



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la histona acetilasa *HAM1* durante la
respuesta a daño al DNA en *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Stefan Steckenborn Díaz Coria

Tutor: Dra. Ma. De La Paz Sánchez Jiménez
[Instituto de Ecología](#)

Comité Tutorial: Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Instituto de Ecología y Dr.
Javier Plasencia de la Parra, Facultad de Química

MÉXICO, D. F. Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Académicos

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

El financiamiento para insumos y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación CONACYT 240180, 180380, 167705, 152649 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203113, IN 203214, IN203814.

Este proyecto de maestría fue realizado en el Instituto de Ecología de la UNAM dentro del Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas y fue financiado por una beca de maestría otorgada por el CONACyT para el becario con CVU 549732.

Esta tesis se concluyó gracias al apoyo de becas de los proyectos CONACYT 152649 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203814.

Agradezco al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo para participar en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica.

Agradezco en particular a la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, del Instituto de Ecología, y al Dr. Javier Plasencia de la Parra, de la Facultad de Química, por su asesoría durante la elaboración de este proyecto y por el apoyo técnico que me brindaron.

Agradezco también al Jurado de examen, compuesto por los Doctores Martha Patricia Coello Coutiño (Presidente), Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Vocal), Roberto Coria Ortega (Vocal), Berenice García Ponce de León (Vocal) y Sobeida Sánchez Nieto (Secretario).

Agradecimientos Personales

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

A mi hermanita, por todo tu cariño, por toda la diversión y por todo lo que hemos vivido. También te esperan grandes cosas, y allí estaré para apoyarte y vivirlas contigo.

A mis tíos, Silvia y Hugo, por el interés que han mostrado en mi desarrollo académico.

A mi tutora, por todos tus consejos, tu esfuerzo y por tenerme tanta paciencia. Por todo lo que aprendí gracias a tu asesoría, pues me será de suma utilidad para moldear mi futuro.

A Pamela, Rosario y Emilio, por toda la ayuda, consejos, enseñanzas y nuestros momentos del día a día. Por ser para mí ejemplos de lo que se puede lograr con disciplina y talento.

A Alejandra, Emmanuel y Karla, por compartirme sus experiencias. Por ayudarme a tomar perspectiva en los momentos en los que me sentía agobiado.

A mis amigos, maestros y compañeros del Laboratorio, del Instituto y del Posgrado, por todos los buenos momentos, por todas las enseñanzas y por ser parte de esta magnífica experiencia.

Resumen

Las plantas, al ser organismos sésiles, no pueden escapar del estrés ambiental, el cual puede generar, ya sea de manera directa o indirecta, daño en el DNA. La regulación de la estructura de la cromatina por medio de la acetilación de las histonas es muy importante durante la respuesta al daño al DNA. Se ha reportado en diversos organismos que las histonas acetilasas de la familia MYST desempeñan funciones críticas para la respuesta al daño al DNA; sin embargo aún no se tiene bien estudiada la función de las MYST en plantas. *Arabidopsis thaliana* tiene dos miembros de la familia MYST: HAM1 y HAM2, pero su función no está bien caracterizada, por lo que este proyecto busca determinar la función de HAM1 durante la respuesta al daño al DNA por la ruptura simultánea de sus dos hebras (DSBs). Los resultados obtenidos indican que HAM1 se requiere para una adecuada detención de la proliferación celular y para prevenir la acumulación de marcadores de daño al DNA como CYCB1;1 y la muerte celular programada (PCD) inducida por DSBs, sugiriendo que HAM1 es necesaria para prevenir la acumulación de DSBs. El mecanismo por el cual HAM1 actúa no es muy claro, ya que no parece estar regulando la transcripción de algunos genes de ciclo celular ni de genes de reparación del daño. Aunque a nivel global la marca de acetilación que cataliza HAM1 no parece ser diferente en plantas mutantes en HAM1, es probable que el mecanismo por el que HAM actúa se dé en loci específicos y/o en las regiones de DNA dañado regulando la estructura de la cromatina durante los procesos de reparación.

Índice

1	Introducción.	7
1.1	La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo biológico para el estudio del daño al DNA.	8
1.2	El daño al DNA y su reparación en las plantas	11
1.3	La regulación de la estructura de la cromatina durante la respuesta al daño al DNA.	17
1.4	Antecedentes.	20
2	Hipótesis	25
3	Objetivo general.	26
3.1	Objetivos particulares.	26
4	Materiales y Métodos.	27
4.1	Material biológico.	27
4.2	Condiciones de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	27
4.3	Condiciones de inducción de daño al DNA con Zeocina.	28
4.4	Obtención de las plantas <i>ham1-1 x pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS</i>	28
4.5	Determinación de la expresión del gen de la β -glucuronidasa.	29
4.6	Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.	29
4.7	Elaboración de las plantas transformadas con <i>pHAM1:HAM1:GFP</i> .	29
4.8	Análisis de las raíces mediante microscopía confocal y cuantificación de muerte celular.	30
4.9	Extracción de RNA y RT-PCR.	30
4.8	Ensayo de mutagénesis dirigida	32
4.10	Extracción y cuantificación de proteínas	33
4.11	Electroforesis y transferencia de proteínas.	34
4.12	Western Blot.	34
4.13	Análisis estadísticos empleados.	35
5	Resultados	36
5.1	Análisis del fenotipo y la expresión de las plantas <i>pHAM1:HAM1:GFP</i> .	36
5.2	Efecto de la inducción de DSBs sobre la proliferación en el meristemo radicular de las plantas <i>ham1-1</i> , <i>HAM1:GFP^{242P/S}/ham1-1</i> y <i>HAM1:GFP/ham1-1</i> .	42
5.3	Expresión de genes del ciclo celular durante el daño por DSB en las plantas <i>ham1-1</i> .	45
5.4	Expresión de genes de reparación durante el daño por DSBs en la mutante <i>ham1-1</i> .	47
5.5	Patrón de acetilación global de las histonas H3 y H4 en la mutante <i>ham1-1</i> y en las plantas <i>HAM1:GFP</i> durante el daño por DSBs.	49
5.6	Patrón de expresión de <i>pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS</i> en plantas mutantes <i>ham1-1</i> durante la inducción de DSBs.	52
5.7	Determinación de la muerte celular inducida por DSBs en plantas mutantes <i>ham1-1</i> y en las plantas <i>HAM1:GFP/ham1-1</i> .	54
6	Discusión.	57
6.1	Patrón de expresión de HAM1 en la raíz y su relación con su función.	58
6.2	HAM1 y la proliferación del RAM durante la inducción de DSBs.	60
6.3	HAM1 en la regulación de la expresión de los genes de reparación de DSBs.	62
6.4	Patrón de acetilación global de las histonas H3 y H4 durante la inducción de DSBs.	63

6.5 Acumulación de daño al DNA y de muerte celular bajo condiciones de inducción de DSBs en las plantas <i>ham1-1</i>	64
7 Conclusiones.....	67
8 Referencias.....	68
9 Figuras Suplementarias.....	73
Figura Suplementaria 1.....	73
Figura Suplementaria 2.....	79
Figura Suplementaria 3.....	85

Abreviaturas

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

1 Introducción.

Las plantas y los animales desarrollaron de manera independiente la multicelularidad como resultado de una convergencia evolutiva, de tal suerte que si bien hay similitudes entre estos grupos, también se presentan estrategias muy diferentes en diversos procesos, como son el desarrollo corporal y la respuesta a estímulos ambientales. Muchas de estas diferencias están en buena medida relacionadas a una característica clave como es la movilidad. Las plantas a diferencia de los animales, son organismos sésiles, por lo que deben de tener una gran capacidad para integrar las respuestas a cambios ambientales y a distintos tipos de estrés para poder adaptarse a diferentes ambientes (Friesner & Britt 2003, Molinier *et al* 2005, Tuteja *et al* 2009, Yoshiyama *et al* 2013a).

La respuesta de daño al DNA es un ejemplo claro de las diferencias que existen entre plantas y animales; si bien pueden encontrarse similitudes principalmente a nivel molecular en relación con las proteínas que se encargan de detectar e iniciar la respuesta al daño (Yoshiyama *et al* 2013b), las estrategias para prevenir, sobrellevar y reparar el daño son bastante diferentes. ¿Cuáles son y cómo funcionan estos mecanismos en las plantas?, ésta es una pregunta cuya respuesta es muy amplia y compleja; sin embargo, recientemente se ha enfatizado la importancia que la epigenética y/o la remodelación de la cromatina tienen en los mecanismos de respuesta de daño al DNA, lo que podría estar contribuyendo a la plasticidad de las plantas. En particular, se ha reportado que se requiere de la acetilación de las histonas para que se dé una adecuada respuesta ante este tipo de daño (Campi *et al* 2012). De allí la importancia de estudiar a las acetilasas de histonas que podrían estar implicadas en esta respuesta. Por lo que el objetivo de este proyecto es definir la función que tiene la acetilasa de histonas “Histone Acetyltransferase of the MYST family 1” (HAM1) de *Arabidopsis thaliana* durante la respuesta a las rupturas de doble cadena del DNA.

1.1 La raíz de *Arabidopsis thaliana* como modelo biológico para el estudio del daño al DNA.

Arabidopsis thaliana es una especie modelo en los estudios de genética, evolución y desarrollo, que prácticamente desempeña un papel dentro de la biología de plantas semejante al que desempeñan los ratones y las moscas de la fruta en la biología de animales. A pesar de que esta planta no es importante a nivel agronómico, posee varias características que la hacen interesante al tratar de entender la genética, la biología celular y molecular de las angiospermas. Se ha realizado mucha investigación respecto a su genoma, el cual es pequeño y está repartido en 5 cromosomas. También se ha investigado la función de los aproximadamente 27000 genes que contiene, información que está recopilada en la base de datos www.arabidopsis.org y es de libre acceso. *Arabidopsis* también es fácil de cultivar gracias a su tamaño y a su rápida y abundante producción de semillas. La transformación genética de esta planta es también muy sencilla. Por ejemplo, a través del uso por infiltración de *Agrobacterium tumefaciens* se puede introducir DNA al genoma de la planta y es gracias a esta tecnología que ha sido posible obtener colecciones de plantas mutantes con pérdida o ganancia de función de muchos de sus genes (Koornneef *et al* 2004).

Otro atributo que hace de *Arabidopsis thaliana* un modelo en la investigación es el hecho de que muchos de sus tejidos son fáciles de analizar por medio de técnicas de fluorescencia y de microscopía, esto debido al tamaño relativamente pequeño y a que las estructuras de sus tejidos son visibles con tratamientos de aclaramiento sencillos. Es gracias a dichas técnicas de microscopía que se ha podido estudiar a profundidad la estructura de muchos tejidos de la planta, como es el caso de su raíz.

La estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* es relativamente simple; siguiendo su eje desde la base hasta el ápice, la raíz puede ser dividida en 3 zonas que a su vez representan los estadios de desarrollo de las células que las conforman: la zona de diferenciación, en la cual las células adquieren su estado final de diferenciación; la zona de alargamiento o elongación, en la cual las células dejan de dividirse e inician un rápido proceso de crecimiento; y la zona meristemática, que se encuentra en la región más distal de la raíz y que contiene a las células en un estado de replicación constante (Figura 1A).

La zona meristemática está conformada por un grupo de células que se mantienen en un estado indiferenciado y de proliferación activa (Ivanov & Dubrovsky 2013). El meristemo apical de la raíz (RAM; Root Apical Meristem), permite el desarrollo y

crecimiento de los órganos subterráneos de la planta (Jeong *et al* 2011). Dentro de este meristemo se encuentra el nicho de células troncales a partir del cual se originan los tipos celulares que conforman la raíz. El nicho de células troncales de *Arabidopsis thaliana* se localiza en un microambiente en el que la diferenciación celular se inhibe y se mantiene la proliferación celular por medio de señales intercelulares y ambientales (Bennett & Scheres 2010). Este nicho celular está formado por un grupo de cuatro células troncales llamadas células del centro quiescente (QC), que se caracterizan por tener una tasa de proliferación baja. Son estas células las que dan origen y mantienen en un estado indiferenciado a las células iniciales de la columela, de la epidermis/cofia lateral, del córtex/endodermis, y del haz vascular/periciclo (Estela) (Figura 1B). Las células iniciales se dividen continuamente sin comprometer su estado “prediferenciado” dando origen a los tipos celulares que conforman el patrón radial de la raíz, los cuales están dispuestos de manera concéntrica y se les identifica, de adentro hacia afuera, como el haz vascular (estela), la endodermis, el córtex y la epidermis. En el ápice de la raíz también se encuentra un tejido especial denominado cofia, que está constituido por la columela y la cofia lateral, es este tejido el encargado de proteger a la raíz de los daños mecánicos que podría sufrir a medida que esta crece y penetra en el suelo, además de ser el centro sensor del gravitropismo de la raíz (Figura 1A) (Ivanov & Dubrovsky 2013).

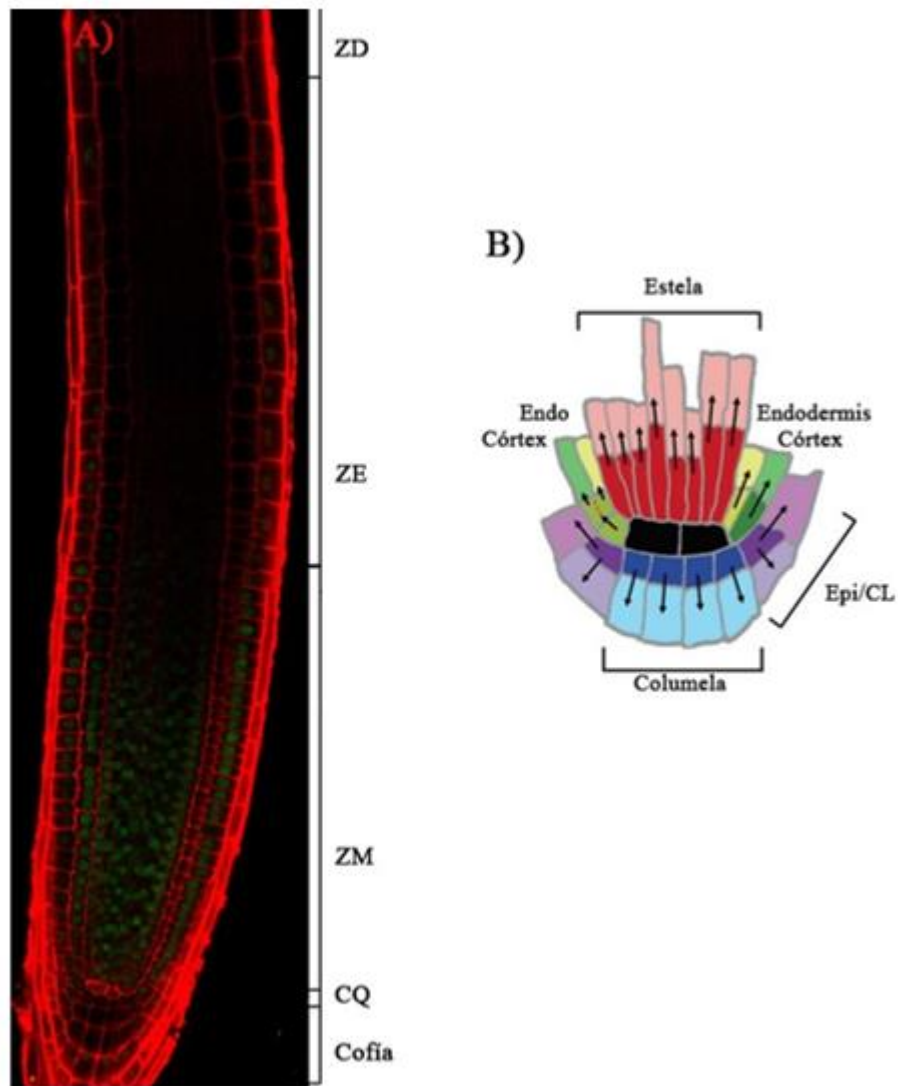


Figura 1. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Representación de las distintas regiones que componen la raíz de *Arabidopsis*, ZM (Zona meristemática), ZE (Zona de Elongación) y ZD (Zona de diferenciación). B) Nicho de células troncales. Las flechas indican los planos de división celular, en negro se aprecia el CQ (Centro quiescente) y en colores a las células iniciales, Epi/CL (Epidermis y Cofia lateral) Endo (Endodermis). (Modificado de Bennett & Scheres 2010).

Por sus características, la raíz de *Arabidopsis thaliana* es un órgano ideal para estudiar células en distintos estadios de desarrollo de manera simultánea, ya que la raíz contiene células troncales, células en proliferación y células diferenciadas que son fácilmente discernibles entre sí. Esto hace que la raíz de *Arabidopsis thaliana* sea un modelo ideal para estudiar los mecanismos de respuesta al daño al DNA, ya que

dependiendo de su actividad y función, cada tipo celular sigue estrategias diferentes para lidiar con éste tipo de daño, por ejemplo, se tiene reportado que las células de tejidos diferenciados, como las hojas, aumentan sus niveles de ploidía para sobrellevar el daño al DNA (Ramirez-Parra & Gutierrez 2007), mientras que las células indiferenciadas de los tejidos meristemáticos inducen muerte celular programada en respuesta a ese mismo estrés (Fulcher & Sablowski 2009).

Otro atributo que hace que *Arabidopsis thaliana* sea un buen modelo para estudiar la respuesta al daño a DNA, es que muchos de los mecanismos de respuesta ante este daño están muy conservados entre animales y plantas; sin embargo muchos de los genes de respuesta al daño al DNA no son esenciales para la sobrevivencia de las plantas bajo condiciones de crecimiento normales, lo que ha permitido estudiar mutantes de pérdida de función para estos genes en plantas a diferencia de los modelos animales, en los cuales no ha sido posible por su letalidad (Bleuyard *et al* 2006).

1.2 El daño al DNA y su reparación en las plantas

1.2.1 Generación y tipos de daño al DNA

Las plantas utilizan al DNA como la base de su información genética, por lo que les es vital mantener su integridad y responder ante el daño al DNA producido por fuentes exógenas y endógenas. Los principales tipos de daño al DNA son: 1) El mal apareamiento de nucleótidos, que puede darse por la tasa de error de la DNA polimerasa, o por reacciones de hidrólisis, alquilación y oxidación que tienen lugar por la exposición a ciertos químicos y metabolitos; 2) Las bases químicamente modificadas, las cuales ocurren por la exposición a especies reactivas de oxígeno, luz UV y radiación ionizante; y 3) Las rupturas del DNA, que pueden ocurrir por la exposición a especies reactivas de oxígeno, radiación ionizante e inclusive a ciertos químicos (Molinier *et al* 2005, Yoshiyama *et al* 2013b). En las plantas hay varias maquinarias que protegen y reparan al DNA que están compuestas por redes extensas de proteínas y vías de señalización. El mal funcionamiento de alguno de los elementos de estas vías acarrea un incremento en la frecuencia de daño al DNA, aumentando el número de mutaciones, las cuales pueden ser transmitidas a su descendencia, o pueden llevar a la pérdida de la homeostasis e inclusive a la muerte del organismo (Boycheva *et al* 2014).

1.2.2 Reparación del daño al DNA

A grandes rasgos los principales mecanismos de reparación del daño al DNA, como la Reparación por Escisión de Bases (BER), la Reparación del mal apareamiento de bases (MMR) y la Reparación por escisión de nucleótido (NER) consisten en la escisión del área dañada y su reemplazo utilizando como molde la hebra complementaria de DNA; sin embargo existen ciertos tipos de daño que por su naturaleza no se pueden reparar con estas estrategias, en consecuencia las plantas han desarrollado mecanismos específicos para lidiar con ciertos tipos de daño al DNA (Friesner & Britt 2003). Un ejemplo de esto, es la reparación de las ruptura simultánea de las dos hebras del DNA o “double-strand breaks” (DSBs)

Las DSBs son uno de los tipos más severos de daño que puede recibir el DNA, ya que se les suele asociar con pérdida de información genética, inversiones y traslocaciones (Gorbunova & Levy 1999). A menudo las DSBs pueden ser inducidas y empleadas por la célula en eventos como la recombinación genética; pero también ocurren de manera indirecta por la exposición a distintos tipos de estrés como temperaturas extremas, disponibilidad de agua, toxicidad iónica y ataque de patógenos, los cuales dan lugar a una acumulación de especies reactivas de oxígeno (Tuteja *et al* 2009), y de manera directa por la exposición a la radiación o a ciertos químicos (Cole *et al* 2010, Molinier *et al* 2005). La reparación de las DSBs involucra cascadas de señalización específicas que llevan a la activación de dos mecanismos de reparación, la reparación no homóloga (RNH) y la reparación homóloga (RH) (Abe *et al* 2009).

1.2.3 Reparación No Homóloga (RNH)

La RNH no requiere la presencia de una cadena homóloga de DNA (Bleuyard *et al* 2006). En este mecanismo se da la religación directa de las DSBs para evitar mayor daño. Los mecanismos de reparación RNH requieren de la participación de un conjunto de proteínas las cuales están altamente conservadas en plantas y animales. Estudios en mamíferos han encontrado que las proteínas Ku 80 y 70, llamadas así por su masa molecular en mamíferos, se unen a los bordes de las DSBs y reclutan a la proteína DNA Protein Kinase (DNAPKcs), una cinasa que activa a la nucleasa Artemis, la cual a su vez procesa los bordes del DNA para que puedan ser ligados por acción de la DNA Ligasa IV y X-ray

repair cross-complementing protein 4 junto con Non-homologous end-joining factor 1 (XRCC4 y XLF, respectivamente) (Figura 2) (Panier & Boulton 2014, Sekiguchi & Ferguson 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado proteínas homólogas para esta vía. Un ejemplo son las proteínas homólogas de Ku70 y Ku80, las cuales incrementan su expresión durante los tratamientos con bleomicina, agente que se intercala en el DNA y promueve la formación de radicales hidroxilo promoviendo las DSBs. Ku70 y Ku80 forman un heterodímero (Tamura *et al* 2002), esencial para realizar la RNH, haciendo a las plantas hipersensibles ante el daño por metilmetanosulfonato (MMS) un agente alquilante que metila el DNA (Gallego *et al* 2003). También se ha reportado que durante tratamientos con radiación gamma, los cuales generan DSBs ya sea por interactuar directamente con el DNA o por medio de la formación de radicales hidroxilo, se presenta un aumento en la expresión de las proteínas homólogas de la DNA Ligasa IV y de XRCC4, las cuales interactúan entre sí (West *et al* 2000).

1.2.4 Reparación Homóloga (RH)

A diferencia de la RNH, la RH utiliza como molde para reparar los DSBs una secuencia homóloga de DNA. En mamíferos se tiene reportado que es necesaria la formación de un complejo llamado MRN por las proteínas Meiotic Recombination 11 (MRE11), Radiation protein 50 (RAD50) y Nibrin (NBS1) para el reconocimiento y señalización en respuesta a DSBs, lo cual lleva a que se reclute a las proteínas RAD52, RAD51 y Breast cancer 1 (BRCA1) para que se unan a los fragmentos recién formados de DNA de hebra sencilla (ssDNA) (San Filippo *et al* 2008) formando el Rad51/ssDNA nucleofilamento, el cual es capaz de invadir una secuencia homóloga de DNA integro que servirá como templado para la reparación del DSB (Figura 2) (Bleuyard *et al* 2006). En mamíferos se tiene reportado que la formación del MRN hace que se reclute a las proteínas RAD52, RAD51 y BRCA1 para que se unan al ssDNA. Muchas de estas proteínas también tienen homólogos en *Arabidopsis*, siendo varias de sus mutantes hipersensibles al daño al DNA, como es el caso de mutantes de pérdida de función para RAD51 y XRCC2, las cuales son hipersensibles al daño causado por uniones entre hebras (Bleuyard *et al* 2005, Bleuyard & White 2004). También existen homólogos de MRE11 y RAD50, los cuales forman el complejo MRX, siendo importantes para la respuesta al daño al DNA, ya que las plantas

mutantes de pérdida de función para estos 2 genes son hipersensibles al daño por MMS (Heacock *et al* 2004).

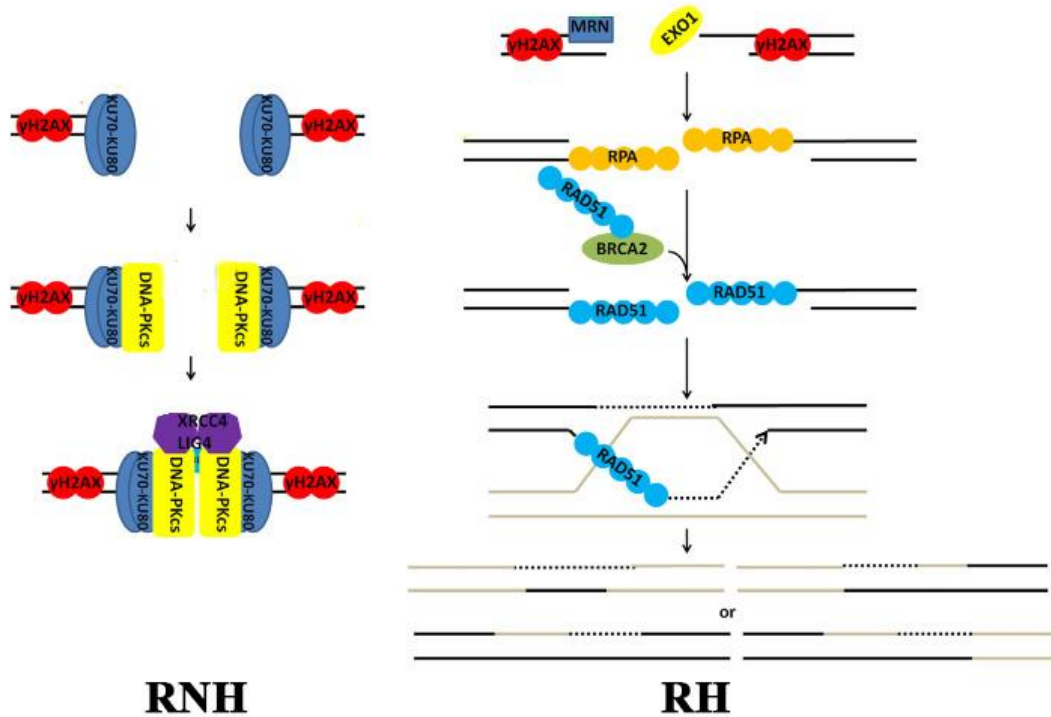


Figura 2. Reparación de las rupturas de doble cadena por reparación no homóloga (RNH) y reparación homóloga (RH). La primera solo reúne los dos fragmentos, la segunda utiliza una secuencia homóloga como templado. En el esquema se muestran las proteínas homólogas a mamíferos identificadas en *Arabidopsis thaliana* (Modificado de Panier & Boulton 2014).

