



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Generación de herramientas moleculares para
el estudio de la localización subcelular de SOG1,
ATM y ATR en plantas.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KAREM SÁNCHEZ MARTÍNEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2024





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesora:** SÁNCHEZ NIETO SOBEIDA

VOCAL: **Profesora:** GUTIÉRREZ VENEGAS GLORIA

SECRETARIO: **Profesor:** PEDROZA GARCÍA JOSÉ ANTONIO

1er. SUPLENTE: **Profesora:** BERNAL GRACIDA LILIA ANGÉLICA

2º SUPLENTE: **Profesor:** GUTIÉRREZ AGUILAR MANUEL

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 104, del Departamento de Bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR:

PEDROZA GARCÍA JOSÉ ANTONIO

SUPERVISOR TÉCNICO:

GUZMÁN CHÁVEZ FERNANDO

SUSTENTANTE:

SÁNCHEZ MARTÍNEZ KAREM

Índice de contenido

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Daño al DNA.....	2
1.2. Respuesta de daño al DNA mamíferos y levadura.....	4
1.2.1. Señalización de la respuesta al daño al DNA en núcleo.....	5
1.2.2. Mantenimiento de la integridad genómica en la mitocondria.....	8
1.3. Mantenimiento de la integridad del DNA en plantas.....	10
1.3.1. Respuesta a daño al DNA en plantas.....	11
1.3.2. Mantenimiento de la integridad en organelos.....	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVO GENERAL.....	18
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1. Material biológico.....	19
5.2. Desinfección y siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
5.3. Extracción de DNA genómico y RNA total de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
5.3.1. Extracción de DNA genómico de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
5.3.2. Extracción de RNA total de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
5.3.3. Síntesis de DNA complementario.....	21
5.4. Reacción en cadena la polimerasa (PCR).....	22
5.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la obtención de los fragmentos codificantes de <i>ATM</i> y <i>ATR</i>	22
5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada.....	24
5.6. Electroforesis y purificación en gel.....	28
5.7. Clonación en pJET1.2/blunt y purificación de plásmido.....	28
5.8. Transformación en células competentes TOP 10.....	29
5.9. Purificación de plásmido.....	29
5.10. Ensayo de restricción.....	30
5.11. Secuenciación de los plásmidos por tecnología de nanopore.....	31
5.12. Ensamble de Gibson.....	32
5.12.1. Obtención de fragmentos para la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i>	34
5.12.2. Ensamble de Gibson de los fragmentos para obtener la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i>	36

5.12.3. Selección de colonias con la construcción con la <i>promSOG1::SOG1-GFP</i> ...	37
5.13. Localización subcelular de SOG1 en protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
5.13.1. Extracción de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
5.13.2. Transformación de protoplastos.....	38
5.13.3 Tinción con MitoTracker® y DAPI.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1. Obtención de la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i>	40
6.1.1. Aislamiento del fragmento de DNA <i>promSOG1::SOG1-GFP</i> y su clonación en el vector pJET1.2/Blunt.	40
6.1.2. Clonación de Gibson para obtener la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i> ..	43
6.1.3. Confirmación de la identidad del vector <i>promSOG1::SOG1-GFP</i> por ensayos de restricción.	45
6.2. SOG1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> muestra triple localización subcelular	47
6.2.1. Localización de SOG1 en cloroplastos.....	47
6.2.2. Localización de SOG1 en mitocondrias.	48
6.2.3. Localización de SOG1 en núcleo.	50
6.3. Identificación y aislamiento de las regiones codificantes de los genes <i>ATM</i> y <i>ATR</i> de <i>A. thaliana</i>	51
6.3.1. Estructura de los genes <i>AtATM</i> y <i>AtATR</i>	51
6.3.2. Aislamiento de las regiones codificantes de <i>AtATM</i> y <i>AtATR</i>	52
6.3.3. Clonación en el vector pJET de los fragmentos codificantes de <i>AtATM</i> y <i>AtATR</i>	56
6.3.4. Secuenciación de los fragmentos clonados.	59
7. DISCUSIÓN.....	60
1. Potencial función más allá del núcleo del factor de transcripción SOG1 y las cinasas ATR y ATM.	60
2. El factor de transcripción SOG1 de <i>A. thaliana</i> presenta localización en mitocondria y cloroplasto.....	60
3. ¿ATM y/o ATR de <i>Arabidopsis</i> coordinan la comunicación entre cloroplasto/mitocondria a núcleo en DDR en organelos?	63
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	65
9. REFERENCIAS.....	66
ANEXO I	71

ABREVIATURAS

AtATM Ataxia Telangiectasia Mutada de *Arabidopsis thaliana*

AtATR Relativo con ataxia-telangiectasia y Rad3 de *Arabidopsis thaliana*

ATG Codón de inicio

ATM Ataxia Telangiectasia Mutada

ATR Relativo a Ataxia Telangiectasia Mutada y Rad-3

AtSOG1 Supresor de la respuesta gamma 1 de *Arabidopsis thaliana*

BER Reparación por escisión de bases

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario

CDKs Cinasas dependientes de ciclinas

CFP Proteína cian fluorescente

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindo

DDR Respuesta al daño de DNA

DNA Ácido desoxirribonucleico

dNTPs Desoxinucleótidos trifosfatos

DSBs Ruptura de doble cadena

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

Fw Forward/Líder

GFP Proteína verde fluorescente

HAP Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HR Recombinación Homóloga

kb Kilo bases

LB Caldo lisogenia

m/v Concentración masa

MES Ácido (2-(N-morfolino)etanosulfónico

MgCl₂ Cloruro de magnesio

mL Mililitro

mM Milimolar

MMR "Mismatch repair"

MS Medio Murashige y Skoog

MW Masa molecular

NER Reparación por escisión de nucleótidos

ng Nanogramos

nM Nanomolar

NHEJ Unión de extremos no homólogos

ONT Oxford Nanopore Technologies

ORF Marco abierto de lectura

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PEG Polietilenglicol

prom Promotor

rDNasa Desoxirribonucleasa

RNA Ácido ribonucleico

RNasa Ribonucleasa

ROS Especies reactivas de oxígeno

rpm Revoluciones por minuto

RT Transcriptasa reversa

Rv Reverse/Reverso

SDS Dodecilsulfato sódico

Ser Serina

SOG1 Supresor de la respuesta gamma 1

SQ serina-guanina

SSB Ruptura de cadena sencilla

ssDNA DNA monocatenario

TFs Factores de transcripción

Thr Treonina

Tris-HCl Clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina

UTR Región no traducida

UV Ultravioleta

xg Gravedades

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Tipos de daño al DNA.....	4
Figura 2. Respuesta de daño al DNA (DDR) en mamíferos y levaduras.	7
Figura 4. Factores endógenos y exógenos que inducen daño al DNA de plantas.....	11
Figura 5. Cascada de señalización de la DDR en meristemos de plantas.....	14
Figura 6. Inestabilidad del genoma de los plastidios.	16
Figura 7. Estrategia de obtención de las regiones codificantes de cDNA de los genes <i>ATM</i> y <i>ATR</i> por fragmentos.	23
Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada.	27
Figura 9. Ensamble de Gibson.	34
Figura 10. Aislamiento y almacenamiento en pJET1.2/Blunt del fragmento <i>promSOG1::SOG1.42</i>	
Figura 11 Obtención de la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i> por ensamble de Gibson.	44
Figura 12. Ensayo de restricción para comprobar el éxito en el ensamble de Gibson en la obtención de la construcción <i>promSOG1::SOG1-GFP</i>	46
Figura 13. Imágenes en microscopia confocal de protoplastos mostrando la localización de SOG1 en cloroplastos.	47
Figura 14. Localización de SOG1 en subcompartimentos dentro del cloroplasto.....	48
Figura 15. Localización de SOG1 con una proteína marcadora de mitocondria.	49
Figura 16. Localización de SOG1 en mitocondrias.	50
Figura 17. Localización de SOG1 en núcleo teñido con DAPI.	51
Figura 18. Mapas de los ORFs de los genes <i>ATM</i> y <i>ATR</i>	52
Figura 19. Estrategia de obtención por fragmentos de los genes correspondientes a las cinasas <i>ATM</i> y <i>ATR</i> a partir de cDNA.	52
Figura 20. Estrategia de obtención de los fragmentos codificantes correspondientes al gen <i>AtATM</i> a partir de cDNA.....	54
Figura 21. Estrategia de obtención de los fragmentos codificantes correspondientes al gen <i>ATR</i> a partir de cDNA.....	55
Figura 22. Ensayo de restricción para comprobar que los fragmentos de cDNA de <i>ATM</i> se hayan clonado en el vector de almacenamiento pJET1.2/Blunt.....	57
Figura 23. Ensayo de restricción para comprobar que los fragmentos de cDNA de <i>ATR</i> se hayan clonado en el vector de almacenamiento pJET1.2/Blunt.	58

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos empleados para aislar el fragmento de DNA *promSOG1::SOG1*.....22

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para aislar el primer y segundo fragmento codificante de *ATM* y *ATR*.....24

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las PCRs anidadas para aislar el segundo fragmento de *ATM* y el primer y segundo fragmento de *ATR*.....26

Tabla 4. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los plásmidos pJET1.2/blunt31

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para obtener la construcción *pSOG1::SOG1-GFP*34

RESUMEN

Las cinasas ATR y ATM se encargan de la activación de las vías de la respuesta al daño al DNA (DDR) y se encuentran conservadas entre eucariotas. ATR inicia la cascada de señalización en respuesta al estallido y colapso de las horquillas de replicación, mientras que ATM está involucrada en la detección de rupturas de la doble cadena (DSBs). Río debajo de ambas cinasas, se activa el factor de transcripción SOG1 el cual regula la respuesta transcripcional, teniendo una función homóloga al factor de transcripción p53 de mamíferos, tomando en cuenta que ambas no poseen secuencias conservadas. A pesar de los avances para comprender la DDR en plantas, se desconoce como ocurre el mantenimiento de la integridad del DNA en los organelos y la señalización retrógrada entre organelos-núcleo para responder a las lesiones en el DNA de cloroplasto y mitocondria. Por lo tanto, en este trabajo se aislaron las regiones codificantes de los genes de SOG1, ATR y ATM de *Arabidopsis thaliana*, con el propósito de generar construcciones de fusiones traduccionales con la proteína GFP. Se logró obtener la construcción promSOG1::SOG1-GFP y se transformaron protoplastos provenientes de hojas de roseta de *Arabidopsis*, este análisis reveló que el factor de transcripción SOG1 tiene localización en cloroplasto y mitocondria, además de su localización nuclear.

Adicionalmente se lograron aislar las regiones codificantes completas de los 2 genes que codifican para las cinasas ATM y ATR, al ser fragmentos de DNA mayores a 8 Kb estos se aislaron en 2 fragmentos que serán fusionados para obtener la región codificante completa. La secuenciación mediante la tecnología de Oxford Nanopore reveló la presencia de splicing alternativo que genera codones de paro anticipado en ATM. Con los fragmentos codificantes aislados será posible obtener las fusiones traduccionales ATR-GFP y ATM-GFP para evaluar si estas cinasas de plantas se localizan en mitocondria y/o cloroplastos, como ocurre con sus contrapartes en mamíferos donde tienen localización mitocondrial y regulan múltiples mecanismos en este organelo. Por lo tanto, los resultados y herramientas moleculares obtenidos en este trabajo, permitirán evaluar nuevas funciones de estos reguladores maestros de la DDR en mantener la integridad del DNA en cloroplasto y mitocondria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Daño al DNA.

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es la unidad básica de la herencia que contiene toda la información genética necesaria para “construir” y mantener las funciones vitales que un organismo requiere. Su composición y estructura química hacen que el DNA sea una molécula muy reactiva y altamente susceptible a modificaciones químicas derivadas de la acción de agentes endógenos y exógenos. Si bien en la naturaleza, los eventos de mutagénesis pueden contribuir a la evolución de los organismos, su incremento junto con alteraciones sobre el DNA puede desencadenar inestabilidad genómica, en específico en mamíferos la acumulación de daño y modificaciones sobre el DNA puede desencadenar la aparición de cáncer o surgimiento de enfermedades hereditarias (Chatterjee & Walker, 2017).

Los agentes que dañan el DNA se pueden clasificar según su origen en endógeno y exógeno. La mayor fuente endógena que induce daño sobre el DNA son las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales comúnmente se forman por el metabolismo *per se* de la células. Por otro lado, las fuentes exógenas que dañan al DNA pueden ser agentes químicos y físicos que pueden estar presentes en el medio ambiente, algunos ejemplos son las radiaciones ionizantes (como los rayos X), sustancias químicas mutagénicas (como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP, que surgen como un subproducto del humo de tabaco) y la luz ultravioleta (UV) proveniente de la luz solar (Chatterjee & Walker, 2017). El DNA también sufre procesos naturales que lo descomponen tales como la alquilación, oxidación y desaminación, que si no se reparan pueden desencadenar mutaciones y también contribuir a la inestabilidad genómica (Carusillo & Mussolino, 2020).

Un daño común sobre el DNA es la ruptura de la cadena sencilla (SSB), el cual puede generarse por múltiples eventos, por ejemplo: por el paro de las horquillas de replicación, por la aparición de aductos en el DNA, por formación de entrecruzamiento intracadenas entre guaninas adyacentes y por la oxidación o alquilación de bases. Lesiones más dañinas sobre el DNA son las rupturas de doble cadena (DSBs) (Carusillo & Mussolino, 2020), este tipo de daño puede provocar la pérdida del material genético por

fragmentación cromosómica y como consecuencia desencadenar la muerte celular, este tipo de daño puede ser generado por radiación ionizante o subproductos metabólicos como ROS, pero también surgen durante la replicación o reparación del DNA (Manova & Gruszka, 2015).

Cuando ocurre una lesión sobre el DNA, esta debe ser reparada antes de continuar con la replicación del material genético y la división celular para así evitar la herencia de mutaciones en las próximas generaciones y/o acumulaciones de alteraciones en el DNA sobre la misma célula. Si el daño al DNA es muy severo y no logra ser reparado adecuadamente la célula puede activar mecanismos de activación de muerte celular programada (Hu et al., 2016; Pedroza-García et al., 2022).

Existen numerosos mecanismos de reparación del DNA que pueden entrar en función, pero esto dependerá del tipo de daño causado (Figura 1). Los DSBs pueden ser reparados por recombinación homóloga (HR) o por la unión de extremos no homólogos (NHEJ); mientras que SSB, sitios AP y algunas bases alquiladas pueden ser reparadas por escisión de bases (BER); cambios causados por la radiación UV puede corregirse mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y los errores de apareamiento de bases ocasionados por las DNA polimerasas pueden corregirse mediante el mecanismo de reparación de errores de apareamiento de bases también conocido como “mismatch repair” (MMR). Todos estos mecanismos se encuentran altamente conservados en la mayoría de las eucariotas (Spampinato, 2017).

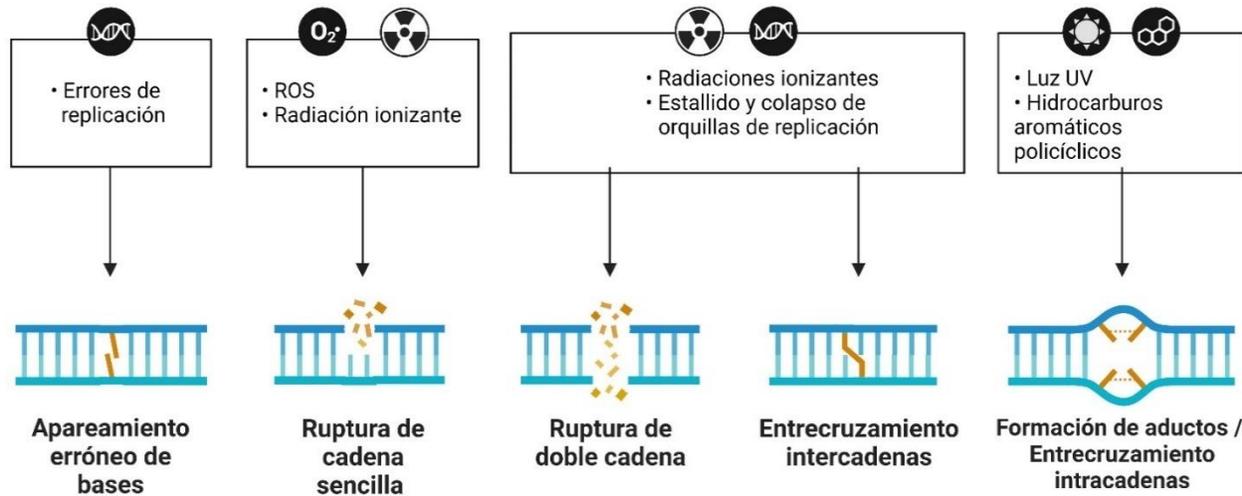


Figura 1. Tipos de daño al DNA. Descripción general de los agentes que dañan el DNA más comunes y las lesiones que le provocan. Se resumen las causas más importantes de daño al DNA (arriba) y las lesiones que inducen (abajo) (Tomada y adaptada de BioRender.com)

1.2. Respuesta de daño al DNA en mamíferos y levadura.

Como se ha mencionado la integridad del genoma de todos los organismos es continuamente retada por múltiples factores endógenos y exógenos que dañan el DNA tanto en el núcleo como en la mitocondria. Por esta razón las células de organismos eucariotas han desarrollado sofisticados sistemas de reparación y tolerancia al daño al DNA, puntos de control de ciclo celular (“checkpoints”) y vías de apoptosis; que en su conjunto participan en mantener la integridad genómica y la sobrevivencia de las células (Carusillo & Mussolino, 2020). Todos estos mecanismos son activados en paralelo a través de redes celulares altamente coordinadas que colectivamente son denominadas Respuesta al Daño del DNA (DNA Damage Response, DDR).

1.2.1. Señalización de la respuesta al daño al DNA en núcleo

En eucariotas, los mecanismos para detectar el daño en el DNA están conservados e involucran a dos proteínas cinasas que tienen una función clave en el inicio de las cascadas de señalización las cuales son ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) y ATR (Relativo a ATM y Rad-3) que son dos proteínas cinasas que pertenecen al grupo de las fosfatidilinositol 3-cinasas. Ambas cinasas desempeñan un papel distinto pero complementario ya que mientras ATM reconoce los DBS, mientras ATR reconoce tanto SSB como el estallido y colapso de la horquilla de replicación, es decir es activada en respuesta a estrés replicativo. ATR y ATM son activadas por diferentes sensores de daño al DNA para desencadenar eventos río abajo (Maréchal & Zou, 2013)

En mamíferos y levaduras, ATM es activado por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) el cual sensa o percibe DSBS. ATM es dirigido al lugar de la DBS por el C-terminal de NBS1 (Amiard et al., 2010). Para su activación ATM se autofosforila en las serinas 367, 1893, 1981 y 2996, una vez activada ATM fosforila cientos de proteínas diana que participan en múltiples mecanismos para mantener la integridad genómica, entre sus principales blancos se encuentra la cinasa transductora CHK2 y el factor de transcripción p53 (Paull, 2015)

ATR es activada cuando la proteína de replicación A (RPA) se une al DNA monocatenario (ssDNA); protegiéndolo de la degradación y permitiendo el reclutamiento de ATR a través de la proteína que interactúa con ATR (ATRIP) (figura 2). A la par, otro grupo de proteínas es requerido por RPA para detectar el SSB el cual comprende a la DNA polimerasa α , RFC (Factor C de replicación RAD-17) y el complejo 9-1-1 (RAD9, RAD1 y HUS1); todo este complejo está involucrado en la activación de ATR (Culligan et al., 2004). De cualquier manera, que sea activada ATR, esta a su vez fosforila cientos de proteínas blanco las cuales muchas de estas son blancos compartidos con la cinasa ATM, sin embargo, a diferencia de ATM, la cinasa ATR activa a la cinasa transductora CHK1 en lugar de CHK2 (Thada & Cortez, 2019). Una vez activada la cinasa CHK1 fosforila y activa la actividad de la cinasa WEE1, la cual inactiva las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), en específico la CDK1 y CDK2. La inactivación de tales CDKs resulta en la activación de puntos de control del ciclo celular (“checkpoints”), deteniendo en específico

la progresión de la fase S y la entrada a la mitosis (Figura 2). En el caso de la cascada de señalización activada por ATM se detiene la progresión del ciclo celular en la interfase G1/S, CHK2 fosforila al factor de transcripción p53 lo cual resulta en su estabilización y activación, resultando en el aumento de la transcripción del gen de la cinasa p21, la cual inhibe complejos CDKs/ciclinas (Figura 2) (Smith et al., 2020).

La proteína MDM2 se une a p53 sin fosforilar contribuyendo a la inhibición de su activación, sin embargo en presencia de daño sobre el DNA, p53 es fosforilado por varias cinasas, incluidas ATR y CHK1, así como ATM y CHK2, lo que contribuye a la activación del factor de transcripción p53, el cual controla la activación de la transcripción de cientos de genes implicados en mecanismos de reparación al DNA, el arresto transitorio de la progresión del ciclo celular, y si el daño es muy severo, la muerte celular con el fin de evitar la transmisión de información genética errónea a la progenie (Nisa et al., 2019) (Figura 2). Por lo tanto, la respuesta a daño a DNA es controlada básicamente por fosforilaciones llevadas a cabo principalmente por las cinasas ATR y ATM, así como por la activación transcripcional desencadenada por p53, por lo que a estas tres proteínas se les conoce como reguladores maestros de la respuesta al daño al DNA. Los defectos en este sistema de vigilancia contribuyen a diversos trastornos en los mamíferos, incluido el cáncer y los defectos del desarrollo, destacando la importancia crucial de una DDR eficiente para la viabilidad tanto de la célula como del organismo (Pedroza-García et al., 2022).

