



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCIÓN DE *HAM1* EN RESPUESTA A DAÑO AL
DNA EN LA PLANTA *Arabidopsis thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

STEFAN STECKENBORN DÍAZ CORIA



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos Académicos

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas y en el laboratorio de Epigenética de plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo y Berenice García Ponce de León, la ayuda técnica del Dr. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes para realizar la investigación de esta tesis.

El financiamiento para insumos, secuenciación y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación CONACyT (152649; 180098; 180380; 167705; 105678) y DGAPA, UNAM (IB201212-2-RR281212; IN204011-3; IN203113-3; IN226510-3)

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de beca para tesis de licenciatura del proyecto CONACYT: 152649, titulado “Regulación epigenética de genes MADS-box y sus implicaciones en la diversidad ecotípica de *Arabidopsis thaliana*”.

Agradecimientos personales

A mi mamá, por ser fuente de amor, inspiración, comprensión y apoyo incondicional. Por eso soy su más grande admirador. Sin ti no lo habría logrado y te estaré por siempre agradecido.

A mi hermanita, por todo tu cariño, por toda la diversión, por todo lo que hemos vivido. Sé que también te esperan grandes cosas, y allí estaré para apoyarte así como tú lo hiciste conmigo.

A mi tutora, por darme esta oportunidad, por todo su esfuerzo, por tenerme tanta paciencia y por ayudarme a encontrar la motivación para seguir por este camino.

A mis amigos, maestros y compañeros del Laboratorio y de la Facultad, por todos los buenos consejos, enseñanzas y momentos, por ser parte de esta magnífica experiencia.

Índice

Agradecimientos Académicos.....	1
Agradecimientos personales.....	2
Índice	3
Abreviaturas	5
Resumen	6
1 Introducción.....	7
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	7
1.2 Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	9
1.3 Tipos de daño al DNA en las plantas.....	12
1.4 Respuesta al daño al DNA y mecanismos de reparación en <i>Arabidopsis</i>	14
1.5 Importancia de la epigenética en la reparación del daño al DNA.....	22
1.6 Antecedentes inmediatos.....	25
2 Hipótesis.....	27
3 Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos particulares.....	28
4 Materiales y Métodos.....	29
4.1 Material biológico.....	29
4.2 Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
4.3 Caracterización de las plantas mutantes.....	30
4.4 Condiciones de inducción de daño al DNA con Zeocina.....	31
4.5 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.....	31
4.6 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal.....	32
4.7 Extracción de RNA y RT-PCR.....	32
4.8 Clonación del gen completo de HAM1 (<i>pHAM1:HAM1:GFP</i>).....	34
4.9 Obtención de plantas <i>ham1-1</i> x <i>pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS</i>	39
4.10 Análisis estadísticos empleados.....	39
5 Resultados	40
5.1 Inducción de DSBs en <i>Arabidopsis</i> mediante tratamientos con zeocina.....	40
5.2 Efecto de la inducción de DSBs sobre el crecimiento radicular de plantas mutantes <i>ham1-1</i>	40
5.3. Efecto de la inducción de DSBs sobre el meristemo radicular de <i>ham1-1</i>	43
5.4 Efecto de la inducción de DSBs sobre el crecimiento radicular de plantas mutantes <i>atm-2</i> y <i>atr-2</i>	46
5.5 Determinación de la muerte celular inducido por DSBs en las plantas mutantes <i>ham1-1</i> , <i>atm-2</i> y <i>atr-2</i>	49
5.6 Efecto del tratamiento con zeocina en la expresión génica de las plantas.....	51
5.7 Arresto del ciclo celular en la mutante <i>ham1-1</i> en respuesta a la inducción de daño por DSBs.....	52
5.8 Elaboración y análisis de la construcción <i>pHAM1:HAM1:GFP</i>	53
6 Discusión.....	57
7 Conclusiones.....	62
8 Perspectivas.....	63

9 Referencias.....	64
Anexo 1.....	67

Abreviaturas

ATM	ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED
ATR	ATM/RAD3-RELATED
BER	Reparación del daño al DNA por escisión de bases
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSB	Ruptura de las dos hebras del DNA
GFP	Sistema reportero de la Proteína Verde Fluorescente
GUS	Sistema reportero de la β -glucuronidasa
H1	Histona 1
H2	Histona 2
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HAT	Enzima con actividad de histona acetilasa
HDAC	Enzima con actividad de histona deacetilasa
HR	Mecanismo de reparación de DSBs por medio de secuencias homólogas
K	Lisina.
MMR	Mecanismo de reparación del mal apareamiento de bases en el DNA
NER	Mecanismo de reparación del daño al DNA por escisión de nucleótidos
NHR	Mecanismo de reparación de DSBs por ligación de los bordes
pb	Pares de base
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QC	Centro quiescente del meristemo radicular
RAM	Meristemo apical de la raíz
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	Meristemo apical aéreo
SSB	Ruptura de una sola hebra del DNA
UV	Radiación ultravioleta

Resumen

Las plantas son organismos sésiles, por lo que necesitan tener una gran capacidad para integrar las respuestas a cambios ambientales y a distintos tipos de estrés, los cuales pueden generar, entre otras cosas, daño al DNA. La regulación epigenética participa en los procesos de respuesta al daño al DNA, siendo parte de los mecanismos que le dan a las plantas la plasticidad que requieren para responder a este estrés. Un ejemplo de la participación de la regulación epigenética en respuesta al daño al DNA son las acetilasas de histonas de la familia MYST (MOZ, YBF2, SAS2 y TIP60), las cuales están muy conservadas entre los eucariontes ya que suelen jugar un papel importante en la replicación y reparación del DNA. *Arabidopsis thaliana* solo tiene dos proteínas tipo MYST HAM1 y HAM2, las cuales no han sido lo suficientemente estudiadas. La histona acetilasa HAM1 es capaz de interactuar con proteínas implicadas en la replicación del DNA y también parece participar en la respuesta al daño al DNA, aunque en realidad no se sabe cuál es su función. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es definir la función de *HAM1* en respuesta al daño al DNA durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. Para ello utilizamos tratamientos de inducción de rupturas de doble cadena al DNA en plantas control y mutantes de pérdida de función de *HAM1*. Los resultados obtenidos indican que *HAM1* participa en la detención de la proliferación de las células meristemáticas de la raíz en respuesta al daño al DNA; *HAM1* también previene la acumulación del daño al DNA en las células meristemáticas, evitando que estas mueran. Además, *HAM1* participa en la inducción de la expresión de *ATM* y *ATR*, dos cinasas que son fundamentales para la activación de la respuesta al daño al DNA. También pudimos determinar por medio de una construcción con GFP, que HAM1 se localiza principalmente en el núcleo de células con capacidad de proliferar. Dicha construcción será empleada para determinar qué genes son regulados directamente por HAM1.

1 Introducción.

Las plantas y los animales desarrollaron de manera independiente la multicelularidad como resultado de una convergencia evolutiva, de tal suerte que si bien si hay similitudes entre estos grupos, también se presentan estrategias muy diferentes en diversos procesos, como son el desarrollo corporal y la respuesta a estímulos ambientales. Muchas de estas diferencias están en buena medida relacionadas a una característica clave como es la movilidad. Las plantas a diferencia de los animales, son organismos sésiles, por lo que deben de tener una gran capacidad para integrar las respuestas a cambios ambientales y a distintos tipos de estrés para poder adaptarse a diferentes ambientes (Cruz, 2010).

La respuesta al daño al DNA es un ejemplo claro de las diferencias que existen entre plantas y animales; si bien pueden encontrarse similitudes principalmente a nivel molecular en relación a las proteínas que se encargan de detectar e iniciar la respuesta al daño (Smith, 2001), las estrategias para prevenir, sobrellevar y reparar el daño son bastante diferentes. ¿Cuáles son y cómo funcionan estos mecanismos en las plantas?, ésta es una pregunta cuya respuesta es muy amplia y compleja. Sin embargo, recientemente se ha enfatizado en la importancia que la epigenética tiene en los mecanismos de respuesta al daño al DNA, lo que podría estar contribuyendo a la plasticidad que tienen plantas. Se ha reportado en particular que la acetilación de las histonas es necesaria para que se dé una adecuada respuesta ante este tipo de daño (Campi *et al.* 2012), de allí la importancia de estudiar a las histonas acetilasas que podrían estar implicadas en esta respuesta; por lo que este proyecto busca definir la función que tiene la acetilasa de histonas HAM1 de *Arabidopsis thaliana* durante la respuesta a las rupturas de doble cadena del DNA.

1.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

Arabidopsis es una planta cuyo hábitat natural se encuentra en Europa, Asia y parte de África. Esta planta mide entre 20 o 25 cm de alto, sus hojas presentan tricomas unicelulares y forman una roseta en la base, aunque también se pueden presentar hojas en el escapo floral; sus flores tienen 3 mm de diámetro, se encuentran arregladas en una

inflorescencia tipo corimbo y presentan la estructura típica de las *Brassicaceae*; su fruto es una silicua de 5 a 20 mm de largo que contiene de 20 a 30 semillas; su raíz posee una estructura simple, con una raíz primaria que crece de manera vertical y que posteriormente produce raíces laterales más pequeñas (Koornneef *et al.* 2004).



Figura 1. Planta de *Arabidopsis thaliana*. Esta planta es fácil de cultivar y tiene un ciclo de vida corto (Hanada *et al.* 2011).

Arabidopsis es muy usada en los estudios de genética, evolución y desarrollo, prácticamente desempeña un papel dentro de la biología de plantas semejante al que desempeñan los ratones y las moscas de la fruta en la biología de animales. A pesar de que esta planta no es importante a nivel agronómico, posee varias características que la hacen interesante al tratar de entender la genética, la biología celular y molecular de las angiospermas. Se ha realizado mucha investigación respecto a su genoma, el cual es pequeño y está repartido en 5 cromosomas, también se ha investigado la función de los aproximadamente 27000 genes que contiene, información que está recopilada en la base

de datos www.arabidopsis.org y es de libre acceso. *Arabidopsis* también es fácil de cultivar gracias a su tamaño (Figura 1) y a su rápida y abundante producción de semillas, ya que en solo 6 semanas produce bastantes silicuas. La transformación genética de esta planta es también muy sencilla, a través del uso por infiltración de *Agrobacterium tumefaciens* se puede introducir DNA al genoma de la planta, es gracias a esta tecnología que fue posible obtener colecciones de plantas mutantes con pérdida o ganancia de función de muchos de sus genes (Koornneef *et al.* 2004).

Otro atributo que hace a *Arabidopsis* atractiva en la investigación es el hecho de que muchos de sus tejidos son fáciles de analizar por medio de técnicas de microscopía. Tanto las raíces como las plántulas jóvenes son relativamente traslúcidas, esto, aunado a su pequeño tamaño, facilita el estudio por medio de técnicas de fluorescencia y microscopía confocal.

1.2 Estructura de la raíz de *Arabidopsis*.

Las plantas crecen y forman nuevos órganos durante todo su ciclo de vida. Estos tejidos y órganos post-embrionarios derivan de células pluripotenciales que residen en los meristemos, los cuales vienen a ser grupos de células que se mantienen en un estado indiferenciado y de proliferación activa (Salazar, 2011). Existen varios meristemos que contribuyen al desarrollo de las plantas, los mejor estudiados son los dos meristemos primarios originados durante la embriogénesis, el meristemo apical aéreo (SAM; Shoot Apical Meristem) y el meristemo apical de la raíz (RAM; Root Apical Meristem), los cuales permiten el desarrollo y crecimiento de los órganos aéreos y subterráneos de la planta respectivamente (Jeong *et al.* 2011). Dentro de ambos meristemos se encuentra el nicho de células troncales a partir del cual se originan otros tipos celulares que conforma la planta. El nicho de células troncales se localiza en un microambiente, en el que la diferenciación celular se inhibe y se mantiene la proliferación celular por medio de señales intercelulares emitidas por células cercanas (Salazar, 2011).

El RAM de *Arabidopsis* está formado por un grupo de cuatro células troncales llamadas células del centro quiescente (QC), que se caracterizan por tener una tasa de proliferación baja. Son estas células las que dan origen y mantienen en un estado indiferenciado a las células iniciales de la columela, de la epidermis/cofia lateral, del

córtex/endodermis, y del haz vascular/periciclo (Figura 2A). Las células iniciales se dividen continuamente sin comprometer su estado “prediferenciado” dando origen a los tipos celulares que conforman el patrón radial de la raíz, los cuales están dispuestos de manera concéntrica y se les identifica, de adentro hacia afuera, como el haz vascular (estela), la endodermis, el córtex y la epidermis. En el ápice de la raíz también se encuentra un tejido especial denominado cofia, que está constituido por la columela y la cofia lateral, es este tejido el encargado de proteger a la raíz de los daños mecánicos que podría sufrir a medida que esta crece y penetra en el suelo, además de ser el centro sensor del gravitropismo de la raíz (Figura 2B) (Salazar, 2011).

La estructura de la raíz de *Arabidopsis* es relativamente simple; siguiendo su eje ápico-basal la raíz puede ser dividida en 3 zonas que a su vez representan los estadios de desarrollo de las células que las conforman: 1) la zona meristemática, que se encuentra en la región más distal o apical de la raíz y que contiene a las células en un estado de replicación constante; 2) la zona de alargamiento o elongación, en la cual las células provenientes del meristemo dejan de dividirse e inician un rápido proceso de crecimiento; y 3) la zona de diferenciación, en la cual las células cesan su crecimiento y adquieren su estado final de diferenciación (Figura 2C).

Las raíces de las plantas son importantes porque cumplen varias funciones básicas para su supervivencia, como es el permitir el anclaje o fijación de la planta al suelo, así como la absorción y transporte del agua y de los nutrientes minerales disueltos en ella desde el suelo hacia el resto de la planta. Además la estructura de la raíz contiene células troncales, células en proliferación y células diferenciadas, lo cual ha permitido estudiar varios procesos en estos tres tipos celulares. Esto hace de la raíz de *Arabidopsis* un modelo ideal para estudiar los mecanismos de respuesta al daño al DNA, ya que, dependiendo de su actividad y función, cada tipo celular sigue estrategias diferentes para lidiar con un daño al DNA.

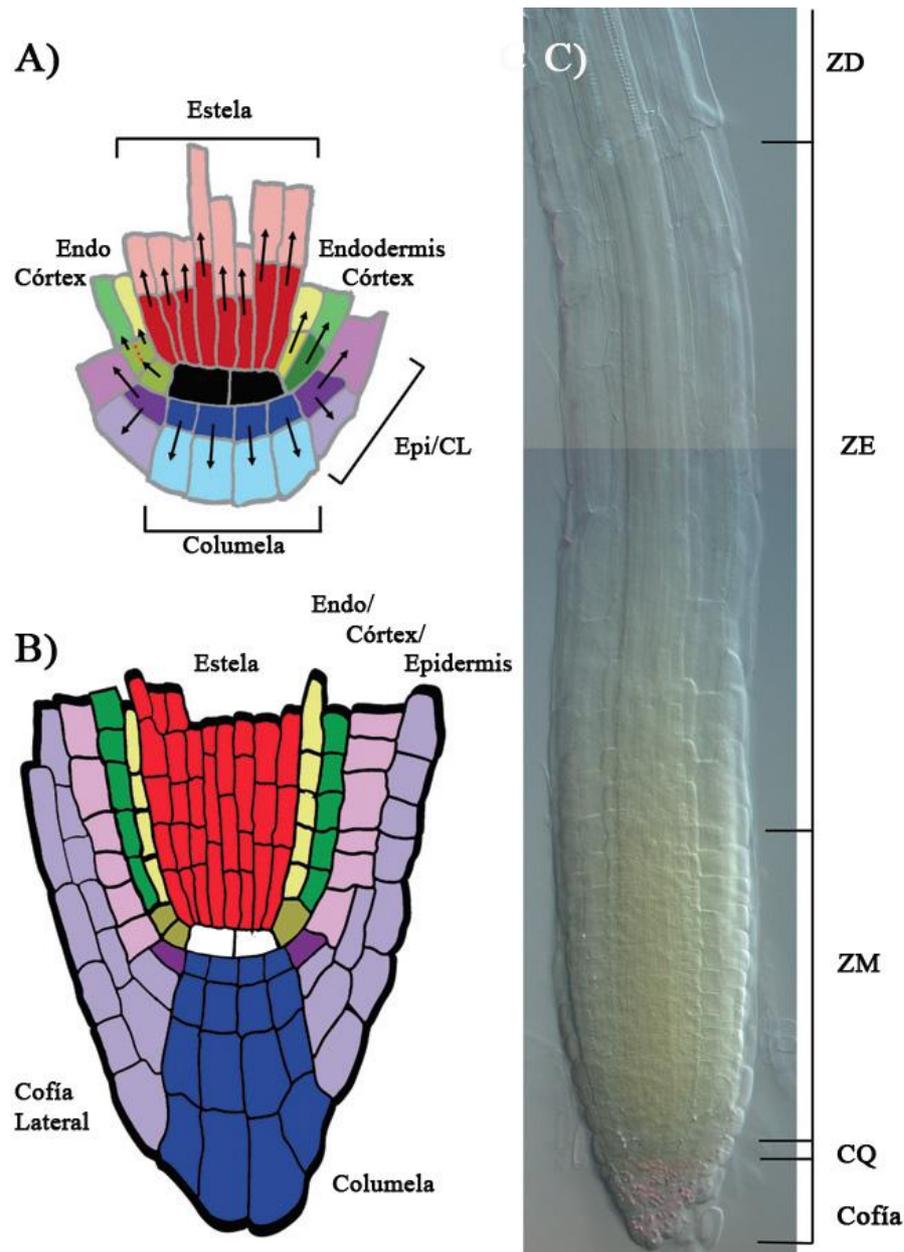


Figura 2 Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Nicho de células troncales e iniciales de la raíz, las flechas indican los planos de división celular, en negro se aprecia el QC (Centro quiescente) y en colores a las células iniciales, Epi/CL (Epidermis y Cofia lateral) Endo (Endodermis). B) Esquema de la raíz, en donde es posible apreciar las capas celulares que la componen. C) Representación de las distintas regiones que componen la raíz de *Arabidopsis*, ZM (Zona meristemática), ZE (Zona de elongación), ZD (Zona de diferenciación). Modificado de Bennett y Scheres (2010).

1.3 Tipos de daño al DNA en las plantas.

El DNA de las plantas, al igual que el de todos los organismos, está constantemente sometido a la modificación química. Estas modificaciones son potencialmente peligrosas, no solo por la mutagénesis que implican y el efecto adverso que estas pueden tener dentro de los nichos de células especiales, como en las células meristemáticas o los gametos; sino también por su efecto sobre las células somáticas, ya que si bien las plantas no desarrollan cáncer, el DNA dañado puede impedirle a cualquier célula realizar las funciones básicas para su subsistencia, como podría ser la síntesis de nuevas proteínas (Britt, 1996).

Los principales tipos de daño al DNA que se han descrito en plantas son: 1) Por mal apareamiento de nucleótidos, los cuales pueden darse de manera espontánea por la acción de la DNA polimerasa, pero que también pueden ocurrir por reacciones de hidrólisis, alquilación y oxidación; 2) Por bases químicamente modificadas, las cuales ocurren por reacciones de hidrólisis, alquilación, oxidación, luz UV y radiación ionizante; y 3) Por ruptura del DNA de hebra sencilla (Single Strand Break; SSB) o doble (Double, Strand Break; DSB), las cuales pueden ocurrir por reacciones de hidrólisis y oxidación, o por la acción de la radiación ionizante (Tabla 1) (Britt, 1996). A continuación se describen las principales causas del daño al DNA y cómo actúan.

- *Daño por hidrólisis:* A grandes rasgos la hidrólisis consiste en romper enlaces covalentes dentro de una molécula orgánica dando lugar a moléculas más sencillas. El DNA está constantemente sujeto a esta clase de reacciones, siendo la más común la hidrólisis del enlace glicosídico entre las purinas y el esqueleto del DNA, la cual provoca SSBs, impidiendo así la transcripción y replicación del material genético. Otro tipo de daño producido por la hidrólisis es la desaminación de las citocinas y de las 5-metilcitocinas, lo cual promueve la sustitución de estas bases por uracilos y timinas, acarreado así el mal apareamiento de nucleótidos y en consecuencia mutaciones puntuales en la secuencia del DNA (Britt, 1996).
- *Daño por alquilación:* La alquilación consiste en la transferencia de un grupo alquilo de una molécula a otra. El tipo de alquilación más común asociado al daño al DNA es la incorporación de grupos metilos a las bases nitrogenadas, las cuales, una vez estando químicamente modificadas, son potencialmente

mutagénicas. En el laboratorio es común el uso de agentes alquilantes, como el Etilmetanosulfonato (EMS), para inducir mutagénesis en las plantas (Britt, 1996).