Los mecanismos RH y RNH tienen su manera particular de resolver el daño por DSB. La RNH simplemente reúne los dos extremos de las hebras rotas, por lo que se trata de una vía poco precisa en la cual suelen ocurrir deleciones, a diferencia de la RH, la cual es más fiable porque utiliza un templado de DNA; sin embargo esta última es más lenta, por lo que *Arabidopsis* utiliza con mayor frecuencia la RNH en células somáticas (Bleuyard *et al* 2006), aunque la frecuencia de la RH puede aumentar como resultado de la exposición a otros tipos de estrés, como la luz UV o a parásitos, los cuales llevan al aumento de especies reactivas de oxígeno que a su vez inducen la expresión de los genes implicados en la RH (Molinier *et al* 2005).

1.2.5 Vía de señalización en respuesta a DSBs

La activación de los mecanismos de respuesta y reparación del daño al DNA por rupturas de sus hebras está mediada por la cascada de señalización de las proteínas cinasas ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) y ATM/RAD3-RELATED (ATR) (Figura 3). Antes se pensaba que ATM participaba únicamente durante las rupturas de doble cadena mientras que ATR se activaba durante las rupturas de cadena sencilla, pero ahora se sabe que es común que ocurra un solapamiento de sus actividades (Bleuyard *et al* 2006). Si bien, las plantas mutantes de pérdida de función para estas cinasas son viables en condiciones de crecimiento normales, las mutantes de ATM son hipersensibles a los tratamientos de radiación gamma (Garcia *et al* 2003), mientras que las mutantes para ATR son hipersensibles al daño producido por luz UV (Culligan *et al* 2004). Cuando ocurre el daño al DNA, estas cinasas inician una cascada de señalización que lleva en primer lugar al arresto del ciclo celular y posteriormente a la activación de los mecanismos de reparación (Figura 3). Durante la respuesta al daño al DNA existe una fuerte regulación del ciclo celular. Esta regulación se da tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional y depende también de ATM, ATR y de sus proteínas efectoras. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado inhibidores de las CDKs, como son las proteínas Siamese Related 4 y 5 (SMR4 y SMR5), las cuales se inducen durante los tratamientos de daño al DNA y se postula que participan en el arresto del ciclo celular por daño al DNA por especies reactivas de oxígeno (Yi *et al* 2014); otro ejemplo mejor estudiado es el de WEE1, la cual se activa por ATM y da lugar al arresto del ciclo celular por medio de fosforilaciones a CDKs que ayudan a inhibir su actividad (Yoshiyama *et al* 2013b). Se ha reportado que es gracias a estas dos cinasas, en particular a ATM, que se da una regulación transcripcional muy importante de muchos genes implicados en la regulación del ciclo celular y en la reparación del daño al DNA durante la respuesta al daño al DNA por radiación ionizante (Culligan *et al* 2006, Ricaud *et al* 2007). ATM activa por medio de fosforilaciones a elementos transcripcionales especiales, como el factor transcripcional “Suppressor of Gamma radiation 1” (SOG1), el cual pertenece a la familia de factores NAC (NAM, ATAF y CUC), que son exclusivos de plantas. SOG1 tiene mucha relevancia en la respuesta al daño al DNA en las plantas, pudiendo ser incluso un equivalente al regulador transcripcional maestro p53 de los animales (Yoshiyama *et al* 2013b). Aunque parece no haber una relación evolutiva entre estos dos factores

transcripcionales, su actividad es fundamental para prácticamente todas las respuestas a este tipo de daño, ya que SOG1 disminuye la expresión de los muchos genes del ciclo celular, como *CDKB2;1*, *KNOLLE*, *H4*, *CYC1;2* y *CYCBI;4* y promueve la expresión de los genes implicados en la reparación del daño, lo cual hace que las mutantes de pérdida de función de *SOG1* no puedan inducir muchas de las respuestas ante el daño al DNA (Yoshiyama *et al* 2013a).

ATM y ATR también están implicadas en la muerte celular programada (PCD) por daño al DNA, respuesta para la cual también se requiere a SOG1. Esta respuesta al daño es diferente a las descritas previamente en este texto, ya que este mecanismo elimina a la célula afectada para evitar que esta siga activa o se reproduzca. En animales esta clase de respuesta ante el daño es bastante común, por lo general las células animales tienen una tendencia “suicida” ante el daño al DNA, actividad que realizan por medio de un proceso llamado apoptosis, el cual se inicia por la acción de factores transcripcionales especializados, como el ya mencionado p53, que llevan en última instancia a la degradación de diversos componentes celulares, dando lugar a una muerte celular ordenada (Alberts 2008). Durante mucho tiempo se pensó que las plantas no tenían actividad de PCD inducida por el daño al DNA, ya que no cuentan con todas las proteínas que se encargan de inducir la apoptosis, además de que no desarrollan cáncer; sin embargo hace algunos años se demostró que en las plantas si existe una actividad de PCD en respuesta al daño al DNA, y se da preferencialmente dentro de los nichos de las células meristemáticas (Fulcher & Sablowski 2009). A diferencia de la PCD de los animales, la PCD de las plantas no presenta características apoptóticas, sino más bien autolíticas. Aunque no se sabe que proteínas o genes dan lugar a esta respuesta dentro de las plantas, queda claro que la cascada de señalización inicia también con ATM y ATR y que la actividad de muerte celular programada es independiente de la actividad de arresto del ciclo celular y de los mecanismos de reparación del daño al DNA (Fulcher & Sablowski 2009). La activación de ATM y ATR durante los DSBs puede ocurrir de varias maneras. En mamíferos se tiene reportado que el reconocimiento del DSB por MRN hace que se reclute y active a ATM (Dupre *et al* 2006). También se sabe que BRCA1 puede participar en el reclutamiento de ATM en el sitio del DSB (Kitagawa *et al* 2004). Sin embargo, la regulación en la estructura de la cromatina también juega un papel muy importante en la

activación de estas dos cinasas y en la reparación de las DSBs, como se describirá con mayor detalle en la siguiente sección.

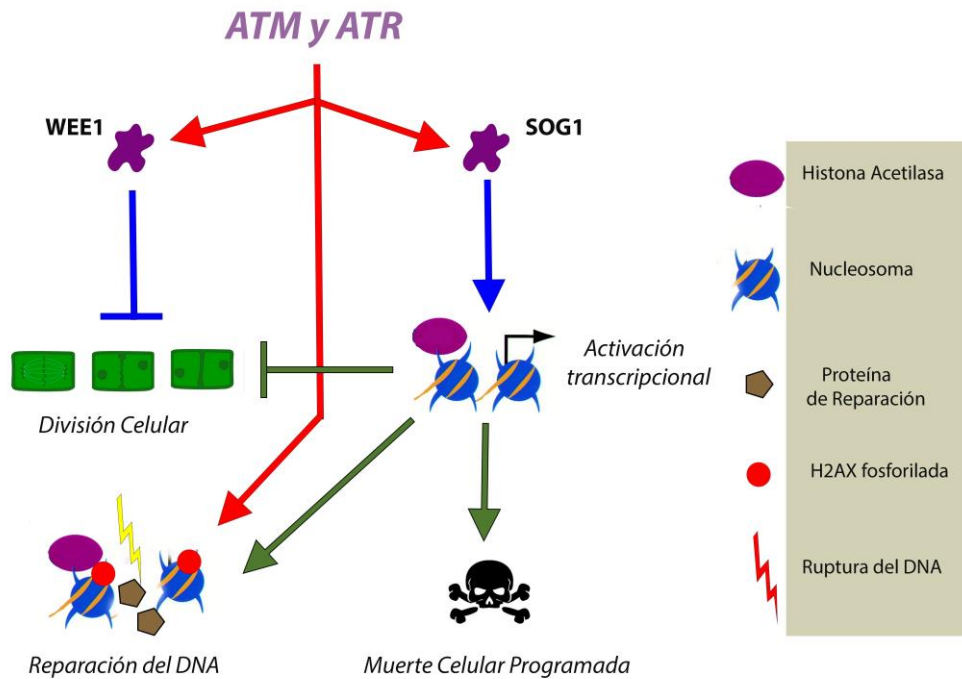


Figura 3. Señalización de ATM y ATR en respuesta a daño al DNA en plantas. Las cinasas ATM y ATR inician la cascada de señalización en respuesta a daño al DNA, mediante una cascada de fosforilaciones a proteínas efectoras como WEE1, SOG1 y H2AX, iniciando así las distintas fases de la respuesta al daño al DNA.

1.3 La regulación de la estructura de la cromatina durante la respuesta al daño al DNA.

Para que en *Arabidopsis* se lleve a cabo la replicación del DNA se requiere, además de las maquinaria típica de replicación, de marcas epigenéticas que regulen la estructura de la cromatina para permitir el acceso de estas proteínas a los orígenes de replicación (Sanchez *et al* 2012). La regulación epigenética puede generarse por metilación del DNA o por modificaciones postraduccionales en las histonas. La iniciación de los procesos de replicación del DNA requiere que los orígenes de replicación estén enriquecidos en las marcas de cromatina relajada, entre las que se encuentran la di y trimetilación de la lisina

4 de la histona H3 (H3K4me2 y H3K4me3) y la de acetilación de la lisina 5 de la histona H4 (H4K5ac) (Figura 4) (Costas *et al* 2011). Dado que gran parte de la maquinaria de replicación es necesaria también en los procesos de reparación del DNA, estos datos sugieren que estas marcas epigenéticas también pueden participar en los procesos de reparación del DNA.

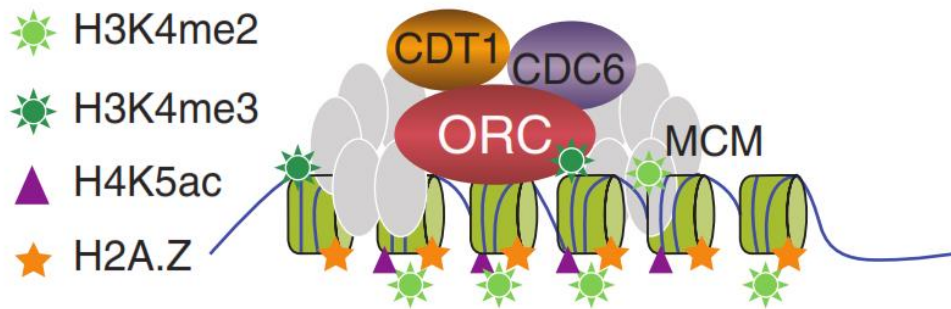


Figura 4. Proteínas y marcas de histonas asociadas a los orígenes de replicación del DNA antes de iniciar la fase S del ciclo celular en *Arabidopsis*. Varias de las marcas de histonas asociadas a la replicación del DNA pueden participar en la respuesta al daño al DNA. (Modificado de Sanchez *et al* 2012)

Las marcas epigenéticas regulan la estructura de la cromatina, la cual está compuesta por los nucleosomas, que a su vez están formados por un octámero de proteínas tipo histonas constituido por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se enrolla el DNA (146 pb por nucleosoma) y cada nucleosoma está a su vez unido por una subunidad de histona H1 (Earley *et al* 2007). Las modificaciones postraduccionales en las histonas alteran la estructura de los nucleosomas, generando con ello una cromatina dinámica, en donde se puede tener una cromatina totalmente compactada (heterocromatina) o una cromatina relajada o abierta (eucromatina) dependiendo de las distintas combinaciones de marcas epigenéticas. Estas modificaciones se dan generalmente en la región amino terminal de las histonas y las marcas incluyen la mono o di-metilación de las argininas; la fosforilación de las serinas y treoninas; y la acetilación, ubiquitinación, sumoilación o mono, di o tri-metilación de las lisinas (Bennetzen *et al* 2013).

La regulación de la estructura de la cromatina es muy importante para la respuesta a las DSBs. En mamíferos se tiene reportado que la descondensación de la cromatina induce la autofosforilación y activación de ATM (Bakkenist & Kastan 2003) y que la falta de estabilidad de la cromatina debida a la ausencia de ciertas chaperonas de histonas,

como la *Chromatin Assembly Factor1* (CAF1) lleva a una hiperactivación de los mecanismos de respuesta al daño al DNA (Hisanaga *et al* 2013). Además una de las marcas de histonas requerida para la reparación de las DSBs en plantas y mamíferos es la incorporación y fosforilación de la variante de histona H2AX, la cual participa en la formación de un andamiaje para reclutar a las proteínas de reparación al sitio donde ocurrió la DSB. En *Arabidopsis*, durante los tratamientos con radiación ionizante, la incorporación de la H2AX fosforilada depende mayormente de ATM, siendo solo un 10% dependiente de ATR (Friesner *et al* 2005).

La acetilación de las histonas es una de las marcas asociadas a la cromatina “relajada”, ya que la adición del grupo acetilo a las lisinas neutraliza la carga positiva de la proteína con lo que disminuye la fuerza de unión con el DNA. Esto facilita que el DNA esté más libre para interactuar con otras proteínas, como las de la maquinaria transcripcional, promoviendo así la expresión de los genes localizados en la región de cromatina acetilada (Earley *et al* 2007).

La acetilación de las histonas tiene también una función muy importante en la respuesta al daño al DNA. En plantas de *Arabidopsis* expuestas a rayos X, luz UV o radiación ionizante, ocurre un incremento en la acetilación de la histona H3K14 y K18 y una tetra-acetilación de histona H4 en los residuos K5, K8, K12 y K16 (Drury *et al* 2012). La acetilación en la histona H4 parece ser particularmente importante, ya que además de participar en los procesos de replicación del DNA (Sanchez *et al* 2012) en algunas variedades de maíz resistentes a la exposición a luz UV presentan la tetra-acetilación en las regiones promotoras de distintos genes asociados a la tolerancia a la luz UV (Campi *et al* 2012). La importancia de la acetilación de estos residuos se ha demostrado por la sustitución de K5, K8, K12 y K16 de la H4 por glutaminas, pues estas células tienen dificultades en realizar la RNH y la RH, lo cual las hace particularmente sensibles a los tratamientos que inducen DSBs (Drury *et al* 2012).

La acetilación de las histonas está regulada por dos tipos de proteínas que funcionan de manera antagónica: las histonas acetilasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs). En *Arabidopsis*, las HATs se han clasificado en 4 familias: GCN5-related N-terminal acetyltransferases, MYST, p300/CBP y TAFII250 (Latrasse *et al* 2008); mientras que las HDACs en 3 familias: RPD3/HDA1, la Silent Information Regulator 2 (SIR2) y la familia HD2 (Boycheva *et al* 2014).

Las HATs de las familias GNAT y MYST están involucradas en la acetilación de

pequeñas moléculas y de proteínas no-histona (Earley *et al* 2007); las p300/CBP están implicadas en la regulación de genes del ciclo celular, diferenciación y muerte celular (Pandey *et al* 2002); mientras que las TAFII250 se asocian con proteínas que interactúan con factores de unión a secuencias TATA (Boycheva *et al* 2014).

1.4 Antecedentes.

Las HATs de tipo MYST desempeñan funciones fundamentales en las modificaciones post-traduccionales de las histonas, teniendo así un efecto en la estructura de la cromatina. Su nombre proviene de las siglas de los 4 primeros miembros que se encontraron en mamíferos y levaduras, MOZ, YBF2, SAS2 y TIP60 (Neal *et al* 2000). Las proteínas MYST se caracterizan por la presencia de un dominio (dominio MYST) compuesto por un sitio de unión a la acetyl-CoA y un dedo de zinc. Algunos otros miembros de la familia poseen además cromodominios, homodominios y otras clases de dominios, los cuales les permiten interactuar con otras proteínas o con residuos de las histonas modificados. Las proteínas MYST parecen estar muy conservadas evolutivamente hablando, ya que se les puede encontrar en diversas clases de eucariontes. En mamíferos las MYST están involucradas en una gran variedad de procesos nucleares críticos (Avvakumov & Cote 2007) como son la activación y represión de genes, la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la replicación y reparación del DNA e incluso están involucradas en el cáncer (Latrasse *et al* 2008). Un ejemplo es el caso de HBO1, una proteína MYST que se encuentra en humanos muy importante para la replicación del DNA (Avvakumov & Cote 2007); otro ejemplo es TIP60, otra MYST humana cuya actividad es necesaria para el intercambio de la H2A por su variante H2AX en los sitios de DSBs (Zhu *et al* 2013). Solo dos miembros de la familia MYST se encuentran en *Arabidopsis*: *HAM1* y *HAM2* (antes *HAG4* y *HAG5*) (Pandey *et al* 2002). *In vitro* estas dos histonas acetilasas tienen mayor especificidad por la lisina 5 de la histona H4, sin embargo, también pueden acetilar algunos residuos de la histona H3 pero con menor afinidad (Earley *et al* 2007).

Dada la similitud en sus secuencias, parece ser que *HAM1* y *HAM2* son resultado de un evento de duplicación (Latrasse *et al* 2008), lo cual es importante ya que si bien aún no se conoce con precisión sus funciones biológicas, el trabajo con mutantes sencillas de estos genes demostró que *HAM1* y *HAM2* tienen función redundante bajo condiciones de crecimiento normales en los tejidos de la parte aérea de *Arabidopsis thaliana* (Latrasse *et al* 2008). Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha observado que una mutante simple

de pérdida de función de *HAM1* (*ham1-1*), tiene ligeramente alterada la estructura del meristemo radicular, principalmente en el número de células del centro quiescente, de las células iniciales de la columela y de las células maduras de la columela (Sánchez, comunicación personal). Por otro lado las mutantes dobles son estériles, por lo que éstas proteínas podrían desempeñar un papel fundamental en el desarrollo embrionario (Latrasse *et al* 2008).

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

Además, mis estudios previos indicaron que la función de HAM1 es importante durante los procesos de reparación de daño al DNA inducido por DSB en la raíz (Steckenborn 2013). Estos estudios mostraron que la inducción de DSBs por zeocina reduce considerablemente el crecimiento radicular tanto en las plantas silvestres como en las plantas *ham1-1*; sin embargo, la reducción del crecimiento radicular en las plantas *ham1-1*, fue ligeramente menor respecto a las plantas silvestres, lo cual se vio reflejado tanto en el tamaño de la raíz como en el tamaño del meristemo radicular (Figura 5). Un comportamiento similar se observó en plantas mutantes de pérdida de función en *ATM* (*atm-2*) (García *et al* 2003), mutantes que tienen defectos en los procesos de reparación de daño por DSB.

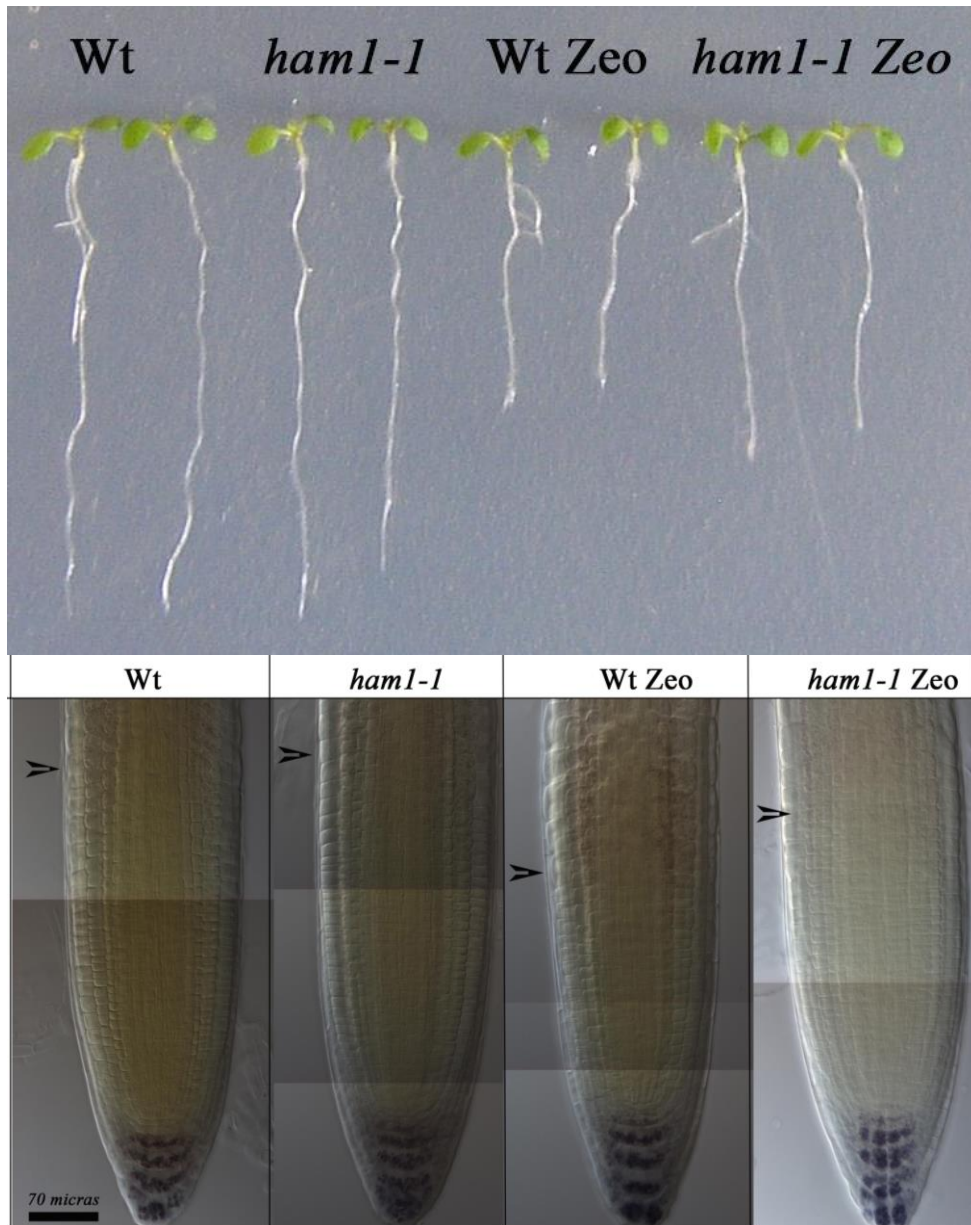


Figura 5. Efecto de la inducción de DSBs en *ham1-1*. Tamaño de la raíz y del meristemo de plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 (meristemo) o 72 horas (raíz) a medio MSS (Wt y *ham1-1*) o MSS+20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (Wt+Zeo, *ham1-1*+Zeo). Resultado representativo de 3 réplicas biológicas. (Steckenborn 2013).

Otra de las respuestas al daño al DNA que se estudió fue la muerte celular programada (PCD). Se ha documentado que esta respuesta se da principalmente en las regiones meristemáticas, y si bien no se sabe qué proteínas efectoras son las que dan lugar a esta respuesta, queda claro que se requiere de la presencia tanto de *ATM* como de *ATR*

para que la PCD pueda ocurrir (Fulcher & Sablowski 2009). Al determinar la PCD se observó que en las plantas *ham1-1* sin tratamiento tuvieron pocas células en proceso de muerte celular, mientras que las plantas *atr-2*, con defectos para inducir la respuestas de inducción de daño, y las silvestres no la presentaron (Figura 6, panel MSS). Cuando las plantas fueron tratadas con zeocina, la muerte celular se observó en las plantas silvestres y con mayor intensidad en las mutantes *ham1-1*, mientras que en las plantas *atr-2* no mostraron muerte celular (Figura 6, panel MSS+Zeo), tal y como se había reportado previamente para esta mutante (Fulcher & Sablowski 2009). Estos resultados sugieren que las mutantes *ham1-1* tienen un ligero daño, el cual se incrementa con el tratamiento con zeocina. Esto podría ser un reflejo de una mayor acumulación de daño al DNA en ésta mutante, tanto bajo condiciones de crecimiento normales como durante la inducción de daño por DSBs. Por otra parte, el hecho de que las mutantes *atr-2* y *atm-2* sean incapaces de generar muerte celular cuando se induce DSBs con zeocina indicaría que se requiere de la función de *ATM* y *ATR* para generar muerte celular, en tanto que *HAM1* no se requiere para inducir esta respuesta.