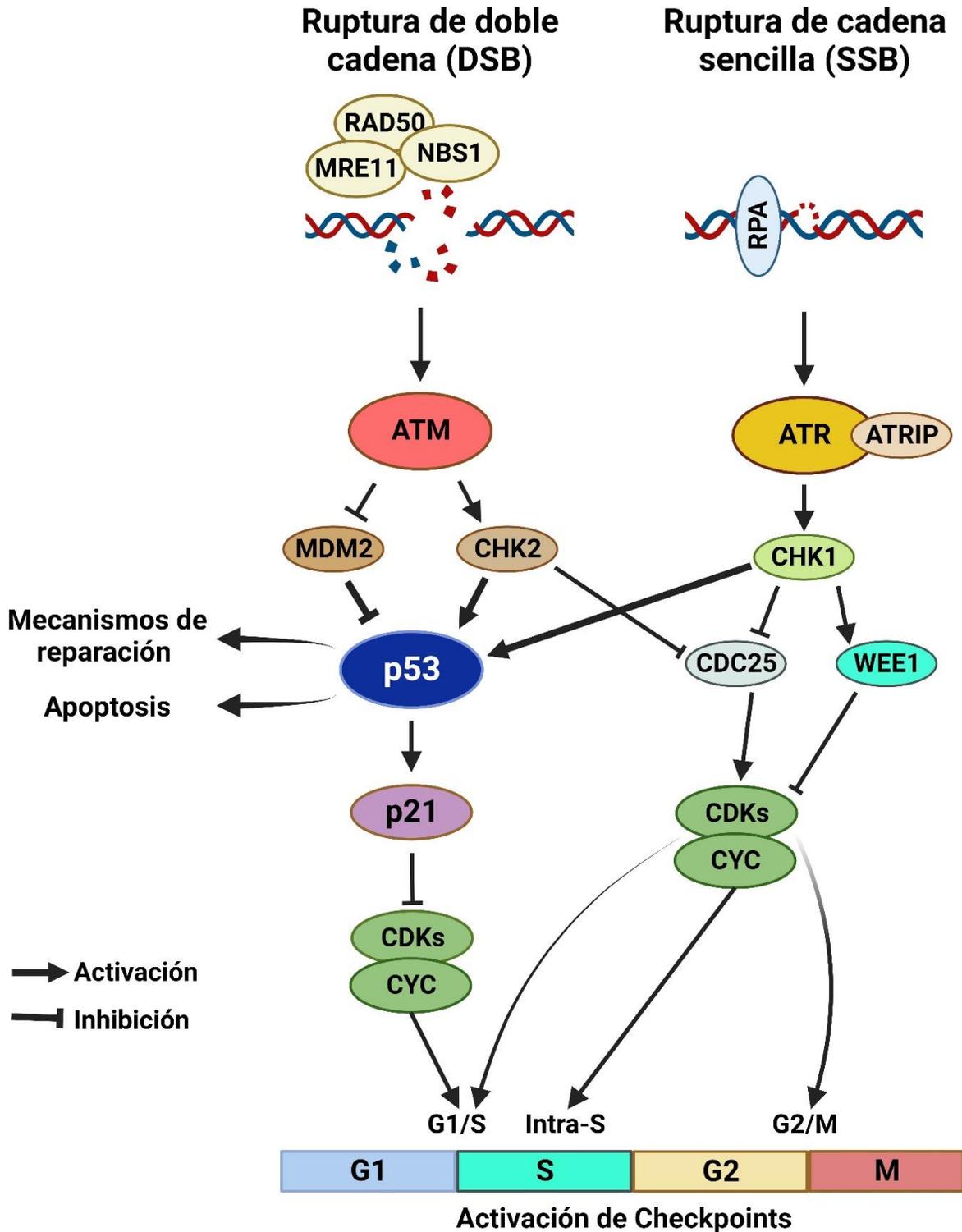


Figura 2. Respuesta de daño al DNA (DDR) en mamíferos y levaduras. Esquema simplificado de puntos de control del ciclo celular de mamíferos activados en respuesta al estrés del DNA. (Tomada y adaptada de Hu et al., 2016)

1.2.2. Mantenimiento de la integridad genómica en la mitocondria.

Además de sus funciones de ATM y p53 en la DDR nuclear, en mamíferos, también se ha reportado evidencia acerca de sus funciones fuera del núcleo, especialmente en el mantenimiento de la integridad del DNA de las mitocondrias (Eaton et al., 2007; Shimura et al., 2017; Wong et al., 2009). Se ha demostrado que ATM controla la respuesta de la mitocondria en presencia de daño en el DNA nuclear (Shimura et al., 2017), además que contribuye a mantener el número de copias de DNA mitocondrial en fibroblastos bajo condiciones normales de crecimiento (Eaton et al., 2007). Para detectar el daño sobre el DNA mitocondrial ocurre la relocalización de proteínas relacionadas a la reparación dentro de la mitocondria, interesantemente tanto ATM como p53 han sido localizados dentro de las mitocondrias (Wong et al., 2009). Estudios recientes han sugerido que p53 contribuye a mantener la integridad del DNA en mitocondria a través de la activación de diferentes mecanismos:

1) Mecanismos dependientes de la regulación transcripcional por p53 de genes que codifican proteínas citosólicas y mitocondriales implicadas en el metabolismo mitocondrial y la respiración, así como de genes de proteínas con actividad antioxidante. Que regulan de manera directa la homeostasis redox de la célula (Mahapatra & Roy, 2020).

2) Regulación a través de mecanismos independientes de la transcripción y que ocurren fuera del núcleo. Inicialmente se mostró que en respuesta a estrés una fracción de proteína p53 se localizó en la mitocondria para mediar la apoptosis, demostrando que p53 participa en la inducción de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) mediante su interacción física con proteínas con actividad antiapoptótica como Bcl2, BclxL y Mcl-1. Además, el mayor resultado fisiológico de MOMP mediada por p53 es la liberación del citocromo C, lo cual deja la activación de caspasas, lo cual puede desencadenar la mitofagia, cuyo propósito es la eliminación de mitocondrias dañadas para evitar la acumulación de ROS (Figura 3) (Chipuk et al., 2004; Comel et al., 2014; Taylor et al., 2008). En respuesta a estrés oxidativo p53 se acumula en la matriz mitocondrial y se une directamente a ciclofilina D (cyD), regulador clave del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, cuya apertura induce necrosis.

Acorde con estos hallazgos, también se ha demostrado que p53 puede cambiar el estado de oligómero de la proteína de membrana interna conocida como VDAC, lo cual también desencadena la liberación del citocromo C (Nakagawa et al., 2005; Tu et al., 2009).

Un importante mecanismo con el que p53 contribuye a mantener directamente el genoma mitocondrial es a través de su translocación a la matriz mitocondrial para interactuar directamente con el DNA mitocondrial con proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del DNA de este organelo (Park et al., 2016). En los mecanismos de reparación de mitocondria como escisión de bases (BER), mismatch repair (MMR), unión de extremos no homólogos (NHEJ) y en la recombinación homóloga, p53 está involucrado (Park et al., 2016). Por lo tanto, p53 tiene una influencia muy amplia sobre la integridad y función mitocondrial, superando lo que se pensaba de su capacidad única para inducir transcripcionalmente la apoptosis mitocondrial (Wang et al., 2014).

Por otra parte, también se ha descrito el papel de la cinasa ATM para la regulación y mantenimiento de la mitocondria. ATM es activada por la generación de ROS en las mitocondrias, sugiriendo que esta cinasa podría estar actuando como un sensor para regular la homeostasis de ROS en la célula (Figura 3). La caracterización de células provenientes de pacientes con ataxia telangiectasia, así como de líneas celulares de ratón con deficiencia de ATM, reveló un papel de ATM en la modulación de la expresión y función de los genes mitocondriales (Lee & Paull, 2020).

Interesantemente, se ha descrito que ATM es requerida para lograr la transferencia de mitocondrias provenientes de células sanas a células adyacentes con daño al DNA mitocondrial, esto se logra de manera dependiente de la formación de estructuras de microtúbulos entre las dos células para lograr la transferencia de mitocondrias. La señalización intercelular y la transferencia de mitocondrias es dependiente de una cinasa ATM funcional (Lee y Paull, 2020). Estos procesos de supervivencia de las células permiten mantener la integridad normal del tejido (Jin & Cordes, 2019).

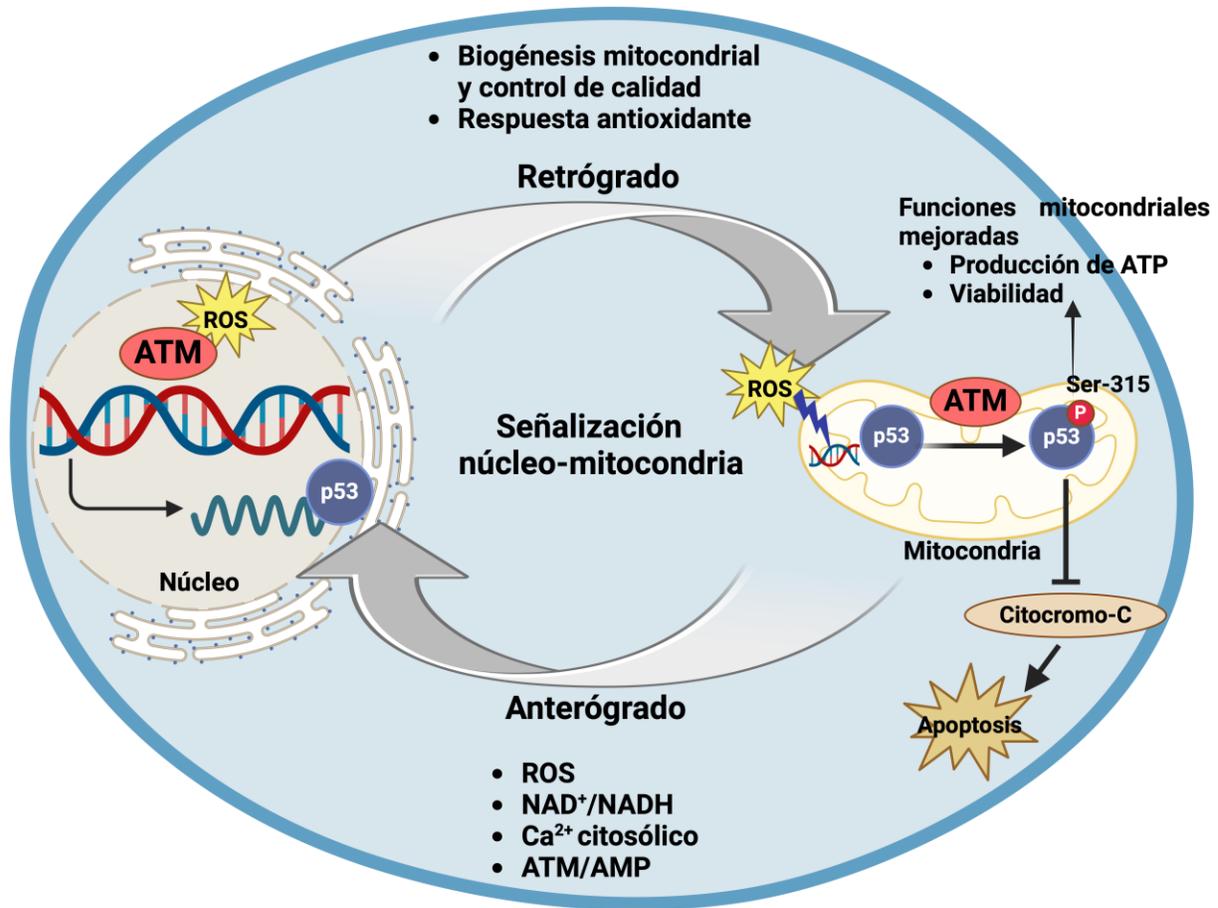


Figura 3. Señalización núcleo-mitocondria en respuesta a daño al DNA en mamíferos y levaduras. La generación de ROS induce daño al DNA en el núcleo y mitocondria desencadenando la señalización en ambos sentidos. Los genes involucrados en mantener la integridad del genoma mitocondrial son codificados en el núcleo; por lo que reguladores de la DDR se translocan a la mitocondria en respuesta a estrés genotóxico para contribuir en la activación de diferentes mecanismos. (Tomada y adaptada de Saki & Prakash, 2017)

1.3. Mantenimiento de la integridad del DNA en plantas.

Debido a su naturaleza sésil y a su dependencia obligatoria de la luz solar para realizar fotosíntesis, las plantas están ampliamente expuestas a diversos factores de estrés ambiental, como la alta radiación solar por luz UV, radiaciones ionizantes, sequía, temperaturas extremas, salinidad del suelo y otros diversos contaminantes del suelo, incluidos metales pesados (Figura 4). Junto con estos agentes exógenos, algunos factores endógenos, como las ROS, que frecuentemente se generan en el cloroplasto y las mitocondrias como subproducto metabólico, a menudo inducen diversas formas de lesiones del DNA y, por lo tanto, afectan la estabilidad del genoma en las plantas (Figura

4) (Pedroza-Garcia et al., 2022 ; Nisa et al., 2019). Aunque la carcinogénesis no ocurre en plantas, el daño del DNA puede conducir a la inhibición del crecimiento y a defectos de desarrollo lo que finalmente puede tener un impacto negativo en la producción de especies de interés agronómico (Hu et al., 2016; Pedroza-García et al., 2022).

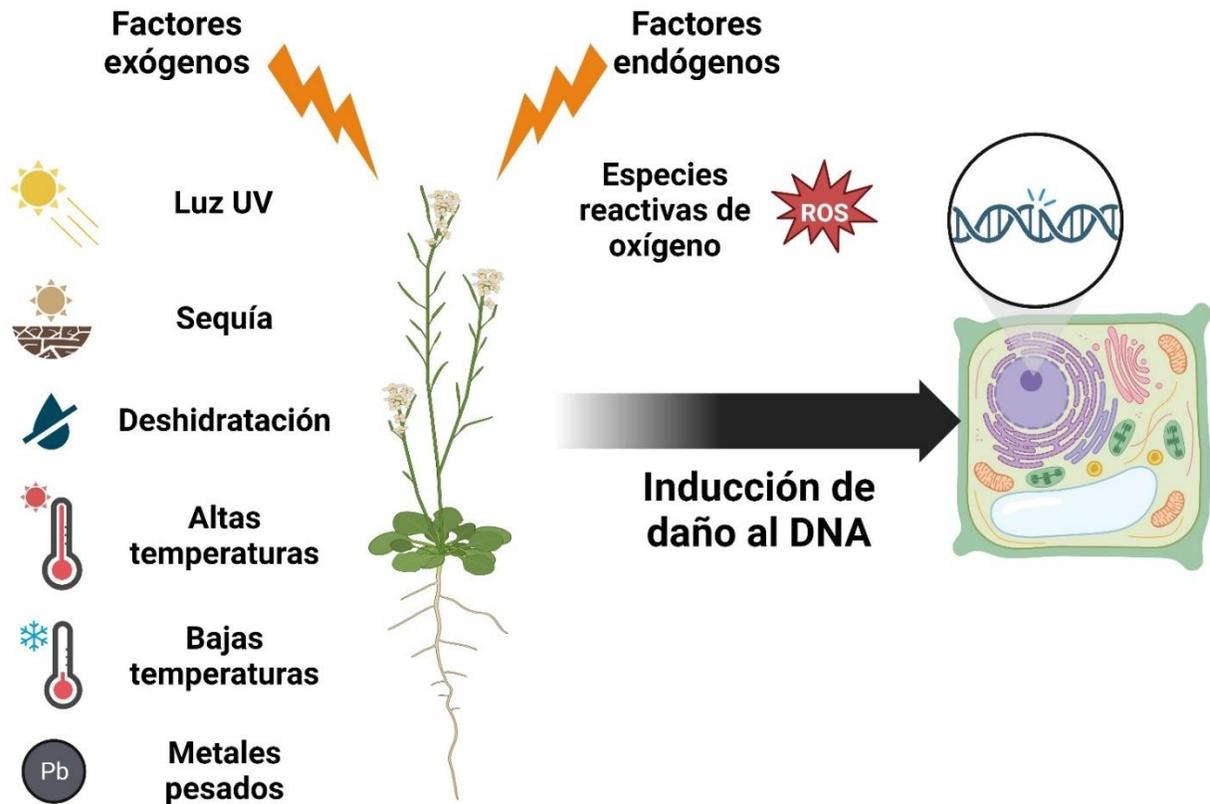


Figura 4. Factores endógenos y exógenos que inducen daño al DNA de plantas. El DNA de las plantas está constantemente dañado por el estrés ambiental. Por lo que las plantas también inducen las vías de DDR para protegerse (Tomada y adaptada de Mahapatra & Roy, 2020)

1.3.1. Respuesta a daño al DNA en plantas.

A diferencia de los mamíferos, en las plantas el desarrollo es post-embriionario, por lo que generalmente todas las células se originan del nicho de células troncales las cuales se localizan en los meristemos de las plantas (figura 5). Mantener la integridad del genoma en células meristemáticas resulta de vital importancia ya que al tener una alta tasa de proliferación son propensas a la generación de daño sobre el DNA, si este daño no es correctamente separado se transmitirá la mutación a las siguientes generaciones, por estas razones la DDR en células meristemáticas debe ser muy eficiente, los mecanismos

de la DDR hasta la fecha han sido caracterizados mayoritariamente en células meristemáticas (Nisa et al., 2019; Pedroza-García et al., 2022).

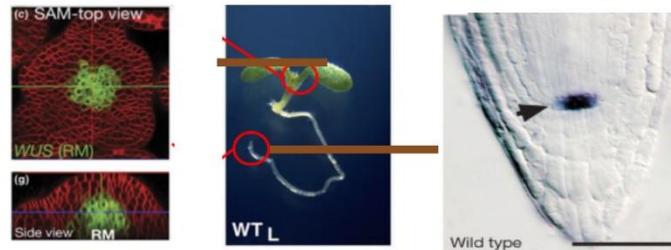
En plantas, al igual que en otros eucariotas, las vías de la DDR contienen varios componentes reguladores clave, incluidos sensores de daño del DNA, transductores de señales, mediadores y efectores; sin embargo, en las plantas, la cascada de respuesta al daño del DNA divergió río abajo de las cinasas transductoras ATM y ATR, sin embargo, las proteínas efectoras que participan directamente en los mecanismos de DDR están conservadas entre los organismos eucariotas (Pedroza-García et al., 2022).

A inicios de la década de 2000, los genes homólogos de *ATR* y *ATM* de *Arabidopsis* se identificaron basándose en la conservación de su secuencia con sus homólogos en mamíferos y levaduras, lo que permitió a su vez aislar y caracterizar plantas mutantes para cada cinasa (García et al., 2003; Culligan et al., 2004), revelando que ATM es requerida para la respuesta a DSBs y ATR principalmente participa en la respuesta a estrés replicativo al igual que en otros eucariotas. El papel del complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBS1) para reconocer la DSBs así como el papel de RPA para activar ATR también están conservados (Figura 5) (Pedroza-García et al., 2022). Sin embargo, las plantas carecen de genes ortólogos para las cinasas transductoras CHK1/2 de la señal de daño y para el factor de transcripción p53, los cuales actúan en sentido descendente de ATM y ATR en levadura y mamíferos (Figura 5) (Hu et al., 2016). En su lugar, las plantas poseen un conjunto de proteínas específicas que detienen el ciclo celular en respuesta al daño del DNA, incluido el factor de transcripción llamado Supresor de la respuesta gamma 1 (SOG1), el cual regula la respuesta transcripcional exhibiendo una función homóloga al factor de transcripción p53 de mamíferos (Yoshiyama et al., 2009) SOG1 pertenece a la familia de factores de transcripción con dominio NAC (NAM, ATAF1/2 y CUC2), este factor de transcripción se activa por la fosforilación de motivos conservados serina-guanina (SQ) C-terminales en respuesta a daño al DNA de manera dependiente de ATM (Yoshiyama et al., 2013) y/o ATR (Sjogren et al., 2015). La cascada de señalización desencadenada por ATR-SOG1 y ATM-SOG1 en respuesta a daño en el DNA nuclear activa la transcripción de cientos de genes blancos directos de SOG1 (Bourbousse et al., 2018; Ogita et al., 2018), los cuales están involucrados en

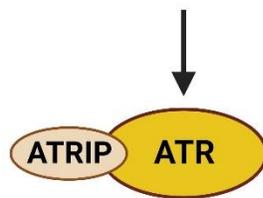
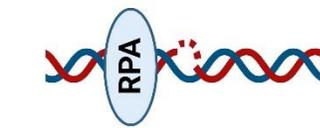
mecanismos de reparación del DNA, arresto transitorio del ciclo celular, y si el daño es muy severo la muerte celular, los mismos mecanismos que son activados en la DDR en mamíferos (Hu et al., 2016). Adicionalmente en plantas también se induce la endoreduplicación (Figura 5), el cual es la replicación del genoma sin que ocurra división celular, la activación de este mecanismo comúnmente se asocia con la diferenciación del nicho de células troncales también conocidos como meristemos en plantas (Nisa et al., 2019). El arresto transitorio del ciclo celular depende en qué fase se produce el daño al DNA, el estrés replicativo activa un punto de control intra-S dependiente de SOG1 y WEE1 (Figura 5) (Hu et al., 2016), SOG1 también activa un grupo de genes específicos de plantas entre los que se encuentra los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina de la familia SIAMESE-RELATED (SMR), en respuesta a daño a DNA principalmente se inducen SMR5 y SMR7 (Yi et al., 2014).

A pesar de que en los recientes años se han tenido importantes avances en la comprensión de la DDR en plantas, aún se desconocen muchos de los actores claves en la cascada de señalización, sus funciones y aspectos sobre la regulación de esta respuesta. Adicionalmente, recientes hallazgos han revelado que los puntos de control (también conocidos como “checkpoints”) en respuesta al daño del DNA también son requeridos durante los procesos de desarrollo, en las vías de señalización retrógrada (mitocondria/cloroplasto-núcleo), así como en respuesta a estreses bióticos y abióticos, incluida la toxicidad por metales, el frío, la salinidad y la deficiencia de fósforo (Pedroza-García et al., 2022). Además, el estudio de la DDR más allá de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ha revelado aspectos específicos en especies con interés agronómico como cebada, arroz y maíz (Szurman-Zubrzycka et al., 2019; Zhang et al., 2020; Pedroza-García et al., 2021). Por ejemplo, a diferencia de las mutantes *atr* de *Arabidopsis* donde no se afecta el desarrollo, en las mutantes de maíz muestran un número reducido de semillas y de menor tamaño, esto último debido a afectaciones en el desarrollo del endospermo (Pedroza-García et al., 2021). Estos resultados revelaron que la DDR podría diferir su función dependiendo del tejido y etapa de desarrollo de la planta en la que se estudie.

Mantenimiento del nicho de células troncales (meristemos)



Ruptura de cadena sencilla (SSB)



WEE1

Cientos de genes

Activación de la transcripción

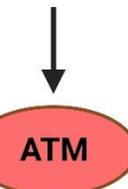
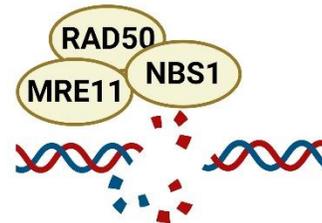
Control del ciclo celular

Endociclo

Apoptosis

Mecanismos de reparación

Ruptura de doble cadena (DSB)



→ Activación

⊣ Inhibición

- - → Activación hipotética

Figura 5. Cascada de señalización de la DDR en meristemos de plantas. El mantenimiento de la información genética en células meristemáticas es crucial para la sobrevivencia de las plantas. Esquema simplificado de señalización de la DDR en plantas; donde en respuesta al daño del DNA, se activan las cinasas ATM y/o ATR. ATM se activa en respuesta a DSBs, mientras que ATR en presencia de SSB y estrés de replicación, ambas cinasas fosforilan y activan SOG1, induciendo la transcripción de genes implicados en múltiples mecanismos para mantener la integridad del DNA (Tomada y modificada de Hu et al., 2016).

1.3.2. Mantenimiento de la integridad en organelos.

Hasta ahora es bien conocida la relevancia y funciones de las cinasas ATM y ATR, y del factor de transcripción SOG1 en la señalización de la DDR para mantener la integridad del genoma nuclear. Sin embargo, sus funciones en las vías de señalización retrógrada (mitocondria/cloroplasto-núcleo) para mantener la integridad del DNA organelar han sido poco exploradas. En plantas, las mitocondrias y los cloroplastos son la fuente de energía celular para permitir el adecuado desarrollo y crecimiento, por lo que comprender como se mantiene la integridad de sus genomas es primordial (Pedroza-García et al., 2022).

Aunque en las plantas se sabe que la función óptima del cloroplasto y la mitocondria es decisiva para la progresión del ciclo celular de acuerdo con las demandas de energía, el diálogo entre los cloroplastos / mitocondrias y el núcleo se ha explorado poco (Pedroza-García et al., 2016). Hallazgos recientes sugieren un papel relevante de SOG1 y probable ATM en la respuesta al daño del DNA de los organelos (Duan et al., 2020). Probablemente SOG1 detecta la inestabilidad del genoma de los plastidios a través de la señalización de ROS (figura 6). De hecho, se ha demostrado previamente que la producción de ROS en organelos activa ATM y DDR (Yi et al., 2014), en específico induciendo la entrada temprana a la endoreduplicación e induciendo el arresto del ciclo celular (Figura 6).

La alteración en la función del cloroplasto induce la expresión de genes blancos de SOG1 (Benhamed et al., 2014), algunos de los cuales podrían estar involucrados en la protección o reparación del DNA de organelos. Estos datos sugieren que las vías de señalización retrograda son activadas por daño al DNA del cloroplasto para desencadenar la actividad de SOG1 y probablemente ATM (Duan et al., 2020). Asimismo, se había reportado que el amino terminal de ATM podría estar interactuando con RUG3, una proteína mitocondrial, y que esta interacción ocurría en el interior del organelo (Su et al., 2017). Sin embargo, la proteína que había sido identificada como ATM en este estudio no corresponde al ID del gen correcto, por lo que determinar si ATM y/o SOG1 transloca a mitocondria y/o cloroplasto permanece para ser determinado.