- *Daño oxidativo:* La oxidación consiste en la transferencia de electrones de una molécula donadora a otra receptora, modificando así la naturaleza de ambas. La oxidación del DNA es causada principalmente por los radicales hidróxilo, superóxido, y óxido nítrico, los cuales al interactuar con el DNA pueden dar lugar a SSBs, DSBs o cambiar la naturaleza química de las bases nitrogenadas. Los productos de la oxidación del DNA actúan principalmente como bloqueadores de la síntesis y transcripción; exceptuando el de la oxidación de las guaninas, que adquieren la capacidad de aparearse tanto con adeninas como con citosinas, teniendo así efectos mutagénicos; y el de DSBs, los cuales pueden dar lugar, entre otras cosas, a pérdidas de fragmentos de la secuencia del DNA (Britt, 1996).
- *Daño por luz ultravioleta:* Los fotones de la luz UV tienen la capacidad de romper los enlaces que se encuentran al interior de las moléculas con las que interactúan, permitiendo así la formación de nuevos enlaces. En el caso del DNA, cuando la luz UV alcanza dos pirimidinas adyacentes, se pueden formar enlaces entre estas, modificando su naturaleza química. En las plantas la formación de dímeros de pirimidina se da por acción de la radiación solar, así que es común que las plantas produzcan pigmentos especiales para prevenir el daño por absorción de este tipo de luz. Si bien este tipo de daño no es mutagénico, si impide la replicación y transcripción del DNA (Britt, 1996).
- *Daño por radiación ionizante:* La radiación ionizante puede afectar al DNA en más de una forma: puede interactuar directamente con este, dando lugar a alteraciones químicas, pérdidas de bases y SSB. Además, tiene la capacidad de producir radicales libres, los cuales causan daño oxidativo en el DNA; sin embargo, el efecto más conocido de la radiación ionizante sobre el DNA es la generación de DSBs, el cual se asocia con rupturas en los cromosomas, inversiones de los mismos, pérdida de información, además de eventos de duplicación y translocación de genes o secuencias (Britt, 1996).

Tabla 1 Tipos de daño al DNA y agentes que lo provocan. Modificado de Lodish (2000).

Lesión al DNA	Tipo de daño	Agentes que lo provocan
Perdida de base	SSB	Agentes hidrolíticos, Radicales libres o Radiación Ionizante
Base alterada	Modificación química	Radiación ionizante, Agentes de alquilación o luz UV
Base incorrecta	Mal apareamiento de nucleótidos	Agentes hidrolíticos, Agentes de alquilación, Radicales libres o Radiación ionizante
Bulto por inserción o delección de un nucleótido	SSB	Agentes hidrolíticos, Agentes de alquilación, Radicales libres o Radiación ionizante
Dímeros de pirimidinas	Modificación química	Luz UV
Rupturas de hebra sencilla o doble	SSB y DSB	Ruptura de enlaces fosfodiéster por acción de radiación ionizante, agentes hidrolíticos, radicales libres o agentes biológicos como la zeocina
Hebras cruzadas	Modificación química	Enlace covalente entre las dos hebras debido a la acción de un agente de alquilación
Fragmentos 3´deoxiribosa	SSB y DSB	Disrupción de la estructura de la desoxiribosa por acción de radicales libres

El daño al DNA no ocurre solo por acción de agentes abióticos, también existen varios agentes de origen biológico que causan daños al DNA. Un ejemplo de ello es la zeocina, el cual es un antibiótico de naturaleza glicopeptídica similar a la bleomicina, es producido por *Streptomyces vericillus* y es capaz de unirse al DNA causando DSBs. La zeocina es particularmente importante para este proyecto porque es a partir de este antibiótico realizamos la inducción de DSB para estudiar la función de *HAMI* en la respuesta al daño al DNA.

1.4 Respuesta al daño al DNA y mecanismos de reparación en *Arabidopsis*.

Las plantas, al igual que todos los seres vivos, han desarrollado mecanismos para prevenir, soportar y reparar el daño al DNA. Cada tipo de daño se repara por un mecanismo específico (Britt, 1996). En plantas se han descrito 5 tipos de reparación del daño (Britt, 1996): 1) Por fotoreactivación, 2) Por escisión de bases (Base Excision Repair; BER), 3) Por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair; NER), 4) Por mal apareamiento, 5) Por DSB.

- *Reparación por fotoreactivación:* En muchos organismos el efecto de la luz UV se reduce bastante si se les coloca bajo fuentes de luz azul. Esto se debe a las enzimas fotoliasas, las cuales cuando se unen a los dímeros de pirimidinas son capaces de absorber un fotón de cierta longitud de onda rompiendo los dímeros formados para así revertir el daño producido por la luz UV sin necesidad de sintetizar nuevo DNA (Figura 3). Hay que señalar que este tipo de reparación solo se da en la parte aérea de la planta, ya que solo ésta puede recibir este tipo de luz (Britt, 1996).



Figura 3 Reparación del daño por luz UV por medio de la fotoreactivación. La fotoliasa reconoce la zona dañada y usa la energía de un fotón para revertir el daño al DNA sin tener que sintetizarlo de nuevo. Modificado de Oguma *et al.* (2002).

- *Reparación por Escisión de Bases (BER):* Cuando es solo una hebra de DNA la que está dañada, es posible utilizar la otra hebra como molde para reparar la primera. Para lograr esto, existen mecanismos de escisión que, a diferencia de la fotoreactivación, reemplazan el DNA dañado con DNA nuevo. El mecanismo BER consiste en remover una sola base dañada por medio de la acción de glicosilasas específicas que dejan el esqueleto de azúcares fosfato del DNA intacto, es decir un sitio abásico. El sitio abásico es reconocido por

endonucleasas o ligasas específicas que rompen las cadenas fosfato para permitir la acción de exonucleasas, DNA polimerasas y ligasas para rellenar este sitio abásico (Britt, 1996).

- *Reparación del mal apareamiento de bases (MMR)*: En el MMR las proteínas MSH2 forman un heterodímero con las MSH3, MSH6 o MSH7 que se encarga de reconocer la distorsión en el DNA causado por la inadecuada colocación de bases. Posteriormente las nucleasas MLH1 y PMS2 se encargan de eliminar la hebra de DNA dañado, dejando un hueco el cual es rellenado por la DNA polimerasa y la acción de una ligasa (Li *et al.* 2006).
- *Reparación por escisión de nucleótido (NER)*: NER se diferencia de los otros dos mecanismos de escisión en la gran variedad de daño que es capaz de reconocer. El mecanismo inicia con la remoción de la hebra dañada al generar rupturas, siempre a una distancia fija de donde se encuentra el daño, tanto río arriba como río abajo. Posteriormente se reclutan helicasas específicas seguidas por la DNA polimerasa y ligasa para rellenar los huecos, utilizando como molde la hebra no dañada (Britt, 1996).

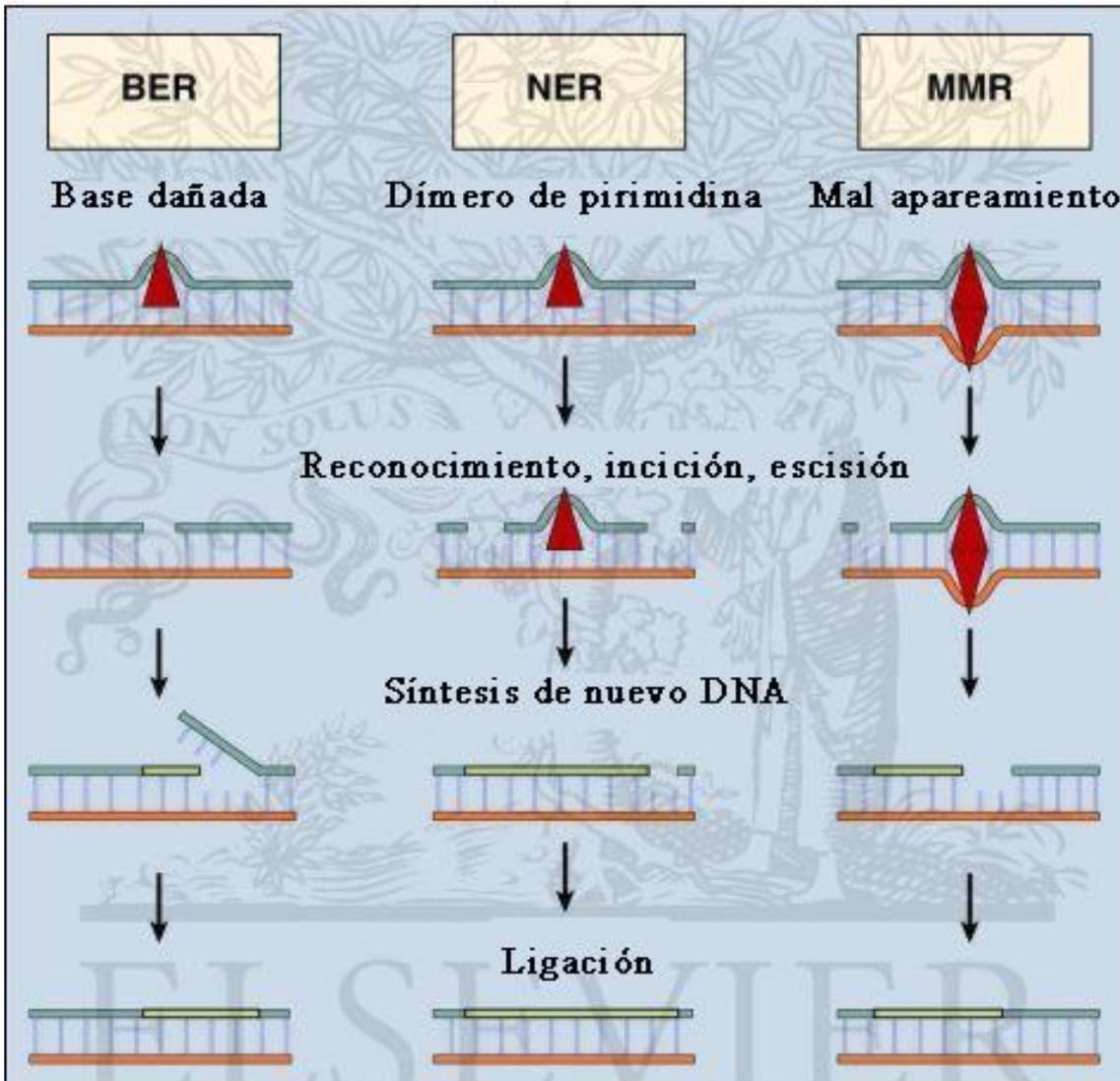


Figura 4 Reparación por mecanismos de escisión. Los pasos básicos son los mismos para los 3: Reconocimiento, Escisión, Síntesis y Ligación. Modificado de Abeloff (2008).

- Reparación de rupturas de doble cadena:** Las rupturas de doble cadena (DSBs) son uno de los tipos de daño al DNA más peligrosos por los efectos que pueden tener en la estructura genética. Existen dos mecanismos básicos de reparación de este tipo de daño: uno que involucra la homología extensiva del DNA, gracias a varias moléculas interactoras (recombinación homóloga o HR) y otra que actúa de manera independiente a la homología de la secuencia (recombinación no homóloga o NHR) (Figura 5) (Bleuyard *et al.* 2006). Durante el NHR simplemente se reúnen los dos extremos de las hebras rotas, de lo cual se deduce que se trata de una vía poco precisa en la que suelen ocurrir deleciones. En cambio la HR es mucho más precisa en su reparación y en ella no tiene lugar la pérdida de información genética, aunque en esta vía la reparación es bastante

más tardada, lo cual hace que *Arabidopsis* utilice de manera preferencial la NHR (Bleuyard *et al.* 2006).

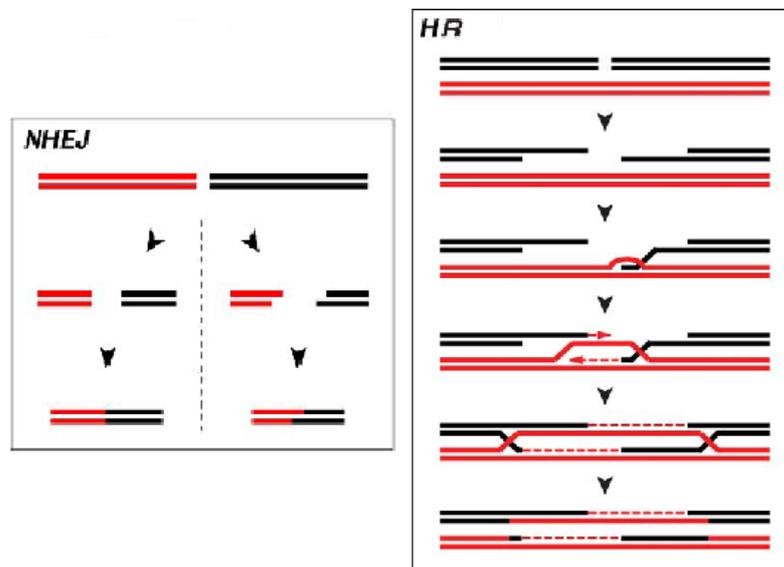


Figura 5 Reparación de las rupturas de doble cadena por recombinación homóloga (derecha) y recombinación no homóloga (izquierda). La primera solo reúne los dos fragmentos, la segunda utiliza una secuencia homóloga como templado. Modificado de Bleuyard *et al.* (2006) y Latrasse *et al.*(2008).

La reparación NHR es promovida por el complejo DNA-PK, el cual está compuesto por el heterodímero de KU70 y KU80, además de la subunidad catalítica DNA-PKcs. El dímero de KU70-KU80 reconoce los extremos rotos del DNA y se une a ellos para prevenir una mayor degradación de éste, además de que sirve como punto de reconocimiento para la DNA-PKcs. Posteriormente, la DNA-PKcs fosforila a KU70, KU80 y a sí misma, para después reclutar y fosforilar a Artemis. La proteína Artemis tiene actividad de endo-exonucleasa, siendo la que se encarga de llevar a cabo la maduración del DNA, facilitando el paso final, que es la ligación de las hebras, lo cual se lleva a cabo gracias al heterodímero Xrcc4/DNA ligasa IV (Figura 6) (Bleuyard *et al.* 2006).

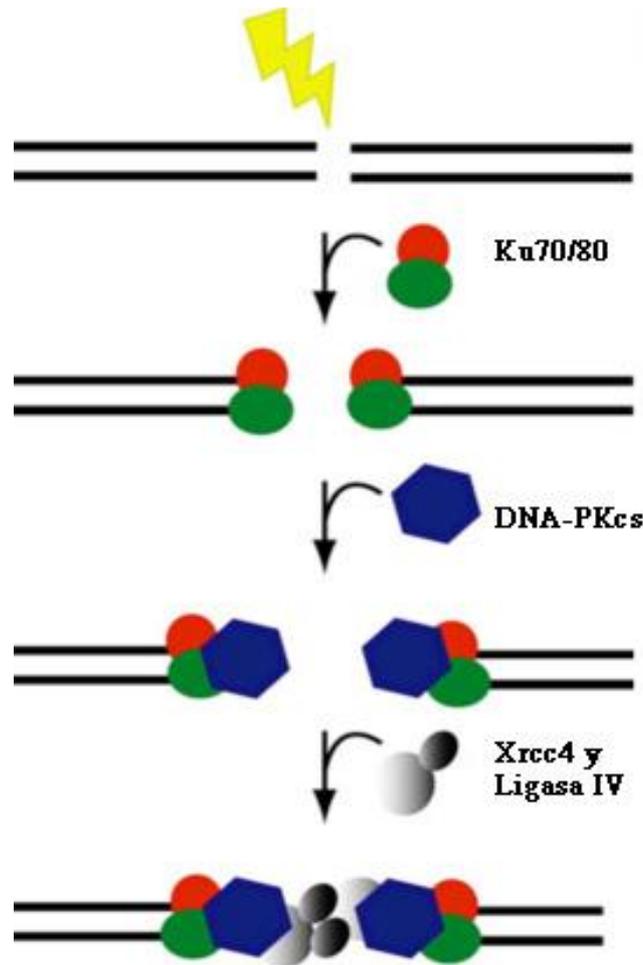


Figura 6 Reparación de las rupturas de doble cadena por recombinación no homologa. Ku70 y Ku80 reconocen el daño y reclutan a DNA-PKcs la cual facilita la acción de la Xrcc4 y la Ligasa IV. Modificado de Smith (2001).

La reparación por HR inicia con el procesamiento del DSB para formar bordes cohesivos de cada lado, proceso que involucra al complejo MRX, compuesto por RAD50, Mre11 y Xrs2. Posteriormente RAD52 se une a los bordes cohesivos, los cuales, si resultan ser complementarios, son unidos directamente, pero si no, se recluta a RAD51, formando así el Rad51/ssDNA nucleofilamento, el cual es capaz de invadir una secuencia homologa de DNA integro que servirá como templado para la reparación del DSB (Figura 7) (Bleuyard *et al.* 2006).

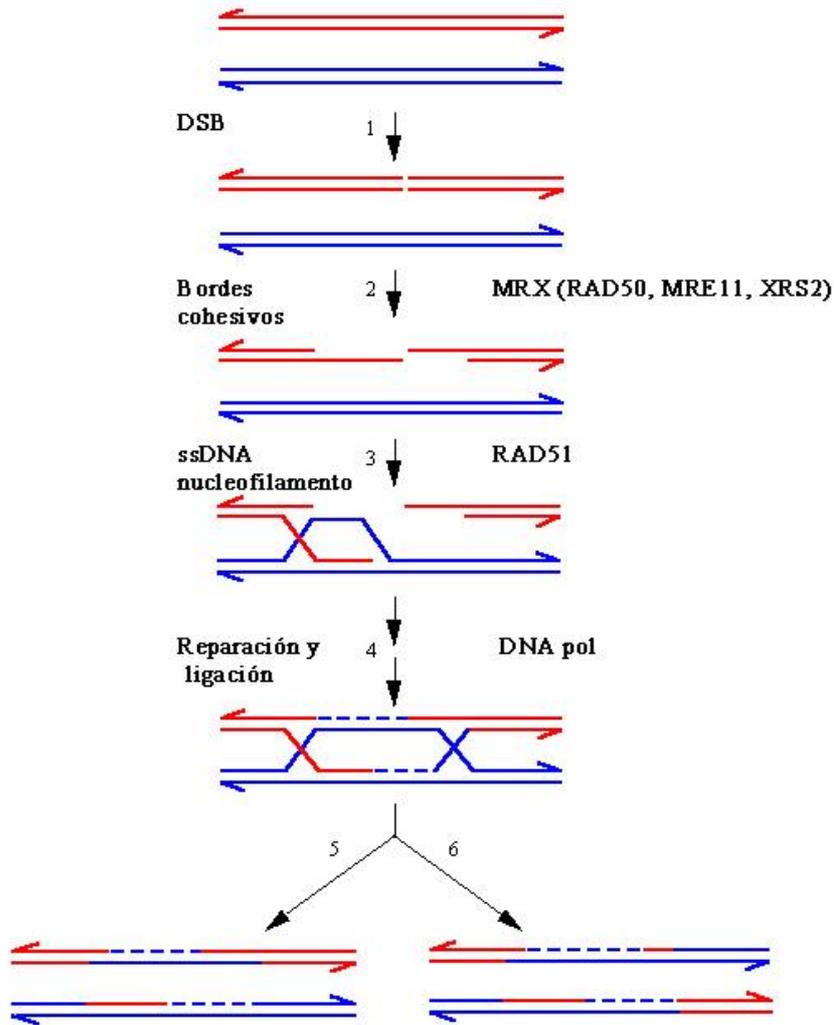


Figura 7 Reparación de las rupturas de doble cadena por recombinación homóloga. MRX reconoce el daño y sintetiza los bordes cohesivos (1 y 2). Si los bordes no son complementarios, se recluta a las proteínas tipo RAD, las cuales forman el núcleo-filamento invasivo (3) para usar como templado una secuencia homóloga (4) y con ello reparar el daño. Modificado de Smith (2001).