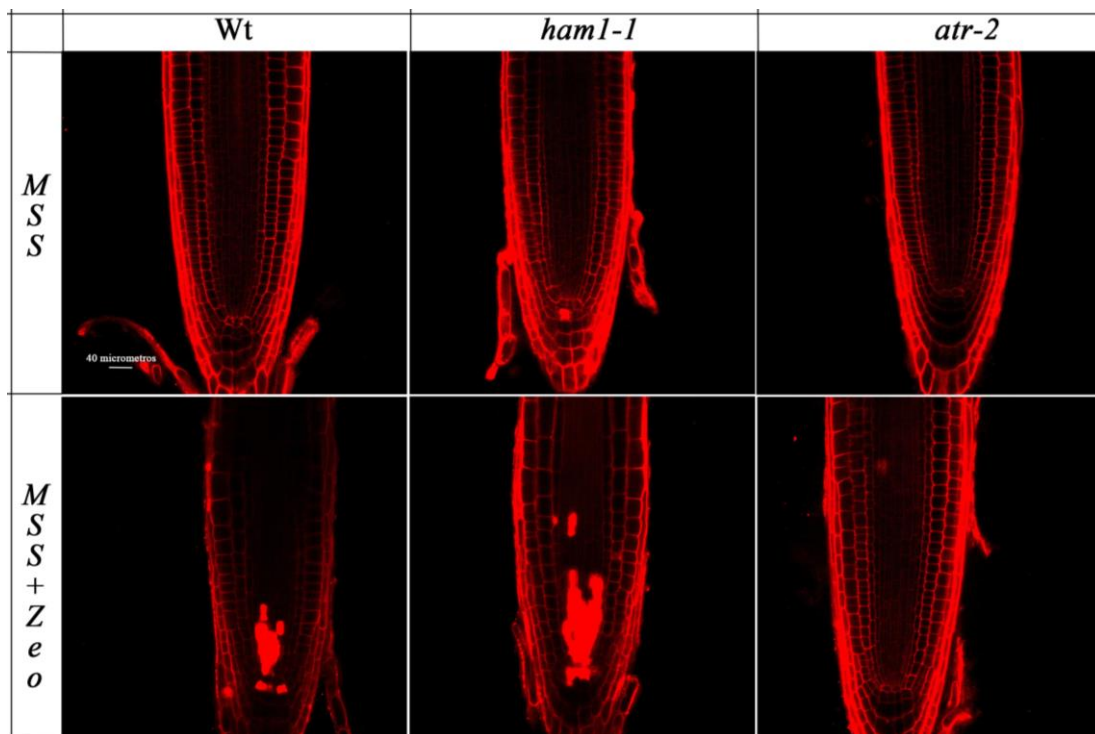


Figura 6. Muerte celular inducida por zeocina en plantas mutantes *ham1-1* y *atr-2*. Muerte celular en plántulas (Wt, *ham1-1*, *atm-2*) crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 horas a medio MSS o MSS+20 µg/ml de zeocina. Muestras observadas a 40x. Resultado representativo de 2 réplicas biológicas. (Steckenborn 2013).

Por lo anterior, estos resultados nos indican que HAM1 podría participar en la detención de la proliferación celular del meristemo radicular bajo condiciones de inducción de DSBs, lo cual puede estar relacionado con el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA. Además, la función de *HAM1* es necesaria para evitar acumulación de muerte celular en plantas con daño por DSB. Tomando como base estos resultados este proyecto está enfocado en estudiar la función de HAM1 en los mecanismos de respuesta generados durante un daño al DNA por DSB, iniciando con su posible participación en el arresto del ciclo celular, además de determinar si participa de manera directa en la regulación de la expresión de los genes de respuesta al daño al DNA por DSBs y en cambios en la acetilación general de la cromatina bajo condiciones de inducción de DSBs.

2 Hipótesis

Durante la inducción de DSBs, se requiere de HAM1 en la prevención de la proliferación y de la muerte celular. Por lo tanto la función de acetilasa de histona de HAM1 participa en la regulación de la estructura de la cromatina asociada a las respuestas de daño al DNA en *Arabidopsis thaliana*.

3 Objetivo general.

Determinar el mecanismo por el cual HAM1 participa en la respuesta al daño al DNA por DSBs.

3.1 Objetivos particulares.

- 1) Generar plantas transgénicas con una construcción que exprese a HAM1 unido a GFP para estudiar su expresión en los diferentes tejidos de la raíz, así como también para complementar a las plantas mutantes en HAM1.
- 2) Determinar la participación de HAM1 en el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA por DSBs.
- 3) Determinar la función de HAM1 sobre la regulación de la expresión de genes inducidos por daño de ruptura de doble cadena.
- 4) Estudiar las marcas de acetilación en los genes regulados por HAM1 en plantas control y plantas con daño de DSBs.
- 5) Estudiar de manera global los cambios en acetilación de la histona H4 cuando se induce un daño al DNA por ruptura de doble cadena

4 Materiales y Métodos.

4.1 Material biológico.

Se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col 0, plantas mutantes de pérdida de función *ham1-1* (SALK_027726) (Latrasse *et al* 2008), *atm-2* (SALK_006953) (García *et al* 2003) y *atr-2* (SALK_03284) (Culligan *et al* 2004); además de plantas transgénicas *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* (Colon-Carmona *et al* 1999) y *pHAM1:HAM1:GFP* (Steckenborn 2013).

Para las transformaciones se usaron las cepas de *Escherichia coli* TOP10, DH5 α y DB3.1.

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

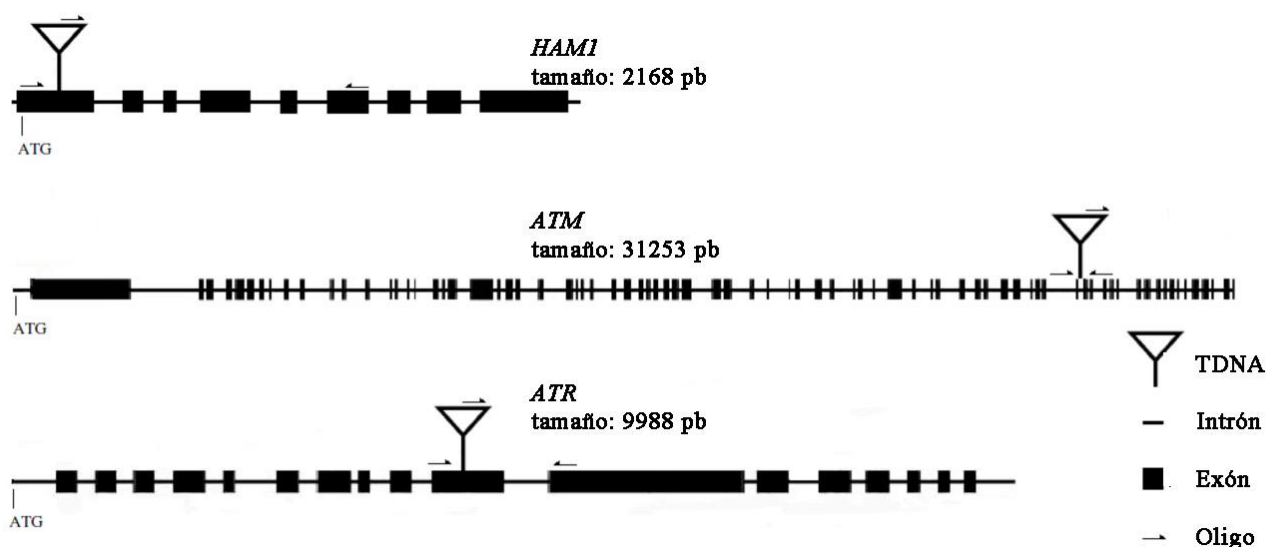


Figura 7. Esquema de las inserciones de T-DNA de las mutantes *ham1-1*, *atm-2* y *atr-2*. Estructura de los genes de *HAM1* (AT5g64610), *ATM* (AT3G48190) y *ATR* (AT5G40820), en cada caso se indica la posición en donde se encuentra la inserción de T-DNA.

4.2 Condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

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

metabolismo y la germinación, las semillas fueron estratificadas durante 72 horas a 4°C en la oscuridad.

Las semillas estratificadas se sembraron en cajas petri con medio MSS que contiene: MS al 0.2x (Murashige y Skoog 1962, MP Biomedicals), MES monohidratado al 0.00005% (Sigma-Aldrich), sacarosa al 1% (Sigma-Aldrich), agar al 1% (Becton, Dickinson and Company) y pH de 5.6 ajustado con 1M KOH. Si el experimento lo requiriera, las plántulas de 8 o 10 días se transferían a tierra (Tierra Metro Mix 200) desinfectada por autoclave a 120 °C y 100 kPa por 20 minutos. Todas las plantas se germinaron y crecieron a una temperatura de 22 °C, con luz blanca y fría a una intensidad aproximada de 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ en condiciones de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad).

4.3 Condiciones de inducción de daño al DNA con Zeocina.

Para inducir daño al DNA por ruptura de doble cadena (DSB) en la raíz de *Arabidopsis*, se utilizó una solución de zeocina en HEPES pH 7.5 (Invitrogen). En general los tratamientos consistieron en crecer las plantas durante 3 o 5 días post-siembra en medio MSS normal para después transferirlas a medio MSS con 10 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de zeocina (lo cual equivale a 6.5 μM y 13 μM respectivamente) durante 8 y 24 horas de acuerdo al experimento a realizar. A partir de este punto quedará implícito que los días de crecimiento de las plantas son días post-siembra. Las plántulas de 5 días y 3 días tratadas durante 8 horas fueron utilizadas para los experimentos de RT-PCR para la determinación de la expresión genética y de Western blot para la determinación de las marcas de histonas, mientras que las plántulas de 3 días tratadas durante 24 horas se utilizaron para los distintos análisis por microscopía.

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

La elaboración de las cruzas *ham1-1* x *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* se describe a detalle en (Steckenborn 2013). A grandes rasgos, para las cruzas se eligieron como planta madre a las *ham1-1* y a las *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* como padre. Se siguió la segregación

de ambos alelos tanto por PCR como por tinción de GUS hasta obtener 3 líneas dobles homocigotas provenientes de entrecruzamientos diferentes.

4.5 Determinación de la expresión del gen de la β -glucuronidasa.

Para determinar la expresión de la β -glucuronidasa que se encuentra en la construcción de *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* se utilizó una solución de tinción (0.5 mg/ml X-Gluc, 2mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 2mM $K_4[Fe(CN)_6]$ y 0.0001% Tween-20 en amortiguador de fosfato de 39% de 0.2M NaH_2PO_4 y 61% de 0.2M Na_2HPO_4 a pH 7.0) en la cual se incubó a las plántulas a 36°C durante toda la noche para después transferirlas a etanol absoluto a 4°C durante aproximadamente 12 horas y finalmente guardarlas en PBS 1X a 4°C hasta el momento en el que se observaran al microscopio óptico.

4.6 Análisis de las raíces mediante microscopía de luz.

Para observar los meristemos radiculares de las plantas, las raíces fueron aclaradas con 2 protocolos. En el primero las raíces se aclararon con solución 4.2M NaI, 8mM Na_2SO_3 , 2% DMSO y 60% glicerol. El segundo protocolo consistió en aclarar las raíces con una solución de 80% de hidrato de cloral y 10% glicerol. El segundo protocolo probó ser más efectivo que el primero. Las raíces fueron visualizadas en un microscopio óptico Olympus BX60 a un aumento de 20X y 40X.

4.7 Elaboración de las plantas transformadas con *pHAM1:HAM1:GFP*

La clonación, recombinación y transformación para la elaboración de las plantas *pHAM1:HAM1:GFP* se describen a detalle en (Steckenborn 2013). A grandes rasgos, el gen de *HAM1* se amplificó utilizando la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad AccuPrime de Invitrogen. La clonación abarca desde 1146 pb río arriba del ATG hasta un codón antes del codón de término. El producto de PCR se purificó y clonó en el vector *pCR®8/GW/TOPO* utilizando el *pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit* de Invitrogen. La recombinación LR se realizó con la LR Clonasa del sistema Gateway de Invitrogen, utilizando como vector donador a *pCR®8/GW/TOPO+HAM1* y como vector receptor a *pGWB4*, al plásmido obtenido se le llamó *pHAM1:HAM1:GFP*. El plásmido fue empleado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*, las cuales a su vez se

emplearon para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y plantas mutantes *ham1-1* para complementarlas.

4.8 Análisis de las raíces mediante microscopía confocal y cuantificación de muerte celular.

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

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

4.9 Extracción de RNA y RT-PCR.

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

Las muestras de RNA se cuantificaron en un nanodrop modelo NanoDrop2000 de Thermo Scientific. Para corroborar su integridad y realizar la calibración de las muestras, fue necesario disolver 100 ng de RNA de cada muestra en 7 µl de buffer de carga, el cual contiene 20% de formamida y 0.45% de SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 7 minutos, después se separaron en un gel de agarosa-TBE al 1.2 %. La integridad de cada muestra de RNA se determinó por la visualización de los RNAs ribosomales, así

mismo su calibración se realizó determinando la concentración de los RNAs ribosomales por densitometría.

Las muestras de RNAs calibradas se usaron para realizar la síntesis de la primera cadena de DNA (cDNA), utilizando el kit “FirstStrand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT” (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, para ello se añadieron 0.5 µM de oligonucleótido dT y 0.5 mM de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) con 250-1000 ng de RNA, esta reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10 mM DTT, 40U RNAsout y 200U SuperScript™ II RT; la síntesis de cDNA se realizó a 42°C por 50 minutos. La enzima se inactivó a 70°C por 15 minutos.

El cDNA obtenido se utilizó para hacer ensayos semicuantitativos por reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction). Las reacciones se hicieron usando el kit de PCR de Invitrogen en un volumen final de 15 µl; cada reacción contenía 1X PCR Rnx Buffer, 1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM dNTPs, 0.4 mM de oligonucleótidos (Ver Tabla 1), ~150µg de DNA y 1 U Taq DNA Polimerasa.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante los ensayos de RT-PCR semicuantitativos. Se muestran las temperaturas de alineamiento (TA) y cantidad de ciclos estandarizados para cada par de oligonucleótidos.

oligonucleótidos para RT-PCR semicuantitativos			
Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')	TA(°C)	No. De Ciclos
<i>ATM</i>	MP-ATMq-F: CGAAATCTGGCAATGATGAC	58	30
	MP-ATMq-R: CCTCACTCCTTGAGCTTCCT	58	
<i>HAM1</i>	MP-HAM1q-F: CTAAGGTACTGGACCGACACT	55	26
	MP-HAM1q-R: ACCATCCAGACAAAAGATTCCT	55	
<i>CYCB1;2</i>	SS-CYCB1;2-Fq GTCCGCTTCATCAAAGCTTCG	55	26
	SS-CYC1;2-Rq TTGAGCAGTCCATAATCTCA	55	
<i>CYCB1;4</i>	SS-CYCB1;4-Fq CACTGTCCAACTCCTTATGTG	55	26
	SS-CYCB1;4-Rq ATTTTCGCATGCTCCATAATCTC	55	
<i>CYCD3;1</i>	CycD3;1 F GGTGTCTTAACTTAACCAA	55	32
	CycD3;1 R GCAAGCCTCAAATTTACGC	55	
<i>H4</i>	QRT_HISTH4F GGAAAAGGGTTAGGCAAAGG	55	29

	QRT_HISTH4R TCTACGAGCAAGACGACGAA	55	
<i>CCS52A1</i>	SS-CCS52A-Fq GCTTGGTCTCCTCATGTTTCAT	55	30
	SS-CCS52A-Rq AGCAATTTTGGACATGGTTGGG	55	
<i>SMR5</i>	SS-SMR5-F GTCCACCTCCGGGAACCACC	56	29
	SS-SMR5-R CACAACTAAGCGCAACTAGG	56	
<i>SMR7</i>	SS-SMR7-F CAGAGAATTAGACACCGATGG	56	29
	SS-SMR7-R TCGCCGTGGGAGTGATACAAAT	56	
<i>CYCB1.1</i>	CycB1;1FR-T: GAATGAATCATGCTAAAGGAC	55	30
	CycB1;RR-T: CTGTCTACACTTGAGTGGTA	55	
<i>BRCA1</i>	MP-BRCA1q-F: GAATCAAGGGGTGATAACAAG	55	28
	MP-BRCA1q-R: TTGGAGCCCATTCAGCACAGTTT	55	
<i>Ku70</i>	MP-KU70q-F: GCACTGGATGAAAACGAGCTT	55	28
	MP-KU70q-R: GTCAAGTCCTCAGCTTCCG	55	
<i>PARP1</i>	MP-PARP1q-F: GCACGGTTCACGTCTCACTAA	55	28
	MP-PARPq-R: CAAAGCAACCTCGCAGAGGAG	55	
<i>RAD51</i>	MP-RAD51q-F: GAAAACGTTGCCTATGCGAGG	55	28
	MP-RAD51q-R: CACACCAAACCTCATCTGCTAACT	55	
<i>eIF4A</i>	SS-eIF4A-Fq GTTTCAAGGACCAGATCTATGA	58	30
	SS-eIF4A-Rq GTCTCGAGCTTCCACTCTTC	58	

4.8 Ensayo de mutagénesis dirigida

El ensayo de mutagénesis dirigida consistió en amplificar el vector pCR®8/GW/TOPO con el gen de *HAM1* utilizando la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad AccuPrime de Invitrogen. Para esto se diseñaron dos oligonucleótidos (Tabla 2) los cuales contienen una mutación puntual que sustituye la secuencia original del quinto exón de *HAM1*. Para la reacción de amplificación, se requirieron 50ng de DNA a los que se les adicionó 1x del Buffer I (600 mM Tris-SO₄ pH=8.9, 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime protein y 10% glicerol), 0.4 mM de Oligonucleótidos y 2.5 U de Accuprime Taq High Fidelity. La reacción se

mezcló suavemente y se colocó en un termociclador en un programa con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C seguida de 18 ciclos con 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 55 °C y 4 minutos de extensión a 68 °C. Una vez concluida la reacción se procedió a digerir el producto con la enzima de restricción Dpn1 de BioLabs, la cual actúa solo sobre el DNA metilado, eliminando únicamente el templado original y dejando los plásmidos con la nueva secuencia. El producto de esa digestión fue introducido en células termocompetentes de *E. Coli* TOP10, las bacterias que contenían el plásmido se seleccionaron con 50 µg/ml de espectinomicina. Para la extracción de los plásmidos se utilizó el QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN. Los plásmidos se analizaron por PCRs para asegurar la presencia del inserto de *HAMI* dentro del vector. Los plásmidos seleccionados se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una vez que se identificó a los plásmidos que tenían la secuencia correcta, se realizó una reacción de recombinación LR utilizando la LR Clonasa del sistema Gateway de Invitrogen, utilizando como vector donador a *pCR®8/GW/TOPO+pHAMI:HAMI* y a *pGWB4* como vector receptor (Nakagawa *et al* 2007).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante la mutagénesis dirigida. Se muestran las temperaturas de alineamiento y cantidad de ciclos usados. En rojo se marca la base modificada de estos oligonucleótidos.

oligonucleótidos para mutagénesis dirigida			
Gen	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')	TA(°C)	No. De Ciclos
<i>HAMI</i> <i>mutado</i>	GGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTGT CAATGTTTGAGGTAA	55	18
	TTACCTCAAACATTGACAAAGTAGAGCTTC GATAGATTCATCCC	55	

4.10 Extracción y cuantificación de proteínas

A las muestras de raíz trituradas se les adicionó buffer de extracción, el cual contiene Tris-HCl pH 7.5 25 mM (Sigma), MgCl₂ 15 mM (Sigma), EDTA 5mM (Sigma), Tritón x-100 0.4% (Research Organics), DDT 1mM (Invitrogen), NaCl 0.5 M (Sigma) y PMSF 1 mM (Sigma). Posteriormente se sonicaron 3 veces por 10 segundos, se centrifugaron

durante 15 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -70 °C. Las muestras se cuantificaron utilizando reactivo de Bradford diluido 1:4 (Bio-Rad), leyéndolas a 590 nm en lector de ELISA modelo ELx808 de BioTek.

4.11 Electroforesis y transferencia de proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en un gel separador SDS-PAGE 15% y un gel concentrador 5%. Se usaron entre 4 a 35 microgramos de proteínas totales. El Buffer de corrida está compuesto por Tris 25 mM, glicina 0.19 M (Sigma) y SDS 0.1%. Las muestras se corrieron a 75 volts por 20 minutos y posteriormente a 120 volts por 1 hora.

Para la Transferencia Semiseca se usaron membranas de nitrocelulosa (Merck Millipore) las cuales se hidrataron en metanol (J.T. Baker) por unos minutos para posteriormente enjuagarlas con agua bidestilada. El Buffer de Transferencia está compuesto por Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.04% y metanol 20%. La transferencia se realizó durante una hora con un amperaje de 1.2 mA por centímetro cuadrado de membrana.

4.12 Western Blot

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se saturaron incubando la membrana en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente en BSA 3% disuelta en PBS 1X con Tween 0.1%. Posteriormente se incubaron durante toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario disuelto en PBS 1X, Tween 0.1% y BSA 1%. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X, Tween 0.1% o PBS 1X, NaCl 0.5M y Tween 0.1%, dependiendo de si el anticuerpo primario requería un lavado más vigoroso, y se incubó a las membranas en agitación a temperatura ambiente durante dos horas con el anticuerpo secundario disuelto en PBS 1X, Tween 0.1% y BSA 1%. Se repitieron los 3 lavados con PBS 1X, Tween 0.1% y se incubó a las membranas en el reactivo de bioluminiscencia (Merck Millipore) para finalmente revelarlas en el escáner Digit-Blot de LI-COR.

Anticuerpos Primarios			
Anticuerpo	Marca	# Catálogo	Dilución
Anti-GFP	Santa Cruz	SC-8334	1:1500
Anti-H3 Acetilada	Millipore	06-599	1:3000
Anti-H4 Acetilada	Millipore	06-866	1:3000
Anti-H4K5 Acetilada	Abcam	EP1000Y	1:3000
Anticuerpo Secundario			
Anticuerpo	Marca	# Catálogo	Dilución
Anti-IgG conejo con HRP	Millipore	AP136P	1:6000

4.13 Análisis estadísticos empleados.

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

Los gráficos se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2007 y los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma 5 para Mac OS X. Los análisis estadísticos consistieron en pruebas de “ANOVA de una vía” y análisis de “t de student”.

5 Resultados

El daño al DNA en plantas es muy frecuente, ya que al ser organismos sésiles están expuestos a agentes inductores de daño tales como las radiaciones solares. Por ello, las plantas tienen mecanismos muy activos para reparar o evadir estos tipos de daño. Varios de estos mecanismos han sido ampliamente estudiados y ya se conocen diversas proteínas que participan en estos procesos de reparación de daño al DNA; sin embargo, hay pocos estudios sobre la participación de las proteínas que regulan la estructura de la cromatina en estos procesos. Estos modificadores de la cromatina son de suma importancia, ya que las proteínas que participan directamente en la reparación del DNA tienen que acceder a éste, por lo que el DNA debe de estar en una conformación que permita que la maquinaria de reparación haga su función. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la función de HAM1, una histona acetilasa involucrada en la relajación de la estructura de la cromatina, durante la respuesta al daño al DNA por DSBs inducidas por zeocina en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

5.1 Análisis del fenotipo y la expresión de las plantas *pHAM1:HAM1:GFP*.

Primero se determinó la expresión HAM1 en la raíz, para ello se realizó una construcción que lograra expresar a la proteína HAM1 bajo las mismas condiciones que una planta silvestre, pero con un marcador como la GFP que permite rastrear su expresión y localización celular (Steckenborn 2013). Al secuenciar la construcción obtenida se observó que contiene una mutación puntual en su quinto exón que da lugar al cambio del aminoácido 242 de serina por una prolina (Figura Suplementaria 1). Dicha mutación está dentro del dominio MYST de HAM1 pero no dentro de su sitio catalítico. A dicha construcción se le nombró *pHAM1:HAM1:GFP^{242P/S}*. Para prevenir cualquier posible complicación por dicha mutación, se realizó un ensayo de mutagénesis dirigida que revirtió exitosamente esa mutación (Figura Suplementaria 2) y el vector resultante se nombró *pHAM1:HAM1:GFP*.

Dado que no se encontraron cambios a nivel estructural en HAM1 debidos a la mutación en el residuo 242 (Figura Suplementaria 3), se optó por realizar la transformación de las plantas silvestres (Wt- Wild type) y plantas mutantes *ham1-1* con

ambas construcciones. La transformación genética se realizó con *Agrobacterium tumefaciens*, se seleccionó a las plantas transformantes por medio de su resistencia a kanamicina y se eligieron las líneas que segregaban como si tuvieran un solo evento de inserción. En cuanto se obtuvieron plantas homocigotas en fondo silvestre y mutante *ham1-1* con ambas construcciones, se analizó el patrón de expresión de HAM1. A partir de este punto, a las plantas silvestres y *ham1-1* transformadas con la construcción *pHAM1:HAM1:GFP* se les referirá como “HAM1:GFP/Wt” y “HAM1:GFP/*ham1-1*” respectivamente, mientras que las plantas transformadas con *pHAM1:HAM1:GFP^{242P/S}* serán referidas como “HAM1:GFP^{242P/S}/Wt” y “HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*”. Por medio de microscopia confocal se pudo determinar que HAM1 es una proteína nuclear que se expresa principalmente en la región de proliferación celular del meristemo y en las células de la epidermis tanto de la zona de proliferación como la de diferenciación (Figura 8A y D), su expresión parece mantenerse constante a lo largo del meristemo, desapareciendo su señal en células que están próximas a dividirse y reapareciendo en células que recién terminaron su división, lo cual indica que tiene una regulación ciclo celular dependiente (Figura 8B). Al observar su expresión en la epidermis, único tejido en el que se mantiene la presencia de HAM1 más allá del meristemo, se aprecia un patrón alternado de expresión y ausencia de HAM1 en filas a lo largo de la punta de la raíz (Figura 8C). Los patrones de expresión descritos se conservan en los fondos Wt y *ham1-1* transformados con ambas construcciones, lo cual se ilustra en la Figura 8D, en la que también se aprecia una variación en la intensidad de GFP entre las distintas líneas obtenidas, pero no un cambio en el patrón de expresión. La variación en intensidad no está relacionado con el tipo de construcción usado (HAM1:GFP o HAM1:GFP^{242P/S}) o con el fondo genético planta (Wt o *ham1-1*), ya que se tienen intensidades diferentes en todos los casos (Figura 8D).