En trabajos previos ha sido reportado que las plantas mutantes *atr*, *atm* y *sog1* de *Arabidopsis* muestran sensibilidad a Ciprofloxacina, un inhibidor específico de la DNA girasa de organelos el cual genera DSBs (Pedroza-García et al., 2019; Duan et al., 2020),

revelando que estos componentes de la DDR son requeridos para la tolerancia de la planta al daño a DNA en organelos. No obstante, aún no se ha caracterizado detalladamente la función y papel molecular de las cinasas ATM y ATR, y del factor de transcripción SOG1 en la señalización retrógrada para salvaguardar la integridad de los genomas de los organelos.

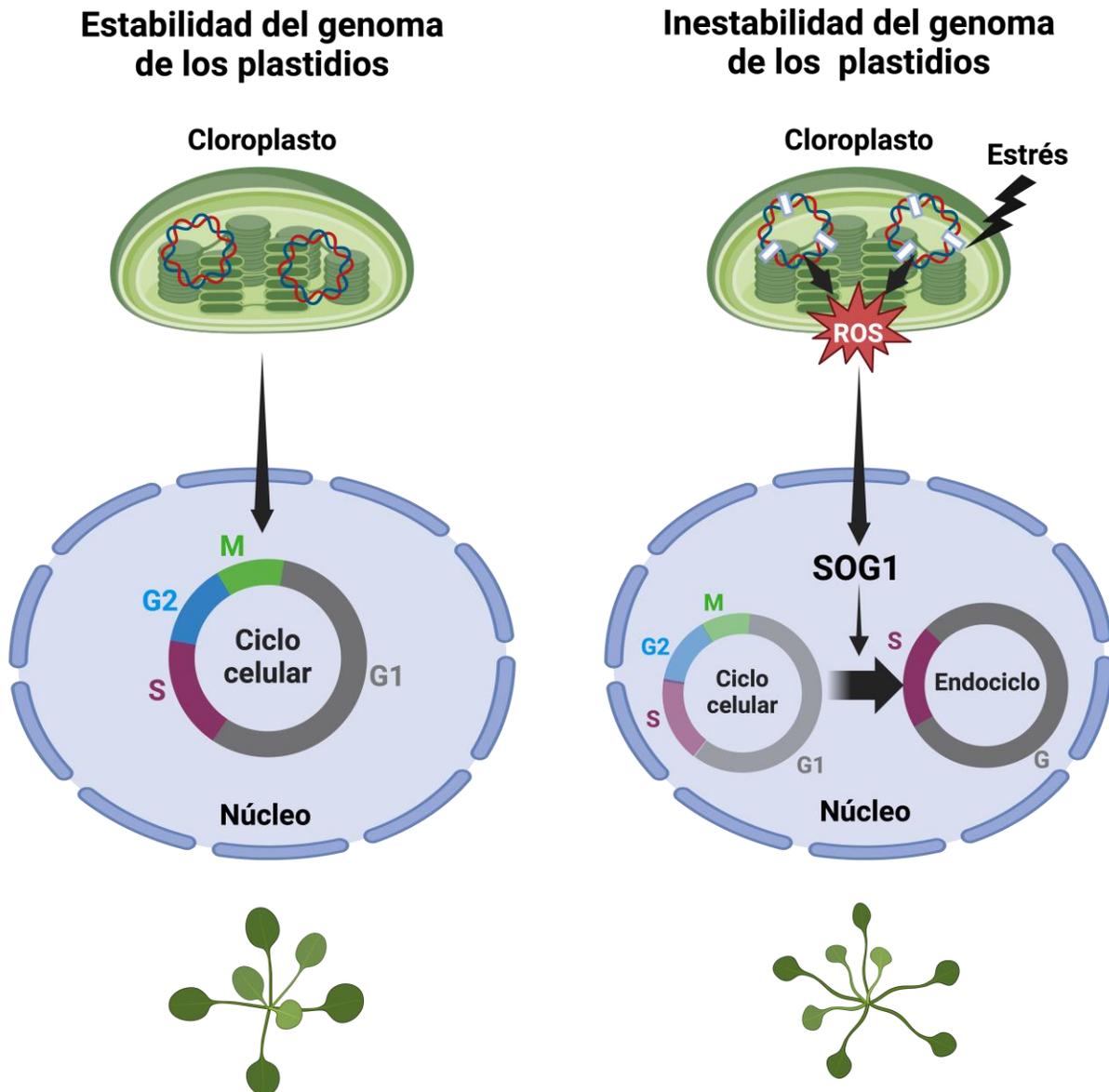


Figura 6. Inestabilidad del genoma de los plastidios. Se muestra que la inestabilidad del genoma de los plastidios modula la endoreduplicación y la progresión del ciclo celular mediante la señalización retrógrada del plastidio al núcleo a través de la vía mediada por SOG1, que es necesaria para el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Tomada y modificada de Duan et al., 2020)

2. HIPÓTESIS

Se ha descrito que en mamíferos y levaduras que el factor de transcripción p53 y la cinasa ATM, ambos reguladores maestros de la respuesta al daño al DNA nuclear, son también localizados en las mitocondrias para participar en el mantenimiento de este organelo. La generación de herramientas moleculares para determinar la localización subcelular en plantas de la cinasa ortóloga ATM y el factor de transcripción con función análoga a p53 conocido como SOG1, nos permitirá determinar si estos reguladores maestros involucrados en mantener la integridad del DNA se localizan en mitocondria y/o cloroplasto en las plantas.

3. OBJETIVO GENERAL

Generar herramientas moleculares que nos permitan determinar la localización subcelular del factor de transcripción SOG1 y de las cinasas ATR y ATM de *Arabidopsis thaliana*.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar por PCR el fragmento de DNA que incluya el promotor y el ORF del gen *SOG1*
- Aislar por RT-PCR las regiones codificantes de los genes *ATR* y *ATM*
- Generar la construcción que contenga la fusión traduccional *pSOG1::SOG1-GFP*
- Estandarizar las condiciones para la generación de protoplastos de hojas de *Arabidopsis* y de expresión transitoria en los protoplastos generados.
- Determinar la localización subcelular de SOG1 en mitocondrias y cloroplastos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico.

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (ecotipo Columbia) donadas por el Dr. Javier Plascencia de la Parra.

5.2. Desinfección y siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas se desinfectaron con una solución acuosa compuesta por hipoclorito de sodio comercial (20 %) y Tritón X-100 (0.025 %) durante 15 min y en agitación constante. Posteriormente, en la campana de flujo laminar, se decantó la solución desinfectante para enjuagar las semillas con 1 mL de agua desionizada estéril. Este último paso se repitió dos veces más.

Las semillas se sembraron en placas Petri cuadradas con medio MS 0.5X (Murashige & Skoog, Duchefa Biochemie) con 1.0 % de agar y se vernalizaron por 48 h a 4°C en oscuridad. Para la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas las cajas se transfirieron a una cámara de crecimiento en condiciones de fotoperiodo largo (16 h luz / 8 h oscuridad).

5.3. Extracción de DNA genómico y RNA total de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

El fin de la extracción del DNA genómico de plantas de *A. thaliana* fue para aislar el fragmento de DNA de 4,414 pares de bases (pb) mediante la PCR, este fragmento contiene la región promotora y el marco de lectura abierto de *SOG1*, este fragmento lo nombraremos como *promSOG1::SOG1* en este trabajo.

La región de los genes *ATR* y *ATM* es bastante grande de 11,171 pb y 27,265 pb respectivamente, para obtenerse por medio de la PCR usando DNA genómico. Por lo tanto, se extrajo el RNA total de plántulas para preparar el DNA complementario (cDNA), el cual se utilizó como templado para aislar en dos fragmentos las regiones codificantes, las cuales posteriormente serán fusionadas por reacciones de Gibson.

5.3.1. Extracción de DNA genómico de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Se recolectaron 5 plántulas Col-0 de 14 días de crecimiento en un microtubo de 1.5 mL. El tejido se congeló en nitrógeno líquido para facilitar su macerado con un pistilo estéril; inmediatamente se añadió 1 mL de amortiguador de extracción (200 mM de Tris-HCl pH 7.5, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA pH 8 y SDS al 0.5 % y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó a un nuevo tubo de microfuga de 1.5 mL, evitando el transvase de residuos de tejido, para posteriormente ser centrifugado con las condiciones previamente mencionadas. Se tomaron 300 µL del sobrenadante resultante para transferirlo a un tubo limpio de microfuga y se añadieron 300 µL de isopropanol los cuales se mezclaron perfectamente en vórtex; la mezcla se incubó durante 1 h a -20°C. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante, en este paso se pudo observar un botón en el fondo del tubo de microfuga al cual se le realizó un lavado con etanol al 70 %; se centrifugó y se eliminó la mayor cantidad de etanol sin afectar la integridad del botón. La muestra se secó a 37°C por 1 h para eliminar residuos del etanol. Pasado el tiempo de secado, el botón se disolvió en 100 µL de H₂O desionizada estéril. Antes de su uso para la PCR, se almacenó la muestra a 4°C por una noche para que precipitaran todas las impurezas que pudieron haber quedado.

5.3.2. Extracción de RNA total de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

En microtubos de 1.5 mL se recolectó un aproximado de 50 mg de plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de 14 días. El tejido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarse a -70°C hasta su procesamiento.

Para la extracción del RNA total se utilizó el kit NucleoSpin RNA (MACHEREY-NEGEL, catálogo 740955.50) siguiendo las instrucciones de manufactura que se describen a continuación:

Las muestras del tejido fueron perfectamente congeladas con nitrógeno líquido para ser maceradas con un pistilo estéril hasta que se obtuvo un polvo fino; al cual se le añadieron 350 µL de amortiguador de lisis (350 µL de amortiguador RA1 + 3.5 µL de β-mercaptoetanol) y se mezcló completamente; la mezcla se decantó en una columna de

filtración (proporcionada por el fabricante) y se centrifugó por 1 min a 11,000 rpm. Al sobrenadante se le agregó 350 µL de etanol al 70 % y se homogenizó pipeteando 5 veces. El volumen total de la mezcla se transfirió a una columna de unión a ácidos nucleicos y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 s, después se añadió 350 µL de amortiguador MDB y se centrifugó por 1 min; posterior a ello se agregaron 95 µL de una mezcla de reacción con rDNasa (10 µL de rDNasa + 90 µL de amortiguador de reacción) en el centro de la membrana de la columna y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo se añadió 200 µL de amortiguador RAW2 (para inactivar la rDNasa) y se centrifugó a 30 s por 11,000 rpm, luego se le adicionaron 600 µL de amortiguador RA3 y se centrifugó por 2 min a 11,000 rpm; se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con 250 µL de amortiguador RA3, centrifugando durante 2 min a 11,000 rpm con el fin de secar la columna completamente. Para la elución del RNA se utilizaron 40 µL de H₂O libre de RNasas los cuales se vertieron en el centro de la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 min a 11,000 rpm.

La cuantificación del RNA total se realizó con 1.0 µL de cada muestra utilizando un NANODROP 2000 Thermo Scientific. El RNA obtenido se almacenó a -70°C para su posterior uso.

5.3.3. Síntesis de DNA complementario

Se procedió a preparar el DNA complementario (cDNA) a través de reacciones de transcriptasa reversa (RT) utilizando el ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, catálogo E6560S) sintetizando el cDNA de la siguiente forma:

Se mezclaron 2.0 µL de d(T)₂₃VN (50 µM), 10.0 µL de mezcla de reacción ProtoScript II (2X), 2.0 µL de mezcla de enzimas ProtoScript II (10X) y un volumen de RNA templado para tener una concentración final aproximada de 2.0 µg en la mezcla de reacción. Se agregó la cantidad necesaria de agua libre de nucleasas para llegar a un volumen total de 20 µL.

Posteriormente se programó el termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler para incubar la muestra a 42°C por una hora y después desactivar las enzimas de

reacción a 80°C por 5 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

5.4. Reacción en cadena la polimerasa (PCR)

Para obtener el fragmento codificante de SOG1 se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 1) que abarcaran 1840 pb río arriba del ATG o codón de inicio y todo el marco abierto de lectura (Open Reading Frame, ORF, por sus siglas en inglés), con el fin de obtener una construcción similar a la descrita en Yoshiyama, et. al., 2013, cuya expresión está siendo regulada por su propio promotor.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25.0 µL. Cada reacción se preparó con 12.5 µL de la mezcla de reacción Q5 High-Fidelity 2X, 1.25 µL de los oligonucleótidos Fw_SOG1 y Rv_SOG1 (10 µM), 1.0 µL de DNA genómico y 9.0 µL de H₂O desionizada. Las PCRs se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler.

Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial a 98°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización 10 segundos a 98°C, alineamiento 20 segundos a 55°C y extensión de 3.5 minutos a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 2 minutos a 72°C. Para visualizar el producto de las PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1 %.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos empleados para aislar el fragmento de DNA *promSOG1::SOG1*.

Gen	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido	Longitud (pb)
SOG1	Forward (Fw_SOG1)	5'-CTAGAAAACCCCGAGATG-3'	4,414
	Reverse (Rv_SOG1)	3'-GTCTTAAGCTCGTGGTAG-5'	

5.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la obtención de los fragmentos codificantes de *ATM* y *ATR*.

El primer problema abordado para obtener las regiones codificantes de *ATM* y *ATR* es que su longitud de secuencia genómica es demasiado grande, para el caso de *ATM* es de 27,265 pb y de *ATR* es de 11,171 pb. Por lo que se siguió la estrategia de aislar

únicamente las regiones codificantes o cDNAs que corresponden a 9,042 pb para *ATM* y 8,112 pb para *ATR*. Para lograr aislar las regiones codificantes completas, que aún son muy grandes, se decidió aislar en dos fragmentos de cDNA las regiones codificantes para cada gen, para posteriormente ser fusionados a través de un ensamble de Gibson y obtener las regiones codificantes completas. Para ello se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 2) que fragmentaran en dos la región codificante y una pequeña parte de las regiones no traducida (UTR) 5' y 3' (Figura 7). Debido al bajo nivel de transcrito de ambos genes sólo el primer fragmento de *ATM* se logró amplificar en concentraciones considerables.

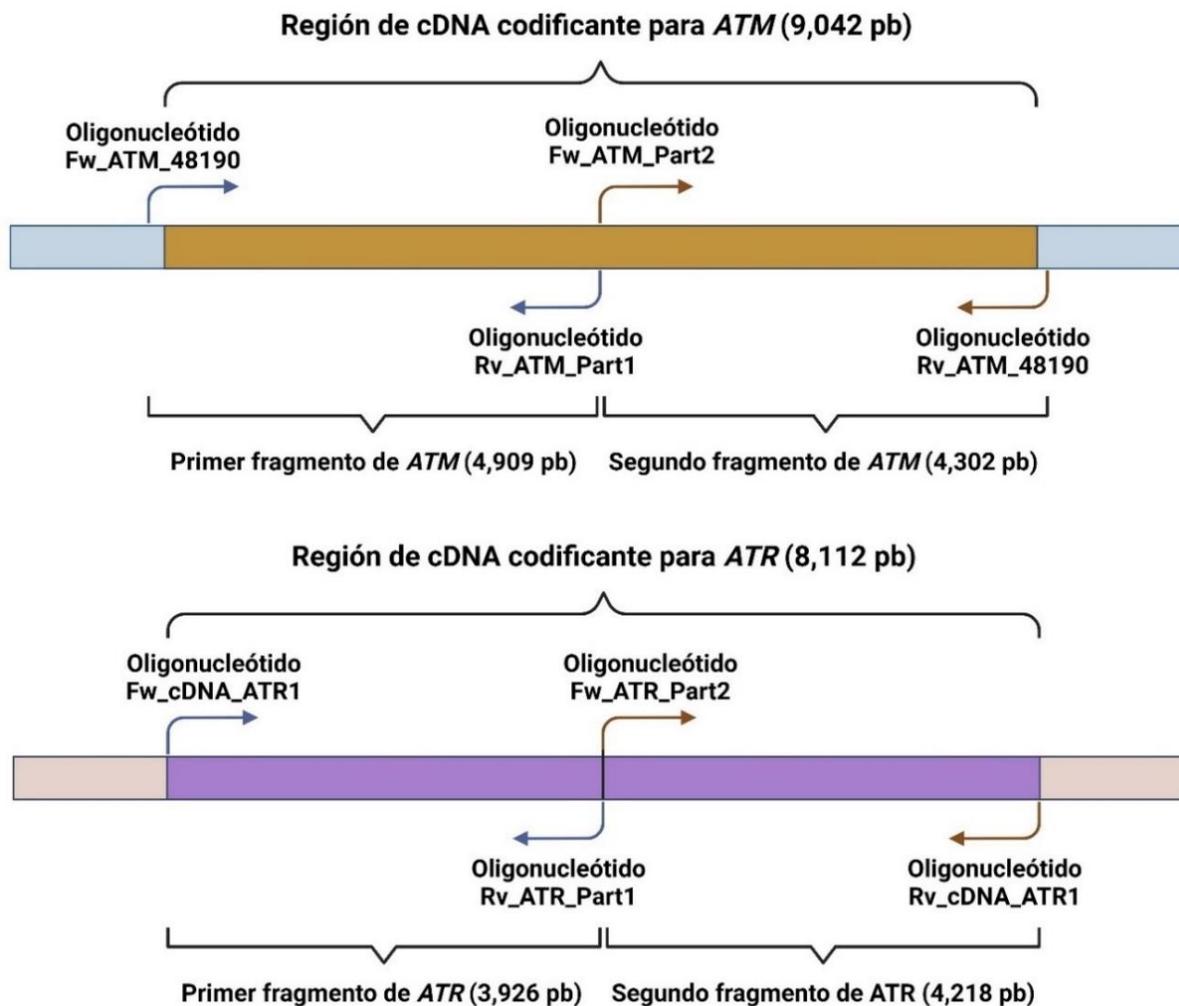


Figura 7. Estrategia de obtención de las regiones codificantes de cDNA de los genes *ATM* y *ATR* por fragmentos. Esquema que muestra la obtención de los fragmentos codificantes del gen *ATM* y *ATR*, así como la localización de los oligonucleótidos utilizados para su aislamiento por fragmentos a través de PCRs convencionales.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50.0 μ L. Cada reacción se preparó con 25.0 μ L de la mezcla PrimeSTAR Max Premix (2X), 1.0 μ L de los oligonucleótidos (10 μ M) para cada fragmento del cDNA, 2 μ L de cDNA y 20 μ L de H₂O desionizada. Las PCRs se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler.

Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos: desnaturalización 10 s a 98°C, alineamiento 10 s a 55°C y extensión de 3.5 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 2 min a 72°C. Para visualizar el producto de las PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1 %.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para aislar el primer y segundo fragmento codificante de *ATM* y *ATR*.

Gen	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido	Longitud (pb)
Primer fragmento de <i>ATM</i>	Forward (Fw_ATM_48190)	5'- ATGGTTGCTTCGAGGGATGT -3'	4,909
	Reverse (Rv_ATM_Part1)	5'- CGTTCTCAGTCAAAGATCTG -3'	
Segundo fragmento de <i>ATM</i>	Forward (Fw_ATM_Part2)	5'- GATGAAGCCGATAGTATGAG-3'	4,302
	Reverse (Rv_ATM_48190)	5'- TTACATCCAAGCTCCCCAG-3'	
Primer fragmento de <i>ATR</i>	Forward (Fw_cDNA_ATR1)	5'- CGATTGTGAAATGGCGAAG-3'	3,926
	Reverse (Rv_ATR_Part1)	5'- AGATCTCCATGTCTGAGAC-3'	
Segundo fragmento de <i>ATR</i>	Forward (Fw_ATR_Part2)	5'- GTCTCAGACATGGAGATCT-3'	4,218
	Reverse (Rv_cDNA_ATR1)	5'-TCATCAGAACCAGGGCATC -3'	

5.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada

Como se mencionó previamente, al no obtenerse altas concentraciones de los fragmentos de las PCRs posterior a la purificación de la banda en gel de agarosa tanto

del segundo fragmento de *ATM*, así como del primer y segundo fragmento de *ATR* se optó por realizar una PCR anidada.

La reacción en cadena de la polimerasa anidada es utilizada cuando se necesita aumentar la sensibilidad y/o especificidad de la PCR, por ejemplo, cuando se requiere amplificar una copia de un gen que se encuentra en muy baja abundancia. En ella se suele utilizar dos reacciones de amplificación secuenciales, cada una con sus respectivos oligonucleótidos. Primero se realiza una reacción con oligonucleótidos externos u “outer” para amplificar una región de DNA más extensa, que contiene el segmento de interés; posteriormente se utiliza el producto de esta amplificación como molde para ejecutar una segunda PCR con oligonucleótidos internos o “inner” que amplifican el fragmento de interés (Green & Sambrook, 2019).

Por lo que se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 3) para seguir la estrategia de la PCR anidada, la cual se describe en la figura 2. Las primeras reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50.0 μL . Cada reacción se preparó con 25.0 μL de la mezcla PrimeSTAR Max Premix (2X), 1.5 μL de cada oligonucleótido externo u “outer” (20 μM correspondiente a cada fragmento del gen), 4.0 μL de cDNA y 18.0 μL de H₂O desionizada. Las PCRs se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cyclers.

Las condiciones de PCR fueron 40 ciclos: desnaturalización 10 s a 98°C, alineamiento 10 s a 55°C y extensión de 3.5 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 2 min a 72°C. El producto de la PCR se utilizó como templado para la segunda ronda de amplificación.

Las segundas reacciones de amplificación, para obtener los fragmentos de interés, se realizaron en un volumen final de 50.0 μL . Cada reacción se preparó con 25.0 μL de la mezcla PrimeSTAR Max Premix (2X), 1.5 μL de cada oligonucleótido interno o “inner” (20 μM) para cada fragmento del cDNA, 10.0 μL del producto de PCR de la primera ronda de amplificación y 12.0 μL de H₂O desionizada. Las PCRs se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cyclers.

Las condiciones de PCR fueron 40 ciclos: desnaturalización 10 s a 98°C, alineamiento 10 s a 55°C y extensión de 3.5 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 2 min

a 72°C. Para visualizar el producto de las PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1 %.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las PCRs anidadas para aislar el segundo fragmento de *ATM* y el primer y segundo fragmento de *ATR*.

