



Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área: Biología
Sub-área: Biología Celular y Molecular

Tesis de Maestría

“Caracterización de histonas tipo H1 y estudio de su rol en la respuesta al estrés abiótico en *Physcomitrella patens*”

Gustavo Brañas Pereyra

Orientadora: Dra. Ana Ramón

Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Tribunal de tesis:

Presidente: Dra. Inés Ponce de León

Vocales: Dr. Francesco Rossi y Dra. Sabina Vidal

Junio, 2014

Índice

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Histonas	3
1.1.1 Estructura de la histona H1	4
1.1.2 Origen y evolución de las histonas H1	5
1.1.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas tipo H1	6
1.1.4 Variantes de las histonas tipo H1	7
1.1.5 Movilidad de histonas tipo H1	8
1.1.6 Función de las histonas tipo H1	9
1.1.7 Histonas tipo H1 en plantas	14
1.2 Physcomitrella patens como modelo de estudio	17
1.2.1 Estudios de genética reversa en <i>Physcomitrella patens</i>	18
1.2.2 Estrés abiótico en <i>Physcomitrella patens</i>	20
1.3 Antecedentes en el estudio de histonas tipo H1 en <i>Physcomitrella patens</i>	22
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento	24
3.2 Análisis bioinformático	24
3.2.1 Búsqueda bioinformática de posibles genes codificantes para histonas del tipo H1	24
3.2.2 Secuenciación, diseño de cebadores y programas informáticos	25
3.3 Preparación y análisis de ADN	25
3.3.1 Extracción de ADN a gran escala a partir de tejido vegetal	25
3.3.2 Cuantificación de ADN	26
3.4 Preparación y análisis de ARN	26
3.4.1 Extracción y cuantificación de ARN	26
3.4.2 Retrotranscripción y control de contaminación con ADN genómico	27

3.5 Medios, Preparación y transformación de cepas bacterianas	28
3.5.1 Medio para cultivo de bacterias	28
3.5.2 Preparación de células DH5 α quimiocompetentes y electrocompetentes	28
3.5.3 Protocolo de transformación de células electrocompetentes y quimiocompetentes	28
3.5.4 Protocolo de obtención de ADN plasmídico mediante miniprep	29
3.6 Generación de una línea <i>knockout</i> para el gen <i>PpH1</i>	29
3.6.1 Construcción plasmídica.....	29
3.6.2 Transformación de <i>Physcomitrella patens</i> a partir de protoplastos	30
3.6.3 Rastreo de mutantes <i>knockout</i> para el gen <i>PpH1</i> por PCR	31
3.6.4 Análisis mediante Southern blot de la línea mutante	32
3.6.5 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo	33
3.7 Análisis de la línea <i>knockout</i> en condiciones de crecimiento estándar.....	34
3.7.1 Estudio de la repetición nucleosomal.....	34
3.7.2 Western blot de proteínas totales	34
3.7.3 Estudios fenotípicos y de velocidad de crecimiento	35
3.8 Análisis de la línea <i>knockout</i> bajo condiciones de estrés abiótico	35
3.8.1 Tratamientos de la línea silvestre y mutante en condiciones de estrés.....	35
3.8.2 Análisis fenotípicos cuantitativos.....	36
3.8.2.1 Determinación de muerte celular empleando el colorante vital Evans Blue	36
3.8.2.2 Determinación del contenido de clorofila	36
3.9 Análisis de otras posibles histonas tipo H1 de <i>P. patens</i>	37
3.9.1 Estudio del nivel de expresión de posibles histonas mediante PCR en tiempo final.....	37
3.9.2 Localización subcelular de otras posibles histonas de <i>P. patens</i> : <i>Pp1s33</i> y <i>Pp1s72</i>	38
3.9.2.1 Construcciones plasmídicas para la expresión de los genes a analizar fusionados a la proteína verde fluorescente	38

3.9.2.2 Infiltración de hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> SRI) crecidas en tierra: transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.10 Estudios de expresión mediante Real Time	40
3.11 Cebadores utilizados	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Verificación del vector de remplazo para la generación de un mutante <i>knockout</i> para el gen <i>PpH1</i>	45
4.2 Transformación de protoplastos de <i>P. patens</i> con el vector pUBW302-KOPpH1	48
4.3 Análisis de los transformantes	49
4.3.1 Verificación de la integración del cassette de selección al locus del gen de <i>PpH1</i> .	49
4.3.2 Análisis por Southern blot de los mutantes <i>knockout</i> 18, 23 y 49	50
4.3.3 Análisis por citometría de flujo de los mutantes 23 y 49.....	52
4.3.4 Análisis de la expresión del gen <i>PpH1</i> en la línea wt y mutante 23.....	53
4.4 Estudio de la repetición nucleosomal del ADN genómico en el mutante 23	54
4.5 Análisis fenotípico del mutante 23, <i>knockout</i> para la histona PpH1	55
4.5.1 Estudio de velocidad de crecimiento	55
4.5.2 Efecto del estrés abiótico	56
4.5.2.1 Efecto del estrés salino-tóxico.....	57
4.5.2.2 Efecto del estrés osmótico generado por manitol	59
4.5.2.3 Efecto del estrés térmico.....	60
4.6 Búsqueda y caracterización de otras posibles histonas H1	62
4.6.1 Búsqueda bioinformática de posibles genes codificantes para histonas del tipo H1	62
4.6.2 Estudio de la expresión de las posibles histonas en estadio gametóforo bajo condiciones estándar de cultivo	63
4.6.3 Obtención del vector de expresión para el estudio de la localización subcelular de las posibles histonas <i>Pp1s33</i> y <i>Pp1s72</i>	64
4.6.4 Localización subcelular de <i>Pp1s33</i> y <i>Pp1s72</i>	67
4.7 Ensayos de Western blot en las líneas silvestre y mutante 23	68

4.8 Evaluación del nivel de expresión de histonas tipo H1 y genes relacionados al estrés abiótico mediante PCR en tiempo real	69
4.8.1 Nivel de expresión de los genes <i>PpH1</i> , <i>Pp1s33</i> , <i>Pp1s72</i> , <i>PpLys</i> y <i>PpABR170</i> en condiciones estándar de crecimiento	72
4.8.2 Nivel de expresión de los genes <i>PpH1</i> , <i>Pp1s33</i> , <i>Pp1s72</i> , <i>PpABR170</i> y <i>PpLys</i> durante los distintos tipos de estrés abiótico en la línea silvestre	73
4.8.3 Análisis de los perfiles de expresión génica en las líneas wt y mutante durante la exposición a estrés abiótico	75
4.8.4 Determinación semicuantitativa de la expresión de <i>PpHSP16.4</i> mediante PCR en tiempo final.....	78
5. DISCUSIÓN	80
5.1 Obtención del mutante knockout estable para el gen <i>PpH1</i>	80
5.2 Estudio de la repetición nucleosomal	80
5.3 Evaluación fenotípica de la línea knockout	81
5.3.1 Análisis de velocidad de crecimiento y morfología macroscópica	81
5.3.2 Análisis macroscópico, de contenido de clorofila y muerte celular de la línea mutante frente a estrés abiótico	81
5.4 Análisis de un posible efecto compensatorio mediante Western blot	83
5.5 Análisis y caracterización de los genes <i>Pp1s33</i> y <i>Pp1s72</i>	84
5.6 Evaluación del nivel de expresión de las histonas <i>Pp1s33</i> y <i>Pp1s72</i>	84
5.7 Evaluación del nivel de expresión de los genes de respuesta a estrés abiótico <i>PpABR170</i>, <i>PpLys</i> y <i>PpHSP16.4</i>	86
6. CONCLUSIONES y PERSPECIVAS	88
7. BIBLIOGRAFÍA	91
8. ANEXO	101

A Ana Ramón. Literalmente un genio como persona, tutora y científica. No tengo palabras para que sepas lo profundamente agradecido que estoy con vos por cincharme para delante, por motivarme y entenderme. Sabes bien que sin el apoyo que me diste todos estos meses este trabajo nunca lo hubiese podido terminar. Muchísimas gracias por aceptarme como pasante, por compartir tus conocimientos conmigo y por la paciencia que me tuviste durante estos dos años y algo que me llevó este trabajo.

A Marcel Bentancor, un “tipazo” con el que compartí muchas horas de laboratorio durante transformaciones y experimentos. Gracias por el tiempo dedicado a entender que estaba pasando con el glorioso mutante. Sin duda fue otra personita que sin ella este trabajo no hubiese llegado a su fin. Muchas gracias por las charlas y esos momentos de risa.

A Ceci Abreu por el tiempo dedicado a este trabajo y a todo el grupo de Biología Molecular Vegetal de Facultad de Ciencias, en especial a Ceci Ruibal, Alex y Bruno. Muchas gracias por esos ratos compartidos y por su disposición y apoyo en la realización de esta tesis.

A toda la gurisada del laboratorio 313 Serrana, Manu, Sole, Alicia, Fernanda, Marcelo y Germán por las horas de charla, divague, almuerzos y ciencia. Al resto de la gente de la Sección Bioquímica y Biología Molecular y en especial a Estela Castillo, Ceci Silvarrey, Cris, Juan y Naty.

A Gianna Cechetto y Mariana Barraco, por su paciencia y ayuda en todo lo relativo a PCR en tiempo real.

A toda la gente de la Unidad de Bioquímica Analítica del CIN. Gracias por el aguante.

A mis amigos por estar ahí siempre. A Agus por el apoyo y la paciencia.

Al servicio de Citometría de Flujo del Instituto de Ciencias Biológicas Clemente Estable.

A los organismos que financiaron este trabajo: PEDECIBA y ANIL.

Las histonas juegan un rol fundamental en el metabolismo del ADN permitiendo el mantenimiento y la integridad de la información genética, la recombinación y replicación del ADN. Poca importancia se le ha dado a la función que posee en particular de la histona tipo H1, como lo demuestran los escasos trabajos publicados en este tema. Esto puede asociarse a que en un principio la comunidad científica le había otorgado un rol en la condensación de la cromatina, asociado con un bloqueo de la transcripción génica pero estudios recientes atribuyen a esta proteína roles específicos vinculados con mecanismos epigenéticos de regulación, silenciamiento de transposones y activación específica de genes.

Durante el presente trabajo se generó una línea *knockout* en el organismo *Physcomitrella patens* para la histona tipo H1, codificada por el gen *Pp1s53_134* y denominada PpH1. La generación de esta línea demostró la no esencialidad de esta histona.