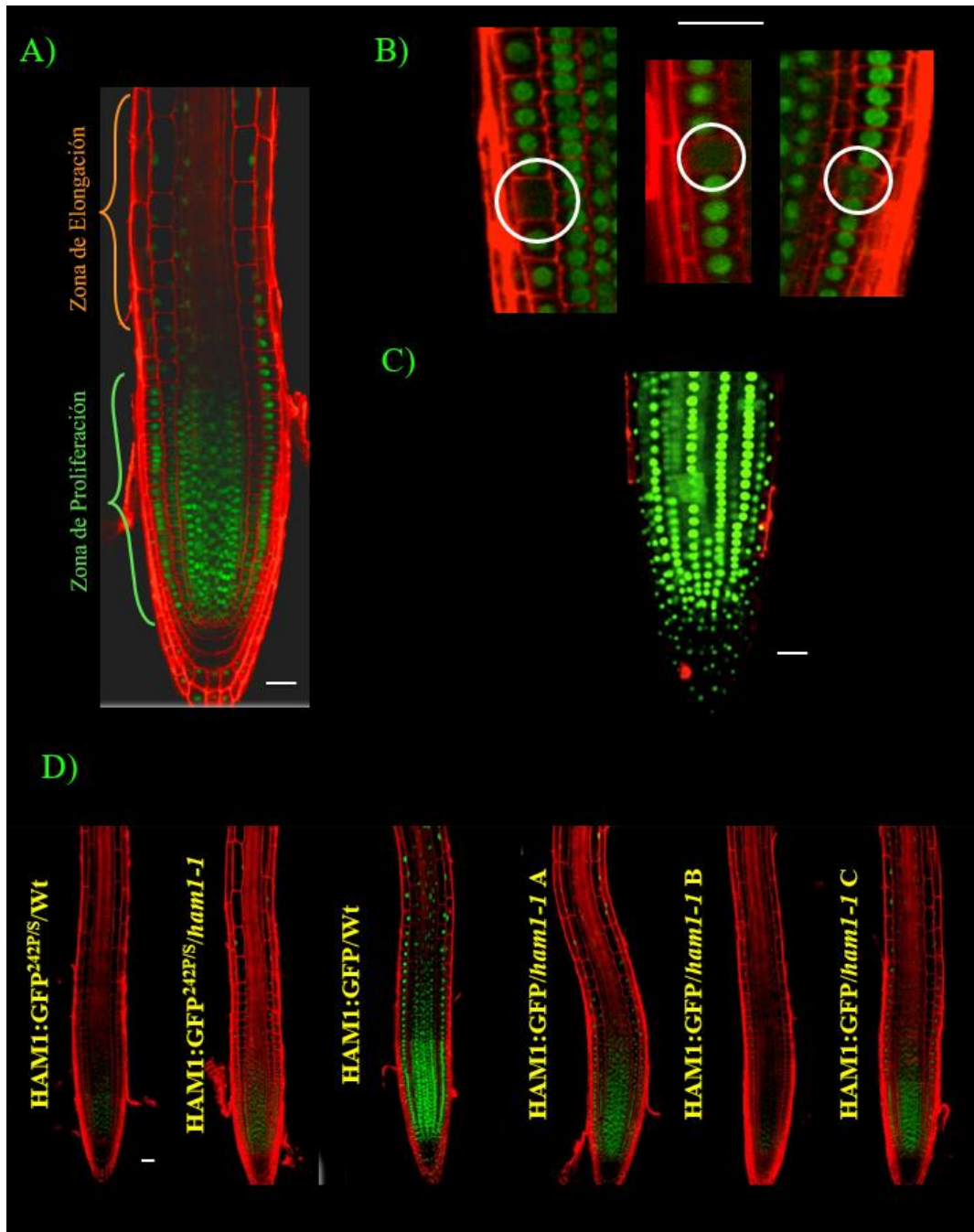


Figura 8. Patrón de expresión de HAM1. A) Expresión de HAM1:GFP bajo condiciones de crecimiento normales en el meristemo radicular. B) En las células meristemáticas próximas a dividirse pierden la señal de GFP y reaparece en las células que recién concretaron su división, como se muestra dentro de los círculos blancos. C) Expresión de HAM1:GFP bajo condiciones de crecimiento normales en la epidermis del meristemo radicular. D) Patrón de expresión de HAM1 en plantas HAM1:GFP/Wt, HAM1:GFP/*ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*. Las barras blancas representan 40 micrómetros.

Después de los estudios de la expresión de las plantas arriba mencionadas, se analizó el fenotipo de la raíz de dichas líneas para confirmar que no tuvieran ninguna aberración fenotípica como resultado de la transformación. A partir de estos datos se puede observar que la mayoría de las plantas transformadas con ambas construcciones tuvieron un crecimiento radicular normal, excepto por la planta HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*, que mostró una raíz más corta en comparación con las demás plantas (Figura 9).

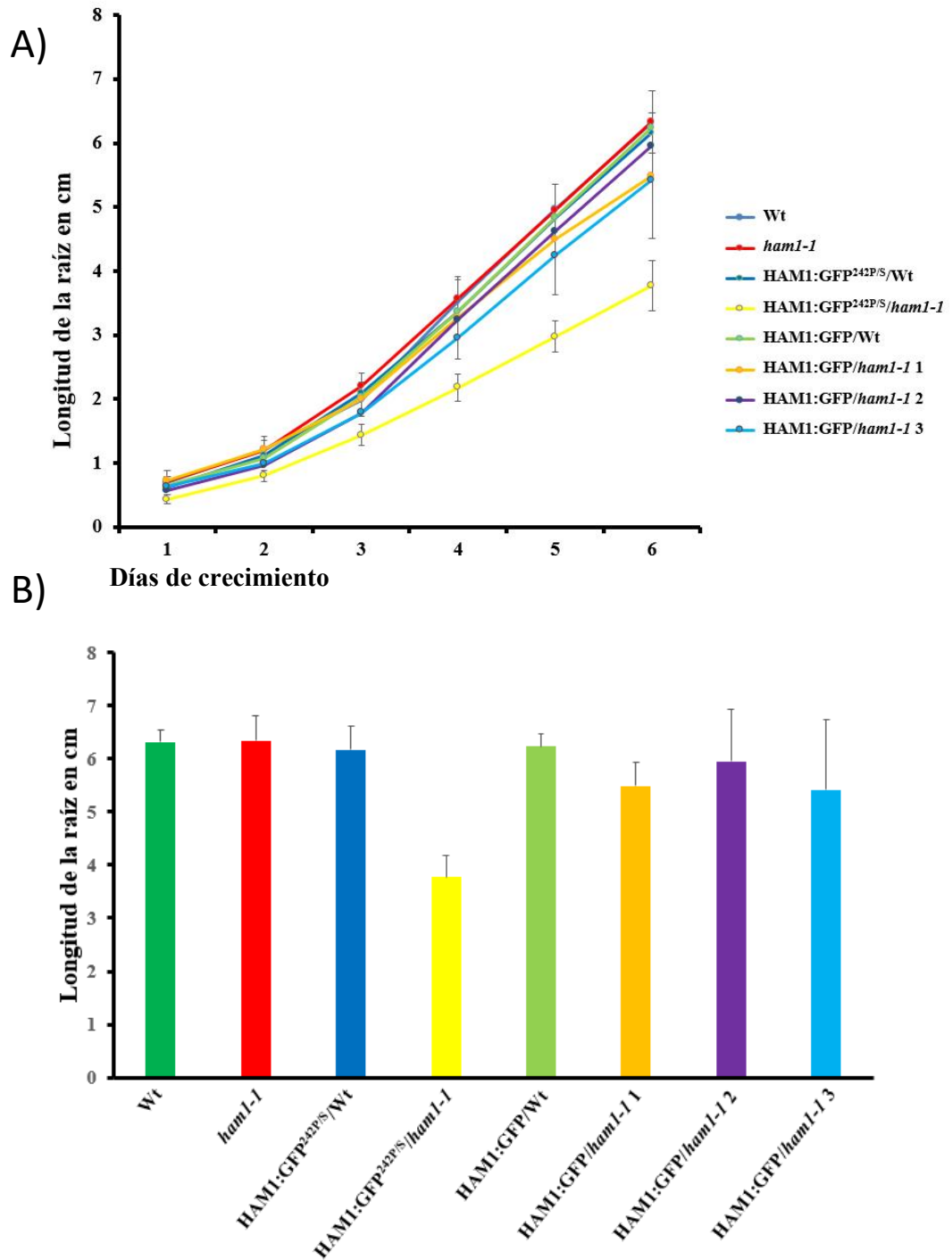


Figura 9. Crecimiento de la raíz de las plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP/Wt, HAM1:GFP/*ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* bajo condiciones normales. A) Cinética de crecimiento de la raíz durante 6 días. B) Longitud de la raíz a 7 días de crecimiento. n>10. Las barras muestran el error estándar.

Por otro lado, dado que el crecimiento de la raíz está relacionado a la proliferación celular del meristemo radicular, otro parámetro que se evaluó fue el número de células meristemáticas del córtex en las diferentes plantas transgénicas. Al realizar este conteo y

los análisis estadísticos se encontró que todas las plantas transformadas presentaban un número similar de células meristemáticas respecto a la planta silvestre (Figura 10). Estos datos indican que las plantas transformadas con las construcciones HAM1:GFP y HAM1:GFP^{242P/S} tienen un desarrollo radicular similar al de las plantas silvestres, con excepción de la línea HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*, la cual tiene una raíz más corta pero un meristemo normal. Dado que los fenotipos de respuesta al daño al DNA por DSBs que se analizaron se presentan en el meristemo radicular, se consideró seguro utilizar a la línea HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* en los siguientes experimentos, los cuales consistieron en evaluar las distintas respuestas al daño al DNA en la mutante *ham1-1* y analizar si su fenotipo se complementaba por las construcciones HAM1:GFP y HAM1:GFP^{242P/S}.

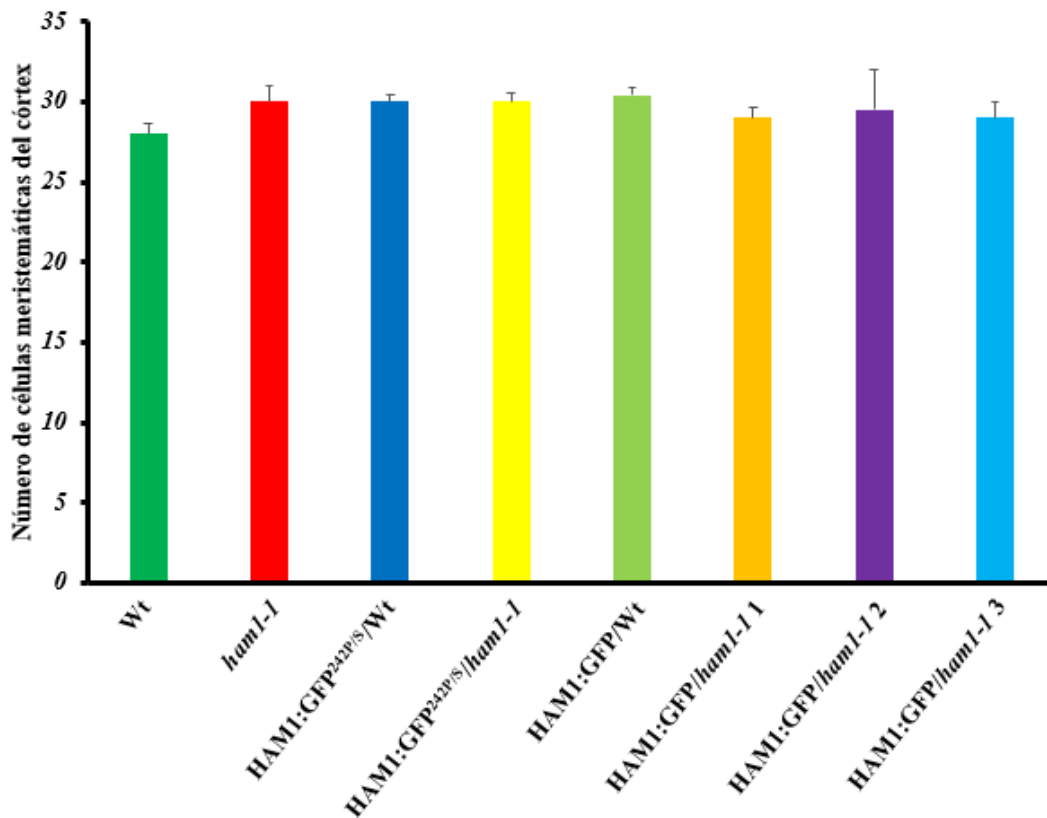


Figura 10. Número de células del córtex del meristemo radicular de las plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP/Wt, HAM1:GFP/*ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* bajo condiciones de crecimiento normales. Plántulas crecidas durante 4 días en medio MSS. Para Wt y *ham1-1* N>60; para HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* n>20; para HAM1:GFP/Wt y HAM1:GFP/*ham1-1* N>7. Las barras representan el error estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.2 Efecto de la inducción de DSBs sobre la proliferación en el meristemo radicular de las plantas *ham1-1*, *HAM1:GFP^{242P/S}/ham1-1* y *HAM1:GFP/ham1-1*.

Previamente se obtuvieron datos que indican que *ham1-1* presenta defectos en la detención de la proliferación del meristemo radicular cuando las plantas son sometidas al tratamiento con zeocina para inducir DSBs (Figura 5). Esto sugiere que se requiere de HAM1 para que se lleve a cabo la detención de la proliferación celular durante el daño al DNA. Para comprobar si dicho fenotipo observado en las plantas mutantes *ham1-1* se debía a la pérdida de función de *HAM1*, se realizaron cuantificaciones con las plantas complementadas *HAM1:GFP^{242P/S}/ham1-1* y *HAM1:GFP/ham1-1* y se compararon con las plantas *HAM1:GFP^{242P/S}/Wt* y *HAM1:GFP/Wt*. A partir de estos ensayos se puede observar que las plantas *ham1-1* tienen un meristemo 8% más grande que las plantas silvestres, mientras que las líneas *HAM1:GFP^{242P/S}* y *HAM1:GFP* presentan un meristemo más pequeño que el de la planta *ham1-1* y similar a las del silvestre (Figura 11). A partir de estos datos se pudo corroborar que la mutante *ham1-1* si tiene un meristemo más grande bajo condiciones de inducción de DSBs y que dicho fenotipo se debe a la pérdida de función de *HAM1*, ya que se revierte en las plantas complementadas *HAM1:GFP^{242P/S}/ham1-1* y *HAM1:GFP/ham1-1*, lo que además sugiere que la mutación en el residuo 242 de la construcción *HAM1:GFP^{242P/S}* no altera la función de *HAM1* al menos en este tejido.

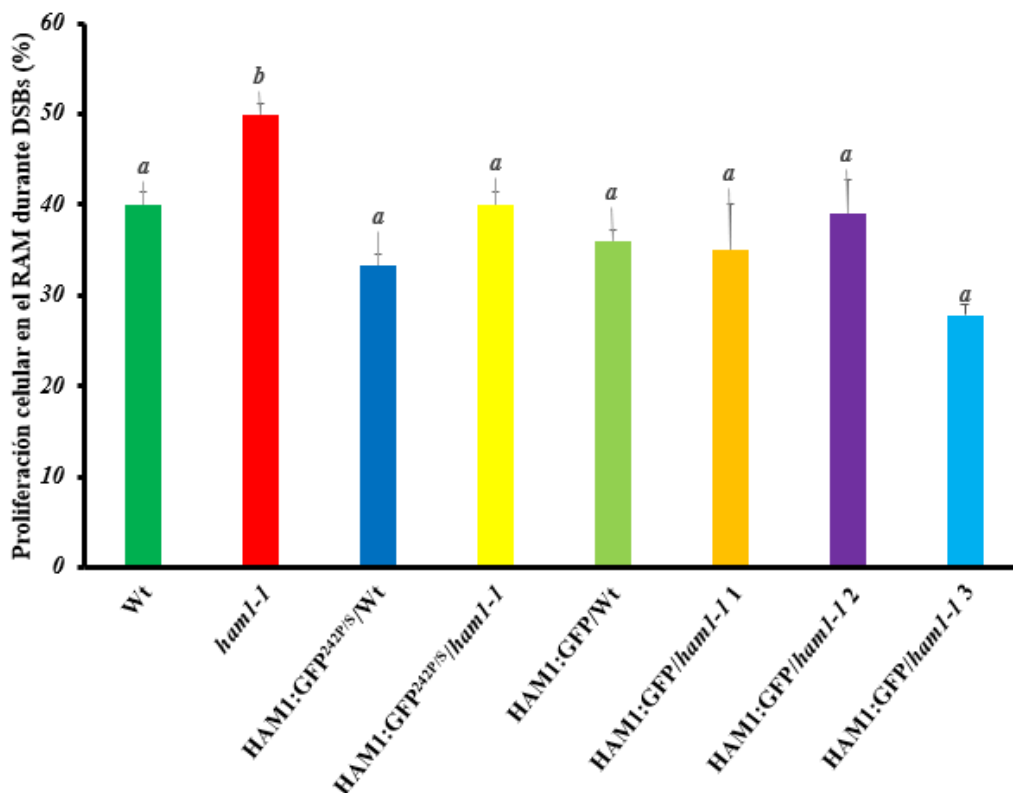


Figura 11. Efecto de la inducción de DSBs en plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP/Wt, HAM1:GFP/*ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*. Porcentaje de células del meristemo de plantas con daño respecto al Wt no tratado. Plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 hr a medio MSS+20 µg/ml de zeocina. Para Wt y *ham1-1* n>60; para HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* n>20; para HAM1:GFP/Wt y HAM1:GFP/*ham1-1* n>10. Las barras representan el error estándar. “a” y “b” indican las diferencias entre grupos con p<0.001.

Para evaluar si este fenotipo estaba relacionado a la edad de las plantas, así como para facilitar la extracción de RNA y proteínas, se realizaron ensayos para corroborar si las diferencias en el tamaño del meristemo se presentaban también en plántulas de 5 días. A partir de estos ensayos se observó que las diferencias del meristemo entre la planta silvestre y *ham1-1* tratadas con zeocina se acentuaban más en las plántulas de 5 días, siendo las *ham1-1* 15% más grandes que las plantas silvestres; además, las plantas silvestres y *ham1-1* transformadas con las construcciones HAM1:GFP y HAM1:GFP^{242P/S} presentan un meristemo más pequeño en comparación con la planta *ham1-1*, siendo similar a la planta silvestre. (Figura 12). Otro detalle interesante que se encontró es que las plántulas de 5 días son más resistentes al tratamiento con zeocina, ya que la reducción del número de células meristemáticas es claramente menos drástico si

se le compara con la reducción de las plántulas de 3 días. A partir de estos resultados se consideró adecuado emplear plántulas de 5 días para las extracciones de RNA y proteínas.

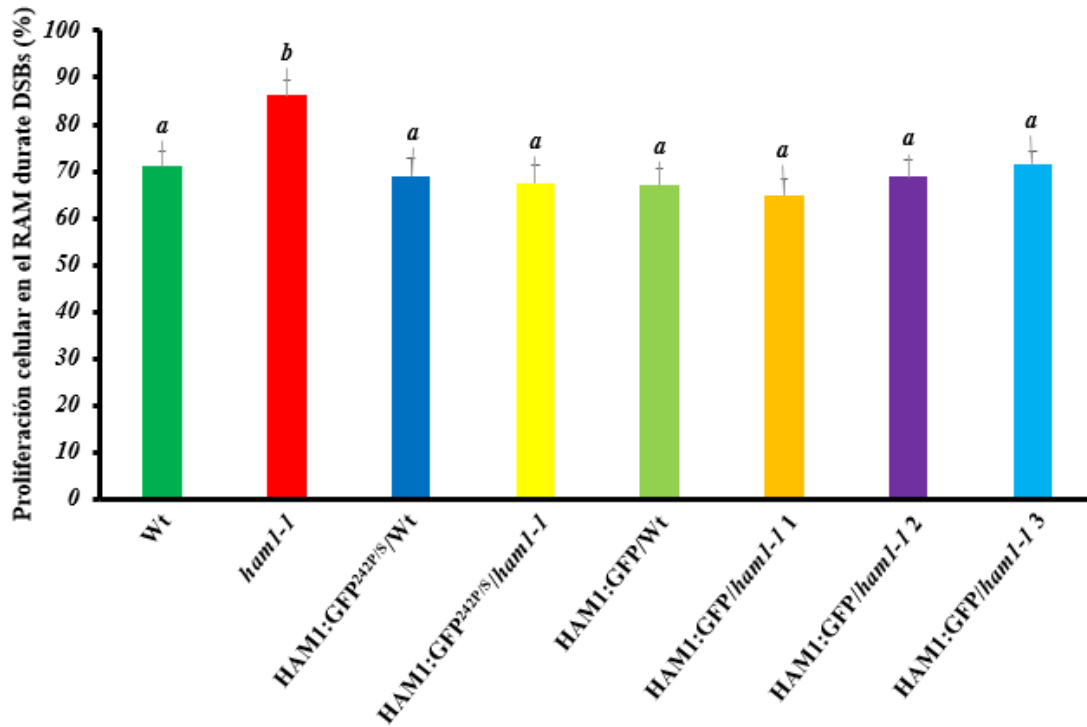


Figura 12. Efecto de la inducción de DSBs en plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP/Wt, HAM1:GFP/*ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1*. Porcentaje de células del meristemo de plantas con daño respecto al Wt no tratado. Plántulas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 24 hr a medio MSS+20 µg/ml de zeocina. n>10. Las barras representan el error estándar. “a” y “b” indican las diferencias entre grupos con p<0.01.

5.3 Expresión de genes del ciclo celular durante el daño por DSB en las plantas *ham1-1*.

El fenotipo previamente descrito del meristemo radicular sugiere que existen problemas en la mutante *ham1-1* para detener la división celular bajo condiciones de daño al DNA. Para poder determinar si HAM1 participa en la regulación del ciclo celular bajo condiciones de inducción de daño al DNA se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativos a partir de cDNA de raíces de plántulas silvestres, *ham1-1* y *atm-2*. La mutante *atm-2* tiene problemas para activar la respuesta al daño al DNA por DSBs, lo cual incluye la represión de diversos genes del ciclo celular y la activación de los genes de respuesta al daño (Culligan *et al* 2006), por lo que se le utilizó como control para comparar las posibles alteraciones transcripcionales que pudiera tener *ham1-1* durante la inducción de DSBs. La regulación transcripcional durante la respuesta al daño al DNA por radiación ionizante alcanza su pico a las 6 horas de ocurrido el daño (Culligan *et al* 2006), por lo que optamos por analizar la expresión de los genes a las 8 horas de tratamiento con zeocina, asegurándonos así de estar dentro del punto de regulación.

Originalmente la calibración de los ensayos semicuantitativos se realizaba a partir de la expresión del gen de Tubulina 2 (*TUB2*); sin embargo, en nuestro laboratorio se ha visto que la expresión de este gen puede variar por muchas circunstancias; además, al analizar la expresión de *TUB2* en microarreglos de plantas de tratamientos de daño al DNA se puede observar que se abate la expresión de este gen (Culligan *et al* 2006). Tomando en cuenta estos datos se optó por utilizar como gen calibrador a “Eukaryotic initiation factor 4A-I” (*eIF4A1*), el cual ha sido utilizado en otros trabajos para calibrar la expresión de genes implicados en la respuesta a daño al DNA, ya que la expresión de este gen no varía en los tratamientos de inducción de daño al DNA por DSBs (Culligan *et al* 2006, Yoshiyama *et al* 2013a).

Los genes de ciclo celular analizados fueron: *CYCBI;1*, una ciclina que se induce en la fase G2/M del ciclo celular y que en los últimos años se ha reportado que también se induce por daño al DNA, por lo que se le utiliza también como marcador ante este daño (Culligan *et al* 2006, Vanderauwera *et al* 2011, Zhu *et al* 2011); *CYCBI;2* y *CYCBI;4*, ciclinas de la fase G2/M las cuales disminuyen su expresión durante los tratamientos de daño al DNA por radiación ionizante (Culligan *et al* 2006); *CYCD3;1*, ciclina de la fase G1/S que disminuye su expresión durante los tratamientos de luz UV como resultado de un arresto del ciclo celular (Jiang *et al* 2011); *H4*, la cual también se induce durante la

fase G1/S pero disminuye su expresión durante el daño al DNA por radiación ionizante (Culligan *et al* 2006); CCS52A1, componente del complejo promotor de anafase e involucrado en la transición a la endoreduplicación, que se expresa en la zona de transición a la diferenciación del RAM (Baloban *et al* 2013); y SMR5 y 7, los cuales se inducen durante los tratamientos de daño al DNA y podrían estar implicadas en el arresto del ciclo celular (Yi *et al* 2014).