Gen	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido	Longitud (pb)
Segundo fragmento de <i>ATM</i>	Forward (Fw_ATM_Part2_Outer)	5'-GAACTTAGTCTCCATGCATG -3'	4,313
	Reverse (Rv_ATM_Part2_Outer)	5'-TCCCATCCTAAGCTAGACA-3'	
	Forward (Fw_ATM_Part2_Inner)	5'-GTCAGATCTTTGACTGAGAAC-3'	4,175
	Reverse (Rv_ATM_Part2_Inner)	5'-GGAAGCATATAGAAGGTTGGT-3'	
Primer fragmento de <i>ATR</i>	Forward (Fw_ATR_Part1_Outer)	5'- TGGAGCGAGAGAGCTTCT-3'	3,747
	Reverse (Rv_ATR_Part1_Outer)	5'- CTCCTAAAGATGGTATGCTAGG-3'	
	Forward (Fw_ATR_Inner_Part1)	5'- TGAAATGGCGAAGGACGA-3'	3,620
	Reverse (Rv_ATR_Inner_Part1)	5'-CATCTAAATATACATGGGGACC-3'	
Segundo fragmento de <i>ATR</i>	Forward (Fw_ATR_Part2_Outer)	5'- GACAGATAGACGGCTACA-3'	5,202
	Reverse (Rv_ATR_Part2_Outer)	5'- ACCGCTCCAGTTAAACT-3'	
	Forward (Fw_ATR_Inner_Part2)	5'-GCACTGAAGCGTATTAAACTG-3'	4,927
	Reverse (Rv_ATR_Inner_Part2)	5'-TGCACAAGGAGCCTATGATA-3'	

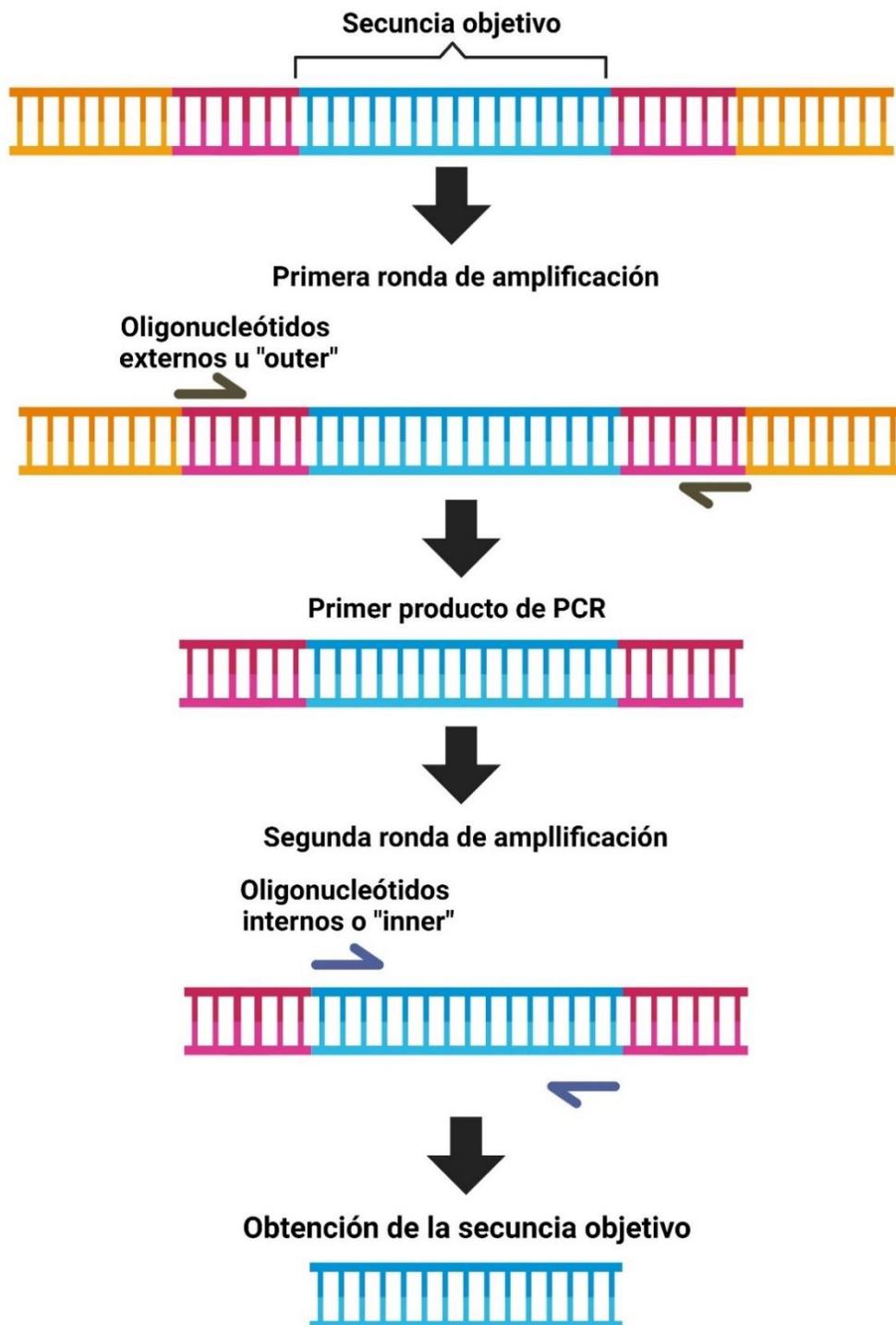


Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de oligonucleótidos para cada ronda con el fin de incrementar la sensibilidad de amplificación. La primera ronda de amplificación se realiza con los oligonucleótidos externos ("outer") para amplificar una región de DNA más extensa, que contiene la secuencia objetivo. Posteriormente, con el producto de amplificación, se ejecuta la segunda ronda de amplificación con los oligonucleótidos internos ("inner") para amplificar la secuencia objetivo.

5.6. Electroforesis y purificación en gel

Se realizó la electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa, para lo cual se cargó el volumen total de las PCR en un gel de agarosa al 1 % y 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio corrió la electroforesis para separar e identificar el fragmento de DNA esperado. Al terminar la electroforesis, se observó el gel de agarosa en un transiluminador se cortó con bisturí la banda de interés, la cual se almacenó en un tubo de microfuga de 1.5 mL y a 4°C hasta su procesamiento.

Se utilizó el PureLink Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Catálogo K2200-01) para purificar el fragmento en gel siguiendo las especificaciones de manufactura. Se añadió 3 veces el volumen del peso de la banda cortada con el amortiguador de disolución L3; se colocó el tubo en un termobloque precalentado a 55°C para disolver la banda por 15 min, invirtiendo el tubo cada 3 min para homogeneizar. Se agregó lo equivalente a un volumen de isopropanol y se mezcló para posteriormente traspararlo a una columna de filtración (en estas se puede agregar un volumen máximo de 850 μL) y se centrifugó en una microcentrífuga de mesa a 12,000 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó 500 μL de amortiguador de lavado W1, enseguida se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm; posterior a esto se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar una vez más bajo las mismas condiciones para eliminar el exceso de amortiguador de lavado. Se colocó la columna en un tubo de microfuga nuevo y se agregaron 40 μL de H₂O desionizada estéril en el centro de la membrana de la columna para eluir la muestra, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. El producto de la purificación fue cuantificado y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

5.7. Clonación en pJET1.2/blunt y purificación de plásmido

Posterior a la obtención de los fragmentos amplificados se procedió a almacenarlos en el vector pJET1.2. El vector de clonación pJET1.2/blunt es un plásmido abierto de 2,974 bp donde se pueden ligar insertos con extremos romos o cohesivos con tamaños desde los 8 pb a los 10 Kpb. El vector de clonación del kit CloneJET™ de Thermo Scientific contiene el gen letal *eco47IR* que se interrumpe al ligar un inserto de DNA en el sito de clonación,

permitiendo una selección positiva, ya que sólo las células con plásmidos recombinantes son capaces de propagarse. Además, contiene el gen que codifica para la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, utilizado en la selección y mantenimiento de células recombinantes de *E. coli*. Asimismo, este vector posee un promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto clonado, un sitio de clonación múltiple expandido para la localización, selección y escisión del inserto (Thermo Scientific, 2012)

Para clonar en este vector se utilizaron 10.0 μL del amortiguador de reacción 2X, un volumen de PCR cuya concentración fue aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.0 μL del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1.0 μL de T4 ligasa de DNA y por último se adicionó H_2O desionizada estéril hasta completar un volumen de 20.0 μL . La reacción se mezcló en vórtex por 5 s, se incubó a temperatura ambiente por 30 min y posteriormente se transformó en células competentes TOP 10.

5.8. Transformación en células competentes TOP 10

La transformación se realizó por choque térmico en células quimiocompetentes de *E. coli* TOP 10; para ello se añadió el volumen total de la clonación en pJET1.2/blunt a 50 μL de células competentes, se incubó en hielo por 30 min; al término se dio un choque térmico a 42°C por 1 min y posteriormente se regresó el tubo con las células al hielo por 3 min. Pasado el tiempo se agregó 500 μL de medio LB líquido y se dejaron las células en recuperación, incubándose 1 h y media a 37°C con agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de recuperación el cultivo se centrifugó y el botón de células se resuspendió en 100 μL de medio, los cuales se plaquearon en medio LB sólido suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron las placas toda la noche a 37°C.

5.9. Purificación de plásmido

Se tomaron algunas de las colonias que crecieron en la placa para extraer los plásmidos para cada uno de los fragmentos de interés utilizando el kit de extracción QIAprep Spin Miniprep Kit (#27104) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada una de las colonias seleccionadas se inocularon en 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ una tarde antes al día de la extracción del

plásmido, dejando en incubación toda la noche a 37°C y a 200 rpm. Al día siguiente, los cultivos celulares se centrifugaron en un tubo de microcentrifuga a 13,000 rpm por 3 min hasta obtener el botón celular de los 5 mL de cultivo. Posteriormente cada botón se resuspendió en 250 µL del amortiguador P1 o de lisado. Posteriormente, se adicionó 250 µL del amortiguador P2 y se mezcló lentamente por inversión de 4 a 6 veces hasta obtener una solución transparente. Enseguida se añadieron 350 µL de amortiguador N3 y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo lentamente. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, pasado el tiempo se tomaron 800 µL del sobrenadante para transferirlos a una columna de filtración la cual se centrifugó por 1 min, para posteriormente descartar el sobrenadante. La columna se lavó primero con 500 µL del amortiguador PB, seguido de 750 µL del amortiguador PE; en cada paso de lavado se centrifugó por 1 min, descartando el sobrenadante. Por último, se centrifugó por 1 min más para remover por completo el amortiguador PE y se colocó la columna en un tubo de microfuga limpio, donde se adicionó 40 µL de H₂O desionizada estéril en el centro de la membrana de la columna para eluir la muestra centrifugándola a 13,000 rpm por 1 min. El producto de la purificación se almacenó a -20°C para su posterior uso.

5.10. Ensayo de restricción

Los plásmidos purificados de pJET1.2/blunt con los fragmentos de DNA de interés fueron sometidos a un ensayo de restricción. Debido a su alta especificidad, las enzimas de restricción son capaces de reconocer una secuencia palindrómica en específico dentro del DNA bicatenario del plásmido, su actividad de endonucleasa permite romper el enlace fosfodiéster y obtener fragmentos de DNA (Marshall et al., 2007) que posteriormente pueden observarse en un gel de agarosa y compararse con un patrón de restricción esperado con las enzimas de restricción seleccionadas (Tabla 4).

Con ayuda del programa SnapGene se realizaron clonaciones *in silico* y simulaciones de patrones de restricción de cada plásmido pJET1.2/blunt con los fragmentos de DNA de interés clonado, se seleccionaron una o más enzimas de restricción que cortaran dentro del fragmento de DNA de interés y fuera de éste. Se utilizaron enzimas de digestión del kit Thermo Scientific™ FastDigest siguiendo las instrucciones del fabricante en la cual se

tomó un tubo de 1.0 μL y se adicionó 10.0 μL del amortiguador green 10x FastDigest, 1.0 μL de la o las enzimas de restricción seleccionadas, un volumen de plásmido aproximado a 400 ng/ μL y H₂O desionizada estéril cuanto baste para completar un volumen de 20.0 μL . La reacción se incubó por 1 h a 37°C y posteriormente se cargó la muestra en un gel de agarosa al 1 % para observar los patrones de restricción. La cepa seleccionada se almacenó en glicerol al 25 % a -70°C.

Tabla 4. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los plásmidos pJET1.2/blunt

Nombre del plásmido	Enzimas de restricción*
pJET1.2::SOG1	<i>NotI</i> y <i>NdeI</i>
pJET1.2::ATM_Part1	<i>XhoI</i>
pJET1.2::ATM_Part2	<i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>
pJET1.2::ATR_Part1	<i>NdeI</i>
pJET1.2::ATR_Part2	<i>HindIII</i>

*Todas las enzimas de restricción pertenecen al kit Thermo Scientific™ FastDigest restriction enzymes: *HindIII*, FD0504; *XhoI*, FD0694; *NdeI*, FD0584; *NotI*, FD0594.

5.11. Secuenciación de los plásmidos por tecnología de nanopore.

Hasta hace una década, la manera principal para determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA era a través del método de Sanger. En 2014, esto cambió con la aparición de la una nueva herramienta de secuenciación llamada Oxford Nanopore Technologies (ONT). Esta tecnología se basa en una proteína sensora en forma de poro (*nanopore*) embebida en membrana polimérica con resistencia, donde las moléculas de RNA o DNA de una sola hebra cargadas negativamente cruzan del lado *cis* (con carga negativa) al lado *trans* (con carga positiva) de la membrana, lo cual sucede cuando se produce una corriente iónica aplicando un voltaje constante a una solución electrolítica. Esta movilización ocurre de manera gradual y controlada mediante una proteína motora, que además presenta actividad helicasa, lo que facilita que el DNA de doble cadena o dúplex de RNA-DNA se desenrolle formando cadenas sencillas que permitan su paso a través del nanoporo. Los cambios de corriente iónica producidos durante la movilización de las moléculas de ácidos nucleicos son decodificados por algoritmos bioinformáticos y corresponden a la secuencia presente en la muestra de DNA o RNA analizada. (Wang et al., 2021). Los plásmidos de almacenamiento de los fragmentos de *ATM* y *ATR* que

resultaron positivos al análisis de restricción, se enviaron a la compañía Secoya Labs para ser secuenciados por esta tecnología.

5.12. Ensamble de Gibson

El ensamble de Gibson es una técnica de clonación molecular que se utiliza en biología molecular y biología sintética para ensamblar fragmentos de DNA. El ensamble de Gibson elimina la necesidad de enzimas de restricción y ligasas que se utilizan en otros métodos de clonación (Gibson, 2017). El principio fundamental de la técnica es la superposición de extremos, donde se diseñan secuencias de solapamiento homólogo o colas de fusión, constituidas por un intervalo de 25 a 40 nucleótidos entre los fragmentos de DNA que se desean ensamblar.

Pasos del Proceso:

- **Diseño de Oligonucleótidos:** Se diseñan oligonucleótidos que contengan las colas de fusión con los extremos de los fragmentos de DNA a ensamblar.
- **Mezcla de reacción:** A partir de la reacción de PCR se obtienen y purifican los fragmentos de DNA con colas de fusión que posteriormente serán mezcladas en un amortiguador que contenga una exonucleasa que digiere en dirección 5' a 3', una DNA polimerasa y una ligasa T4.
- **Reparación y Amplificación:** La técnica se basa en la acción conjunta de las tres enzimas donde la DNA polimerasa se encarga de la reparación y extensión de los extremos solapados y la ligasa une los fragmentos ensamblados. El resultado es un DNA recombinante amplificado.

La técnica resulta eficiente y rápida pues permite el ensamblaje de múltiples fragmentos de DNA en una sola reacción, sin cambiar la temperatura de reacción y funcionando todas las enzimas a la par en un mismo medio de reacción, simplificando el proceso y ahorrando tiempo; aparte de eliminar la necesidad de enzimas de restricción y ligasas, reduciendo las limitaciones asociadas con éstas (Gibson, 2017). En la figura 9 se ilustran los pasos del ensamble de Gibson.

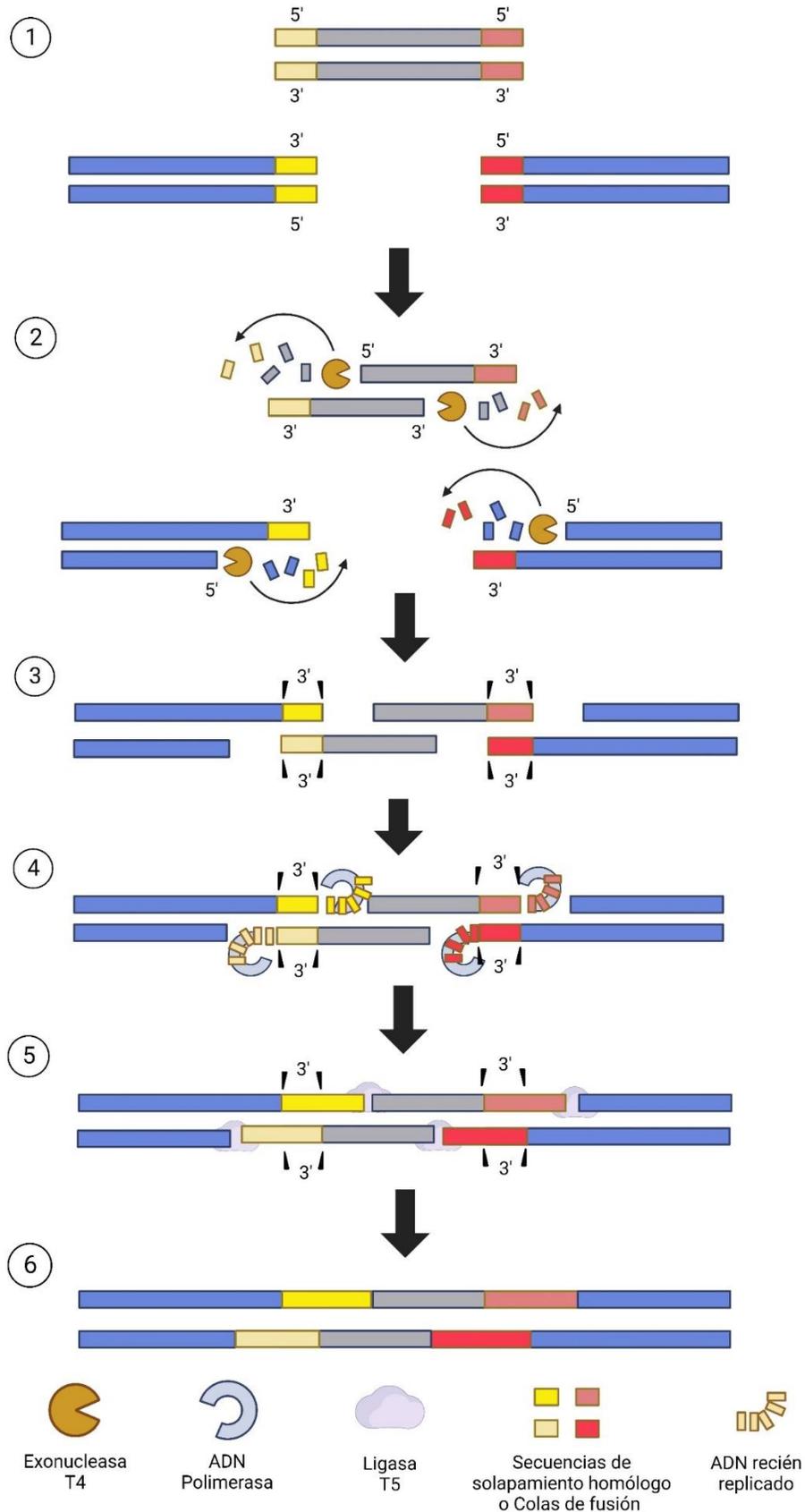


Figura 9. Ensamble de Gibson. **1)** Se ilustran los extremos del vector y el inserto con secuencias sobrepuestas. **2)** Se procede con la digestión en dirección 5' tanto del inserto y el vector de clonación por la exonucleasa T5, dejando extremos voladizos en dirección 3'. **3)** Se forma el dúplex inserto-vector en las secuencias complementarias (extremos de los salientes 3'). El dúplex se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias. **4)** La DNA polimerasa rellena los nucleótidos que haya retirado la exonucleasa T5. **5)** La enzima ligasa sella ambas cadenas. **6)** Unión final entre el vector-inserto después de la ligación.

5.12.1. Obtención de fragmentos para la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*

Se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 5) para agregar las colas de fusión a los diferentes fragmentos de DNA que se usaron para realizar la clonación de Gibson y obtener la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*. Por lo tanto, se amplificaron los fragmentos *promSOG1::SOG1*, el fragmento codificante para la proteína verde fluorescente o *GFP* (acrónimo de la traducción al inglés: “Green Fluorescent Protein”) y el fragmento de plásmido que se utilizó como vector “backbone” del plásmido “New_L3_Full_V2_Venus” (tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para obtener la construcción *pSOG1::SOG1-GFP*.

Fragmento de DNA	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido	Longitud (pb)
<i>promSOG1::SOG1</i> con colas de fusión para ensamble de Gibson	Forward (Fw_SOG_tails_new)	5'- AAAATCCAGATCGCTAGCAAG GAGGGAGGCTCTTCAATGACTAGA AAACCCCGAGATGAAAGAATC -3'	4,425
	Reverse (Rv_SOG_tails_new)	5'- TCGCCCTTGCTCACCGAAGC ATCAGTCTTTCCAGTCCCCCA -3'	
Fragmento de New_L3_Full_V2_Venus con colas de fusión para ensamble de Gibson	Forward (Fw_NewL3)	5'- CGAGCTGTACAAGTAAG CTTGCAAGCAGATCG -3'	8,799
	Reverse (Rw_NewL3)	5'- TTCATCTCGGGGTTTTCTAGC TCCTCATTGAAGAGCCTCCC -3'	
<i>GFP</i> con colas de fusión para	Forward (Fw_eGFPTails_New)	5'- GGGGGACTGGAAAGACTGA TGCTTCGGTGAGCAAGGGC -3'	765

ensamble de Gibson	Reverse (Rv__eGFPTails_New)	5'-GTTTGAACGATCTGCTTGACAA GCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT -3'	
-----------------------	--------------------------------	--	--

El aislamiento de cada uno de los fragmentos requeridos para la clonación de Gibson se obtuvo de la siguiente manera:

Para el aislamiento del fragmento *promSOG1::SOG1* con colas se usó como DNA templado el vector *pJET1.2::promSOG1::SOG1*, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50.0 µL. Cada reacción se preparó con 25.0 µL de la mezcla PrimeSTAR Max Premix (2X), 1.0 µL del oligonucleótido Fw_SOG_tails_new y Rv_SOG_tails_new (10 mM), 120 ng del vector en cuestión y 21.0 µL de H₂O desionizada. La PCR se realizó en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler. Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial por 3 min a 98°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 15 s a 98°C, alineamiento de 15 s a 55°C y extensión de 4 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 10 min a 72°C. Para visualizar el producto de las PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1 % y se utilizó el Kit de purificación de PCR y extracción de gel PureLink™ Quick, Invitrogen™ # K220001.

Para el aislamiento de la región codificante del gen de *GFP* con colas de fusión se utilizó como DNA templado el plásmido *cTag_eGFP*, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL. Cada reacción se preparó con 12.5 µL la mezcla de reacción Q5 High-Fidelity 2X, 1.25 µL de los oligonucleótidos Fw_eGFPTails_New y Rv__eGFPTails_New (10 µM), 120 ng del plásmido *cTag_eGFP* y 9.0 µL de H₂O desionizada. La PCR se realizó en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler. Las condiciones de esta PCR fueron una desnaturalización inicial a 98°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización 10 s a 98°C, alineamiento 20 s a 55°C y extensión de 1 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 2 minutos a 72°C. Para visualizar los productos de las PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% y se utilizó el Kit de purificación de PCR y extracción de gel PureLink™ Quick, Invitrogen™ #K220001 para purificar cada producto.

Para el aislamiento del fragmento “*New_L3_Full_V2_Venus*” con colas de fusión, se usó como DNA templado el plásmido “*New_L3_Full_V2_Venus*” el cual fue creado por

ensamble de Gibson por el Dr. Fernando Guzmán Chávez usando la colección OPEN PLANT TOOL KIT (Sauret-Güeto et al., 2020). El fragmento amplificado con colas contiene los genes de resistencia de Kanamicina para bacterias, el gen de resistencia a higromicina para plantas, el origen de replicación, la región terminadora entre otras regiones de DNA lo que lo hacen excelente opción para fungir como vector de clonación (Ver Anexo I).

Para el aislamiento del fragmento correspondiente se realizó una PCR en un volumen final de 50.0 μL , la cual se preparó con 25.0 μL de la mezcla PrimeSTAR Max Premix (2X), 1.0 μL del oligonucleótido Fw_NewL3 y Rv_NewL3 (10 mM), 120 ng del plásmido en cuestión y 22.0 μL de H₂O desionizada. La PCR se realizó en un termociclador Labnet MultiGene™ Mini PCR Thermal Cycler. Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial por 3 min a 98°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización 15 s a 98°C, alineamiento de 15 s a 55°C y extensión de 6 min a 72°C, seguidos por un paso de extensión final 10 min a 72°C. Para visualizar el producto de la PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1 % y se utilizó el Kit de purificación de PCR y extracción de gel PureLink™ Quick, Invitrogen™ # K220001.