El mutante fue caracterizado a nivel fenotípico en medio estándar de cultivo y frente a diferentes tipos de estrés abiótico. Los resultados demostraron que no existen diferencias en la velocidad de crecimiento de la línea mutante frente a la silvestre en condiciones estándar de cultivo y que además en condiciones de estrés salino-tóxico, osmótico o térmico, a nivel macroscópico la línea mutante presenta las mismas características que la línea silvestre luego de exponerlas a estrés y durante su recuperación. Estudios cuantitativos demostraron que la línea mutante presenta los mismos niveles de clorofila y muerte celular en recuperación en comparación con la línea silvestre. Esto permite hipotetizar que la histona tipo H1 o bien no juega un rol en el desarrollo ni en la recuperación de las colonias frente a el estrés abiótico o que la función de PpH1 vinculada con el desarrollo, crecimiento, resistencia y recuperación a estrés abiótico es llevada a cabo por otra variante de histona de tipo H1.

Estudios de Western blot en el mutante *knockout* para *PpH1* que se llevaron a cabo con un anticuerpo primario anti-H1 humano policlonal no permitieron identificar si existían variaciones en las intensidades de bandas correspondientes a histonas tipo H1.

Para analizar un posible efecto compensatorio, se caracterizaron dos proteínas, Pp1s33 (*Pp1s33_295V6*) y Pp1s72 (*Pp1s72_277V6*), las cuales presentan todas las características bioquímicas y de localización nuclear que permite definir las como histonas tipo H1. Las mismas fueron empleadas en estudios de PCR en tiempo real y demostraron que en condiciones estándar y frente a estrés salino-tóxico, osmótico y térmico presentan variaciones en el nivel de su expresión relativa. Esto permite hipotetizar sobre un posible efecto compensatorio, evidenciado por un aumento en el nivel de expresión de dichos genes en la línea *knockout* para *PpH1*.

Por otra parte, estudios por PCR en tiempo real en la línea *knockout* demostraron que los niveles de expresión de los genes de respuesta a estrés abiótico *PpARB170* y *PpLys* están alterados en comparación con la línea silvestre lo que permite sugerir una posible función de PpH1 en relación con la regulación de la expresión génica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Histonas

El ADN se encuentra empaquetado en la célula bajo la forma de cromatina. Estructuralmente, 146 pares de bases del ADN se enrollan en una unidad fundamental llamada nucleosoma (ver Figura 1.1), formada por un octámero de 4 proteínas básicas llamadas histonas del core (Godde *et al*, 2009). Estos nucleosomas se separan entre sí por un segmento de aproximadamente 20 pares de bases denominado ADN espaciador o *linker* (Bogdanova *et al*, 2005). Una quinta histona, denominada histona *linker* o tipo H1, interacciona con este ADN espaciador para formar el cromatosoma, la unidad estructural en la fibra de 10 nm de cromatina. La mayoría de las células poseen una relación H1-nucleosoma cercana a uno lo que indica que existiría una molécula de H1 por nucleosoma pero en algunos tipos celulares como las neuronas, esta relación varía alcanzando valores significativamente menores (Woodcock *et al*, 2006). Un nivel mayor de compactación involucra la interacción entre cromatosomas a través de las histonas tipo H1 y las colas de las histonas del core para alcanzar una compactación mayor, como la fibra de 30 nm y los bucles radiales que culminan en una estructura con el máximo grado de compactación conocida como cromosoma mitótico (Harshman *et al*, 2013).

Se han propuesto dos formas de organización de la fibra de 30 nm: el modelo solenoide planteado por Thoma y colaboradores (Thoma *et al*, 1979), en el cual los nucleosomas se ubican uno atrás de otro, enrollándose como un solenoide y ubicando el ADN *linker* hacia el centro de esta estructura. Por otro lado, el modelo de zig-zag planteado por Bednar (Bednar *et al*, 1998) establece que los nucleosomas se ubican en forma de zig-zag conectados por el ADN *linker*. Estas diferencias propuestas entre las estructuras planteadas para explicar la organización de la fibra de 30 nm fueron resueltas por Dorigo y colaboradores en el año 2004 (Dorigo *et al*, 2004), cuando propusieron que se debería considerar que las mismas fueron obtenidas *in vitro* y por lo tanto, *in vivo*, podrían observarse ambas en un estado de transición dinámico donde la histona tipo H1 juega un rol fundamental en estas transiciones, como se mencionará más adelante.

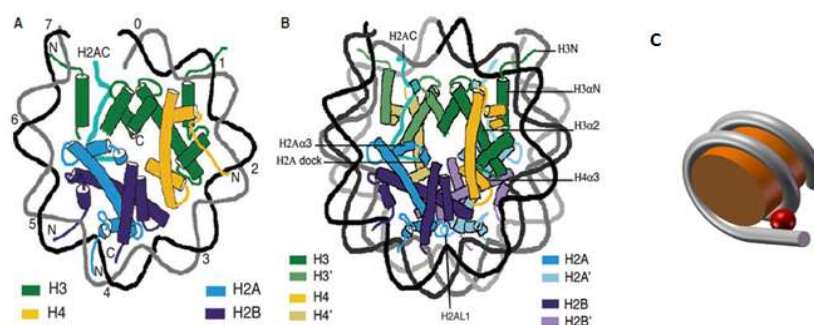


Figura 1.1 Estructura del nucleosoma. La estructura cristalográfica del nucleosoma fue determinada por Luger (Luger *et al*, 1997) mediante estudios de difracción de rayos X (A) Mitad de un nucleosoma. Se muestran las histonas del core H2A, H2B, H3 y H4 y su interacción intranucleosomal con 0.7 vueltas de hélice del ADN involucrando 73 pares de bases. Se incluye el esquema de la estructura de pliegue histónico. (B) Estructura del nucleosoma de levadura. Aquí se muestra las 1.7 vueltas de hélice del ADN junto con el octámero de histonas indicando en él las estructuras proteicas hélice-vuelta-hélice y la formación de heterodímeros (H3-H4). (C) Modelo esquemático donde se muestra la posición del dominio globular de la histona H1 (círculo rojo) en relación con el nucleosoma (cilindro naranja), en gris ADN. En este modelo, el dominio globular interactúa a nivel de dos sitios, uno en las cercanías del nucleosoma y otro, a nivel del ADN *linker* adjacente al core del nucleosoma. Adaptado de Pusarla *et al*, 2005; Happel *et al*, 2009.

Debido a que el objetivo general de esta tesis consiste en estudiar histonas tipo H1 en el musgo *Physcomitrella patens*, en las próximas secciones se presentará una actualización bibliográfica respecto a lo que se conoce hoy en día sobre la histona tipo H1 en general para luego concluir con una sección que profundiza sobre estudios realizados sobre esta histona en plantas.

1.1.1 Estructura de la histona H1

Las histonas tipo H1 de organismos eucariotas poseen una organización estructural tripartita en donde un dominio globular central, altamente conservado entre especies, se encuentra flanqueado por dos dominios básicos menos estructurados denominados colas amino terminal (Nt) y carboxilo terminal (Ct) (Happel *et al*, 2009). En eucariotas inferiores esta estructura clásica puede presentar variantes. En *Tetrahymena thermophila* el dominio globular se encuentra ausente, mientras que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra duplicado (Wu *et al*, 1986; Patterson *et al*, 1998).

La estructura cristalográfica del dominio globular fue resuelta por Ramakrishnan en 1993 (Ramakrishnan *et al*, 1993) (ver Figura 1.2). Dicho dominio se caracteriza por poseer un motivo de hélice alada, la cual es una estructura α/β compacta formada por dos alas (W1 y W2), tres α -hélices (H1, H2 y H3) y tres hojas β (S1, S2 y S3). La mitad del dominio Nt del dominio globular posee una estructura helicoidal mientras que el Ct del dominio globular está compuesto por dos hojas β antiparalelas y dos alas, W1 y W2, que le confieren el nombre de hélice alada (Gajiwala *et al*, 2000).

Este dominio globular interactuaría con dos regiones de ADN espaciador diferentes (Kowalski *et al*, 2012), ambos enriquecidos en aminoácidos cargados positivamente. Uno de los sitios de unión interaccionaría con el surco mayor del ADN en las cercanías del nucleosoma mientras que el segundo sitio lo haría a nivel del surco menor en regiones de secuencia poco conservada.

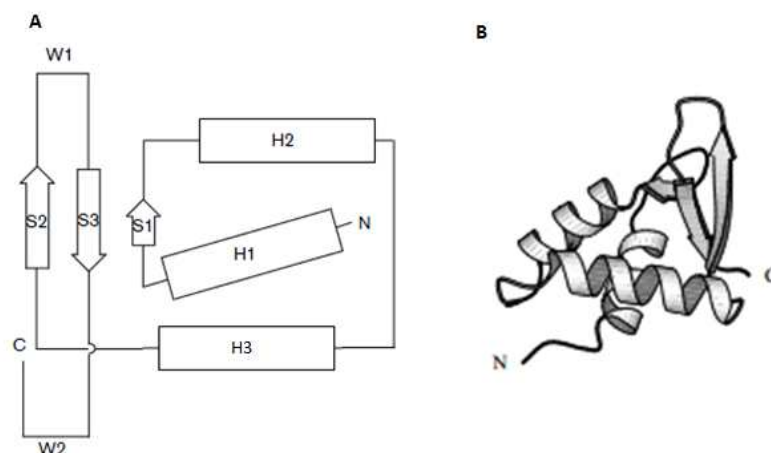


Figura 1.2. Motivo de hélice alada del dominio globular de la histona tipo H1. (A) Estructura esquemática del motivo (ver texto para mayor información) (B) Estructura cristalográfica tridimensional del dominio globular de la histona tipo H1 denominada H5 (ver más adelante). Adaptado de Ramakrishnan V., 1997; Gajiwala *et al*, 2000.

La composición aminoacídica de la cola Ct se caracteriza por poseer una proporción de 40% de lisina, entre 20 a 35% de alanina y un 15% de prolina (Harshman *et al*, 2013). La alternancia de estos residuos altamente helicogénicos junto con su distribución de carga resultan en la formación de dominios anfipáticos con conformación de α -hélice, vinculados a un rol en la interacción H1-H1. Esta idea deriva de experimentos donde el plegamiento de la estructura de 30 nm *in vitro*, sólo se ha alcanzado trabajando con histonas H1 que poseen el dominio globular y la cola Ct (Happel *et al*, 2009). A su vez se ha planteado la hipótesis del “desorden intrínseco” de la cola Ct, en el cual se establece que el plegado y la estabilización de la fibra de cromatina depende de los “clusters” específicos de aminoácidos ubicados de un modo intrínsecamente desordenado a nivel de la cola Ct, que adquieren conformaciones estructurales distintas como α -hélices, hojas β y “loops” (Caterino *et al*, 2011) determinando, de esta forma, la función de las variantes de histona H1. Se ha establecido que las compensaciones electrostáticas de carga entre las lisinas, cargadas positivamente, y el ADN *linker* cargado negativamente, facilita el plegamiento de este dominio y de forma conjunta el compactado del ADN (Roque *et al*, 2009).