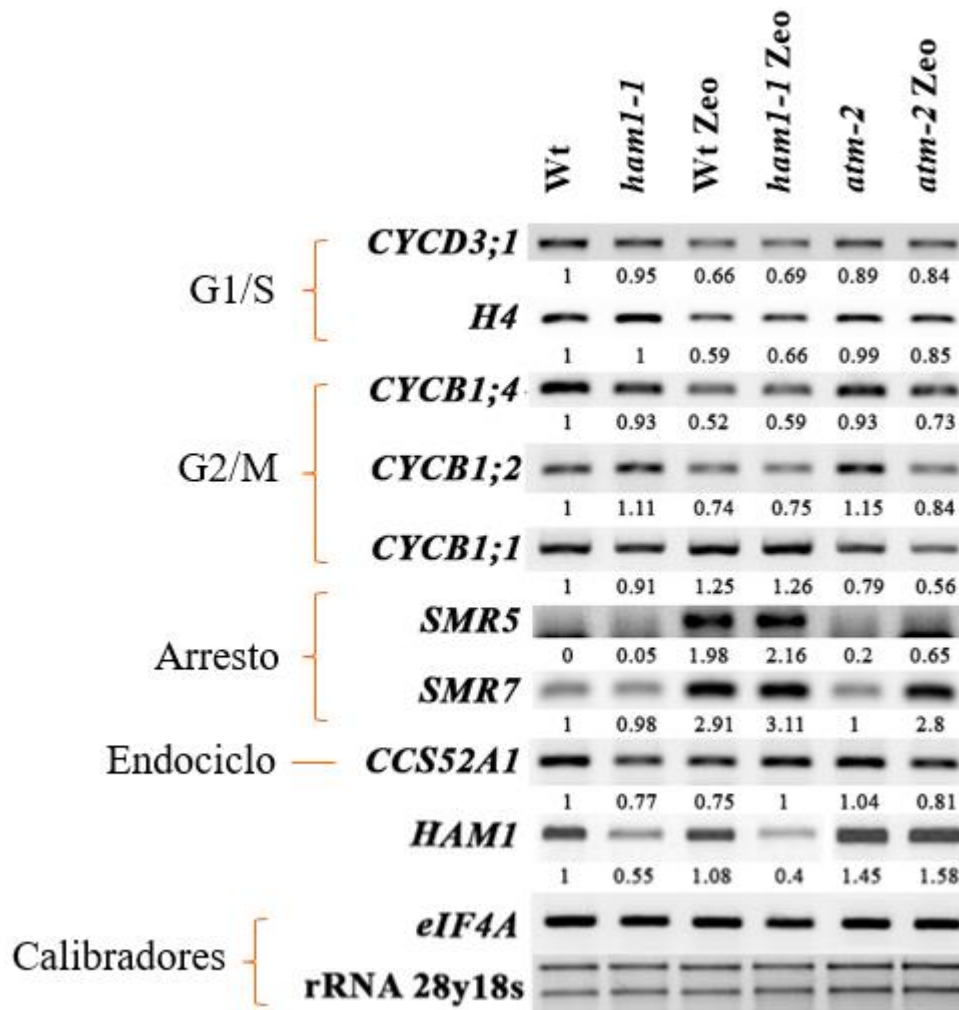


Figura 13. Expresión de genes del ciclo celular de plantas Wt, *ham1-1* y *atm-2*. Raíces de plantas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio con zeocina a 20 µg/ml. Los números representan los valores de densitometría normalizados respecto al calibrador eIF4A tomando como valor de referencia la expresión del Wt en MSS. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

A partir de estos análisis (Figura 13) se puede observar que la expresión de *SMR5* y *SMR7* es mayor en las plantas silvestres y *ham1-1* tratadas con zeocina respecto a las plantas no tratadas. La expresión de *CYCB1;1* también aumenta en ambas plantas tratadas

con zeocina, aunque en menor proporción; resultados que coinciden con reportes anteriores (Culligan *et al* 2006). Por otro lado, se puede observar que los genes de ciclo celular *CYCD3;1*, *H4*, *CYCB1;2* y *CYCB1;4* disminuyen su expresión durante los tratamientos de DSBs en las plantas silvestre y *ham1-1*. En las plantas tratadas con zeocina al reducirse el meristemo se induce procesos de diferenciación que pueden estar asociados a endociclo, sin embargo no hay diferencias consistentes en la expresión de *CCS52A1* promotor de esta transición.

Al usar como control la mutante *atm-2* se encontró que la expresión de *CYCB1;1* no se incrementa en las plantas *atm-2* tratadas con zeocina lo cual es consistente con lo que se tiene reportado (Culligan *et al* 2006). Contrario a lo esperado, la expresión de *SMR5* y *SMR7* se incrementa en la mutante tratada. De igual manera algunos de los genes de ciclo celular tienen un ligero decremento en su expresión en las plantas *atm-2* con zeocina, lo cual también es inconsistente con reportes previos por otros tipos de daño (Culligan *et al* 2006, Ricaud *et al* 2007). Como control se midió la expresión de *HAM1*, observándose que los tratamientos de daño al DNA no afectan mucho su expresión y solo se aprecia una marcada disminución en la mutante *ham1-1* tanto en condiciones de crecimiento normal como en condiciones de daño, corroborando el comportamiento de la mutante.

5.4 Expresión de genes de reparación durante el daño por DSBs en la mutante *ham1-1*.

Por su actividad de histona acetilasa es probable que *HAM1* participe en la activación transcripcional de los genes de respuesta al daño al DNA por DSBs. Para poder determinar si esta hipótesis era correcta se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativos a partir de cDNA de raíces de plántulas silvestres, *ham1-1* y *atm-2* crecidas por 5 días y tratadas durante 8 horas. Como se mencionó anteriormente, la mutante *atm-2* tiene problemas para activar la respuesta al daño al DNA por DSBs, lo cual incluye la inducción transcripcional de los genes de respuesta al daño (Culligan *et al* 2006), por lo que se le utilizó como control para comparar las posibles alteraciones transcripcionales que pudiera tener *ham1-1* durante la inducción de DSBs.

Como ya se mencionó anteriormente, la regulación transcripcional durante la respuesta al daño al DNA por radiación ionizante alcanza su pico a las 6 horas de ocurrido el daño (Culligan *et al* 2006), por lo que la expresión de los genes de daño se evaluó

también a las 8 horas de tratamiento con zeocina, asegurándonos así de estar dentro del punto de máxima inducción. En este ensayo se analizó la expresión de *BRCA1*, *PARP1* y *RAD51*, además de *KU70*, genes implicados en la reparación homóloga y no homóloga del daño al DNA por DSBs (Figura 2). Estos son algunos de los genes que más se inducen durante los tratamientos de DSBs (Culligan *et al* 2006, Yoshiyama *et al* 2013a).

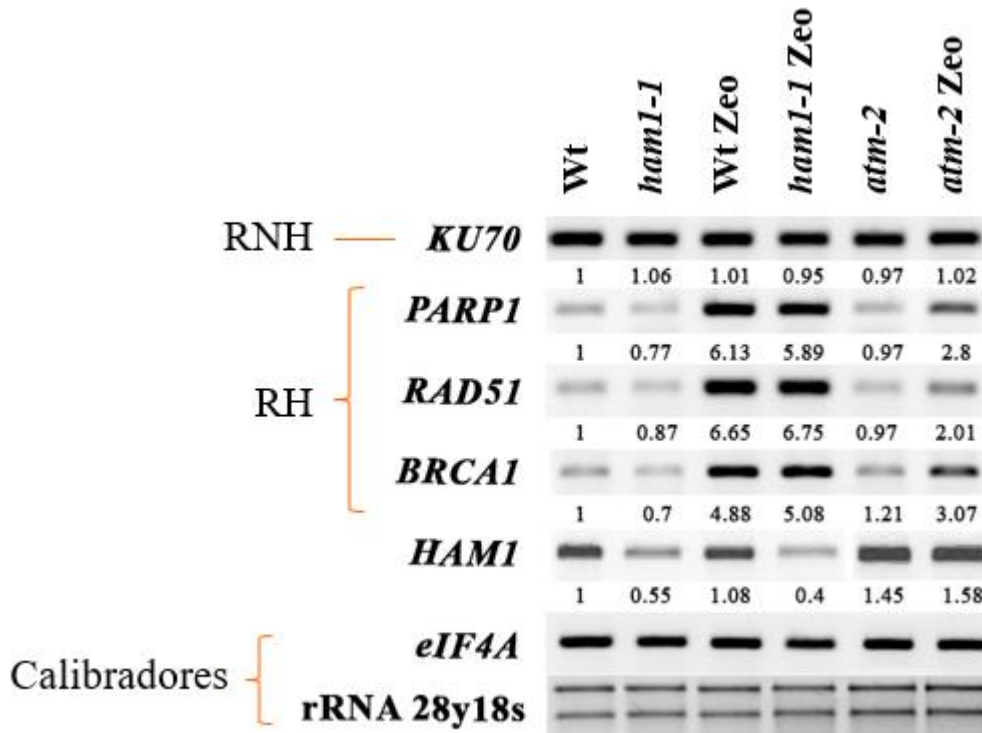


Figura 14. Expresión de genes de reparación de DSBs en plantas Wt, *ham1-1* y *atm-2*. Raíces de plantas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio con zeocina a 20 µg/ml. Los números representan los valores de densitometría normalizados respecto al calibrador eIF4A tomando como valor de referencia la expresión del Wt en MSS. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

Al analizar la Figura 14 se observa que hay una clara inducción de *BRCA1*, *PARP1* y *RAD51* en la planta silvestre y *ham1-1* bajo condiciones de inducción de DSBs, incremento que no es tan marcada en la mutante *atm-2*, comportamiento similar al reportado para esta mutante (Culligan *et al* 2006). Curiosamente en estos ensayos no se encontró cambios en la expresión de *KU70* en ninguno de los casos. Es interesante notar que no se presentan grandes diferencias en la expresión de ninguno de estos genes de reparación entre la planta silvestre y la planta *ham1-1* en condiciones de inducción de daño al DNA, fenómeno similar al que se presenta con los genes del ciclo celular.

5.5 Patrón de acetilación global de las histonas H3 y H4 en la mutante *ham1-1* y en las plantas *HAM1:GFP* durante el daño por DSBs.

Otro aspecto que se evaluó fue la acetilación global de la histona H4 en sus residuos de lisina 5, 8, 12 y 16 y la acetilación solo de la lisina 5, marca que específicamente deposita HAM1 en las plantas *ham1-1* y *HAM1:GFP* con y sin DSBs. Como control se evaluó la acetilación global de la histona H3, ya que las marcas de acetilación de esta histona se asocian típicamente a la activación transcripcional de genes (Lee & Shilatifard 2007) y son muchos los genes que se activan o reprimen durante la respuesta al daño al DNA (Culligan *et al* 2006, Yoshiyama *et al* 2013a). A partir de estos ensayos de western blot se puede observar que la cantidad global de H3 acetilada no parece mostrar grandes cambios ni en la mutante *ham1-1*, ni en las plantas *HAM1:GFP* respecto a las plantas silvestres. Tampoco se observaron diferencias en dichas plantas pero con DSB (Figura 15).

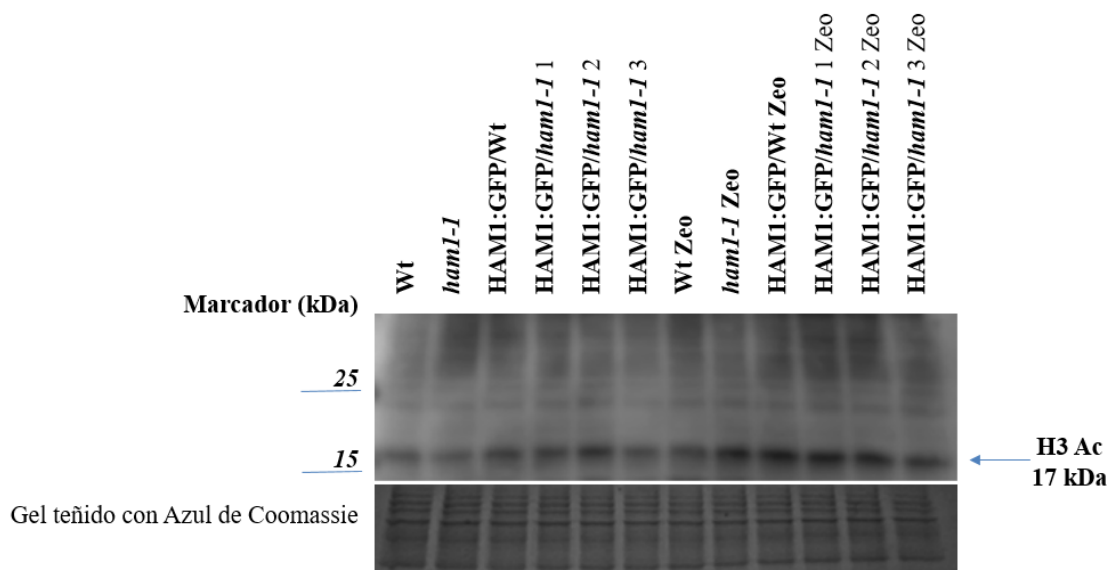


Figura 15. Acetilación global de H3 durante los tratamientos de DSBs en plantas Wt, *ham1-1* y plantas transformadas con *HAM1:GFP*. Extractos proteicos de raíces de plantas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio MSS o MSS con zeocina a 20 $\mu\text{g/ml}$. Se cargó la misma cantidad de proteínas totales en cada muestra. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

Las marcas de acetilación de la H4, en particular la acetilación de la lisina 5, no son marcas que se asocien normalmente a la activación transcripcional de genes, estas suelen asociarse al relajamiento de la cromatina para otras funciones, como la replicación

del DNA (Bird *et al* 2002, Costas *et al* 2011, Sanchez *et al* 2012). Al igual que la acetilación de H3, la acetilación global de la histona H4 no mostró diferencias consistentes entre las plantas usadas que incluyen la mutante *ham1-1* y HAM1:GFP, ni entre los tratamiento de daño (Figura 16).

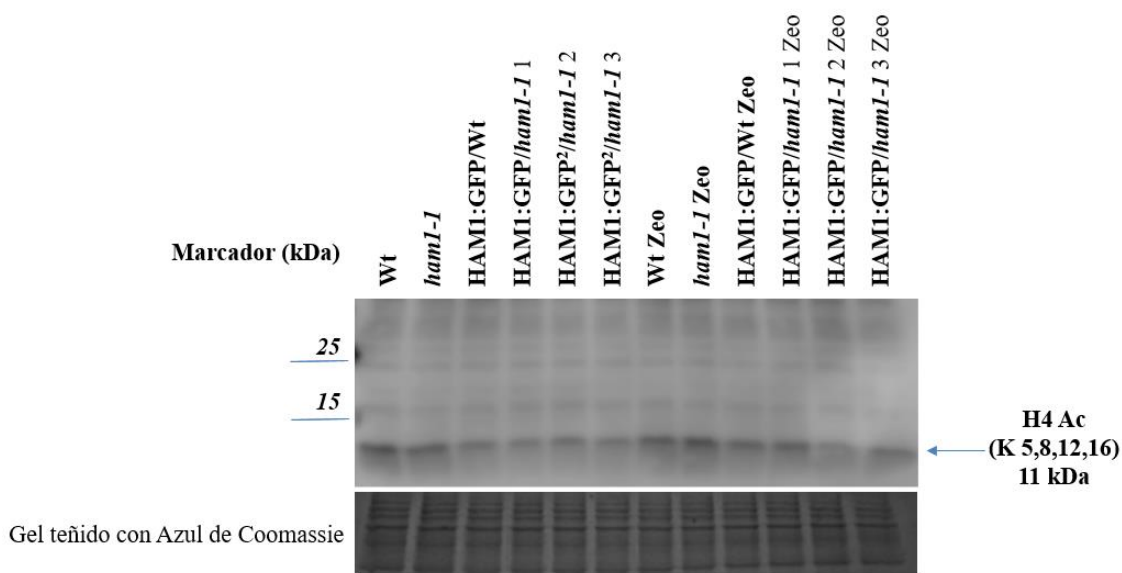


Figura 16. Acetilación global de H4 durante los tratamientos de DSBs en plantas Wt, *ham1-1* y plantas transformadas con HAM1:GFP. Raíces de plantas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio MSS o MSS con zeocina a 20 µg/ml. Se cargó la misma cantidad de proteínas totales en cada muestra.

Una de las marcas de acetilación más importantes a analizar era la acetilación de la lisina 5 de la histona 4, ya que es la marca que preferencialmente coloca HAM1, por lo que era necesario determinar si dicha marca presentaba cambios durante el daño por DSBs en la mutante *ham1-1* y en las plantas transformadas con HAM1:GFP. En los ensayos de western blot no se observan alteraciones a nivel global de la H4K5 acetilada, ni en la planta *ham1-1* respecto a la planta silvestre, ni durante la inducción de los tratamientos de daño al DNA por DSBs. Por otro lado la acetilación en las plantas HAM1:GFP no presenta diferencias en su acetilación respecto a la planta silvestre (Figura 17). Con estos ensayos podemos decir que la acetilación global de H4 y de la lisina 5 no parece mostrar grandes cambios entre las plantas usadas ni entre los tratamientos realizados; es probable que los cambios en acetilación se dan en loci o sitios específicos de la cromatina que no se observan en los ensayos globales de acetilación. Esto se discute más ampliamente más adelante.

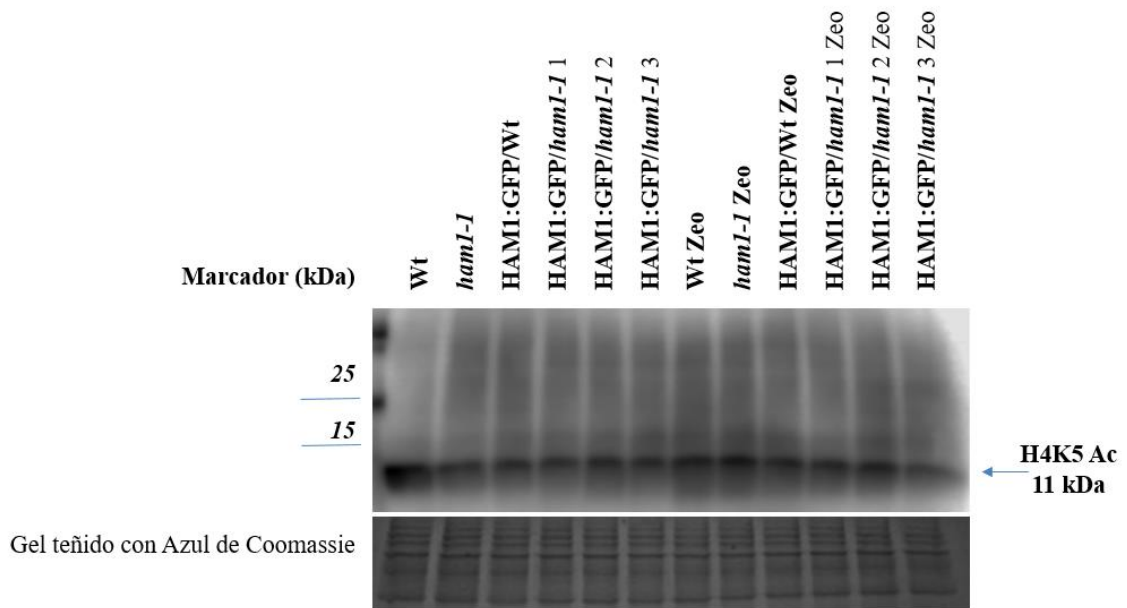


Figura 17. Acetilación global de H4K5 durante los tratamientos de DSBs en plantas Wt, *ham1-1* y plantas transformadas con HAM1:GFP. Raíces de plantas crecidas durante 5 días en medio MSS y transferidas durante 8 horas a medio MSS o MSS con zeocina a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se cargó la misma cantidad de proteínas totales en cada muestra. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

5.6 Patrón de expresión de *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* en plantas mutantes *ham1-1* durante la inducción de DSBs.

De acuerdo con los resultados anteriores, la mutante *ham1-1* presenta deficiencias en la detención de la proliferación celular; sin embargo, al comparar la expresión de diversos genes del ciclo celular, de respuesta al daño al DNA y las marcas globales de acetilación de histonas no se encuentran diferencias significativas entre la mutante *ham1-1* y la planta silvestre en condiciones normales y de daño por DSBs. Así que se incorporó a la mutante *ham1-1*, un marcador como *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* (Colon-Carmona *et al* 1999), el cual corresponde a una ciclina de la fase G2/M del ciclo celular que, a diferencia de otras ciclinas B de *Arabidopsis*, se induce transcripcionalmente y su proteína se acumula durante los tratamientos de daño al DNA por radiación ionizante (Culligan *et al* 2006), por lo que en presencia de daño al DNA, la acumulación en la expresión de este marcador indican la acumulación de daño al DNA (Gonzalez Besteiro & Ulm 2013, Zhu *et al* 2011). Para evaluar el patrón de expresión de *CYCB1;1* se incorporó a la mutante *ham1-1* el marcador *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* por medio de cruzas, utilizando como planta madre a *ham1-1* y como padre a *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS*. La primera generación de plantas obtenida fue heterocigota tanto para el alelo *ham1-1* como para el alelo *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS*, por lo que fue necesario seguir la segregación de estos alelos hasta la tercera generación, en la cual ya se obtuvieron plantas homocigotas para ambos caracteres. Se analizaron 3 líneas *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS/ham1-1* provenientes de cruzas independientes. Con estas líneas se realizó una cinética de expresión de este marcador en plántulas de 3 días tanto en fondo silvestre como en fondo *ham1-1* bajo condiciones de crecimiento normales y durante la inducción de daño al DNA con zeocina. Con los resultados obtenidos lo primero que se puede observar es que ya bajo condiciones de crecimiento normales se presenta una sobreexpresión de éste marcador en las plantas *ham1-1* y que dicha sobreexpresión se acentúa todavía más en estas plantas tratadas en zeocina, en las cuales la acumulación de *CYCB1.1DB:GUS* se incrementa junto con la duración del tratamiento con zeocina (Figura 18). Es interesante notar que la actividad transcripcional del gen de *CYCB1;1* es similar entre la planta silvestre y la mutante *ham1-1*, al igual que ocurre con los otros genes del ciclo celular probados hasta ahora (Figura 13). Esto nos indica que la acumulación de la proteína *CYCB1;1* se debe a que se está impidiendo su degradación. Dado que los genes de

distintas fases del ciclo celular tienen un comportamiento normal en la mutante *ham1-1* podemos suponer que esta acumulación no se debe a una desregulación del ciclo celular como sería un arresto del ciclo en la fase G2/M. Lo más probable es que la acumulación de CYCB1;1 sea resultado de una estabilización de la proteína como resultado de la activación de los mecanismos de respuesta al daño al DNA, lo cual sugiere que la mutante *ham1-1* presenta daño en condiciones de crecimiento normales y esta acumulación de daño se acentúa durante la inducción de DSBs.

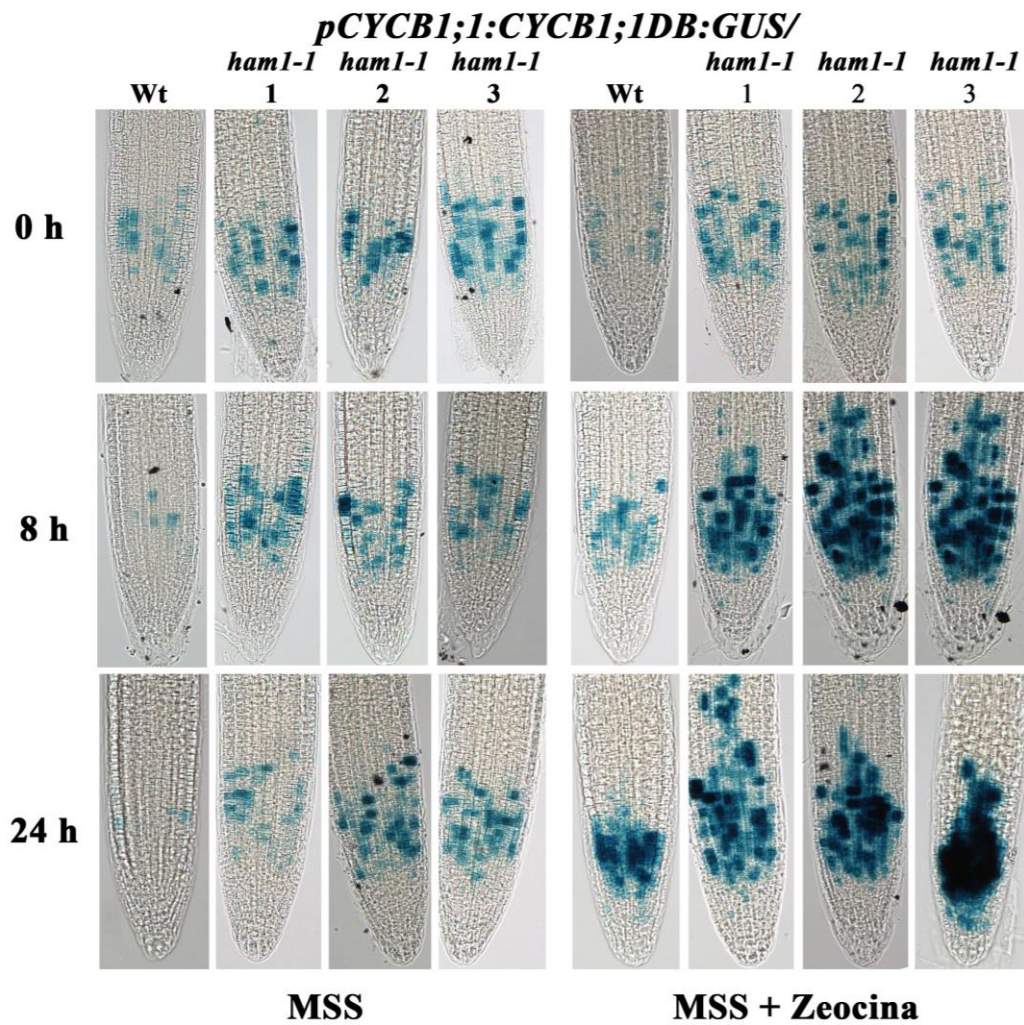


Figura 18. Expresión de *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS/Wt* y *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS/ham1-1* en plántulas de 3 días tratadas durante 0, 8 y 24 horas en medio MSS y MSS con zeocina a 20 µg/ml. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas.