La respuesta al daño al DNA por rupturas de sus hebras, está mediada por dos proteínas cinasas altamente conservadas: ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) y ATM/RAD3-RELATED (ATR) (Figura 8). En general ATM se induce durante las rupturas de doble cadena mientras que ATR se activa durante las rupturas de cadena sencilla, pero es común que ocurra un solapamiento de sus actividades (Bleuyard *et al.* 2006). Cuando ocurre el daño al DNA, estas cinasas inician una cascada de señalización que lleva en primer lugar al arresto del ciclo celular y posteriormente a la activación de los mecanismos de reparación, como son la HR y la NHR. ATM y ATR

también están implicadas en la muerte celular programada (PCD) por daño al DNA, una respuesta al daño completamente diferente a los descritos previamente, ya que este mecanismo elimina a la célula afectada para evitar que esta siga activa o se reproduzca. En animales esta clase de respuesta ante el daño es bastante común; por lo general las células animales tienen una tendencia “suicida” ante el daño al DNA, actividad que realizan por medio de un proceso llamado apoptosis, el cual se inicia por la acción de factores transcripcionales especializados, como p53, que llevan en última instancia a la degradación de diversos componentes celulares, dando lugar a una muerte celular limpia y ordenada (Alberts, 2008). Durante mucho tiempo se pensó que las plantas no tenían actividad de PCD inducida por el daño al DNA, ya que en estas no existen todas las proteínas que se encargan de inducir la apoptosis, además de que no presentan el riesgo de desarrollar cáncer; sin embargo hace algunos años se demostró que en las plantas sí existe una actividad de PCD en respuesta al daño al DNA, pero se da preferencialmente dentro de los nichos de las células meristemáticas (Fulcher y Sablowski, 2009). A diferencia de la PCD de los animales, la PCD de las plantas no presenta características apoptóticas, sino más bien autolíticas. Aunque no se sabe que proteínas o genes dan lugar a esta respuesta dentro de las plantas, queda claro que la cascada de señalización inicia también con ATM y ATR y que la actividad de muerte celular programada es independiente de la actividad de arresto del ciclo celular y de los mecanismos de reparación del daño al DNA (Fulcher y Sablowski, 2009).

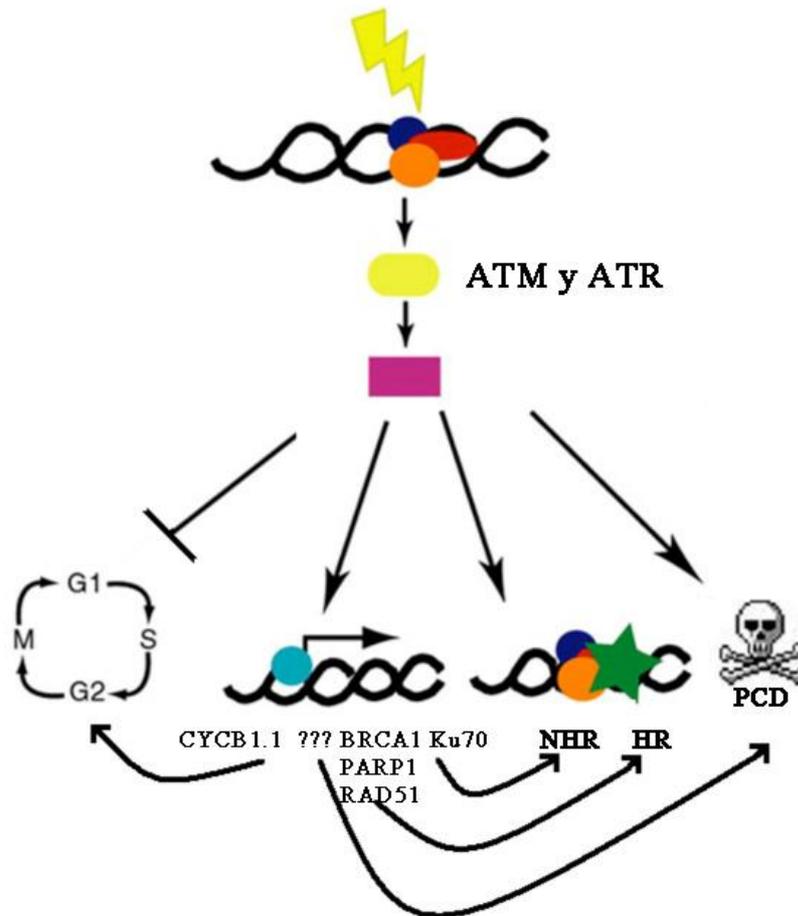


Figura 8 Regulación de la respuesta al daño al DNA por parte de ATM y ATR. Estas cinasas inician la cascada de señalización en respuesta a este tipo de daño. Modificado de Smith (2001).

1.5 Importancia de la epigenética en la reparación del daño al DNA.

En *Arabidopsis* se ha descrito que para que se lleve a cabo la replicación del DNA se requiere, además de las proteínas que participan directamente en los mecanismos de replicación (Sanchez *et al.* 2012), de marcas epigenéticas que regulen la estructura de la cromatina para permitir el acceso de estas proteínas a los orígenes de replicación. La regulación epigenética puede generarse por metilación del DNA o por modificaciones postraduccionales en las histonas. En *Arabidopsis* se ha reportado que para que se inicien los procesos de replicación del DNA, se requiere que los orígenes de replicación estén enriquecidos en las marcas de di y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2 y H3K4me3) y en la de acetilación de la lisina 5 de la histona H4 (H4K5ac) (Costas *et al.* 2011). Dado que gran parte de la maquinaria de replicación es necesaria también en los procesos de reparación del DNA, estos datos sugieren que

estas marcas epigenéticas también pueden participar en los procesos de reparación del DNA. Sin embargo, hasta ahora hay pocos estudios sobre la función que tiene la epigenética en los procesos de reparación del daño al DNA en plantas.

Las marcas epigenéticas regulan la estructura de la cromatina, debido a que la unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por un octámero de proteínas tipo histonas compuesto por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se enrolla el DNA (146pb por nucleosoma) y cada nucleosoma está a su vez unido por una subunidad de histona H1 (Earley *et al.* 2007). Modificaciones postraduccionales en las histonas alteran la estructura del nucleosoma generando con ello una cromatina dinámica, en donde se puede tener una cromatina totalmente compactada (heterocromatina) o una cromatina relajada o abierta (eucromatina) dependiendo de las distintas combinaciones de marcas epigenéticas (Figura 9).

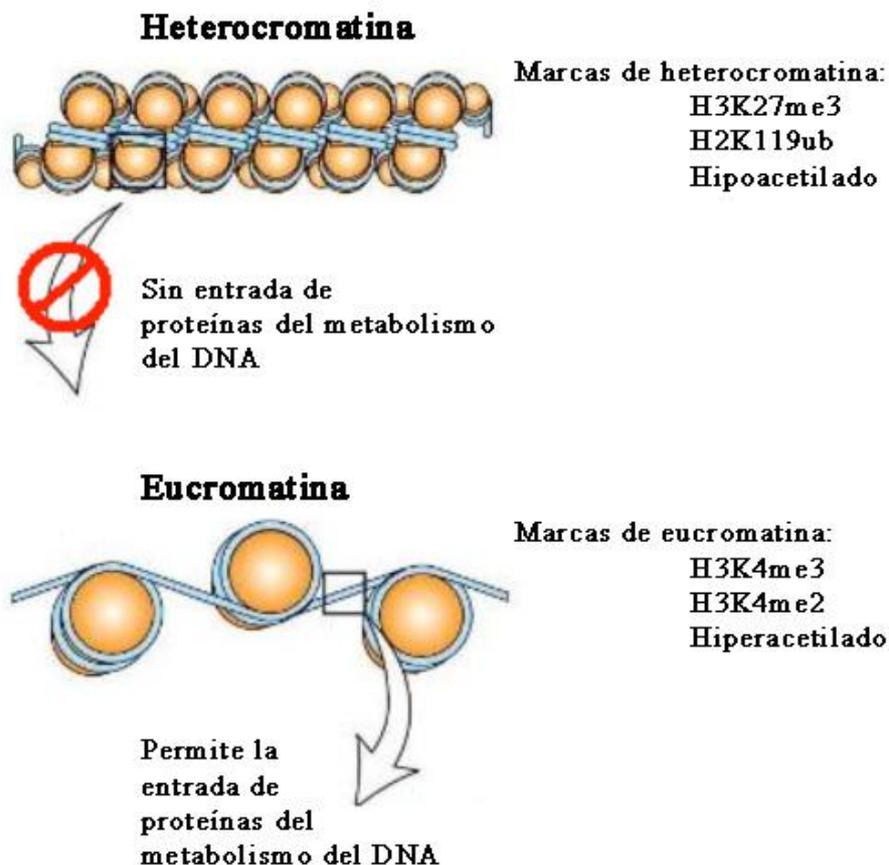


Figura 9 Estructura y dinámica de la cromatina. Cada nucleosoma está conformado por un octámero de histonas (esfera naranja) alrededor del cual se enrolla el DNA (hebra azul) (Sabbatino, 2007). A la derecha se enlistan algunas de las marcas epigenéticas asociadas a heterocromatina y eucromatina.

Las modificaciones postraduccionales de las histonas se suelen dar en la región amino terminal de estas proteínas; estas marcas incluyen la mono o di-metilación de las argininas; la fosforilación de las serinas y treoninas; y la acetilación, ubiquitinación, sumoilación o mono, di o tri-metilación de las lisinas. La acetilación de las histonas es una de las marcas que se suele asociar con la cromatina “relajada”, ya que al adicionar el grupo acetilo a las lisinas se disminuye la afinidad de las histonas por el DNA al neutralizar la carga positiva de estas proteínas, permitiendo así que el DNA esté más libre para interactuar con otras proteínas, como las de la maquinaria transcripcional, promoviendo así la expresión de los genes localizados en la región de cromatina acetilada (Earley *et al.* 2007).

La acetilación de las histonas juega un papel muy importante en la respuesta al daño al DNA (Figura 10). En *Arabidopsis* se ha demostrado que después de la exposición a rayos X, luz UV o radiación ionizante, ocurre un incremento en la acetilación de la histona H3K14 y K18 y una tetra-acetilación de histona H4 en los residuos K5, K8, K12 y K16 (Drury *et al.* 2012). La acetilación en la histona H4 parece ser particularmente importante, ya que además de que participa en los procesos de replicación del DNA (ver arriba), en algunas variedades de maíz resistentes a la exposición a luz UV presentan la tetra-acetilación en las regiones promotoras de distintos genes asociados a la tolerancia a la luz UV (Campi *et al.* 2012). También se ha visto que al sustituir los residuos K5, K8, K12 y K16 de la H4 por glutaminas, las células tienen dificultades en realizar la NHEJ y la HR, lo cual las hace particularmente sensibles a los tratamientos que inducen DSBs (Drury *et al.* 2012).

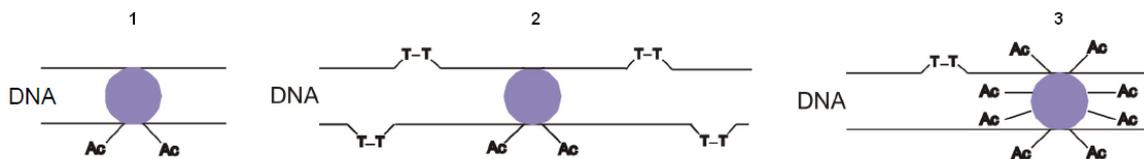


Figura 10 Estados de la cromatina antes, durante y después de un daño al DNA.1) Histonas (círculo morado) parcialmente acetiladas, antes del daño al DNA (línea negra) 2) Nucleosoma después del daño al DNA, el cual se muestra en forma de dímeros de timina 3) El nucleosoma es hiperacetilado y comienza la reparación de los dímeros de timina. Modificado de Campi *et al.* (2012).

La acetilación de las histonas está regulada por dos tipos de proteínas que funcionan de manera antagónica: las histonas acetilasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs). En *Arabidopsis*, las HATs se han clasificado en 4 familias (GNAT; GCN5-related N-terminal acetyltransferases, MYST, p300/CBP y TAFII250) (Latrasse *et al.* 2008); mientras que las HDACs en 3 familias (RPD3/HDA1, la Silent Information Regulator 2 (SIR2) y la familia HD2) (Pandey *et al.* 2002).

Las HATs de las familias GNAT y MYST están involucradas en la acetilación de pequeñas moléculas y de proteínas no-histona (Earley *et al.* 2007); las p300/CBP están implicadas en la regulación de genes del ciclo celular, diferenciación y muerte celular (Pandey *et al.* 2002); mientras que las TAFII250 se asocian con proteínas que interactúan con factores de unión a secuencias TATA (Pandey *et al.* 2002).

1.6 Antecedentes inmediatos.

Las HATs de tipo MYST desempeñan funciones fundamentales en las modificaciones post-traduccionales de histonas, teniendo así un efecto en la estructura de la cromatina. Su nombre proviene de las siglas de los 4 primeros miembros que se encontraron en mamíferos y levaduras, MOZ, YBF2, SAS2 y TIP60 (Neal *et al.* 2000). Las proteínas MYST se caracterizan por la presencia de un dominio (dominio MYST) compuesto por un sitio de unión a la acetyl-CoA y un dedo de zinc. Algunos otros miembros de la familia poseen además cromodomios, homodomios y otras clases de dominios, los cuales les permiten interactuar con otras proteínas o con residuos de las histonas modificados. Las proteínas MYST parecen estar muy conservadas evolutivamente hablando, ya que se les puede encontrar en diversas clases de eucariontes. Las MYST están involucradas en una gran variedad de procesos nucleares críticos (Avvakumov y Cote, 2007) como son la activación y represión de genes, la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la replicación y reparación del DNA e incluso están involucradas en el cáncer (Latrasse *et al.* 2008), como es el caso de HBO1, una proteína MYST que se encuentra en humanos (Avvakumov y Cote, 2007). Solo dos miembros de la familia MYST se encuentran en *Arabidopsis*: HAM1 y HAM2 (antes HAG4 y HAG5) (Pandey *et al.* 2002). Se ha demostrado *in vitro* que estas dos enzimas tienen mayor especificidad por la lisina 5 de la histona H4, sin embargo también pueden

acetilar algunos residuos de la histona H3 pero con menor afinidad (Earley *et al.* 2007).

Dada la similitud en sus secuencias, parece ser que HAM 1 y 2 son resultado de un evento de duplicación (Latrasse *et al.* 2008), lo cual es importante ya que si bien aún no se conoce con precisión sus funciones biológicas, el trabajo con mutantes sencillas de estos genes demostró que *HAM1* y *HAM2* tienen función redundante bajo condiciones de crecimiento normales en la parte aérea de *Arabidopsis*. Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha observado que una *ham1-1*, una mutante simple de pérdida de función de *HAM1* tiene ligeramente alterada la estructura del meristemo radicular, principalmente en el número de células del centro quiescente, de las células iniciales de la columela y de las células maduras de columela (Sánchez, *et al.* datos sin publicar). Por otro lado no es posible obtener mutantes dobles para estos genes, ya que estas proteínas parecen desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de los gametos (Latrasse *et al.* 2008).

Análisis bioquímicos realizados con la proteína HAM1 han mostrado que es capaz de unirse a ORC1b, una proteína del complejo preRC esencial para que se inicie la replicación del DNA (Sánchez *et al.* datos sin publicar). Estos datos sugieren que HAM1 podría estar participando no solo en la replicación del DNA, sino que también en los procesos de reparación frente a un daño al DNA, de hecho reportes recientes publicados después de iniciar este proyecto indican que es necesaria la presencia de los genes de *HAM1* y *HAM2* para una adecuada reparación del daño producido por la luz UV, siendo más importante *HAM1* que *HAM2* (Campi *et al.* 2012).

Por lo anterior, este proyecto tiene como finalidad aportar datos para definir la función que tiene *HAM1*, en los mecanismos de respuesta generados por un daño al DNA con zeocina que induce DSBs.

2 Hipótesis.

HAM1 es una histona acetilasa de *Arabidopsis* que interactúa con proteínas involucradas en la replicación del DNA. Sus homólogos en otros organismos también participan en la replicación del DNA y además participan en la respuesta al daño al DNA. Entonces HAM1 podría estar participando en la respuesta al daño al DNA en *Arabidopsis thaliana*.

3 Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Determinar la función de la histona acetilasa *HAMI* en la reparación del daño al DNA durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

3.2 Objetivos particulares.

- 1.- Establecer las condiciones y tiempos de incubación con distintos tratamientos de zeocina para inducir el daño al DNA por ruptura de doble cadena en *Arabidopsis*.
- 2.-Caracterizar el fenotipo de las plantas mutantes *ham1-1* bajo condiciones de daño al DNA por DSBs.
- 3.-Determinar la expresión de algunos genes implicados en las vías de señalización activas por daño al DNA, en plantas control, plantas *ham1-1* y otras plantas mutantes con y sin inducción del daño.
- 4.- Definir el mecanismo por el cual *HAMI* participa en reparación, si es a través de la regulación directa de la expresión génica, o a través de la regulación del algún componente del metabolismo del DNA.

4 Materiales y Métodos.

4.1 Material biológico.

Durante la realización de este proyecto se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0, plantas mutantes de pérdida de función *ham1-1* (SALK_027726) (Latrasse *et al.* 2008), *atm-2* (SALK_006953) (Garcia *et al.* 2003) y *atr-2* (SALK_03284) (Culligan *et al.* 2004); además de plantas transgénicas pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS (Colon-Carmona *et al.* 1999).

Para las clonaciones se usaron células de *Escherichia coli* DH5 α y DB3.1.

Para la generación de plantas transgénicas se utilizaron células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58.

4.2 Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis* fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 20% y Tween-20 al 0.0001% (Sigma-Aldrich) incubándolas a temperatura ambiente y en agitación durante 15 minutos, después de esta incubación las semillas se lavaron cuatro veces con agua estéril. Con el fin de sincronizar el metabolismo y la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 72 horas a 4°C en oscuridad.

Las semillas estratificadas fueron sembradas en cajas petri con medio MSS que contiene: MS al 0.2x (Murashige y Skoog 1962, MP Biomédicals), MES monohidratado al 0.00005% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich), agar al 1% (Becton, Dickinson and Company) y pH de 5.6 ajustado con KOH al 1M. Si el experimento lo requería, las plántulas de 8 o 10 días se transferían a tierra (Tierra Metro Mix 200) esterilizada por autoclave. Todas las plantas se germinaron y crecieron a una temperatura de 22 °C, con luz blanca y fría a una intensidad aproximada de 110 μ Em-2s-1 en condiciones de día largo (16 hrs luz/ 8 hrs oscuridad).

4.3 Caracterización de las plantas mutantes.

Para genotipificar las plantas mutantes *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2* (Figura 11), se realizó la extracción de DNA de una hoja por cada planta a analizar. Para esta extracción, el tejido fue congelado a -70°C y triturado sin descongelar hasta formar un polvo fino, posteriormente a cada muestra se le adicionaron 500 μl de buffer de extracción (100 mM de TrisHCl pH=8, 50 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 1% de SDS y 0.07% de β -mercaptoetanol), las muestras se incubaron a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 130 μl de Acetato de Potasio 5 M, y se incubaron a 4°C por 5 minutos. Finalmente, se realizó una extracción con 150 μl de cloroformo, centrifugando a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C . A cada sobrenadante obtenido se le adicionó 665 μl de isopropanol y 65 μl de AcNa 3M para precipitar el DNA a -20°C por 20 minutos. El DNA precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en H_2O miliQ. El DNA obtenido fue cuantificado en un equipo nanodrop (Nanodrop 2000 Thermo scientific).

Con el DNA obtenido se realizaron los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés; Polymerase Chain Reaction). Las reacciones se hicieron usando el kit de PCR de Invitrogen en un volumen final de 15 μl ; cada reacción contenía 1X PCR Rnx Buffer, 1.5 mM MgSO_4 , 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM de oligonucleótidos (Ver Tabla 2), $\sim 150\mu\text{g}$ de DNA y 1 U Taq DNA Polimerasa.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante la genotipificación de las plantas mutantes *atm-2*, *atr-2* y *ham1-1*, con temperaturas de alineamiento y número de ciclos usados para cada caso.