En las especies de tripanosomas *T. cruzi* y *T. brucei*, se ha observado que las histonas H1 carecen del dominio de hélice alada, aunque éstas sí poseen dominios con una estructura muy similar a las Ct de las histonas de mamíferos y plantas (Kasinsky *et al*, 2001). Esto es suficiente para ordenar los nucleosomas entre sí y a su vez compactar el ADN en la fibra de 10 nm, destacando que éste sería el nivel mayor de compactación del ADN en estas especies.

La cola Nt de la histona H1 es considerada normalmente como desestructurada (Harshman *et al*, 2013). A partir de su secuencia aminoacídica puede ser dividida en dos sub-regiones: la región ubicada más hacia el extremo N-terminal, no caracterizada aún, donde se concentra una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos, mientras que la región más cercana al dominio globular posee una mayor cantidad de residuos básicos, adoptando una estructura de α -hélice. La cola Nt parecería no jugar un rol en el compactado de la cromatina pero sí modularía la interacción cabeza-cola entre H1-H1 y H1-ADN (Kowalski *et al*, 2012).

1.1.2 Origen y evolución de las histonas H1

El ADN de organismos procariotas se encuentra empaquetado en una especie de cromatina primitiva a través de proteínas básicas de interacción con el ADN similares a histonas (Kasinsky *et al*, 2001; Ammar *et al*, 2012).

Un análisis comparativo de las secuencias de las histonas tipo H1 y secuencias de proteínas relacionadas a histonas tipo H1 sugiere que el origen de estas proteínas puede encontrarse en las bacterias (Kasinsky *et al*, 2001). En este trabajo se plantea además que el motivo de hélice alada, perteneciente al dominio globular de H1 de metazoarios, apareció mucho más tarde en los protistas, posteriormente a la aparición de las histonas del core en arqueobacterias.

Se ha demostrado que las colas Nt y Ct son extremadamente heterogéneas, variando su largo y composición aminoacídica, mientras que el motivo de hélice alada del dominio globular es conservado. Se piensa que este dominio ha evolucionado por sustitución nucleotídica mientras que las colas Nt o Ct lo han hecho mediante inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas (Ponte *et al*, 2003) reflejada en los rearrreglos de los aminoácidos lisina (K), serina (S), alanina (A) y prolina (P) bajo la forma KPK, AKP, SPKK, PKKA y AAKK.

1.1.3 Modificaciones post-traduccionales de histonas tipo H1

Las histonas sufren modificaciones covalentes principalmente a nivel de las colas Nt y Ct lo que regula su fuerza de unión al ADN y el reclutamiento de diversas proteínas regulatorias, ambos procesos involucrados en la transcripción, replicación y condensación cromosómica durante la mitosis (Godde *et al*, 2008; Godde *et al*, 2009). Estas modificaciones post-traduccionales se encuentran asociadas a regulaciones epigenéticas, denominándose al vínculo existente entre la modificación covalente observada y el efecto celular generado “Código de histonas” (Ausio, J., 2006).

Existe una diversa cantidad de literatura que vincula las modificaciones covalentes que sufren las histonas del core con la actividad de un gen específico (Strahl *et al*, 2000). Para el caso de la histona tipo H1 la situación es diferente ya que el número de estudios reportados es menor, lo que se vincula con el hecho de que las modificaciones observadas y su función específica sea aún poco claro (Godde *et al*, 2008). La mayoría de los estudios se centran principalmente en las modificaciones observadas en las regiones Nt y Ct mientras que muy pocos reportan modificaciones a nivel del dominio globular y su vínculo con la regulación génica (ver Figura 1.3).

La fosforilación es la modificación más estudiada y se ha observado que dicha modificación es más abundante en las colas Nt y Ct en histonas tipo H1 (Happel *et al*, 2009). Esta modificación está asociada a funciones opuestas dependiendo del sitio de fosforilación en el que se da dicha modificación. Estarían involucradas en la condensación o descondensación de la cromatina durante el ciclo celular y se ha demostrado que esta modificación es fundamental para la entrada en la mitosis celular (Harshman *et al*, 2013). Por una parte, se ha planteado que la fosforilación de H1 puede estar vinculada con la descondensación de la cromatina ya que esta modificación post-traduccionaumentaría la carga negativa de la misma disminuyendo la fuerza de interacción entre el ADN y la histona tipo H1. Sin embargo, esta misma modificación en los dominios Nt y Ct puede estar asociada a un efecto opuesto, un aumento de la condensación de la cromatina debido posibles cambios estructurales en la histona tipo H1 que acompañan un aumento en la afinidad por el ADN (Over *et al*, 2013).

En cuanto a otras modificaciones, la metilación de lisinas ha sido asociada con la represión de la transcripción y además se ha postulado que la N-formilación (Happel *et al*, 2009), modificación post-traducciona vista principalmente en residuos de lisina pertenecientes a la histona tipo H1, deriva de daño oxidativo en el ADN *linker* postulando que dicha modificación podría interferir con la señalización por acetilación y metilación de lisinas. Otras modificaciones como acetilación y ubiquitinación han sido menos estudiadas y, por lo tanto, su rol aún es poco claro.

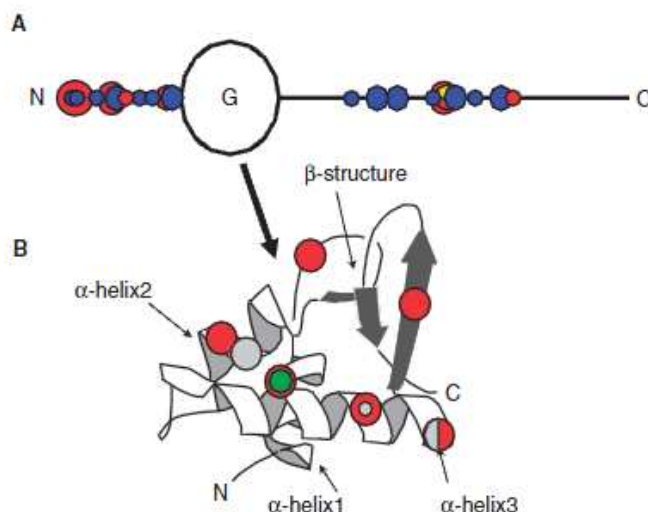


Figura 1.3. Modificaciones post-traduccionales observadas en las variantes somáticas de la histona H1 humana. (A) Sitios de modificación de las colas Nt y Ct (B) Modificaciones reportadas en el dominio globular. Se indican las tres α -hélices y las estructuras de hoja β del dominio. Los círculos divididos a la mitad indican que dos modificaciones fueron reportadas para el mismo sitio en el mismo número de variantes, mientras que los círculos concéntricos indican que más de una modificación ocurre en el mismo sitio pero en diferentes variantes de histona H1. Código de colores: Rojo: acetilación; Amarillo: metilación; Azul: fosforilación; Verde: ubiquitinación; Gris: formilación. Adaptado de Godde *et al*, 2008.

1.1.4 Variantes de las histonas tipo H1

Para todas las histonas excepto la histona del core H4, existen variantes (Godde *et al*, 2009) expresadas de manera diferencial en distintos tejidos o incluso durante diferentes etapas del desarrollo (Ausio, J., 2006), mientras que otras aumentan su expresión durante la diferenciación celular o en respuesta a señales específicas del ambiente (Alatzas *et al*, 2008). Se destaca que el número de variantes de histonas tipo H1 es mucho mayor en comparación con las histonas del core y se ha observado que las mismas no adquieren una distribución al azar en el genoma. Además se ha reportado que se encuentran asociadas a la expresión diferencial de genes (Harshman *et al*, 2013).

Además de su característico dominio globular, las variantes de histonas tipo H1 presentan otras características comunes. Son proteínas muy básicas con puntos isoeléctricos mayores a 10 y peso molecular de entre 25 y 35 KDa (Kasinsky *et al*, 2001; Abreu, C., 2009; Harshman *et al*, 2013). Su secuencia aminoacídica carece de cisteínas y triptófanos. En cuanto a la composición del dominio Ct, éste presenta un elevado número de residuos de lisina, alanina y prolina.

Es importante considerar que los dominios Ct difieren entre las variantes, asociándolos a una función especial de cada subtipo de histona. Esta función ha sido vinculada con la capacidad de las distintas variantes de condensar la cromatina (Godde *et al*, 2009), hecho vinculado directamente con la variación en la afinidad de unión al ADN.

La denominada histona *linker* H5 es considerada un miembro de la familia de las histonas tipo H1 (Harshman *et al*, 2013). Esta proteína es característica de núcleos de eritrocitos de aves pero también puede ser encontrada en células espermáticas. Esta proteína, al igual que las histonas tipo H1, posee un motivo de hélice alada característico del dominio globular y su presencia se asocia a cromatina inactiva desde el punto de vista replicativo o transcripcional.

1.1.5 Movilidad de histonas tipo H1

Los nucleosomas son estructuras dinámicas cuya conformación varía entre los estados plegados y desplegados, dependiendo de la temperatura, la concentración de las proteínas del octámero, las condiciones iónicas del medio y las señales celulares. En respuesta a esas señales, la cromatina puede ser reorganizada por medios de elementos que se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos remodeladores que necesitan la hidrólisis de ATP para modificar los contactos existentes entre las histonas, otras proteínas y el ADN (complejos SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD entre otros) y aquellos elementos que actúan mediante un mecanismo no dependiente de energía (variantes de histonas y sus modificaciones post-traduccionales, proteínas no histonas sin actividad enzimática entre otras) (Jerzmanowski A., 2007). Junto a esto, se ha descrito que la presencia de chaperonas de histonas es fundamental para el ensamblado y desensamblado del nucleosoma (Eriksson *et al*, 2012) aunque la función y actividad de estas proteínas es aún poco clara (Harshman *et al*, 2013).

