1 promueven el alargamiento del hipocotilo y están involucrados en la fotomorfogenesis en respuesta al UV-B. La inhibición de la elongación del hipocotilo por UV-B está mediada por la inhibición de la señalización de BR. UVR8 inhibe las respuestas de BR para inhibir el alargamiento del hipocotilo y el crecimiento de las plantas. El análisis transcriptómico revela que BR induce, pero el UV-B reprime, la expresión de genes relacionados con el crecimiento. En el núcleo, UVR8 se asocia a BES1 para evitar su unión a los promotores de genes relacionados con el crecimiento para disminuir su expresión (73).



Figura 3: Modelo de transducción de señales mediada por UVR8 en *Arabidopsis***.** Cuando las plantas crecen en LB (luz blanca) (panel izquierdo), el fotorreceptor UVR8 se localiza principalmente en el citosol como dímero. Por otro lado, los FTs HY5, WRKY36, BIM1 y BES1 se encuentran en el núcleo. HY5 se une a su propio promotor para activar su transcripción mientras que WRKY36 también se une al promotor de *HY5* pero para inhibirlo. BIM1 y BES1 actúan juntos para inducir la expresión de genes de respuesta a brasinoesteroides (BR). Cuando las plantas se cultivan con LB + UV-B (panel derecho), UVR8 percibe la luz UV-B y se monomeriza en un monómero activo. UVR8 monomérico activo interactúa con COP1, y COP1 promueve la acumulación nuclear de UVR8. El complejo nuclear UVR8-COP1 facilita la estabilización de la proteína HY5 y mejora la unión de HY5 a su propio promotor, activando así la transcripción de *HY5*. UVR8 nuclear también interactúa con WRKY36 para inhibir la unión de WRKY36 al promotor de *HY5*. Como resultado, UVR8 emplea al menos dos mecanismos para activar la transcripción de *HY5*. Además, UVR8 localizado en el núcleo interactúa con BIM1 y el BES1 para inhibir su unión a genes de respuesta a BR involucrados en el alargamiento celular, reprimiendo así la expresión de estos. Las RUPs interactúan con UVR8 para facilitar su redimerización, probablemente tanto en el citosol como en el núcleo (solo se muestra la parte del citosol por simplicidad). *De Liang* (75).

UVR8 también puede controlar a PHYTOCHROME INTERACTING 4 (PIF4) en diferentes grados para regular las respuestas en condiciones de sombra y termomorfogénesis (76,77). Cuando se cultiva en un contexto de vegetación densa, las plantas intolerantes a la sombra detectan la presencia de competidores y desencadenan respuestas para evitar la sombra como un mayor crecimiento del tallo para competir por la luz (78). UVR8 activado por UV-B inhibe la elongación del hipocotilo a causa de la sombra mediante el control de la estabilidad y función de PIF4 y PIF5, las que juegan un papel central en la evitación de la sombra (79). Las DELLA son proteínas que reprimen el crecimiento y actúan para inactivar a las PIFs (80). En este sentido, el UV-B podría promover la degradación de las PIFs estabilizando a las DELLA (81). Este doble mecanismo evita que las proteínas PIFs activen la expresión de genes de biosíntesis de auxinas

y, por lo tanto, inhibe las respuestas de evitación de la sombra (77). Similar a las respuestas de evitación de la sombra, los aumentos en la temperatura provocan cambios morfológicos en las plantas como el alargamiento del hipocotilo y del pecíolo. PIF4 es un regulador positivo crítico en termomorfogénesis y el UV-B podría inhibir la expresión transcripcional de *PIF4* y su función (76). El complejo UVR8–COP1 inhibe la transcripción de *PIF4* a bajas y altas temperaturas. En conclusión, UVR8 activado por UV-B controla la actividad de PIF4 a través de múltiples mecanismos para suprimir el crecimiento en respuesta a la sombra y las altas temperaturas.

5.3.3. Regulación de la transcripción mediada por UVR8

Durante muchos años la asociación de UVR8 con la cromatina ha sido un enigma; permanecía incierto si la detección de la presencia de UVR8 sobre algunos *loci* que regula, revelada por inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR cuantitativa (ChIP-qPCR) indicaba una función dada durante el reclutamiento y/o activación de modificadores de cromatina y/o FTs, procesos necesarios para la regulación transcripcional, o, si la asociación se debe simplemente a la unión no especifica a la cromatina debido a cierta afinidad por las histonas (45,82). Los cambios en la metilación del ADN, los reordenamientos de los nucleosomas y los cambios en las modificaciones covalentes de las colas de histonas, son fenómenos que aseguran que el ADN permanezca en un estado eucromático poco compactado, facilitando así el acceso de la maquinaria transcripcional a los distintos *targets* genómicos (83–86)

En 2016 a través de un ensayo de ChIP-Seq, Velanis y col. (29) identificaron diversos genes con una acumulación de la marca H3K9,14diac que, a su vez codifican proteínas involucradas en las respuestas a UV-B. De estos *targets*, 133 *loci* mostraron que este aumento de la acetilación dependía de la presencia de UVR8. Para mencionar algunos ejemplos, se encontraron los genes codificantes de FTs como *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED (HFR1), MYB DOMAIN PROTEIN 74 (MYB74) y SIGMA FACTOR E (SIG5)*; el gen que codifica a RUP2, regulador negativo de la fotomorfogénesis en respuesta a UV-B; entre otros. Es interesante que para ciertos genes como *HY5*, las diferencias en la acumulación de H3K9/14diac fueron menos prominentes en las regiones promotoras que abarcan el sitio de inicio de la transcripción (*del inglés TSS: transcription start sites*), en comparación con las regiones corriente abajo. En este locus, la unión de HY5 en su propia región promotora aumenta con el UV-B (62), mientras que UVR8 ha sido detectado tanto en la región promotora como en la región transcripta (82). Si HY5 es el reclutador físico directo de la maquinaria de acetilación, podría esperarse que la modificación ocurriera a cierta distancia del sitio de unión del FT debido a restricciones estéricas, lo cual concuerda con el patrón observado. Por otro lado, la presencia de UVR8 en la cromatina en estos

sitios distantes podría contribuir a la integridad estructural del complejo modificador de histonas al proporcionar sitios de interacción para sus subunidades periféricas. Actualmente no está claro por qué solo algunos *loci* y no otros han mostrado la interacción UVR8-cromatina en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (82), pero como sucede con muchas pruebas, las inmunoprecipitaciones tienen ciertos límites de detección que pueden pasar por alto algunas uniones a la cromatina débiles y/o transitorias. Por lo tanto, sigue sin estar claro si la asociación observada de UVR8 con la cromatina tiene un significado funcional.

Para comprender la naturaleza de la participación de UVR8 en los procesos epigenéticos que regula, Velanis y col. también investigaron la posibilidad de interacciones físicas directas con acetiltransferasas de histonas (del inglés: *histone acetyltransferases*, HACs) y las deacetilasas de histonas (del inglés *histone deacetylases*, HDACs). En *Arabidopsis*, hay al menos 10 HACs diferentes y se agrupan en cuatro (87) o cinco (88) familias. Como resultado, no se detectaron interacciones físicas directas en ensayos de doble hibrido en levaduras. De manera similar, no se observaron interacciones con HY5. Estos resultados negativos podrían ser una consecuencia del hecho de que la acetilación y/o desacetilación de histonas se lleva a cabo comúnmente mediante complejos proteicos grandes, donde las subunidades con la actividad catalítica real están rodeadas por numerosas proteínas adaptadoras que contribuyen a la estabilidad estructural del complejo.

5.4. Acetilación de histonas en plantas

En las células eucariotas, el ADN genómico se empaqueta con histonas para formar una estructura compleja conocida como cromatina. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma, que consta aproximadamente de 146 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas que contiene dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las colas N-terminal de las histonas experimentan diversas modificaciones post-traduccionales, incluyendo acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación y sumoilación (89). Entre los diferentes tipos de modificaciones de histonas, la acetilación/desacetilación reversible de histonas es clave para la conversión entre estados permisivos y represivos de la cromatina en un contexto de eucromatina-heterocromatina facultativa (90). Se ha observado que los residuos de lisina (K) N-terminales de las histonas H3 (K9, K14, K18, K23 y K27) y H4 (K5, K8, K12, K16 y K20) son blanco de acetilación y desacetilación en plantas (91).

En general, la hiperacetilación de histonas relaja la estructura de la cromatina y se asocia con la activación transcripcional, mientras que la hipoacetilación de histonas induce la

26

compactación de la cromatina y la represión génica (92). La acetilación y desacetilación de histonas son catalizadas por las ya mencionadas HACs y HDACs (Figura 4), respectivamente.



Figura 4: La acetilación y desacetilación de histonas en la regulación génica. La acetilación y desacetilación reversibles de las colas N-terminales de las histonas son catalizadas por las acetiltransferasas de histonas (HACs) y las deacetilasas de histonas (HDACs), respectivamente. En general, la hiperacetilación de histonas suele inducir una estructura de cromatina "abierta" y se asocia con la activación génica, mientras que la hipoacetilación de histonas a menudo se correlaciona con una cromatina "cerrada" y la represión génica. *Figura modificada de Liu* (89).

5.4.1. Acetiltransferasas de histonas

La acetilación implica la transferencia de un grupo acetil desde el acetil-CoA al grupo εamino de una lisina. La adición de grupos acetil a una cadena lateral de aminoácidos puede neutralizar cargas positivas, cambiar el tamaño total del aminoácido y alterar la hidrofobicidad local. La acetilación de una lisina también genera sitios de unión para otras proteínas; por ejemplo, las proteínas que contienen bromodominio se unen específicamente a lisinas acetiladas (93).

Según la caracterización de secuencias, las HACs de plantas pueden dividirse en cuatro categorías: (1) HACs de la familia p300/CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc), (2) HAF de la familia del factor asociado a la proteína de unión al TATA (TAF_{II}250), (3) HAG para la familia de la acetiltransferasa N-terminal relacionada con el control general no represible 5 (GNAT), y (4) HAM para la familia MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60 (MYST) (87).

5.4.2. El rol de la acetilación de histonas en la fotomorfogénesis

La luz es una de las señales externas más importantes que rige en el crecimiento y desarrollo de las plantas a lo largo de todo su ciclo de vida, desde la germinación hasta la floración (94). En la oscuridad, las plántulas experimentan la escomorfogénesis, un proceso

caracterizado por hipocotilos alargados, cotiledones cerrados, ganchos apicales y cloroplastos no diferenciados. Al ser irradiadas con luz, las plántulas experimentan el desarrollo fotomorfogénico, un proceso que incluye la apertura de cotiledones, la represión del alargamiento del hipocotilo y la biosíntesis de cloroplastos maduros (95).

Las señales de luz son percibidas por un conjunto de fotorreceptores para regular la expresión génica y el crecimiento de las plantas. Evidencia emergente establece una relación entre modificaciones de acetilación de histonas y la expresión génica sensible a la luz. Por ejemplo, la expresión regulada por la luz del gen de la plastocianina PetE en arveja (Pisum sativum) está específicamente asociada con la acetilación de las histonas H3 y H4 (96). En Arabidopsis, la acetilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) de los genes sensibles a la luz está regulada de manera cooperativa por cambios en las condiciones de luz (97). A su vez, las mutaciones en los genes que codifican a las HACs GCN5 y HAF2 conducen a una reducción en la expresión génica sensible a la luz, mientras que las mutaciones en la HDA19 inducen efectos opuestos (98,99). La pérdida de la función de HDA19 en plántulas de Arabidopsis resulta en un fenotipo de hipocotilo corto, mientras que las mutaciones en GCN5 inducen un fenotipo opuesto bajo condiciones de luz roja, roja- lejana y azul, lo que sugiere que las HDAC y HAC pueden actuar de manera antagónica para regular el alargamiento del hipocotilo en la fotomorfogénesis (99). Los análisis moleculares y genéticos mostraron que GCN5 tiene un efecto epistático hacia HY5 (99). Más recientemente, se demostró que HDA19 es necesario para la represión de PHYA durante el cambio luz-oscuridad al disminuir los niveles de acetilación de histonas H3K9 y H3K14 (100), lo que sugiere que HDA19 puede regular el crecimiento del hipocotilo al reprimir directamente la transcripción de fitocromos.

5.4.3. La familia de acetiltransferasas de histonas CBP/p300 de A. thaliana

El genoma de *Arabidopsis* codifica cinco proteínas HAC de la familia CBP/p300 (HAC1, HAC2, HAC4, HAC5 y HAC12). Entre estas, se demostró que HAC2 y HAC4 no tienen actividad acetiltransferasa. Por otro lado, se ha demostrado que el dominio catalítico de HAC1 se conserva respecto al p300/CBP humano y muestra actividad acetiltransferasa *in vitro*, al igual que HAC5 y HAC12 (101).

En concordancia con la participación de las HACs en varios procesos de desarrollo de plantas, se ha demostrado que la inactivación del gen *HAC1* afecta tanto al desarrollo vegetativo como reproductivo en *Arabidopsis*. De hecho, las mutaciones en *HAC1* conducen a un fenotipo de floración tardía y a defectos de desarrollo pleiotrópicos, como raíces primarias cortas y fertilidad reducida (102). Interesantemente, la triple mutante *hac1hac5hac12*, muestra

28

fenotipos pleiotrópicos asociados con hipersensibilidad al etileno tanto en condiciones de oscuridad como de luz. De manera consistente, el doble mutante *hac1hac5* muestra una mayor expresión de los genes *FACTOR DE RESPUESTA AL ETILENO (ERF), ERF1, ERF4, ERF6 y ERF11*, sugiriendo así que las HACs están involucradas en la vía de señalización del etileno (27)(103). En particular, HAC1 actúa aditivamente con MED25, una subunidad del complejo Mediador, y regula la transcripción durante la señalización del JA (104). Más recientemente, se ha demostrado que tanto HAC1 como HAC5 son reclutados por las subunidades MED8 y 25 al complejo Mediador, y estos factores HAC y MED cooperan en el control del represor de la floración, *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, a través de la regulación positiva del gen inductor de la floración, *GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7 (GRP7)* (105).

5.5. Apertura estomática

Los estomas son estructuras epidérmicas de las hojas compuestas por dos células de la guarda (CG) que rodean un poro. Los estomas actúan como válvulas en la superficie de la hoja, controlando simultáneamente la captación de dióxido de carbono (CO₂) para la fotosíntesis y la pérdida de agua por transpiración. La hinchazón (aumento de la turgencia debido a la entrada de agua) de las CG resulta en la apertura estomática, mientras que la contracción (disminución de la turgencia debido a la salida de agua) de las CG provoca el cierre estomático. Cambios en el contenido de osmolitos de las CG y la apertura estomática están regulados por señales internas (por ejemplo, el reloj circadiano), señales bióticas (106), y diversos factores ambientales, incluyendo la luz, la concentración de CO₂, la sequía y la temperatura (107).

La conductancia estomática (g_s) es una medida del grado de apertura estomática, reflejando la capacidad de los estomas para intercambiar CO₂ y vapor de agua con el entorno. Está bien establecido que una alta g_s se correlaciona con tasas más altas de fotosíntesis, mientras que una baja g_s restringe la difusión de CO₂ lo que resulta en una biomasa y rendimiento afectados (108). A su vez una g_s alta puede conllevar un mayor riesgo de pérdida de agua a través de la transpiración, especialmente en escenarios de estrés hídrico.

Los cambios en el potencial osmótico de las CG son controlados por varios transportadores de iones y aniones localizados en la membrana plasmática (MP) (109). Las ATPasas de la MP bombean H⁺ fuera de las CG y causan una hiperpolarización de la MP, lo que resulta en la captación de K⁺ a través de canales sensibles al voltaje. A su vez, la acumulación de K⁺ dentro de las CG impulsa la entrada de agua, lo que resulta en un aumento de la turgencia y en la apertura estomática. En contraste, el canal de aniones de tipo S (SLAC1) media la salida de

Cl⁻ y NO³⁻ a través de la MP de las CG, lo que resulta en una despolarización de la MP y en la salida neta de K⁺ desde las CG, y finalmente en el cierre estomático (110).

Las plantas experimentan cambios diurnos en la calidad e intensidad de la luz que afectan el movimiento estomático (108). La apertura estomática inducida por la luz se puede dividir en dos vías diferentes, las que incluyen las respuestas a la luz roja y las respuestas a la luz azul. La apertura estomática es inducida principalmente por la luz azul monocromática (400-500 nm), y en menor medida por la luz roja (680 nm) o roja-lejana (730 nm) (111).

Diferentes longitudes de onda de la radiación solar son detectadas por múltiples fotorreceptores de plantas, incluyendo los criptocromos (CRY1/2) que absorben luz azul/ultravioleta-A y las fototropinas (PHOT1/2), los fitocromos que absorben luz roja/roja-lejana (phyA-E), y el fotorreceptor que absorbe UV-B (UVR8) (107). Se ha demostrado que PHOT1 y PHOT2 son los principales fotorreceptores específicos de luz azul en las células de la guarda que modulan el movimiento estomático. Los mutantes *phot1phot2* en *Arabidopsis* muestran estomas cerrados y una respuesta atenuada a la luz azul (112). CRY1 y CRY2 también desempeñan funciones en la apertura estomática inducida por la luz azul, actuando de manera independiente de PHOT. El mutante doble *cry1cry2* tiene una apertura estomática reducida; sin embargo, sus estomas son sensibles a la luz azul a una tasa de fluencia muy baja en comparación con los mutantes dobles *phot1phot2* (111). Entre los cinco miembros de fitocromos (phyA–E) en *Arabidopsis*, se demostró que phyB media la apertura estomática bajo luz roja. Los mutantes de *phyB* muestran una apertura estomática disminuida al crecer bajo LB o roja en comparación con el tipo salvaje, mientras que la sobreexpresión de *phyB* confiere poros estomáticos más abiertos (113).

5.5.1. La luz UV-B inhibe la apertura estomática

Generalmente, el pico de intensidad de la luz UV-B está estrechamente correlacionado con el de la luz azul y roja, durante el cual los estomas tienden a estar abiertos y la fotosíntesis es más activa. Se asume que la señalización de la luz UV-B opera como un mecanismo de vigilancia para prevenir una apertura estomática excesiva y, por lo tanto, reducir la pérdida de agua por transpiración. El fotorreceptor UVR8 media una vía de señalización específica de UV-B que regula diversos procesos de autoprotección, como el enrollamiento hacia abajo de las hojas y el cierre estomático (114).

En primer lugar, la luz UV-B induce la producción y acumulación de ABA, peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y óxido nítrico (NO), todos los cuales están involucrados en la promoción del cierre estomático (115). De manera paralela, la percepción de UV-B por el dímero UVR8 induce la interacción del monómero UVR8 con COP1 en el núcleo, lo que resulta en la expresión

aumentada de *HY5* y *HYH* (48). También se sabe que HY5 y HYH promueven la generación de NO mediante la modulación positiva de la expresión y actividad de la NITRATO REDUCTASA (NR). El NO juega un papel central en la regulación del cierre estomático al mejorar la actividad de los canales de aniones (SLAC1) y al suprimir la actividad de los canales de K⁺ (115). Cabe destacar que el NO es capaz de inhibir la apertura estomática inducida por la luz azul (116), lo que indica que la luz UV-B es capaz de antagonizar la apertura estomática inducida por la luz azul.