Oligonucleótidos para la genotipificación de las plantas mutantes			
Mutante	Secuencia del oligonucleótido (5'--->3')	Tm(°C)	No. de ciclos
<i>atm-2</i>	MP-ATMgI-F: GTTCAGTCTTGCCTCCCAGA	66.45	35
	MP-ATMgI-R: CTTGTCTAATCATAGGCCCATG	65	
<i>atr-2</i>	MP-ATRgI-F: TCTCTGGTCTTGGTGCCCTT	66.45	35
	MP-ATRgI-R: CTGTGTCTATTAACCTGGCCAG	65	
<i>ham1-1</i>	HAG4LC-F: AGAGACGGCGATGATAATCGCCAC	69	35
	HAG4LCb-R: ATCCACGATCATCACATTCACA	61	
TDNA/SALK "LBC1"	GGAACAACACTCAACCCTATCTCGG	69.38	35

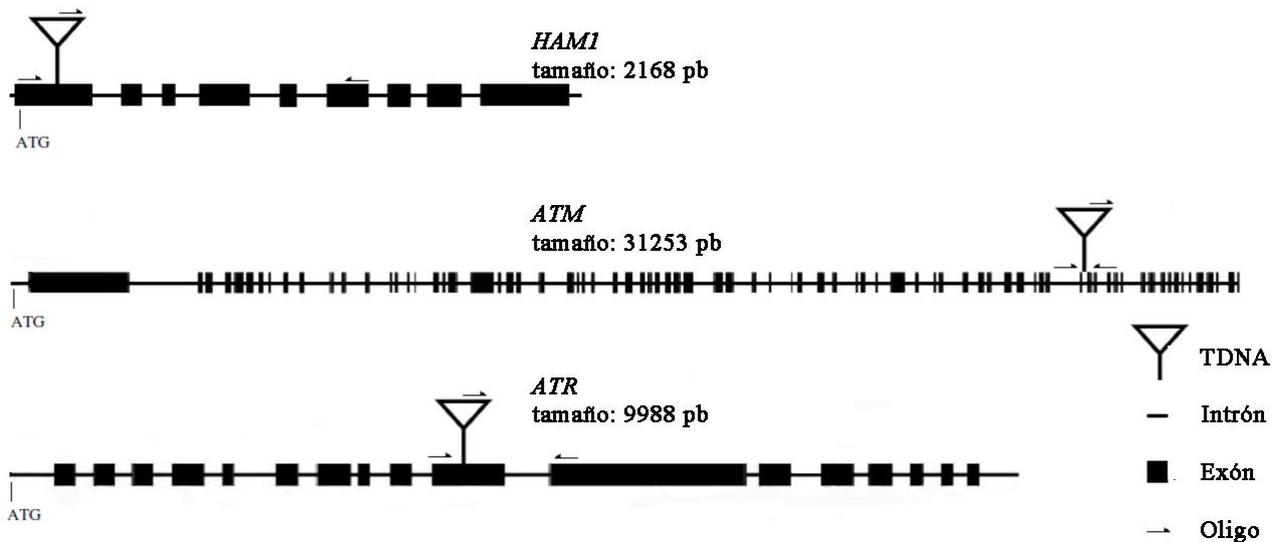


Figura 11: Esquema de las inserciones de las mutantes *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*. Estructura de los genes de *HAM1* (AT5g64610), *ATM* (AT3G48190) y *ATR* (AT5G40820), se indica la posición en donde se encuentra la inserción de T-DNA.

4.4 Condiciones de inducción de daño al DNA con Zeocina.

Para inducir daño al DNA por ruptura de doble cadena (DSB) en la raíz de *Arabidopsis*, se utilizó una solución de zeocina (Invitrogen). La zeocina tiene la ventaja de ser menos tóxica y genera el mismo daño que la bleomicina. En general los tratamientos consistieron en crecer las plantas durante 3 o 4 días, según el caso, en medio MSS normal para después transferirlas a medio MSS con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (lo cual equivale a 6.5 μM y 13 μM respectivamente) durante 8, 24, 40 o 72 horas.

4.5 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.

Para observar los meristemos radiculares de las plantas, las raíces fueron teñidas con una solución de lugol (yodo y yoduro potásico al 1%) durante unos segundos y después fueron aclaradas con solución de aclaramiento (80% de hidrato del cloral y 10% de glicerol), las raíces aclaradas se visualizaron en un microscopio óptico Olympus BX60 a un aumento de 40X.

4.6 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal.

Para cuantificar la muerte celular ocurrida en los meristemos durante el tratamiento de daño al DNA, se usó el método de Fulcher y Sablowski (2009), el cual consiste en montar las raíces en medio MSS con 5µg/ml de Ioduro de Propidio (IPr) y observar la capacidad que tiene el IPr de penetrar al interior de las células, mediante microscopía confocal; para este caso se usó el Microscopio Confocal (Olympus FV1000) del Conjunto E de la Facultad de Química a una longitud de onda de 535 nm con láser de diodo.

Para observar las plantas pHAM1:HAM1:GFP, las raíces también se montaron en MSS con IPr y se utilizó una longitud de onda de 509 nm con láser de diodo.

4.7 Extracción de RNA y RT-PCR.

La extracción de RNA se realizó a partir de 100 mg de tejido de raíz. Para ello, el tejido fue triturado sin descongelar hasta formar un polvo fino; cada muestra fue resuspendida en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos; después se realizaron dos extracciones con 0.2 ml de cloroformo centrifugando a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. El RNA en solución fue precipitado con 1 ml de isopropanol frío incubando a -20°C por 20 minutos y se centrifugando a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. Una vez precipitado, el RNA se lavó 3 veces con etanol 70% y se resuspendió en H₂O miliQ.

Las muestras de RNA fueron cuantificadas en un nanodrop. Para corroborar su integridad y realizar la calibración de las muestras, fue necesario disolver 100 ng de RNA de cada muestra a analizar en 7 µl de buffer de carga, el cual contiene 20% de formamida y 0.45% de SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 7 minutos, después se separaron en un gel de agarosa-TBE al 1.2 %. La integridad de cada muestra de RNA se determinó por la visualización de los RNAs ribosomales, así mismo su calibración se realizó determinando la concentración de los RNAs ribosomales por densitometría.

Las muestras de RNAs calibradas se usaron para realizar la síntesis de la primera cadena de DNA (cDNA), utilizando el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT” (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, para ello se agregó en un tubo 0.5 µM de oligonucleótido dT y 0.5 mM de

desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) con 250 o 1000 ng de RNA, esta reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10mM de DTT, 40U de RNAsaout y 200U de la enzima SuperScript™ II RT; la síntesis de cDNA se realizó a 42°C por 50 minutos. La enzima se inactivó a 70°C por 15 minutos.

El cDNA obtenido se utilizó para hacer ensayos semicuantitativos por PCR, las cuales fueron hechas bajo las mismas condiciones de las PCR de genotipificación de las mutantes. Los oligonucleótidos empleados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante los ensayos de RT-PCR semicuantitativos, con temperaturas de alineamiento y cantidad de ciclos usados en cada caso.

oligonucleótidos para RT-PCR semicuantitativos			
Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'--->3')	Tm(C°)	No. De Ciclos
<i>ATM</i>	MP-ATMq-F: CGAAATCTGGCAATGATGAC	63.05	32
	MP-ATMq-R: CCTCACTCCTTGAGCTTCCT	66.45	
<i>ATR</i>	MP-ATRq-F1: GCCATTCAGATTGACCCAGAAC	66.55	32
	MP-ATRq-R1: ACTCCACAAGAGGATCATGGATG	66.59	
<i>BRCA1</i>	MP-BRCA1q-F: GAATCAAGGGGGTGATAACAAG	65.11	29
	MP-BRCA1q-R: TTGGAGCCCATTCAGCACAGTTT	66.59	
<i>HAM1</i>	MP-HAM1q-F: CTAAGGTACTGGACCGACACT	66.5	30
	MP-HAM1q-R: ACCATCCAGACAAAAGATTTCCT	63.45	
<i>HAM2</i>	MP-HAM2q-F: CAAAGGTTCTGGACCGACATC	66.5	30
	MP-HAM2q-R: CAGCCCGCTTTACTTACACA	64.75	
<i>CYCB1.1</i>	CycB1;1FR-T: GAATGAATCATGCTAAAGGAC	61.64	30
	CycB1;RR-T: CTGTCTACACTTGAGTGGTA	63.05	
<i>Ku70</i>	MP-KU70q-F: GCACTGGATGAAAACGAGCTT	64.88	30
	MP-KU70q-R: GTCAAGTCCTTCAGCTTCCG	66.5	
<i>PARP1</i>	MP-PARP1q-F: GCACGGTTCACGTCTCACTAA	66.5	29
	MP-PARPq-R: CAAAGCAACCTCGCAGAGGAG	68.12	
<i>RAD51</i>	MP-RAD51q-F: GAAAACGTTGCCTATGCGAGG	66.5	29
	MP-RAD51q-R: CACACCAAACCTCATCTGCTAACT	65.11	

<i>TUB2</i>	TUB FOR NEW: AGGACTCTCAAACACTCACTACC	74	29
	TUB REV: TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	77	

4.8 Clonación del gen completo de *HAM1* (*pHAM1:HAM1:GFP*).

- *Extracción del DNA.* Para clonar el gen completo de *HAM1*, se realizó una extracción de DNA a partir de hojas. Para ello el tejido se congeló a -70 °C y se trituró hasta formar un polvo fino sin permitir que se descongelara, después se le adicionaron 500 µl de buffer de extracción (0.05 M de TrisHCl pH=8, 0.01 M de EDTA, 2 % de SDS, 0.1 M de LiCl y 1 µl de Proteinasa K), se mezcló por inversión durante 15 minutos y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. Al sobrenadante obtenido se le agregó 20 µm/ml de RNasaA y se dejó incubando a 37 °C por 30 minutos para después realizar dos extracciones con 25/24/1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. A este nuevo sobrenadante se le adicionó 0.25 volúmenes de Acetato de Amonio 10 M junto con 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA a -20 °C durante 1 hora. El DNA precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en H₂O miliQ para después ser cuantificado en un nanodrop.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados durante la clonación de *HAM1*, con temperaturas de alineamiento y cantidad de ciclos usados.

Oligonucleótidos usados para la clonación de <i>HAM1</i>			
Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'--- »3')	Tm(C')	No. De Ciclos
<i>HAM1</i>	HAM1g-F: TGATGCAAATTGTTGGTCAAA	53.4	35
	HAM1g-R: GCTCTGCTCTTTGTAAGGAGTC	62.1	

- *Amplificación:* El gen de *HAM1* fue amplificado utilizando la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad AccuPrime de Invitrogen. Para esto se diseñaron dos oligonucleótidos (Tabla 4) que amplifican desde 1146 pb arriba del ATG hasta un codón antes del condón de término del gen. Para la reacción de amplificación, se requirieron 500ng de DNA genómico a los que se les adicionó

1X del Buffer II (600 mM Tris-SO₄ pH=8.9, 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime protein y 10% glicerol), 0.4 mM de Oligonucleótidos (ver tabla 4) y 1 U de Accuprime Taq High Fidelity. La reacción se mezcló suavemente y se colocó en un termociclador en un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C seguida de 35 ciclos con 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 55 °C y 3 minutos de extensión a 68 °C. Una vez concluida la amplificación, al producto se le adicionó 0.5 ml de Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen) junto con 0.2 mM de dATPs y se colocó a 72 °C por 10 minutos para que el producto tuviera bordes de adenina. El producto final se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión para purificar la banda que contenía el tamaño de amplicón esperado. La purificación de la banda consistió en disolver ésta en 500 µl de TBE 1X para después filtrarla por una columna con papel filtro. A la solución ya filtrada se le aplicó una extracción con 25/24/1 de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y después se precipitó, lavó y cuantificó el DNA.

- *Clonación:* El producto purificado se clonó en el vector pCR®8/GW/TOPO del sistema gateway, utilizando el kit pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® de Invitrogen (Figura 12). La reacción consistió en añadirle a 160 ng de la secuencia amplificada 20 ng del plásmido y 0.12 M de NaCl con 6 µM de MgCl₂ para después dejarla incubando a 22 °C por 5 minutos, el producto de esa reacción fue introducido en células termocompetentes de *E. coli* DH5α, las bacterias que contenían el plásmido fueron seleccionadas con 50 µg/ml de espectinomicina. Para poder analizar los productos plasmídicos fue necesario hacer una extracción de DNA de las bacterias mediante la técnica de minipreps. Ésta consistió en crecer 3 ml de cultivo de bacterias transformadas y centrifugarlas a 500 rpm por 10 minutos, el botón obtenido se resuspendió en 250 µl de un buffer I (50 mM glucosa, 25 mM TrisHCl pH=8 y 10 mM EDTA) después se le añadió 250 µl de buffer II (0.2 N NaOH y 1% SDS) y se mezcló suavemente para añadir 350 µl de un buffer III (3 M AcK y 11.5% de ácido acético). Las muestras se mezclaron con mucho cuidado para evitar ruptura de DNA genómico. Después se realizó una extracción con 150 µl de cloroformo, se

precipitó el DNA con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se lavó con etanol 70% para finalmente resuspenderlo en H₂O miliQ. Los plásmidos producto de este protocolo sirven para análisis sencillos, en algunas ocasiones se requirió una extracción de plásmidos de mayor calidad para análisis más delicados, en esos casos la extracción se realizó con el QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN, cuyo protocolo es muy similar al arriba descrito, solo que este kit contiene sus propias columnas de extracción, así que no fue necesario realizar las extracciones con cloroformo. Los plásmidos fueron analizados con enzimas de restricción y PCRs para determinar la presencia y dirección de inserto en el vector. Los plásmidos seleccionados se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

- *Recombinación:* Una vez que se verificó que los plásmidos seleccionados tenían la secuencia correcta y en la orientación adecuada, se realizó una reacción de recombinación LR utilizando la LR Clonasa del sistema Gateway de Invitrogen, utilizando como vector donador a pCR®8/GW/TOPO+pHAM1:HAM1 y a pGWB4 como vector receptor (Nakagawa *et al.* 2007). El vector pGWB4 del sistema GATEWAY contiene las secuencias necesarias para integrarse al DNA de las plantas, además contiene resistencia a kanamicina e higromicina y una construcción sin promotor del gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) y que al hacer la recombinación la GFP quedaría hacia la región 3 prima del gen pHAM1:HAM1 (Figura 12), haciendo posible el uso de GFP como reportero de la expresión, en este caso de HAM1. La reacción de recombinación consistió en adicionar a 300 ng del vector donador (pCR®8/GW/TOPO+pHAM1:HAM1), 300 ng del vector receptor (pGWB4), 1.5X del buffer LR Clonase Reaction y 4 µl de la mezcla LR clonase enzyme. La reacción se incubó a 22 °C toda la noche, posteriormente se detuvo la reacción con 1 µl de Proteínasa K a 37 °C por otros 10 minutos. El producto resultante fue empleado para transformar células de *E. coli* DH5α, las cuales fueron crecidas en medio con kanamicina a 50 µg/ml. Las colonias resistentes se analizaron por medio de ensayos de restricción, PCR y secuenciación para verificar la presencia de pHAM1:HAM1 y en la orientación correcta, el plásmido obtenido se nombró como pHAM1:HAM1:GFP.

- *Transformación:* El plásmido pHAM1:HAM1:GFP fue empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales fueron a su vez se usaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0 y plantas mutantes *ham1-1* para complementarlas. La transformación de *Arabidopsis* por infiltración consistió en crecer la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* con el gen de pHAM1:HAM1:GFP en medio LB líquido con kanamicina a 50 µg/ml y rifampicina a 100 µg/ml. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos para obtener un botón que fue resuspendido en una solución con 5 % sacarosa y 0.05 % Silwet L-77. Esta solución con *Agrobacterium* fue empleada para sumergir las flores inmaduras de las plantas de *Arabidopsis* a transformar durante 90 segundos. Las plantas transformadas se dejaron creciendo hasta obtener semillas. Las semillas se pusieron a crecer en MSS con kanamicina a 50 µg/ml para seleccionar las plantas con los insertos de T-DNA, y seguir la segregación de los mismos. Finalmente se corroboró la presencia de la construcción observando a GFP mediante microscopía confocal.

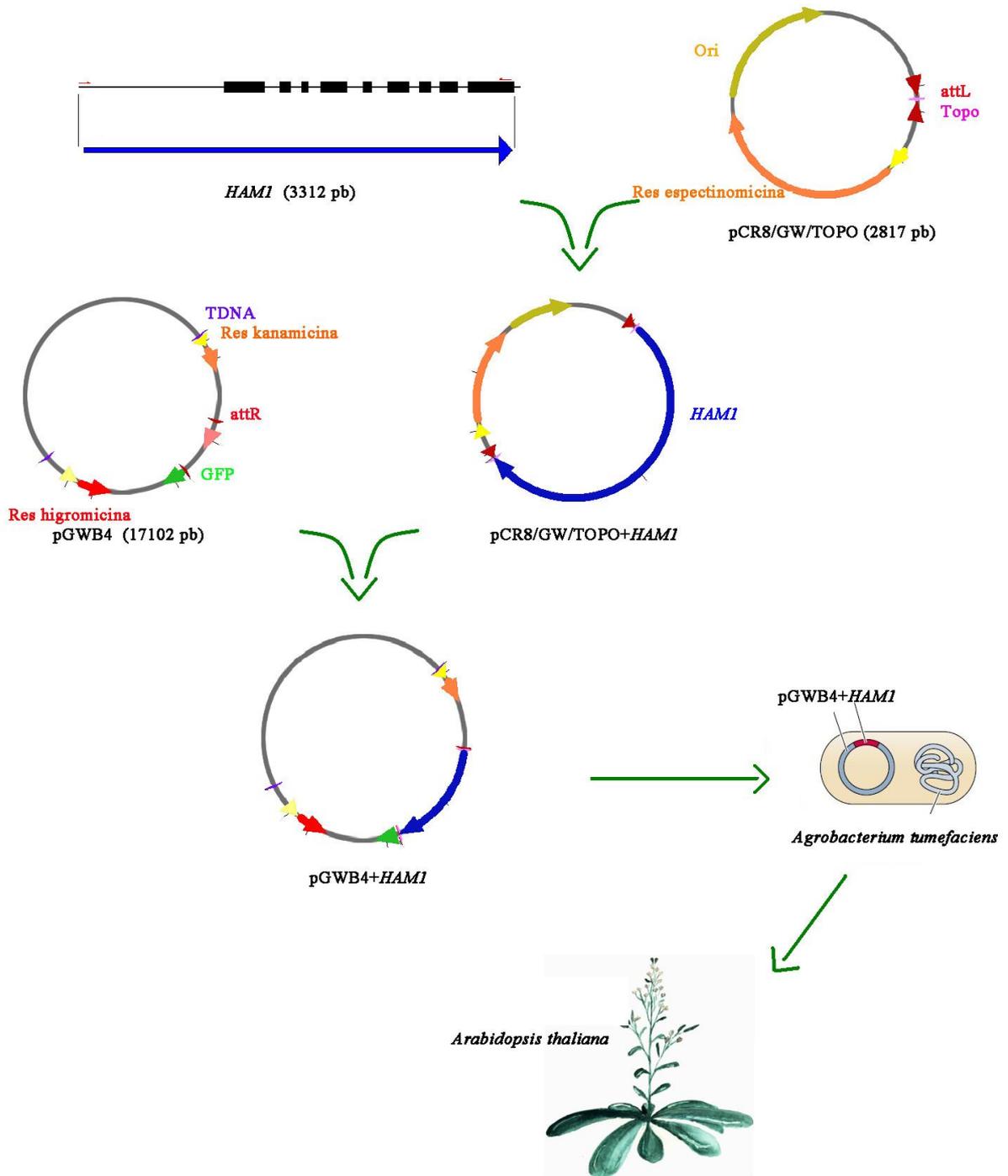


Figura 12 Esquema de la elaboración de la construcción pHAM1:HAM1:GFP hasta la transformación de las plantas. Las flechas verdes indican la dirección de los pasos seguidos

4.9 Obtención de plantas *ham1-1* x *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS*.

Para poder introducir en la mutante *ham1-1* un marcador de *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* presente en otra planta, se realizaron cruza entre estas. Para ello, se eligieron a las plantas *ham1-1* como madres y a las plantas *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* como padres; a las plantas que serían las madres se les removieron de varias de sus flores inmaduras los verticilos florales, excepto por los carpelos, a los cuales se les colocó el polen de la planta que sería el padre. Después se siguió el desarrollo de estos carpelos y se colectaron las semillas de aquellos que lograron generarlas, las cuales fueron genotipificadas, tanto por PCR como identificando la presencia del marcador por medio de tinciones de GUS.

4.10 Análisis estadísticos empleados.

Las mediciones del tamaño de las raíces y sus meristemas se realizaron con el programa de dominio público Image JA 1.45b disponible en: <http://imageja.sourceforge.net/>

Los gráficos y el análisis estadístico de los datos se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2007. Los análisis estadísticos consistieron en pruebas de “*t* de Student” utilizando la fórmula que se muestra a continuación:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Figura 13. Fórmula empleada para el análisis de *t* de Student. N_1 y N_2 son el número de elementos de las muestras 1 y 2; \bar{X}_1 y \bar{X}_2 son los valores promedio de estas mismas muestras y s_1^2 y s_2^2 son sus respectivas desviaciones estándar.