Por los mecanismos arriba mencionados, la posición de los nucleosomas en las regiones reguladoras de la expresión génica así como la accesibilidad a la digestión del ADN *linker* con nucleasa de micrococo cambian en respuesta a estímulos intracelulares o del entorno (Verbsky *et al*, 2001). En principio, la interacción ADN-histona H1 estaría modulada por el nivel de modificaciones post-traduccionales que posea y, por otro lado, su interacción con otras proteínas presentes en la cromatina como variantes de histonas del core y sus modificaciones post-traduccionales, proteínas del grupo de alta movilidad electroforética (HMG), proteína de la heterocromatina 1 (HP1) entre otras (Ausio, J., 2006; Happel *et al*, 2009; Thomas *et al*, 2012). Se ha descrito que las histonas tipo H1 se encuentran menos fuertemente asociadas a la cromatina, por lo que presentan mayor movilidad en relación a las histonas del core (Ausio, J., 2006). En general, las variantes de H1 con colas Ct más cortas poseen un intercambio más rápido si se las compara con Ct de mayor longitud debido a una menor afinidad por la cromatina (Happel *et al*, 2009).

Actualmente, se propone que movilidad de la H1 como un proceso de tipo “Stop and Go” (Mistelli *et al*, 2000; Izzo *et al*, 2008; Over *et al*, 2013), en el cual la fase “Stop” o fase de asociación con el ADN, es más prolongada en el tiempo que su fase de disociación o fase “Go” en donde la H1 es redistribuida entre los nucleosomas. En este modelo, dinámico, la condensación de la cromatina y por lo tanto la inactivación transcripcional de esta región dependerá de la presencia de factores reguladores locales que compiten con las variantes de histonas tipo H1. El modelo aquí planteado es detallado en la figura que se muestra a continuación.

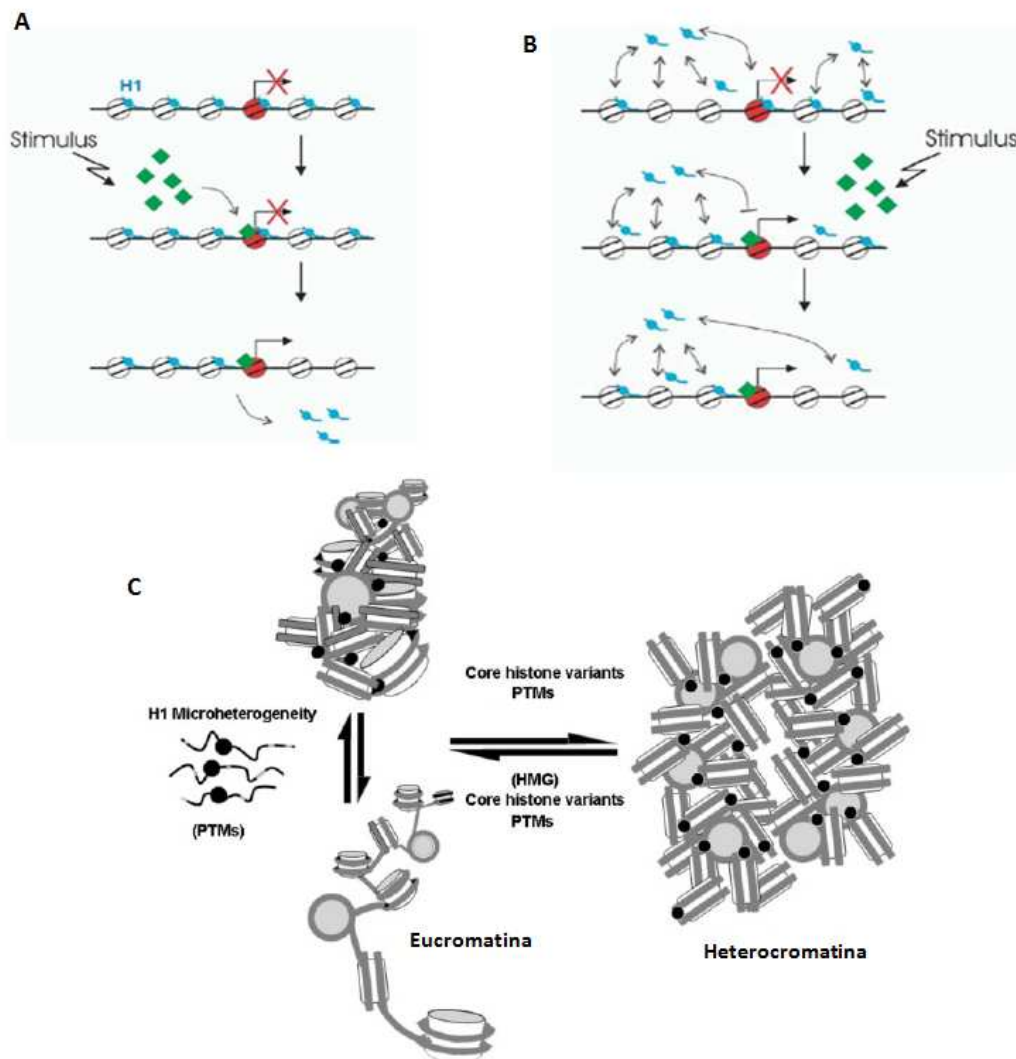


Figura 1.4. Movilidad de la histona H1. Análisis del rol de H1 desde el modelo estático (A) o dinámico (B). En la visión estática, las moléculas de H1 están asociadas de manera estática con el nucleosoma, actuando como represora de la transcripción de un cierto grupo de genes. Luego de un estímulo, la presencia de moléculas reguladoras (rombos verdes) interaccionan con la cromatina, liberando la molécula de H1 sitioespecífica permitiendo la transcripción. En el modelo dinámico (B), la interacción de H1 con los nucleosomas se encuentra en un estado de “Stop and go”, en donde las moléculas de H1 libres se encuentran en menor número en un estado continuo de movimiento. La concentración de factores reguladores locales compiten con moléculas de H1 para interaccionar a nivel sitio específico. (C) Representación esquemática del modelo dinámico planteado para el ensamblado de la cromatina. La variantes de histonas H1 se encuentran en continuo intercambio entre regiones plegadas y no plegadas de la cromatina en una dinámica de “Stop and Go”. Las concentraciones locales de estas variantes varían según los diferentes estímulos que recibe la célula, los cuales pueden estar asociados a modificaciones post-transcripcionales (PTMs) de histonas, síntesis de variantes o incluso asociaciones entre estas proteínas y proteínas de interacción con la heterocromatina. Adaptado de Bustin *et al*, 2005; Ausio, J., 2006.

1.1.6 Función de las histonas tipo H1

Sería difícil abarcar en profundidad en esta sección todas las funciones asociadas a la histona H1. La realidad demuestra que la función específica de esta histona no está del todo clara

(Izzo *et al.*, 2008) y más aún cuando se consideran las diferencias existentes entre los resultados obtenidos *in vitro* y aquellos obtenidos de experimentos *in vivo* (Woodcock *et al.*, 2006).

Estudios in vitro

La evidencia de que la histona tipo H1 posee un rol en el compactado y en la estructura de la cromatina fue puesta en evidencia inicialmente por experimentos realizados *in vitro*. Thoma y colaboradores (Thoma *et al.*, 1979) evaluaron el compactado de la cromatina y la disposición espacial de la misma en ausencia y presencia de H1 en un medio acuoso donde la fuerza iónica era variable. Se demostró aquí mediante microscopía electrónica y cristalografía de rayos X, que la histona tipo H1 condensaba la cromatina en una estructura más densa y definida en comparación con aquella estructura observada en ausencia de H1. Por otro lado, Steinmetz (Steinmetz *et al.*, 1978) dedujo, mediante digestión de ADN de timo de ternera con DNasa II, que la histona tipo H1 juega un rol importante en la formación de estructuras de compactación superiores por acercamiento de nucleosomas vecinos. A su vez, estos autores reportaron diferencias en el empaquetamiento del ADN nucleosomal al digerir ADN en presencia y ausencia de H1 con nucleasa de micrococo. Resumidamente, la presencia de H1 protege de la digestión al ADN *linker*.

Los estudios de repetición nucleosomal son empleados para determinar la distancia, en pares de bases de ADN, presente entre nucleosomas que es sensible a ser digerida por la nucleasa de micrococo. Trabajos recientes que emplearon variantes de histonas tipo H1 humanas demostraron *in vitro* e *in vivo* que las mismas presentaban diferentes distancias de repetición nucleosomal ocasionado por sus diferencias de afinidad por la cromatina (Clausell *et al.*, 2009; Öberg *et al.*, 2012) sugiriendo que estas variantes poseen roles diferentes en la organización de esta fibra. Estas diferencias observadas aquí podrían ser atribuidas a distintas fuerzas de interacción asociadas a la neutralización de carga del ADN *linker* por la presencia de H1, postulado planteado por Blank en 1995 como conclusión de estudios realizados *in vitro* (Blank *et al.*, 1995).

Otro de los roles atribuidos a la histona tipo H1 es el de represor general de la transcripción génica. Uno de los experimentos *in vitro* que puso a prueba esta teoría fue el realizado por Levy y Noll en el año 1981 (Levy *et al.*, 1981) trabajando con ADN de *D. melanogaster* y nucleasa de micrococo. Estos autores argumentaban que la sensibilidad a la digestión por parte de esta nucleasa se relacionaría con el grado de compactación de la cromatina, observándose mayor sensibilidad a la digestión cuando la cromatina es más laxa, asociada a un estado transcripcionalmente activo. Tres años más tarde Weintraub (Weintraub H., 1984) postulaba que la histona tipo H1 interaccionaba de manera diferente a nivel de nucleosomas ubicados en zonas transcripcionalmente activas en comparación con aquellas regiones inactivas. En éstas últimas, se daba lugar a la formación de estructuras con mayor grado de compactación que inhibían el proceso de transcripción génica. Este hecho fue evidenciado por Bresnick y colaboradores (Bresnick *et al.*, 1992) en un trabajo en el que demostraban que el promotor del virus de tumor mamario de ratón, en estado transcripcionalmente activo, poseía una reducción del 46% del contenido de histona tipo H1.

En forma resumida, los trabajos *in vitro* evidenciaban el rol de la histona tipo H1 en el compactado y organización de la cromatina, asociándola a su vez, a una función en la inhibición de la transcripción génica. Estudios *in vivo* posteriores tratarán de evidenciar si la histona tipo H1, asociada a estas funciones, juega un rol esencial para los organismos.

Estudios in vivo en organismos eucariotas unicelulares

Los primeros estudios que intentaron evidenciar el rol de esta histona en microorganismos fueron realizados en el protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y los hongos *Aspergillus nidulans*, *Ascobolus immersus* y *Neurospora crassa*. A continuación se presentaran los aspectos más relevantes de cada uno de ellos.