6. Objetivos

Objetivo general

• Caracterizar la interacción de UVR8 y HAC5 con el ARNs largo no codificante APOLO y su rol en la determinación de la configuración dinámica tridimensional de la cromatina en plantas.

Objetivos Específicos

- Caracterización de la interacción entre las proteínas y el ARNInc *APOLO* de *Arabidopsis thaliana*, en diferentes sistemas.
- Caracterización de los complejos ribonucleoproteicos a nivel bioquímico y celular.
- Determinación del rol de UVR8 y HAC5 en la conformación espacial de los *loci* regulados por estos complejos.
- Dilucidación del impacto de UVR8 y HAC5 en la organización global del núcleo eucariota.

7. Materiales y métodos

7.1. Plásmidos

pENTR[™]/D-TOPO[®]: se utilizó como vector de entrada (Life Technologies) que permite el clonado direccional de productos de PCR con extremos romos. Para tal fin, es necesario agregar la secuencia de 4 nucleótidos CACC, en el extremo 5' del cebador sentido, complementario al extremo sobresaliente GTGG del vector, permitiendo una única orientación de clonado. El mismo se provee lineal y contiene en cada extremo una enzima Topoisomerasa I unida covalentemente que liga el fragmento de PCR al vector. Este vector también es compatible con el sistema Gateway, permitiendo así la recombinación a diferentes vectores de destino. Como marcador de selección en *Escherichia coli*, posee el gen de resistencia a kanamicina.

pGGZ193 y pGGZ194: son vectores derivados de la serie pGREEN (117) utilizados como vectores de destino para fusionar el extremo 5' o 3' de un gen de interés a la proteína verde fluorescente (conocida por su abreviatura en inglés *GFP: green fluorescent protein*). Poseen dos orígenes de replicación, siendo uno de ellos para *E. coli* y otro para *Agrobacterium tumefaciens*, posibilitando la infección de plantas. Además, poseen el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S CaMV (35S), el cual dirige la expresión constitutiva y ectópica del gen en estudio, el gen de resistencia a espectinomicina para seleccionar en *E. coli* y el de kanamicina para aislar las plantas que fueron transformadas eficientemente.

pGGZ195-198: también son vectores derivados de la serie pGREEN (117) utilizados como vectores de destino para fusionar el extremo 5' o 3' de un gen de interés a la proteína amarilla fluorescente (conocida por su abreviatura en inglés *YFP*: *yellow fluorescent protein*). Al igual que los anteriores, poseen dos orígenes de replicación para *E. coli* y para. Y tambien poseen el promotor 35S y los genes de resistencia a espectinomicina para *E. coli* y el de kanamicina para plantas.

7.2. Cepas bacterianas

Los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *E. coli* DH5α [supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1] (118). Para la transformación de *Arabidopsis thaliana* se empleó la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 [C58 (rif r) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentr) Nopaline]. Esta cepa contiene el plásmido Ti tipo nopalina pMP90 (pTiC58DT-DNA) sin la función propia de transporte, pero el T-DNA del vector binario puede transferirse correctamente. El plásmido pTiC58DT-DNA contiene los genes VIR y resistencia a gentamicina. La cepa presenta resistencia cromosomal a rifampicina (119).

Materiales y métodos

7.3. Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos

Todas las líneas de Arabidopsis thaliana son del ecotipo Col-0. Las líneas OE APOLO 1 y 2, CRISPR APOLO 1 y 2, proAPOLO:GUS:GFP y OE WRKY42 (15,20,28,120) estaban disponibles en nuestro laboratorio. Las semillas mutantes hy5-ks50 y Pro35S:HY5 (121) fueron proporcionadas gentilmente por el Dr. Raul Cassia de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Las mutantes uvr8-6 (SALK 033468), uvr8-2 (SALK 072594), wrky42 (SALK_121674C), hac5-3 (SALK_152684), hac-4 (SALK_122443) fueron solicitadas al Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Ohio State University, USA. Las plantas Pro35S:GFP:UVR8 y Pro35S:GFP:HAC5 se generaron a través de la transformación mediada por A. tumefaciens (cepa EHA105) (122) en fondos Col-0 y CRISPR APOLO 1. Se seleccionaron dos líneas independientes de transformantes que albergaban GFP:UVR8 o HAC5 en medio semisólido Murashige and Skoog (MS) (SigmaAldrich) 0,5X (pH 5,7) y agar al 0,6% (p/v) complementado con kanamicina (40 μg/ml).

Para germinar las semillas de *A. thaliana* en placas, se las desinfectó con etanol 70% (v/v) por 5 min, luego por 30 min con una mezcla de hipoclorito de sodio 10% (v/v) y SDS 0,1% (p/v), y se las lavó 4 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas fueron resuspendidas en una solución de agar 0,1% (p/v) estéril, estratificadas en oscuridad a 4º C por 2-3 días, y sembradas en las placas de Petri conteniendo medio MS-Agar y antibiótico si correspondiese. El proceso anteriormente descripto se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo de aire laminar. Alternativamente, las plantas *A. thaliana* fueron cultivadas en macetas (837 cm³) con sustrato Klassman a 23°C en condiciones de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) con una intensidad lumínica aproximada de 100umol. m⁻². s⁻¹.

Para el estudio de la apertura de estomas, se incubaron tiras de epidérmis de hojas de 3 semanas de edad en un buffer de apertura (MES 10 mM y KCl 10 mM, pH 6,1) y luz blanca (LB) durante 3 horas y luego se expusieron a LB suplementada con 1 Wm⁻² de UV-B (311nm; lámparas Phillips de banda estrecha TL 100W/01) durante 3 horas. Los resultados se expresan como el promedio de 100 estomas observados con el software ImageJ.

Para ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), ARN (RIP), duplex ADN-ARN (DRIP) y aislamiento de cromatina mediante purificación de ARN (ChIRP) las plántulas se cultivaron durante 3 semanas a 23 °C y se trataron con LB suplementada con UV-B.

7.4. Construcciones

Las regiones codificantes de UVR8 (AT5G63860) y HAC5 (AT3G12980) fueron aisladas de plantas de *Arabidopsis* mediante PCR. Luego, estas fueron clonadas en el plásmido pENTR[™]/D-TOPO[®]. A su vez, estas secuencias se fusionaron a GFP y YFP mediante recombinación con la

serie de plásmidos pGGZ mencionados en el punto 6.1. Las construcciones generadas con sus descripciones se alistan en la Tabla 1. Los cebadores utilizados para los clonados se alistan en la Tabla 2.

7.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en

Cadena de la Polimerasa)

La amplificación de fragmentos de ADN para clonados, análisis de mutantes insercionales, líneas transgénicas, y chequeo de construcciones obtenidas ya sea directamente sobre colonias de bacterias transformadas o sobre ADN plasmídico, se llevó a cabo mediante PCR. En cada reacción se utilizó solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, dNTPs 0,2 mM y 0,4 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y luego se le agregó 0,3 uL de enzima Taq ADN polimerasa (Transgen Biotech) para reacciones de chequeo, o Pfu ADN polimerasa (Thermo Scientific) para amplificaciones de fragmentos que fueron luego clonados. Los volúmenes finales de reacción fueron de 20 µL, o 50 µL para amplificaciones de fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) y en general se utilizó el siguiente programa: (30 s 94° C, 30 s [Tm - 5]º C, t a 72° C) x 30 ciclos + 10 minutos a 72° C, donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados [Tm=2(A+T) +4(G+C)], y el tiempo (t) de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. Para las reacciones con Taq ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar, mientras que para Pfu ADN polimerasa el tiempo estimado fue de 2 min por cada 1000 pb. Los productos de amplificación fueron resueltos y visualizados en geles de agarosa.

7.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de amplificación de ADN obtenidos por PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para ello, se preparó agarosa en solución amortiguadora TAE 1X (Tris 5,5 g/L, EDTA 0.75 g/L, ácido acético glacial 0,1% [v/v]) en una concentración de 1 al 2 % (p/v) de acuerdo al tamaño de los fragmentos a separar. Los productos de amplificación se suplementaron con 1/10 de volumen de solución de siembra de ADN (Glicerol 30% (v/v), Xylen cianol 0,25% (p/v), Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y Gel Red 1/1000 (Biotium®) y luego fueron sembrados en el gel de agarosa. La corrida electroforética se llevó a cabo a un voltaje constante entre 1 y 5 V/cm de gel durante 20-40 min. Para corroborar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se sembró el marcador de peso molecular de ADN

Trans2K[®] Plus II (Transgen Biotech). Una vez finalizada la separación electroforética, la visualización de los fragmentos de ADN se realizó en un transluminador de luz UV ENDURO GDS (Labnet, CA, USA).

7.7. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación del fragmento de ADN luego de una corrida electroforética se realiza con el objetivo de purificarlo para proceder con el proceso de clonado. Para ello, se cortó la banda de interés del gel de agarosa y se realizó la extracción del producto de PCR utilizando el kit comercial GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

7.8. Clonados en vectores de entrada y vectores destino

Para los clonados en los vectores de entrada, en primer lugar, se obtuvieron los productos de amplificación mediante PCR con la enzima *Pfu* ADN polimerasa para reducir la incorporación de mutaciones durante la amplificación. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa y purificados. Luego, para obtener los vectores de entrada, después de la purificación de los fragmentos, se siguió el protocolo descripto por el fabricante de cada vector en particular. Brevemente, se mezclan 2,3 µL del producto de PCR purificado, 0,2 µL del vector de entrada pENTR™/D-TOPO®, y 0,5 µL de solución salina provista con el vector. Se incubó a temperatura ambiente de 30 min a 2 h, y se transforman células de *E. coli* electrocompetentes. Luego de 24 hs de crecimiento de las bacterias a 37°C, se procedió al chequeo de las mismas mediante PCR de colonia.

Una vez confirmados los clones positivos, se realizaron minipreparaciones del ADN plasmídico y se procedió con los clonados por recombinación Gateway en los vectores de la serie pGGZ193-198 mencionados anteriormente. Los mismos se realizaron utilizando la enzima LR Clonase^M (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclan 150 ng del vector de entrada con el fragmento a recombinar, 100 ng del vector destino, 0,5 µL de LR Clonase^M, y se lleva a volumen final 3 µL con solución amortiguadora TE 1X. Se incuba a temperatura ambiente de 2 a 4 h, y se procede a la transformación de bacterias.

7.9. Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico

La preparación de células de *E. coli* competentes para trasformación por el método de electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El pulso eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) ajustando las variables de electroporación según las
recomendaciones del fabricante. Inmediatamente luego del choque eléctrico, las células de *E. coli* se recuperaron en 1 mL de medio LB (Peptona de carne 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. A continuación, el cultivo de células se centrifugó a 1500 g durante 5 min y el sedimento celular se resuspendió en 100 µL de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar (Medio LB, agar 15 g/L) suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron durante toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37 °C. Finalmente, se realizó PCR en colonia como se describió anteriormente, con el fin de identificar colonias transformadas con la construcción de interés. Las colonias que fueron positivas (la PCR amplificó un fragmento del tamaño correcto), fueron repicadas en medio LB líquido para realizar posteriormente minipreparación de ADN plasmídico.

7.10. Transformación de bacterias de A. tumefaciens con ADN

plasmídico

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens*, se tomaron células competentes a las que se les adicionó 1 μ L del plásmido de interés. Inmediatamente luego del pulso eléctrico en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad), las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB y se incubaron durante 2 horas a 28 °C. A continuación, se centrifugaron a 1500 g durante 5 min y el pellet fue resuspendido en 100 μ L de medio LB. Se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado los antibióticos correspondientes al plásmido con el que se transformó. Las placas fueron incubadas a 28 °C hasta la aparición de colonias (48-72 h). Para la identificación de las colonias transformadas se realizó PCR en colonia siguiendo la misma metodología explicada para *E. coli*.

7.11. Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* transformadas se realizó según el método de lisis alcalina (123). Las células transformadas se cultivaron hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 min, y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución l de minipreparación (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de solución II de minipreparación (NaOH 0,2 N; SDS 1% [p/v]), los tubos se agitaron por inversión y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de solución III (KAc 5 M [pH 5,2]) y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 min antes de ser centrifugada a 13000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se le

realizó una extracción con 1 volumen de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó por 10 min a 10000 g y temperatura ambiente, y el ADN plasmídico presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol frío. La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 h y posteriormente se centrifugó a 13000 g por 10 min a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 μ l de etanol 70% (v/v) para eliminar las sales, y se centrifugó por a 13000 g por 5 min a 4 °C. Luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 30 μ l de agua bidestilada estéril. Para los casos en que fue necesario eliminar el ARN, las minipreparaciones se trataron con ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 μ g/ μ L a 37 °C por 1 h. Para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad para reacciones de determinación de secuencia o para la purificación de vectores con fines de clonado y transformación, se realizaron minipreparaciones con el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) siguiendo

las instrucciones del fabricante.

7.12. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

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

7.13. Extracción de ADN genómico de plantas de A. thaliana

Se pulverizó el material con nitrógeno líquido en un mortero y el polvo congelado se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL. Se agregó a cada tubo una de solución CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CTAB] 2% [p/v], NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, Polivinilpirrolidona [PVP] 1% [p/v]) y 5 μ L de ARNasa A 100 mg/mL (Promega) y se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló por completo. Luego se incubó por 30 min a 65 °C en un baño de agua, mezclando por inversión cada 5 min. Luego de 15 min de incubación, se suplementó cada tubo con 12 μ L de β -mercaptoetanol, se mezcló y se dejó incubando a 65 °C los restantes 15 min. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min, luego de lo cual, se agregó 6 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitó hasta emulsión completa, y se centrifugó a 3000 g durante 20 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se mezcló con 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), y se centrifugó a 3000 g durante 20 min a 4 °C.

volumen de isopropanol para precipitar el ADN genómico, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 3000 g durante 10 min. A continuación, se lavó el pellet de ADN con 5 mL de etanol 70% (v/v), se centrifugó nuevamente a 3000 g por 5 min, y se dejó secar completamente el pellet de ADN. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 200 µL de TE 1X pH 8,0, se agregó 0,5 µL de ARNasa A 100 mg/mL (Promega), y se incubó a 55 °C por al menos 30 min. Por último, se centrifugó a 3000 g por 2 min para eliminar sedimentos no disueltos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

7.14. Inmunoprecipitación de la cromatina

Para los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), las plantas de Arabidopsis se cultivaron en tierra durante 3 semanas. El ensayo de ChIP se realizó como se describe en (15) utilizando anticuerpos anti-GFP (Abcam ab290), anti-HA (Abcam ab9110) y anti-IgG (Cell Signaling #2729). Después del entrecruzamiento, la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; 10 ciclos de: 30 s prendido / 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C con Proteína A o G Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos correspondientes. El ADN inmunoprecipitado se recuperó mediante extracción con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. La cuantificación de las regiones genómicas inmunoprecipitadas se realizó mediante qPCR usando los cebadores enumerados en la Tabla 2 y el kit comercial iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar se procesó en paralelo y se consideró como la muestra de entrada (INPUT).

7.15. Inmunoprecipitación del ARN

Los ensayos de inmunoprecipitación del ARN (RIP) se realizaron en plantas estables *A*. *thaliana* con la construcción *35S:GFP:UVR8* de 3 semanas de edad como se describe en (16) y en hojas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente como se describe en (124), utilizando los anticuerpos anti-GFP (Abcam ab290) y anti-IgG (Cell Signaling #2729). Después del entrecruzamiento, la extracción y lisis de los núcleos, la cromatina se sonicó en un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; 3 ciclos de: 30 s prendido / 30 s apagado, pulsos de baja intensidad, en microtubos Bioruptor). Para la inmunoprecipitación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C con Proteína A Dynabeads (Invitrogen) recubiertas con los anticuerpos correspondientes. Los ARN precipitados se prepararon utilizando el reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich), se trataron con la ADNasa RQ1 (Promega) y se sometieron a RT-qPCR; los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 2. Los ARN totales se procesaron en paralelo y se consideraron como la muestra de *INPUT*.

7.16. Inmunoprecipitación ADN-ARN

La inmunoprecipitación del dúplex ADN-ARN (DRIP) se realizó como se describe en (20). Se utilizaron plántulas sin entrecruzar para la purificación de núcleos, y las muestras se sonicaron utilizando un baño de agua Bioruptor Pico (Diagenode; pulsos de 30s on/ 30s off, a alta intensidad durante 4 ciclos). Las muestras de cromatina se incubaron con 50 ml de Protein G Dynabeads lavadas y recubiertas previamente con 1 mg de anticuerpo S9.6 (Millipore MABE1095) durante 16 h a 4 °C. Las muestras tratadas con ARNasa H (Invitrogen) durante 2 h a 37 °C se utilizaron para DRIP en paralelo como control negativo. Tras el lavado, se recuperó el ADN y se llevaron a cabo reacciones de qPCR sobre el *locus* de interes (los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 2).

7.17. Aislamiento de la cromatina mediante purificación del ARN

El aislamiento de la cromatina mediante purificación del ARN (ChIRP) se realizó como se describe previamente en (20). Se utilizaron plántulas entrecruzadas con UV las que se molieron y luego se aislaron los núcleos. Luego, se sonicó utilizando un baño de agua Bioruptor Plus (Diagenode; pulsos de 30 s encendido/30 s apagado, a alta intensidad durante 30 ciclos). La cromatina se diluyó en 2 volúmenes de buffer de hibridación (750 mM de NaCl, 1% SDS, 50 mM Tris 7.0, 1 mM EDTA, 15% formamida, DTT, PMSF, inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich) y Superase-in (Ambion)). Se añadieron 100 pmol de sondas a 200 µl de cromatina diluida y se incubó a 50°C durante 4 horas. Las beads de estreptavidina (Invitrogen) se lavaron tres veces en buffer de hibridación nuclear. Se añadieron 50 ul de beads lavadas, y toda la reacción (beads:sondas-biotina:ARN:cromatina) se incubó durante 60 minutos a 50°C. Después de la incubación, las beads se lavaron cuatro veces con 100 μl de buffer de lavado ChIRP (2X SSC, 0.5% SDS, DTT y PMSF). Después del último lavado, las beads se depositaron en buffer de elución (50 mM de NaHCO3, 1% SDS, 200 mM de NaCl), y el ADN se eluyó con un cóctel de 100 mg/ml de ARNasa A (Sigma-Aldrich) y 0.1 U/ml de ARNasa H (Ambion). La reversión del entrecruzamiento se realizó con proteinasa K durante 1 hora a 65°C. El ADN obtenido se recuperó utilizando fenol:cloroformo:ácido isoamílico (25:24:1; Sigma).

7.18. Aislamiento de ARN

Las extracciones se realizaron con 100 µg de tejido vegetal fresco previamente pulverizado con nitrógeno líquido, al cual se le agregó 1 mL del reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich). Se mezcló por inversión hasta que el polvo se descongeló y resuspendió completamente en el reactivo, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min en la mesada. Luego se adicionó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4º C, tomando luego la fase acuosa que se mezcló con 1 volumen de isopropanol y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, para precipitar el ARN total de la muestra, se centrifugó durante 15 min a 12000 g y 4º C y el pellet obtenido se lavó con etanol 70 % v/v. Una vez seco, el precipitado se disolvió en 30 µL de agua miliQ estéril. Por último, la calidad y concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

7.19. Transcripción reversa (RT)

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando 1µg de ARN total tratado con ADNasa RQ1 (Promega) y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos poli-dT (un nucleótido variable en el extremo 5' seguido de 18 nt de timina) para aquellos casos en los que se midieron niveles de ARNm por RT-qPCR, y se utilizaron oligonucleótidos dN6 (mezcla de oligonucléotidos de 6 pb con secuencias aleatorias) que permite amplificar cualquier tipo de ARN, incluyendo ARNs Inc.