5.12.2. Ensamble de Gibson de los fragmentos para obtener la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*

Una vez obtenidos los 3 fragmentos de interés con colas se procedió a realizar el ensamble utilizando el Gibson Assembly® Cloning Kit, #E5510S como se describe a continuación:

En un tubo de reacción para PCR se añadieron 10.0 μL de amortiguador Gibson Assembly Master Mix (2X), 5.0 μL del inserto *SOG1* (concentración 84 ng/ μL), 2 μL del inserto *GFP* (concentración 83 ng/ μL), 3 μL del fragmento del vector *New_L3_Full_V2_Venus* (concentración 105 ng/ μL), para un volumen total de 20.0 μL . La reacción se incubó a 50°C por 45 min, después de transcurrido el tiempo se usó toda la reacción de Gibson para transformar células competentes TOP 10 como se describió en la sección 5.1 de métodos. Pasada la recuperación el cultivo se centrifugó y el botón

de células se resuspendió en 100 µL de medio, los cuales se plaquearon en medio LB sólido suplementado con Kanamicina 50 µg/mL, incubándose toda la noche a 37°C.

5.12.3. Selección de colonias con la construcción con la *promSOG1::SOG1-GFP*

Se seleccionaron 14 colonias a las cuales se les extrajo el plásmido utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (#27104) siguiendo las instrucciones del fabricante y como fue descrito en la sección 5.2 de métodos. Los plásmidos (400 ng) se sometieron a un primer ensayo de restricción con la enzima *Bam*HI de Thermo Scientific FastDigest restriction enzymes (Thermo Scientific™ FastDigest *Bam*HI, FD0054) siguiendo las instrucciones del fabricante (descrito en la sección 6 de métodos) y se separaron en geles de agarosa al 1 % para visualizar los patrones de restricción. De las colonias que mostraron el patrón esperado de digestión en el primer ensayo, se les realizó una segunda restricción para confirmar que el plásmido es la construcción deseada; para ello se utilizaron las enzimas *Xba*I y *Not*I de Thermo Scientific FastDigest restriction enzymes (Thermo Scientific™ FastDigest *Xho*I, FD0694 y *Not*I, FD0594) siguiendo las instrucciones del fabricante (descrito en la sección 6 de métodos) y se separaron en geles de agarosa al 1 % para visualizar los patrones de restricción. La cepa seleccionada se almacenó en glicerol al 25 % a -70°C.

5.13. Localización subcelular de SOG1 en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Los protoplastos son células vegetales vivas a las cuales se le ha removido la pared celular mediante métodos mecánicos o con el uso de enzimas que degradan la pared celular; dejando a la célula rodeada solo por la membrana plasmática. Los protoplastos se aíslan principalmente de células del mesófilo de las hojas, de callos o cultivos de células en suspensión (Ahmed et al., 2021). Es de suma importancia que en el proceso de aislamiento se mantenga la integridad de la membrana plasmática para la viabilidad del protoplasto; por lo que, en la etapa inicial del aislamiento, el cual resulta en la plasmólisis de las células, se requiere un medio con ósmosis adecuada y, en el aislamiento enzimático, una mezcla de enzimas que degraden la pared celular. La solución contiene manitol como osmótico y una mezcla de celulasas, hemicelulosas y pectinasas (Davey et al., 2005). Posterior a su aislamiento, los protoplastos se lavan con

una solución osmótica decreciente, se centrifugan y resuspenden para que puedan ser viables a un proceso transformación, el cual implica la entrega directa de DNA a células vegetales individuales mediante polietilenglicol o electroporación. Una vez dentro del núcleo, el DNA puede expresarse de forma transitoria o integrarse de forma estable en el genoma (Bhatia et al., 2015)

5.13.1. Extracción de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Para extracción de protoplastos se utilizaron plantas tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Se siguió el protocolo reportado por (Yoo et al., 2007), el cual se describe a continuación:

Se tomaron 100 hojas verdaderas (hoja 5, 6 y 7) de plantas de 3 a 4 semanas de edad, se cortaron en pedazos pequeños utilizando un bisturí nuevo; los pedazos se sumergieron por completo en 10 mL de solución enzimática (manitol 0.4 M, KCl 20 mM, MES 20 mM (pH 5.7), 1.5 % celulosa (m/v), 0.4 % macerozima (m/v) y CaCl₂ 10 mM) contenida en una caja Petri. Posteriormente el contenido de la caja se filtró al vacío, utilizando una cámara de secado durante 30 minutos, posteriormente se incubaron a 25°C a 40 rpm durante 90 min, transcurrido el tiempo, se incrementó la agitación a 80 rpm durante 5 min. La solución enzima/protoplasto, fue diluida con 10 mL de solución W5 (2 mM MES (pH 5.7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl) una vez diluida, se filtró en un tubo de centrifuga utilizando un pedazo de filtro miracloth (475855 Millipore Miracloth) el cual se sumergió en solución W5 para retirar las hojas, el filtrado fue centrifugado a 200 xg a 4°C durante 2 minutos. Se desechó la mayor parte de sobrenadante y se resuspendió el botón con el sobrenadante residual. Se realizaron 2 lavados con 1 mL de solución W5 y al final, se resuspendió con 500 µL de solución MMG (4 mM MES (pH 5.7), 0.4 M manitol, 15 mM MgCl₂) para proceder a transformar los protoplastos.

5.13.2. Transformación de protoplastos

En un microtubo de 1.5 mL se añadieron 100 µL de protoplastos seguido de un volumen equivalente a 1.0 µg del plásmido *promSOG1::SOG1-GFP*, se mezcló suavemente para posteriormente añadir 110 µL de la solución PEG (20% PEG 4000, 0.2 M, 100 mM CaCl₂).

Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se diluyó la mezcla con 400 μL de W5 y se centrifugó a temperatura ambiente por 2 min a 100 x g, el botón se resuspendió en 1 mL de solución W5. Los protoplastos transformados se observaron en microscopio confocal.

5.13.3 Tinción con MitoTracker® y DAPI

Una muestra de 10 μL protoplastos transformados fueron añadidos a un portaobjetos cóncavo, para su tinción se agregó 1.5 μL de MitoTracker® (100 nM) o DAPI (300 nM), inmediatamente se mezcló con movimientos suaves y se le colocó el cubreobjetos para hacer las observaciones en el microscopio confocal. Se recomienda localizar y observar los protoplastos rápidamente para evitar que el colorante dañe a las células y/o las tiña por completo no permitiendo diferenciar los componentes de éstas.

6. RESULTADOS

Como se mencionó el objetivo del presente trabajo de tesis es generar las herramientas moleculares necesarias que nos permitan estudiar la localización subcelular de las proteínas encargadas de hacer frente al daño al DNA (ATM, ATR y/o SOG1) en *Arabidopsis thaliana*. Para ello se generó la construcción que permitió la expresión de AtSOG1 unida a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de su propio promotor lo que nos permitió estudiar la localización subcelular de SOG1 en mitocondrias y cloroplastos. Además, se aislaron las regiones codificantes de los genes *ATR* y *ATM* de *Arabidopsis thaliana*.

6.1. Obtención de la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*.

Para la obtención del vector *promSOG1::SOG1-GFP*, se decidió realizar una construcción similar a la descrita en Yoshiyama, et. al., 2013, en la cual su expresión es regulada por el promotor del gen de *SOG1*, además de que el ORF del gen *SOG1* esta fusionado al gen de *GFP* lo que permitirá seguir su localización subcelular.

6.1.1. Aislamiento del fragmento de DNA *promSOG1::SOG1-GFP* y su clonación en el vector pJET1.2/Blunt.

A partir de plantas silvestres ecotipo Col-0 de *Arabidopsis thaliana* se realizó la extracción del DNA genómico para el aislamiento de la región promotora y el marco de lectura abierto de *SOG1* mediante PCR, fragmento que nombraremos como *promSOG1::SOG1* en el presente trabajo. El fragmento amplificado abarco 1840 pb río arriba del codón de inicio y todo el ORF del gen (figura 10a). A través de PCR se obtuvo el fragmento de DNA genómico de 4,414 pb (Figura 10b) correspondiente a *promSOG1::SOG1*. Dicho producto de PCR fue purificado y cuantificado para ser clonado y almacenado en el vector pJET1.2/Blunt, obteniendo la construcción *pJET1.2::promSOG1::SOG1* (Figura 10c). Para verificar la correcta clonación del fragmento *promSOG1::SOG1* en pJET1.2/Blunt, se seleccionaron 12 colonias transformantes a las cuales se les extrajo el plásmido y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *NotI* y *NdeI*. De las 12 colonias analizadas, solamente 2 mostraron el patrón de restricción esperado, en la figura 10d se muestran el patrón de restricción esperado del vector *pJET1.2::promSOG1::SOG1* en

ensayo *in silico* realizado en SnapGene (panel superior) y en la parte inferior de la figura se observa la restricción experimental de la colonia seleccionada (Figura 10d).

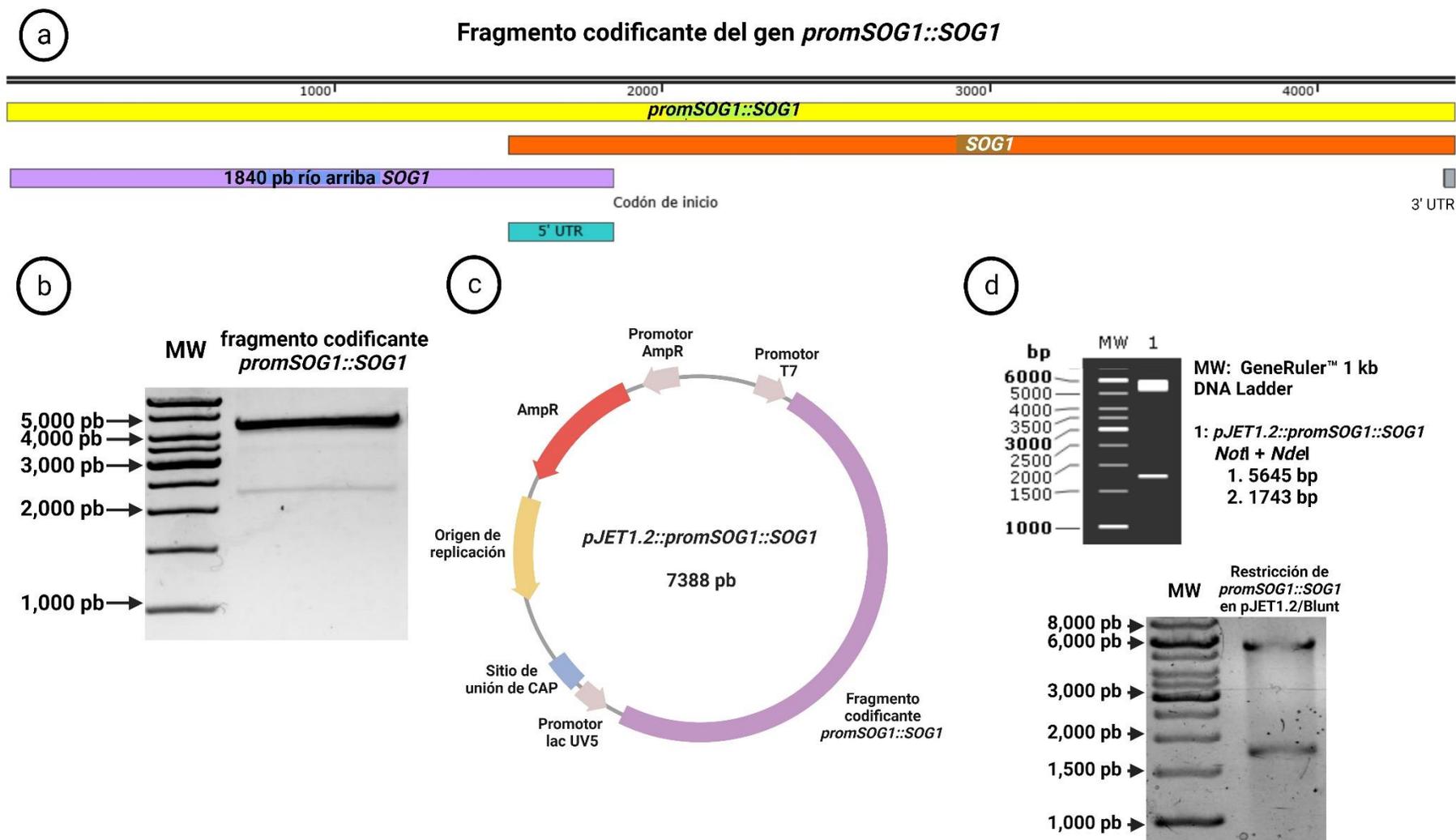


Figura 10. Aislamiento y almacenamiento en pJET1.2/Blunt del fragmento *promSOG1::SOG1*. a) Fragmento de DNA genómico aislado (*promSOG1::SOG1*) el cual contiene a 1840 pb río arriba del ATG de inicio de la traducción así como todo el ORF del gen *AtSOG1*. b) Resultado de la PCR para la obtención del fragmento *promSOG1::SOG1* a partir de DNA genómico en un gel de agarosa 1 %. c) Mapa de la construcción *in silico* *pJET1.2::pSOG1::SOG1*. d) Resultado del ensayo de restricción con las enzimas *NotI* y *NdeI* del plásmido *pJET1.2::pSOG1::SOG1 in silico* (panel superior) y experimental en un gel de agarosa 1 % (panel inferior).

6.1.2. Clonación de Gibson para obtener la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*.

Para crear la construcción deseada, se utilizó la tecnología de Gibson como se describió en materiales y métodos. Para lo cual se aislaron los 3 fragmentos deseados con colas de fusión (Figura 11a). Los 2 fragmentos de DNA adicionales a fusionar con *promSOG1::SOG1* fueron: 1) la región codificante de *GFP* con colas de fusión (765 pb) y 2) la región de DNA que funcionará como vector “backbone” del plásmido final (8799 pb con colas de fusión). Este último fragmento contiene los marcadores de selección para bacterias y plantas, así como el origen de replicación y la región terminadora 3term_Nos, la cual es usada como región terminadora de la fusión *SOG1-GFP* (Figura 11a). Para el aislamiento del fragmento “backbone” de la construcción se realizó la PCR usando como templado el plásmido “New_L3_Full_V2_Venus” (consultar Anexo I), obteniéndose el fragmento de tamaño esperado (Figura 11b). El plásmido *pJET1.2::pSOG1::SOG1* se utilizó como templado para la PCR, el fragmento con colas de fusión obtenido fue de 4,425 pb (Figura 11c). Por último, se aisló del plásmido *cTAG-eGFP* (consultar Anexo I) la región codificante al gen de *GFP*, obteniéndose un fragmento de 765 pb (Figura 11d). Todos los productos de PCR fueron purificados y cuantificados para ser sometidos al ensamble de Gibson.

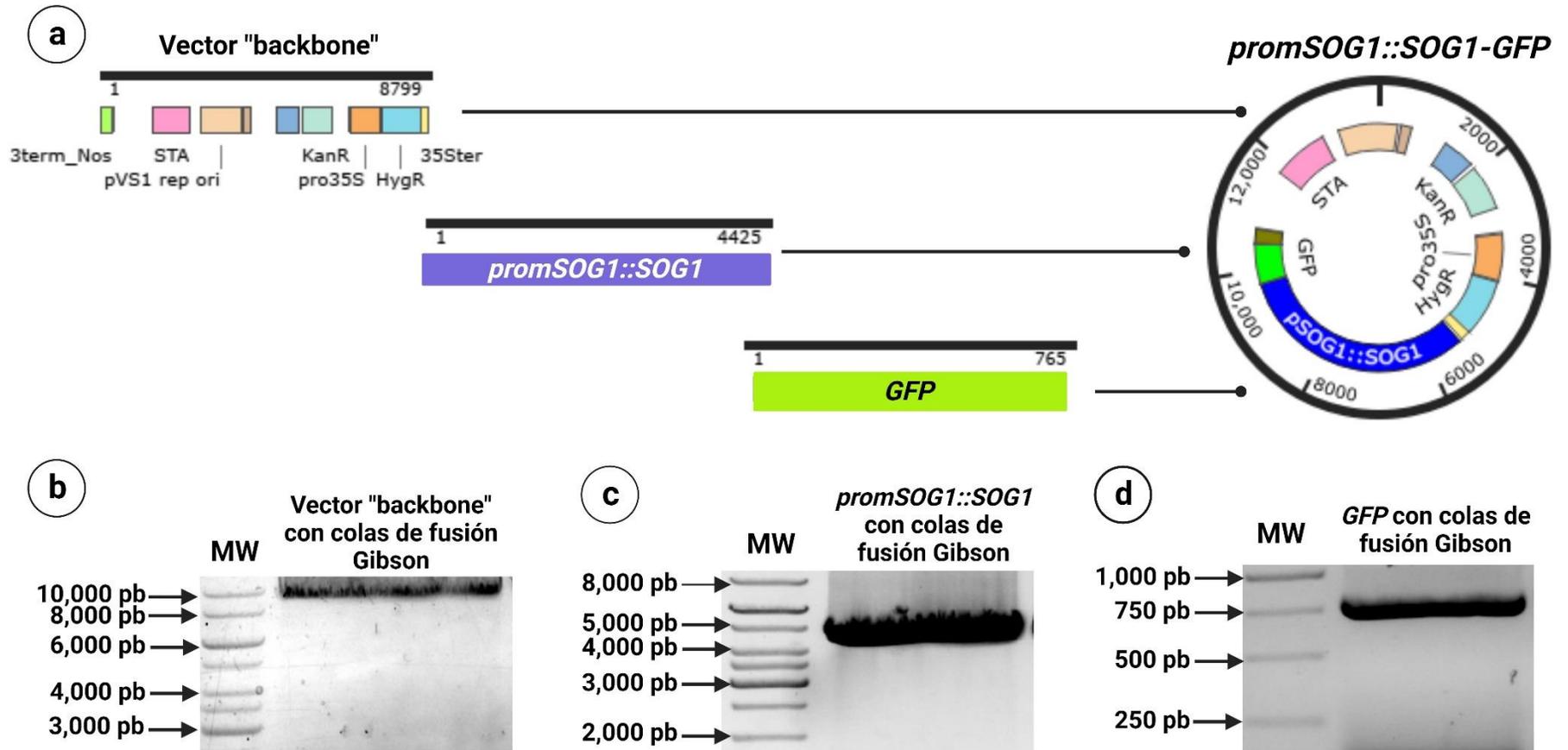


Figura 11. Obtención de la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* por ensamble de Gibson. a) Fragmentos de DNA requeridos para la obtención de la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* por ensamble de Gibson. b) Resultado de la PCR en un gel de agarosa 1 % del fragmento de DNA que funcionará como "backbone" del plásmido deseado. c) Resultado de la PCR fragmento *promSOG1::SOG1* con colas de fusión a partir del plásmido pJET1.2::*promSOG1::SOG1* en un gel de agarosa 1 %. d) Resultado de la PCR fragmento del gen de *GFP* con colas de fusión a partir del plásmido *cTAG_eGFP* en un gel de agarosa 1 %.

6.1.3. Confirmación de la identidad del vector *promSOG1::SOG1-GFP* por ensayos de restricción.

Como se ha mencionado, para lograr la construcción planteada se realizó el ensamble de Gibson con los fragmentos de PCR obtenidos. La reacción de Gibson se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, de las colonias transformantes crecidas se seleccionaron al menos 6 colonias para purificar y hacer ensayos de restricción para verificar la correcta obtención del plásmido *promSOG1::SOG1-GFP* (Figura 12).

Se realizaron dos ensayos de restricción, el primero se utilizó en los plásmidos de las seis colonias transformantes seleccionadas para discernir cuales tenían el patrón de restricción esperado (Figura 12a-c), la digestión se realizó con la enzima *Bam*HI teniendo el plásmido esperado 2 sitios de reconocimiento para esta enzima uno de la región *promSOG1::SOG1* y el segundo en la secuencia del gen de resistencia a higromicina (Figura 12a). En la figura 12b se muestra la restricción *in silico* en SnapGene mientras que el resultado experimental de la colonia seleccionada se muestra en la figura 12c, se observa el patrón de bandas experimental correspondió a la simulación *in silico*. El segundo ensayo de restricción únicamente se realizó en una colonia positiva para el primer ensayo de restricción con el fin de corroborar la identidad del plásmido (Figura 12e-f), en este caso la digestión se realizó con la combinación de enzimas *Not*I y *Xba*I, en la figura 12d se puede observar la localización de los sitios de corte para tales enzimas en el plásmido *promSOG1::SOG1-GFP*, el patrón de bandas experimentales correspondió al patrón obtenido *in silico* (Figura 12e-f). Ambos análisis de digestión nos indicaron que el ensamble de Gibson se obtuvo de forma adecuada, por lo que esta construcción posteriormente se usó para transformar protoplastos y observar la localización subcelular del factor de transcripción SOG1.

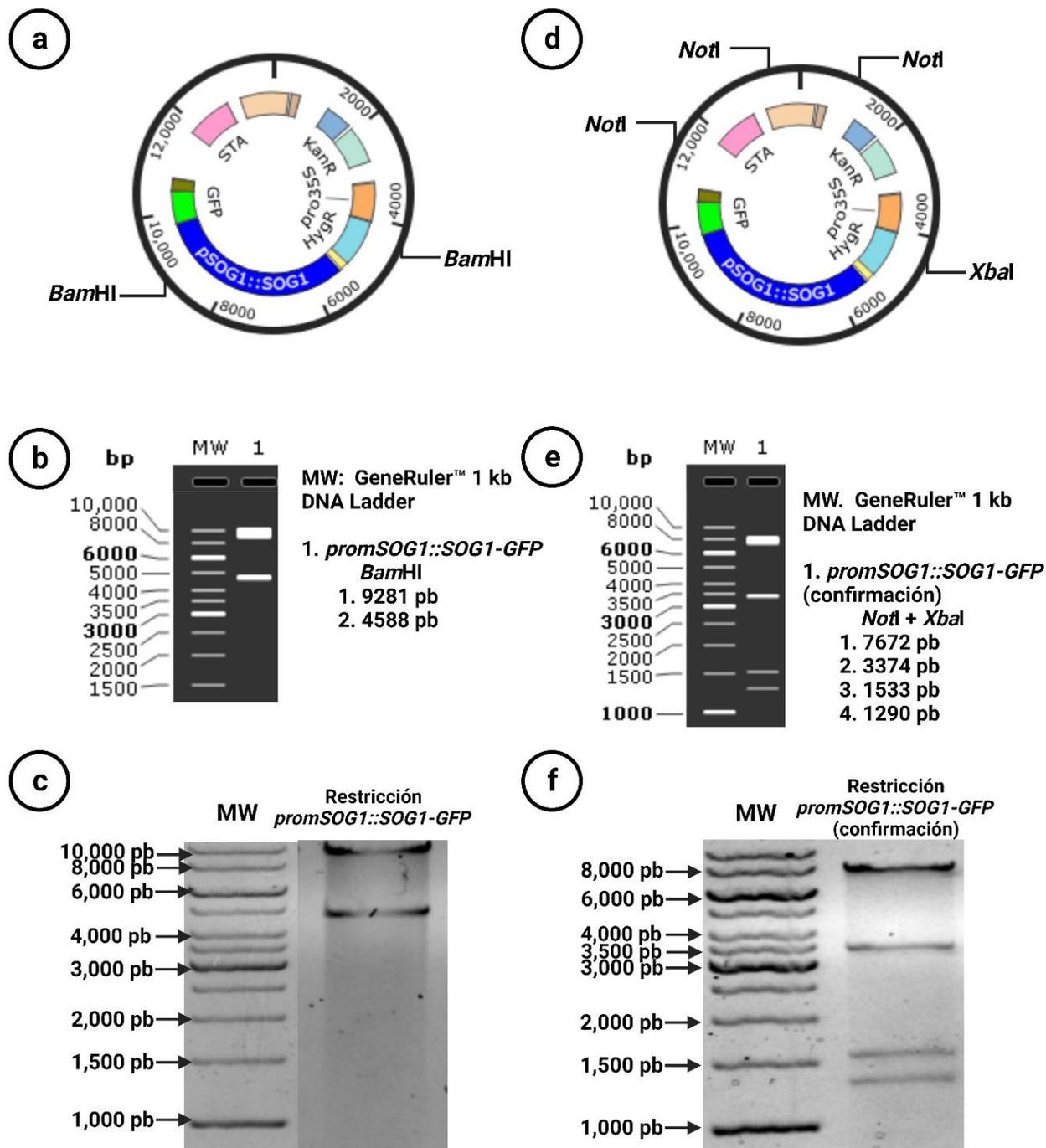


Figura 12. Ensayo de restricción para comprobar el éxito en el ensamble de Gibson en la obtención de la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*. a-c) Análisis de restricción con la enzima de restricción *Bam*H1, a) mapa del plásmido *promSOG1::SOG1-GFP* con los sitios de corte para *Bam*H1, b) restricción *in silico*, c) resultado del ensayo de restricción con *Bam*H1 del plásmido en gel de agarosa 1 %. d-f) Análisis de restricción con las enzimas de restricción *Not*I y *Xba*I, d) mapa del plásmido *promSOG1::SOG1-GFP* con los sitios de corte para *Not*I y *Xba*I, e) restricción *in silico*, f) resultado del ensayo de restricción con *Not*I y *Xba*I del plásmido en gel de agarosa 1 %.