T. thermophila presenta dos núcleos denominados macro y micronúcleo (Wu *et al*, 1986). A nivel del macronúcleo, *Tetrahymena* presenta una única histona H1 típica mientras que el micronúcleo presenta tres histonas tipo H1 atípicas (α , β , γ) asociados con regiones de ADN *linker*. Shen y colaboradores (Shen *et al*, 1996) demostraron que la supresión de la histona atípica γ no causa fenotipos severos, pero sí una reducción en el compactado de la cromatina. Además se observó la desregulación de ciertos genes específicos, no afectando mayormente el nivel global de transcripción. Posteriormente, en un estudio similar donde se deletó la histona H1 típica, se demostró que la metilación en residuos de adenina en los sitios de ADN *linker*, mecanismo vinculado con el silenciamiento génico en este organismo, no variaban en comparación con la línea silvestre (Karrer *et al*, 2002).

Ushinsky y colaboradores (Ushinsky *et al*, 1997) inactivaron el único gen codificante para una histona H1 atípica en *S. cerevisiae*, no resultando en ningún fenotipo evidente, destacándose que solamente se vinculó la falta de esta histona con alteraciones en el nivel de transcripción de 27 genes. Estudios más recientes demostraron que la pérdida de dicha histona provoca que las células sean más propensas a reparar el ADN mediante recombinación homóloga, disminuyendo su vida media (Downs *et al*, 2003).

En *N. crassa*, la generación de mutantes *knockout* para el único gen codificante para una histona H1 típica demostró que la misma no era esencial, ya que los mismos no presentaban efectos fenotípicos ni genotípicos notorios, salvo que los micelios poseían un crecimiento menor al normal (Folco *et al*, 2003).

Estudios realizados en *A. immersus*, demostraron que la falta de su única histona H1 era necesaria para la sobrevivencia del hongo a largo plazo (Barra *et al*, 2000). Estos mutantes mostraron un patrón de accesibilidad a digestión con nucleasa de micrococo mayor al silvestre. Además se observó un aumento en el nivel global de metilación del ADN de regiones que se encuentran metiladas en la línea silvestre. Esto demuestra que en este organismo, su única histona H1 no juega un rol importante en el silenciamiento génico asociado a metilación.

Por otro lado, estudios en *A. nidulans* demostraron que la delección del único gen codificante para una histona H1 típica genera mutantes que no se diferencian fenotípicamente de la línea silvestre (Ramón *et al*, 2000) pero a diferencia de *A. immersus*, la susceptibilidad a la digestión con nucleasa de micrococo no se ve alterada.

En forma resumida, los estudios detallados anteriormente, llevados a cabo en organismos donde el gen codificante para la histona H1 es de copia única y en algunos casos, además, atípica, demostraron que la falta de H1 no genera efectos en la viabilidad de los mismos (Godde *et al*, 2009). Sin embargo, es importante considerar el hecho de que estos estudios fueron llevados a cabo en organismos cuyo ADN espaciador presenta una longitud menor si se los compara con organismos eucariotas pluricelulares (Woodcock *et al*, 2006). Estas diferencias no permiten generalizar el hecho de que la histona tipo H1 no es esencial para la viabilidad de organismos eucariotas pluricelulares.

Estudios in vivo en organismos eucariotas pluricelulares

El estudio de la función de la histona tipo H1 en organismos eucariotas pluricelulares es complicado de abordar ya que en estos organismos existen diferentes variantes de histonas tipo H1, las cuales son expresadas de manera diferencial en distintas etapas de desarrollo o en los diferentes tejidos (Izzo *et al*, 2008).

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en organismos unicelulares, donde no existen variantes de histonas tipo H1 y además presentan una única copia del gen codificante para esta proteína, en organismos eucariotas pluricelulares el efecto de la falta de una histona tipo H1 en particular podría verse afectado por un mecanismo compensatorio por la expresión de distintos subtipos de H1, lo cual se ha observado tanto en mamíferos como en plantas (Jerzmanowski A., 2007). La función de la histona deletada podrá o no ser compensada completamente por las demás variantes ya que éstas poseen fuerzas de interacción distinta con el ADN e incluso una relación entre los tiempos de asociación/disociación diferentes (Bustin *et al*, 2005). Este mecanismo podría generar efectos poco notorios en condiciones normales de crecimiento pero frente a diversos estímulos de estrés, cuando la célula necesita responder de manera rápida y eficaz, los efectos de la falta de la histona pueden ser mucho más evidentes.

Diferentes estudios de mutantes *knockouts* en mamíferos han demostrado este mecanismo compensatorio. Por ejemplo, en los experimentos llevados a cabo por Rabini (Rabini *et al*, 2000), la generación de un mutante *knockout* para la histona H1.1 en ratón, provocó un incremento en los niveles de las histonas H1.2, H1.3 y H1.4 en los espermatozoides.

Existen varias revisiones que mencionan estudios que vinculan el rol de la histona H1 con la regulación de genes específicos (Happel *et al*, 2009; Kowalski *et al*, 2012). Un estudio reciente demostró que la regulación de genes de tipos celulares específicos depende de algunas variantes de histonas H1 (Kowalski *et al*, 2012; Pérez-Montero *et al*, 2013), en un experimento en el cual la reprogramación de queratinocitos a células pluripotenciales alteraba los niveles relativos de las variantes de histonas H1, sugiriendo que las mismas juegan un rol específico durante la diferenciación. Esta regulación génica surge del hecho de que dichas variantes provocan un compactado mayor de dichas regiones imposibilitando el acceso a la maquinaria transcripcional y por lo tanto actuando como un represor general de la transcripción, rol tradicional atribuido a la histona tipo H1.

Se ha descrito roles novedosos para las histonas H1. En humanos, la histona H1.2 estaría asociada a la inducción de apoptosis en linfocitos tratados con drogas citotóxicas (Harshman *et al*, 2013), ya que se reportó su translocación al citoplasma de dichas células.

A lo largo de esta sección se analizaron los diferentes roles conocidos atribuidos a la histona tipo H1. Los mismos pueden ser agrupados en cuatro grandes categorías en los que se encuentran el plegamiento del ADN dentro del núcleo eucariota, el establecimiento del espaciado nucleosomal (Ausio, J., 2006) y la metilación de regiones específicas del genoma hechos probablemente vinculados con el silenciamiento de algunos genes a nivel de eucromatina o incluso, a un silenciamiento mayor a nivel de heterocromatina (Lu *et al*, 2013). Junto a estas funciones se incluye el rol de esta histona durante el desarrollo en donde juega un papel fundamental en la regulación de genes específicos.

Rol de la histona H1 durante el desarrollo y en la diferenciación celular

La primera variante de histona *linker* asociada a células totipotenciales fue descrita hace más de treinta años, en un trabajo publicado en 1974 por el grupo de Ruderman (Ruderman *et al.*, 1974) en el que se describió variantes de histona tipo H1 en oocito de erizo de mar. El año siguiente, el grupo de Alder (Alder *et al.*, 1975) reportó la presencia de variantes de histonas tipo H1 en espermatozoides presentes exclusivamente en testículos de rana. Luego de publicados estos trabajos, la literatura que vincula los cambios de expresión de los subtipos de histonas tipo H1 durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular fue en aumento (Godde *et al.*, 2009).

Uno de los trabajos más relevantes que vincula el rol de la histona tipo H1 y el desarrollo de organismos eucariotas fue llevado a cabo en *Xenopus tropicalis* donde se evidenció que la variante de histona H1 específica de oocito, B4, es progresivamente remplazada por tres variantes somáticas H1 durante la embriogénesis (Sera *et al.*, 1998; Crane-Robinson C., 1999). Se demostró que la función fundamental de esta variante de histona es la inhibición selectiva de la expresión del gen del ARN ribosomal 5S al bloquear el acceso de factores de transcripción al promotor de este gen. A su vez, Steinbach demostró que la acumulación de estas variantes de histona tipo H1 somáticas es esencial para el silenciamiento transcripcional selectivo de genes reguladores vinculados con la diferenciación del tejido mesodérmico (Steinbach *et al.*, 1997).

En el organismo *Caenorhabditis elegans* se demostró, mediante silenciamiento por ARN de interferencia de la variante de histona H1.1, una alteración en la proliferación de la línea germinal y en la diferenciación, junto con una malformación en las gónadas asociadas a esterilidad (Jedrusik *et al.*, 2001). Estos hechos fueron vinculados a la ausencia de silenciamiento de ciertos genes en la línea germinal.

En un trabajo focalizado en el estudio de las variantes de la histona tipo H1 específica de testículo de ratón, se demostró que la inactivación de la variante H1t no generaba efectos aparentes durante la espermatogénesis. Por el contrario, la inactivación de una segunda variante, H1T2, que reemplaza a H1t durante el desarrollo, provocaba una alteración en la reestructuración celular, en la condensación del ADN y el empaquetamiento de la cromatina durante la diferenciación espermática (Martianov *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005).

Estudios llevados a cabo por Fan (Fan *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2005) evidenciaron que la reducción en un 50% del total de histonas H1 expresadas en células de embrión de ratón por la supresión de tres variantes de histonas H1c, H1d y H1e, causan cambios importantes en la estructura de la cromatina que provocan la muerte del embrión antes de los 11 días de gestación. En este estudio se observó una disminución en el espaciado entre nucleosomas, de 201 a 174 pb, asociado a compactación local de la cromatina y acompañado de cambios en las modificaciones covalentes de las histonas. Se demostró además la alteración de la expresión de 29 genes, 9 de ellos afectados por hipometilación en islas CpG de las regiones reguladoras de los mismos (Rupp *et al.*, 2005). Por el contrario, no se observó cambios en el nivel global de metilación.

Un estudio reciente demostró que en *Drosophila*, el silenciamiento de entre un 20 a un 60% de la histona H1 mediante ARN de interferencia es letal para las larvas. El fenotipo y genotipo observados permitieron demostrar que esta proteína es esencial para el organismo ya que es un determinante importante en la formación y función de la heterocromatina y un componente bioquímico esencial para el alineamiento de las cromátidas hermanas en los cromosomas politénicos (Lu *et al.*, 2009). A su vez, este silenciamiento se acompañó de un aumento de transcritos pertenecientes a transposones junto con una reducción de la dimetilación de la histona H3 a nivel de la lisina 9 (Lu *et al.*, 2013).

1.1.7 Histonas tipo H1 en plantas

→ Estructura del dominio globular en plantas

Una diferencia importante que existe entre el dominio globular de las histonas tipo H1 en plantas en comparación con los mamíferos es la carencia del motivo conservado GXGAX perteneciente al ala W2, ubicada entre las dos hojas β antiparalelas S2 y S3 (Jerzmanowski A., 2007). Este motivo conecta dos regiones que interaccionan con el nucleosoma, por lo que se especula que su ausencia podría asociarse con la función global de esta histona.