5 Resultados

5.1 Inducción de DSBs en *Arabidopsis* mediante tratamientos con zeocina.

Para estudiar cuál es la función de *HAMI* en los procesos de reparación del daño al DNA, en este trabajo nos enfocamos sobre todo en estudiar la función de *HAMI* en los eventos que ocurren cuando se induce un daño al DNA por DSB, usando como modelo de estudio la raíz de *Arabidopsis*, ya que en éste tejido se tiene células troncales, células en proliferación y diferenciación que son fáciles de visualizar, lo que nos permitió estudiar los procesos celulares que se llevan a cabo después de un daño por DSB.

Para inducir el daño por DSB se utilizó una solución de zeocina. En *Arabidopsis* existen varios estudios en los que se ha reportado la inducción de DSBs por zeocina (Calmels *et al.* 1991, Fulcher y Sablowski 2009, Ramirez-Parra y Gutierrez 2007); tomando como base estos reportes, se optó por usar concentraciones de 10 y 20 µg/ml de zeocina, lo que equivale a 6.5 µM y 13 µM respectivamente. Utilizando estas concentraciones de zeocina, se buscó establecer la duración del tratamiento, para ello se sembraron directamente varias semillas de *Arabidopsis* en medio MSS con 10 o 20 µg/ml zeocina. Algunas de las semillas sometidas a estos tratamientos no germinaron y las que lograron germinar tuvieron una germinación asincrónica. Por ello se optó por dejar que las semillas germinaran en medio MSS durante 3 o 4 días para después transferirlas al medio MSS con 10 o 20 µg/ml zeocina, lo que permitió que todas las plantas germinaran antes del tratamiento. Bajo éstos tratamientos se empezaron a realizar cinéticas de crecimiento radicular.

5.2 Efecto de la inducción de DSBs sobre el crecimiento radicular de plantas mutantes *ham1-1*.

Para poder determinar la función de *HAMI* en respuesta a DSBs empleamos la mutante de pérdida de función *ham1-1* (SALK 027726/N527726) (Latrasse *et al.* 2008), la cual no es una mutante nula, pero presenta una reducción en la expresión de *HAMI* del 60% (Sánchez, datos sin publicar). Las semillas de *ham1-1* y control (Ctr) se

germinaron en medio MSS durante 4 días y se transfirieron a medio MSS o medio MSS con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zeocina durante 3 días, tiempo en el cual se midió la longitud radicular. Los resultados obtenidos mostraron que la inducción de DSBs por zeocina detiene considerablemente el crecimiento radicular tanto en las plantas control como en las plantas *ham1-1* (Figura 14). Sin embargo, el tamaño radicular promedio en las plantas *ham1-1* fue de 2.13 cm, ligeramente mayor respecto a las plantas control que tuvieron un tamaño de 1.9 cm. Si bien se trata de una diferencia sutil, esta ocurrió constantemente en las 4 replicas biológicas realizadas, demostrando ser estadísticamente significativa.

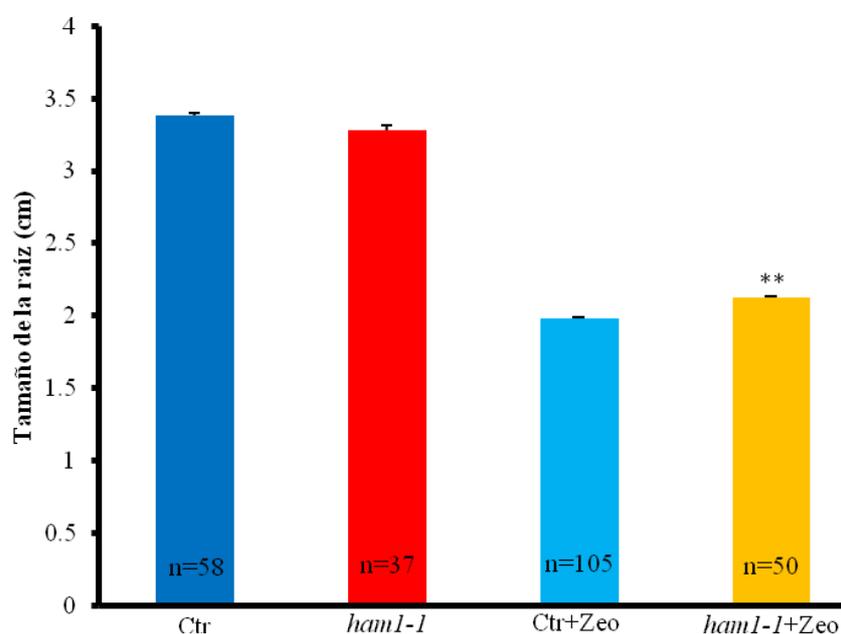


Figura 14. Efecto del crecimiento radicular por inducción de DSBs en las plantas *ham1-1*. Tamaño radicular promedio en centímetros (cm) de plántulas crecidas durante 4 días en medio MSS y transferidas durante 3 días a medio MSS (Ctrl y *ham1-1*) o MSS+10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zeocina (Ctrl+Zeo, *ham1-x*+Zeo). Nótese que la raíz de *ham1-1* reduce menos su crecimiento respecto a las plantas control durante el tratamiento con zeocina. ** ($p < 0.025$). Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 4 replicas biológicas.

Para analizar con detalle el crecimiento radicular durante todo el tratamiento, se realizó una cinética de crecimiento de las raíces antes y después de la inducción del daño bajo las mismas condiciones experimentales anteriores. La cinética del crecimiento radicular nos indica que la diferencia en el crecimiento que presenta *ham1-1* bajo condiciones de inducción de DSBs se empieza a dar después del primer día de tratamiento, es decir, después de los 5 días de inicio del experimento (Figura 15).

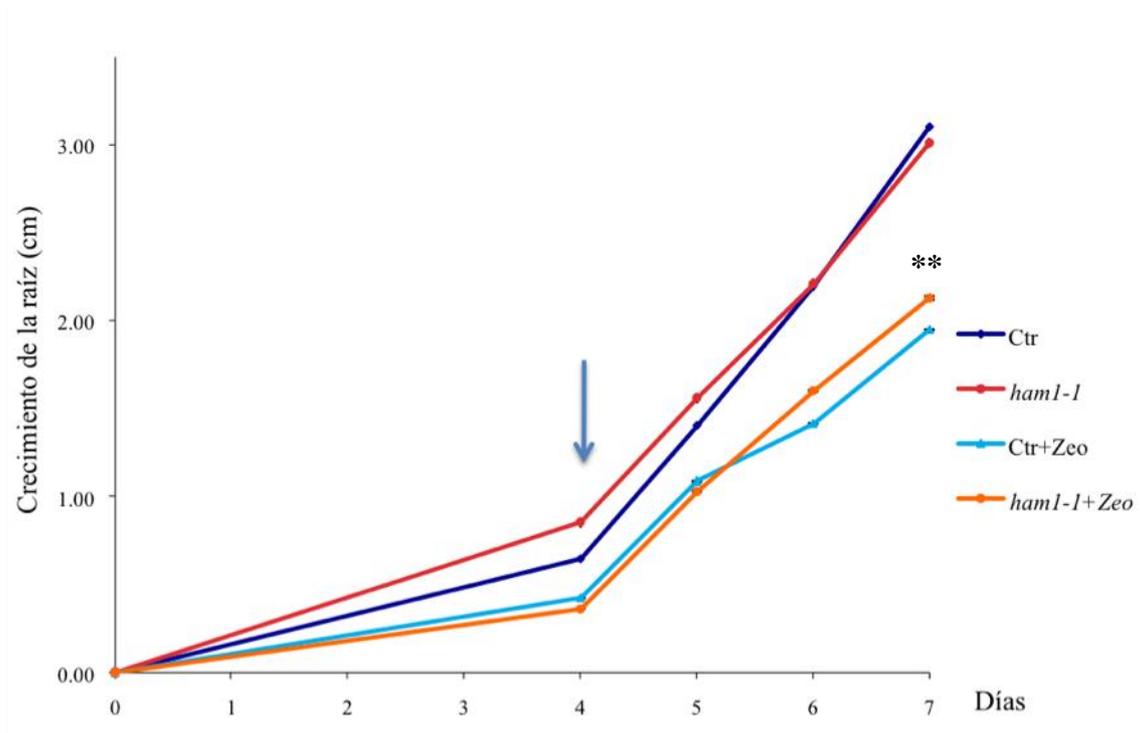


Figura 15. Cinética de crecimiento radicular por inducción de DSBs. Crecimiento radicular en centímetros (cm) de plántulas crecidas durante 4 días en medio MSS y transferidas durante 3 días a medio MSS (Ctr y *ham1-1*) o MSS+10 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-1*+Zeo) Nótese que la raíz de *ham1-1* reduce menos su crecimiento respecto a las plantas control durante el tratamiento con zeocina. La flecha indica el inicio del tratamiento con zeocina. La diferencia que se presenta al inicio del tratamiento corresponde a una variación entre las réplicas biológicas que se presenta durante los primeros 3 días post siembra, pero que no permanece durante estadios más avanzados del desarrollo de la raíz, por lo cual no es significativa y no afecta el resultado final. ** ($p < 0.025$). Resultado promedio de 4 réplicas biológicas.

Posteriormente se realizó otro ensayo similar, pero partiendo de plántulas más jóvenes. Para ello se germinaron las semillas en medio MSS para transferirlas a los 3 días postsiembra a medio MSS o medio MSS con 10 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina, en el cual estuvieron también durante 3 días. En este ensayo se pudo observar una diferencia en la detención del crecimiento aún mayor en plantas *ham1-1*, después de la inducción de DSBs (Figura 16), por lo cual se optó por emplear este tratamiento en los ensayos siguientes. En conjunto estos resultados sugieren que se requiere de la función de *HAM1* para detener el crecimiento radicular cuando se induce DSBs con zeocina.

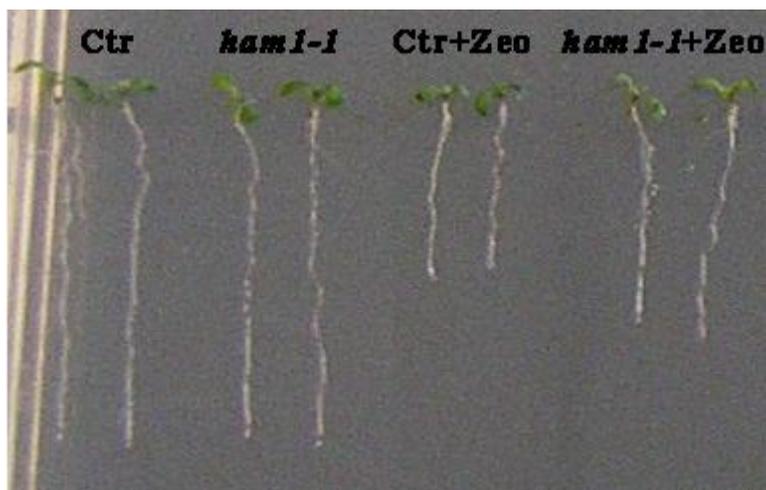


Figura 16. Efecto de la inducción de DSBs en plántulas de 3 días. Plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante otros 3 días a medio MSS (Ctr y *ham1-1*) o MSS+10 µg/ml de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-1*+Zeo).

5.3. Efecto de la inducción de DSBs sobre el meristemo radicular de *ham1-1*.

Dado que las raíces de las plantas *ham1-1* tienen problemas para detener el crecimiento radicular después de la inducción de DSBs, se puede suponer que el meristemo radicular se esté viendo alterado en esta mutante, ya que en general el crecimiento de la raíz está determinado por la velocidad en la que las células del QC producen nuevas células meristemáticas y por la velocidad en la que las células meristemática pasan a diferenciarse (Shishkova *et al.* 2008). Además, se ha reportado que las células meristemáticas son particularmente vulnerables a daños al DNA (Fulcher y Sablowski, 2009). Para evaluar ésta hipótesis se analizó el efecto de la zeocina sobre el meristemo radicular.

Los primeros intentos de observar el meristemo se realizaron bajo condiciones de 3 días de crecimiento inicial más 3 días de tratamiento en zeocina a 10 µg/ml, pero los meristemos presentaban una morfología irregular, algunos estaban terriblemente reducidos mientras que otros parecían muy normales, probablemente por un efecto de acumulación de células en reparación y muerte celular. Así que se optó por hacer los análisis en etapas más tempranas del tratamiento de inducción de DSBs, es decir, a las 40 hrs después de la inducción del daño. En este tiempo, el tamaño radicular entre las plantas control y las mutantes *ham1-1* apenas se empieza a diferenciar (Figura 15) y al ser menor tiempo era probable que el daño celular fuera menor.

Al realizar los análisis del meristemo 40 hrs después de la inducción de DSBs, se observó que el tamaño del meristemo en las plantas control tratadas con zeocina es menor respecto a las plantas sin tratamiento, esta reducción en tamaño está directamente relacionada con el número de células del córtex contenidas en la zona meristemática; los meristemos de las plantas sin tratamiento tuvieron en promedio 36.7 células de córtex, mientras que las plantas tratadas tuvieron solo 14.2 (Figura 17, comparar Ctr vs Ctr+Zeo). Al comparar los meristemo de las plantas tratadas con zeocina, se encontró que *ham1-1* tiene más células de córtex en sus meristemos (18.5 células) respecto a los de las plantas control (14.2 células) (Figura 17). Este comportamiento en el tamaño del meristemo correlaciona con el observado en el tamaño total de la raíz.

Para poder determinar que ocurre durante etapas más tempranas del tratamiento, se realizó el mismo experimento, pero esta vez se redujo el tiempo de inducción de daño por DSBs a solo 24 hrs. El resultado siguió la misma tendencia observada para las 40 hrs de inducción de DSBs; el número de células promedio del córtex de los meristemos en *ham1-1* fue de 19.9, lo cual fue significativamente más grande respecto al de las plantas control que tuvieron en promedio 17.9 células del córtex (Figura 18).

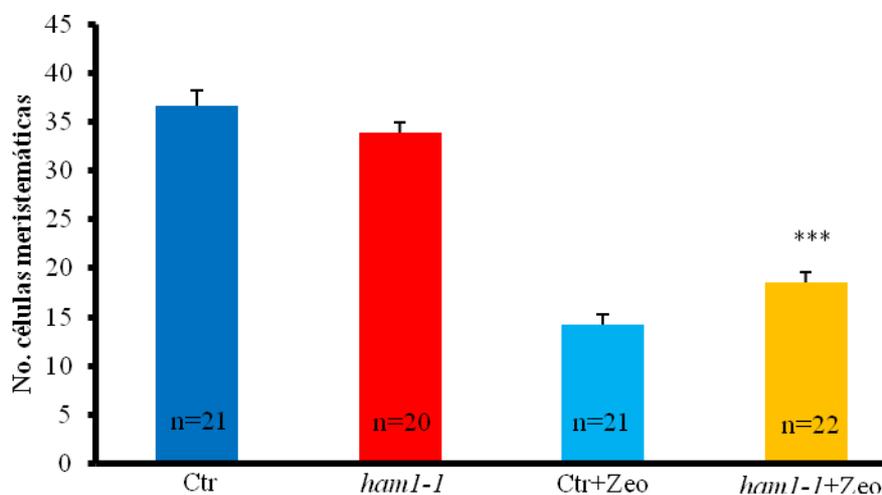


Figura 17. Efecto de la inducción de DSBs a las 40 hrs, sobre el meristemo radicular de *ham1-1*. Número de células meristemáticas del córtex en plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 40 hrs a medio MSS (Ctr y *ham1-1*) o MSS+10 µg/ml de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-1*+Zeo). *** (p<0.005). Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 2 replicas biológicas.

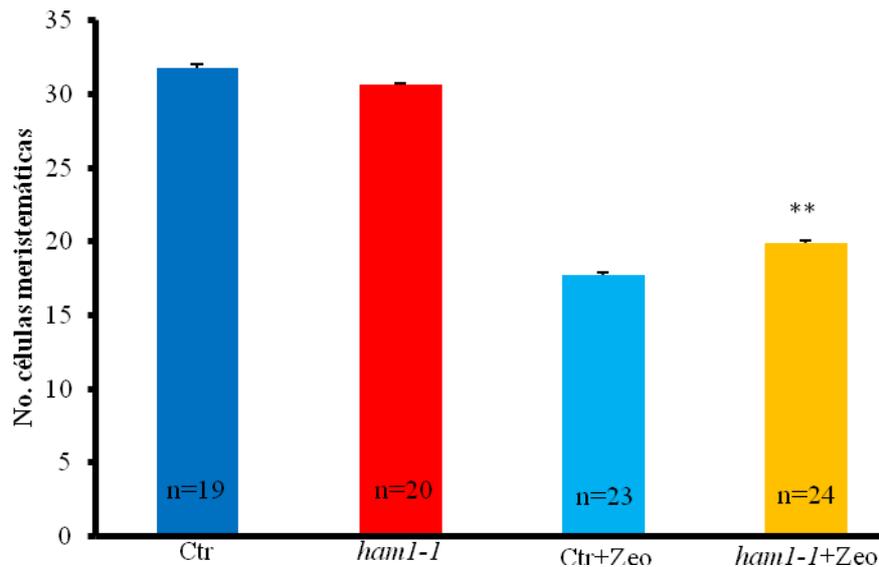


Figura 18. Efecto de la inducción de DSBs a las 24 hrs, sobre el meristemo radicular de *ham1-1*. Número de células meristemáticas del córtex en plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 hrs a medio MSS (Ctr y *ham1-1*) o MSS+10 µg/ml de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-1*+Zeo). ** (p<0.025). Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 2 replicas biológicas.

Después se realizó otro ensayo, en el cual utilizamos un tratamiento con una concentración de zeocina más alta, esto para observar si podíamos inducir un fenotipo más drástico en los meristemas de las plantas *ham1-1* respecto a las control; así que se repitió el experimento anterior, pero esta vez se utilizó una concentración de 20 µg/ml de zeocina, el doble de la concentración usada en los ensayos anteriores. Como era de esperarse, los meristemas tuvieron una respuesta más drástica bajo este tratamiento de inducción de DSBs; esta respuesta a su vez produjo una diferencia significativa entre el número de células del córtex del meristemo de las plantas control respecto al de las plantas *ham1-1* bajo las condiciones de daño por DSBs (Figura 19). En este caso las plantas control tuvieron en promedio 11.6 células de córtex, mientras que las plantas *ham1-1* tuvieron 13.9 células de córtex. Así que a partir de ese momento se optó por usar tratamientos de 20 µg/ml de zeocina, ya que este tratamiento es más efectivo y no llega a generar un daño severo. Estos resultados sugieren que durante la inducción de DSBs, se requiere de *HAMI* para detener el crecimiento del meristemo radicular.

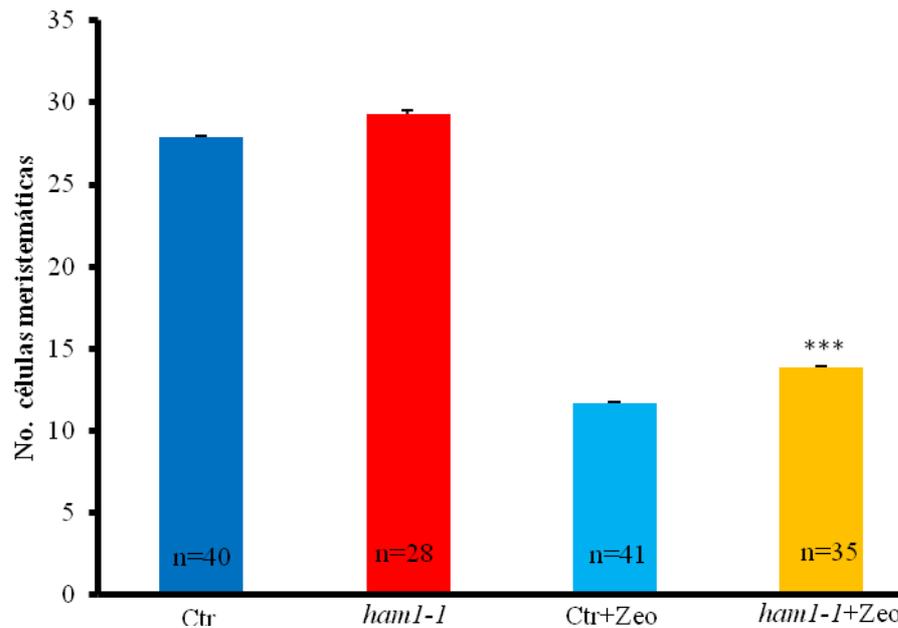


Figura 19. Efecto de la inducción de DSBs con 20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina en *ham1-1*. Número de células meristemáticas del córtex en plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 hrs a medio MSS (Ctr y *ham1-x*) o MSS+20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-x*+Zeo). *** ($p < 0.005$). Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 3 replicas biológicas.