7.20. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las RT-qPCRs (del inglés RetroTranscripted quantitative PCRs) se realizaron en un equipo StepOne (Applied Biosystems) usando los cebadores específicos enumerados en la Tabla 2 y SYBR Green Supermix (Bio-Rad). La fluorescencia fue medida a 72 °C durante 40 ciclos de PCR. Para todas las medidas se utilizaron tres réplicas biológicas independiente. La expresión de los genes se calculó utilizando el método ΔΔCt utilizando como genes de referencia *ACTINA2* (AT3G18780) o *SAND* (AT2G28390) para la normalización de los niveles de expresión de los transcriptos analizados. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante un análisis de prueba T no pareado. Aquellos p-valores menores que 0.01 fueron marcados en las figuras como *, mientras que los valores inferiores a 0.001 como **.

7.21. Transformación estable de plantas de *A. thaliana* por inmersión floral

Las plantas de A. thaliana fueron transformadas por el protocolo de "floral dip" descripto previamente por Clough y Bent, 1998 (122). Las plantas se cultivaron hasta la entrada en estado reproductivo donde la primera vara floral emergente fue cortada para estimular el nacimiento y desarrollo de varas secundarias. Las plantas fueron crecidas hasta floración en las condiciones descriptas anteriormente. Cuando el número de inflorescencias y calidad de las flores fue el adecuado, se procedió a la transformación. Para esto se utilizaron células de la cepa de A. tumefaciens transformadas con el plásmido binario de interés, según la metodología descripta anteriormente. Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron durante 16 horas a 28 °C con agitación células de A. tumefaciens en frascos que contenían 3 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Estos cultivos se utilizaron para inocular un Erlenmeyer que contenía 200 mL del mismo medio suplementado con antibióticos. Las células se cultivaron hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28 °C, con agitación). Luego se precipitaron por centrifugación a 5500 g durante 20 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en 200 mL de una solución de sacarosa 5% que contenía 40 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialties, Inc.) y esta suspensión se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético. Las plantas se sumergieron entre 30 y 60 segundos, tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra y hojas. Luego, las macetas fueron ubicadas en posición horizontal en una bandeja, se taparon con film adherente y se llevaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se colocaron en posición vertical y se cultivaron hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6-8 semanas de la siembra). Cuando las silicuas se secaron y se tornaron de un color marrón claro, se colectaron las semillas y se guardaron en cámara fría (4°C) para su posterior selección y análisis.

7.22. Transformación transitoria de plantas de N. benthamiana por

agroinfiltración

Se crecieron las bacterias *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones de interés en medio YEB inducido (1g/L extracto de levadura, 5g/L extracto de carne, 5 g/L peptona, 5 g/L sacarosa, 0.5 g/L MgSO4.7H2O, 10 g/L agarosa, 1 g/L NH4Cl, 0.15 g/L KCl, 0.01 g/L CaCl2, 0.0025 g/L FeSO4.7H2O, 50mM buffer fosfato pH 5.5, 20% Glucosa, 1M MES, 200 mM acetosiringona) a 28 °C durante 24 a 36 horas. Las células se rasparon y se resuspendieron en 500 μ L de solución de lavado (10 mM MgCl2, 100 mM acetosiringona). Después de agitar

brevemente, 100 µL de bacterias resuspendidas se diluyeron 10 veces para medir la OD₆₀₀. Finalmente, las bacterias se diluyeron a una OD₆₀₀ de 0,5 en solución de infiltración (1/4 MS [pH = 6,0], 1% sacarosa, 100 mM acetosiringona, 0.005% Silwet L-77 [v/v, 50 ml/l]). En todas las transformaciones transitorias que se realizaron, se incluyó una construcción que expresa la proteína viral p19, la cual actúa suprimiendo el silenciamiento mediado por ARNs pequeños mediante la captura de ARNs pequeños de 21-25 nucleótidos, inhibiendo su función (125,126). Las bacterias se infiltraron en la cara abaxial de hojas de tabaco con una jeringa de plástico de 1 mL, luego de lo cual se mantuvieron durante 1 hora en luz para permitir que las hojas se sequen. Posteriormente, se mantuvieron en oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, las plantas transformadas se transfirieron nuevamente a la cámara de cultivos durante otros 2 a 3 días antes de la recolección de muestras y/o microscopía.

7.23. Tinción histoquímica GUS

Las hojas fueron recolectadas e incubadas con solución de tinción (2 mM de solución reguladora de Potasio-Ferricianuro, 2 mM solución reguladora de Potasio-Ferricianuro, 0,2% Triton X-100, 50 mM NaPO4 pH7.2, 2 mM X-gluc). Luego fueron infiltradas al vacío durante 5 minutos e incubadas en oscuridad a 37°C durante toda la noche. Para la decoloración, se realizaron lavados sucesivos con etanol (20%, 30%, 50%) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, las muestras fueron incubadas en etanol 70% hasta que la clorofila se removió completamente.

7.24. Extracción de proteínas totales de A. thaliana

Se procesaron aproximadamente 100 mg de plántulas de 15 días de *A. thaliana* las cuales fueron pulverizadas en nitrógeno líquido. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de solución de extracción de proteínas (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM, y una tableta del Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). Luego se centrifugó durante 20 min a 16000 g y 4 º C, y finalmente se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio, teniendo así los extractos proteicos. La concentración de proteínas totales en las muestras se determinó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Invitrogen). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro Novaspec Pro (Biochrom).

7.25. Separación de proteínas y análisis por Western blot

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo en geles verticales, según lo descrito previamente (127). Las proteínas fueron separadas en geles de resolución con una concentración final de acrilamida del 8% (p/v) y geles apiladores con una concentración del 6% (p/v). Los extractos proteicos a analizar fueron mezclados con solución de carga Laemmli 5X (325 mM Tris-HCl pH 6,8; 50% [v/v] glicerol; 10% [p/v] SDS; 0,05% [p/v] azul de bromofenol; 5% [v/v] β -mercaptoetanol) en una relación 5:1 y luego incubados a 95° durante 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas. A continuación, se realizó la electroforesis en una solución de corrida 1X (25 mM Tris-Base; 250 mM glicina; 0,1% [p/v] SDS). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana Hybond-ECL (GE Healthcare), previamente activada con metanol al 100%, mediante el método estándar de transferencia húmeda en una solución de transferencia 1X (48 mM Tris-Base; 39 mM glicina; 20% [v/v] metanol). Para determinar el peso molecular de las bandas y verificar la eficiencia de transferencia, se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Luego, la membrana fue bloqueada en una solución de leche en polvo al 5% (p/v) en TBS-T 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo policional contra GFP (Agrisera AS152987) en una dilución 1:5000 y, después, con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante. La detección se llevó a cabo utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal[®] West Pico (Pierce). Como control de carga, se utilizó la proteína de referencia ACTINA 8 (Agrisera AS132640) en una dilución 1:10000.

7.26. Aislamiento de protoplastos de A. thaliana

Se recolectaron hojas de *A. thaliana* de 3 a 4 semanas de edad. Se preparó una solución con 1.5% de celulasa, 0.4% de macerozima, 0.4 M de manitol, 20 mM de KCl, 10 mM de CaCl₂, 20 mM de MES (pH 5.7) y 0.1% de BSA, la cual fue filtrada para su esterilización. Las hojas se cortaron en tiras de 0.5-1 mm y se incubaron en esta solución a temperatura ambiente durante 3-4 horas, tras una infiltración con vacío de 30 minutos. Después de la digestión, la mezcla se filtró a través de un filtro de nylon de 70 μ m, y los protoplastos obtenidos se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en un buffer (0.4 M de manitol, 20 mM de KCl, 20 mM de MES, 10 mM de CaCl₂) y se lavaron dos veces. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en buffer MMG (0.4 M de manitol, 15 mM de MgCl₂, 4 mM de MES, pH 5.7) a una concentración de 1-2 × 10⁶ protoplastos/mL y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos

antes de su uso. La viabilidad se verificó mediante azul de tripano, considerando viables aquellos protoplastos que no se tiñeron.

7.27. Microscopía de escaneo láser confocal (CLSM)

Pasadas las 72h de la infiltración de protoplastos de *A. thaliana* y de hojas *N. benthamiana*, se llevó a cabo la visualización y captura de imágenes con un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Solms, Alemania). Para tal fin, las capturas se realizaron con un lente 40x, excitando las muestras con los láseres de 488 nm y 514 nm, y recolectando la emisión a 495-530 nm para GFP, 520-560 nm para YFP y 600-630 nm para DsRed, agregando una ventana de detección de 670-730 nm para la autofluorescencia de la clorofila. Luego, el procesamiento de las imágenes se realizó en el software ImajeJ.

7.28. Ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC)

El ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC) se realizó según (128). La secuencia codificante de WRKY42 se clonó en el vector pVYNE (nYFP), mientras que las secuencias codificantes de COP1 y UVR8 se clonaron en el vector pVYCE (cYFP), respectivamente. Todas las construcciones se transformaron en protoplastos de *Arabidopsis* mediante transfección mediada por PEG, siguiendo el procedimiento descrito con pequeñas modificaciones (129). Después de mezclar 100 µl de protoplastos recién aislados con 20 µg de ADN plasmídico, se añadieron 120 µl de una solución de PEG al 40% suplementada con 0.02 mM de MG132. Los tubos se invirtieron varias veces para mezclar el contenido, y las células transfectadas se examinaron utilizando un microscopio confocal de barrido láser LSM 900 (Zeiss).

7.29. Ensayo de doble híbrido en levaduras

Se utilizó el sistema de doble híbrido en levaduras para detectar interacciones proteínaproteína. Los genes codificantes de las proteínas de interés fueron clonados en los vectores pGBKT7 (con el dominio de unión al ADN) y pGADT7 (con el dominio de activación de la transcripción). Las construcciones fueron co-transformadas en la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 mediante el método de acetato de litio (LiAc). Las levaduras co-transformadas se seleccionaron en medios SD-Trp-Leu para asegurar la presencia de ambos plásmidos. Las interacciones entre las proteínas se evaluaron mediante el crecimiento en medios selectivos SD-Trp-Leu-His y SD-Trp-Leu-His-Ade.

7.30. Análisis de ChIP-Seq

Las lecturas crudas de ChIP-Seq fueron filtradas por calidad, se eliminaron adaptadores y duplicados de PCR, para luego ser mapeadas al genoma de *A. thaliana* con Bowtie2. Los archivos de salida (BAM) se procesaron para identificar picos de unión de proteínas al ADN utilizando MACS2, el cual define los sitios de unión significativos. Posteriormente, se generaron gráficos *heatmaps* para observar la distribución y enriquecimiento de las señales en regiones específicas, y se analizaron matrices de correlación entre diferentes proteínas para evaluar la similitud entre perfiles de unión.

Transgen	Descripción	Referencia
35S:GFP:UVR8	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la proteína GFP fusionada a UVR8	Este trabajo
35S:GFP:HAC5	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la proteína GFP fusionada a HAC5	Este trabajo
35S:GFP:COP1	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la proteína GFP fusionada a COP1	Este trabajo
35S:UVR8:YFPc	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región C-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de UVR8	Este trabajo
35S:COP1:YFPn	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región N-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de COP1	Este trabajo
35S:COP1:YFPc	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región C-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de COP1	Este trabajo
35S:WRKY42:YFPn	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región N-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de WRKY42	Este trabajo
35S:WRKY42:YFPc	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región C-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de WRKY42	Este trabajo
35S:HAC5:YFPn	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región N-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de HAC5	Este trabajo
35S:HAC5:YFPc	Promotor 35S dirigiendo la expresión de la región C-terminal de la proteína YFP fusionada al extremo 3' de HAC5	Este trabajo
ProADH1:GAL4AD:WRKY42	Promotor ADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de WRKY42 fusionado al dominio de activación de GAL4 (AD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.	Este trabajo

Tabla 1: Construcciones utilizadas.

ProADH1:GAL4BD:UVR8	Promotor ADH1 dirigiendo la expresión del ADNc de UVR8 fusionado al dominio de unión de GAL4	Este trabajo
	(BD) para ensayo de doble hibrido en levaduras.	Fata tushais
	Promotor ADH1 dirigiendo la expresión del ADNC	Este trabajo
PIOADHI:GAL4AD:COP1	de COPI fusionado al dominio de union de GAL4	
	(BD) para ensayo de doble hibrido en levaduras.	
	Promotor ADH1 dirigiendo la expresión del ADNc	Este trabajo
ProADH1:GAL4BD:COP1	de COP1 fusionado al dominio de unión de GAL4	
	(BD) para ensayo de doble híbrido en levaduras.	
	Promotor ADH1 dirigiendo la expresión del ADNc	(130)
Bro ADH1.CALARD.LIV/POR338A	de la variante UVR8 ^{R338A} fusionado al dominio de	
PIOADHI:GAL4BD:UVR8	unión de GAL4 (BD) para ensayo de doble híbrido	
	en levaduras.	
	Promotor de APOLO dirigiendo la expresión de	(20)
ProAPOLO:GFP:GUS	GFP y GUS para ensayos de tinción histoquímica y	
	microscopía confocal.	
	Promotor 35S dirigiendo la transcripción del gen	Este trabajo
35:GUS + DsRed cassette	que codifica a GUS y promotor CsVMV dirigiendo	-
	la expresión de la proteína roja de Discosoma	
	(DsRed)	
	Promotor 35S fusionado al gen que codifica a	Este trabajo
35:APOLO + DsRed cassette	APOLO y promotor CsVMV dirigiendo la expresión	
	de la proteína roja de <i>Discosoma</i> (DsRed)	

Tabla 2: Oligonucleótidos y sondas utilizadas. F: Forward, sentido. R: Reverse, antisentido.

Gene	Experiment	Sequence
APOLO F	RIPqPCR GFP-UVR8/HAC5	CTTCGAGGCGCTAAACAATC
APOLO R	RIPqPCR GFP-UVR8/HAC5	ACAGCGGTGCCACCTATTAC
AT1G13320 (PP2A) F	RIPqPCR GFP-UVR8/HAC5	CCTGCGGTAATAACTGCATCT
AT1G13320 (PP2A) R	RIPqPCR GFP-UVR8/HAC5	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA
AT5G11260 (HY5)	ChIP-Qpcr H3K9ac, ChIP GFP UVR8/HAC5	TCCTCTCTCTTGCTTGCTGA
AT5G11260 (HY5)	ChIP-Qpcr H3K9ac, ChIP GFP- UVR8/HAC5	AAGTCAAAGGAAGCGAGGGA
AT5G11260 (HY5)	RT-qPCR	GTTTGGAGGAGAAGCTGTCG
AT5G11260 (HY5)	RT-qPCR	TCTTGCTTGCTGAGCTGAAA
AT5G11260 (HY5)	ChIRP/DRIP qPCR APOLO	AGCGGGACTTGGGATTTACA
AT5G11260 (HY5)	ChIRP/DRIP qPCR APOLO	ATCCACCCACGTTCCAATCT
Prom APOLO F	ChIP over prom APOLO	GATTGCACTTTTCAACGCGTG
Prom APOLO R	ChIP over prom APOLO	TCCATATCTGTAATTTTGCACCCC

AT2G28390 (SAND) F	ChIP-qPCR sobre promAPOLO	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT
AT2G28390 (SAND) R	ChIP-qPCR sobre promAPOLO	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC

8. Resultados

8.1. El ARN Inc *APOLO* se asocia con el fotorreceptor de UV-B UVR8 *in vivo*

Como fue mencionado en la introducción, a través de un ensayo de aislamiento de cromatina mediante purificación de ARN seguido de la precipitación de proteínas y espectrometría de masas, identificamos complejos ribonucleoproteicos integrados por el ARN lnc *APOLO*. Se utilizaron dos conjuntos independientes de sondas de ADN biotinilado complementarias a *APOLO* (conjuntos ODD y EVEN) y sondas LacZ como control negativo (25,28). Se consideraron aquellas proteínas identificadas mediante dos lecturas en cada una de las muestras ODD y EVEN, respectivamente, y ninguna en la muestra LacZ, como potencialmente asociadas al ARN lnc *APOLO*. Entre estas proteínas encontramos al fotorreceptor de UV-B, UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8). Para validar esta interacción, decidimos transformar hojas de *Nicotiana benthamiana* de manera transitoria con construcciones de *APOLO* y *UVR8* bajo el promotor *35S:CaMV*. Por otro lado, también obtuvimos líneas estables de *Arabidopsis* que sobreexpresan a UVR8 (*355:GFP:UVR8*). Con este material, realizamos inmunoprecipitaciones de *APOLO* en las muestras inmunoprecipitadas contra *GFP:UVR8* tanto en tabaco como en *Arabidopsis* (Figura 5).



Figura 5. El ARN Inc APOLO se asocia con el fotorreceptor de UV-B UVR8 *in vivo*: Ensayo de inmunoprecipitación de ARN (RIP) en hojas de Nicotiana benthamiana (Nb) co-transformadas con fusiones APOLO y GFP:UVR8 bajo el control del promotor 35S:CaMV y, en plántulas estables Arabidopsis thaliana (Ath) con 35S:GFP:UVR8 de 3 semanas de edad, expuestas a LB suplementada con UV-B durante 15 minutos para detectar la interacción con APOLO endógeno. Los resultados se expresan como un porcentaje de la fracción de INPUT. Se emplearon anticuerpos anti-IgG como control

negativo. El ARN *PP2A* se consideró como control negativo de RIP en plantas de *Arabidopsis*. También se muestra el nivel de transcriptos del gen constitutivo *PP2A* en *Arabidopsis*.

8.1. UVR8 se une a los sitios de inicio de la transcripción de sus genes blanco

Según la bibliografía, la actividad UVR8 implica la interacción con la cromatina en los *loci* de los genes blanco a través de la unión a histonas (131). Para caracterizar mejor esta asociación, llevamos a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de secuenciación (ChIP-Seq). Identificamos aproximadamente 12000 genes blanco, que presentaban sitios de unión a UVR8 cerca de los sitios de inicio de la transcripción (TSS) (Figura 6A, Lista completa en Anexo 1). A continuación, determinamos los motivos de unión consenso de UVR8 y descubrimos que coinciden con dos secuencias de unión canónicas de los factores de transcripción pertenecientes a las familias TCP y WRKY (Figura 6B).





correspondiente. B) Principales secuencias de ADN consenso de los picos de unión de UVR8, encontrados con la herramienta MEME-ChIP (132).