→ Las variantes de la histona H1 y su vinculación con el desarrollo y otras funciones en plantas

El estudio de la función de la histona H1 en plantas presenta las mismas dificultades mencionadas en el caso de animales. En particular, los mecanismos de compensación citados para el caso de mamíferos también son observados en plantas, como se demostró a través del siguiente experimento llevado a cabo en *Nicotiana tabacum*. El silenciamiento de un 75% de las histonas H1 mayoritarias en tabaco, H1A y H1B, provocó un aumento en las variantes H1C y H1F. Las plantas mutantes poseían un espaciamiento nucleosomal normal pero sus cromosomas presentaban una compactación menor. Fenotípicamente, estas líneas presentaban aberraciones en el desarrollo de las flores, lo cual se vio acompañado de esterilidad masculina, debido a problemas en la segregación de cromosomas durante la meiosis (Prymakowska-Bosak *et al*, 1999) destacando aquí un rol importante de la histona tipo H1 en el desarrollo de este organismo.

En *Zea mays L.* las variantes principales de histonas tipo H1 son H1A, H1B y H1⁰ cuyas proporciones en células pertenecientes al meristema corresponden al 41%, 34% y 25% del total respectivamente. Estudios recientes demuestran que la relación establecida anteriormente para estas variantes se encuentra alterada en células que se diferencian a raíz mientras que la misma no se ve afectada en células involucradas en el desarrollo del callo (Alatzas *et al*, 2008). Los autores proponen en este estudio que la alteración en las relaciones de las variantes de histonas tipo H1 analizadas se correlacionan con la diferenciación celular y, por lo tanto, con la expresión génica involucrada en dicho proceso.

Por otro lado, estudios en *Pisum sativum L.* demostraron que el subtipo H1-7 de la histona H1 en este organismo, el cual presenta tres alelos distintos identificados por movilidad electroforética, se encontraban vinculados a tejidos vegetales en crecimiento. Experimentos que involucran plantas homocigotas para cada uno de estos alelos, demostraron que existía variación fenotípica en el tamaño alcanzado por las plantas (Bogdanova *et al*, 2007). Un estudio actual sobre este organismo, demostró que probablemente el subtipo H1-6 también puede generar variaciones cuantitativas en la dinámica de crecimiento de esta planta (Kosterin *et al*, 2012). Por otra parte, el subtipo 5 de la histona H1 es más abundante en plantas que crecen en regiones geográficas con temperaturas más bajas lo que apoyaría la teoría de que esta histona podría estar asociada en la adaptación a nuevos ambientes (Bogdanova *et al*, 2005).

Dudnikov (Dudnikov A.J., 2012) demostró que en el organismo *Aegilops tauschii*, subespecies *strangulata* y *tauschii*, el alelo Hst2¹⁰²⁶ presente en *strangulata* podría ser adaptativo por lo que no se presentaría en plantas de las regiones altamente lluviosas de Irán, debido a un posible mecanismo de selección natural.

Un estudio reciente demuestra que en *A. thaliana*, la megaspora materna es reprogramada a un estado de menor compactación de la cromatina debido a una disminución de los niveles de la histona tipo H1 (She *et al.*, 2013). En este mismo organismo, se demostró además que los niveles de la histona H1-3 son relativamente bajos en hojas jóvenes aumentando el nivel de expresión en tejidos que no presentan división celular o en hojas viejas (Schmid *et al.*, 2005).

Es interesante destacar en este punto que se ha reportado que la presencia de fitohormonas vinculadas con el crecimiento y desarrollo de plantas, se asocia con modificaciones covalentes del dominio Ct de histonas tipo H1 (Over *et al.*, 2013) las cuales se vinculan con cambios en la regulación génica.

Algunas variantes de H1 se han vinculado a la respuesta al estrés hídrico, ya que las mismas son inducidas en estas condiciones. Este es el caso de la H1-3 de *A. thaliana* (H1-3), *Lycopersicon esculentum* (H1-S) y *pennellii* (H1-D) pero el rol de las mismas en este tipo de estrés aún no es claro (Scippa *et al.*, 2004). Estas variantes representan un subtipo ancestral que surgió antes de la separación entre plantas mono y dicotiledóneas (Jerzmanowski *et al.*, 2000). Experimentos vinculados con este tipo de histonas serán detallados más adelante en la sección *Histonas H1 y su relación con el estrés abiótico en plantas*.

Finalmente, se reportó la actividad novedosa de una histona H1 ubicada a nivel de la superficie nuclear como organizadora de microtúbulos en células BY-2 de tabaco (Hotta *et al.*, 2007). Se ha descrito que esta histona forma un complejo en forma de anillo con la tubulina los cuales sirven como centro de nucleación para la elongación radial de los microtúbulos.

→ *Histonas H1 y su relación con el estrés abiótico en plantas*

Estudios recientes han demostrado que existe una coordinación entre la expresión génica y la regulación de la compactación de la cromatina en respuesta a estrés abiótico pero poco se sabe de cuál es la relación de la histona tipo H1 y este tipo de estrés en plantas. Esto se ve reflejado en los escasos trabajos publicados al respecto (Kim *et al.*, 2010). La respuesta a estas condiciones incluyen modificaciones de histonas que se ubican en regiones de genes que responden a distintos tipos de estrés a través de la acción de complejos remodeladores de la cromatina. Esto se vincula con la sobre/sub expresión de estos genes (ver Figura 1.6).

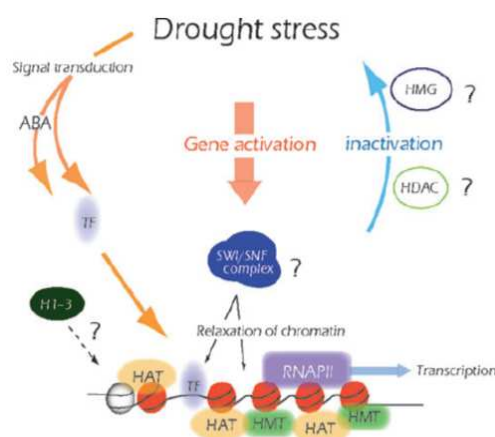


Figura 1.6 Mecanismo posible de regulación de la cromatina mediante cambios post-traduccionales de las histonas y modificaciones posicionales de los nucleosomas en respuesta a estrés hídrico. Este tipo de estrés genera una activación génica posiblemente a través de la relajación de la cromatina por la mediación de los complejos SWI/SNF, los cuales modificarían la posición de aquellos octámeros (círculos de color rojo) ubicados en las cercanías del gen de respuesta a este tipo de estrés, no modificando aquellos que se encuentran por fuera de esta región (círculos de color blanco). De esta forma se permitiría la transcripción génica. Esta respuesta también estaría asociada a un reclutamiento de proteínas modificadoras de histonas, histona acetiltransferasa e histona metiltransferasa, las cuales modificarían post-traduccionamente las histonas del core. El rol de las histonas tipo H1 aún no está del todo claro al igual que los procesos de inactivación. HDAC: histona desacetilasa; HAT: histona acetiltransferasa y HMT: histona metiltransferasa, HMG: proteínas de alta movilidad; H1-3: histonas *linker* H1-3; RNAPII: RNA polimerasa II; TF, factor de transcripción. ABA: ácido abscísico. Adaptado de Kim *et al*, 2010.

A pesar de que se conoce el patrón de expresión de las variantes de H1 inducidas por estrés hídrico, su rol en éste aún no es claro. Ascenzi y colaboradores (Ascenzi *et al*, 1999) demostraron que mutantes de *A. thaliana* deficientes en una de las tres variantes de histona tipo H1 que es inducida por estrés hídrico, H1-3, no presentaban fenotipo aberrante ni variaciones en los niveles de expresión de genes que responden a la sequía. Posteriormente, se demostró que esta variante es inducida bajo tratamientos con ácido abscísico (ABA) de forma diferencial en la raíz y el meristema, debido a la acción de AREB1, un factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés hídrico. La sobre-expresión de este factor de transcripción lleva a un aumento en la sensibilidad a ABA y una mayor tolerancia a la sequía (Fujita *et al*, 2005).

En el tomate, la variante de histona H1 denominada H1S, es inducida por sequía y ABA y su expresión también se encuentra regulada durante el ciclo día/noche, alcanzando mayores niveles durante el período de luz. En estas condiciones, se observa una acumulación a nivel nuclear de esta proteína en hojas de tomate marchitas. El silenciamiento de este gen resulta en un aumento en la pérdida relativa de agua en hojas de la línea silenciada si se las compara con la silvestre en ambos casos frente a estrés hídrico. Este hecho se vincula con una desregulación en la función de los estomas que conlleva a un mayor índice de transpiración (Scippa *et al*, 2004). Estos resultados podrían indicar que esta variante de H1 puede presentar más de una función a nivel celular vinculados con el control del estado hídrico en la planta.

Por otro lado, estudios en *Gossypium herbaceum* en dos variantes genotípicas sensibles (RAHS-14) o resistentes (Vagad) a sequía demostraron que el genotipo resistente poseía un nivel de expresión 39 veces mayor que el sensible, de una proteína tipo H1 inducible por estrés hídrico de secuencia similar a H1S de tomate. Este nivel diferencial de expresión, acompaña el hecho de que la variante Vagad sea más resistente a la sequía (Trivedi *et al*, 2012).

1.2 *Physcomitrella patens* como modelo de estudio

P. patens es un musgo de la familia de las briofitas (Prigge *et al.*, 2010). Estas plantas no vasculares divergieron aproximadamente hace 450 millones de años de las plantas vasculares a partir de un ancestro común. Desde entonces, las briofitas han desarrollado muy pocos cambios morfológicos, siendo el grupo de plantas terrestres más preservado y constituyendo un excelente modelo para estudios evolutivos.

Este musgo posee varias características que lo hacen un modelo ideal para estudios de genética reversa. Presenta una morfología simple que permite su cultivo en el laboratorio y su propagación vegetativa permite mantener las líneas de estudio de forma indefinida. A su vez, la predominancia de fase haploide a nivel del ciclo celular permite una identificación rápida de mutaciones dominantes y recesivas que afectan el desarrollo del musgo y realizar estudios funcionales mediante delección génica, remplazamiento de alelos o empleo de ARN de interferencia para estudios de silenciamiento génico. Este musgo presenta un alto porcentaje de recombinación homóloga por lo que los mutantes estables obtenidos por transformación de protoplastos con polietilenglicol y shock térmico, pueden ser seleccionados en tiempos mucho menores en comparación con otras plantas (Prigge *et al.*, 2010). Otra característica importante que se destaca en este organismo, es que las familias génicas tienden a estar representadas por menor número de genes y existe conservación de genes vinculados con el desarrollo de plantas en general (Nishiyama *et al.*, 2003). Además, las secuencias genómicas son altamente similares a genes de plantas superiores en relación a el uso de codones y la estructura intrón-exón (Schaefer, D. G., 2002).