5.4 Efecto de la inducción de DSBs sobre el crecimiento radicular de plantas mutantes *atm-2* y *atr-2*.

La respuesta al daño al DNA puede ser dividida en tres fases. 1) La detención del ciclo celular, cuyo fin es evitar que las células proliferen, previniendo la propagación del daño a las células hijas, 2) La reparación del daño, la cual es específica para cada tipo de daño al DNA y 3) La muerte celular programada, que tiene como objetivo eliminar a las células dañadas con el fin de salvaguardar la integridad del organismo entero (Game y Mortimer, 1974). Para determinar cuál es la función de *HAM1*, y a qué nivel actúa durante la inducción de DSB por zeocina, analizamos el efecto de la inducción de DSBs en raíces de plantas mutantes de pérdida de función en *ATM* y *ATR* (*atm-2* y *atr-2* respectivamente) ya que la respuesta al daño al DNA está mediada principalmente por las cinasas ATM y ATR (Figura 8). En general el gen de *ATM* se induce durante las rupturas de doble cadena mientras que el de *ATR* se induce durante las rupturas de cadena sencilla (Bleuyard *et al.* 2006). Cuando ocurre el daño al DNA, estas cinasas inician una cascada de señalización que lleva en primer lugar al arresto del ciclo celular y a la activación de los mecanismos de reparación del daño e

incluso, en algunos casos al inicio de la muerte celular programada en respuesta al daño al DNA (Game y Mortimer, 1974).

Los resultados obtenidos son sin duda interesantes, en la figura 20 se observa que el tamaño de las raíces después de 3 días de inducción de DSBs con 20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina, fue aproximadamente en promedio de 1.3 cm en las plantas control y *atr-2*, en tanto que en las plantas *atm-2* el tamaño radicular fue de 2.02 cm. El comportamiento que presentan las plantas *atm-2* es muy similar al de las mutantes *ham1-1*, ya que ambas mutantes tienen defectos para detener el crecimiento radicular durante la inducción de DSBs.

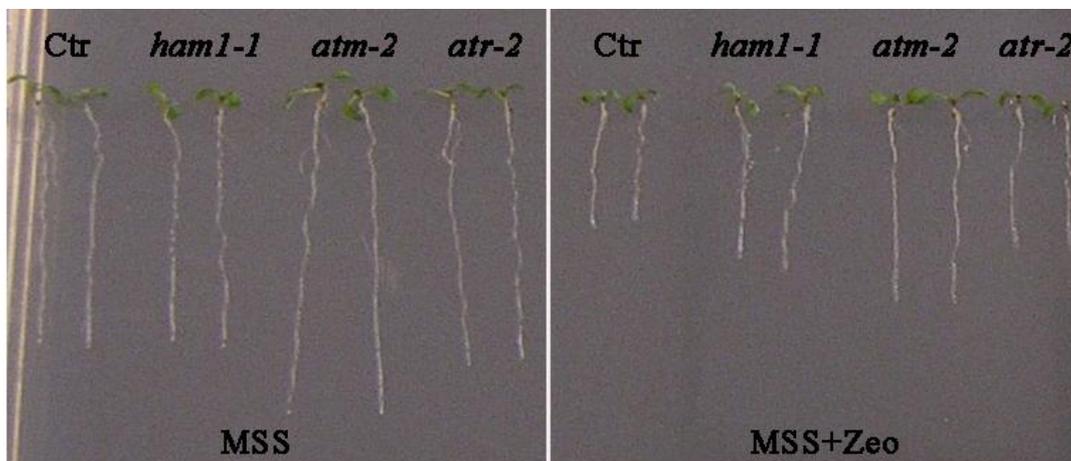


Figura 20. Efecto de la inducción de DSBs en plántulas mutantes con defectos en la respuesta a DSB. Plántulas (Ctr, *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*) crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante otros 3 días a medio MSS o MSS+20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina. Nótese que *ham1-1* no logra detener su crecimiento como la planta Ctr durante el tratamiento con zeocina; lo mismo ocurre con las plantas *atm-2*.

Un comportamiento similar se observó en los meristemos de las plantas *atm-2* y *ham1-1* tratadas con zeocina (Figuras 21 y 22). Las dos mutantes mostraron más células del córtex en su meristemo (14.8 células para *ham1-1* y 28.4 células para *atm-2*), respecto a los de las plantas control (12 células). Esto nos indica que *HAM1* podría estar actuando por la misma vía que *ATM* o en vías diferentes que confluyen en el arresto del crecimiento radicular, es decir, en las etapas iniciales de inducción de la reparación del daño.

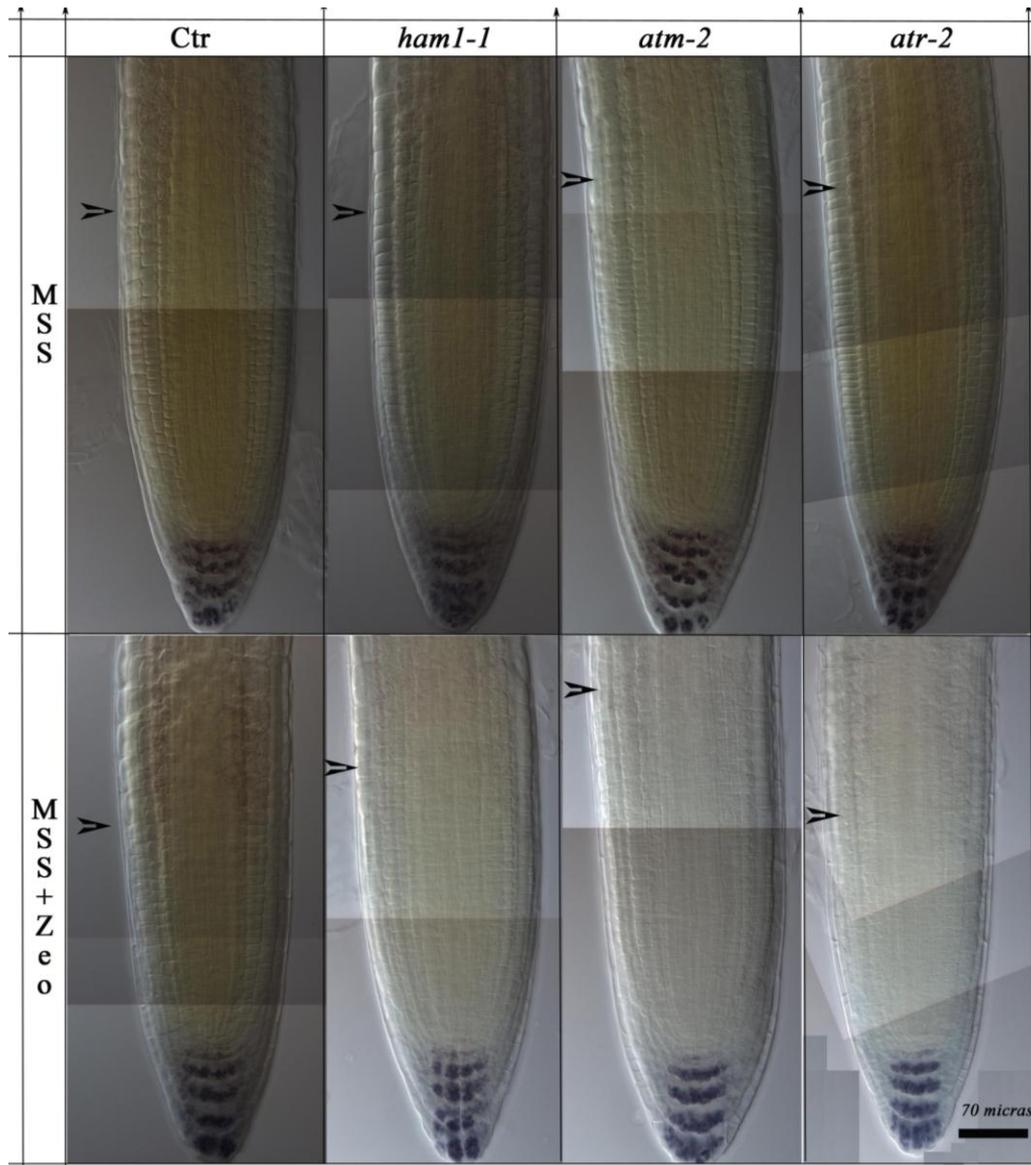


Figura 21. Efecto en el tamaño del meristemo radicular en plántulas mutantes con defectos en la respuesta a DSB, *atm-2* y *atr-2*. Número de células meristemáticas del córtex en plántulas (Ctrl, *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*) crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 1 día a medio MSS o MSS+20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina y observadas a 40X. Nótese que *ham1* tiene más células meristemáticas del córtex respecto a las plantas Ctrl durante la inducción, al igual que la mutante *atm-2*.

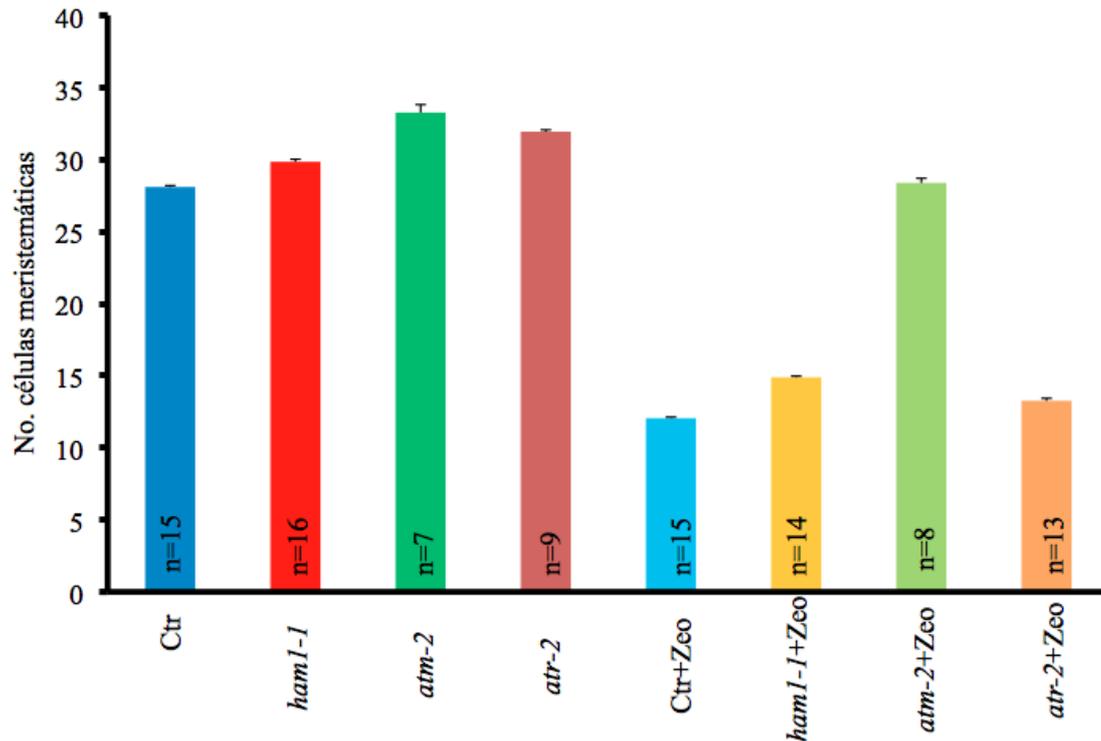


Figura 22. Efecto en el meristemo radicular en plántulas mutantes con defectos en la respuesta a DSB, *atm-2* y *atr-2*. Número de células meristemáticas del córtex en plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 1 día a medio MSS (Ctr, *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*) o MSS+20 µg/ml de zeocina (Ctr+Zeo, *ham1-1*+Zeo, *atm-2*+Zeo y *atr-2*+Zeo). Nótese que *ham1* tiene más células meristemáticas del córtex respecto a las plantas Ctr durante la inducción de DSBs, al igual que la mutante *atm-2*. Las barras representan el error estándar. Resultado promedio de 1 replica biológica.

5.5 Determinación de la muerte celular inducido por DSBs en las plantas mutantes *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*.

Otra de las fases de la respuesta al daño al DNA es la muerte celular programada. Por mucho tiempo se pensó que las plantas no tenían muerte celular programada (PCD) en respuesta al daño al DNA; sin embargo, se ha documentado que esta respuesta sí se da en las plantas, principalmente en las regiones meristemáticas, y si bien no se sabe que proteínas efectoras son las que dan lugar a esta respuesta, queda claro que se requiere de la presencia tanto de *ATM* como de *ATR* para que la PCD pueda ocurrir (Fulcher y Sablowski, 2009).

Para observar la muerte celular inducida por zeocina, las plántulas de 3 días fueron transferidas al medio con 20 µg/ml de zeocina durante 24 hrs, para después ser teñidas con IPr y visualizadas al microscopio confocal. En estos ensayos el IPr penetra solo en las células muertas, en tanto que en las células viables el IPr solo tiñe la pared

celular (Fulcher y Sablowski, 2009); bajo esta premisa se observó que en las plantas *ham1-1* sin tratamiento presentaron un poco de muerte celular, mientras que las plantas *atr-2* y control no la presentaron (Figura 23, panel MSS). Cuando las plantas fueron tratadas con zeocina, la muerte celular se observó en las plantas control y con mayor intensidad en las mutantes *ham1-1*, mientras que en las plantas *atr-2*, con defectos para inducir la respuestas de inducción de daño, no mostraron muerte celular (Figura 23, panel MSS+Zeo), tal y como se había reportado previamente para esta mutante (Fulcher y Sablowski, 2009). Estos resultados preliminares, nos sugieren que las mutantes *ham1-1* parecen tener un ligero daño, el cual se incrementa con el tratamiento con zeocina. Por otra parte, el hecho de que las mutantes *atr-2* y *atm-2* sean incapaces de generar muerte celular cuando se induce DSBs con zeocina (datos obtenidos en este trabajo y en Fulcher y Sablowski, (2009)), indica que se requiere de la función de *ATM* y *ATR* para generar muerte celular, en tanto que *HAM1* no se requiere para inducir esta respuesta, por el contrario parece que está implicada en la reparación del daño antes de que se de la muerte celular, por ello en la mutante *ham1-1* observamos mayor muerte celular, lo que sería el reflejo de mayor acumulación de daño.

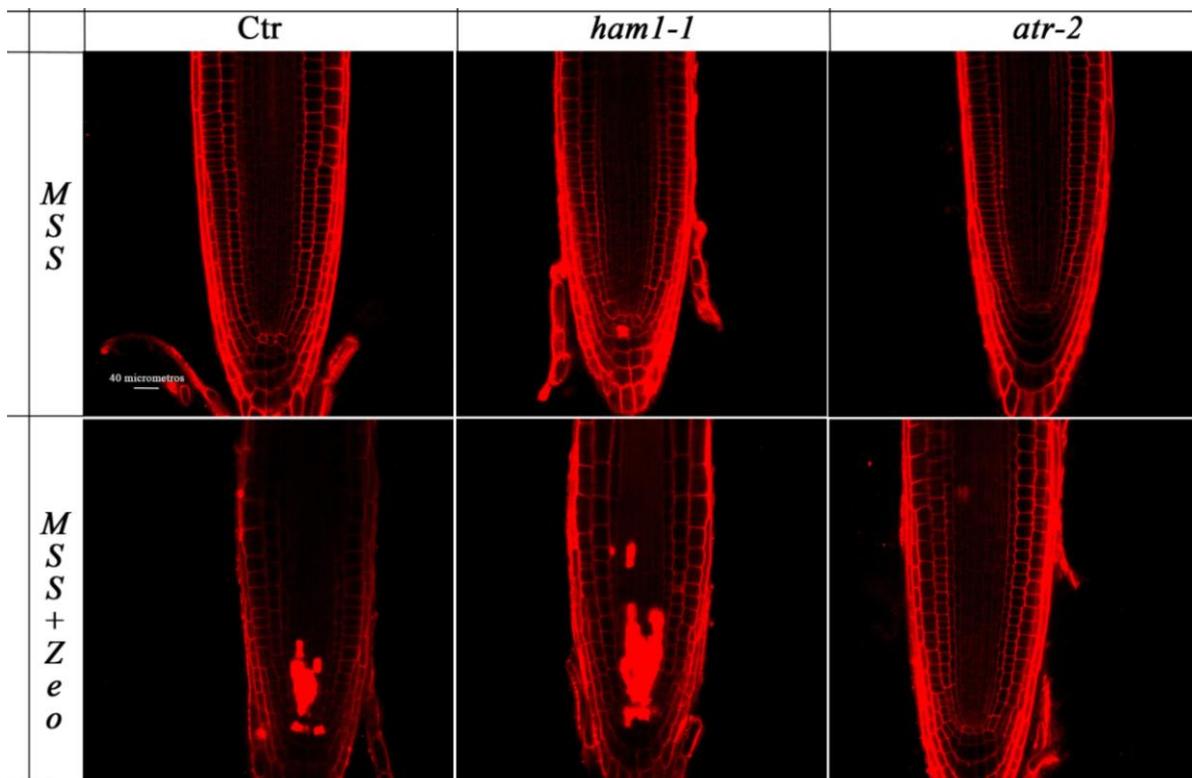


Figura 23. Muerte celular inducida por zeocina en plantas mutantes *ham1-1* y *atm-2*. Muerte celular en plántulas (Ctr, *ham1-1*, *atm-2*) crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 horas a medio MSS o MSS+20 μ g/ml de zeocina, observadas a 40X. Resultado representativo de 2 réplicas biológicas.

5.6 Efecto del tratamiento con zeocina en la expresión génica de las plantas.

Para poder determinar en qué punto de la respuesta al daño al DNA está participando *HAM1*, fue necesario saber qué genes de respuesta al daño están desregulados en la mutante *ham1-1* y comparar esta expresión con la que tienen las plantas *atm-2* y *atr-2*. Para revisar esto, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativos a partir de cDNA de parte aérea o de raíces de plántulas *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2* crecidas por 3 días en medio MSS y transferidas por 8 hrs a medio MSS (plantas sin tratamiento) o MSS+ 20 µg/ml de zeocina (plantas tratadas).

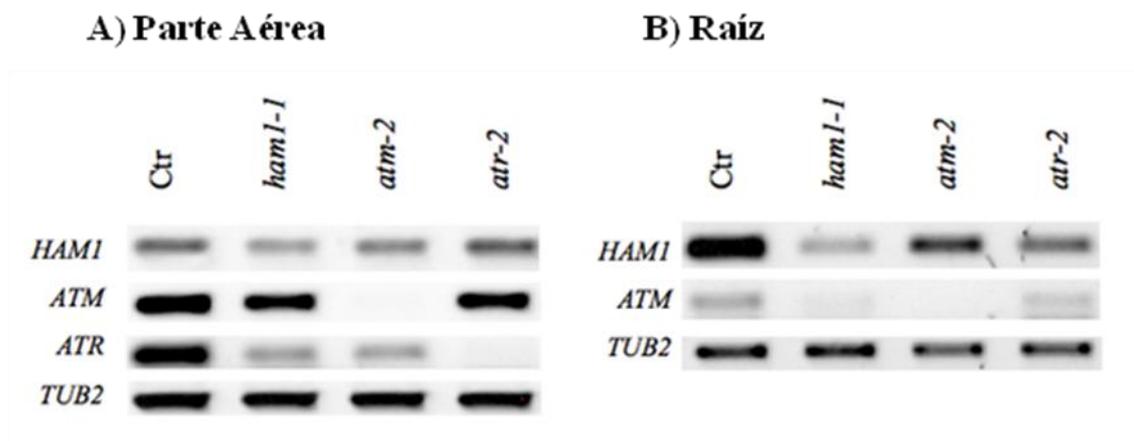


Figura 24. Expresión génica de plantas *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*. Niveles de expresión de *HAM1*, *ATM* y *ATR* que presentan las plantas mutantes en la parte aérea (A) y en la raíz (B). Plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio MSS o MSS+20 µg/ml de zeocina. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

Con estos ensayos pudimos corroborar que la expresión de los genes de *HAM1*, *ATM* y *ATR* está disminuida o es nula en sus respectivos mutantes (Figura 24), sorprendentemente encontramos que la expresión *ATM* y *ATR* está disminuida en la mutante *ham1-1* en comparación con la expresión de las plantas control (Figura 24). También se analizó la expresión de estos genes y algunos implicados en la respuesta de daño por DSB (como *BRCA1*, *PARP1*, *RAD51*, *Ku70* y *CYCB1.1*) en plantas tratadas con zeocina, sin embargo los resultados fueron inconsistentes en las réplicas realizadas, por lo que se requiere de hacer más ensayos para determinar su comportamiento.