5.7 Determinación de la muerte celular inducida por DSBs en plantas mutantes *ham1-1* y en las plantas *HAM1:GFP/ham1-1*.

La muerte celular programada es una respuesta típica de las células meristemáticas ante el daño al DNA por DSBs. La sobreexpresión de *pCYCB1.1:CYCB1.1DB:GUS* sugiere una acumulación de daño al DNA en la mutante *ham1-1*, lo cual podría tener un efecto en la muerte celular programada en el meristemo. Anteriormente ya se habían hecho experimentos con la mutante de *ham1-1* para determinar cómo se daba la muerte celular en la mutante *ham1-1*, pero no se contaban con suficientes réplicas biológicas para asegurar que los resultados obtenidos eran concluyentes, además de que no se había tenido oportunidad de evaluar este fenómeno en las plantas transformadas con la construcción *HAM1:GFP^{242P/S}* para determinar la complementación de este fenotipo. Por ello se realizaron algunas réplicas más de este experimento y gracias a estos últimos ensayos se pudo observar que la muerte celular abarca una mayor área del meristemo en las mutantes *ham1-1* en comparación con las plantas silvestres bajo condiciones de inducción de daño al DNA por DSBs, fenotipo que además se revierte con la presencia de la construcción *HAM1:GFP^{242P/S}* (Figura 19). Está reportado que tanto *atm-2* como *atr-2* presentan una disminución drástica en la muerte celular programada bajo condiciones de inducción de daño al DNA en el meristemo radicular (Fulcher & Sablowski 2009), lo cual se utilizó como control para corroborar nuestros experimentos (Figura 19).

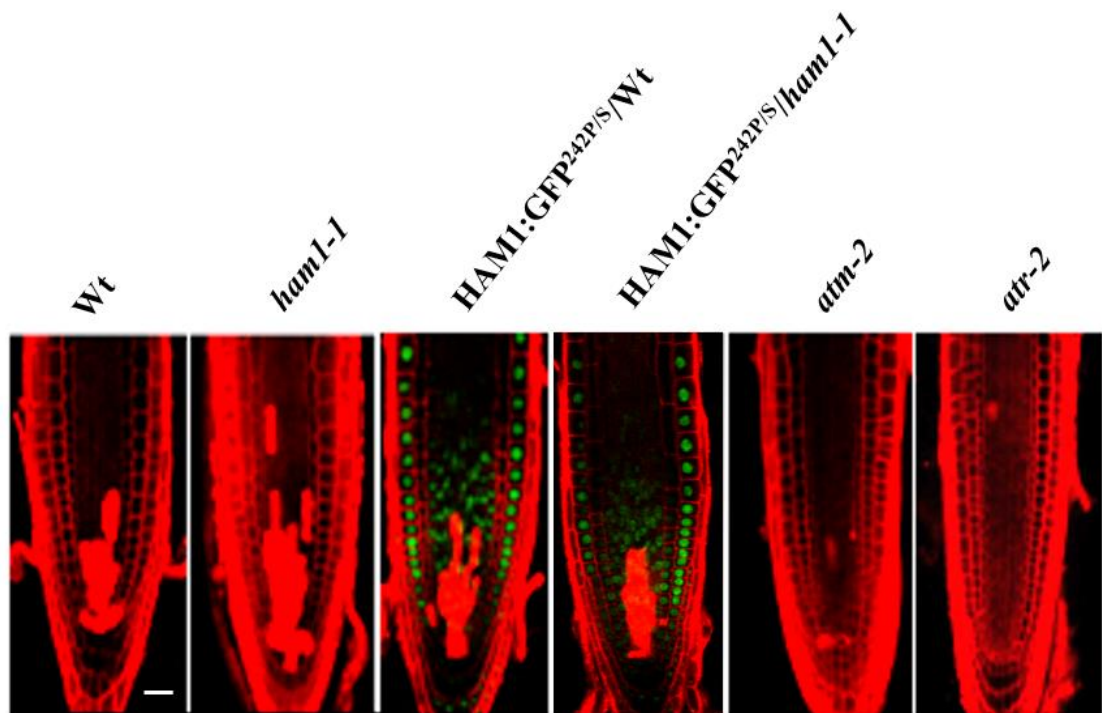


Figura 19. Muerte celular inducida por DSBs en plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 horas a medio MSS+20 μ g/ml de zeocina. Resultado representativo de 3 réplicas biológicas. Muestras observadas a 40x. La barra blanca representa 40 micrómetros.

Utilizando todas las fotografías hechas a partir de estos ensayos, se cuantificó el área que presenta muerte celular (ver materiales y métodos) y se realizaron análisis estadísticos. Como se puede observar en la Figura 20, la acumulación de muerte celular es significativamente mayor bajo condiciones de inducción de DSBs para la planta *ham1-1*, mientras que las plantas HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* no presentan diferencias significativas de muerte celular respecto al silvestre, indicando que la acumulación de muerte celular en *ham1-1* se debe a la ausencia de HAM1 ya que cuando se complementan están plantas con la construcción HAM1:GFP se observa una disminución de muerte celular respecto a las plantas mutantes no complementadas. Además las plantas mutantes *atm-2* y *atr-2* que se usaron como control de este experimento presentan un menor nivel de muerte celular en comparación con las plantas silvestres, corroborando lo previamente reportado (Fulcher & Sablowski 2009).

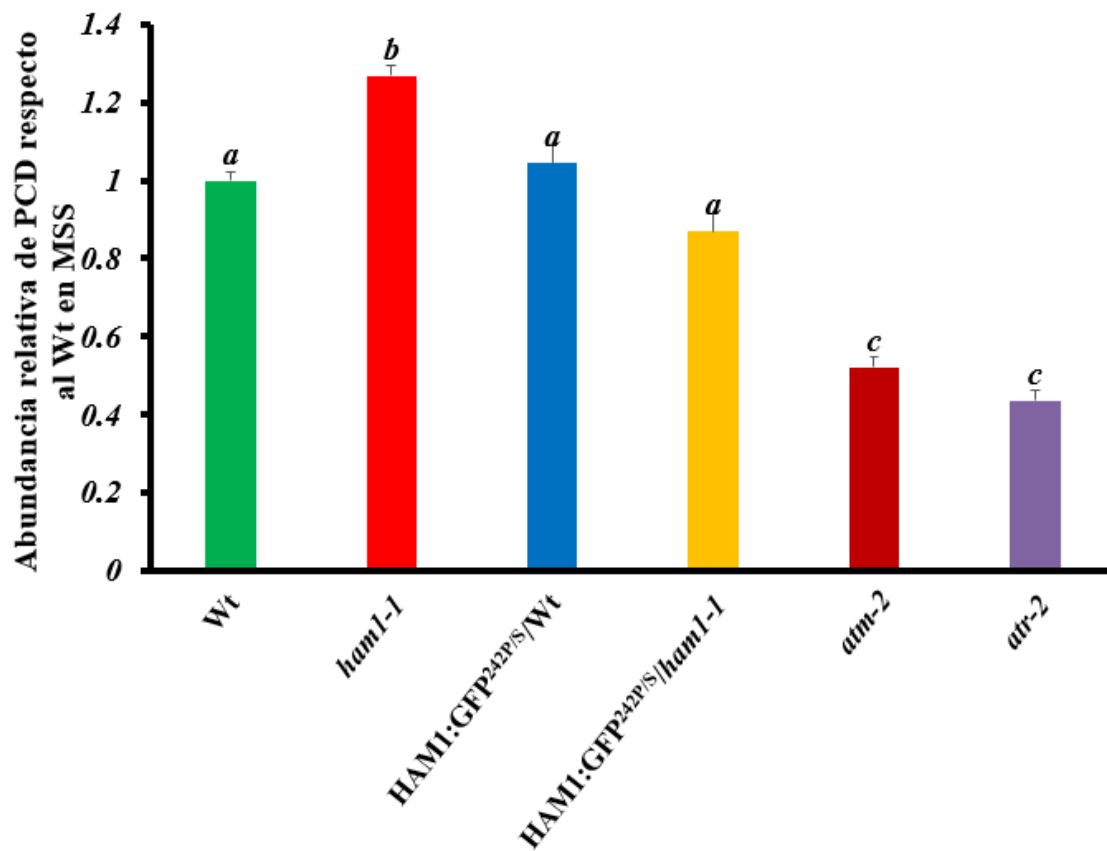


Figura 20. Abundancia relativa de muerte celular bajo condiciones de inducción de DSBs en plantas Wt, *ham1-1*, HAM1:GFP^{242P/S}/Wt y HAM1:GFP^{242P/S}/*ham1-1* respecto al Wt en MSS. Plántulas crecidas durante 3 días en medio MSS y transferidas durante 24 hrs a medio MSS+20 µg/ml de zeocina. n>20. Las barras representan el error estándar. “a”, “b” y “c” indican las diferencias entre grupos con p<0.001.

6 Discusión

La respuesta al daño al DNA requiere de la activación coordinada de diversos mecanismos que regulan la actividad celular, con el fin de prevenir la propagación del daño, reparar el daño y en algunos casos eliminar a la célula dañada (Yoshiyama *et al* 2013b). Para que ocurra la activación de estos mecanismos se requiere de una regulación dinámica de la estructura de la cromatina, ya sea por medio de la regulación transcripcional de diversos genes blanco o por medio de la apertura del sitio donde ocurrió el daño para que éste pueda ser reparado (Yoshiyama *et al* 2013b, Zhu *et al* 2011). Es por ello que las modificaciones de histonas como la acetilación tienen una función fundamental en estos procesos de respuesta al daño al DNA. En diversos organismos se tiene reportado que la familia de histonas acetilasas MYST participa en la respuesta al daño al DNA (Zhu *et al* 2013); sin embargo no se ha descrito a profundidad la función de estas enzimas en las plantas. En *Arabidopsis thaliana* existen 2 miembros de la familia MYST: HAM1 y HAM2 (Earley *et al* 2007). Reportes previos indican que la actividad de HAM1 es más importante que la de HAM2 para la respuesta al daño al DNA por luz UV en la parte aérea de la planta (Campi *et al* 2012), y la expresión de HAM2 es menor que la de HAM1 en la raíz (Sánchez, comunicación personal), lo cual explica la presencia de un fenotipo en la mutante de expresión disminuida *ham1-1* durante la respuesta al daño al DNA por DSBs (Steckenborn 2013), por lo que en este proyecto se estudió a HAM1, una de las dos MYST de *Arabidopsis thaliana*, en los procesos de daño al DNA por DSBs. Para analizar su posible función se estudiaron 4 mecanismos de la respuesta al daño al DNA fácilmente discernibles, los cuales son: 1) La regulación de la proliferación celular, 2) La activación transcripcional de los genes de reparación, 3) La expresión de un marcador de daño al DNA, y 4) La inducción de muerte celular programada. Los resultados anteriormente descritos indican que la mutante *ham1-1* tiene defectos en la inhibición de la proliferación celular durante las DSBs, fenotipo que se revierte exitosamente con las construcciones HAM1:GFP^{242P/S} y HAM1:GFP. También muestran que la mutante *ham1-1* no afecta la expresión de los genes del ciclo celular y de respuesta al daño al DNA en los tiempos probados; que el nivel de acetilación global de las histonas H3 y H4 tampoco se ve alterado por los tratamientos de daño al DNA, el fondo genético *ham1-1* o la presencia de la construcción HAM1:GFP; y que la mutante *ham1-1* presenta una mayor acumulación de marcadores de daño al DNA como CYCB1;1 y la inducción

de PCD, fenotipo que también se revierte exitosamente en las plantas transformadas con HAM1:GFP^{242P/S}. Cada uno de estos fenotipos se discute en los siguientes apartados.

6.1 Patrón de expresión de HAM1 en la raíz y su relación con su función.

Las plantas HAM1:GFP^{242P/S} y HAM1:GFP revelaron que HAM1 es una proteína nuclear que en la raíz se expresa preferencialmente en las células meristemáticas. Si bien este patrón de expresión se conserva en todas las plantas estudiadas, la intensidad en la expresión de GFP varía en algunas de ellas. Estas diferencias no están asociadas al fondo genético (silvestre o mutante *ham1-1*) de las plantas ni a la construcción usada (HAM1:GFP^{242P/S} o HAM1:GFP), por lo que dichas diferencias de expresión podrían deberse al sitio donde ocurrió la inserción en cada línea.

El patrón de expresión de HAM1 en las células en división sugiere que se requiere de su función al inicio del ciclo celular, probablemente desde la fase G1 hasta finales de la fase G2, ya que en células próximas a dividirse la señal de GFP desaparece, lo que sugiere que HAM1 se está degradando entre G2/M, comportamiento parecido a algunas proteínas de ciclo celular como las ciclinas A y B, de las cuales se tiene reportado en distintos organismos, incluidas las plantas, que deben degradarse para permitir la mitosis (Ortiz-Gutierrez *et al* 2015), como es el caso de CYCB1;1 en *Arabidopsis*, la cual al no ser degradada impide la división celular (Weingartner *et al* 2004). El patrón de expresión de HAM1 coincide con los tiempos en que se pueden llevar a cabo los procesos de replicación y/o reparación del DNA, los cuales inician desde la transición G1/S hasta la fase G2 donde se revisa que el material genético se haya duplicado adecuadamente (Gutierrez 2009). Este patrón de expresión en conjunto con los reportes de que en los orígenes de replicación activos hay un enriquecimiento en la acetilación de la histona H4 en particular en los residuos de lisina 5 (Costas *et al* 2011, Sanchez *et al* 2012), marca que cataliza HAM1 (Latrasse *et al* 2008, Xiao *et al* 2013); y de la interacción de HAM1 con proteínas de replicación (Sánchez *et al.*, datos no publicados), sugieren que HAM1 participa en el metabolismo del DNA, igual que algunas proteínas con dominio MYST, como Human acetylase Binding to ORC1 (HBO1) de animales la cual es necesaria para un adecuado ensamblaje del pre-RC por su interacción con ORC1 y MCM (Miotto &

Struhl 2008); otro ejemplo es Something About Silencing3 (SAS3) de levaduras que además de participar en procesos de transcripción es necesaria para promover la transición G2/M e interacciona con la proteína cinasa efectora de daño al DNA ChK1, que media el arresto de la mitosis (Liu *et al* 2000).

Dada su probable participación en el metabolismo del DNA, es lógico suponer que HAM1 tenga una mayor expresión en células que están en constante proliferación, como las células meristemáticas. De hecho se ha reportado en mamíferos que las MYST desempeñan funciones clave en la regulación de la proliferación, llegando a ser consideradas como posibles oncogenes, ejemplos de esto son MOnocytic leukaemia Zing finger (MOZ) la cual está sobreexpresada en varios tipos de leucemias agudas (Lafon *et al* 2007) y HBO1 la cual regula a los receptores de esteroides, lo cuales a su vez están implicados en el desarrollo del cáncer (Wang *et al* 2010).

Por otra parte, es curioso notar que la expresión de HAM1 no se abate durante los tratamientos con zeocina para inducir daño al DNA, a diferencia de otros genes que también participan en la formación del pre-RC, como *ORC6*, *CDC6*, *MCM1* o *CDT*, y de forma similar a genes implicados en la respuesta al daño al DNA, como *WEE1*, *MRE11*, *ATM* o *ATR*, las cuales mantienen su expresión (Datos obtenidos de la colección de microarreglos de Winter *et al* 2007, disponible en <http://bbc.botany.utoronto.ca/>). Este patrón de expresión es consistente con la hipótesis de que HAM1 desempeña alguna función durante la respuesta al daño al DNA, al igual que las MYST de mamíferos TAT Interactive Protein60 (TIP60) y MOZ, necesarias para un adecuada apertura de la cromatina en los sitios donde ocurren las DSBs (Avvakumov & Cote 2007, Lafon *et al* 2007, Sharma *et al* 2010, Sun *et al* 2005).

La expresión de HAM1 también se observa en células de la epidermis de la raíz no proliferativas, esta expresión podría sugerir una función de HAM1 no relacionada con metabolismo de DNA. El patrón de expresión alternado en estas células puede sugerir una función en procesos de diferenciación o formación de pelos radiculares, este supuesto es apoyado por datos preliminares de nuestro laboratorio que indican que la mutante *ham1-1* tiene un expresión alterada del gen *GLABRA2* (GL2), el cual normalmente se expresa en las células de la epidermis de manera alternada para regular la formación de los pelos radiculares (Khosla *et al* 2014). La participación de HAM1 en procesos de diferenciación es también apoyada por reportes que indican que se requiere de HAM1 y

HAM2 para la inducción transcripcional del gen Flowering Locus C (*FLC*), implicado en la represión de la floración (Xiao *et al* 2013), lo que indica que la expresión de HAM1 podría requerirse para la activación transcripcional en tejidos diferenciados.

6.2 HAM1 y la proliferación del RAM durante la inducción de DSBs.

Uno de los fenómenos que ocurre durante la respuesta al daño al DNA es la reducción de la proliferación celular, lo cual sucede como resultado del arresto del ciclo celular (Preuss & Britt 2003). Así mutantes defectuosas en la reparación del daño al DNA, como *rad50*, *nbs1* y *mre11* promueven el arresto del ciclo celular e inhiben el crecimiento radicular como resultado de una continua activación de los mecanismos de señalización en respuesta al daño al DNA, en particular por la vía de señalización de la cinasa ATR (Amiard *et al* 2010), mientras que mutantes defectuosas en la señalización del daño, como es el caso de ATM, no disminuyen su proliferación celular durante el daño al DNA (Culligan *et al* 2006). Esta reducción en la proliferación celular está asociada a una disminución en la expresión de un gran número de genes del ciclo celular, algunos de ellos son *CYCD3;1*, *CYCD3;2*, *CYCB1;2* y *CYCB1;4*, (Culligan *et al* 2006), implicados en la progresión del ciclo celular de G1/S y G2/M (Scofield *et al* 2014); mientras que otros genes implicados en el arresto del ciclo celular se inducen transcripcionalmente, como *SMR4*, *SMR5* y *SMR7* (Yi *et al* 2014). Existen otras proteínas implicadas en la inhibición de la progresión del ciclo celular bajo condiciones de inducción de daño al DNA, como WEE1 y las KRPs (Yoshiyama *et al* 2013b), sin embargo, sus genes no se inducen durante la respuesta al daño al DNA (Culligan *et al* 2006), si no que la activación de sus proteínas depende de modificaciones postraduccionales resultado de la activación de las vías de señalización en respuesta al daño al DNA, como ocurre con WEE1, la cual es activada por medio de fosforilaciones inducidas por ATM y ATR (De Schutter *et al* 2007).

Es interesante notar que en condiciones de daño por DSBs, la mutante *ham1-1* genera meristemas con una mayor cantidad de células respecto a la plantas silvestre, fenotipo que se revierte con las construcciones HAM1:GFP y HAM1:GFP^{242P/S}, lo que sugiere que se requiere de la función de HAM1 para una adecuada detención de la proliferación celular del meristemo bajo condiciones de inducción de daño al DNA por

DSBs y que la mutación en el aminoácido 242 no afecta la función de HAM1, por lo menos en este tejido. Si este fenotipo se debía a un deficiente arresto del ciclo celular, probablemente se vería reflejado en la expresión de genes del ciclo celular implicados en la progresión de G1/S, G2/M, en la endoreplicación y en el arresto del ciclo celular, como *CYCB1;1*, *CYCB1;2*, *CYCB1;4*, *CYCD3;1*, *H4*, *CC52A1*, *SMR5* y *SMR7*; sin embargo, no se encontraron diferencias en expresión entre la planta silvestre y *ham1-1* bajo condiciones de daño. Esto sugiere que el aumento en el número de células meristemáticas en *ham1-1* bajo condiciones de DSBs no se debe a cambios transcripcionales globales de estos genes involucrados en la progresión o el arresto del ciclo celular, aunque con el método usado no podemos determinar diferencias pequeñas en la expresión de estos genes o diferencias en algún tejido específico de la raíz, lo cual es importante ya que el fenotipo observado en las mutantes *ham1-1* no es muy drástico y se observa principalmente en el meristemo. Tampoco podemos descartar la posibilidad de que se estén desregulando otros genes que no se analizaron en este trabajo o que el fenotipo observado se deba a un control del ciclo celular a otro nivel como el postraduccional. Se ha reportado que las MYST TIP60 y SAS3, de animales y levaduras respectivamente, también son capaces de acetilar proteínas no histonas implicadas en el arresto del ciclo celular, como ATM y Chk1, para regular su actividad (Liu *et al* 2000, Sun *et al* 2005). Un fenómeno observado con *ham1-1* que respalda esta hipótesis es la expresión de *CYCB1;1*, la cual no se induce drásticamente a nivel transcripcional en la mutante respecto a la planta silvestre durante la inducción de DSBs, pero cuya proteína si se acumula más en *ham1-1* durante la respuesta al daño al DNA, lo cual indica que no se está degradando la proteína (ver la discusión más adelante).

Para determinar si hay o no un problema con la regulación del ciclo celular en la mutante *ham1-1* sería importante realizar análisis para estimar la velocidad de la proliferación celular y la duración de ciclo celular, lo cual se podría hacer incorporando a la mutante *ham1-1* un marcador de proliferación celular. También se podrían realizar ensayos de inmunoprecipitación para determinar si HAM1 se asocia a otras proteínas no histonas implicadas en la regulación del ciclo celular durante la inducción de DSBs.

Por otra parte, al usar como control a la mutante *atm-2*, se esperaba que los genes del ciclo celular analizados no mostraran cambios en los tratamientos de daño por zeocina, como se tiene reportado para radiación ionizante (Culligan *et al* 2006); sin embargo, es interesante notar que los genes de G2/M disminuyen su expresión en las

plantas *atm-2* tratadas, mientras que los genes SMR5 y SMR7 aumenta su expresión, lo cual sugiere un comportamiento diferencial entre la radiación ionizante y los tratamientos con zeocina.

6.3 HAM1 en la regulación de la expresión de los genes de reparación de DSBs.

Si bien la acetilación de la lisina 5 de la histona 4 es una marca que se asocia más al metabolismo del DNA que a la activación transcripcional (Costas *et al* 2011, Sanchez *et al* 2012), existen reportes que indican que se requiere de HAM1 y HAM2 para la inducción transcripcional de FLC (Xiao *et al* 2013). Al evaluar la función de HAM1 en la regulación transcripcional de los genes de respuesta a daño que más se inducen y cuya expresión durante las DSBs es esencial para reparar el daño, como *RAD51*, *PARP1* y *BRCAl*, los cuales participan en la RH (Culligan *et al* 2006) y de los genes que participan en RNH, KU70 y KU80, que se tiene reportado que se inducen en los tejidos aéreos durante los tratamientos con bleomicina (Tamura *et al* 2002), no se encontraron diferencias en la expresión de estos genes entre la planta silvestre y la planta *ham1-1*; en ambas plantas se da una inducción normal de *BRCAl*, *PARP1* y *RAD51* durante la inducción de DSBs. Además, es curioso notar que, a diferencia de lo que ocurre en la parte aérea, no parece haber una inducción de *KU70* en la raíz durante los tratamientos de daño, por lo que sería interesante investigar si esto se debe a alguna diferencia en la regulación de este gen entre los diferentes órganos. Estos datos indican que HAM1 no está implicada en la inducción transcripcional de estos genes de respuesta al daño al DNA. Sin embargo, el observar mayor acumulación de daño al DNA en la mutante *ham1-1* (mediante la acumulación de CYCB1;1 y de PCD) pero no observar diferencias a nivel transcripcional de algunos de los genes de daño sugiere que se requiere de HAM1 en otra vía o a otro nivel de la respuesta al daño al DNA. Existen reportes en otros modelos, como mamíferos, que involucran a las MYST, como TIP60 y MOZ, en el recambio de la variante de histonas H2AX fosforilada en los sitios donde ocurrió una DSB (Avvakumov & Cote 2007, Lafon *et al* 2007, Sharma *et al* 2010, Sun *et al* 2005); y en levaduras, donde se tiene reportado que la MYST SAS3 regula a la proteína efectora de la respuesta al daño al DNA Chk1 (Liu *et al* 2000). Si bien estos fenómenos son importantes para la respuesta a los DSBs, no necesariamente tendrían un impacto en la regulación transcripcional de

los genes de respuesta al daño al DNA, por lo que sería posible que HAM1 tenga una función semejante al de estas MYST, lo cual explicaría la mayor acumulación de daño al DNA en *ham1-1* sin presentarse alteraciones a nivel transcripcional.