6.2. SOG1 de *Arabidopsis thaliana* muestra triple localización subcelular

6.2.1. Localización de SOG1 en cloroplastos.

Para determinar si SOG1 presenta localización en cloroplasto se realizó la expresión transitoria en protoplastos de plantas Col-0 con la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*, para las observaciones en la microscopia confocal se observó en campo claro la integridad de los protoplastos (Figura 13A), la fluorescencia de GFP (fluorescencia verde) se observó en gran parte del protoplasto (Figura 13B), para discernir la localización de los cloroplastos dentro de la célula se detectó la autofluorescencia de estos organelos dada por la clorofila, (680nm/fluorescencia roja) lo que permitió visualizar su localización (Figura 13C). Se observo un claro traslape de ambas fluorescencias (Figura 13D), indicando que efectivamente SOG1 presenta localización en cloroplastos.

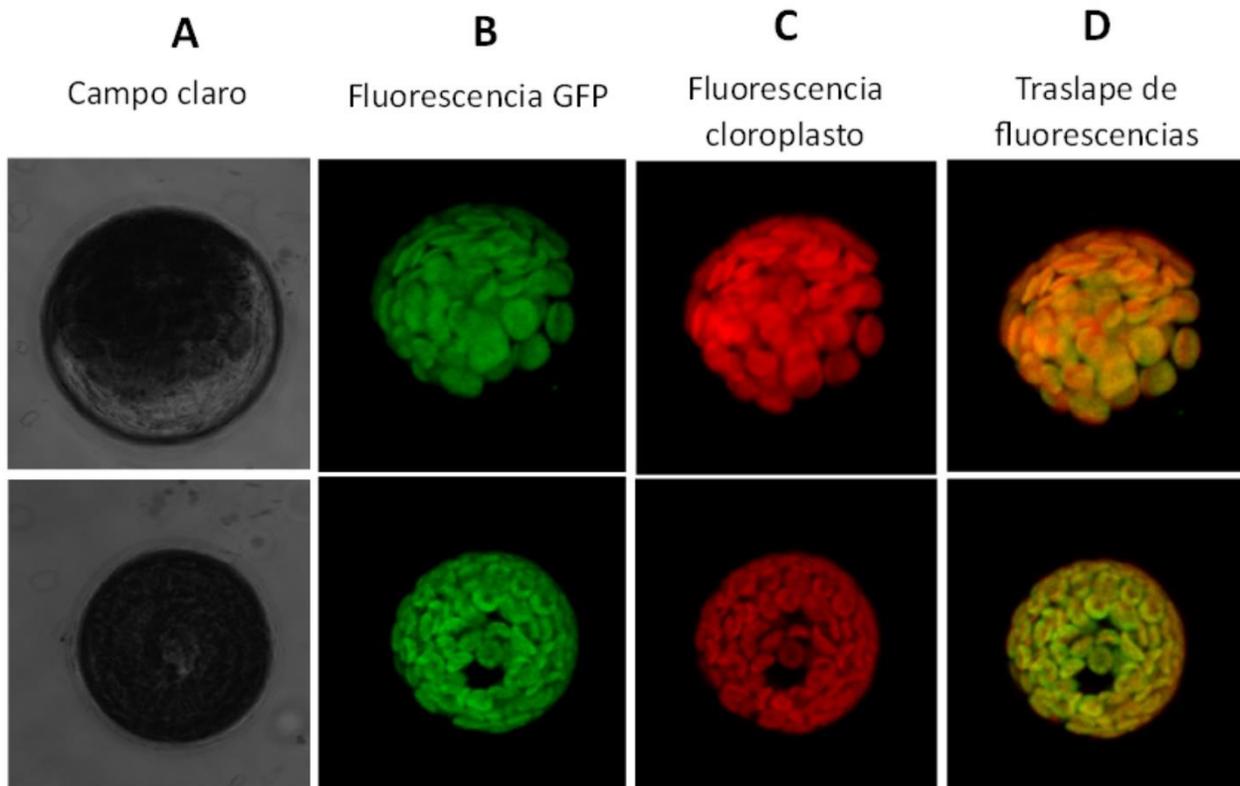


Figura 13. Imágenes en microscopia confocal de protoplastos mostrando la localización de SOG1 en cloroplastos. A) protoplastos en campo claro B) fluorescencia de *GFP* C) autofluorescencia de cloroplastos D) Traslape de fluorescencias de *GFP* y autofluorescencia de cloroplasto.

Mientras que en 8 de cada 10 protoplastos se observó una fluorescencia de GFP ubicua en los cloroplastos, en otro 20 % se observó la fluorescencia de GFP fuertemente relocalizada en un sitio específico en los cloroplastos (figura 14A-D), el cual podría tratarse del nucleóide de este organelo, lo cual necesitará ser confirmado.

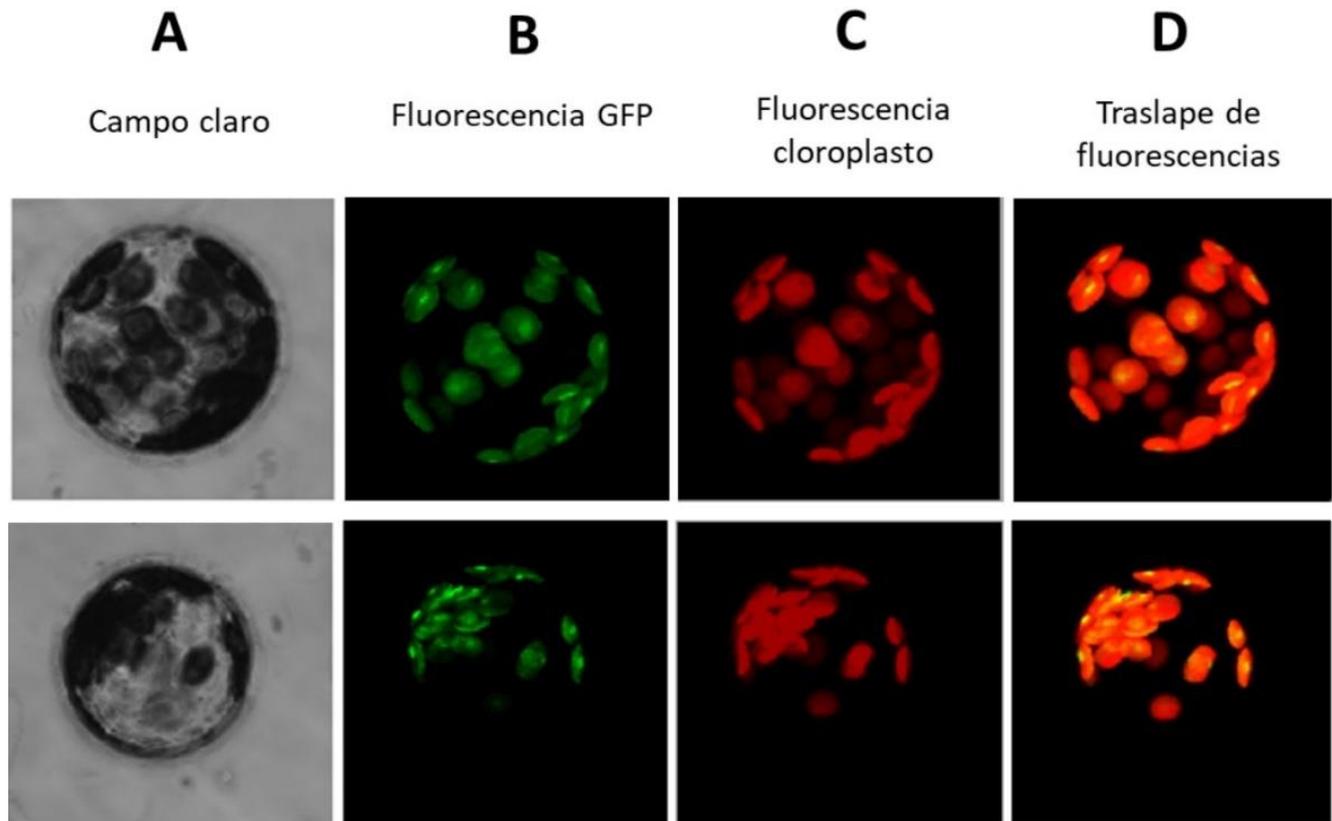


Figura 14. Localización de SOG1 en subcompartimentos dentro del cloroplasto. A) protoplastos en campo claro B) fluorescencia de GFP C) autofluorescencia de cloroplastos D) Traslape de fluorescencia de GFP y autofluorescencia de cloroplasto.

6.2.2. Localización de SOG1 en mitocondrias.

Para evaluar si SOG1 muestra una localización subcelular en mitocondria se prepararon protoplastos de la línea marcadora de mitocondrias Mito-CFP (Cyan Fluorescent Protein) (Figura 15A-F). Los protoplastos de esta línea ya muestran fluorescencia cian en mitocondrias (fluorescencia azul) (Figura 15C), por lo que se transformaron con la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* para también detectar la fluorescencia de GFP (Figura 15B) con el objetivo de lograr determinar si existía traslape con la fluorescencia de cian. Sin embargo, el microscopio confocal que utilizamos no puede hacer captura en paralelo de la fluorescencia

de GFP y CFP debido a la proximidad de sus longitudes de emisión en las que se detectan ambas fluorescencias (entre 470 nm para GFP y 485 nm para CFP) por lo que no se logró hacer directamente el traslape deseado. Para diferenciar la fluorescencia de GFP dentro de los cloroplastos también se detectó la autofluorescencia de estos organelos (figura 15D). Se observó señal muy fuerte de GFP fuera de los cloroplastos. La fluorescencia de la proteína CFP; en color cian, mostró un patrón muy similar a GFP fuera de cloroplastos (Figura 15E-F), aunque se lograron distinguir algunas mitocondrias aisladas mostrando ambas fluorescencias (Figura 15E-F), la mayoría de la fluorescencia de GFP fuera de los cloroplastos se localizó en un punto específico, indicando la probabilidad que las mitocondrias se agruparon en este sitio dentro del citoplasma. Como se mencionó, a pesar de no lograr un traslape en la señal de emisión de ambos fluoróforos con el microscopio utilizado, en las fotos independientes se observó que la señal de ambas proteínas fluorescentes se agrupa en el mismo sitio (figura 15E-F), por lo que sugeriría que la proteína SOG1 se localiza en mitocondria.

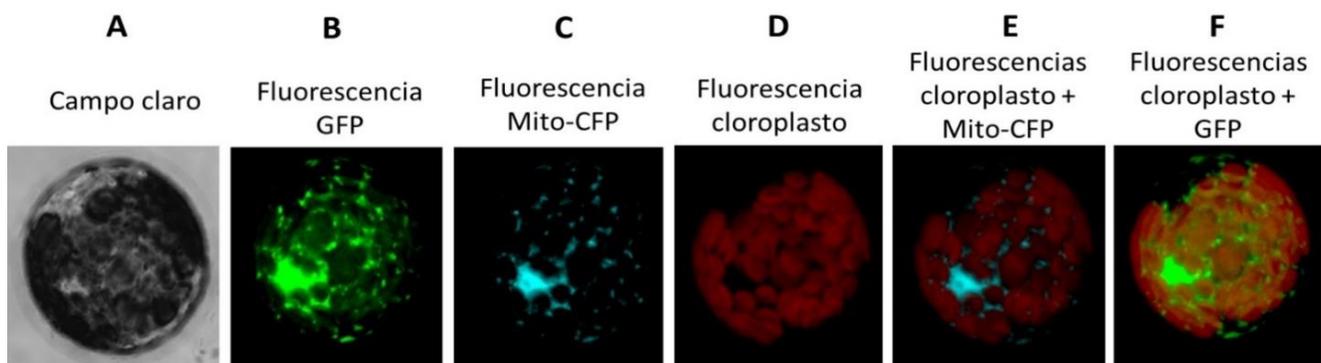


Figura 15. Localización de SOG1 con una proteína marcadora de mitocondria. A) protoplasto en campo claro B) fluorescencia de GFP C) fluorescencia de Mito-CFP D) autofluorescencia de cloroplasto E) traslape de autofluorescencia de cloroplasto y de Mito-CFP F) traslape de autofluorescencia de cloroplasto y GFP.

Para confirmar la localización mitocondrial de SOG1 se realizó la tinción con MitoTracker® en protoplastos de plantas silvestres transformados con la construcción *promSOG1::SOG1-GFP*, este colorante tiñe específicamente mitocondrias. En la figura 16 (A-F) se muestra que efectivamente la fluorescencia de GFP fuera de los cloroplastos se traslapa con el patrón de fluorescencia de MitoTracker® (Figura 16E), este resultado nos confirmó que SOG1 se localiza también en mitocondrias.

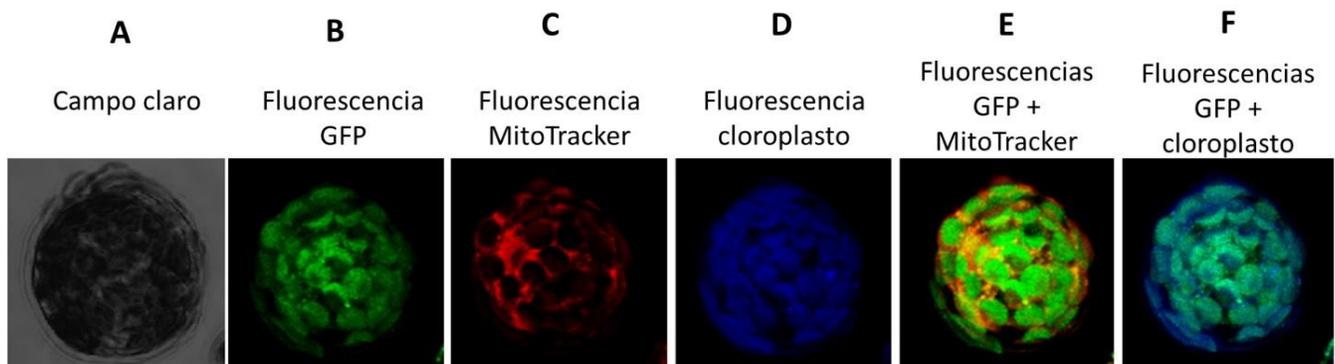


Figura 16. Localización de SOG1 en mitocondrias. A) protoplasto en campo claro, B) fluorescencia de GFP, C) fluorescencia de MitoTracker® D) autofluorescencia de cloroplasto E) sobrelape de fluorescencia de GFP y MitoTracker® F) sobrelape de autofluorescencia de cloroplasto y fluorescencia de GFP.

6.2.3. Localización de SOG1 en núcleo.

Hasta ahora, el papel conocido de SOG1 es como el factor de transcripción que activa la expresión de cientos de genes nucleares en respuesta a daño al DNA (Pedroza-García et al., 2022), la mayoría de los estudios reportados acerca de SOG1 han sido caracterizando su función en el nicho de células troncales de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, donde se ha mostrado que este factor de transcripción tiene localización nuclear como es de esperarse (Yoshiyama et al., 2013). Por lo tanto, en este trabajo también se evaluó si SOG1 se encuentra en el núcleo de protoplastos provenientes de células de hojas de la roseta. Por lo tanto, se realizó tinción con DAPI de protoplastos transformados con la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* (Figura 16A-E), el DAPI es un colorante fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en adenina y timina del DNA. Se observó la fluorescencia de DAPI (color azul), concentrada en una parte específica del protoplasto, señalada en la figura 16B, esta fluorescencia se traslapa con la fluorescencia de GFP (Figura 16B-D), lo cual corroboró que SOG1 se encuentra en núcleo de protoplastos provenientes de las hojas de la roseta.

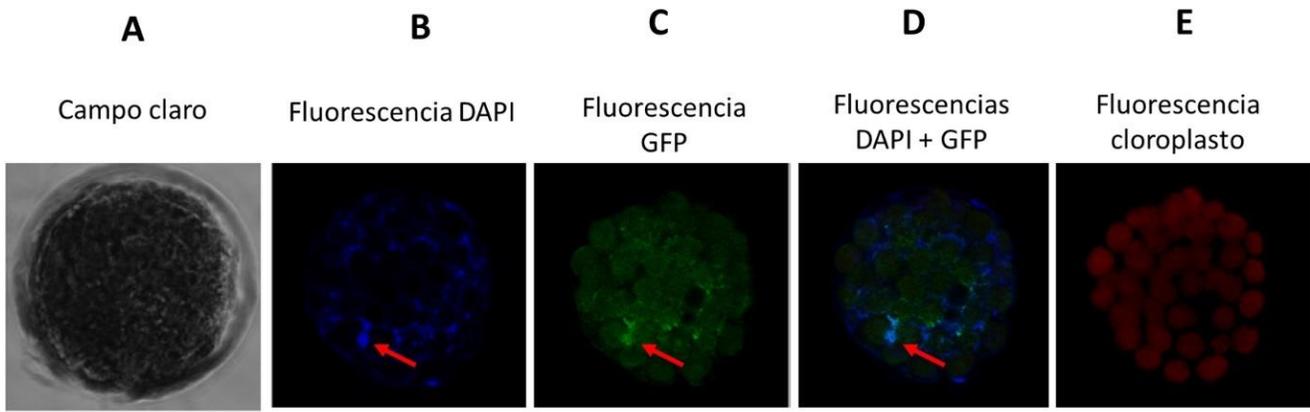


Figura 17. Localización de SOG1 en núcleo teñido con DAPI. A) protoplasto en campo claro B) fluorescencia de DAPI C) fluorescencia de GFP D) Traslape de fluorescencias de DAPI y GFP E) autofluorescencia de cloroplasto.

6.3. Identificación y aislamiento de las regiones codificantes de los genes *ATM* y *ATR* de *A. thaliana*.

Para obtener el fragmento codificante de los genes de las cinasas *ATM* y *ATR* de *A. thaliana*, primero buscamos las secuencias de ambos genes en la base de datos de The Arabidopsis Information Resource (TAIR), Sin embargo, a diferencia del gen de *SOG1* el marco de lectura para ambos genes es de un tamaño mayor a 10 kb lo que complica su aislamiento directo del DNA genómico, por lo tanto, se decidió aislar únicamente las regiones codificantes de cada gen.

6.3.1. Estructura de los genes *AtATM* y *AtATR*

En la figura 17 se muestra la estructura de los genes *AtATM* (AT3G48190.2) y *AtATR* (AT3G40820.1), las cuales se obtuvieron de TAIR Arabidopsis. El ORF de *AtATM* tiene una longitud de 27,265 pb y está conformado por 79 exones y 78 intrones (Figura 17a), mientras que su cDNA corresponde a 9,042 pb. En el caso del gen *AtATR* su ORF es de 11,171 pb (Figura 17b), el cual tiene 15 exones y 14 intrones, mientras que su cDNA corresponde a 8,112 pb.

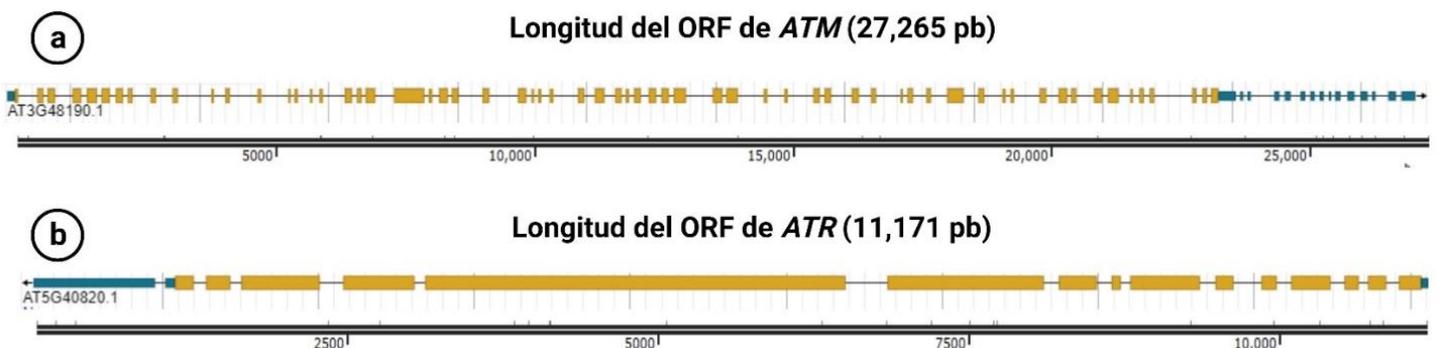


Figura 18. Mapas de los ORFs de los genes *ATM* y *ATR*. a) Longitud del DNA genómico de *ATM* (AT3G48190.1) de 21,265 pb b) Longitud del DNA genómico de *ATR* (AT3G40820.1) de 11,171 pb. Figuras e información tomada de TAIR Arabidopsis.

6.3.2. Aislamiento de las regiones codificantes de *AtATM* y *AtATR*.

Para aislar las regiones codificantes de los genes *AtATM* y *AtATR*, se extrajo RNA total para sintetizar cDNA y aislar por PCR las regiones codificantes de 9,042 pb para *ATM* y 8,112 pb para *ATR*. Ambos cDNAs son de un tamaño considerable para ser fácilmente amplificados en una sola reacción de PCR, por lo que se planteó una estrategia en la cual se pudieran obtener en dos partes los fragmentos codificantes de *ATM* y *ATR*, para posteriormente ser unidas por ensamble de Gibson y así obtener el fragmento codificante completo (figura 18).

El cDNA para *ATR* se fraccionó en dos partes para obtener el primer fragmento de *ATR* correspondiente a 3,636 pb y el segundo fragmento de *ATR* de 4,921 pb (Figura 18a). También el cDNA para *ATM*, se fraccionó en dos partes, el primer fragmento del gen de *ATM* corresponde a 4,921 pb y el segundo fragmento del gen *ATM* a 4,155 pb (Figura 18b).

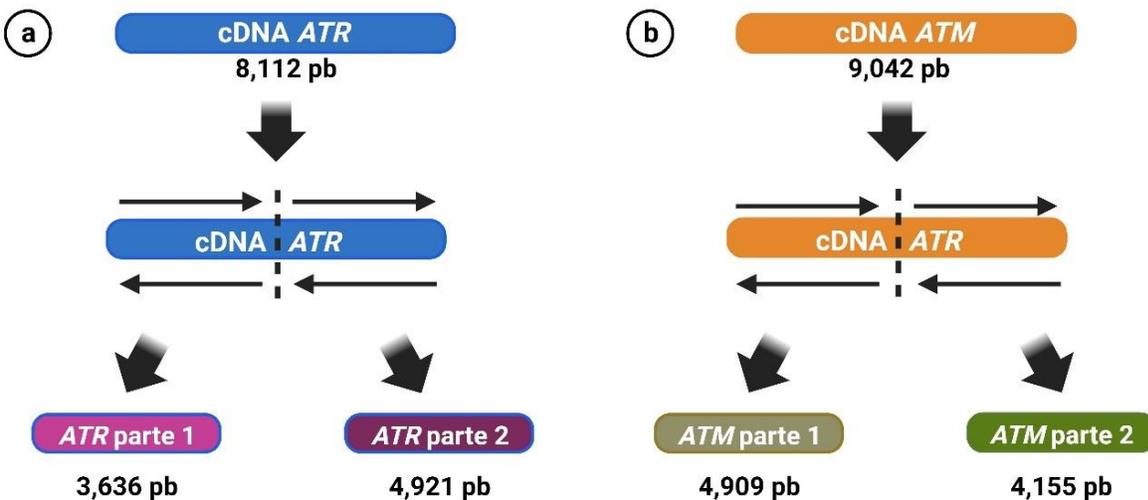


Figura 19. Estrategia de obtención por fragmentos de los genes correspondientes a las cinasas *ATM* y *ATR* a partir de cDNA. a) Obtención de *ATM* en dos fragmentos a partir de cDNA b) obtención de *ATR* en dos fragmentos a partir de cDNA.