8.2. UVR8 y el FT WRKY42 comparten sitios de unión a la cromatina

Si bien se propuso que UVR8 interactúa físicamente con el FT WRKY36 en el núcleo para inhibir la actividad de unión al ADN de este factor (6), nos preguntamos si este fotorreceptor también está relacionado con el FT WRKY42 que a su vez interactúa con APOLO (28). En primer lugar, llevamos a cabo un experimento de ChIP-Seq de WRKY42, que también mostró un enriquecimiento en TSSs (Figura 7A, Lista completa en Anexo 1). Una comparación entre los perfiles de unión de UVR8 y WRKY42 en todo el genoma de Arabidopsis reveló una correlación significativa (0.9; Figura 7B) y que el 66% de todos los sitios de unión de UVR8 se corresponden con las interacciones de WRKY42 (Figura 7C). Tal correlación no se observa al comparar los perfiles de LHP1, otro interactor de APOLO, con los de UVR8 y WRKY42 (-0.01 y 0.07 respectivamente, Figura 7B). Teniendo en cuenta que APOLO interactúa tanto con WRKY42 (28) como con UVR8 (Figura 5A, B) y que reconoce sus dianas mediante la formación de bucles R o R-loops, comparamos la presencia de esta conformación de ADN no B sobre las dianas de UVR8 y WRKY42, respectivamente, basándonos en conjuntos de datos disponibles públicamente (24). Sorprendentemente, en ambos casos el subconjunto de genes está significativamente enriquecido en dúplex ADN-ARN (Figura 7D), lo que apunta a un mecanismo general mediado por el receptor UV-B, el FT WRKY42 y ARNs Inc relacionados con R-loops.



Figura 7. UVR8 y el FT WRKY42 comparten sitios de unión a la cromatina: A) Patrón de distribución de la unión de WRKY42 y mapa de calor de perfiles alrededor de TSS y TES en todos los genes de *Arabidopsis*. B) Mapa de calor agrupado de los perfiles de ChIP-seq de UVR8, WRKY42 y LHP1. Las filas y columnas se agrupan según la correlación entre muestras. La intensidad del color es proporcional al valor de correlación indicado en cada celda. C) Diagrama de Venn de los genes blanco de UVR8 y WRKY42 obtenidos mediante secuenciación luego de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Seq). D) Patrón de distribución de bucles R sobre el cuerpo del gen y las regiones adyacentes para todos los genes de *Arabidopsis* (amarillo), *targets* de UVR8 (azul) y *targets* de WRKY42 (azul claro).

8.3. El ARN Inc APOLO también se asocia con COP1 in vivo

COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1) es un conocido represor de la fotomorfogénesis tanto en luz como en oscuridad, pero en presencia de UV-B, es un promotor de respuestas relacionadas a esta radiación (133). A nivel molecular, COP1 se dirige a diferentes FTs como por ejemplo HY5 para su degradación en la oscuridad. Tras la activación de los fotorreceptores por la luz visible, COP1 se inactiva y se separa físicamente de HY5, lo que permite la estabilización y activación de este factor y de los genes que responden a la luz (60).

COP1 pertenece a la superfamilia de proteínas que contienen dominio ubiquitina E3ligasa (57). Llamativamente, la interacción entre *APOLO* y la proteína VIM1 fue descripta anteriormente en nuestro laboratorio, y VIM1 también pertenece a la misma superfamilia de proteínas (25). Como las proteínas COP1 y UVR8 interactúan específicamente de forma dependiente del UV-B, nos preguntamos si *APOLO* es capaz de interactuar también con COP1. Para ello, realizamos inmunoprecipitaciones de ARN seguidos de qPCR tanto en hojas de *Arabidopsis* como en *Nicotiana* que sobreexpresan a COP1 (*35S:GFP:COP1*). En ambos casos, se obtuvieron altos enriquecimientos de los transcriptos de *APOLO* en las muestras inmunoprecipitadas contra GFP:COP1, tanto en un contexto de sobreexpresión de *APOLO* en *Nicotiana*, como con el transcripto endógeno en *Arabidopsis* (Figura 8).



Figura 8. El ARN Inc *APOLO* **se asocia con COP1** *in vivo*: Ensayo de inmunoprecipitación de ARN (RIP) en hojas de *Nicotiana benthamiana (Nb)* co-transformadas con fusiones *APOLO* y *GFP:COP1* bajo el control del promotor 35S:CaMV y, en plántulas estables *Arabidopsis thaliana (Ath)* con *35S:GFP:UVR8* de 3 semanas de edad, expuestas a LB suplementada con UV-B durante 15 minutos para detectar la interacción con *APOLO* endógeno. Los resultados se expresan como un porcentaje de la fracción de INPUT. Se emplearon anticuerpos anti-IgG como control negativo. El ARN *PP2A* se consideró como control negativo de RIP en plantas de *Arabidopsis*. También se muestra el nivel de transcriptos del gen constitutivo *PP2A* en *Arabidopsis*.

8.4. El complejo UVR8-COP1 interactúa con el FT WRKY42

Para corroborar si el complejo UVR8-COP1 interactúa con WRKY42, realizamos un ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) en protoplastos de *Arabidopsis*. Curiosamente, encontramos que tanto WRKY42 como UVR8 y COP1 forman parte de un mismo complejo en el núcleo de células vegetales (Figura 9). Por otro lado, el hecho que se observe complementación de la fluorescencia no necesariamente implica que las proteínas involucradas interaccionen directamente, sino que pueden hacerlo de forma indirecta.



Figura 9. El complejo UVR8-COP1 interactúa con el FT WRKY42: Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* transformados transitoriamente. Los dominios N y C terminal de la proteína YFP se fusionaron con UVR8, COP1 y WRKY42. En ambos paneles, se muestran imágenes de campo brillante (BF) (izquierda), fluorescencia YFP (centro) e imágenes fusionadas o *merge* (derecha). Barras de escala: 50 um

Para evaluar qué tipo de interacciones existen entre UVR8, COP1 y WRKY42, realizamos ensayos de doble híbrido en levaduras. Este resultado demostró que WRKY42 interactúa con COP1 pero no así con UVR8 (Figura 10). La combinación AD-COP1/BD-UVR8 sumado al tratamiento con UV-B se utilizó como control positivo al igual que la combinación AD-COP1/BD-UVR8^{R338A}. La variante de UVR8^{R338A} codifica para una versión de UVR8 que no posee la capacidad de homodimerización (130)

Resultados



Figura 10. COP1 interactúa de forma directa con el FT WRKY42: Ensayo de doble híbrido que prueba la interacción entre COP1 y WRKY42. Como control de carga, las levaduras fueron crecidas en medio sintético sin leucina ni triptófano (SD-Leu-Trp). Las interacciones entre proteínas se detectaron cuando las levaduras crecieron en medio sintético sin leucina, triptófano, histidina y Adenina (SD-Leu-Trp-His-Ade). Dominio de activación GAL4 (AD); Dominio de unión al ADN GAL4 (BD).

8.5. *APOLO* y WRKY42 regulan un subconjunto común de genes que responden a la radiación UV-B de manera dependiente de UVR8, incluido HY5

Para profundizar en el papel del complejo *APOLO*, UVR8, COP1 y WRKY42, perfilamos sus respectivos *targets* genómicos así como los transcriptomas de la sobreexpresión de *APOLO* (*DEG APOLO*) (20), junto con el de plántulas WT vs *uvr8-6* tras 1 h de exposición a UV-B (DEG UV-B) (Figura 11A, Lista de genes en el Anexo 2 y 3). Sorprendentemente, el 67% de los *targets* de UVR8 también son blanco de WRKY42. A su vez, *APOLO* reconoce 864 de estos genes (10%). Por otro lado, el 38% de los genes desregulados por UV-B de manera dependiente de UVR8 también lo hacen ante la sobreexpresión de *APOLO*.



Figura 11. APOLO, UVR8 Y WRKY42 regulan un subconjunto de genes en respuesta a UV-B: A) Diagramas de Venn, izquierda: *targets* directos de APOLO (ChIRP APOLO), *targets* directos de UVR8 (ChIP UVR8) y *targets* directos de WRKY42 (ChIP WRKY42), derecha: genes desregulados en las plantas *OE APOLO* (DEG *OEAPOLO*) y genes desregulados en plántulas WT y *uvr8-6* tratadas con LB suplementada con UV-B (DEG UV-B). Los genes correspondientes a ambas intersecciones se encuentran listados en el Anexo 4. El *p value* corresponde a una prueba de distribución hipergeométrica. B) Análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) de los genes desregulados por *APOLO* y por UV-B dependientes de UVR8. Se muestran las categorías GO con valores p más significativos. El navegador ShinyGO se encuentra en bioinformatics.sdstate.edu y se publicó en (134).

También realizamos un análisis de *Gene Ontology* (GO) de los genes en común desregulados tanto en *OE APOLO* como en respuesta a UV-B y se obtuvieron categorías relacionadas con "Respuesta a estímulo abiótico" y "Respuesta a radiación" (Figura 11B). Comparando los cinco subconjuntos estudiados en la Figura 11A, obtuvimos de la intersección una lista de 10 genes entre los que se encuentra el gen que codifica el FT bZIP HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) (Tabla 3).

Tabla 3: Lista de genes blanco de *APOLO*, UVR8 y WRKY42 que a su vez están desregulados en plantas que sobreexpresan *APOLO* y plantas tratadas con UV-B y cuya expresión depende de la presencia de UVR8.

GEN	DESCRIPCIÓN
AT1G08570	ACHT4 atypical CYS HIS rich thioredoxin 4
AT1G79270	ECT8 evolutionarily conserved C-terminal region 8
AT2G01290	RPI2 ribose-5-phosphate isomerase 2
AT2G19650	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT2G27820	PD1 prephenate dehydratase 1
AT2G30040	MAPKKK14 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
AT3G04140	Ankyrin repeat family protein
AT3G16350	NID1 Homeodomain-like superfamily protein
AT4G28290	hypothetical protein
AT5G11260	HY5 Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor

Teniendo en cuenta el papel fundamental de *HY5* en la señalización subyacente a la respuesta a UV-B (135), elegimos este *locus* para una mayor caracterización. Como *APOLO* reconoce sus *loci* blanco por complementariedad de secuencia y formación de bucle R (20), investigamos el perfil de unión de *APOLO* mediante ChIRP-Seq sobre el *locus HY5*. En comparación con las sondas LacZ utilizadas como control negativo, las sondas ODD y EVEN mostraron una unión específica de *APOLO* sobre el promotor *HY5* (Figura 12, líneas 1-3). Además, la inmunoprecipitación de ADN-ARN seguida de secuenciación (DRIP-Seq) (24) reveló que la formación de bucles R se produce en la región promotora de *HY5*, en correlación con la unión de *APOLO* (Figura 12, líneas 4-7), lo que sugiere que *APOLO* reconoce directamente *HY5* a través de la interacción directa con el ADN. Los ChIP-Seqs de UVR8 y WRKY42 también revelaron que estas proteínas se unen a la región promotora de *HY5* formando el R-loop con *APOLO* (Figura 12, líneas 4-7). En conjunto, nuestros resultados sugieren que UVR8, WRKY42 y *APOLO* regulan conjuntamente la actividad del *locus HY5*.



Figura 12. Perfil epigenético del *locus HY5***:** Líneas 1 a 3: Reconocimiento de *APOLO* por ChIRP seguido de secuenciación, utilizando sondas ODD (línea 1) y EVEN (línea 2) contra *APOLO*. En la línea 3 se muestra el control negativo ChIRP utilizando sondas LacZ (20). Líneas 4 a 7: Formación del bucle R mediante secuenciación ADN:ARN por inmuniprecipitación (DRIP), en la cadena Watson (línea 4), la cadena Crick (línea 5) y sin distinción de cadena (línea 6). En la línea 7 se muestra el control negativo DRIP tras el tratamiento con RNAseH (24). Líneas 8 y 9: unión de UVR8 y WRKY42 mediante ChIP-seq, respectivamente.

Posteriormente, realizamos un *APOLO* ChIRP y DRIP seguidos de qPCR sobre el *locus HY5* en plántulas WT y *CRISPR APOLO*, las que sirvieron para confirmar la interacción ARN Inc-ADN y que la formación del loop R depende de la expresión de *APOLO* (Figura 13A, B).



Figura 13. *APOLO* se une al *locus HY5* formando un R-loop: A) Unión de *APOLO* al *locus HY5* mediante ChIRP-qPCR en plantas WT y *CRISPR APOLO*. B) Formación de híbridos ARN-ADN (R-loop) en el *locus HY5* mediante DRIP-qPCR en plantas WT y *CRISPR APOLO*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medias (p < 0.05, prueba t)

8.6. WRKY42 reclutaría a UVR8 a través de COP1 en el locus HY5 y *APOLO* la aleja de la cromatina

Considerando la presencia de UVR8, COP1, WRKY42 y *APOLO* sobre el *locus HY5*, y las interacciones UVR8-*APOLO*, COP1-*APOLO* y WRKY42-*APOLO*, nos propusimos determinar su interdependencia en la unión a la cromatina y la regulación del gen blanco. Para ello, realizamos un ChIP de UVR8 seguido de qPCR en plántulas WT y *CRISPR APOLO* después de la exposición a UV-B. En plantas WT, esto confirmó primeramente la interacción entre el fotorreceptor y la región promotora de *HY5*. Además, en ausencia de *APOLO* en el fondo *CRISPR APOLO*, esta interacción se incrementó significativamente (Figura 14), lo que indica que *APOLO* puede bloquear el reconocimiento o alejar a su interactor de la cromatina.

Resultados



Figura 14. UVR8 se une al locus de HY5 en respuesta a UV-B: Análisis de ChIP-qPCR de la unión de UVR8 en el *locus* HY5 en plantas WT y *CRISPR APOLO* tratadas con LB suplementada con UV-B durante 1 h. El asterisco indica una diferencia significativa entre las medias (p < 0.05, prueba t)

Con la predicción de la estructura proteica 3D llevada a cabo con la herramienta AlphaFold (https://alphafoldserver.com/), evaluamos la posible unión de UVR8, COP1 y WRKY42 a una región del promotor de HY5 en ausencia y presencia de APOLO. Según este software, UVR8 parecería tener contacto directo con esta secuencia en estudio solo en presencia de WRKY42, el cual sería el responsable de atraer a este fotorreceptor a la cromatina a través de la unión con COP1. Dicha hipótesis podría validarse comparando experimentos de ChIP de UVR8 utilizando plantas que tengan la construcción *GFP:UVR8* en el fondo WT y en el fondo mutante *wrky42*. Estas líneas se encuentran en preparación. Además, cabe destacar que AlphaFold predice un complejo ribonucleoproteico en torno a la secuencia promotora de *HY5*, en el que además de WRKY42, UVR8 y COP1, incluye al ARNInc *APOLO* como interactor de ambas proteínas.

Resultados



Figura 15. Predicción de la interacción entre UVR8, COP1, WRKY42, *APOLO***y la región promotora***HY5:* Interacciones entre A) UVR8 y la región promotora *HY5*, B) UVR8, COP1 y la región promotora *HY5*, C) UVR8, COP1, WRKY42 y la región promotora *HY5*, D) UVR8, WRKY42, la región promotora *HY5* y *APOLO* obtenidas de la herramienta AlphaFold Server (https://alphafoldserver.com/)

De acuerdo con informes previos (136), nuestros datos de RNA-Seq confirmaron que la inducción de *HY5* por UV-B depende de UVR8 (Anexo 2). Por esto, analizamos los niveles de transcriptos de *HY5* cuando se desregulan los niveles de *APOLO* y *WRKY42*. Un ensayo realizado en plantas WT y *CRIPSR APOLO* durante 8h de LB suplementada con UV-B, reveló que los niveles de expresión de *HY5* aumentaron hasta 1h de exposición a UV-B, y, tras el pico de 1h, los niveles de transcriptos de *HY5* disminuyeron. Este incremento fue significativamente mayor en las líneas *CRISPR*, lo que indica un rol negativo de *APOLO* sobre *HY5* (Figura 16A), de acuerdo con el enriquecimiento de la interacción UVR8-cromatina en las plantas *CRISPR APOLO* (Figura 14). En las plantas *OE APOLO*, el UV-B causó una disminución de los niveles basales de *HY5*, en consonancia con los datos del RNA Seq de *OE APOLO* (20), y disminuyó parcialmente su activación por UV-B (Figura 16B). Por otro lado, las plantas *OE WRKY42* presentan los mismos niveles de transcriptos de *HY5* que las WT tanto con condiciones de LB como en presencia de UV-B. Sin embargo, en la mutante *wrky42* y en respuesta a UV-B, los niveles de *HY5* se incrementaron de manera significativa (Figura 16C).



Figura 16. *APOLO* **y WRKY42 regulan la expresión de** *HY5* **en respuesta al UV-B**: A) Ensayo de los niveles de transcriptos *HY5* **en** plantas WT (purpura) y *CRISPR APOLO* (azul) expuestas a LB suplementada con UV-B durante 8 horas. B) Niveles de transcriptos de *HY5* **en** plantas WT y *OE APOLO* expuestas a LB (purpura) y LB suplementada con UV-B durante 1 h (amarillo). C) Niveles de transcriptos de *HY5* **en** plantas WT, *OE WRKY42* y *wrky42* expuestas a LB (violeta) y LB suplementada con UV-B durante 1 h (amarillo). Letras diferentes en B y C indican diferencias significativas entre las medias (p < 0.05, prueba de Tukey).

8.7. *APOLO*, UVR8, COP1 y WRKY42 median en el cierre estomático en respuesta a UV-B

Teniendo en cuenta que hemos dilucidado la formación de un nuevo complejo formado por UVR8, WRKY42 y *APOLO*, nos preguntamos en qué tipo celular y en qué contexto fisiológico, esta interacción podría cumplir un rol biológico. Utilizando la construcción *proAPOLO:GFP:GUS*, observamos que la región promotora de *APOLO* se activa en las células de la guarda de plántulas de 10 días de edad (Figura 17A). Además, *UVR8, COP1, WRKY42 y HY5* también se expresan en los estomas según los datos de la matriz Affymetrix ATH1 (137) (Figura 17B).

Resultados



Figura 17. *APOLO*, **UVR8, COP1, WRKY42 y** *HY5* **Se expresan en las células de la guarda:** A) Panel superior: esquema de la región *PID-APOLO* y el segmento utilizado como *ProAPOLO*, dirigiendo la expresión de los genes reporteros *GUS:GFP*. Panel inferior: imágenes de microscopía confocal detectando GFP (panel izquierdo) y localización histoquímica de la actividad GUS (panel derecho) en plántulas de 10 días transformadas con la construcción *ProAPOLO:GUS:GFP*. Barras:20um. B) Vista del navegador eFP de los patrones de expresión de *UVR8, COP1, WRKY42 y HY5* en las células de guarda de *Arabidopsis*. Intensidad de expresión codificada por color: amarillo=baja, rojo=alta. El navegador eFP de *Arabidopsis* se encuentra en bar.utoronto.ca/eplant y fue publicado por (138).

Varias respuestas fisiológicas se han relacionado con el fotorreceptor UVR8. Además, se ha informado de que el UV-B induce el cierre estomático a través de una vía dependiente de UVR8-HY5 (115). Por lo tanto, decidimos determinar el efecto del UV-B sobre el movimiento estomático en tiras de epidermis de hojas de plantas de líneas independientes *CRISPR APOLO 1 y 2, OE APOLO 1 y 2, uvr8-6 y uvr8-2, OE WRKY42 y wrky42* (Figura 18A y 18B). Como se informó anteriormente, la respuesta UV-B en WT desencadenó el cierre de estomas, en contraste con las plantas *uvr8-6 y uvr8-2*, que no mostraron respuesta. Llamativamente, en las *OE y CRISPR APOLO*, así como en los fondos *wrky42* y *OE WRKY42*, los estomas se abrieron significativamente

63

tras la radiación UV-B. En conclusión, nuestros resultados indican que la respuesta de *HY5* a la radiación UV-B mediada por el módulo UVR8-WRKY42-*APOLO* controla el cierre de los estomas.