6.4 Patrón de acetilación global de las histonas H3 y H4 durante la inducción de DSBs.

Durante la respuesta al daño al DNA se necesita de la regulación de la estructura de la cromatina, ya sea para la regulación transcripcional de diversos genes o para el relajamiento del sitio donde ocurrió el daño al DNA, lo que implicaría cambios en los patrones de acetilación de las histonas. En otros modelos se ha comprobado que las MYST son muy importantes para la remodelación de la cromatina, por ejemplo, en humanos se tiene reportado que la acetilación de MOZ se requiere para un adecuado recambio de la histona H2AX en los sitios donde ocurrió una DSB, además de la activación de DNA-PKcs para que se fosforile diversos blancos implicados en la RH y la RNH (Sharma *et al* 2010), fenómeno similar ocurre con TIP60, cuya acetilación es requerida para la activación de ATM y la formación de los foci de H2AX fosforilada, al igual que la activación transcripcional de factores transcripcionales clave en la respuesta al daño al DNA como p53 (Sun *et al* 2005); así mismo, HBO1 es necesaria para el recambio de la variante de histonas H2AZ en las regiones teloméricas y en los sitios de origen del replicación del DNA (Avvakumov *et al* 2012). En levaduras se tiene reportado que SAS3 interactúa con el factor remodelador de la cromatina Asf1 para acetilar la cromatina recién replicada; además la MYST ESA1 es necesaria para acetilar los sitios donde se replica el DNA y donde ocurrieron las DSBs (Lafon *et al* 2007). Como primera aproximación para evaluar la importancia de la acetilación de HAM1 durante la respuesta al daño al DNA, se analizó la acetilación global de la cromatina. Con estos ensayos pudimos observar que el nivel de acetilación global de la histona H3 y H4 no es diferente entre las plantas con daño al DNA y sin daño, al igual que entre las plantas silvestres, *ham1-1*, y las transformadas con HAM1:GFP. El mismo fenómeno ocurre con la acetilación de la lisina 5 de la H4, marca específica que coloca HAM1. Es probable que la ausencia de diferencias en la acetilación global se deba a que esta ocurra en loci o regiones de la cromatina específicos que no alcanzan a reflejarse en la cantidad total de histonas acetiladas. Un resultado que respalda esta hipótesis es la falta de cambios en la acetilación global de la H3, ya que durante la respuesta al daño al DNA ocurre una fuerte

regulación transcripcional de una gran cantidad de genes (Culligan *et al* 2006, Yoshiyama *et al* 2013a), la cual al parecer no alcanza a reflejarse en el nivel de acetilación global de la H3, por lo que sería lógico suponer que cambios de acetilación potencialmente más sutiles, como podrían ser los de la H4, serían aún más difíciles detectar por medio de estimaciones globales. Por ello sería interesante evaluar por medio de ensayos de inmunoprecipitación e inmunolocalización si ocurren cambios en estas marcas en ciertos sitios de la cromatina, como podría ser el sitio donde ocurrió el daño al DNA, y así determinar la importancia y función de HAM1 durante la respuesta al daño al DNA.

6.5 Acumulación de daño al DNA y de muerte celular bajo condiciones de inducción de DSBs en las plantas *ham1-1*.

Al analizar el patrón de expresión de diversos genes del ciclo celular y de respuesta al daño al DNA, así como el patrón global de acetilación de las histonas, no se encontraron diferencias significativas entre la planta silvestre y la mutante *ham1-1*. Sin embargo al estudiar la expresión de la proteína CYCB1;1, a través de la construcción pCYCB1;1:CYCB1;1DB:GUS, la cual se induce transcripcionalmente y se acumula no solo en la transición G2/M del ciclo celular (Colon-Carmona *et al* 1999) sino también durante los tratamiento de daño al DNA (Culligan *et al.*, 2006) y en consecuencia es utilizado como marcador de daño al DNA (Vanderauwera *et al* 2011); se observó una acumulación de la proteína CYCB1;1 en las plantas *ham1-1* aún sin inducción de daño, acumulación que se acentuaba todavía más durante la inducción de DSBs. Dado que no se observan cambios a nivel transcripcional en la mutante *ham1-1* de los genes del ciclo celular probados hasta ahora, incluidos los de otras ciclinas B, se puede suponer que esta acumulación no ocurre como consecuencia de una desregulación del ciclo celular. El observar una mayor acumulación de la proteína CYCB1;1 pero no una inducción más drástica del gen *CYCB1;1* en la mutante *ham1-1* indica que este fenotipo ocurre porque se impide la degradación de la proteína CYCB1;1. Reportes previos indican que la acumulación de la proteína CYCB1;1 durante el daño al DNA depende de la activación de los mecanismos de respuesta al daño al DNA mediados por la vía de señalización de ATR y no por ATM (Culligan *et al* 2004, Culligan *et al* 2006), por lo que sería interesante probar si la ausencia o inhibición de ATR impide la acumulación de CYCB1;1 en la mutante *ham1-1*. La acumulación del marcador pCYCB1;1:CYCB1;1DB:GUS sugiere que la ausencia de HAM1 induce acumulación de daño al DNA, y que éste daño se acumula mucho más cuando las plantas son tratadas con el inductor de DSBs. El mismo

fenotipo se presenta en plantas que tienen defectos en el mantenimiento de la integridad del genoma, como es el caso de la mutante para la DNA polimerasa y helicasa TEBICHI (*teb-1*) (Inagaki *et al* 2006)

La acumulación de daño al DNA puede dar lugar a la inducción de muerte celular programada (PCD) en los meristemos; y si bien la PCD depende también de ATM, ATR y SOG1 para su activación, se ha demostrado que esta respuesta ante el daño al DNA es independiente de las vías señalización que llevan al arresto del ciclo celular o a la reparación del daño al DNA, por lo que la muerte celular programada ocurre a pesar de que se presenten deficiencias en otras vías de respuesta al daño al DNA (Fulcher & Sablowski 2009, Yoshiyama *et al* 2013a). En la mutante *ham1-1* se presenta una mayor acumulación de PCD en comparación con la planta silvestre, fenómeno que se revierte con la construcción HAM1:GFP^{242P/S}. Esto sugeriría que en ausencia de HAM1 ocurre una mayor acumulación de daño al DNA, lo cual es consistente con la expresión de CYCB1;1. La mayor acumulación de muerte celular en el meristemo radicular bajo condiciones de inducción de DSBs en *ham1-1*, es un fenotipo que también se presenta en mutantes de las proteínas remodeladoras de la cromatina FASCIATA1 y FASCIATA2 (Kaya *et al* 2001); así como en las proteínas implicadas en la señalización en respuesta al daño al DNA como WEE1 (Cools *et al* 2011) y MRE11 (Bundock & Hooykaas 2002), lo cual apoya la idea de que este fenotipo ocurre como resultado de una mayor acumulación de daño al DNA.

A partir de estos datos podemos decir que se requiere de la función de HAM1 para una adecuada respuesta frente a un daño al DNA por DSBs. El hecho de no observar cambios en la expresión de diversos genes ni en la acetilación global de las histonas podría implicar que la actividad de HAM1 se requiere en sitios y contextos específicos que no están implicados con la regulación transcripcional de dichos genes y que no alcanzan a reflejarse en la acetilación global de las histonas. Dado que la acetilación de la lisina 5 de la histona 4 se asocia al relajamiento de la cromatina para facilitar el metabolismo del DNA (Costas *et al* 2011), es muy probable que dicha acetilación participe en el relajamiento de la cromatina en los sitios donde ocurrieron las DSBs, facilitando así su reparación. Esto podría explicar porque en ausencia de HAM1 se presenta una acumulación de marcadores de daño al DNA como la muerte celular o la acumulación de la proteína CYCB1;1, ya que una inadecuada acetilación de histonas en el sitio de la DSBs dificultaría la reparación del DNA, promoviendo que se acumule el

daño. Otra posibilidad a considerar sería que HAM1 acetile proteínas no histona que participen en la respuesta al daño al DNA, ya que se tiene reportado en otros modelos que las MYST acetilan proteínas no histonas, como la cinasa ATM, regulando así su actividad (Sun *et al* 2005). Una inadecuada activación de alguna proteína efectora podría llevar a alteraciones en la vía de señalización en respuesta a DSBs lo cual podría explicar los fenotipos previamente descritos.

7 Conclusiones

- La expresión de HAM1 en la raíz es nuclear y exclusiva de células proliferativas y de la epidermis. A nivel celular su expresión desaparece durante la mitosis para reaparecer cuando ya se concluyó la división celular.
- La expresión de HAM1 no se afecta por el tratamiento de inducción de DSBs.
- HAM1 participa en la disminución de la proliferación celular del meristemo radicular durante la inducción de DSBs.
- HAM1 no parece desempeñar alguna función crítica durante la regulación transcripcional de los genes del ciclo celular y de reparación de DSBs probados en este trabajo.
- La cantidad de acetilación global de las histonas H3 y H4, incluyendo la H4K5, no es afectada por la inducción de DSBs
- La función de HAM1 es necesaria para evitar una mayor acumulación de la proteína CYCB1;1, usada como marcador de daño al DNA
- Se requiere de la función de HAM1 para evitar mayor acumulación de muerte celular programada durante las DSBs.

8 Referencias

- Abe K, Osakabe K, Ishikawa Y, Tagiri A, Yamanouchi H, et al. 2009. Inefficient double-strand DNA break repair is associated with increased fasciation in Arabidopsis BRCA2 mutants. *Journal of experimental botany* 60: 2751-61
- Alberts B. 2008. Apoptosis In *Molecular biology of the cell*, pp. 1115. New York: Garland Science
- Amiard S, Charbonnel C, Allain E, Depeiges A, White CI, Gallego ME. 2010. Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in Arabidopsis. *The Plant cell* 22: 3020-33
- Avvakumov N, Cote J. 2007. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26: 5395-407
- Avvakumov N, Lalonde ME, Saksouk N, Paquet E, Glass KC, et al. 2012. Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation. *Molecular and cellular biology* 32: 689-703
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506
- Baloban M, Vanstraelen M, Tarayre S, Reuzeau C, Cultrone A, et al. 2013. Complementary and dose-dependent action of AtCCS52A isoforms in endoreduplication and plant size control. *The New phytologist* 198: 1049-59
- Bennett T, Scheres B. 2010. Root development-two meristems for the price of one? *Current topics in developmental biology* 91: 67-102
- Bennetzen MV, Larsen DH, Dinant C, Watanabe S, Bartek J, et al. 2013. Acetylation dynamics of human nuclear proteins during the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cell Cycle* 12: 1688-95
- Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu QF, Harmon KE, et al. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 419: 411-15
- Bleuyard JY, Gallego ME, Savigny F, White CI. 2005. Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant J* 41: 533-45
- Bleuyard JY, Gallego ME, White CI. 2006. Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA repair* 5: 1-12
- Bleuyard JY, White CI. 2004. The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *The EMBO journal* 23: 439-49
- Boycheva I, Vassileva V, Iantcheva A. 2014. Histone acetyltransferases in plant development and plasticity. *Current genomics* 15: 28-37
- Bundock P, Hooykaas P. 2002. Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in Arabidopsis MRE11 mutants. *The Plant cell* 14: 2451-62
- Campi M, D'Andrea L, Emiliani J, Casati P. 2012. Participation of chromatin-remodeling proteins in the repair of ultraviolet-B-damaged DNA. *Plant physiology* 158: 981-95
- Cole F, Keeney S, Jasin M. 2010. Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: more than just Spo11. *Genes & development* 24: 1201-7
- Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20: 503-8
- Cools T, Iantcheva A, Weimer AK, Boens S, Takahashi N, et al. 2011. The Arabidopsis thaliana checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *The Plant cell* 23: 1435-48

- Costas C, Sanchez M, Stroud H, Yu Y, Oliveros JC, et al. 2011. Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nature structural & molecular biology* 18: 395-400
- Culligan K, Tissier A, Britt A. 2004. ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 16: 1091-104
- Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB. 2006. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J* 48: 947-61
- De Schutter K, Joubes J, Cools T, Verkest A, Corellou F, et al. 2007. *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *The Plant cell* 19: 211-25
- Drury GE, Dowle AA, Ashford DA, Waterworth WM, Thomas J, West CE. 2012. Dynamics of plant histone modifications in response to DNA damage. *The Biochemical journal* 445: 393-401
- Dupre A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. 2006. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature structural & molecular biology* 13: 451-7
- Earley KW, Shook MS, Brower-Toland B, Hicks L, Pikaard CS. 2007. In vitro specificities of *Arabidopsis* co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J* 52: 615-26
- Friesner J, Britt AB. 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J* 34: 427-40
- Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB. 2005. Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Molecular biology of the cell* 16: 2566-76
- Fulcher N, Sablowski R. 2009. Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 20984-8
- Gallego ME, Bleuyard JY, Daoudal-Cotterell S, Jallut N, White CI. 2003. Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 557-65
- Garcia V, Bruchet H, Camescasse D, Granier F, Bouchez D, Tissier A. 2003. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant cell* 15: 119-32
- Gonzalez Besteiro MA, Ulm R. 2013. ATR and MKP1 play distinct roles in response to UV-B stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 73: 1034-43
- Gorbunova VV, Levy AA. 1999. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends in plant science* 4: 263-69
- Gutierrez C. 2009. The *Arabidopsis* cell division cycle. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 7: e0120
- Heacock M, Spangler E, Riha K, Puizina J, Shippen DE. 2004. Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining. *The EMBO journal* 23: 2304-13
- Hisanaga T, Ferjani A, Horiguchi G, Ishikawa N, Fujikura U, et al. 2013. The ATM-dependent DNA damage response acts as an upstream trigger for compensation in the *fas1* mutation during *Arabidopsis* leaf development. *Plant physiology* 162: 831-41

- Inagaki S, Suzuki T, Ohto MA, Urawa H, Horiuchi T, et al. 2006. Arabidopsis TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems. *The Plant cell* 18: 879-92
- Ivanov VB, Dubrovsky JG. 2013. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in plant science* 18: 237-43
- Jeong S, Bayer M, Lukowitz W. 2011. Taking the very first steps: from polarity to axial domains in the early Arabidopsis embryo. *Journal of experimental botany* 62: 1687-97
- Jiang L, Wang Y, Bjorn LO, Li SS. 2011. UV-B-induced DNA damage mediates expression changes of cell cycle regulatory genes in Arabidopsis root tips. *Planta* 233: 831-41
- Kaya H, Shibahara KI, Taoka KI, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T. 2001. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104: 131-42
- Khosla A, Paper JM, Boehler AP, Bradley AM, Neumann TR, Schrick K. 2014. HD-Zip Proteins GL2 and HDG11 Have Redundant Functions in Arabidopsis Trichomes, and GL2 Activates a Positive Feedback Loop via MYB23. *The Plant cell* 26: 2184-200
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes & development* 18: 1423-38
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D. 2004. Naturally occurring genetic variation in Arabidopsis thaliana. *Annual review of plant biology* 55: 141-72
- Lafon A, Chang CS, Scott EM, Jacobson SJ, Pillus L. 2007. MYST opportunities for growth control: yeast genes illuminate human cancer gene functions. *Oncogene* 26: 5373-84
- Latrasse D, Benhamed M, Henry Y, Domenichini S, Kim W, et al. 2008. The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in Arabidopsis. *BMC plant biology* 8: 121
- Lee JS, Shilatifard A. 2007. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutation research* 618: 130-4
- Liu Y, Vidanes G, Lin YC, Mori S, Siede W. 2000. Characterization of a Saccharomyces cerevisiae homologue of Schizosaccharomyces pombe Chk1 involved in DNA-damage-induced M-phase arrest. *Molecular & general genetics : MGG* 262: 1132-46
- Miotto B, Struhl K. 2008. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes & development* 22: 2633-8
- Molinier J, Oakeley EJ, Niederhauser O, Kovalchuk I, Hohn B. 2005. Dynamic response of plant genome to ultraviolet radiation and other genotoxic stresses. *Mutation research* 571: 235-47
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, et al. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* 104: 34-41
- Neal KC, Pannuti A, Smith ER, Lucchesi JC. 2000. A new human member of the MYST family of histone acetyl transferases with high sequence similarity to Drosophila MOF. *Biochimica et biophysica acta* 1490: 170-4
- Ortiz-Gutierrez E, Garcia-Cruz K, Azpeitia E, Castillo A, Sanchez Mde L, Alvarez-Buylla ER. 2015. A Dynamic Gene Regulatory Network Model That Recovers

- the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle. *PLoS computational biology* 11: e1004486
- Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, et al. 2002. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic acids research* 30: 5036-55
- Panier S, Boulton SJ. 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15: 7-18
- Preuss SB, Britt AB. 2003. A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 323-34
- Ramirez-Parra E, Gutierrez C. 2007. E2F regulates FASCIATA1, a chromatin assembly gene whose loss switches on the endocycle and activates gene expression by changing the epigenetic status. *Plant physiology* 144: 105-20
- Ricaud L, Proux C, Renou JP, Pichon O, Fochesato S, et al. 2007. ATM-mediated transcriptional and developmental responses to gamma-rays in *Arabidopsis*. *PLoS one* 2: e430
- San Filippo J, Sung P, Klein H. 2008. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* 77: 229-57
- Sanchez M, Costas C, Sequeira-Mendes J, Gutierrez C. 2012. Regulating DNA replication in plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4
- Scofield S, Jones A, Murray JA. 2014. The plant cell cycle in context. *Journal of experimental botany* 65: 2557-62
- Sekiguchi JM, Ferguson DO. 2006. DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* 124: 260-2
- Sharma GG, So S, Gupta A, Kumar R, Cayrou C, et al. 2010. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 30: 3582-95
- Steckenborn S. 2013. *Función de HAMI en respuesta a daño al DNA en la planta Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 71 pp.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13182-7
- Tamura K, Adachi Y, Chiba K, Oguchi K, Takahashi H. 2002. Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J* 29: 771-81
- Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. 2009. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation research* 681: 134-49
- Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, van de Cotte B, Morsa S, et al. 2011. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 1711-6
- Wang WZ, Liu HO, Wu YH, Hong Y, Yang JW, et al. 2010. Estrogen receptor alpha (ERalpha) mediates 17beta-estradiol (E2)-activated expression of HBO1. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 29: 140
- Weingartner M, Criqui MC, Meszaros T, Binarova P, Schmit AC, et al. 2004. Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *The Plant cell* 16: 643-57

- West CE, Waterworth WM, Jiang Q, Bray CM. 2000. Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* 24: 67-78
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* 2: e718
- Xiao J, Zhang H, Xing L, Xu S, Liu H, et al. 2013. Requirement of histone acetyltransferases HAM1 and HAM2 for epigenetic modification of FLC in regulating flowering in Arabidopsis. *Journal of plant physiology* 170: 444-51
- Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, et al. 2014. The Arabidopsis SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *The Plant cell* 26: 296-309
- Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, et al. 2013a. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO reports* 14: 817-22
- Yoshiyama KO, Sakaguchi K, Kimura S. 2013b. DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals. *Biology* 2: 1338-56
- Zhu Y, Dong A, Shen WH. 2013. Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta* 1819: 343-8
- Zhu Y, Weng M, Yang Y, Zhang C, Li Z, et al. 2011. Arabidopsis homologues of the histone chaperone ASF1 are crucial for chromatin replication and cell proliferation in plant development. *Plant J* 66: 443-55

9 Figuras Suplementarias

Figura Suplementaria 1.

Alineamiento de las secuencias del gen *HAMI* (Sequence_1: AT5G64610) obtenida de la página <https://www.arabidopsis.org/> y del gen clonado en la construcción *HAMI:GFP^{242P/S}* (Sequence_2: HAMI-242SP). En la secuencia 1 se muestra en **Azul** el promotor, en **Amarillo** los exones y en **Morado** los intrones. En la secuencia 2 se muestra en **Verde** los oligos usados para la clonación. El pequeño rectángulo **Azul** remarca el sitio de la mutación que da lugar al cambio del aminoácido 242.

Alignment of Sequence_1: [AT5G64610.xdna] with Sequence_2: [HAM1-242SP.txt.xdna]

Similarity : 3312/3317 (99.85 %)

```
Seq_1 1      tgatgcaaattggttggtcaaataatgaattaaattaaaatacgtttttccagcttcgtca 60
          |||
Seq_2 1      TGATGCAAATTGTTGGTCAAATAATGAATTAAATTAATAACGTTTTTCCAGCTTCGTCA 60

Seq_1 61      tttcattacatttgagtatctttactttatTTTTgaagaatttagaattgatgatatacg 120
          |||
Seq_2 61      TTTCATTACATTTGAGTATCTTTACTTTATTTTTGAAGAATTTAGAATTGATGATATACG 120

Seq_1 121     aacaagatatttgtcgatgaatcaatcattgtaggtaaaagaatcagccacttcaacacg 180
          |||
Seq_2 121     AACAAGATATTTGTCGATGAATCAATCATTGTAGGTAAAAGAATCAGCCACTTCAACACG 180

Seq_1 181     ttatttccaaaatttgataactaagttttgtttgctcaaccccccaattctgtctgttt 240
          |||
Seq_2 181     TTATTTCCAAAATTTGATAACTAAGTTTTGTTTGCTCAACCCCCCAATTTCTGTCTGTTT 240

Seq_1 241     taaagatttcgctactcttttctcattttttcttacaattatacaatttcacatcattat 300
          |||
Seq_2 241     TAAAGATTTTCGCTACTCTTTTCTCATTFTTTCTTACAATTATACAATTTTACATCATTAT 300

Seq_1 301     tatgaaaaaggatacacggtgtgtagtagctacaaaaattagaagatgaatatatgtca 360
          |||
Seq_2 301     TATGAAAAGGATACACGGTGTGTAGTAGCTACAAAAATTAGAAGATGAATATATGTCA 360

Seq_1 361     ccaaattaaatcattttatTTAAATTTCCCTTTAGTCAAGTTGCCATATAAGTATATAA 420
          |||
Seq_2 361     CCAAATTAATCATTFTTTAAATTTCCCTTTAGTCAAGTTGCCATATAAGTATATAA 420

Seq_1 421     cgtgtttacatgtgaacaactgaaataggaatcaattctatTTTTcttcattcgaatttc 480
          |||
Seq_2 421     CGTGTTTACATGTGAACAACCTGAAATAGGAATCAATTCTATTTTTCTTCATTTCGAATTC 480

Seq_1 481     aaaagtaagtaagtcaccacttcaattcataaccgaaaaataaaagtaaattgatagta 540
          |||
Seq_2 481     AAAAGTAAGTAAGTCACCACTTCAATTCATAACCGAAAAATAAAAGTAAATTGATAGTA 540

Seq_1 541     tgtaaaagtaaaacattctTTAAGAAAAATGAGATGTAAAATTTACATACAAGATACAG 600
          |||
Seq_2 541     TGTAAGTAAACATTTTAAAGAAAAATGAGATGTAAAATTTACATACAAGATACAG 600

Seq_1 601     taaagtgaccatgtgaatctTTTTgttcataaaaaatcatttggttaatctagaggaa 660
          |||
Seq_2 601     TAAAGTGACCATGTGAATCTTTTTGTTCATAAAAAATCATTTGGTTAATCTAGAGGAA 660

Seq_1 661     catggtgtgccaatctatgaccataacttcaaggacacgatgatgagttgtgttttctgt 720
          |||
Seq_2 661     CATGGTGTGCGAATCTATGACCATAACTTCAAGGACACGATGATGAGTCGTGTTTTCTGT 720

Seq_1 721     ctttgcttcttggaaactttgtgattttttgatctgtgaatcttgtgattagtagaatca 780
          |||
```

Seq_2	721	CTTTGCTTCTTGGAACTTTGTGATTTTTTTGATCTGTGAATCTTGTGATTAGTACGAATCA	780
Seq_1	781	taaagccttggttgctgtttccattcacgacaaaatactgactctgtcacttattatt	840
Seq_2	781	TAAAGCCTTGTTTGGCTGTTTCCATTACAGACAAAATACTGACTCTGTCACTTATTATT	840
Seq_1	841	tatctctcattatctcttttagtTTTTATAAAATTGTTTGCCTACTAATCATTCTTTAAA	900
Seq_2	841	TATCTCTCATTATCTCTTTAGTTTTTATAAAATTGTTTGCCTACTAATCATTCTTTAAA	900
Seq_1	901	tgtaacctggcgattataaaaactaaacataagccaacagttataaaaacgtgtattaacga	960
Seq_2	901	TGTAACCTGGCGATTATAAAACTAAACATAAGCCAACAGTTATAAAAACGTGTATTAACGA	960
Seq_1	961	cggtaagagatTTTTTGCACCCAAAAAAAAGGACGGTAAGAGAGACATATAGTACAGGC	1020
Seq_2	961	CGGTAAGAGATTTTTTGCACCCAAAAAAAAGGACGGTAAGAGAGACATATAGTACAGGC	1020
Seq_1	1021	caattataaagataggccaattgagcattcaaagttgttattgggccacactccttcca	1080
Seq_2	1021	CAATTATAAAGATAGGCCAATTGAGCATTCAAAGTTGTTATTGGGCCACACTCCTTCCA	1080
Seq_1	1081	aatgatgttctttatccgtatgagaaaagaatccaccggaaaaaatctccgaccgact	1140
Seq_2	1081	AATGATGTTCTTTATCCGTATGAGAAAAGAATCCACCCGAAAAAATCTCCGACCCGACT	1140
Seq_1	1141	aaagaaATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGCGTCG	1200
Seq_2	1141	AAAGAAATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGCGTCG	1200
Seq_1	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_2	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_1	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_2	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_1	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_2	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_1	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_2	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_1	1441	CATTACACAGAGTgtatgtcgtttcctcttctctatctgaatttgtaatctagggt	1500
Seq_2	1441	CATTACACAGAGTGTATGTCGTTTCTCCTTTCTCTATCTGAAATTTGTGAATCTAGGGT	1500
Seq_1	1501	ttatagattggagctgaaatttcgaagaattgaattagagggctttgcaattcaagttgt	1560
Seq_2	1501	TTATAGATTGGAGCTGAAATTTCAAGAATTGAATTAGAGGGCTTTGCAATTCAGTTGT	1560

```

Seq_1 1561 tttgagtatcacaactcttgtgaaactgcagTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAG 1620
|
Seq_2 1561 TTTGAGTATCACAACCTTGTGAAACTGCAGTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAG 1620

Seq_1 1621 CTTGAACAGCTTGACCTTGATTAGATGAGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG 1680
|
Seq_2 1621 CTTGAACAGCTTGACCTTGATTAGATGAGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG 1680

Seq_1 1681 gtattagccatTTTTCTCAAAGTCTTGAGCTTTCCTCTCCGTAGTTTGCCTGAAACAT 1740
|
Seq_2 1681 GTATTAGCCATTTTTCTCAAAGTCTTGAGCTTTCCTCTCCGTAGTTTGCCTGAAACAT 1740

Seq_1 1741 agaagtttgtttgtgtaaatagGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA 1800
|
Seq_2 1741 AGAAGTTTGTGGTAATAGGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA 1800

Seq_1 1801 GATTGATGAGACTCATGTAGAGGTAAGTATTGGTTAAGTTAGTTAACTTTGTTGTGG 1860
|
Seq_2 1801 GATTGATGAGACTCATGTAGAGGTAAGTATTGGTTAAGTTAGTTAACTTTGTTGTGG 1860

Seq_1 1861 ttttagtgaactgtgtggcatgctatatattctgatgtttttcgatattttgtatagGGT 1920
|
Seq_2 1861 TTTTAGTGAACGTGTGGCATGCTATATATCTGATGTTTTTCGATATTTTGTATAGGGT 1920

Seq_1 1921 CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCCTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC 1980
|
Seq_2 1921 CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCCTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC 1980

Seq_1 1981 ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT 2040
|
Seq_2 1981 ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT 2040

Seq_1 2041 CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTTATGAAG 2100
|
Seq_2 2041 CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTTATGAAG 2100

Seq_1 2101 CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGgtgagcaactgtttttttatcattttagcat 2160
|
Seq_2 2101 CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGGTGAGCAACTGTTTTTTTATCATTGTAGCAT 2160

Seq_1 2161 ttttaattgttttgtctttacagttatttttagtttcacacataccttttatgggtcattc 2220
|
Seq_2 2161 TTTAATGTTTTGTCTTTACAGTTATTTTAGTTTCACACATACCTTTTATGGGTCATTTC 2220

Seq_1 2221 tttttacttaagttttgtcctcaatcgtcttttatctatgcagAGGAAATGCGATTGGAAGC 2280
|
Seq_2 2221 TTTTACTTAAGTTTTGTCTCAATCGTCTTTTATCTATGCAGAGGAAATGCGATTGGAAGC 2280

Seq_1 2281 ACCCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTTTCGAAATGTTGAGgtaaatagatt 2340
|
Seq_2 2281 ACCCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTTTCGAAATGTTGAGGTAATAGATT 2340

Seq_1 2341 gatgttttcatccttaaactgtttgctttaggcttacgatacttgtttggaagctaataa 2400