Se esperaba que a través de una PCR convencional y con polimerasas comerciales obtener los fragmentos sin mayores complicaciones con la estrategia descrita, situación que se complicó al implementarla, ya que se obtuvieron concentraciones extremadamente bajas de los fragmentos de las cinasas lo que imposibilitaba clonaras dentro del vector pJET1.2/Blunt. El único fragmento que se logró amplificar con éxito y en concentraciones aptas para su clonación en el vector de almacenamiento fue el primer fragmento de cDNA de *ATM* correspondiente a 4,909 pb (Figura 19b-d).

Debido a que no se pudieron obtener amplificaciones de los demás fragmentos con una reacción de PCR convencional como se planteó, se diseñó una estrategia de PCR anidada la cual es una técnica que reduce la amplificación inespecífica de la secuencia blanco dentro del DNA, aumentando la sensibilidad y especificidad para obtener la amplificación esperada. Este protocolo se realizó en dos recciones de PCR sucesivas, en la primera se utilizaron oligonucleótidos que abarcaron secuencias que flanquean por ambos extremos la secuencia blanco (por ello nombramos a los oligonucleótidos de esta primera reacción como “outer” cuya traducción del inglés es fuera). Después de la primera reacción, se realizó una segunda reacción sobre el producto de la primera PCR con oligonucleótidos que se unen a la secuencia objetivo dentro de la secuencia amplificada de la primera PCR (de ahí que el nombre clave de los oligonucleótidos se nombran “inner” por su traducción en inglés dentro). Por ello se diseñaron oligonucleótidos “outer” e “inner” siguiendo esta estrategia de obtención por fragmentos de los cDNAs tanto de *ATM* (Figura 19c) y *ATR* (Figura 20a-c). En el caso de *ATM* sólo aplicó la PCR anidada para para obtener el segundo fragmento de *ATM* (Figura 19c), logrando amplificar este fragmento de 4,175 pb (Figura 19e).

Para *ATR* se aplicó la PCR anidada para obtener ambos fragmentos del gen (Figura 20a-c) en la primera reacción de PCR se utilizó el cDNA total como templado y los oligonucleótidos “outer” correspondientes a cada fragmento; el producto de esta reacción se empleó como templado para las segundas reacciones de PCR con los oligonucleótidos “inner” de cada fragmento. El resultado fue la amplificación del primer fragmento de *ATR* de 3,620 pb (Figura 20d) y el segundo fragmento de *ATR* de 4,927 pb (Figura 20e).

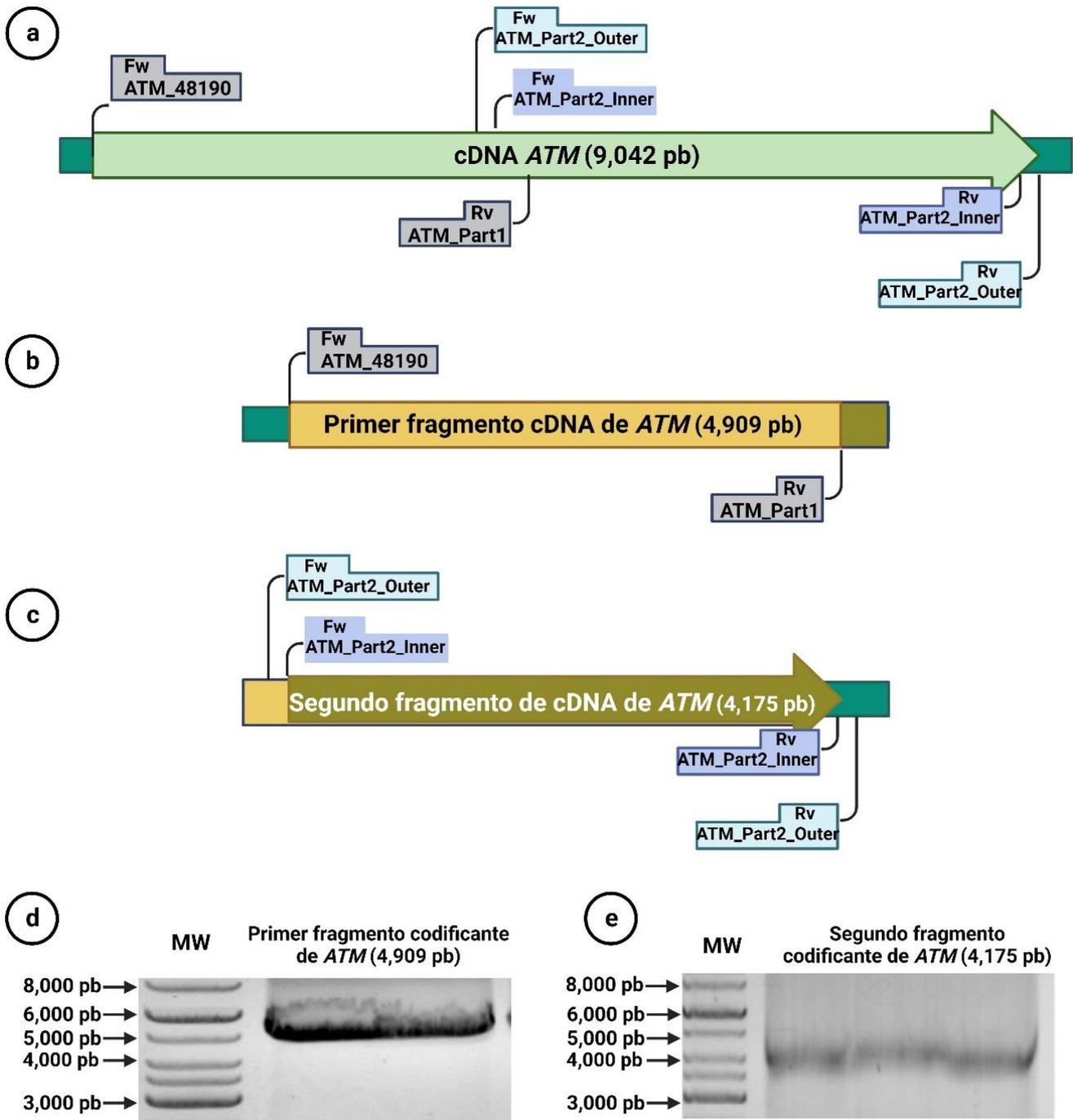


Figura 20. Estrategia de obtención de los fragmentos codificantes correspondientes al gen *AtATM* a partir de cDNA. a) Fragmento codificante del gen *ATM* y localización de los oligonucleótidos utilizados para su aislamiento por fragmentos. b) Obtención del primer fragmento de cDNA de *ATM* por PCR convencional. c) Obtención del segundo fragmento de cDNA de *ATM* por PCR anidada. d) Resultado de la PCR convencional para la obtención del primer fragmento de cDNA de *ATM* en un gel de agarosa 1 %. e) Resultado de la PCR anidada para la obtención del segundo fragmento de cDNA de *ATM* en un gel de agarosa 1 %.

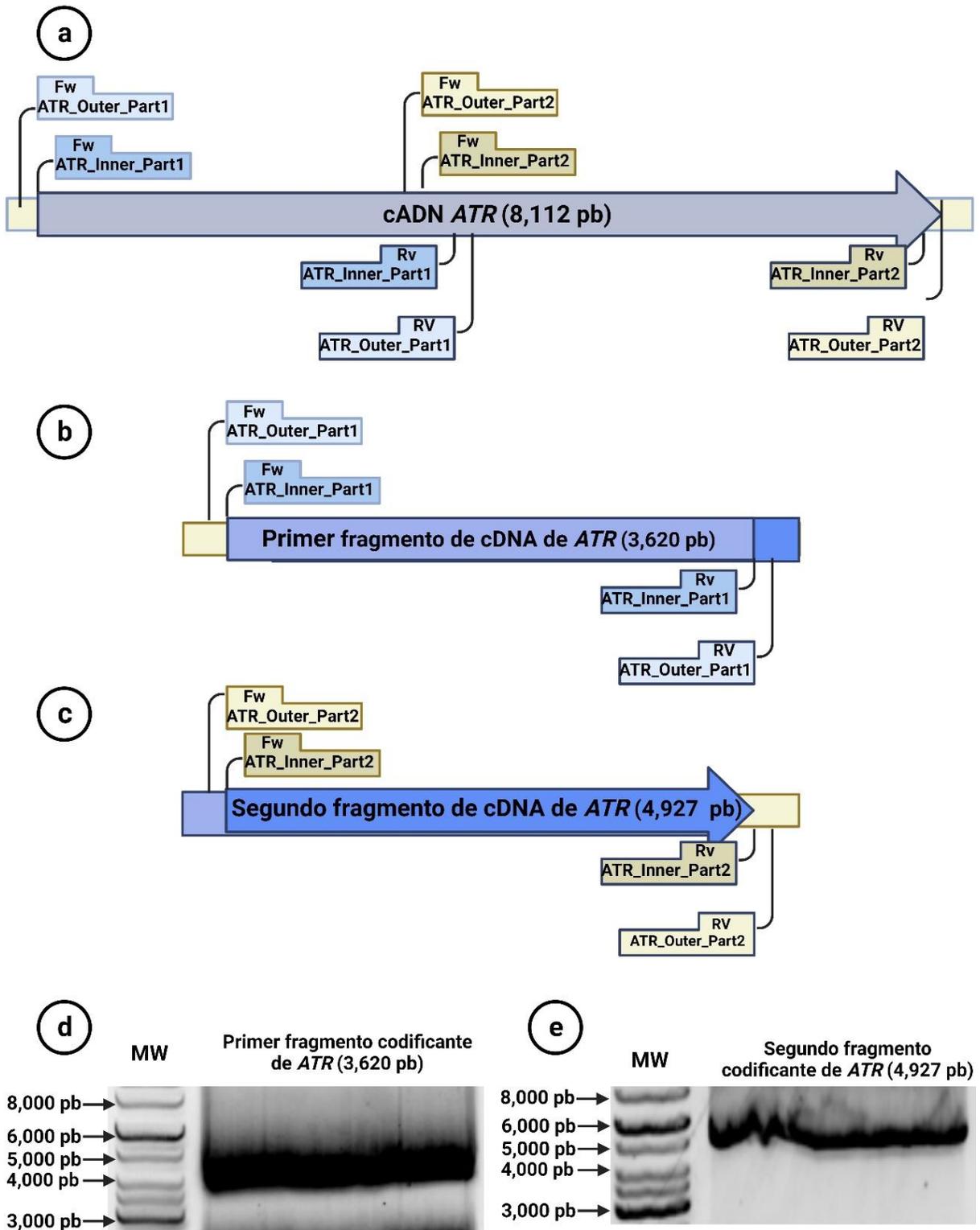


Figura 21. Estrategia de obtención de los fragmentos codificantes correspondientes al gen *ATR* a partir de cDNA. a) Fragmento codificante del gen *ATR* y localización de los oligonucleótidos para su aislamiento por fragmentos. b) Obtención del primer fragmento de cDNA de *ATR* por PCR anidada. c) Obtención del segundo fragmento de cDNA de *ATR* por PCR anidada. d) Resultado de la PCR anidada para la obtención del primer fragmento de cDNA de *ATR* en un gel de agarosa 1 %. e) Resultado de la PCR anidada para la obtención del segundo fragmento de cDNA de *ATR* en un gel de agarosa 1 %.

6.3.3. Clonación en el vector pJET de los fragmentos codificantes de *AtATM* y *AtATR*.

Los fragmentos de DNA obtenidos de las PCRs fueron purificados y cuantificados, para posteriormente ser clonados en el vector pJET1.2/Blunt para el almacenaje de las secuencias. Para los fragmentos del cDNA de *ATM* los mapas de los plásmidos *pJET1.2::ATM_Part1* y *pJET1.2::ATM_Part2* se muestran en figura 21a-b junto con la localización de las enzimas de restricción que se utilizaron para verificar la identidad de las secuencias clonadas. Los ensayos de restricción de ambos plásmidos se modelaron *in silico* usando SnapGene (Figura 21c-d), para la digestión del plásmido *pJET1.2::ATM_Part1* se usó la enzima de restricción *XhoI*, mientras que para el plásmido *pJET1.2::ATM_Part2* se empleó la combinación de las enzimas *XhoI* y *NdeI*. Se seleccionaron de 12 a 18 colonias transformantes de cada construcción para lograr encontrar una colonia de cada construcción con el patrón de restricción esperado, cuyo patrón de restricción experimental de la correspondiente colonia seleccionada se muestra en la figura 20e.

Los mapas de los plásmidos *pJET1.2::ATR_Part1* y *pJET1.2::ATR_Part2* se muestran en la figura 22a-b, de igual forma se realizó un análisis restricción *in silico* en SnapGene para cada construcción (Figura 22c-d). Para el plásmido con la primera parte del cDNA de *ATR* se realizó la digestión con la enzima *NdeI* mientras que para el vector *pJET1.2::ATR_Part2* se utilizó *HindIII* (Figura 22a-e). Se analizaron por restricción plásmidos purificados de 10 a 12 colonias de cada construcción para encontrar al menos una colonia con el patrón de restricción esperado. La restricción experimental de los plásmidos provenientes de las colonias seleccionadas se muestra en la figura 22e.

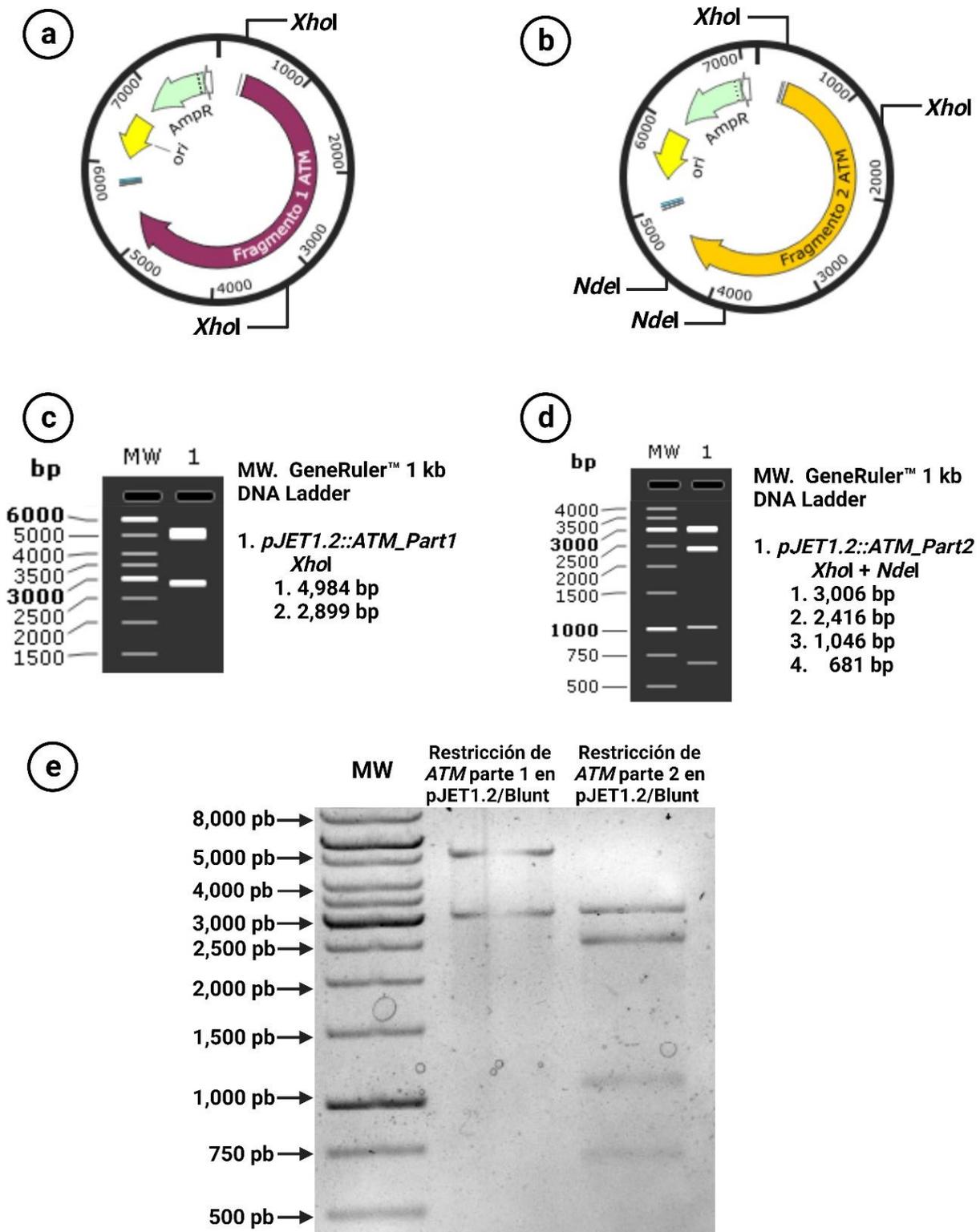


Figura 22. Ensayo de restricción para comprobar que los fragmentos de cDNA de *ATM* se clonaron en el vector de almacenamiento pJET1.2/Blunt a-b) Mapas *in silico* de la construcciones pJET1.2::ATM_Part1 y pJET1.2::ATM_Part2, mostrando la localización de las enzimas de restricción empleadas. c-d) Ensayos de restricción *in silico* para pJET1.2::ATM_Part1 con *XhoI* y pJET1.2::ATM_Part2 usando *XhoI* + *NdeI*. e) Resultado experimental de los ensayos de restricción de los plásmidos en gel de agarosa 1 %.

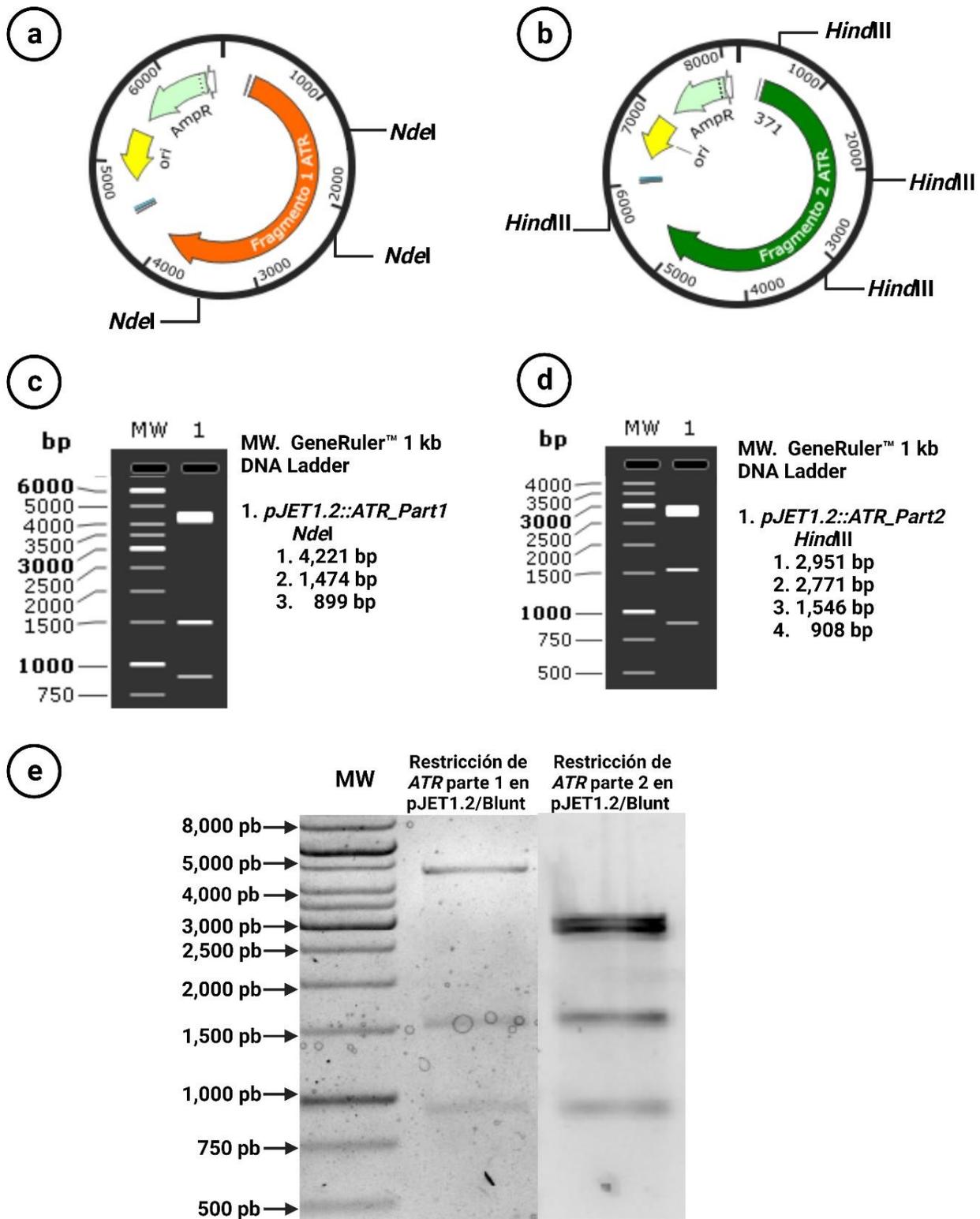


Figura 23. Ensayo de restricción para comprobar que los fragmentos de cDNA de *ATR* se clonaron en el vector de almacenamiento pJET1.2/Blunt. a) a-b) Mapas *in silico* de la construcciones pJET1.2::ATR_Part1 y pJET1.2::ATR_Part2, mostrando la localización de las enzimas de restricción empleadas. c-d) Ensayos de restricción *in silico* para pJET1.2::ATR_Part1 con *NdeI* y pJET1.2::ATR_Part2 usando *HindIII*. e) Resultado experimental de los ensayos de restricción de los plásmidos en gel de agarosa 1 %.

6.3.4. Secuenciación de los fragmentos clonados.

Una vez clonados los fragmentos de cDNA de los genes *ATR* y *ATM* en el vector pJET1.2 de almacenamiento. Estos fueron secuenciados completamente por la tecnología Oxford Nanopore. El análisis de las secuencias resultantes indicó que el plásmido *pJET1.2::ATM_part1* contiene dos inserciones de DNA de 21 y 33 pares de bases no presentes en la secuencia de cDNA reportada en la base de datos de TAIR Arabidopsis (<https://www.arabidopsis.org>). Sin embargo, al alinear la secuencia de la parte 1 de *ATM* con la secuencia de DNA genómico del gen *ATM* (AT3G48190), se identificó que la secuencia de 21 bases corresponde a la parte final del intrón 10, mientras que la inserción de 33 bases esta alineada con la parte final del intrón 11. Aunque estas inserciones no rompen el marco de lectura abierto, si fueron bases que se agregaron en múltiplos de tres, sí insertan tanto en el primer como en el segundo caso uno y dos codones de paro respectivamente. Con base en este resultado, se buscará amplificar la parte 1 de *ATM* bajo la metodología de PCR anidado, la cual funcionó bien en la parte 2 de *ATM*, debido a que no se encontraron mutaciones en la secuenciación. El gen *ATR* (AT5G40820), al igual que con *ATM*, fue aislado en dos partes usando PCRs anidados y los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector pJET1.2. La secuenciación en primera instancia se hizo por tecnología de Oxford Nanopore y se verificaron algunas regiones por secuenciación de Sanger, los resultados obtenidos indicaron que la parte 1 de *ATR* presenta una deleción de 3 bases (GCA), lo que implica la eliminación de un aminoácido (alanina), pero manteniendo el marco de lectura correcto. Mientras que la secuencia de la parte 2 de *ATR* presentó una mutación silenciosa que no modifica la secuencia de aminoácidos. Dado que las dos partes de *ATR* son correctas en secuencia, se continuará con el ensamble de estos fragmentos de DNA por ensamble de Gibson para su posterior clonación en un vector de expresión.