Figura 18. UVR8, WRKY42 *y* **APOLO controlan el cierre de los estomas en respuesta a UV-B:** A) Efecto de UV-B sobre la apertura estomática en las líneas WT, *uvr8-6, CRISPR APOLO, OE APOLO y wrky42*. B) Efecto de UV-B sobre la apertura estomática en las líneas WT, *uvr8-2, CRISPR APOLO 2, OE APOLO 2 y OE WRKY42*. Tiras de epidérmis de la cara abaxial de hojas de 3 semanas de edad que se incubaron en un buffer de apertura y LB durante 3 horas y, luego, se expusieron a LB suplementada o no con UV-B durante 3 horas. Los datos son la media de 100 estomas observados. Letras diferentes en A y B indican diferencias significativas entre las medias (p < 0.05, prueba de Tukey).

8.8. *APOLO* modula la acetilación de histonas en el locus HY5 mediante la interacción con la acetiltransferasa HAC5

Investigaciones previas indicaron que la exposición a UV-B de *Arabidopsis* aumenta la acetilación de las lisinas K9 y/o K14 de la histona H3 (H3K9/14diac) en el *locus HY5* (como se muestra en la Figura 19A), y que esta modificación depende de UVR8 (29). Además, 23 de los 153 genes desregulados en *OEAPOLO y* UV-B experimentan un enriquecimiento en H3K9,14 diac tras la radiación UV-B (Figura 19B, la lista completa de los genes se encuentra en el Anexo 4).



Figura 19. *APOLO* junto a UVR8 modulan la marca H3K9Ac en respuesta a UV-B: A) Perfil epigenético en el *locus HY5*. Líneas 1 y 2: Enriquecimiento relativo en la secuenciación del ChIP H3K9ac en plantas de tipo salvaje (WT) expuestas a 1,5 μmol m⁻² s⁻¹ UV-B de banda estrecha durante 4 h UV- B (línea 1) y LB de baja tasa de fluencia (15 μmol m⁻² s⁻¹) sin UV-B medible (LW: línea 2) (29). La anotación del gen se muestra en la parte inferior. B) Diagrama de Venn de genes desregulados en *OEAPOLO* y en el tratamiento con UV-B y, *targets* enriquecidos en H3K9Ac tras la exposición a UV-B obtenida por ChIP-Seq (29). El *p value* corresponde a una prueba de distribución hipergeométrica.

Para evaluar en mayor profundidad hasta qué punto la activación en la transcripción en respuesta a UV-B se debe a la acetilación de histonas, tratamos plántulas de *Arabidopsis* con ácido anacárdico, un inhibidor de la deposición de esta marca (Inhib HAC) (139) y cuantificamos los niveles de transcriptos de *HY5* mediante RT-qPCR luego de la exposición a LB suplementada con UV-B. Como era de esperar, la exposición a UV-B aumentó los niveles de transcriptos de *HY5*, pero esta inducción no se observó en las plántulas expuestas a UV-B durante el tratamiento con el inhibidor (Figura 20).

Resultados



Figura 20. La activación de la transcripción de HY5 en respuesta a UV-B se debe a la marca H3K9Ac: Niveles de transcriptos de HY5 cuantificados por RT-qPCR en plántulas WT de 6 días de edad tratadas o no con inhibidor de histona acetíl transferasa (Inhib HAC) antes del tratamiento con LB suplementado con UV-B. El inhibidor previene la deposición de H3K9,14diac afectando la inducción de HY5 por UV-B. Las plantas fueron infiltradas con el inhibidor 4h antes de ser expuestas (o no) a LB suplementada con UV-B durante 1h. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (p < 0.05, prueba de Tukey).

Este resultado confirma que la acetilación de histonas en el locus *HY5* es necesaria para desencadenar su expresión en respuesta al UV-B. Llamativamente, la histona acetiltransferasa HAC5 también emergió como una proteína que interactúa potencialmente con *APOLO* identificada por ChIRP seguida de espectrometría de masas (25,28). La interacción entre HAC5 y *APOLO* fue validada mediante RIP seguido de qPCR en *Nicotiana* (Figura 21A). Por ello, realizamos un ChIP contra la marca de histona H3K9ac seguido de qPCR tras 1h de exposición a UV-B en plantas WT, *OE APOLO y hac5*. Como se informó anteriormente (29), el UV-B indujo significativamente esta marca de histona sobre la región *HY5* en plantas WT. Sin embargo, este incremento no se observó en plantas *OE APOLO* ni mutantes *hac5* (Figura 21B).



Figura 21. *APOLO* **y HAC5** interactúan *in vivo* **y** participan en la deposición de la marca H3K9Ac en el *locus HY5*: A) Ensayo de inmunoprecipitación de ARN (RIP) en hojas de *Nicotiana benthamiana (Nb)* transitoriamente cotransformadas con *APOLO* **y** *Pro35S:GFP:HAC5* expuestas a LB suplementada con UV-B durante 15 minutos. Los resultados se expresan como porcentaje de la fracción INPUT. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG como control negativo. B) ChIP-qPCR H3K9ac en la región promotora de *HY5* en plántulas WT, *OE APOLO* **y** *hac5* de 3 semanas tratadas con LB o LB suplementada con UV-B durante 1 hora. El asterisco indica una diferencia significativa entre las medias (p < 0.05, prueba t).

Curiosamente, cuando transformamos de forma estable plantas de *Arabidopsis* con *35S:GFP:HAC5*, su expresión sólo se observó en el fondo *CRISPR APOLO*, pero no en las plantas WT. Sorprendentemente, en ausencia de *APOLO*, *GFP:HAC5* se observó acumulada solamente en los núcleos de las células de guarda (Figura 22A), precisamente en el mismo tipo celular donde *APOLO* se expresa normalmente. Además, las plantas *CRISPR APOLO / OE HAC5* mostraron un área de roseta significativamente reducida, en contraste con el área ligeramente aumentada de *OE HAC5* en el fondo WT (Figura 22B-C), lo que sugiere que, en ausencia de *APOLO*, la sobreexpresión de HAC5 tiene un impacto importante en el desarrollo de la planta. Cabe destacar que los niveles de transcriptos de *HAC5* son significativamente mayores en los fondos WT y CRISPR *APOLO* transformados con *GFP:HAC5* en comparación con las mismas plantas sin transformar, y similares en cada caso (Figura 22D), indicando que el control negativo de *APOLO* sobre HAC5 no ocurre a nivel transcripcional ni post-transcripcional, sino que sugiere que ocurre a nivel de la traducción o post-traduccional.

67



Figura 22. *APOLO* modula los niveles de HAC5 en células de la guarda: A) Células de guarda en plantas WT y *CRISPR APOLO* transformadas con la fusión *35S:GFP:HAC5*. En ambos paneles, de arriba a abajo: Fluorescencia GFP, clorofila, campo claro e imágenes fusionadas. Barra de escala: 20um. B) Rosetas representativas WT, *CRISPR APOLO*, *35S:GFP:HAC5* fondo WT (L1 y L5) y fondo *CRISPR* (L1 y L5). Barra de escala: 1 cm. C) Área de rosetas de plantas WT, *CRISPR APOLO*, *35S:GFP:HAC5* fondo WT (L1 y L5) y fondo *CRISPR* (L1 y L5) de tres semanas de edad. D) Niveles de transcriptos de *HAC5* en plantas WT, *CRISPR APOLO*, *35S:GFP:HAC5* en fondo WT (L1) y fondo *CRISPR* (L1) cuantificados por RT-qPCR. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (p < 0.05, prueba de Tukey).

Para respaldar más sólidamente nuestras observaciones, transitoriamente cotransformamos hojas de *N. benthamiana* con las siguientes combinaciones: *35S:GFP:HAC5*, *35S:GFP:HAC5* + *35S:GUS::CsVMV:DsRed*, *35S:GFP:HAC5* + *35S:APOLO::CsVMV:DsRed*. Mediante este enfoque, pudimos distinguir qué células expresaban *APOLO*. Además, co-expresamos con *35S:GUS:: CsVMV:DsRed* como control. Como reveló la fusión de las imágenes adquiridas, HAC5 fusionada a GFP se co-localizó en un gran número de células con DsRed cuando acompañaba a la expresión de *35S:GUS*. Por otro lado, GFP y DsRed se excluían mutuamente en un número significativamente mayor de células en las hojas que expresaban *35S:APOLO* (Figura 23A). También, existe una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia cuantificada en los núcleos que expresan a *APOLO* en comparación con los dos controles (Figura 23B). Por otro lado, los niveles de transcripto *HAC5* en presencia de *APOLO* no están disminuidos con respecto a las otras dos muestras (Figura 23C) lo que sugiere que *APOLO* podría reprimir la acumulación de HAC5 a nivel post-traduccional. Teniendo en cuenta la interacción directa entre *APOLO* y



HAC5, es probable que *APOLO* desencadene la degradación de HAC5 de forma específica para cada célula.

Figura 23. *APOLO* **reprime la aculumación de HAC5 en céulas de la guarda:** A) Imágenes de microscopia confocal de hojas de tabaco. De izquierda a derecha: Fluorescencia de GFP, DsRed y de las imágenes fusionadas (Combinación). Barra de escala: 20um. B) Intensidad de fluorescencia nuclear cuantificadas en células de hojas de tabaco. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el software ImageJ[®]. C) Niveles de transcriptos de *HAC5* en hojas de tabaco transformadas transitoriamente. Para los tres experimentos las hojas fueron transformadas con las construcciones *35S:GFP:HAC5, 35S:GFP:HAC5 + 35S:GUS/APOLO::DsRed cassette.* El asterisco indica una diferencia significativa entre las medias (p < 0.05, prueba t).

En el contexto de la respuesta de los estomas al UV-B, el ChIP de GFP:HAC5 seguido de qPCR en plantas *CRISPR APOLO* tras la exposición a la UV-B reveló la interacción entre HAC5 y la región promotora de *HY5* (Figura 24A). Además, HAC5 también se expresa en las células de la guarda, según los datos del array ATH1 de Affymetrix (137) (Figura 24B). Coincidentemente, los estomas de las plantas mutantes *hac5* se abrieron significativamente tras la radiación UV-B (Figura 24C), de forma similar al efecto de la desregulación de *APOLO* y *WRKY42*. Teniendo en cuenta que HAC5:GFP pudo observarse en el mismo tipo celular pero sólo en plantas *CRISPR APOLO*, podría suponerse que HAC5 juega un rol importante en el cierre estomático, pero no debe expresarse en altos niveles, por lo que en condiciones normales *APOLO* modula la acumulación de su proteína asociada.



Figura 24. HAC5 se une al *locus HY5* **y se expresa en los estomas:** A) Análisis ChIP-qPCR de la unión de HAC5 en el *locus HY5* en plantas *CRISPR APOLO* tratadas con LB suplementada con UV-B durante 1 h. B) Vista del navegador eFP de los patrones de expresión de *HAC5* en las células de guarda de *Arabidopsis*. Intensidad de expresión codificada por color: amarillo=baja, rojo=alta. El navegador eFP de *Arabidopsis* se encuentra en bar.utoronto.ca/eplant y fue publicado por (138). C) Efecto del UV-B sobre el cierre estomático en plantas *hac5-3* y *hac5-4*. Tiras epidérmicas abaxiales de plantas de 3 semanas de edad se incubaron en buffer de apertura y LB durante 3 horas y luego se expusieron a LB suplementada o no con UV-B durante 3 horas. Los datos son la media de 100 estomas observados. El asterisco indica una diferencia significativa entre las medias (p < 0.05, prueba t).

En conjunto, nuestros datos indican que *APOLO* participa en la modulación de H3K9ac desencadenada por UVR8 y mediada por HAC5 en respuesta a UV-B. *APOLO* interactúa directamente con HAC5 y ajusta su abundancia, probablemente dirigiendo la degradación de la proteína.

Resultados

8.9. HY5 regula la inducción tardía de APOLO en respuesta UV-B

promoviendo un bucle de retroalimentación negativa transcripcional

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de transcriptos de *HY5* alcanzan su máximo a la 1h de UV-B (Figura 16A y 25A) y es bien sabido que HY5 promueve la fotomorfogénesis (75). La regulación a la baja de los niveles de transcriptos de *HY5* después de su máximo a 1h sugirió un control estricto de su expresión. Para comprender mejor la dinámica de *HY5*, cuantificamos los niveles de la proteína HY5 mediante Western Blot durante la exposición continua a UV-B y encontramos un aumento de la abundancia de proteína a partir de las 2h con un pico a las 8h de radiación (Figura 25A-B).



Figura 25. Los niveles de transcriptos de HY5 tienen su máximo después de 1h de UV-B: A) Análisis temporal de los niveles de transcripción de HY5 (violeta) y de la abundancia de proteína HY5 (amarillo) durante 24 horas de exposición continua a LB suplementada con UV-B. B) Western blot de plantas mutantes hy5 transformadas con la construcción *ProHY5:HY5:GFP*. Actina fue utilizada para normalizar las muestras. Las bandas fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ[®] y se expresaron en relación con la fracción de proteínas correspondiente a las mismas plantas expuestas a solo a LB.

Basándonos en conjuntos de datos publicados, descubrimos que *APOLO* es un blanco directo de HY5, tal como revelan los análisis ChIP-Seq (140). HY5 reconoce dos sitios en la región intergénica entre *PID* y *APOLO* (Figura 26A). Por lo tanto, realizamos ChIP seguido de qPCR sobre la región promotora de *APOLO* utilizando plantas que expresaban *ProHY5:HY5:HA*, y confirmamos la interacción (Figura 26B). Para tal fin, escogimos un pico de unión revelado por ChIP-Seq que contiene un sitio canónico de unión de HY5 para el diseño de los *primers* de qPCR, lo que sugiere que en esta región la unión con el ADN es directa (cuadro negro de la Figura 26A, Figura 26B). De forma consistente, un ensayo de los niveles de *APOLO* llevado a cabo en plantas WT y mutantes *hy5*, mostró un pico después de 3h de exposición a LB + UV-B en WT en contraste con el fondo mutante, apoyando que HY5 activa directamente la expresión de *APOLO* en respuesta a UV-B (Figura 26C).



Figura 26: HY5 se une a la región promotora de *APOLO***:** A) Reconocimiento de HY5 por ChIP seguido de secuenciación en la región promotora de *APOLO*. En verde y morado se representa la región donde se diseñaron los *primers* para ChIP-qPCR. B) Validación ChIP-qPCR de la unión de HY5 en la región promotora de *APOLO* en plántulas *Pro35S:HY5:HA* de 3 semanas de edad tras 6h de exposición a LB suplementada con UV-B. C) Análisis temporal de los niveles de transcriptos en plantas WT (círculos) y *hy5* (cuadrados) en LB (rosa) o LB suplementada con UV-B (azul y púrpura) durante 8 horas.

Por lo tanto, la acumulación tardía de *APOLO*, inducida por el mismo HY5, alejaría a UVR8, COP1 y WRKY42 de la cromatina y desencadenaría la degradación de HAC5, amortiguando la actividad transcripcional de *HY5* (Figura 27).




Figura 27. Modelo final: A) El FT WRKY42 se une a la región promotora de *HY5* bloqueando la transcripción. B) La radiación UV-B desencadena la monomerización de UVR8, su localización nuclear y su posterior unión a COP1. En el núcleo, UVR8-COP1 reconocen el *locus HY5* mediante la interacción con WRKY42. Además, HAC5 aumenta la marca H3K9ac activando la transcripción de *HY5* que conduce al cierre estomático. C) El FT HY5 se une directamente a la región promotora de *APOLO*, incrementando los transcriptos de *APOLO* en el núcleo. D) Tras una exposición prolongada a UV-B, los altos niveles de *APOLO* dan lugar a la formación del bucle R, el alejamiento del complejo UVR8-COP1-WRKY42 y HAC5 de la región promotora de *HY5*, lo que resulta en una reducción de los niveles de transcriptos de *HY5*. Serán necesarias más investigaciones para descubrir el mecanismo subyacente a la degradación de la proteína HAC5 relacionada con *APOLO*.

Discusión

9. Discusión

La radiación UV-B desencadena varias respuestas fotomorfogénicas en las plantas, como la inhibición de la elongación del hipocotilo y la síntesis de filtros solares UV, como flavonoides y antocianinas (63). Hasta la fecha, el único fotorreceptor UV-B conocido en Arabidopsis es UVR8. El homólogo más cercano de UVR8 en metazoos, RRC1, es el factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Ran, una proteína G nuclear similar a Ras. RCC1 se une a la cromatina y a Ran para establecer un gradiente de concentración de RanGTP, participando así en una serie de actividades fisiológicas celulares, como la formación de la membrana nuclear, el transporte nucleoplásmico y la formación del huso mitótico (141). De hecho, la correcta organización de la heterocromatina es esencial para la localización y función de RCC1, que a su vez afecta a la generación de RanGTP y, por tanto, a la formación del huso mitótico durante la división celular. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre la interacción de UVR8 con la cromatina. Mientras que algunos informes han demostrado que UVR8 nativa se une a la cromatina in vivo (45,82,142), otros más recientes, no han podido confirmar la asociación de este fotorreceptor mediante inmunoprecipitación de la cromatina. En concordancia, la comparación estructural de UVR8 con el motivo de unión a nucleosomas de RCC1 muestra que UVR8 carece de regiones con cargas positivas para interactuar directamente con la cromatina (143). En este trabajo, realizamos un ensayo ChIP-Seq y observamos un enriquecimiento de UVR8 alrededor de los sitios de inicio de la transcripción (Figura 6A). Curiosamente, dos secuencias consenso de FTs (TGGGCC/T y TTCACT/C) estaban sobrerrepresentadas en los sitios de unión de UVR8 (Figura 6B) sugiriendo además una función transcripcional de este receptor. Los sitios de unión previamente descriptos de UVR8 sobre blancos específicos (Cloix & Jenkins, 2008), incluyendo HY5, fueron validados por nuestro enfoque de genoma completo. Además, encontramos una fuerte correlación (0,9) entre los perfiles de unión de UVR8 y el FT interactor de APOLO WRKY42 (28) (Figura 7B). Adicionalmente, mediante la realización de ensayos de doble híbrido en levaduras y BiFC descubrimos que COP1 y WRKY42 pueden interactuar y probablemente este FT es responsable de reclutar de forma indirecta a UVR8 a la cromatina diana (Figura 9, 10). Curiosamente, los genes diana de UVR8 y WRKY42 también estaban enriquecidos en dúplex de ADN-ARN, de forma similar a los targets validados de APOLO, a lo largo del genoma de Arabidopsis (20).