```

Seq_2	2341	 GATGTTTTTCATCCTTAAACTGTTTGCCTTAGGCTTACGATACTTGTGGGAAGCTAATAA	2400
Seq_1	2401	atgtatttagaattgaattttcaccgacctgggagtttatttgtaatatcttacagGTGGA	2460
Seq_2	2401	ATGTATTAGAATTGAATTTTCACGACCTGGGAGTTTATTGTAAATATCTTACAGGTGGA	2460
Seq_1	2461	TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCTCTGTTATCTGGCAAAGTATTTCTTGA	2520
Seq_2	2461	TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCTCTGTTATCTGGCAAAGTATTTCTTGA	2520
Seq_1	2521	CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTGTTCCTGTTCTATATTCTCTGTGAATGTGA	2580
Seq_2	2521	CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTGTTCCTGTTCTATATTCTCTGTGAATGTGA	2580
Seq_1	2581	TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGgtatcagcacactttggctcttg	2640
Seq_2	2581	TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGGTATCAGCACACTTTGGCTCTTG	2640
Seq_1	2641	ggtctgttatatacatgttctgtttcaatttgattgtctgatgaaaaaatgcaatttct	2700
Seq_2	2641	GGTCTGTATATACATGTCTGTTTCAATTTGATTGTCTGATGAAAAAATGCAATTTCT	2700
Seq_1	2701	gttggtacagGAAAAACACTCAGAAGAAGCTTACAACCTGGCTTGCATCCTTACACTTCC	2760
Seq_2	2701	GTTGGTACAGGAAAAACACTCAGAAGAAGCTTACAACCTGGCTTGCATCCTTACACTTCC	2760
Seq_1	2761	TCCATATCAAAGGAAGGGCTATGGCAAATCTTAATAGCCTTCTgtgagttttgttttt	2820
Seq_2	2761	TCCATATCAAAGGAAGGGCTATGGCAAATCTTAATAGCCTTCTGTGAGTTTTGTTTTT	2820
Seq_1	2821	cattcaactcttcttattgttctcacctctctctataaagcttacacgttatattgtgt	2880
Seq_2	2821	CATTCAACTCTTCTTATTGTCTCACCTCTCTCTATAAAGCTTACACGTTATATTGTGT	2880
Seq_1	2881	tatagCCTATGAACTCTCAAAGAAAGAGGGCAAAGTCGGGACACCGAAAGGCCGCTCTC	2940
Seq_2	2881	TATAGCTATGAACTCTCAAAGAAAGAGGGCAAAGTCGGGACACCGAAAGGCCGCTCTC	2940
Seq_1	2941	TGATCTAGGGTTAGTGAGTTACAGAGGTTACTGGACTCGGATTTATTAGACATTTTGAA	3000
Seq_2	2941	TGATCTAGGGTTAGTGAGTTACAGAGGTTACTGGACTCGGATTTATTAGACATTTTGAA	3000
Seq_1	3001	AAAGCACAAGGGAAACATATCTATCAAGgtatgtatatctatatatccgtaatgatcctt	3060
Seq_2	3001	AAAGCACAAGGGAAACATATCTATCAAGGTATGTATATCTATATATCCGTAATGATCCTT	3060
Seq_1	3061	tttagcctatctgtcaacagaataattcatatattcaacttttttaaatgtagGAGCTGA	3120
Seq_2	3061	TTTAGCTATCTGTCAACAGAATAATTCATATATTCAACTTTTTTAAATGTAGGAGCTGA	3120
Seq_1	3121	GCGACATGACAGCGATTAAAGCAGAAGATATATTAAGCACCTGCAGAGCTTGGAAGTGA	3180
Seq_2	3121	GCGACATGACAGCGATTAAAGCAGAAGATATATTAAGCACCTGCAGAGCTTGGAAGTGA	3180

```

Seq_1  3181  TACAATACAGGAAAGGACAACACGTAATCTGCGCGGATCCTAAGGTACTGGACCGACACT 3240
          |||
Seq_2  3181  TACAATACAGGAAAGGACAACACGTAATCTGCGCGGATCCTAAGGTACTGGACCGACACT 3240

Seq_1  3241  TGAAAGCGGCAGGCCGAGGTGGTCTTGATGTGGATGTGAGCAAAATGATATGGACTCCTT 3300
          |||
Seq_2  3241  TGAAAGCGGCAGGCCGAGGTGGTCTTGATGTGGATGTGAGCAAAATGATATGGACTCCTT 3300

Seq_1  3301  ACAAAGAGCAGAGCTAA 3317
          |||
Seq_2  3301  ACAAAGAGCAGAGC--- 3314

```


Figura Suplementaria 2.

Alineamiento de las secuencias del gen *HAM1* (Sequence_1: AT5G64610) obtenida de la página <https://www.arabidopsis.org/> y del gen clonado en la construcción HAM1:GFP (Sequence_2: HAM1). En la secuencia 1 se muestra en **Azul** el promotor, en **Amarillo** los exones y en **Morado** los intrones. En la secuencia 2 se muestra en **Rojo** los oligos usados para la mutagénesis dirigida. El pequeño rectángulo **Azul** remarca la reversión exitosa de la mutación que da lugar al cambio del aminoácido 242.

Alignment of Sequence_1: [AT5G64610.xdna] with Sequence_2: [HAM1.txt.xdna]

Similarity : 3313/3317 (99.88 %)

```
Seq_1 1      tgatgcaaatggttggtcaaataatgaattaaattaaaatacgtttttccagcttcgtca 60
          |||
Seq_2 1      TGATGCAAATTGTTGGTCAAATAATGAATTAATTAAAATACGTTTTTCCAGCTTCGTCA 60

Seq_1 61      tttcattacatttgagtatctttactttatTTTTgaagaatttagaattgatgatatacg 120
          |||
Seq_2 61      TTTCATTACATTTGAGTATCTTTACTTTATTTTTGAAGAATTTAGAATTGATGATATACG 120

Seq_1 121     aacaagatatttgtcgatgaatcaatcattgtaggtaaaagaatcagccacttcaacacg 180
          |||
Seq_2 121     AACAAGATATTTGTCGATGAATCAATCATTGTAGGTAAAAGAATCAGCCACTTCAACACG 180

Seq_1 181     ttatttccaaaatttgataactaagtttggttgctcaacccaaaaaattctgtctgttt 240
          |||
Seq_2 181     TTATTTCCAAAATTTGATAACTAAGTTTGTGGTCAACCCAAAAAATCTGTCTGTTT 240

Seq_1 241     taaagatttcgctcactcttttctcatttttcttacaattatacaatttcacatcattat 300
          |||
Seq_2 241     TAAAGATTCGTCACTCTTTTCTCATTTTTCTTACAATTATACAATTTACATCATTAT 300

Seq_1 301     tatgaaaaggatacacgggtgtgtagtagctacaaaaattagaagatgaatatatgtca 360
          |||
Seq_2 301     TATGAAAAGGATACACGGTGTGTAGTAGCTACAAAAATTAGAAAGATGAATATATGTCA 360

Seq_1 361     ccaaattaaatcattttattttaattttcccttttagtcaagttgccatataagtatataa 420
          |||
Seq_2 361     CCAAATTAATCATTTTATTTAAATTTTCCCTTTAGTCAAGTTGCCATATAAGTATATAA 420

Seq_1 421     cgtgtttacatgtgaacaactgaaataggaatcaattctatTTTTcttcattcgaatttc 480
          |||
Seq_2 421     CGTGTTTACATGTGAACAACCTGAAATAGGAATCAATCTATTTTTCTTCATTCGAATTC 480

Seq_1 481     aaaagtaagtaagtcacacttcaattcataaccgaaaaataaaagtaaaattgatagta 540
          |||
Seq_2 481     AAAAGTAAGTAAGTCACACTTCAATTCATAACCGAAAAATAAAAGTAAATTGATAGTA 540

Seq_1 541     tgtaaaagtaaaacattctttaagaaaaatgagatgtaaaatttcacatacaagatacag 600
          |||
Seq_2 541     TGTAAGTAAACATCTTTAAGAAAAATGAGATGTAATTTACATACAAGATACAG 600

Seq_1 601     taaagtgaccatgtgaatctTTTTgttcataaaaaatcattttggttaatctagaggaa 660
          |||
Seq_2 601     TAAAGTGACCATGTGAATCTTTTTGTTTATAAAAAATCATTTTGGTTAATCTAGAGGAA 660

Seq_1 661     catggtgtgccaatctatgaccataacttcaaggacacgatgatgagttgtgttttcgt 720
          |||
Seq_2 661     CATGGTGTGCGAATCTATGACCATAACTTCAAGGACACGATGATGAGTCGTGTTTTTCGT 720

Seq_1 721     ctttgcttcttggaaactttgtgattttttgatctgtgaatcttgtgattagtagcaaatca 780
          |||
Seq_2 721     CTTTGCTTCTTGGAACTTTGTGATTTTTTGATCTGTGAATCTTGTGATTAGTACGAATCA 780
```

Seq_1	781	taaagccttgtttggtgtttcccattcacgacaaaatactgactctgtcacttattatt	840
Seq_2	781	TAAAGCCTTGTTTGGCTGTTTCCATTACAGACAAAATACTGACTCTGTCACTTATTATT	840
Seq_1	841	tatctctcattatctctttagtttttataaattgtttgctcctactaatcattctttaaa	900
Seq_2	841	TATCTCTCATTATCTCTTAGTTTTTATAAATTGTTTGCTCCTACTAATCATTCTTTAAA	900
Seq_1	901	tgtaacctggcgattataaaaactaaacataagccaacagttataaaaacgtgtattaacga	960
Seq_2	901	TGTAACCTGGCGATTATAAAACTAAACATAAGCCAACAGTTATAAAAACGTGTATTAACGA	960
Seq_1	961	cggtaagagatTTTTTGCACCCAAAAAAGGACGGTAAGAGAGACATATAGTACAGGC	1020
Seq_2	961	CGGTAAGAGATTTTTGCACCCAAAAAAGGACGGTAAGAGAGACATATAGTACAGGC	1020
Seq_1	1021	caattataaagataggcccaattgagcattcaaagttgttattgggccacactccttcca	1080
Seq_2	1021	CAATTATAAAGATAGGCCCAATTGAGCATTCAAAGTTGTTATTGGGCCACACTCCTTCCA	1080
Seq_1	1081	aatgatgttctttatccgtatgagaaaagaatccacccggaaaaaatctccgacccgact	1140
Seq_2	1081	AATGATGTCTTTATCCGTATGAGAAAAGAATCCACCCGAAAAAATCTCCGACCCGACT	1140
Seq_1	1141	aaagaaATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGCGTGC	1200
Seq_2	1141	AAAGAAATGGGATCGTCTGCGGATACAGAGACGGCGATGATAATCGCCACACCGGCGTGC	1200
Seq_1	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_2	1201	AACCATAATAATCCGGCAACCAACGGCGGAGATGCGAATCAGAATCATACTTCTGGTGCG	1260
Seq_1	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_2	1261	ATACTCGCTCTCACGAATTCAGAATCGGATGCTTCGAAGAAGAGAAGAATGGGGGTGCTT	1320
Seq_1	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_2	1321	CCGCTCGAGGTTGGTACTCGCGTGATGTGTCAATGGAGAGACGGAAAATACCATCCGGTG	1380
Seq_1	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_2	1381	AAGGTTATCGAGCGCCGAAAGAATTATAATGGTGGTCACAATGATTACGAGTACTACGTT	1440
Seq_1	1441	CATTACACAGAGTgtatgtcggttccctcttctctatctgaaatttgtaatctaggg	1500
Seq_2	1441	CATTACACAGAGTGTATGTCGTTTCCCTCTTCTCTATCTGAAATTTGTGAATCTAGGGT	1500
Seq_1	1501	ttatagattggagctgaaatttcaagaattgaattagagggcttgcattcaagttgt	1560
Seq_2	1501	TTATAGATTGGAGCTGAAATTTCAAGAATTGAATTAGAGGGCTTTCGAATCAAGTTGT	1560

```

Seq_1 1561 tttgagtatcacaactcttgtgaaactgcagTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAG 1620
|
Seq_2 1561 TTTGAGTATCACAACCTCTGTGAACTGCAGTTAATAGAAGATTGGATGAATGGATTAAG 1620

Seq_1 1621 CTTGAACAGCTTGACCTTGATTGATTGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG 1680
|
Seq_2 1621 CTTGAACAGCTTGACCTTGATTGATTGAGTGTGCTTTAGATGAAAAAGTTGAAGACAAG 1680

Seq_1 1681 gtattagccatTTTTCTTCAAAGTCTTGAGCTTTCCTCTCCGTAGTTTGCCTGAAACAT 1740
|
Seq_2 1681 GTATTAGCCATTTTTCTTCAAAGTCTTGAGCTTTCCTCTCCGTAGTTTGCCTGAAACAT 1740

Seq_1 1741 agaagtttgtttggtgtaaatagGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA 1800
|
Seq_2 1741 AGAAGTTTGTGTTGTGGTAATAGGTGACTAGCTTGAAGATGACACGACACCAGAAACGGAA 1800

Seq_1 1801 GATTGATGAGACTCATGTAGAGGtaaagtgattggtaagttagttaaactttgttggtg 1860
|
Seq_2 1801 GATTGATGAGACTCATGTAGAGGTAAGTATTGGTTAAGTTAGTTAACTTTGTTGTGG 1860

Seq_1 1861 ttttagtgaactgtgtggcatgctatatattctgatgtttttcgatattttgtatagGGT 1920
|
Seq_2 1861 TTTTAGTGAACGTGTGGCATGCTATATATTCTGATGTTTTTCGATATTTGTATAGGGT 1920

Seq_1 1921 CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCGTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC 1980
|
Seq_2 1921 CATGAAGAGCTGGATGCTGCCAGTTTGCGTGAACACGAGGAGTTCACGAAAGTGAAGAAC 1980

Seq_1 1981 ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT 2040
|
Seq_2 1981 ATAGCTACGATTGAGCTTGGGAAGTATGAGATTGAGACGTGGTACTTCTCTCCTTTTCCT 2040

Seq_1 2041 CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTATGAAG 2100
|
Seq_2 2041 CCAGAATACAATGACTGCGTGAAGCTCTTTTTCTGTGAGTTTTGCCTCAGTTTATGAAG 2100

Seq_1 2101 CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGgtgagcaactgtttttttatcattttagcat 2160
|
Seq_2 2101 CGCAAAGAGCAGCTTCAAAGACATATGGTGAGCAACTGTTTTTTTATCATTTGTAGCAT 2160

Seq_1 2161 ttttaattgttttgcctttacagttatTTTTAGTTTACACATACCTTTTATGGGTCATTC 2220
|
Seq_2 2161 TTTAATTGTTTTGCTTTACAGTTATTTTAGTTTACACATACCTTTTATGGGTCATTC 2220

Seq_1 2221 ttttacttaagttttgctcaatcgtcttttatctatgcagAGGAAATGCGATTTGAAGC 2280
|
Seq_2 2221 TTTTACTTAAGTTTTGCTCAATCGTCTTTTATCTATGCAGAGGAAATGCGATTTGAAGC 2280

Seq_1 2281 ACCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTTTC AATGTTTGAGgtaatagatt 2340
|
Seq_2 2281 ACCCCCTGGGGATGAAATCTATCGAAGCTCTACTTTTTC AATGTTTGAGGTAATAGATT 2340

Seq_1 2341 gatgttttcatccttaaactgtttgcttaggcttacgatacttgtttggaagctaataa 2400
|

```

Seq_2 2341 GATGTTTTCATCCTTAAACTGTTTGCTTTAGGCTTACGATACTTGTGGGAAGCTAATAA 2400

Seq_1 2401 atgtatttagaattgaattttcagcactgggagtttatttgtaatatcttacagGTGGA 2460
 |||

Seq_2 2401 ATGTATTTAGAATTGAATTTTCACGACCTGGGAGTTTATTTGTAATATCTTACAGGTGGA 2460

Seq_1 2461 TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCTCTGTTATCTGGCAAAGTTATTTCTTGA 2520
 |||

Seq_2 2461 TGGCAAGAAGAATAAGGTCTATGCACAGAACCTCTGTTATCTGGCAAAGTTATTTCTTGA 2520

Seq_1 2521 CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTGTTCCCTGTTCTATATTCTCTGTGAATGTGA 2580
 |||

Seq_2 2521 CCACAAAACCTCTTTACTATGACGTTGATTGTTCCCTGTTCTATATTCTCTGTGAATGTGA 2580

Seq_1 2581 TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGgtatcagcacactttggctcttg 2640
 |||

Seq_2 2581 TGATCGTGGATGCCACATGGTTGGATACTTTTCAAAGGTATCAGCACACTTTGGCTCTTG 2640

Seq_1 2641 ggtctgttatatacatgttctgtttcaatttgattgtctgatgaaaaaaaaatgcaatttct 2700
 |||

Seq_2 2641 GGTCTGTTATATACATGTTCTGTTTCAATTTGATTGTCTGATGAAAAAAAAATGCAATTTCT 2700

Seq_1 2701 gttggtacagGAAAAACACTCAGAAGAAGCTTACAACCTGGCTTGCATCCTTACACTTCC 2760
 |||

Seq_2 2701 GTTGGTACAGGAAAAACACTCAGAAGAAGCTTACAACCTGGCTTGCATCCTTACACTTCC 2760

Seq_1 2761 TCCATATCAAAGGAAGGGCTATGGCAAATCTTAATAGCCTTCTgtgagtttttgttttt 2820
 |||

Seq_2 2761 TCCATATCAAAGGAAGGGCTATGGCAAATCTTAATAGCCTTCTGTGAGTTTTGTTTTT 2820

Seq_1 2821 cattcaactcttcttatttggttctcacctctctctataaaagcttacacgttatattgtgt 2880
 |||

Seq_2 2821 CATTCAACTCTTCTTATTTGTTTCTCACCTCTCTCTATAAAAGCTTACACGTTATATTGTGT 2880

Seq_1 2881 tatagCCTATGAACTCTCAAAGAAAGAGGGCAAAGTCGGGACACCGAAAGGCCGCTCTC 2940
 |||

Seq_2 2881 TATAGCCTATGAACTCTCAAAGAAAGAGGGCAAAGTCGGGACACCGAAAGGCCGCTCTC 2940

Seq_1 2941 TGATCTAGGGTTAGTGAGTTACAGAGGTTACTGGACTCGGATTTTATTAGACATTTTGAA 3000
 |||

Seq_2 2941 TGATCTAGGGTTAGTGAGTTACAGAGGTTACTGGACTCGGATTTTATTAGACATTTTGAA 3000

Seq_1 3001 AAAGCACAAGGGAAACATATCTATCAAGgtatgtatatctatatatccgtaatgatcctt 3060
 |||

Seq_2 3001 AAAGCACAAGGGAAACATATCTATCAAGGTATGTATATCTATATATCCGTAATGATCCTT 3060

Seq_1 3061 tttagcctatctgtcaacagaataattcatatattcaacttttttaaatgtagGAGCTGA 3120
 |||

Seq_2 3061 TTTAGCCTATCTGTCAACAGAATAATTCATATATTCAACTTTTTTAAATGTAGGAGCTGA 3120

Seq_1 3121 GCGACATGACAGCGATTAAAGCAGAAGATATATTAAGCACCTGCAGAGCTTGGAACTGA 3180
 |||

Seq_2 3121 GCGACATGACAGCGATTAAAGCAGAAGATATATTAAGCACCTGCAGAGCTTGGAACTGA 3180

```

Seq_1 3181 TACAATACAGGAAAGGACAACACGTAATCTGCGCGGATCCTAAGGTACTGGACCGACACT 3240
          |||
Seq_2 3181 TACAATACAGGAAAGGACAACACGTAATCTGCGCGGATCCTAAGGTACTGGACCGACACT 3240

Seq_1 3241 TGAAAGCGGCAGGCCGAGGTGGTCTTGATGTGGATGTGAGCAAATGATATGGACTCCTT 3300
          |||
Seq_2 3241 TGAAAGCGGCAGGCCGAGGTGGTCTTGATGTGGATGTGAGCAAATGATATGGACTCCTT 3300

Seq_1 3301 ACAAAGAGCAGAGCTAA 3317
          |||
Seq_2 3301 ACAAAGAGCAGAGC--- 3314

```

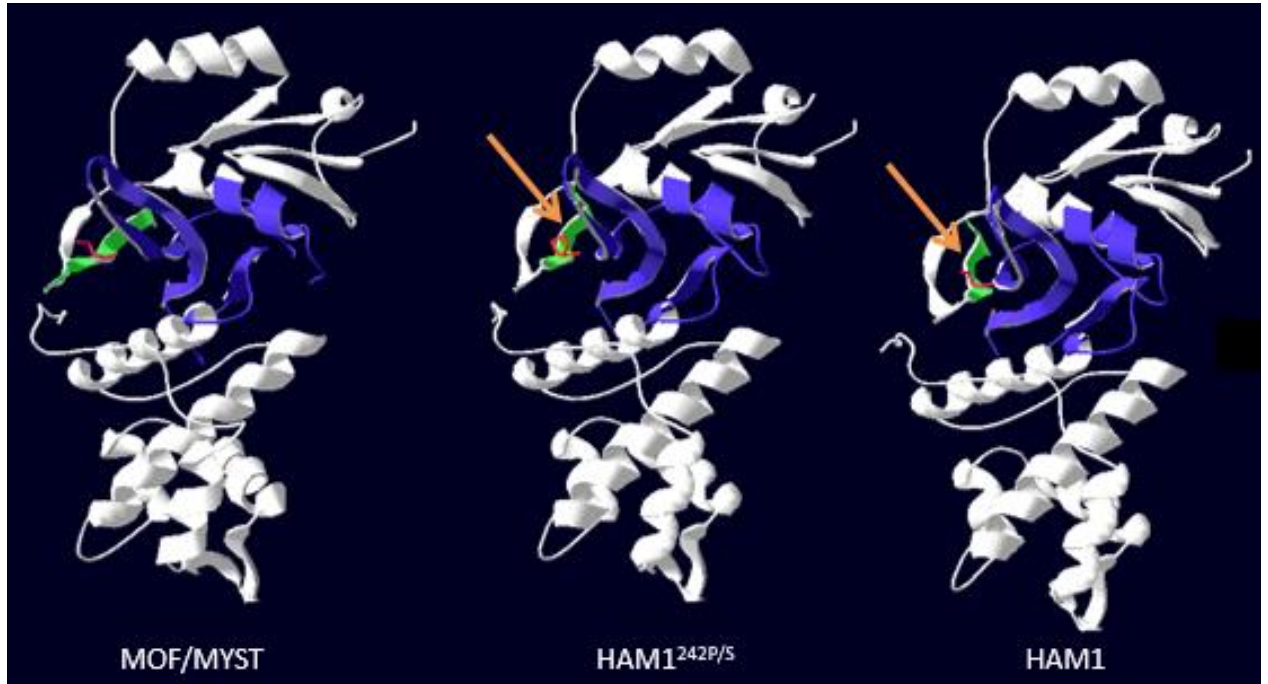


Figura Suplementaria 3.

Modelado del dominio MYST de las construcciones HAM1:GFP y HAM1:GFP^{242P/S}. Se utilizó como molde el cristal del dominio MYST de MOZ. Las flechas naranjas indican el aminoácido que varía entre las construcciones. En azul se muestra el sitio catalítico de la enzima. No se alcanzan a apreciar diferencias en el plegamiento entre estas proteínas.