El genoma de *P. patens* ha sido secuenciado por el Joint Genome Institute (JGI) y es de libre acceso desde el 2008 (Lang *et al.*, 2008). Estudios citogenéticos han demostrado que el genoma haploide se encuentra organizado en 27 cromosomas con un total de 480 mega pares de bases, por lo menos tres veces mayor al tamaño del genoma de *A. thaliana* (125 Mpb) y similar al de arroz (420 Mpb) (Yu *et al.*, 2002). El análisis de su transcriptoma revela la presencia de 27949 genes que codifican para proteínas y demuestra que aproximadamente, el 60% de sus genes tienen homólogos en plantas superiores (Nishiyama *et al.*, 2003). Se destaca que aún hoy no se ha adoptado una nomenclatura universal para los genes (Cove *et al.*, 2009).

P. patens, al igual que las plantas vasculares, exhibe alternancia entre fase haploide y diploide de crecimiento, pero a diferencia de ellas, la fase gametofítica haploide es la que presenta mayor predominancia e incluye la mayor parte del tejido presente en el musgo (Figura 1.7). La germinación de *P. patens* se da a partir de una espora haploide, la cual se desarrolla para formar una estructura filamentosa, bidimensional, llamada gametofito juvenil o protonema. A partir de esta estructura se pueden diferenciar dos tipos de tejidos, el llamado cloronema, que consiste en las células que emergen de la espora, de filamentos ya existentes o de tejido dañado, con tabiques perpendiculares al eje del filamento principal y con un contenido de entre 50 a 100 cloroplastos desarrollados, y células del caulinema, células de crecimiento rápido cuyos tabiques se encuentran oblicuos al eje del filamento principal y con presencia de menor contenido de cloroplastos. Ambos tipos de células presentan crecimiento apical (Furt *et al.*, 2012) y la transición entre células del cloronema a las del caulinema se encuentra regulada por factores ambientales y auxinas (Vidali *et al.*, 2012). A partir de los filamentos del caulinema se desarrolla una yema y a partir de allí comienza el crecimiento tridimensional dependiente de la fitohormona citoquinina, y la formación del gametofito adulto denominado gametóforo, el cual posee un vástago fotosintético, hojas, rizoides filamentosos y, en el ápice, los órganos sexuales que darán lugar al desarrollo del cigoto diploide denominado esporofito, con posterior formación de esporas.

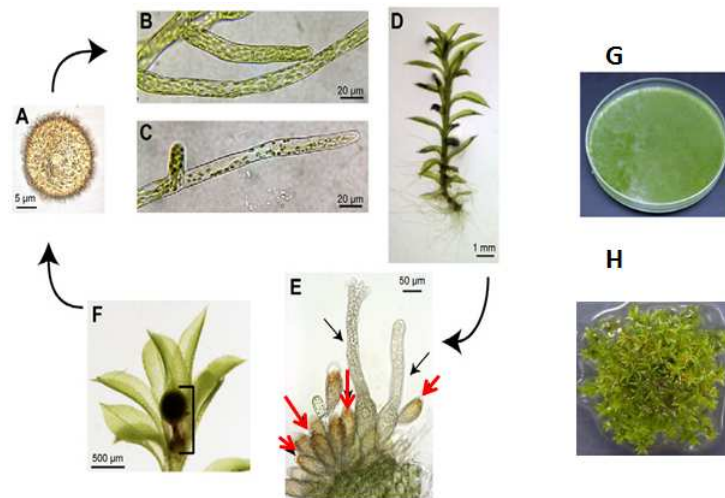


Figura 1.7 Ciclo del organismo *P. patens*. (A) La espora haploide germina para generar células del clonema (B) las cuales continúan su desarrollo diferenciándose a células del caulinema (C). Los gametóforos (D) emergen de los filamentos del protonema pudiendo observarse a nivel de su ápice (E) los órganos sexuales masculinos (anteridios, indicados con flechas rojas) y femeninos (arquegonios, indicados con flechas negras). (F) Esporofito (indicado con un paréntesis recto en la imagen) se desarrolla en el ápice del gametóforo. (G) Estadio protonema de 6 días de crecimiento y (H) gametóforo o colonia. Adaptado de Prigge *et al*, 2010.

1.2.1 Estudios de genética reversa en *Physcomitrella patens*

En estudios por genética reversa, el empleo de mutaciones permite dilucidar la función de un gen o proteína en particular, a través de inactivaciones o sobreexpresión de genes. Dichas inactivaciones pueden llevarse a cabo a través de mutaciones en sitios específicos que se asocian a silenciamiento génico por producción de ARN doble hebra, disrupción de la estructura génica o delección completa del gen (Kamisugi *et al*, 2006). De esta forma, en base a transgénesis y posterior caracterización molecular y fenotípica de las líneas mutantes, se establece un acercamiento real a la función del gen en estudio.

El mecanismo denominado “Gene targeting”, o mecanismo de obtención de mutantes específicos mediante recombinación homóloga, genera mutantes por inserción de fragmentos de ADN en *locus* específicos, haciendo de esta estrategia un mecanismo interesante en la obtención de mutantes (Figura 1.8). El mismo ha sido empleado para transformación de levaduras como *S. cerevisiae* pero en animales y plantas vasculares presenta varios ordenes de magnitud menor si se lo compara con la recombinación ilegítima. *P. patens* y *Ceratodon purpureus*, briofitas, taxonómicamente distantes de *A. thaliana* (Markmann-Mulisch *et al*, 2007), han demostrado presentar un alto porcentaje de recombinación homóloga reconociéndolas como modelo eucariota multicelular de elección para estudios de genética reversa en plantas terrestres. *P. patens* presenta un mayor porcentaje de recombinación homóloga en comparación con *C. purpureus* (Trouiller *et al*, 2007).

Los métodos de transformación de *P. patens* incluyen la transformación de protoplastos con polietilenglicol y shock térmico (Cove *et al*, 2009). Para delecciones o disrupciones se emplea un cassette de selección flanqueado a ambos lados por regiones homólogas de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) que dirigirán el evento de recombinación a un *locus* específico dentro del genoma (Quatrano *et al*, 2007). Se ha demostrado que vectores linealizados que poseen 2000 pb en la región de homología, presentan un 90% de eficiencia en el evento de recombinación (Schaefer, D. G.,

2002). Para esto, el ADN empleado puede provenir de PCR o de plásmido linealizado. Los cassettes de selección actualmente empleados para este fin, confieren resistencia a neomicina o geneticina (gen *nptII*), higromicina (gen *aphIV*), sulfadiazina (gen *sul*), entre otros, bajo el control del promotor CaMV 35S o el promotor NOS destacando que se ha reportado que el nivel de resistencia obtenido para este último es menor si se lo compara con el CaMV 35S (Schaefer, D. G., 2002).

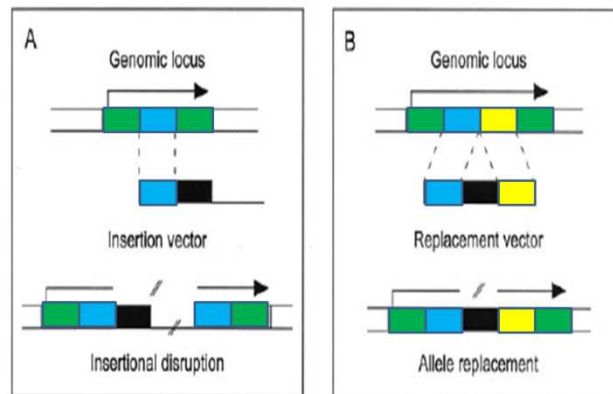


Figura 1.8 Generación de mutantes *knockout*. Los vectores que se muestran en la imagen son los más utilizados en la transformación de *P. patens*. **(A)** El vector de inserción posee un fragmento de homología con el ADN genómico (regiones indicadas con celeste) junto con un cassette de selección (rectángulo en negro) generando un mutante por interrupción del gen debido a la inserción de una o más copias del vector mediante recombinación homóloga. **(B)** Vector de reemplazo alélico. Éste posee un cassette de selección (rectángulo negro) flanqueado por dos secuencias que presentan homología a nivel del genoma de un locus determinado (rectángulo celeste y amarillo) las cuales se encuentran involucradas en dos eventos de recombinación homóloga. El resultado es una pérdida de función del gen en estudio. Rectángulos en verde: Secuencia genómica. Adaptado de Schaefer *et al*, 2001.

Las condiciones de selección para los mutantes estables, luego de una semana post-transformación, emplean concentraciones de antibiótico 10 veces superiores a la dosis letal 50. El porcentaje de obtención de mutantes estables mediante polietilenglicol y shock térmico es de 3 a 30% (Schaefer, D. G., 2002). La mayoría de los mutantes observados durante la ronda de selección no selección presentan crecimiento lento, con una regeneración alterada y son perdidos durante la ronda de selección mientras que otros presentan una regeneración similar a protoplastos silvestres en medio no selectivo. Los primeros se denominan transformantes inestables, ya que el ADN foráneo fue introducido a la célula pero permanece como episomal mientras que los segundos son los transformantes estables que integraron de manera homóloga o ilegítima ese ADN.

Es importante destacar que en las transformaciones se pueden generar mutantes no deseados en los que el evento de recombinación homóloga no ocurre de la forma esperada. Además de la recombinación ilegítima y doble recombinación homóloga, también puede observarse que el evento de recombinación homóloga sólo ocurre a nivel de uno de los extremos de homología mientras que en el otro extremo puede suceder un evento de recombinación no homóloga denominado NHEJ (“non-homologous end-joining”) o incluso puede esperarse un efecto de inserción consecutiva de la construcción empleada (concatenación) (Kamisugi *et al*, 2006) de ahí que la elección de cebadores para caracterizar el sitio de inserción es fundamental. Por otro lado, mediante estudios de Southern blot se puede demostrar si durante la transformación ocurrió un solo evento de recombinación o más de uno en distintos *locus* (Quatrano *et al*, 2007). Este punto será profundizado en la sección Materiales y métodos donde se explicará en detalle cómo fue considerada la selección de los mismos para este trabajo de maestría.