Como ya fue mencionado, LHP1 ha sido relacionada con la conformación tridimensional del genoma. LHP1 reconoce regiones enriquecidas en la marca H3K27me3 de la cromatina, característica de genes reprimidos en el contexto de heterocromatina facultativa. Este reconocimiento facilita la compactación de estas regiones y contribuye a la organización de

74

dominios en el genoma, creando áreas de represión génica que afectan la expresión y la disposición espacial de los genes (144). La falta de correlación entre los perfiles de unión de esta proteína con los de UVR8 y WRKY42, apunta a un mecanismo diferente de los ya descriptos para *APOLO* y su interactor LHP1. Por esta razón, decidimos no indagar durante esta Tesis sobre el rol en la arquitectura global del núcleo de este nuevo complejo y contexto celular en el que participarían *APOLO* junto a un FT y un fotorreceptor. El potencial rol de este nuevo complejo en la organización tridimensional de la información genética en el núcleo celular requerirá de investigaciones futuras.

Se ha sugerido también que la asociación de UVR8 con la cromatina podría ser constitutiva y que no responda a UV-B (82), a pesar de que UVR8 se acumula en el núcleo tras esta irradiación (145). Utilizando la herramienta AlphaFold, observamos que la interacción potencial entre UVR8 y la región promotora de *HY5* no fue predicha pero sí, un posible complejo sobre esta región integrado por el ARN Inc *APOLO*, COP1 y WRKY42, posiblemente como puente de la interacción entre UVR8 y la cromatina (Figura 15).

En *Arabidopsis*, UVR8 está normalmente presente en el citosol como un dímero que, tras la percepción de UV-B, se monomeriza y transloca al núcleo por difusión simple (146). En el núcleo, UVR8 se une a COP1 e inhibe su actividad E3 ubiquitina ligasa contra proteínas diana como el FT HY5, lo que conduce a la fotomorfogénesis y aclimatación en respuesta al UV-B (147). UVR8 también interactúa con los FTs BES1 , BIM1, WRKY36, MYB73/MYB77 y MYB13 en el núcleo, regulando directamente la transcripción de diversos genes blanco (6,73,148,149).

En particular, se demostró que el complejo UVR8-COP1 también activa la transcripción del *locus HY5* (150). Nuestro interés en este fotorreceptor surgió a partir de los resultados preliminares obtenidos por ChIRP-MS (25,28) en el que UVR8 surgió como un potencial *partner* de *APOLO*. A pesar de la creciente caracterización de UVR8 desde su identificación (151), la capacidad de este receptor de participar en complejos ribonucleoproteicos que contienen ARNs lnc era desconocida. En este trabajo, confirmamos mediante enfoques independientes que UVR8 interactúa *in vivo* con el ARN lnc nuclear *APOLO* (15) tras la exposición al UV-B (Figura 5) y probablemente existan otros transcriptos que se unan a UVR8 en diversas células vegetales.

Mediante el análisis de experimentos de RNA-Seq, DRIP-Seq, ChIP-Seq y ChIRP-Seq, identificamos un subconjunto de genes que están sujetos a la regulación directa por *APOLO*, UVR8 y WRKY42 en respuesta al UV-B. Entre ellos, identificamos el gen que codifica el FT HY5, que posteriormente controla muchos genes relacionados con esta radiación. La unión de *APOLO* a través de la formación de un bucle R sobre el *locus HY5* se confirmó mediante ChIRP- y DRIPqPCR (Figura 13), respectivamente, y la unión de la cromatina de UVR8 sobre *HY5* fue significativamente mayor en plantas *knockout* de *APOLO* (Figura 14). Además, los niveles de transcriptos de *HY5* en la línea *CRISPR APOLO* aumentaron tras 1h de exposición a UV-B en comparación con plantas WT. Adicionalmente, la expresión de *HY5* se reduce en *OE APOLO*, lo que sugiere que, al acumularse, *APOLO* dificulta la unión de UVR8 a la cromatina. En concordancia, se observó un mayor enriquecimiento de la unión de UVR8 sobre el *locus HY5* en la línea *CRISPR APOLO*.

Existe evidencia que varios ARNs lnc pueden servir como señuelos que impiden el acceso de proteínas reguladoras al ADN (152). Se ha demostrado que la sobreacumulación de *APOLO* aleja a VIM1 y LHP1 del promotor de *YUC2* (25). En humanos, el ARN lnc *PANDA* se asocia con el FT NF-YA para prevenir la apoptosis mediada por p53. NF-YA activa varios genes clave para la apoptosis, pero la unión de *PANDA* a NF-YA aleja este FT del locus blanco (153).

Anteriormente, se propuso que *APOLO* modula estequiométricamente la unión de WRKY42 al promotor del gen *RHD6* en los pelos radiculares (28). Se demostró que niveles bajos de *APOLO* no consiguen reclutar a WRKY42 a la cromatina, mientras que niveles altos alejan al FT de los genes diana. Como resultado, plantas *OE APOLO* y *CRISPR APOLO* mostraron pelos radiculares más cortos en respuesta al frío (28).

Un mecanismo molecular similar se observó recientemente para el regulador maestro del crecimiento de yemas, *BRANCHED1 (BRC1)*, tras la desregulación de *APOLO* (120). De forma similar, en este trabajo observamos la misma tendencia de apertura de estomas en respuesta a UV-B en plantas *OE APOLO* y *CRISPR APOLO*. Sin embargo, el comportamiento de *HY5* fue opuesto en las dos líneas, es decir, la inducción por UV-B fue parcialmente perjudicada en la línea *OE APOLO*, mientras que fue exacerbada en la *CRISPR APOLO*. Es probable que *APOLO* orqueste la expresión de un subconjunto de genes que coordinan la respuesta fisiológica, como se demostró para los genes que responden a auxinas durante el desarrollo de raíces laterales (20). Cabe destacar que la mayoría de los blancos de *APOLO* están implicados en la síntesis, el transporte y la respuesta a auxinas (20,25,28,154), y se ha demostrado que la homeostasis de auxinas modula el cierre de los estomas (155).

En este sentido, *HY5* debería considerarse uno de entre varios *targets* de *APOLO* que participan activamente en la respuesta a UV-B en las células de guarda. Curiosamente, se ha demostrado que HY5 participa en el desarrollo de las raíces (156), y también se descubrió que HY5 regula los genes *RRA1* y *RRA2* relacionados con la pared celular de las raíces a través de vías mediadas por miARNs junto con la señalización de auxinas (157). Considerando que previamente se demostró que *APOLO* y WRKY42 regulan conjuntamente blancos comunes durante la expansión de los pelos radiculares (28,154), es probable que la participación de HY5 en el mismo tipo celular esté controlada por complejos ribonucleoproteicos similares que actúan también en las células de guarda. Notablemente, otros FTs WRKY han sido relacionados con el cierre de

estomas en *Arabidopsis*. Los FTs WRKY70 y WRKY54 relacionados con la defensa de las plantas, cooperan como reguladores negativos del cierre estomático y los mutantes dobles *wrky54/wrky70* mostraron una tolerancia claramente mejorada al estrés osmótico (158). Asimismo, se propuso que WRKY46 regula las respuestas de las plantas al estrés por sequía y salinidad y, también participa en la apertura estomática dependiente de la luz en las células de guarda (159). Además, WRKY1 se identificó como un regulador negativo en la señalización del ABA en los estomas (160).

Como se mencionó anteriormente, UVR8 interactúa con múltiples FTs, incluido WRKY36. A su vez, se propuso que WRKY36 inhibe la expresión de HY5 (Yang et al., 2018a). La interacción de UVR8 con WRKY36 inhibiría la interacción de este factor con el ADN, desencadenando la transcripción de HY5 y activando la elongación del hipocotilo. Según nuestros resultados, WRKY42 también actuaría como regulador negativo basal de HY5, probablemente en asociación con APOLO, tal como se había propuesto previamente (28). En respuesta al UV-B, WRKY42 reclutaría a UVR8, con COP1 como puente, activando la transcripción de HY5. Teniendo en cuenta que en el fondo mutante wrky42, la activación de HY5 mediada por UVR8 aumenta (Figura 16C), concluimos que en ausencia de WRKY42, otro miembro de la gran familia de FTs WRKY puede ocupar su sitio de unión dentro del promotor de HY5, activando su transcripción más eficientemente. Por el contrario, los ensayos de unión in vitro indicaron que UVR8 interactúa con la cromatina a través de la histona H2B (45). Por lo tanto, la forma en que UVR8 se une a la cromatina en regiones genómicas específicas puede implicar un complejo que incluya múltiples proteínas asociadas y ARNs Inc. En resumen, teniendo en cuenta que uno de los principales motivos de ADN surgido de los sitios de unión de UVR8 es un elemento regulador en cis de WRKY (Figura 6B) y su distribución altamente solapada en todo el genoma (Figura 7B), sugerimos que WRKY42, y otros factores de la familia WRKY, pueden reclutar, de forma directa o indirecta, a UVR8 a la cromatina en genes específicos que responden a UV-B.

Se sabe que la exposición a UV-B de *Arabidopsis* aumenta la acetilación de H3K9 y/o 14 en *loci* de genes regulados por UV-B de forma dependiente de UVR8 (Figura 19A) (29). *HY5* constituye un ejemplo entre estos genes diana y su inducción por UV-B se bloquea mediante la inhibición química de las histonas acetiltransferasas (Figura 20). Además, la modificación de H3K9ac está alterada en plantas *OE APOLO* y mutantes *hac5* (Figura 21B). En nuestro estudio, demostramos que la acetiltransferasa HAC5 interactúa con *APOLO*, como reveló el ChIRP-MS y lo confirmó el RIP-qPCR (Figura 21A). La búsqueda sistemática de la interacción de UVR8 con acetiltransferasas implicadas en la modificación de histonas regulada por la luz no reveló ningún posible interactor directo (29). Descubrimos que, además de su interacción con *APOLO*, la unión de HAC5 al *locus HY5* tras UV-B era detectable en las líneas *CRISPR APOLO* mediante ChIP-qPCR

Discusión

(Figura 24A). Recientemente, se propuso que HAC1 y HAC5 forman parte del complejo transcripcional MEDIATOR como subunidades específicas que activan la transcripción génica (105). Esta asociación está aparentemente mediada por las subunidades MED8 y MED25. Curiosamente, se demostró que la subunidad MED19a de MEDIATOR interactúa con el ARN Inc ELENA1 (ELF18-INDUCED LONG-NONCODING RNA1) para aumentar la expresión de genes sensibles a patógenos (161). Más recientemente, se propuso que ELENA1 puede migrar sistémicamente y disociar la interacción entre MED19a y un complejo transcripcional, calibrando así la progresión de la senescencia en respuesta a la deficiencia de nutrientes (162). Por lo tanto, es probable que la participación de ARNs Inc dentro de complejos dinámicos de ribonucleoproteínas que guían la transcripción de genes diana constituya una característica general de la actividad nuclear. En los mamíferos, existen numerosos ejemplos que demuestran cómo los ARNs Inc influyen en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas. Al facilitar la interacción entre las proteínas diana y quinasas, fosfatasas o ubiquitin ligasas específicas, los ARNs Inc pueden controlar estas modificaciones que posteriormente afectan a la actividad enzimática (163,164), la estabilidad de las proteínas (165) o su localización subcelular (166). Específicamente, en plantas, las marcas de histonas como H3K27me3, H3K4me3 y H4K16ac se modulan mediante la interacción entre ARNs Inc y modificadores de histonas como CLF, LHP1, ATX1, WDR5a o MOF (19). Aquí demostramos que APOLO interactúa con la acetiltransferasa de histonas HAC5 y que ambos participan en la deposición de H3K9ac sobre el locus HY5 (Figura 21)

En particular, la expresión de HAC5:GFP bajo el promotor 35S sólo se observó en los núcleos de las células de guarda en las plantas CRISPR APOLO, pero no en el fondo WT (Figura 22A) y a su vez, las plantas CRISPR APOLO / OE HAC5 muestran un fenotipo más drástico de rosetas pequeñas que en el fondo WT (Figura 22B-C). Considerando la interacción directa HAC5-APOLO revelada en nuestro trabajo, proponemos que APOLO desencadena la degradación de HAC5 específicamente en las células de la guarda. En animales, se ha demostrado que ciertos ARNs lnc promueven la ubiquitinación y degradación de proteínas diana. Existen múltiples mecanismos conocidos mediados por ARNs Inc sobre la desestabilización de proteínas en cánceres gastrointestinales (GI). Por ejemplo, los ARNs lnc pueden unirse directamente tanto a la proteína diana como a la E3 ligasa para promover su ubiquitinación o interactuar físicamente con la proteína y promover la fosforilación de aminoácidos específicos lo que conduce a una mayor unión y, por tanto, a la desestabilización de la proteína (167). Curiosamente, se demostró previamente que el ARN Inc de humanos UPAT puede imitar la acción de APOLO cuando se expresa en células vegetales. UPAT interactúa con UHRF1 en mamíferos, que es el ortólogo del interactor de APOLO, VIM1 (25). Se propuso que UPAT puede controlar la actividad E3 ligasa de su socio UHRF1 para modular la degradación de proteínas (165). Sin embargo, el rol potencial

78

de *APOLO* en la regulación de la estabilidad de sus proteínas asociadas sigue sin ser explorado en profundidad y aquí presentamos pruebas que sugieren que *APOLO* puede inducir la degradación de HAC5 de forma específica. Es probable que futuras investigaciones arrojen luz sobre el papel potencial de *APOLO* en la modulación de la estabilidad de proteína/as asociada/as.

HY5 es un FT de tipo bZIP, que regula las respuestas mediadas por la luz y que se une al promotor de numerosos genes (140), participando en diversos procesos fisiológicos y biológicos, incluyendo la termo y fotomorfogénesis, la biosíntesis de flavonoides, el desarrollo radicular, la respuesta al estrés abiótico y la homeostasis de nutrientes (168). Estudios recientes han revelado los mecanismos moleculares subyacentes a la función del FT HY5, cuya actividad está regulada por fotorreceptores alternativos (169). En Arabidopsis, HY5 desempeña un papel central en la señalización de la luz UV-B (136) no solo asociándose con los promotores de sus genes blanco corriente abajo implicados en la señalización UV-B y la reparación de daños en el ADN, como RUP1, RUP2, UVR2 y UVR3 (170), sino también reconociendo su propio promotor y desencadenando una regulación de retroalimentación positiva (62). Aquí demostramos que HY5 también reconoce el promotor de APOLO y activa su transcripción (Figura 26 A-B). Además, los ensayos de cinética de la respuesta a la exposición a UV-B, nos permitieron concluir que el pico de APOLO se produce después de tres horas de radiación de una manera dependiente de HY5 (Figura 26C), y de forma consistente con el inicio del aumento de la proteína HY5 (Figura 25). En conjunto, estos hallazgos sugieren la existencia de un mecanismo de retroalimentación transcripcional en el que la inducción tardía de APOLO por HY5 tras la exposición a UV-B integra un bucle negativo en la respuesta transcripcional de HY5. Como resultado, la actividad transcripcional de HY5 es amortiguada por la desorganización mediada por APOLO del complejo UVR8, COP1, WRKY42 y HAC5 sobre el locus HY5.

La luz y la temperatura fluctúan durante los ciclos día-noche y los cambios estacionales controlan el crecimiento y el desarrollo de las plantas (171). Además, a temperaturas cálidas (29 °C) y en condiciones tanto de luz como de oscuridad, HY5 se degrada (172). Como resultado, no es capaz de competir con el FACTOR INTERACTOR DE FITOCROMO 4 (PIF4) para unirse a determinados sitios e inhibir el crecimiento de plántulas en respuesta a temperaturas cálidas (173). Recientemente, se demostró qué a 23 °C, el complejo *APOLO*-VIM1-LHP1 reconoce el gen de biosíntesis de auxinas *YUCCA2*, bloqueando su transcripción a través de la metilación del ADN y las histonas. A 29 °C, los niveles de transcripción de *APOLO* disminuyen y la unión de VIM1-LHP1 a la región promotora de *YUCCA2* se reduce, promoviendo su actividad transcripcional y la elongación del hipocotilo en respuesta al calor (25). De acuerdo con nuestras observaciones, niveles más bajos de proteína HY5 pueden causar una disminución en la actividad transcripcional

79

de APOLO, lo que podría permitir una adaptación eficiente de la planta a cambios en las condiciones de luz y temperatura.

En particular, la evitación de la sombra constituye otra estrategia relacionada con la luz adoptada por las plantas, percibida como una señal de proximidad de plantas vecinas que da lugar a respuestas de desarrollo ante una reducción en la relación Rojo/Rojo lejano (R/FR) (174). Recientemente se demostró que los niveles de transcriptos de *APOLO* responden dinámicamente a una baja relación R/FR en yemas axilares. Se demostró que *APOLO* media la formación de bucles de cromatina que abarcan la región promotora del regulador maestro de la ramificación *BRANCHED1 (BRC1)* en yemas, junto con los genes *YUCCA2, PID* y *WAG2* en hojas. Se propuso también qué, en respuesta a FR, *APOLO* participa en el crecimiento de las yemas axilares y activa la síntesis y el flujo de auxinas relacionado con la hiponoastía foliar (120). Notablemente, se sabe que HY5 es necesaria para la elongación del hipocotilo y del pecíolo bajo la sombra (175), pero su transcripción es inducida por la exposición prolongada (8h) a baja R/FR (174). Consistentemente, en las plántulas expuestas al sol, una inhibición del crecimiento del hipocotilo fue más eficiente por la tarde en comparación con la mañana, lo que indica que HY5 es responsable de finalizar la señalización de la sombra, una respuesta bien correlacionada con su abundancia tardía (168,176).

Para concluir, nuestros hallazgos demuestran un mecanismo novedoso por el cual un ARN Inc coordina la actividad de un complejo ribonucleoproteico integrado por un fotorreceptor, FTs y remodeladores de la cromatina para modular la respuesta de las plantas a la luz enriquecida con UV-B.

10. Conclusiones

- El fotorreceptor UVR8 junto a COP1 interactúan con el ARN no codificante *APOLO* y el FT WRKY42, formando un complejo que regula la transcripción del FT *HY5,* que a su vez modula los genes de respuesta al UV-B.
- UVR8 es capaz de unirse a la cromatina, en particular en los sitios de inicio de la transcripción al igual que el FT WRKY42.
- El FT WRKY42 es el responsable de reclutar a UVR8 a la cromatina, a través de COP1, en particular al promotor de *HY5* para activar su transcripción.
- *APOLO* también interactúa con la acetiltransferasa de histonas HAC5, y ambos participan en la deposición de H3K9ac sobre el *locus HY5* en respuesta al UV-B.
- La transcripción de HY5 es amortiguada por la desorganización mediada por APOLO del complejo UVR8, COP1, WRKY42 y HAC5.
- El FT HY5 activa la transcripción de *APOLO* tras la exposición prolongada al UV-B.
- La inducción tardía de *APOLO* por el FT HY5 tras la exposición a UV-B, integra un bucle negativo transcripcional en respuesta al UV-B.