5.7 Arresto del ciclo celular en la mutante *ham1-1* en respuesta a la inducción de daño por DSBs.

De acuerdo a los resultados anteriores, las plantas *ham1-1* tienen defectos para detener el crecimiento radicular y el crecimiento del meristemo cuando se induce DSBs, esto sugiere que *HAMI* podría estar participando en la interrupción del ciclo celular, tal y como se ha reportado para proteínas de la misma familia en otros organismos (Latrasse *et al.* 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, el arresto del ciclo celular es una primera fase que se presenta cuando hay daño para evitar acumulación de mutaciones. En la raíz, el arresto del ciclo celular puede estar implicado en la disminución general del tamaño radicular, ya que si las células meristemáticas no pueden dividirse, el meristemo va paulatinamente disminuyendo su tamaño, lo cual a su vez disminuye el ritmo de crecimiento de la raíz. En realidad es posible que el fenotipo que se observa en *ham1-1* se deba a alteraciones en la forma en la que se presenta el arresto del ciclo celular, de manera similar a lo que se tiene reportado que ocurre con las mutantes *atm-2* (Culligan y Britt, 2008).

Para determinar si existen alteraciones en el arresto del ciclo celular por daño al DNA en la mutante *ham1-1*, se optó por realizar cruza de ésta mutante con otra que tuviera un marcador de ciclo celular como es pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS, la cual es normalmente usada como marcador de ciclo celular, ya que es una ciclina que contiene la caja de destrucción D-Box que permite marcar las células en la fase G2/M (Colon-Carmona *et al.* 1999). Hasta el momento, se ha logrado obtener 3 líneas (*ham1-1* x pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS) provenientes de dos eventos de cruce distintos que contienen tanto la inserción de *ham1-1* como el marcador de pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS en homocigosis (Figura 24), pero por cuestiones de tiempo, no fue posible realizar ensayos de inducción de DSBs para determinar si existen alteraciones en el arresto del ciclo celular similares a las que se tienen reportadas para las mutantes *atm-2* (Culligan *et al.* 2006).

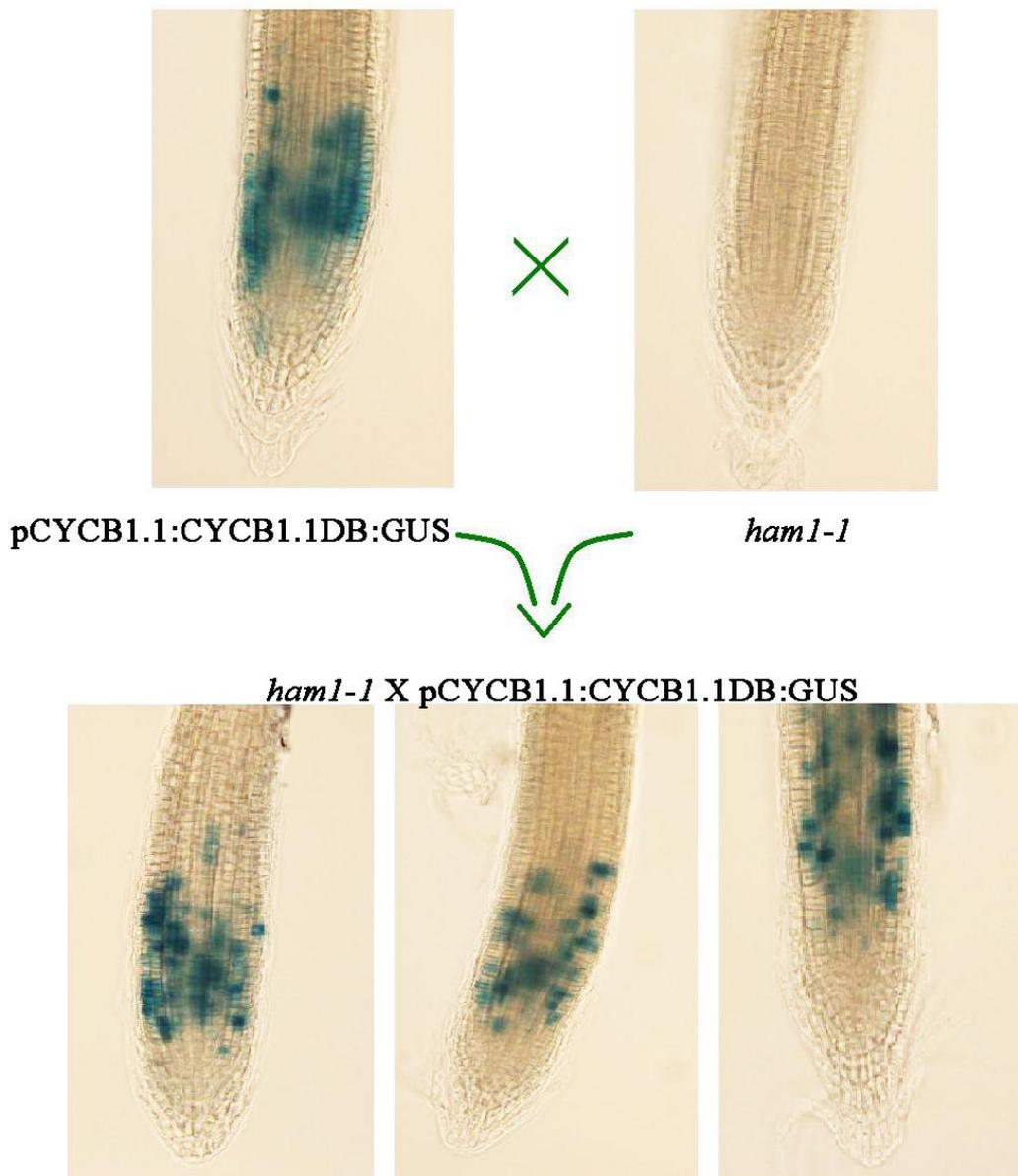


Figura 25. Obtención de plantas *ham1-1* x *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS*. Tinción de GUS de plantas mutantes *ham1-1*, plantas *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* y plantas homocigotas *ham1-1* x *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS*.

5.8 Elaboración y análisis de la construcción pHAM1:HAM1:GFP.

Para estudiar cómo se da la expresión de la proteína de HAM1 en la raíz y complementar las plantas *ham1-1*, además de poder determinar si *ATM* y *ATR* se regulan directamente por HAM1, tanto en condiciones normales como de daño al DNA, se realizó una construcción que lograra expresar a HAM1 bajo las mismas condiciones que una planta control, pero con un marcador de GFP para poder rastrear su expresión o

unión a diferentes locus. Para ello se clonaron 1146 pb río arriba del ATG (justo donde termina el gene adyacente) y 2165 pb río abajo del ATG (que incluye intrones y exones pero sin codón de stop), este fragmento se fusionó a GFP por el sistema gateway para obtener la construcción pHAM1:HAM1:GFP. Después de secuenciar el plásmido, nos dimos cuenta de que este contenía dos mutaciones puntuales, una en el promotor, 438 pb arriba del ATG y la otra en el quinto exón. Esta última da lugar a un cambio de aminoácidos colocando una prolina en lugar de una serina en el residuo 242 (ver anexo D); sin embargo, esta mutación no parece afectar el plegamiento de la proteína, además, no se encuentra en el dominio catalítico de la enzima (Figura 26).

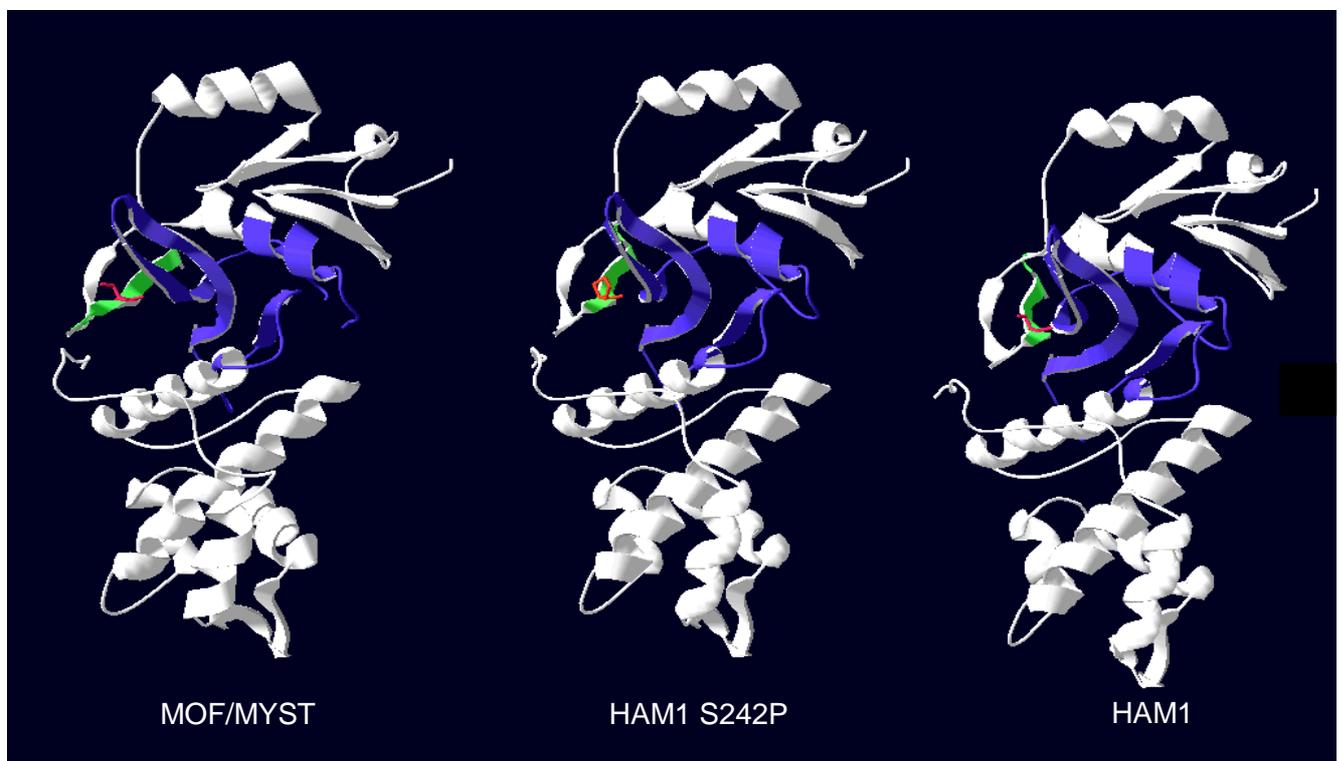


Figura 26. Estructura de HAM1. Estructura de HAM1 y HAM1 mutada en S 242 por P (HAM1 S242P). Ambas estructuras se modelaron tomando como molde el cristal de MOF/MYST y usando el programa swissmodel workspace. En rojo se marca el aminoácido 242 (Serina y/o Prolina) y en azul se indica el dominio MYST que contiene el subdominio C2HC y el catalítico.

Mediante transformación por *Agrobacterium* se obtuvieron plantas transgénicas pHAM1:HAM1:GFP. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas con 50 µg/ml de kanamicina y se eligieron aquellas que a través de la resistencia a kanamicina tuvieron una segregación Mendeliana, lo que nos sugiere que tienen una sola inserción. A pesar

de que todavía no tenemos plantas homocigotas, pudimos analizar las plantas heterocigotas y determinar que la expresión de la proteína HAM1 es claramente nuclear, limitándose preferencialmente a células que tienen capacidad de proliferación, como las células meristemáticas, las células del córtex y las células epidérmicas (Figura 27). En nuestro laboratorio se ha visto que HAM1 interactúa con proteínas que participan en la replicación del DNA (Sánchez *et al.*, datos no publicados), lo cual es consistente con lo observado en estas plantas. Gracias a estas plantas será posible realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para determinar cuáles son los blancos que regula directamente HAM1.

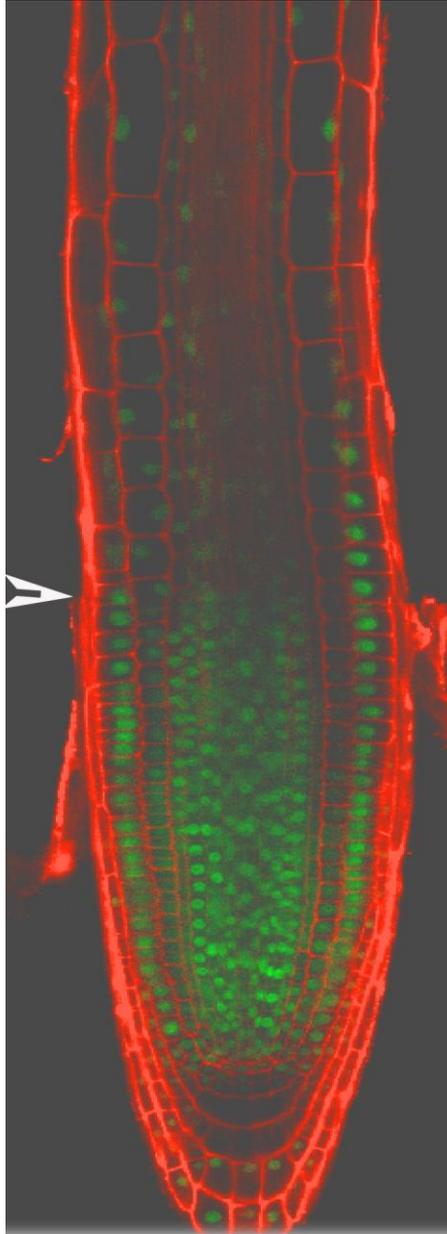


Figura 27. Localización de HAM1 en la raíz de *Arabidopsis*. Raíz de plantas *pHAM1:HAM1:GFP* visualizada a través de la emisión de GFP por microscopía confocal. La expresión de HAM1 se da preferencialmente en células con capacidad de proliferación. La flecha indica la zona donde termina en meristemo

6 Discusión

En los últimos años, se ha enfatizado la importancia que tiene la estructura de la cromatina en los mecanismos de respuesta inducidos por daño al DNA. En plantas, se ha reportado en particular que se requiere de la función de algunas histonas acetilasas para que se lleve a cabo el mecanismo de reparación del DNA cuando es dañado por radiación UV (Campi *et al.* 2012), por esto la importancia de estudiar a las histonas acetilasas que pueden estar implicadas en esta respuesta. Como ya se mencionó, el objetivo del presente proyecto fue aportar datos para definir la función que tiene *HAM1*, una acetilasa de histonas de *Arabidopsis thaliana*, en los mecanismos de respuesta generados por un daño al DNA con zeocina que induce DSBs. ¿Por qué *HAM1*? Porque esta proteína pertenece a la familia de histonas acetilasas tipo MYST, las cuales están involucradas en una gran variedad de procesos nucleares críticos (Avvakumov y Cote, 2007) como son la regulación de la expresión de algunos genes, en los procesos de apoptosis, en la progresión del ciclo celular, la replicación y reparación del DNA; además de estas funciones, se ha encontrado actividad desregulada de algunas acetilasas de histonas en algunos tipos de cáncer, como es el caso de HBO1, una proteína MYST que se encuentra en humanos (Latrasse *et al.* 2008). *Arabidopsis* solo tiene dos acetilasas del tipo MYST, *HAM1* y *HAM2*, ambas proteínas tienen 92.5% de similitud, estudios realizados con dobles mutantes de pérdida de función (*ham1-1 ham2*) indican que tiene funciones redundantes en el desarrollo floral (Latrasse *et al.* 2008). Sin embargo datos de expresión génica, muestran que algunos tejidos de la planta predomina la expresión de *HAM1* respecto a la de *HAM2* y viceversa, lo cual sugiere que si bien pueden tener funciones redundantes, en algunos tejidos puede predominar la función de alguna de éstas proteínas sobre la otra, esto es lo que puede estar ocurriendo en la raíz de *Arabidopsis*, en donde se ha observado que la mutante simple *ham1-1* presenta ligeros desarreglos morfológicos en las células del QC y en las células iniciales de la columela (Sánchez, datos no publicados). Análisis bioquímicos realizados por Sánchez y colaboradores (datos sin publicar), han mostrado que *HAM1* es capaz de unirse a ORC1b, una proteína del complejo preRC esencial para que se inicie la replicación del DNA, lo que sugieren que *HAM1* podría estar participando no solo en la replicación del DNA, sino que también en los procesos de reparación del DNA frente a

un daño. De hecho, trabajos recientemente publicados después de iniciar este proyecto, en donde se determinó la acumulación de daño al DNA inducido por luz UV en planta mutantes de *Arabidopsis ham1-1* y *ham2* indican que es necesaria la presencia de ambos genes *HAM1* y *HAM2* para que se pueda realizar una adecuada reparación del daño, siendo más importante *HAM1* que *HAM2*, ya que hay mas acumulación de daño en la mutante *ham1-1* respecto a *ham2* (Campi *et al.* 2012).

Para determinar la función de *HAM1* en la respuesta inducida por DSBs, en este trabajo se usó como modelo de estudio la raíz de *Arabidopsis*, ya que éste tejido tiene células troncales, células en proliferación y diferenciación que son fáciles de visualizar, lo que nos permitió estudiar más fácilmente los procesos celulares que se llevan a cabo después de un daño por DSB. Está reportado que el daño al DNA tiene un efecto negativo en la proliferación celular, esto es particularmente cierto para las células pluripotenciales encargadas de dar origen a distintos tipos de tejidos, como es el caso de las células meristemáticas (Fulcher y Sablowski, 2009). Dado que el crecimiento radicular está directamente ligado con la proliferación celular que se da en el meristemo (Shishkova *et al.* 2008), una primera aproximación para saber si hay alteraciones en la proliferación celular del meristemo sería observar el crecimiento radicular bajo condiciones de inducción de daño por DSBs (Figuras 14, 15 y 16). Estos ensayos nos indicaron que la mutante *ham1-1* tiene un mayor crecimiento radicular a pesar del daño producido al DNA, estos datos sugerían que la proliferación celular en el meristemo radicular de la mutante *ham1-1* no se detuvo, sino que continuaba a pesar de la inducción de daño al DNA, idea que fue posteriormente confirmada al observar los meristemas radiculares de la mutante bajo condiciones de inducción de DSBs (Figuras 17, 18 y 19). Los resultados fueron concluyentes, la proliferación celular en el meristemo radicular de *ham1-1* se mantenía un poco más respecto a las plantas control, a pesar de la inducción de daño a su DNA por DSBs. Lo que nos llevó a determinar era si la diferencia en la proliferación se daba porque la mutante *ham1-1* era más resistente al tratamiento de inducción de DSBs, o porque la capacidad de la mutante de responder ante este daño se estaba viendo comprometida. Para ello fue necesario comparar el comportamiento que exhibía *ham1-1* con el de otras mutantes que tuvieran defectos para reparar DSBs; se han documentado muchas líneas mutantes con esa deficiencia, así que parte del problema fue elegir con cual(es) comparar a *ham1-1*. Dado que no sabíamos en que punto de la respuesta al daño al DNA podía estar participando *HAM1*,

se consideró que lo más adecuado era comparar a *ham1-1* con mutantes que tuvieran alterada la vía de respuesta ante el daño al DNA desde los primeros niveles de la respuesta, como son las mutantes *atm-2* y *atr-2*, que carecen de la función de ATM y ATR.

La respuesta al daño al DNA está mediada principalmente por dos proteínas cinasas altamente conservadas: ATM y ATR (Figura 8). En general ATM se induce durante las rupturas de doble cadena mientras que ATR se activa durante las rupturas de cadena sencilla (Bleuyard *et al.* 2006). Cuando ocurre el daño al DNA, estas cinasas inician una cascada de señalización que lleva en primer lugar al arresto del ciclo celular (Fase 1), a la activación de los mecanismos de reparación del daño (Fase 2) (Bleuyard *et al.* 2006) y, en caso de ser necesario, al inicio de la muerte celular programada en respuesta al daño al DNA (Fase 3) (Fulcher y Sablowski 2009, Game y Mortimer 1974). La comparación del crecimiento radicular (Figura 19) y del tamaño de los meristemas (Figuras 21 y 22) nos indica que, al igual que *ham1-1*, la mutante *atm-2* presenta una mayor proliferación celular bajo condiciones de inducción de DSBs, aunque en el caso de *atm-2*, es más notorio la falta de detención de la proliferación que en el caso de *ham1-1*; sin embargo, el que *ham1-1* tenga un comportamiento similar al de la mutante *atm-2* sugiere que se requiere de *HAM1* al igual que de *ATM* para que se lleve a cabo la detención de la proliferación celular cuando se induce DSBs en el DNA.