7. DISCUSIÓN

1. Potencial función más allá del núcleo del factor de transcripción SOG1 y las cinasas ATR y ATM.

En el presente trabajo se generaron herramientas moleculares como la generación de la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* y el aislamiento de las regiones codificantes de los genes de las cinasas ATR y ATM de *Arabidopsis thaliana*. La generación de construcciones que contengan las regiones codificantes de estos reguladores maestros de la respuesta al daño al DNA (DDR) fusionados a la proteína marcadora GFP nos permitirá obtener evidencia experimental si estos componentes, que son conocidos por su papel en el núcleo también podrían localizarse en mitocondrias y cloroplastos, como ocurre con ATM y p53 (análogo funcional de SOG1) de mamíferos y levaduras, los cuales también se localizan en mitocondrias. En años recientes se han tenido importantes avances en la comprensión de la DDR en el núcleo de células meristemáticas de raíz (Hu et al., 2016; Nisa et al., 2019; Pedroza-García et al., 2021), sin embargo, aún se desconoce como ocurre el mantenimiento de la integridad del DNA de los organelos y la señalización retrograda que sucede entre organelos-núcleo para responder a las lesiones en el DNA de cloroplasto y mitocondria. En plantas, las mitocondrias y los cloroplastos son la fuente de energía celular para permitir el adecuado desarrollo y crecimiento, por lo que comprender como se mantiene la integridad de los DNA organelares resulta primordial. Nosotros hemos hipotetizado que estos 3 reguladores maestros de la DDR podrían tener una función primordial en mantener la estabilidad de núcleo, mitocondrias y cloroplastos.

2. El factor de transcripción SOG1 de *A. thaliana* presenta localización en mitocondria y cloroplasto.

La construcción *promSOG1::SOG1-GFP* que se obtuvo en el presente trabajo, se utilizó para hacer expresión transitoria en protoplastos provenientes de hojas de la roseta de plantas silvestres de *A. thaliana*, nuestros resultados mostraron que SOG1 además de tener la localización nuclear esperada, como había sido previamente reportado en células meristemáticas de raíz (Yoshiyama et al., 2013), también tiene una clara localización en cloroplastos y mitocondrias. Estos resultados no eran fácilmente predecibles con el análisis de secuencias del gen o la proteína, debido a que carece de algún péptido de tránsito a organelos adicional a la secuencia NLS de localización nuclear (Mahapatra & Roy, 2020). Aunque p53 de

mamíferos y levaduras, que es el factor de transcripción con función análoga a SOG1, se localiza en mitocondrias y tiene múltiples funciones para mantener la integridad de la mitocondria independientes de la transcripción en núcleo tales como: 1) la inducción de la apoptosis al inhibir proteínas con actividad antiapoptótica al interactuar con estas; 2) p53 contribuye a la liberación de citocromo C, lo cual activa a caspasas desencadenando la mitofagia para eliminar mitocondrias dañadas (Comel et al., 2014; Taylor et al., 2008) y 3) p53 interactúa directamente con el DNA mitocondrial y con proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del DNA de este organelo (Park et al., 2016). A nivel de secuencia entre SOG1 y p53 no existe homología por lo que resulta bastante intrigante como es que ocurrió la evolución de los mecanismos de la DDR en el caso de este mediador, a pesar de no tener similitud en sus secuencias y dominios en las proteínas ambos factores de transcripción son activados en respuesta a daño al DNA por la fosforilación directa de los correspondientes ortólogos de las cinasas ATR y ATM, aún más interesante es que varios de los genes blancos de SOG1, sus ortólogos en mamíferos son blancos de p53, en ambos casos inducen la transcripción de genes implicados en mecanismos de reparación celular, la detención transitoria de la división celular y en acumulación severa de daño se inducen genes implicados en la muerte celular programada (Mahapatra & Roy, 2020). Además de todas estas funciones compartidas en el núcleo entre p53 y SOG1, nosotros hemos obtenido la primera evidencia de que probablemente también comparten funciones para mantener la integridad genómica en mitocondria y aún más interesante, en plantas, SOG1 también podría estar contribuyendo a mantener la integridad genómica en cloroplastos. Muchas de las funciones de p53 en mitocondria depende de la interacción con otras proteínas, desde su localización en mitocondria necesita ser translocada con ayuda de otras proteínas (Blandino et al., 2020), por lo tanto, resultará primordial determinar con que proteínas interactúa SOG1 para su translocación a mitocondria y cloroplasto, así como otras proteínas que permitieran realizar potenciales funciones en estos organelos.

Hasta ahora, en *A. thaliana*, únicamente se había asociado una función de la señalización dependiente de ATM-SOG1 en la comunicación entre cloroplastos y núcleo por la acumulación de ROS generados en estos organelos, la producción de ROS activó a la cinasa ATM y las vías de la DDR (Yi et al., 2014) y la alteración en la función del cloroplasto indujo la expresión de genes blancos de SOG1 (Benhamed et al., 2014), algunos de los cuales podrían estar involucrados en la protección o reparación del DNA de organelos. La interpretación de estos

datos fue que las vías de señalización retrograda son activadas por daño al DNA del cloroplasto, acumulándose ROS desencadenando la actividad de SOG1 y probablemente ATM en núcleo, influyendo en la regulación del ciclo celular y la entrada a endociclo (Duan et al., 2020). No obstante, nuestros resultados de localización subcelular en cloroplasto y mitocondria indican nuevas funciones de SOG1 en estos organelos para mantener su integridad genómica más allá de su función como factor de transcripción en el núcleo. Interesantemente, alrededor de los 80 % de protoplastos observados mostraron que SOG1-GFP se localizó homogéneamente dentro de los cloroplastos, mientras que en un 20 % se concentró su localización en subcompartimentos dentro de los cloroplastos, los cuales podrían tratarse de los nucleoides de estos organelos, por lo que pudiera estar SOG1 interactuando directamente con el DNA organelar o sus proteínas involucradas en su reparación, como sucede con p53 cuando hay daño al DNA en mitocondria (Park et al., 2016). Por lo tanto, será una prioridad determinar si realmente SOG1 se une al DNA en los nucleoides de cloroplastos y si esto depende de la acumulación de daño en el DNA de estos organelos. Asimismo, será importante determinar si la localización de SOG1 en mitocondria y/o cloroplasto es tejido específico en hojas de roseta o también se puede observar en meristemas de raíz u otros tejidos.

Finalmente, cabe mencionar que en plantas se han reportado alrededor de 30 factores de transcripción (TFs) que se encuentran fuera del núcleo y solo se activan y relocalizan al núcleo en respuesta a estreses bióticos y abióticos; estos factores de transcripción pueden encontrarse en el citosol o asociados a retículo endoplasmático y membrana celular (Marathe et al., 2024). Se ha reportado hasta ahora 3 factores de transcripción con localización en núcleo y cloroplasto en plantas, entre estos se encuentra el factor de transcripción NAC102 (*Arabidopsis* NAC transcription factor 102), el cual es de la misma familia de TFs de SOG1, se ha demostrado que ANAC102 es inducido por ROS generadas por exceso de luz o en respuesta al tratamiento con β -cyclocitral, el cual es un componente de la señalización de plastidio, la mutante muestra defecto en la respuesta a β -cyclocitral, indicando que ANAC102 media la señalización en el plastidio río abajo del estrés fotooxidativo (Krupinska et al., 2020). Por lo tanto, SOG1 sería el cuarto factor de transcripción que se encuentra en núcleo y cloroplasto, el cual además también tiene localización mitocondrial. Este hallazgo abre múltiples nuevas líneas de investigación de cómo ocurre la comunicación en respuesta a daño al DNA en organelos hacia núcleo y viceversa, pudiendo ser SOG1 quien coordina física y directamente tal comunicación.

3. ¿ATM y/o ATR de Arabidopsis coordinan la comunicación entre cloroplasto/mitocondria a núcleo en DDR en organelos?

Existe evidencia acerca de la conexión entre la DDR y la función de la mitocondria en mamíferos, en específico se ha demostrado que ATM controla la respuesta mitocondrial al daño del DNA nuclear (Shimura et al., 2017) y contribuye a mantener el número de copias de DNA mitocondrial bajo condiciones normales de crecimiento en fibroblastos (Eaton et al., 2007). Asimismo, se ha demostrado que esta cinasa se puede encontrar asociada con las mitocondrias y su ausencia resulta en afectaciones en la función de la mitocondria, más recientemente se reportó que ATM se localiza dentro de la mitocondria en miocitos cardiacos bajo condiciones normóxicas y en específico está asociada a la membrana interna mitocondrial, sugiriendo una interacción entre ATM y la cadena transportadora de electrones (Blignaut et al., 2019). En el caso de ATR de mamíferos, se ha reportado que tiene actividad anti apoptótica en la mitocondria en respuesta a daño por luz UV, ATR contiene un dominio parecido a BH3 que le permite su interacción con la mitocondria suprimiendo la liberación de citocromo C y apoptosis (Hilton et al., 2015).

Hasta la fecha, en plantas, se desconoce si los ortólogos de ATM y/o ATR se localizan en mitocondria y/o cloroplasto y si participan en la regulación de mecanismos para mantener la integridad de estos organelos. En 2017, se reportó que el amino terminal de ATM podría estar interactuando con RUG3, una proteína mitocondrial, y que esta interacción ocurría en el interior del organelo (Su et al., 2017). Sin embargo, la proteína que había sido identificada como ATM en este estudio no corresponde al ID del gen correcto, por lo tanto, aún no existe evidencia experimental de una localización diferente a la nuclear de alguna de las 2 cinasas. ATM de Arabidopsis es activada en respuesta a ROS (Yi et al., 2014; Duan et al., 2020), pero se desconoce como ocurre la señalización.

En este trabajo nos propusimos aislar las regiones codificantes de los genes de *ATR* y *ATM*, hasta ahora no existe reportes con construcciones que cuenten con toda la región codificante de cada gen, muy probablemente se deba al tamaño de estos que rebasan los 8 Kb lo cual dificulta su aislamiento. Las regiones codificantes lograron aislarse en 2 fragmentos que posteriormente se unieron mediante reacciones de Gibson y que se pretendía que las construcciones expresaran a las proteínas completas fusionadas a GFP, esto permitirá evaluar en protoplastos las localizaciones subcelulares de ATR y ATM en mitocondria y/o cloroplastos. De los 2 fragmentos aislados del cDNA de *ATR* coincidieron con las secuencias esperadas,

mientras que el primer fragmento de *ATM* que se amplificó encontramos un evento de splicing alternativo que incorporó 2 codones de paro, por lo que deberá aislarse nuevamente este fragmento. Será interesante evaluar si este splicing observado es parte de la regulación de la expresión de la cinasa. Además, la clonación de las regiones codificantes completas nos permitirá obtener las proteínas recombinantes para su caracterización *in vitro* que hasta la fecha no se ha realizado.

Uno de los principales retos en la actualidad es la pérdida de productividad en plantas de interés agronómico debido al cambio climático, por lo que la comprensión de los mecanismos moleculares de como las plantas muestran resiliencia a condiciones adversas en su ambiente podría ayudar a desarrollar novedosas estrategias biotecnológicas para hacer frente a las pérdidas de rendimiento. Por lo tanto, revelar los mecanismos que controlan la DDR representan un campo de estudio fundamental para lograr tal propósito.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con el desarrollo de este trabajo de investigación se ha logrado obtener la construcción *promSOG1::SOG1-GFP* y establecer el protocolo de generación y transformación de protoplasto de hojas de Arabidopsis, lo cual nos permitió determinar que el factor de transcripción SOG1 presenta localización en mitocondrias y cloroplastos, además de su localización esperada en núcleo. Lo cual ha dejado abiertas múltiples preguntas para ser abordadas ¿SOG1 coordina directamente la señalización retrógrada para salvaguardar la integridad de los genomas de los organelos? ¿Cuáles son las funciones de SOG1 en organelos que son independientes de su actividad de factor de transcripción en núcleo? ¿Los mecanismos regulados por p53 en mitocondria en mamíferos son parecidos a los controlados por SOG1 en mitocondria/cloroplasto en plantas? ¿SOG1 tiene funciones específicas o compartidas entre mitocondrias y cloroplastos? ¿SOG1 se relocaliza y se une a nucleoides de cloroplastos en respuesta a estrés al DNA organelar? Asimismo, será de suma importancia determinar cuáles son los interactores físicos de SOG1 en mitocondrias y cloroplastos, lo que nos permitirá deducir sus potenciales funciones en estos organelos.

Por otra parte, el aislamiento de las secuencias codificantes completas de los genes de ATM y ATR de Arabidopsis en 2 fragmentos, nos permitirá hacer su ensamble mediante Gibson para posteriormente generar las construcciones con fusiones traduccionales con GFP, lo que nos permitirá determinar si ¿ATM y/o ATR también se encuentran en a cloroplasto y/o mitocondria en respuesta a daño al DNA en organelos como ocurre con sus contrapartes en mamíferos? En paralelo se generarán construcciones que nos permitan expresar y obtener las proteínas recombinantes para la caracterización *in vitro* de ambas cinasas.

La respuesta general que empezaremos a responder es ¿Cuál es el papel molecular de las cinasas ATR y ATM, y del factor de transcripción SOG1 en la coordinación de la señalización retrógrada para salvaguardar la integridad de los genomas de los organelos? Este trabajo represento un avance para responder esta pregunta y las perspectivas que abre el trabajo es caracterizar algunas de las funciones de las cinasas y el factor de transcripción SOG1 en líneas mutantes de *sog1*, *atr* y *atm*, lo que nos permitirá determinar cómo las deficiencias en las vías de señalización de la DDR repercuten en el desarrollo de las plantas en respuesta a estrés en organelos. En estas mutantes se planea que sean sometidas a diferentes tipos de estrés que generen daño general tanto en núcleo y en organelos, así como usando compuestos que generan únicamente daño en el DNA de mitocondria y cloroplastos como son ciprofloxacina y

novobiocina; lo que nos permitirá estudiar la relevancia de estos reguladores maestros en la respuesta al daño en DNA en coordinar la repuesta entre núcleo y los organelos.

Adicionalmente, se evaluará el papel de la fosforilación de SOG1 dependiente de las cinasas ATM y ATR, para determinar si cambios en su fosforilación están involucrados directamente en su potencial papel para mantener la integridad del DNA en mitocondrias y cloroplastos,

9. REFERENCIAS

Ahmed, M. A. A., Miao, M., Pratsinakis, E. D., Zhang, H., Wang, W., Yuan, Y., Lyu, M., Iftikhar, J., Yousef, A. F., Madesis, P., & Wu, B. (2021). Protoplast isolation, fusion, culture and transformation in the woody plant *jasminum* spp. *Agriculture (Switzerland)*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/agriculture11080699>

- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C. I., & Gallego, M. E. (2010). Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22(9). <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078527>
- Benhamed, M., Yoshioka, Y., Domenichini, S., Bourge, M., Soubigout-Taconnat, L., Mazubert, C., Yi, D., Bujaldon, S., Hayashi, H., De Veylder, L., Bergounioux, C., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2014). Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the arabidopsis crumpled leaf mutant. *Plant Physiology*, 166(1). <https://doi.org/10.1104/pp.114.242628>
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T., & Bhatia, S. (2015). Chapter 2 – Plant Tissue Culture. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*.
- Blandino, G., Valenti, F., Sacconi, A., & Di Agostino, S. (2020). Wild type- and mutant p53 proteins in mitochondrial dysfunction: emerging insights in cancer disease. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.05.011>
- Blignaut, M., Loos, B., Botchway, S. W., Parker, A. W., & Huisamen, B. (2019). Ataxia-Telangiectasia Mutated is located in cardiac mitochondria and impacts oxidative phosphorylation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41108-1>
- Bourbousse, C., Vegesna, N., & Law, J. A. (2018). SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.1810582115>
- Carusillo, A., & Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 58, Issue 5, pp. 235–263). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*, 303(5660). <https://doi.org/10.1126/science.1092734>
- Comel, A., Sorrentino, G., Capaci, V., & Del Sal, G. (2014). The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. In *FEBS Letters* (Vol. 588, Issue 16). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.015>
- Culligan, K., Tissier, A., & Britt, A. (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 16(5). <https://doi.org/10.1105/tpc.018903>
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 23, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
- Duan, S., Hu, L., Dong, B., Jin, H. L., & Wang, H. Bin. (2020). Signaling from Plastid Genome Stability Modulates Endoreplication and Cell Cycle during Plant Development. *Cell Reports*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108019>
- Eaton, J. S., Lin, Z. P., Sartorelli, A. C., Bonawitz, N. D., & Shadel, G. S. (2007). Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9). <https://doi.org/10.1172/JCI31604>

- Gibson, D. G. (2017). Gibson Assembly Cloning Guide. *Sgi-Dna*.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- Hilton, B. A., Li, Z., Musich, P. R., Wang, H., Cartwright, B. M., Serrano, M., Zhou, X. Z., Lu, K. P., & Zou, Y. (2015). ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Molecular Cell*, 60(1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008>
- Hu, Z., Cools, T., & De Veylder, L. (2016). Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 67). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111902>
- Jin, S., & Cordes, N. (2019). ATM controls DNA repair and mitochondria transfer between neighboring cells. *Cell Communication and Signaling*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0472-x>
- Krupinska, K., Blanco, N. E., Oetke, S., & Zottini, M. (2020). Genome communication in plants mediated by organelle–nucleus-located proteins. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 375, Issue 1801). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0397>
- Lee, J. H., & Paull, T. T. (2020). Mitochondria at the crossroads of ATM-mediated stress signaling and regulation of reactive oxygen species. In *Redox Biology* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101511>
- Mahapatra, K., & Roy, S. (2020). An insight into the mechanism of DNA damage response in plants - role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vols. 819–820). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111689>
- Manova, V., & Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants – From models to crops. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue OCTOBER). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00885>
- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Marshall, J. J. T., Gowers, D. M., & Halford, S. E. (2007). Restriction Endonucleases that Bridge and Excise Two Recognition Sites from DNA. *Journal of Molecular Biology*, 367(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.070>
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., & Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434(7033). <https://doi.org/10.1038/nature03317>
- Nisa, M. U., Huang, Y., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2019). The plant DNA damage response: Signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00653>
- Ogita, N., Okushima, Y., Tokizawa, M., Yamamoto, Y. Y., Tanaka, M., Seki, M., Makita, Y., Matsui, M., Okamoto-Yoshiyama, K., Sakamoto, T., Kurata, T., Hiruma, K., Saijo, Y., Takahashi, N., & Umeda, M. (2018). Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis. *Plant Journal*, 94(3). <https://doi.org/10.1111/tpj.13866>
- Park, J. H., Zhuang, J., Li, J., Hwang, P. M., & Just, W. (2016). P53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Letters*, 590(7). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12061>
- Paull, T. T. (2015). Mechanisms of ATM activation. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 84). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>

- Pedroza-Garcia, J. A., Domenichini, S., Bergounioux, C., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2016). Chloroplasts around the plant cell cycle. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.10.009>
- Pedroza-Garcia, J. A., Eekhout, T., Achon, I., Nisa, M. U., Coussens, G., Vercauteren, I., van den Daele, H., Pauwels, L., van Lijsebettens, M., Raynaud, C., & de Veylder, L. (2021). Maize ATR safeguards genome stability during kernel development to prevent early endosperm endocycle onset and cell death. *Plant Cell*, 33(8). <https://doi.org/10.1093/plcell/koab158>
- Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., Mazubert, C., Aguilera-Alvarado, P., Drouin-Wahbi, J., Sánchez-Nieto, S., Gualberto, J. M., Raynaud, C., & Plasencia, J. (2019). Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity. *Plant Journal*, 97(3). <https://doi.org/10.1111/tpj.14128>
- Pedroza-Garcia, J. A., Xiang, Y., & De Veylder, L. (2022). Cell cycle checkpoint control in response to DNA damage by environmental stresses. In *Plant Journal* (Vol. 109, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/tpj.15567>
- Saki, M., & Prakash, A. (2017). DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 107). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.050>
- Sauret-Güeto, S., Frangedakis, E., Silvestri, L., Rebmann, M., Tomaselli, M., Markel, K., Delmans, M., West, A., Patron, N. J., & Haseloff, J. (2020). Systematic Tools for Reprogramming Plant Gene Expression in a Simple Model, *Marchantia polymorpha*. *ACS Synthetic Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00511>
- Scientific, T. (2012). CloneJET PCR Cloning Kit. *ThermoScientific*.
- Shimura, T., Sasatani, M., Kawai, H., Kamiya, K., Kobayashi, J., Komatsu, K., & Kunugita, N. (2017). ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*, 16(24). <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1387697>
- Sjogren, C. A., Bolaris, S. C., & Larsen, P. B. (2015). Aluminum-dependent terminal differentiation of the arabidopsis root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *Plant Cell*, 27(9). <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00172>
- Smith, H. L., Southgate, H., Tweddle, D. A., & Curtin, N. J. (2020). DNA damage checkpoint kinases in cancer. In *Expert Reviews in Molecular Medicine* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>
- Spampinato, C. P. (2017). Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 9). <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2436-2>
- Su, C., Zhao, H., Zhao, Y., Ji, H., Wang, Y., Zhi, L., & Li, X. (2017). RUG3 and ATM synergistically regulate the alternative splicing of mitochondrial nad2 and the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43897>
- Szurman-Zubrzycka, M., Nawrot, M., Jelonek, J., Dziekanowski, M., Kwasniewska, J., & Szarejko, I. (2019). ATR, a DNA Damage Signaling Kinase, Is Involved in Aluminum Response in Barley. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01299>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/nrm2312>

- Thada, V., & Cortez, D. (2019). Common motifs in ETAA1 and TOPBP1 required for ATR kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(21). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008154>
- Tu, H. C., Ren, D., Wang, G. X., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Kim, H., Sasagawa, S., Hsieh, J. J. D., & Cheng, E. H. Y. (2009). The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.0808173106>
- Wang, D. B., Kinoshita, C., Kinoshita, Y., & Morrison, R. S. (2014). P53 and mitochondrial function in neurons. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1842, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.015>
- Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. In *Nature Biotechnology* (Vol. 39, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>
- Wong, T. S., Rajagopalan, S., Townsley, F. M., Freund, S. M., Petrovich, M., Loakes, D., & Fersht, A. R. (2009). Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Research*, 37(2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn974>
- Yi, D., Kamei, C. L. A., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K. O., Larkin, J., Van den Daele, H., Conklin, P., Britt, A., Umeda, M., & De Veylder, L. (2014). The Arabidopsis SIAMESE-RELATED cyclin-dependent Kinase Inhibitors SMR5 and SMR7 Regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell*, 26(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118943>
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
- Yoshiyama, K., Conklin, P. A., Huefner, N. D., & Britt, A. B. (2009). Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31). <https://doi.org/10.1073/pnas.0810304106>
- Yoshiyama, K. O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., & Umeda, M. (2013). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Reports*, 14(9). <https://doi.org/10.1038/embor.2013.112>
- Zhang, J., Bellani, M. A., James, R. C., Pokharel, D., Zhang, Y., Reynolds, J. J., McNee, G. S., Jackson, A. P., Stewart, G. S., & Seidman, M. M. (2020). DONSON and FANCM associate with different replisomes distinguished by replication timing and chromatin domain. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17449-1>

ANEXO I

Los plásmidos *New_L3_Full_V2_Venus* y *cTag_eGFP* son parte de la colección OpenPlant Kit (Sauret-Güeto et al., 2020), la cual fue donada por el Prof. Jim Haseloff de la universidad de Cambridge en Reino Unido.