11. Bibliografía

- 1. Corradi N, Pombert JF, Farinelli L, Didier ES, Keeling PJ. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian Encephalitozoon intestinalis. Nat Commun. 2010 Sep;1:77.
- Thomas CAJ. The genetic organization of chromosomes. Annu Rev Genet. 1971;5:237– 56.
- 3. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. Nature. 2012 Sep;489(7414):101–8.
- Ariel F, Romero-Barrios N, Jégu T, Benhamed M, Crespi M. Battles and hijacks: Noncoding transcription in plants. Vol. 20, Trends in Plant Science. Elsevier Ltd; 2015. p. 362–71.
- Comings DE. The structure and function of chromatin. Adv Hum Genet. 1972;3:237– 431.
- Yang Y, Liang T, Zhang L, Shao K, Gu X, Shang R, et al. UVR8 interacts with WRKY36 to regulate HY5 transcription and hypocotyl elongation in Arabidopsis. Nat Plants. 2018 Feb 1;4(2):98–107.
- 7. Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. Biol Proced Online. 2014;16:11.
- 8. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. RNA Biol. 2013 Jun;10(6):925–33.
- Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. Nat Rev Genet. 2019 Nov;20(11):675–91.
- 10. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. Genome Biol. 2017 Oct;18(1):206.
- 11. Lucero L, Ferrero L, Fonouni-Farde C, Ariel F. Functional classification of plant long noncoding RNAs: a transcript is known by the company it keeps. New Phytol. 2021 Feb;229(3):1251–60.
- 12. letswaart R, Wu Z, Dean C. Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. Trends Genet. 2012 Sep;28(9):445–53.
- 13. Heo JB, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. Science. 2011 Jan;331(6013):76–9.
- 14. Zheng Q, Rowley MJ, Böhmdorfer G, Sandhu D, Gregory BD, Wierzbicki AT. RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. Plant J. 2013 Jan;73(2):179–89.
- 15. Ariel F, Jegu T, Latrasse D, Romero-Barrios N, Christ A, Benhamed M, et al. Noncoding transcription by alternative rna polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. Mol Cell. 2014 Aug 7;55(3):383–96.
- 16. Bardou F, Ariel F, Simpson CG, Romero-Barrios N, Laporte P, Balzergue S, et al. Long

Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. Dev Cell. 2014 Jul 28;30(2):166–76.

- 17. Crespi MD, Jurkevitch E, Poiret M, d'Aubenton-Carafa Y, Petrovics G, Kondorosi E, et al. enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. EMBO J. 1994 Nov;13(21):5099–112.
- 18. Lucero L, Fonouni-Farde C, Crespi M, Ariel F. Long noncoding RNAs shape transcription in plants. Transcription. 2020;11(3–4):160–71.
- 19. Fonouni-Farde C, Ariel F, Crespi M. Plant Long Noncoding RNAs: New Players in the Field of Post-Transcriptional Regulations. Non-coding RNA. 2021 Feb;7(1).
- 20. Ariel F, Lucero L, Christ A, Mammarella MF, Jegu T, Veluchamy A, et al. R-Loop Mediated trans Action of the APOLO Long Noncoding RNA. Mol Cell. 2020 Mar 5;77(5):1055-1065.e4.
- 21. Zheng B, Wang Z, Li S, Yu B, Liu JY, Chen X. Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in Arabidopsis. Genes Dev. 2009 Dec;23(24):2850–60.
- Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic Maps of Long Noncoding RNA Occupancy Reveal Principles of RNA-Chromatin Interactions. Mol Cell. 2011 Nov 18;44(4):667–78.
- 23. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. Science. 2009 Oct;326(5950):289–93.
- 24. Xu W, Xu H, Li K, Fan Y, Liu Y, Yang X, et al. The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome. Nat Plants. 2017 Sep 1;3(9):704–14.
- 25. Fonouni-Farde C, Christ A, Blein T, Legascue MF, Ferrero L, Moison M, et al. The Arabidopsis APOLO and human UPAT sequence-unrelated long noncoding RNAs can modulate DNA and histone methylation machineries in plants. Genome Biol. 2022 Aug 29;23(1).
- Quinodoz S, Guttman M. Long noncoding RNAs: An emerging link between gene regulation and nuclear organization. Vol. 24, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2014. p. 651–63.
- Bardou F, Ariel F, Simpson CG, Romero-Barrios N, Laporte P, Balzergue S, et al. Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. Dev Cell [Internet]. 2014;30(2):166–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017
- 28. Moison M, Pacheco JM, Lucero L, Fonouni-Farde C, Rodríguez-Melo J, Mansilla N, et al. The IncRNA APOLO interacts with the transcription factor WRKY42 to trigger root hair cell expansion in response to cold. Mol Plant. 2021;6:1–12.
- Velanis CN, Herzyk P, Jenkins GI. Regulation of transcription by the Arabidopsis UVR8 photoreceptor involves a specific histone modification. Plant Mol Biol [Internet].
 2016;92(4–5):425–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s11103-016-0522-3
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. WRKY transcription factors. Trends Plant Sci [Internet]. 2010;15(5):247–58. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006

- 31. Eulgem T, Somssich IE. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Curr Opin Plant Biol. 2007 Aug;10(4):366–71.
- 32. Pandey SP, Somssich IE. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiol. 2009 Aug;150(4):1648–55.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. Plant Mol Biol. 2004 Aug;55(6):853– 67.
- 34. Tao Z, Liu H, Qiu D, Zhou Y, Li X, Xu C, et al. A pair of allelic WRKY genes play opposite roles in rice-bacteria interactions. Plant Physiol. 2009 Oct;151(2):936–48.
- 35. Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U. A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in Arabidopsis thaliana. Plant Biol (Stuttg). 2008 Sep;10 Suppl 1:110–20.
- 36. Robatzek S, Somssich IE. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. Genes Dev. 2002 May;16(9):1139–49.
- 37. Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, et al. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. Plant Physiol. 2005 Jan;137(1):176–89.
- Qiu JL, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, et al. Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. EMBO J. 2008 Aug;27(16):2214–21.
- Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. Plant Cell. 2008 Sep;20(9):2357– 71.
- Alvarez-Venegas R, Abdallat A Al, Guo M, Alfano JR, Avramova Z. Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. Epigenetics. 2007;2(2):106–13.
- 41. Niu F, Cui X, Zhao P, Sun M, Yang B, Deyholos MK, et al. WRKY42 transcription factor positively regulates leaf senescence through modulating SA and ROS synthesis in Arabidopsis thaliana. Plant J. 2020;104(1):171–84.
- 42. Li R, Liu H, Liu Y, Guo J, Chen Y, Lan X, et al. Insights into the mechanism underlying UV-B induced flavonoid metabolism in callus of a Tibetan medicinal plant Mirabilis himalaica. J Plant Physiol. 2023 Sep;288:154074.
- 43. Tilbrook K, Arongaus AB, Binkert M, Heijde M, Yin R, Ulm R. The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. Arab B. 2013;11:e0164.
- 44. Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL. Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human Regulator of Chromatin Condensation 1. Plant Physiol. 2002;130(1):234–43.
- 45. Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, et al. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(50):18225–30.
- 46. Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, et al. Perception of UV-B by the arabidopsis UVR8 protein. Science (80-). 2011 Apr 1;332(6025):103–6.

- 47. Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, et al. Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. Science. 2012 Mar;335(6075):1492–6.
- 48. Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, et al. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. Nature. 2012 Feb;484(7393):214–9.
- 49. Jenkins GI. The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. Plant Cell. 2014 Jan;26(1):21–37.
- 50. Kaiserli E, Jenkins GI. UV-B promotes rapid nuclear translocation of the Arabidopsis UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. Plant Cell. 2007 Aug;19(8):2662–73.
- 51. Hofmann NR. The molecular mechanism of the UVR8 UV-B photoreceptor. Plant Cell. 2012 Sep;24(9):3485.
- 52. Zeng X, Ren Z, Wu Q, Fan J, Peng PP, Tang K, et al. Dynamic Crystallography Reveals Early Signalling Events in Ultraviolet Photoreceptor UVR8. Nat plants. 2015;1.
- 53. Qian C, Mao W, Liu Y, Ren H, Lau OS, Ouyang X, et al. Dual-Source Nuclear Monomers of UV-B Light Receptor Direct Photomorphogenesis in Arabidopsis. Vol. 9, Molecular plant. England; 2016. p. 1671–4.
- 54. Yin R, Skvortsova MY, Loubéry S, Ulm R. COP1 is required for UV-B-induced nuclear accumulation of the UVR8 photoreceptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul;113(30):E4415-22.
- 55. Gruber H, Heijde M, Heller W, Albert A, Seidlitz HK, Ulm R. Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov;107(46):20132–7.
- 56. Heijde M, Ulm R. Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan;110(3):1113–8.
- 57. Podolec R, Ulm R. Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. Curr Opin Plant Biol. 2018 Oct;45(Pt A):18–25.
- 58. Lau OS, Deng XW. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1 : 20 years later. Trends Plant Sci [Internet]. 2012;17(10):584–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.004
- Oravecz A, Baumann A, Máté Z, Brzezinska A, Molinier J, Oakeley EJ, et al. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in Arabidopsis. Plant Cell. 2006 Aug;18(8):1975–90.
- 60. Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravecz A, Funk M, et al. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. EMBO J. 2009 Mar;28(5):591–601.
- 61. Huang X, Ouyang X, Yang P, Lau OS, Chen L, Wei N, et al. Conversion from CUL4-based COP1-SPA E3 apparatus to UVR8-COP1-SPA complexes underlies a distinct biochemical function of COP1 under UV-B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct;110(41):16669–74.
- 62. Binkert M, Kozma-Bognár L, Terecskei K, De Veylder L, Nagy F, Ulm R. UV-B-responsive association of the Arabidopsis bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 with target genes, including its own promoter. Plant Cell. 2014 Oct;26(10):4200–13.

- 63. Yin R, Ulm R. How plants cope with UV-B: from perception to response. Curr Opin Plant Biol [Internet]. 2017;37:42–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.013
- 64. Clouse SD. Brassinosteroids. Arab B. 2011;9:e0151.
- 65. Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. Cell. 1997 Sep;90(5):929–38.
- 66. He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jul;99(15):10185–90.
- 67. Nam KH, Li J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell. 2002 Jul;110(2):203–12.
- Li J, Jin H. Regulation of brassinosteroid signaling. Trends Plant Sci. 2007 Jan;12(1):37–41.
- 69. Belkhadir Y, Jaillais Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. New Phytol. 2015 Apr;206(2):522–40.
- 70. Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, et al. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. Dev Cell. 2002 Apr;2(4):505–13.
- 71. Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, et al. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. Cell. 2002 Apr;109(2):181–91.
- 72. Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. Cell. 2005 Jan;120(2):249–59.
- Liang T, Mei S, Shi C, Yang Y, Peng Y, Ma L, et al. UVR8 Interacts with BES1 and BIM1 to Regulate Transcription and Photomorphogenesis in Arabidopsis. Dev Cell. 2018;44(4):512-523.e5.
- 74. Vert G, Chory J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. Nature. 2006 May;441(7089):96–100.
- 75. Liang T, Yang Y, Liu H. Signal transduction mediated by the plant UV-B photoreceptor UVR8. New Phytol. 2019 Feb;221(3):1247–52.
- 76. Hayes S, Velanis CN, Jenkins GI, Franklin KA. UV-B detected by the UVR8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug;111(32):11894–9.
- Hayes S, Sharma A, Fraser DP, Trevisan M, Cragg-Barber CK, Tavridou E, et al. UV-B
 Perceived by the UVR8 Photoreceptor Inhibits Plant Thermomorphogenesis. Curr Biol. 2017 Jan;27(1):120–7.
- 78. Fraser DP, Hayes S, Franklin KA. Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. Curr Opin Plant Biol. 2016 Oct;33:1–7.
- 79. Lorrain S, Allen T, Duek PD, Whitelam GC, Fankhauser C. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. Plant J. 2008 Jan;53(2):312–23.

- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, et al. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. Nature. 2008 Jan;451(7177):475–9.
- de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, et al. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature. 2008 Jan;451(7177):480–4.
- Cloix C, Jenkins GI. Interaction of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. Mol Plant [Internet]. 2008;1(1):118–28. Available from: http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssm012
- 83. Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. Annu Rev Biochem. 2009;78:273–304.
- 84. Ito T, Tarutani Y, To TK, Kassam M, Duvernois-Berthet E, Cortijo S, et al. Genome-wide negative feedback drives transgenerational DNA methylation dynamics in Arabidopsis. PLoS Genet. 2015 Apr;11(4):e1005154.
- 85. Jarillo JA, Piñeiro M, Cubas P, Martínez-Zapater JM. Chromatin remodeling in plant development. Int J Dev Biol. 2009;53(8–10):1581–96.
- Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. Cell. 2007 Feb;128(4):707–19.
- 87. Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. Nucleic Acids Res. 2002 Dec;30(23):5036–55.
- 88. Boycheva I, Vassileva V, Iantcheva A. Histone acetyltransferases in plant development and plasticity. Curr Genomics. 2014 Feb;15(1):28–37.
- 89. Liu X, Yang S, Zhao M, Luo M, Yu CW, Chen CY, et al. Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. Mol Plant. 2014 May;7(5):764–72.
- 90. Kim W, Benhamed M, Servet C, Latrasse D, Zhang W, Delarue M, et al. Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in Arabidopsis. Cell Res. 2009 Jul;19(7):899–909.
- 91. Zhang K, Sridhar V V, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK. Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana. PLoS One. 2007 Nov;2(11):e1210.
- 92. Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. Curr Opin Genet Dev. 2001 Apr;11(2):155–61.
- 93. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. Nat Struct Mol Biol. 2007 Nov;14(11):1025–40.
- 94. Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. Nature. 2000 Oct;407(6804):585–91.
- 95. McNellis TW, Deng XW. Light control of seedling morphogenetic pattern. Plant Cell. 1995 Nov;7(11):1749–61.
- 96. Chua YL, Brown AP, Gray JC. Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene. Plant Cell. 2001

Mar;13(3):599-612.

- 97. Guo L, Zhou J, Elling AA, Charron JBF, Deng XW. Histone modifications and expression of light-regulated genes in Arabidopsis are cooperatively influenced by changing light conditions. Plant Physiol. 2008 Aug;147(4):2070–83.
- 98. Bertrand C, Benhamed M, Li YF, Ayadi M, Lemonnier G, Renou JP, et al. Arabidopsis HAF2 gene encoding TATA-binding protein (TBP)-associated factor TAF1, is required to integrate light signals to regulate gene expression and growth. J Biol Chem. 2005 Jan;280(2):1465–73.
- 99. Benhamed M, Bertrand C, Servet C, Zhou DX. Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell. 2006 Nov;18(11):2893–903.
- 100. Jang IC, Chung PJ, Hemmes H, Jung C, Chua NH. Rapid and reversible light-mediated chromatin modifications of Arabidopsis phytochrome A locus. Plant Cell. 2011 Feb;23(2):459–70.
- 101. Longo C, Lepri A, Paciolla A, Messore A, De Vita D, Bonaccorsi di Patti MC, et al. New Inhibitors of the Human p300/CBP Acetyltransferase Are Selectively Active against the Arabidopsis HAC Proteins. Int J Mol Sci. 2022 Sep;23(18).
- 102. Deng W, Liu C, Pei Y, Deng X, Niu L, Cao X. Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis. Plant Physiol. 2007 Apr;143(4):1660–8.
- Li C, Xu J, Li J, Li Q, Yang H. Involvement of Arabidopsis histone acetyltransferase HAC family genes in the ethylene signaling pathway. Plant Cell Physiol. 2014 Feb;55(2):426– 35.
- 104. An C, Li L, Zhai Q, You Y, Deng L, Wu F, et al. Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Oct;114(42):E8930–9.
- 105. Guo J, Wei L, Chen SS, Cai XW, Su YN, Li L, et al. The CBP/p300 histone acetyltransferases function as plant-specific MEDIATOR subunits in Arabidopsis. J Integr Plant Biol. 2021 Apr;63(4):755–71.
- 106. Ye W, Murata Y. Microbe Associated Molecular Pattern Signaling in Guard Cells. Front Plant Sci. 2016;7:583.
- 107. Yang J, Li C, Kong D, Guo F, Wei H. Light-Mediated Signaling and Metabolic Changes Coordinate Stomatal Opening and Closure. Front Plant Sci. 2020;11:601478.
- Matthews JSA, Vialet-Chabrand SRM, Lawson T. Diurnal Variation in Gas Exchange: The Balance between Carbon Fixation and Water Loss. Plant Physiol. 2017 Jun;174(2):614– 23.
- 109. Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. New Phytol. 2014 Jul;203(1):44–62.
- 110. Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. Curr Opin Plant Biol. 2015 Dec;28:154–62.
- 111. Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH, Yang HQ. From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug;102(34):12270–5.

- 112. Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature. 2001 Dec;414(6864):656–60.
- 113. Wang FF, Lian HL, Kang CY, Yang HQ. Phytochrome B is involved in mediating red lightinduced stomatal opening in Arabidopsis thaliana. Mol Plant. 2010 Jan;3(1):246–59.
- 114. Yin R, Ulm R. How plants cope with UV-B: from perception to response. Curr Opin Plant Biol. 2017 Jun;37:42–8.
- 115. Tossi V, Lamattina L, Jenkins GI, Cassia RO. Ultraviolet-B-induced stomatal closure in arabidopsis is regulated by the UV RESISTANCE LOCUS8 photoreceptor in a nitric oxide-dependent mechanism. Plant Physiol. 2014;164(4):2220–30.
- Zhao X, Qiao XR, Yuan J, Ma XF, Zhang X. Nitric oxide inhibits blue light-induced stomatal opening by regulating the K+ influx in guard cells. Plant Sci. 2012 Mar;184:29– 35.
- 117. Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Mol Biol. 2000 Apr;42(6):819–32.
- 118. Foerster AM, Mittelsten Scheid O. Analysis of DNA methylation in plants by bisulfite sequencing. Methods Mol Biol. 2010;631:1–11.
- 119. Koncz C, Schell J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. Mol Gen Genet MGG [Internet]. 1986;204(3):383–96. Available from: https://doi.org/10.1007/BF00331014
- 120. Mammarella MF, Lucero L, Hussain N, Muñoz-Lopez A, Huang Y, Ferrero L, et al. Long noncoding RNA-mediated epigenetic regulation of auxin-related genes controls shade avoidance syndrome in Arabidopsis. EMBO J. 2023 Dec;42(24):e113941.
- 121. Oyama T, Shimura Y, Okada K. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. Genes Dev. 1997 Nov;11(22):2983–95.
- 122. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 1998 Dec;16(6):735–43.
- 123. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979 Nov;7(6):1513–23.
- 124. Sorenson R, Bailey-Serres J. Rapid immunopurification of ribonucleoprotein complexes of plants. Methods Mol Biol. 2015;1284:209–19.
- 125. Canto T, Uhrig JF, Swanson M, Wright KM, MacFarlane SA. Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. J Virol. 2006 Sep;80(18):9064–72.
- 126. Westhof E. How to silence silencing. Chem Biol. 2004 Feb;11(2):158–60.
- 127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug;227(5259):680–5.
- 128. Xu P, Yang Y, Zhao Z, Hu J, Xie J, Wang L, et al. The transcription factor Dof3.6/OBP3 regulates iron homeostasis in Arabidopsis. EMBO J. 2024 Nov;
- 129. Yoo SD, Cho YH, Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for

transient gene expression analysis. Nat Protoc. 2007;2(7):1565-72.