El arresto del ciclo celular, es una de las 3 fases de la respuesta al daño al DNA que podría tener un efecto directo en la proliferación de las células meristemáticas. Está bien documentado que la mutante *atm-2* no induce el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA (Culligan *et al.* 2006), así que consideramos adecuado emplear la misma técnica para determinar si con la mutante *ham1-1* ocurría lo mismo. Para ello realizamos cruza de *ham1-1* con plantas que contenían la construcción pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS (Colon-Carmona *et al.* 1999), la cual se ha demostrado funciona perfectamente como marcador de ciclo celular (Culligan *et al.* 2006). Actualmente ya tenemos líneas que son homocigas tanto para *ham1-1* como para pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS (Figura 25), pero por el momento no nos fue posible realizar pruebas en condiciones de inducción de DSBs; sin embargo creemos que estas líneas podrán aportar información clave acerca del comportamiento del ciclo celular en la mutante *ham1-1*.

La muerte celular programada también podría tener un efecto sobre la proliferación celular en los meristemas. Está reportado que tanto *atm-2* como *atr-2* presentan una disminución drástica en la muerte celular tanto en el meristemo radicular como en el aéreo bajo condiciones de inducción de daño al DNA (Fulcher y Sablowski, 2009). En este trabajo se pudo observar que la muerte celular en el meristemo radicular de *ham1-1* no solo no está disminuida, sino que incluso aumenta, tanto bajo condiciones normales como de inducción de DSBs (Figura 23), lo cual nos indica que a diferencia de *ATM* o *ATR*, *HAM1* ciertamente no participa en la muerte celular programada en respuesta al daño al DNA. Por otra parte, el observar muerte celular en mutantes *ham1-1* sin inducción de daño nos indica que en esta mutante se está acumulando un mayor daño al DNA, lo cual a su vez se traduce en una mayor muerte celular en el meristemo.

Otra técnica con la cual buscamos determinar en qué fase de la respuesta al daño al DNA está participando *HAM1* fue por medio de ensayos semicuantitativos de genes de respuesta al daño al DNA en las plantas *ham1-1*. Como era natural, los primeros genes que revisamos fueron *ATM* y *ATR* (Figura 24) y lo que notamos fue que tanto en la raíz como en la parte aérea de la planta, la expresión de estos dos genes está disminuida en *ham1-1*, estos ensayos nos da una pista importante acerca del rol que desempeña *HAM1* en la respuesta al daño al DNA por DSBs, ya que nos indica que es necesaria la presencia de esta acetilasa para una adecuada expresión de *ATM* y *ATR*.

Para poder determinar qué genes son blanco directo de *HAM1*, es necesario realizar inmunoprecipitaciones de cromatina. Con este fin se realizó la construcción de p*HAM1:HAM1:GFP*, con la cual se transformaron tanto plantas silvestres como plantas *ham1-1*. Los primeros ensayos nos indican que en la raíz, *HAM1* está presente en los núcleos de células que poseen capacidad de proliferación (Figura 27), lo cual es consistente con lo reportado por Sánchez y colaboradores (dato sin publicar), ya que *HAM1* interactúa con proteínas implicadas en la replicación del DNA. La información más interesante que nos puede aportar esta construcción es el poder determinar cuáles son los genes que regula *HAM1* directamente, ya que gracias al marcador de GFP podremos realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para estudiar si *ATM* y *ATR* se regulan directamente por *HAM1*. Pero primero es necesario realizar ensayos para corroborar que nuestra construcción es capaz de complementar el fenotipo observado en la mutante *ham1-1*, especialmente porque nuestra construcción tiene dos

mutaciones, una de las cuales da lugar a un cambio del aminoácido 242, serina, por una prolina.

7 Conclusiones

- *HAM1* participa en la detención de la proliferación celular de los meristemos radiculares bajo condiciones de inducción de DSBs , ya que la mutante *ham1-1* presenta deficiencias en este punto, de manera similar a lo que se presenta con la mutante *atm-2*, aunque no de manera tan drástica. Esto puede estar relacionado con el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA.
- *HAM1* no es necesaria para que se de la muerte celular programada en respuesta al daño al DNA, en realidad parece que se requiere *HAM1* para evitar acumular daño al DNA. Esto se deduce porque la muerte celular en el meristemo radicular de *ham1-1* bajo condiciones de inducción de DSBs es mayor, al contrario de lo que ocurre con *atm-2* y *atr-2*.
- *HAM1* regula directa o indirectamente la expresión de *ATM* y *ATR*. Esto debido a que su expresión está disminuida en la mutante *ham1-1*.
- La localización de la proteína HAM1 es nuclear y se limita mayormente a las células con capacidad de proliferación y parece que es dependiente del ciclo celular, ya que disminuye en las células mitóticas y se vuelve acumular en las células recién divididas.

8 Perspectivas

- Evaluar si hay cambios en el arresto del ciclo celular por inducción de DSBs en la mutante *ham1-1* por medio del marcador de pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS.
- Corroborar que la disminución en la expresión de ATM y ATR en *ham1-1* se da también bajo condiciones de inducción de DSBs y que esta disminución afecta la expresión de otros genes de respuesta a DSBs
- Determinar si la construcción de pHAM1:HAM1:GFP es capaz de complementar a la mutante *ham1-1*.
- Caracterizar cuáles son los genes que HAM1 regula de manera directa, tanto en condiciones normales como bajo inducción de DSBs por medio de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

9 Referencias

- Abeloff MD. 2008. DNA damage response pathway In *Abeloff's clinical oncology*, pp. 145. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier
- Alberts B. 2008. Apoptosis In *Molecular biology of the cell*, pp. 1115. New York: Garland Science
- Avvakumov N, Cote J. 2007. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26: 5395-407
- Bennett T, Scheres B. 2010. Root development-two meristems for the price of one? *Current topics in Developmental Biology* 91: 67-102
- Berdy J. 1980. Bleomycin-Type Antibiotics. In *Amino Acid and Peptide Antibiotics*. CRC Press: 459-97.
- Bleuyard JY, Gallego ME, White CI. 2006. Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA repair* 5: 1-12
- Britt AB. 1996. DNA Damage and Repair in Plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 75-100
- Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G. 1991. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Current Genetics* 20: 309-14
- Campi M, D'Andrea L, Emiliani J, Casati P. 2012. Participation of chromatin-remodeling proteins in the repair of ultraviolet-B-damaged DNA. *Plant Physiology* 158: 981-95
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 20: 503-8
- Costas C, Sánchez M, Stroud H, Yu Y, Oliveros JC, et al. 2011. Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nature structural & molecular biology* 18: 395-400
- Cruz D. 2010. *Participación del gen AGL19 en el establecimiento del meristemo floral y el tiempo de floración*. Tesis de Maestría thesis. UNAM, Mexico D.F. 60 pp.
- Culligan K, Tissier A, Britt A. 2004. ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 1091-104
- Culligan KM, Britt AB. 2008. Both ATM and ATR promote the efficient and accurate processing of programmed meiotic double-strand breaks. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 55: 629-38

- Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB. 2006. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 48: 947-61
- Drury GE, Dowle AA, Ashford DA, Waterworth WM, Thomas J, West CE. 2012. Dynamics of plant histone modifications in response to DNA damage. *The Biochemical Journal* 445: 393-401
- Earley KW, Shook MS, Brower-Toland B, Hicks L, Pikaard CS. 2007. In vitro specificities of Arabidopsis co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* 52: 615-26
- Fulcher N, Sablowski R. 2009. Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 20984-8
- Game JC, Mortimer RK. 1974. A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation research* 24: 281-92
- Garcia V, Bruchet H, Camescasse D, Granier F, Bouchez D, Tissier A. 2003. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant Cell* 15: 119-32
- Hanada K, Sawada Y, Kuromori T, Klausnitzer R, Saito K, *et al.* 2011. Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in Arabidopsis thaliana. *Molecular biology and evolution* 28: 377-82
- Jeong S, Bayer M, Lukowitz W. 2011. Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early Arabidopsis embryo. *Journal of experimental botany* 62: 1687-97
- Smith J. 2001. Tying up Loose Ends: Generation and Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D. 2004. Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annual review of Plant Biology* 55: 141-72
- Latrasse D, Benhamed M, Henry Y, Domenichini S, Kim W, *et al.* 2008. The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in Arabidopsis. *BMC plant biology* 8: 121
- Li L, Jean M, Belzile F. 2006. The impact of sequence divergence and DNA mismatch repair on homeologous recombination in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45: 908-16
- Lodish HF. 2000. Section 12.4 DNA damage and repair and their role in carcinogenesis In *Molecular cell biology*, pp. 473. New York: W.H. Freeman
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, *et al.* 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of

- fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104: 34-41
- Neal KC, Pannuti A, Smith ER, Lucchesi JC. 2000. A new human member of the MYST family of histone acetyl transferases with high sequence similarity to Drosophila MOF. *Biochimica et biophysica acta* 1490: 170-4
- Oguma K, Katayama H, Ohgaki S. 2002. Photoreactivation of Escherichia coli after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6029-35
- Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, *et al.* 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic acids research* 30: 5036-55
- Ramirez-Parra E, Gutierrez C. 2007. E2F regulates FASCIATA1, a chromatin assembly gene whose loss switches on the endocycle and activates gene expression by changing the epigenetic status. *Plant Physiology* 144: 105-20
- Sabbatino V. 2007. Célula. In *Biología Celular y Humana, Guía práctica*: Word Copy
- Salazar GSF. 2011. *Caracterización funcional de AGL17 en el desarrollo radicular de Arabidopsis thaliana*. UNAM, México, Distrito Federal
- Sánchez M, Costas C, Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2012. Regulating DNA replication in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4
- Shishkova S, Rost TL, Dubrovsky JG. 2008. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany* 101: 319-40

Anexo 1

A continuación se muestra la secuencia de *HAMI* (AT5G64610) alineada respecto a la secuencia clonada utilizada para la construcción pHAM1:HAM1:GFP. En la secuencia de AT5G64610, que corresponde el nombre “Secuence_1”, se muestra en azul la sección que corresponde al promotor, en mayúsculas y amarillo la correspondiente a los exones, y en minúsculas y morado las secuencias correspondientes a los intrones. En la secuencia del fragmento clonado, que corresponde el nombre “Secuence_2” se muestran en verde los oligos empleados para la clonación y en rojo las mutaciones, que corresponden a los nucleótidos 709 y 2316. Nótese que el fragmento clonado carece de los últimos 3 nucleótidos del último exón.

Alignment of Sequence_1: [AT5G64610] with Sequence_2: [Clonación_HAM1]

Similarity : 3312/3317 (99.85 %)

```
Seq_1 1      tgatgcaaattggtggtcaaataatgaattaaattaaaatacgtttttccagcttcgca 60
          |||
Seq_2 1      TGATGCAAAATTGTTGGTCAAA TAATGAATTAAATTAATAACGTTTTTCCAGCTTCGTC 60

Seq_1 61      tttcattacatttgagtatctttactttatTTTTgaagaatttagaattgatgatatacg 120
          |||
Seq_2 61      TTTCATTACATTTGAGTATCTTTACTTTATTTTTGAAGAATTTAGAATTGATGATATACG 120

Seq_1 121     aacaagatatttgctcgatgaatcaatcattgttaggtaaaagaatcagccacttcaacacg 180
          |||
Seq_2 121     AACAAAGATATTTGTCGATGAATCAATCATGTAGGTAAAAGAATCAGCCACTTCAACACG 180

Seq_1 181     ttattttccaaaatttgataactaagttttggttgcacccaaaaaaattctgtctgttt 240
          |||
Seq_2 181     TTATTTCCAAAATTTGATAACTAAGTTTTGTTTGTCTCAACCAAAAAAATCTGTCTGTTT 240

Seq_1 241     taaagatttcgctcactcttttctcattttttcttacaattatacaatttcacatcattat 300
          |||
Seq_2 241     TAAAGATTTTCGTCACTCTTTTCTCATTTTTCTTACAATTATACAATTTACATCATTTAT 300

Seq_1 301     tatgaaaaaggatacacgggtgtgtagtagctacaaaaattagaaagatgaatataatgtca 360
          |||
Seq_2 301     TATGAAAAAGGATACACGGTGTGTAGTAGCTACAAAAATTAGAAAGATGAATATATGTCA 360

Seq_1 361     ccaaattaaatcattttatttaattttcccttttagtcaagttgccatataagtatataa 420
          |||
Seq_2 361     CCAAATTAATCATTTTATTTAAATTTTCCCTTTAGTCAAGTTGCCATATAAGTATATAA 420

Seq_1 421     cgtgtttacatgtgaacaactgaaataggaatcaattctatTTTTcttcattcgaatttc 480
          |||
Seq_2 421     CGTGTTTACATGTGAACAACCTGAAATAGGAATCAATTCATTTTTTCTTCATTTCGAATTC 480

Seq_1 481     aaaagtaagtaagtcacacttcaattcataaccgaaaaataaaaagtaattgatagta 540
          |||
Seq_2 481     AAAAGTAAGTAAGTCACACTTCAATTCATAACCGAAAAATAAAAAGTAAATTGATAGTA 540

Seq_1 541     tgtaaaagtaaaacattctttaagaaaaatgagatgtaaaatttcacatacaagatacag 600
          |||
Seq_2 541     TGTA AAAAGTAAAACATTC TTTAAGAAAAATGAGATGTAAAATTTACATACAAGATACAG 600

Seq_1 601     taaagtgaccatgtgaatctTTTTgttcataaaaaatcattttgggttaattctagaggaa 660
          |||
Seq_2 601     TAAAGTGACCATGTGAATCTTTTTGTTCATAAAAAATCATTTTGGTTAATCTAGAGGAA 660

Seq_1 661     catggtgtgcaatctatgaccataacttcaaggacacgatgatgagttgtgttttcgt 720
          |||
Seq_2 661     CATGGTGTGCGAATCTATGACCATAACTTCAAGGACACGATGATGAGTTCGTGTTTTTCGT 720

Seq_1 721     ctttgcttcttggactttgtgatttttgatctgtgaatcttgtgattagtagcaaatca 780
          |||
Seq_2 721     CTTTGCTTCTTGGAAC TTTGTGATTTTTTGATCTGTGAATCTTGTGATTAGTACGAATCA 780

Seq_1 781     taaagccttgtttggctgtttccattcagacaaaaactgactctgtcacttattatt 840
          |||
Seq_2 781     TAAAGCCTTGT TGGCTGTTTCCATTACGACAAAATACTGACTCTGTCACTTATTATT 840
```

Seq_1	841	tatctctcattatctcttttagtthttataaaattgthtgcctactaatcattctthaaa	900
Seq_2	841	TATCTCTCATTATCTCTTTAGTTTTTATAAAATTGTTTGCTCCTACTAATCATCTCTTTAAA	900
Seq_1	901	tgtaacctggcgattataaaactaaacataagccaacagttataaaacgtgtattaacga	960
Seq_2	901	TGTAACCTGGCGATTATAAAACTAAACATAAGCCAACAGTTATAAAACGTGTATTAACGA	960
Seq_1	961	cggtaaagagatthtttgcaccccaaaaaaaaggacggtaagagagacatatagtacaggc	1020
Seq_2	961	CGGTAAGAGATTTTTTGCACCCAAAAAAAAGGACGGTAAGAGAGACATATAGTACAGGC	1020
Seq_1	1021	caattataaagataggcccaattgagcattcaaagttgthattgggccacactcctthcca	1080
Seq_2	1021	CAATTATAAAGATAGGCCCAATTGAGCATTCAAAGTTGTTATTGGGCCACACTCCTTCCA	1080
Seq_1	1081	aatgatgttctthtatccgtatgagaaaaagaatccacccggaaaaaatctccgacccgact	1140
Seq_2	1081	AATGATGTTCTTTATCCGTATGAGAAAAAGAATCCACCCGAAAAAATCTCCGACCCGACT	1140
Seq_1	1141	aaagaaATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGGCTCG	1200
Seq_2	1141	AAAGAAATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGGCTCG	1200
Seq_1	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_2	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_1	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_2	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_1	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_2	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_1	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_2	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_1	1441	CATTACACAGAGTgtatgtcgtttcctcctttctctatctgaaatttgatgaatctagggt	1500
Seq_2	1441	CATTACACAGAGTGTATGTCGTTTCTCTCTATCTGAAATTTGTGAATCTAGGGT	1500
Seq_1	1501	ttatagattggagctgaaatttcgaagaattgaattagaggcctttgcaattcaagttgt	1560
Seq_2	1501	TTATAGATTGGAGCTGAAATTTGAAAGAAATGAATTAGAGGGCTTTGCAATTCAGTTGT	1560
Seq_1	1561	tttgagtatacaactcttgtaaactgcagTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAAG	1620
Seq_2	1561	TTTGAGTATCACAACCTTGTGAACTGCAGTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAAG	1620
Seq_1	1621	CTTGAACAGCTTGACCTTGATTCAGTAGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG	1680
Seq_2	1621	CTTGAACAGCTTGACCTTGATTCAGTAGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG	1680
Seq_1	1681	gtattagccattthttcttcaaagtcttgagctthtctctcctcgtagtttgcaactgaaacat	1740
Seq_2	1681	GTATTAGCCATTTTTCTTCAAAGTCTTGAGCTTTCTCTCCTCCTAGTTTGCACTGAAACAT	1740

Seq_1	1741	agaagtttgtttggtgtaataagGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA	1800
Seq_2	1741	AGAAGTTTGTGTTGTGGTAATAGGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA	1800
Seq_1	1801	GATTGATGAGACTCATGTAGAGGtaaaagtgattggtaagttagttaaactttgttgtgg	1860
Seq_2	1801	GATTGATGAGACTCATGTAGAGGTAAGTGATTGGTTAAGTTAGTTAAACTTTGTTGTGG	1860
Seq_1	1861	ttttagtgaactgtgtggcatgctatatattctgatggtttttcgatattttgtatagGGT	1920
Seq_2	1861	TTTTAGTGAACGTGTGGCATGCTATATATTCTGATGTTTTTCGATATTTGTATAGGGT	1920
Seq_1	1921	CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCCTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC	1980
Seq_2	1921	CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCCTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC	1980
Seq_1	1981	ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT	2040
Seq_2	1981	ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT	2040
Seq_1	2041	CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTTATGAAG	2100
Seq_2	2041	CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTTATGAAG	2100
Seq_1	2101	CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGgtgagcaactgtttttttatcattttagcat	2160
Seq_2	2101	CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGGTGAGCAACTGTTTTTTTATCATTTGTAGCAT	2160
Seq_1	2161	tttaattgttttgtctttacagttattttagtttcacacataccttttatgggtcattc	2220
Seq_2	2161	TTTAATTGTTTTGTCTTTACAGTTATTTTTAGTTTCACACATACCTTTTATGGGTCATTC	2220
Seq_1	2221	ttttacttaagttttgctcaatcgcttttatctatgcagAGGAAATGCGATTTGAAGC	2280
Seq_2	2221	TTTTTACTTAAGTTTGTCTCAATCGTCTTTTATCTATGCAGAGGAAATGCGATTTGAAGC	2280
Seq_1	2281	ACCCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTGTCAATGTTTGAGgtaatagatt	2340
Seq_2	2281	ACCCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTGCCAATGTTTGAGGTAATAGATT	2340
Seq_1	2341	gatgttttcatecttaactgtttgcttttaggcttacgatacttgtttggaaagctaataa	2400
Seq_2	2341	GATGTTTTTCATCCTTAAACTGTTTGCTTTAGGCTTACGATACTTGTGTTGGAAGCTAATAA	2400
Seq_1	2401	atgtatttagaattgaattttcacgacctgggagtttatttgaatatcttacagGTGGA	2460
Seq_2	2401	ATGTATTTAGAAATGAATTTTCACGACCTGGGAGTTTATTTGTAATATCTTACAGGTGGA	2460
Seq_1	2461	TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCCTGTATTCTGGCAAAGTTATTTCTTGA	2520
Seq_2	2461	TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCCTGTATTCTGGCAAAGTTATTTCTTGA	2520
Seq_1	2521	CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTTGTTCCCTGTTCATATTCCTCTGTGAATGTGA	2580
Seq_2	2521	CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTTGTTCCCTGTTCATATTCCTCTGTGAATGTGA	2580
Seq_1	2581	TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGgtatcagcacactttggctcttg	2640
Seq_2	2581	TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGGTATCAGCACACTTTGGCTCTTG	2640