- 130. Huang X, Yang P, Ouyang X, Chen L, Deng XW. Photoactivated UVR8-COP1 Module Determines Photomorphogenic UV-B Signaling Output in Arabidopsis. 2014;10(3).
- 131. Cloix C, Jenkins GI. Interaction of the Arabidopsis UV-B-specific signaling component UVR8 with chromatin. Mol Plant. 2008 Jan;1(1):118–28.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res [Internet]. 2009 Jul 1;37(suppl_2):W202–8. Available from: https://doi.org/10.1093/nar/gkp335
- 133. Jenkins GI. Photomorphogenic responses to ultraviolet-B light. Plant Cell Environ. 2017;2544–57.
- 134. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. Bioinformatics. 2020 Apr;36(8):2628–9.
- 135. Chen Z, Dong Y, Huang X. Plant responses to UV-B radiation: signaling, acclimation and stress tolerance. Stress Biol. 2022 Dec;2(1):51.
- 136. Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Ádám É, Oakeley EJ, et al. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(5):1397–402.
- 137. Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI. Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. Plant Methods. 2008;4(1):1–15.
- 138. Waese J, Fan J, Pasha A, Yu H, Fucile G, Shi R, et al. ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. Plant Cell [Internet].
 2017 Aug 1;29(8):1806–21. Available from: https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073
- Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. J Biol Chem. 2003 May;278(21):19134– 40.
- 140. Cañibano E, Bourbousse C, García-León M, Garnelo Gómez B, Wolff L, García-Baudino C, et al. DET1-mediated COP1 regulation avoids HY5 activity over second-site gene targets to tune plant photomorphogenesis. Mol Plant. 2021;14(6):963–82.
- 141. Ren X, Jiang K, Zhang F. The Multifaceted Roles of RCC1 in Tumorigenesis. Front Mol Biosci. 2020;7(September):1–8.
- 142. Cloix C, Kaiserli E, Heilmann M, Baxter KJ, Brown BA, Hara AO, et al. C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein. 2012;109(40).
- Binkert M, Crocco CD, Ekundayo B, Lau K, Raffelberg S, Tilbrook K, et al. Revisiting chromatin binding of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8. BMC Plant Biol [Internet]. 2016;16(1):1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0732-5
- 144. Veluchamy A, Jégu T, Ariel F, Latrasse D, Mariappan KG, Kim SK, et al. LHP1 Regulates H3K27me3 Spreading and Shapes the Three-Dimensional Conformation of the Arabidopsis Genome. PLoS One. 2016 Jul 1;11(7).
- 145. Kaiserli E, Jenkins GI. UV-B Promotes Rapid Nuclear Translocation of the Arabidopsis UV-B Specific Signaling Component UVR8 and Activates Its Function in the Nucleus.

2007;19(August):2662-73.

- 146. Fang F, Lin L, Zhang Q, Lu M, Skvortsova MY, Podolec R, et al. Mechanisms of <scp>UV-B</scp> light-induced photoreceptor <scp>UVR8</scp> nuclear localization dynamics. New Phytol [Internet]. 2022 Sep 21; Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.18468
- 147. Podolec R, Demarsy E, Ulm R. Perception and Signaling of Ultraviolet-B Radiation in Plants. Annu Rev Plant Biol. 2021;72:793–822.
- 148. Yang Y, Zhang L, Chen P, Liang T, Li X, Liu H. UV-B photoreceptor UVR8 interacts with MYB73/MYB77 to regulate auxin responses and lateral root development. EMBO J. 2020;39(2):1–15.
- 149. Qian C, Chen Z, Liu Q, Mao W, Chen Y, Tian W, et al. Coordinated Transcriptional Regulation by the UV-B Photoreceptor and Multiple Transcription Factors for Plant UV-B Responses. Mol Plant [Internet]. 2020;13(5):777–92. Available from: https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.015
- 150. Díaz-Ramos LA, O'Hara A, Kanagarajan S, Farkas D, Strid Å, Jenkins GI. Difference in the action spectra for UVR8 monomerisation and HY5 transcript accumulation in Arabidopsis. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2018 Aug;17(8):1108–17.
- 151. Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL. Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human Regulator of Chromatin Condensation 1. Plant Physiol. 2002;130(1):234–43.
- 152. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. Annu Rev Biochem. 2012;81:145–66.
- 153. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, et al. Panda Incrna. 2013;43(7):621–9.
- 154. Pacheco JM, Mansilla N, Moison M, Lucero L, Gabarain VB, Ariel F, et al. The IncRNA APOLO and the transcription factor WRKY42 target common cell wall EXTENSIN encoding genes to trigger root hair cell elongation. Plant Signal Behav. 2021 Aug;16(8):1920191.
- 155. Asghar MA, Li Y, Jiang H, Sun X, Ahmad B, Imran S, et al. Crosstalk between abscisic acid and auxin under osmotic stress. Agron J. 2019;111(5):2157–62.
- 156. Li J, Zeng J, Tian Z, Zhao Z. Root-specific photoreception directs early root development by HY5-regulated ROS balance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2024 Feb;121(6):e2313092121.
- 157. Gaddam SR, Sharma A, Bhatia C, Trivedi PK. A network comprising ELONGATED HYPOCOTYL 5, microRNA397b, and auxin-associated factors regulates root hair growth in Arabidopsis. Plant Physiol [Internet]. 2024;00(0):1–15. Available from: https://doi.org/10.1093/plphys/kiae301
- 158. Li J, Besseau S, Törönen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, et al. Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in Arabidopsis. New Phytol. 2013 Oct;200(2):457–72.
- 159. Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ, et al. Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in

Arabidopsis. Plant J. 2014 Jul;79(1):13–27.

- 160. Qiao Z, Li CL, Zhang W. WRKY1 regulates stomatal movement in drought-stressed Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol. 2016 May;91(1–2):53–65.
- 161. Seo JS, Sun HX, Park BS, Huang CH, Yeh SD, Jung C, et al. ELF18-INDUCED LONG-NONCODING RNA Associates with Mediator to Enhance Expression of Innate Immune Response Genes in Arabidopsis. Plant Cell. 2017 May;29(5):1024–38.
- Cheng SLH, Xu H, Ng JHT, Chua NH. Systemic movement of long non-coding RNA ELENA1 attenuates leaf senescence under nitrogen deficiency. Nat plants. 2023 Oct;9(10):1598–606.
- 163. Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, et al. Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKCbetall messenger ribonucleic acid. Endocrinology. 2009 May;150(5):2087–97.
- 164. Cooper DR, Carter G, Li P, Patel R, Watson JE, Patel NA. Long Non-Coding RNA NEAT1 Associates with SRp40 to Temporally Regulate PPARγ2 Splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. Genes (Basel). 2014 Nov;5(4):1050–63.
- 165. Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Iwasaki K, et al. Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Feb 2;113(5):1273–8.
- 166. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. Mol Cell. 2010 Sep;39(6):925–38.
- Zhou J, Liu J, Xing H, Shen Y, Xie M, Chai J, et al. Implications of protein ubiquitination modulated by IncRNAs in gastrointestinal cancers. Biochem Pharmacol [Internet].
 2021;188(April):114558. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114558
- 168. Gangappa SN, Botto JF. The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. Mol Plant [Internet]. 2016;9(10):1353–65. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002
- 169. Mankotia S, Jakhar P, Satbhai SB. HY5: a key regulator for light-mediated nutrient uptake and utilization by plants. New Phytol. 2024;
- 170. Job N, Lingwan M, Masakapalli SK, Datta S. Transcription factors BBX11 and HY5 interdependently regulate the molecular and metabolic responses to UV-B. Plant Physiol [Internet]. 2022 Aug 1;189(4):2467–80. Available from: https://doi.org/10.1093/plphys/kiac195
- 171. Bian Y, Chu L, Lin H, Qi Y, Fang Z, Xu D. PIFs- and COP1-HY5-mediated temperature signaling in higher plants. Stress Biol. 2022 Aug;2(1):35.
- 172. Park YJ, Lee HJ, Ha JH, Kim JY, Park CM. COP1 conveys warm temperature information to hypocotyl thermomorphogenesis. New Phytol. 2017 Jul;215(1):269–80.
- 173. Gangappa SN, Kumar SV. DET1 and HY5 Control PIF4-Mediated Thermosensory Elongation Growth through Distinct Mechanisms. Cell Rep. 2017 Jan;18(2):344–51.
- 174. Ciolfi A, Sessa G, Sassi M, Possenti M, Salvucci S, Carabelli M, et al. Dynamics of the shade-avoidance response in Arabidopsis. Plant Physiol. 2013 Sep;163(1):331–53.

- 175. Nozue K, Tat A V, Kumar Devisetty U, Robinson M, Mumbach MR, Ichihashi Y, et al. Shade avoidance components and pathways in adult plants revealed by phenotypic profiling. PLoS Genet. 2015 Apr;11(4):e1004953.
- 176. Sellaro R, Yanovsky MJ, Casal JJ. Repression of shade-avoidance reactions by sunfleck induction of HY5 expression in Arabidopsis. Plant J. 2011 Dec;68(5):919–28.

Anexo

Anexo 1: Targets de UVR8 y WRKY42. Link de acceso: <u>https://drive.google.com/drive/folders/10LPf6zO4aVByBoQjov408Rg9CgO2uFL9?usp=drive_link</u>

Anexo 2: Lista de genes cuya transcripción se ve aumentada por el tratamiento de 1h de luz blanca suplementada con UV-B de manera dependiente de UVR8:

AT1G01420, AT1G01470, AT1G01520, AT1G02340, AT1G02350, AT1G02390, AT1G02820, AT1G04530, AT1G05100, AT1G05870, AT1G06000, AT1G06040, AT1G06180, AT1G06430, AT1G06690, AT1G07010, AT1G07128, AT1G07150, AT1G07720, AT1G08570, AT1G09350, AT1G10370, AT1G10657, AT1G10920, AT1G10960, AT1G12250, AT1G12370, AT1G13080, AT1G13600, AT1G13610, AT1G13670, AT1G14430, AT1G14820, AT1G15100, AT1G16730, AT1G17050, AT1G17100, AT1G17400, AT1G18330, AT1G18810, AT1G19490, AT1G19700, AT1G19970, AT1G20070, AT1G20450, AT1G22770, AT1G23010, AT1G23550, AT1G24148, AT1G24580, AT1G26560, AT1G26790, AT1G29640, AT1G29720, AT1G31540, AT1G32690, AT1G32780, AT1G32870, AT1G32900, AT1G33560, AT1G35140, AT1G35710, AT1G42550, AT1G42560, AT1G48100, AT1G48745, AT1G49450, AT1G49660, AT1G50180, AT1G50250, AT1G51440, AT1G51700, AT1G51805, AT1G51820, AT1G52690, AT1G53080, AT1G53090, AT1G53680, AT1G54540, AT1G55910, AT1G55960, AT1G56600, AT1G56670, AT1G58520, AT1G58807, AT1G59740, AT1G60270, AT1G60590, AT1G61380, AT1G61890, AT1G62030, AT1G62180, AT1G62570, AT1G62975, AT1G64500, AT1G65060, AT1G65190, AT1G65486, AT1G65490, AT1G65620, AT1G65870, AT1G66230, AT1G66330, AT1G66540, AT1G66725, AT1G66780, AT1G66840, AT1G67030, AT1G67070, AT1G67360, AT1G68440, AT1G69530, AT1G69640, AT1G69730, AT1G69870, AT1G70000, AT1G70420, AT1G70985, AT1G72240, AT1G72490, AT1G73010, AT1G73480, AT1G73650, AT1G73670, AT1G74300, AT1G74430, AT1G75040, AT1G75170, AT1G76570, AT1G78070, AT1G78100, AT1G78440, AT1G78450, AT1G78510, AT1G78600, AT1G78820, AT1G79245, AT1G79270, AT1G79770, AT1G80130, AT1G80340, AT1G80610, AT2G01290, AT2G02410, AT2G04570, AT2G04795, AT2G14060, AT2G15020, AT2G15970, AT2G16365, AT2G16430, AT2G16890, AT2G17220, AT2G18790, AT2G18969, AT2G19650, AT2G20570, AT2G21220, AT2G21320, AT2G21560, AT2G21970, AT2G23000, AT2G23120, AT2G23670, AT2G23690, AT2G23910, AT2G24190, AT2G24540, AT2G25450, AT2G25470, AT2G25510, AT2G25530, AT2G25620, AT2G27420, AT2G27820, AT2G28550, AT2G28880, AT2G29090, AT2G29340, AT2G29450, AT2G30040, AT2G30520, AT2G31560, AT2G31750, AT2G32390, AT2G32510, AT2G33530, AT2G33585, AT2G33590, AT2G34810, AT2G34960, AT2G35290, AT2G35660, AT2G35700, AT2G35760, AT2G35940, AT2G35960, AT2G36590, AT2G36630, AT2G36790, AT2G36800, AT2G36870, AT2G36970, AT2G37970, AT2G38210, AT2G38230, AT2G39250, AT2G39800, AT2G39980, AT2G40080, AT2G40150, AT2G40900, AT2G41000, AT2G41250, AT2G41342, AT2G43900, AT2G43910, AT2G45680, AT2G46270, AT2G46340, AT2G46410, AT2G46420, AT2G46450, AT2G46790, AT2G46830, AT2G47460, AT2G47485, AT2G47490, AT2G47770, AT3G01140, AT3G01820, AT3G02140, AT3G02910, AT3G04110, AT3G04140, AT3G05327, AT3G05800, AT3G05932, AT3G06070, AT3G07700, AT3G08505, AT3G09450, AT3G09520, AT3G09650, AT3G12580, AT3G14200, AT3G14690, AT3G14770, AT3G15090, AT3G15310, AT3G15354, AT3G15760, AT3G16175, AT3G16350, AT3G17110, AT3G17609, AT3G17611, AT3G17690, AT3G17790, AT3G17800, AT3G18217, AT3G19450, AT3G21150, AT3G21560, AT3G21670, AT3G21690, AT3G21890, AT3G22060, AT3G22830, AT3G22840, AT3G22886, AT3G23110, AT3G23210, AT3G23410, AT3G23530, AT3G23810, AT3G23920, AT3G24170, AT3G24190, AT3G24520, AT3G24840, AT3G27170, AT3G28160, AT3G28270, AT3G44310, AT3G44450, AT3G44720, AT3G44735, AT3G44970, AT3G46870, AT3G47420, AT3G47430, AT3G47770, AT3G47820, AT3G47830, AT3G47960, AT3G48310, AT3G48320, AT3G48350, AT3G48460, AT3G48520, AT3G48700, AT3G49210, AT3G49760, AT3G50560, AT3G50970, AT3G50980, AT3G51240, AT3G51920, AT3G52450, AT3G52540, AT3G52740, AT3G52950, AT3G53830, AT3G54420, AT3G54990, AT3G55110, AT3G55120, AT3G55580, AT3G56260, AT3G56290, AT3G56300, AT3G57020, AT3G57062, AT3G57190, AT3G57540, AT3G57830, AT3G61220, AT3G61750, AT3G62990, AT4G00050, AT4G00970, AT4G01540, AT4G01660, AT4G02420, AT4G03400, AT4G04840, AT4G05100, AT4G07390, AT4G08630, AT4G09420, AT4G09570, AT4G10450, AT4G12720, AT4G14420, AT4G14600, AT4G16146, AT4G16250, AT4G16620, AT4G18780, AT4G19700, AT4G21530, AT4G22830, AT4G23860, AT4G24540, AT4G24580, AT4G25250, AT4G25770, AT4G26510, AT4G27140, AT4G28410, AT4G29380, AT4G29890, AT4G30090, AT4G30790, AT4G30950, AT4G31290, AT4G31550, AT4G31710, AT4G31920, AT4G32000, AT4G32600, AT4G32700, AT4G33000, AT4G33540, AT4G34131, AT4G34490, AT4G34500, AT4G34610, AT4G35130, AT4G35510, AT4G35770, AT4G36220, AT4G36640, AT4G37550, AT4G38070, AT4G38740, AT4G39360, AT4G39480, AT4G39800, AT4G40050, AT4G40060, AT4G40070, AT4G40420, AT4G40480, AT4G40490, AT4G40520, AT4G40550, AT4G40650, AT4G40880, AT4G40950, AT4G41540, AT5G01890, AT5G01960, AT5G02260, AT5G02410, AT5G02960, AT5G03760, AT5G03970, AT5G04120, AT5G04290, AT5G05200, AT5G06140, AT5G07300, AT5G08550, AT5G09000, AT5G09410, AT5G09590, AT5G11890, AT5G11910, AT5G12610, AT5G14850, AT5G17060, AT5G17070, AT5G17100, AT5G17340, AT5G17390, AT5G19220, AT5G19970, AT5G20320, AT5G20980, AT5G22540, AT5G23120, AT5G23410, AT5G23980, AT5G24260, AT5G25260, AT5G25930, AT5G26680, AT5G26920, AT5G27470, AT5G27490, AT5G28020, AT5G28540, AT5G28640, AT5G28690, AT5G30340, AT5G30440, AT5G31550, AT5G32810, AT5G34500, AT5G35130, AT5G35430, AT5G35620, AT5G37300, AT5G37670, AT5G37690, AT5G37790, AT5G38020, AT5G39560, AT5G39610, AT5G40700, AT5G41480, AT5G41560, AT5G41590, AT5G42260, AT5G42400, AT5G43270, AT5G43740, AT5G44680, AT5G45320, AT5G46050, AT5G46630, AT5G46780, AT5G46950, AT5G47610, AT5G47900, AT5G49050, AT5G49810, AT5G50740, AT5G51440, AT5G52000, AT5G52310, AT5G52870, AT5G53160, AT5G53230, AT5G54270, AT5G54490, AT5G54690, AT5G55800, AT5G55900, AT5G56230, AT5G56550, AT5G56740, AT5G57360, AT5G57820, AT5G57940, AT5G58910, AT5G59120, AT5G59440, AT5G59500, AT5G59610, AT5G60600, AT5G61850, AT5G62290, AT5G63110, AT5G63640, AT5G64160, AT5G64420, AT5G65450, AT5G65920, AT5G66250, AT5G66980, AT5G67650, AT5G67680, AT5G68480, AT5G68720, AT5G69250, AT5G69550, AT5G69840, AT5G69980, AT5G70470, AT5G70900, AT5G71930, AT5G71990, AT5G72680, AT5G73560, AT5G73910, AT5G74180, AT5G74590, AT5G74810, AT5G75310, AT5G75610, AT5G75660, AT5G76800, AT5G77200, AT5G77990, AT5G78080, AT5G78130, AT5G78300, AT5G78600, AT5G79270, AT5G79690, AT5G80160, AT5G80330, AT5G80580.

Anexo 3: Lista de genes cuya transcripción se ve disminuida por el tratamiento de 1h de luz blanca suplementada con UV-B de manera dependiente de UVR8:

AT1G30250, AT1G60060, AT1G67265, AT2G01755, AT2G44910, AT2G46970, AT3G10040, AT3G51400, AT3G60390, AT4G25420, AT4G34770, AT4G34790, AT5G15160, AT5G39860.

Anexo 4: Lista de genes blanco en común de *APOLO*, UVR8 y WRKY42 y lista de que genes están desregulados en plantas que sobreexpresan *APOLO* y plantas tratadas con UV-B y cuya expresión depende de la presencia de UVR8. *Link* de acceso:

<u>https://drive.google.com/drive/folders/10LPf6zO4aVByBoQjov408Rg9CqO2uFL9?usp=drive_lin</u> <u>k</u>