Una de las debilidades importantes en el estudio de mutantes *knockout* en este sistema es la haploidía de *P. patens*, ya que impide la obtención de mutantes por inactivaciones de genes esenciales cuya falta se torna letal para el organismo (Cove, D., 2000). Los posibles mecanismos

para afrontar este problema se podría realizar un silenciamiento génico o incluso emplear construcciones con promotores regulables. No podría considerarse la fusión de protoplastos como alternativa en este punto ya que se ha demostrado que cambios morfológicos y desviaciones fenotípicas, en comparación con la línea silvestre se relacionan con la poliploidía obtenida por fusión de protoplastos durante la transformación con polietilenglicol, y no con la inactivación del gen en estudio (Schween *et al*, 2005). El estudio de contenido de ADN por citometría de flujo es esencial en la evaluación de los mutantes obtenidos.

1.2.2 Estrés abiótico en *Physcomitrella patens*

A pesar de millones de años de evolución independiente, *P. patens* presenta similitudes con las plantas superiores en sus respuestas frente a factores de crecimiento (auxinas, citoquinas y ácido abscísico -ABA-) y ambientales (luz y temperatura) (Paponov *et al*, 2009).

Diversos estudios de resistencia a estrés abiótico demostraron que *P. patens* es altamente resistente a estrés abiótico salino y osmótico (Frank *et al*, 2005), haciendo de éste un modelo excelente para el estudio de los mecanismos moleculares que se activan en estas condiciones. El cultivo de plantas entre 0.1 a 1 M de cloruro de sodio por tres días con posterior pasaje a medio estándar de cultivo, demostró que concentraciones menores a 300 mM no generan diferencias fenotípicas con respecto al control sin estrés durante la etapa de recuperación, mientras que concentraciones mayores de hasta 600 mM, afectan la recuperación de las plantas (Benito *et al*, 2003).

Lunde y colaboradores (Lunde *et al*, 2007) generaron mutantes *knockout* de *P. patens* para el gen que codifica *PpENA1*, una bomba Na-ATPasa. En estudios previos, ya se había argumentado la función de este tipo de proteínas en la alta resistencia de este musgo a niveles elevados de estrés salino (Benito *et al*, 2003). En el estudio de Lunde, se expuso al mutante a 100 mM de NaCl por tiempos variables de días a semanas, demostrando que los mismos presentan igual contenido de clorofila pero un decrecimiento en el tamaño de las colonias de un 40% respecto a la línea silvestre. Aquí se argumenta que el cloruro de sodio, además de generar un efecto salino mediante estrés hiperosmótico, también genera un efecto tóxico por oxidación (Lunde *et al*, 2007; Azzabi *et al*, 2012). Varios de estos mecanismos y los genes implicados en la respuesta a estrés salino por cloruro de sodio han sido caracterizados (Kroemer *et al*, 2004).

En su tesis de maestría, Cecilia Ruibal (Ruibal, C., 2009) caracterizó el gen *PpABR170* (*Physcomitrella patens* ABA Responsive 170), el cual codifica para una lipasa de *P. patens* de función desconocida pero probablemente asociada a respuestas de estrés abiótico. Los análisis fenotípicos de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan este gen demostraron que las mismas presentan mayor tolerancia al cloruro de sodio. Se demostró además que en estrés abiótico, en especial frente a tratamientos de ABA 50 μ M y manitol 0.9M luego de 4 y 24 horas de exposición, este gen se encontraba altamente expresado.

Otro gen evaluado en su trabajo fue *PpLys*, el cual codificaría para una proteína integral de membrana con dominio LysM perteneciente a la familia de proteínas DUF395 con función desconocida (Ruibal, C., 2009). El dominio LysM es encontrado en enzimas involucradas en la degradación de la pared bacteriana y debido a esto, se propone que esta proteína podría tener una función asociada a la unión de peptidoglicanos de pared. Los trabajos reportados sobre el rol de este tipo de proteínas en plantas son escasos. A pesar de ello, Ruibal de mostró que este gen se induciría frente a estrés salino-tóxico, osmótico y frente al tratamiento con ABA.

Las proteínas de Heat Shock (HSP) están involucradas en respuesta a estrés abiótico. Durante un estrés de tipo térmico, se acumulan a nivel citoplasmático junto con otras chaperonas y juegan un rol fundamental en la re solubilización de proteínas agregadas. Un gen el particular, el denominado *PpHSP16.4*, duplicado en el genoma de *P. patens* y codificante para una proteína sHSP, fue eliminado mediante recombinación homóloga en un trabajo recientemente publicado (Ruibal *et al*, 2013). La línea silvestre mostró una inducción de este gen frente a tratamientos de manitol 0.9 M, cloruro de sodio 0.5 M y ácido salicílico (1 mM) luego de 4 y 24 horas de exposición al estrés. Además, la línea mutante fue expuesta a estrés térmico, salino y osmótico, y se demostró que las líneas doble mutantes presentaban un menor nivel de recuperación en comparación con la línea silvestre o incluso no se observaba recuperación alguna.

1.3 Antecedentes en el estudio de histonas tipo H1 en *Physcomitrella patens*

Durante la tesis de maestría de Cecilia Abreu (Abreu, C., 2009), se propuso estudiar las posibles histonas presentes en el repertorio genético del musgo *P. patens*. Para ello, se realizó una búsqueda bioinformática de los posibles genes codificantes para histonas tipo H1 mediante homología a nivel aminoacídico con los dominios globulares de histonas H1 de *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum L* y *Zea mays*. Los resultados muestran que existirían 5 secuencias codificantes para este tipo de histona, y una en particular, *Pp1s53_134V6* denominada por Abreu como *PpH1*, fue caracterizada.

Inicialmente, se analizó la secuencia de *PpH1* mostrando que el gen de 1112 pb codificaría para una proteína de 288 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 30 KDa y un punto isoeléctrico de 10.6. Se demostró la presencia de un único intrón de 245 pb con posiciones de corte y emplame entre los nucleótidos 186 y 431, a su vez, una región 3' UTR de 1532 pb. Mediante la fusión de la secuencia codificante de *PpH1* con la proteína verde fluorescente (GFP), se determinó que su localización sub-celular es nuclear.

Para demostrar la posible función de este gen, Abreu utilizó la estrategia de silenciamiento génico empleando ARN de interferencia. El mutante silenciado mostró una reducción del 30 % de histonas tipo H1 mediante estudios de Western blot mientras que mediante la evaluación mediante PCR en tiempo real la reducción lograda sería de un 46 %.

El análisis de la línea silenciada demostró que no existen diferencias morfológicas ni de velocidad de crecimiento en condiciones normales de cultivo. Por otro lado, al exponer al mutante silenciado a estrés salino-tóxico (0.5 M de NaCl por 11 días), osmótico (0.9 M de manitol por 15 días) o térmico (30, 32, 35 y 37 °C por 4 días) con posterior recuperación en medio estándar de cultivo y analizar de forma cuantitativa el contenido de clorofila y muerte celular, se observó que en estrés térmico o salino-tóxico no existen diferencias con respecto al control. En cambio, bajo condiciones de estrés osmótico, la línea silenciada posee menos contenido de clorofila en comparación con el control durante el proceso de recuperación, alcanzando valores similares al día 18 post-recuperación.

Por otro lado, se evaluó el espaciado nucleosomal de la línea silenciada bajo condiciones estándar de cultivo, no observándose diferencias con respecto al control silvestre.

El trabajo de Abreu concluyó con la construcción de un vector para la obtención de un mutante *knockout* para el gen *PpH1*. Esta alternativa contempla el hecho de que el silenciamiento de *PpH1* fue bajo y además, se hipotetizó que si este gen fuera esencial para el musgo, se tendría que haber observado efectos más severos en la línea silenciada bajo estrés abiótico.

2. OBJETIVOS

Esta tesis plantea como objetivo general contribuir a la caracterización funcional y al estudio de la expresión de la histona tipo H1 denominada *PpH1* en diferentes etapas de desarrollo del musgo *Physcomitrella patens*, en cultivo estándar y frente a condiciones de estrés abiótico. A su vez, se estudiarán el nivel de expresión transcripcional de otras proteínas con características típicas de histonas tipo H1 presentes en el genoma de *P. patens*. De esta forma se pretende dilucidar un posible efecto compensatorio en la línea *knockout* para el gen *PpH1* en condiciones estándar de cultivo o frente a estrés abiótico.

Objetivos específicos

Generación y caracterización de una línea *knockout* para el gen codificante de PpH1 en condiciones estándar de crecimiento y frente a estrés abiótico.

1. Generación de una línea *knockout* para el gen *PpH1*.
2. Estudio, en la línea *knockout*, del efecto de la falta de *PpH1* durante el desarrollo de este musgo, en los estadios protonema y gametóforo mediante comparación fenotípica y de velocidad de crecimiento respecto a la línea silvestre.
3. Análisis de la repetición nucleosomal en la línea mutante.
4. Análisis de la resistencia, por parte de la línea *knockout*, a diferentes tipos de estrés abiótico: térmico, osmótico y salino.
5. Estudio del nivel de expresión de genes vinculados con la resistencia a dicho tipo de estrés.

Estudio de otras posibles histonas tipo H1 en *P. patens* y análisis de un posible efecto compensatorio en la línea *knockout*.

1. Búsqueda bioinformática de posibles genes codificantes para histonas tipo H1 en este organismo.
2. Estudio de la expresión a nivel transcripcional de estas posibles histonas en condiciones estándar de cultivo. Análisis de la localización subcelular de aquellas que presenten un mayor nivel de transcripción.
3. Determinación del nivel de expresión transcripcional de aquellas secuencias identificadas como posibles histonas tipo H1 en presencia y ausencia de *PpH1* durante las diferentes etapas de desarrollo de *P. patens*.
4. Análisis de un posible efecto compensatorio en la línea *knockout* al someter dicha línea a diferentes condiciones de estrés abiótico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

La línea silvestre utilizada en este trabajo fue *Physcomitrella patens* Grandsen (Schaefer D *et al*, 1991).

P. patens fue crecida en condiciones estériles en medio estándar compuesto por MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1.8 mM, pH 6.5), KNO₃ (10 mM), FeSO₄ (45 μM), CaCl₂ (1 mM), tartrato de amonio (5 mM), sales de Hoagland's 0.22 mM de CuSO₄·5H₂O, 10 mM de H₃BO₃, 0.23 mM de CoCl₂·6H₂O, 0.1 mM de Na₂MoO₄·2H₂O, 0.19 mM de ZnSO₄·7H₂O, 2 mM de MnCl₂·4H₂O y 0.17 mM de KI y Plant agar (Duchefa) (10 g.L⁻¹) empleando para ello agua milli Q 18 MΩ·cm a 25 °C (Ashton NC, DJ., 1977). Se utilizaron placas de Petri esterilizadas con etileno. Para todos los casos, exceptuando experimentos de estrés térmico, el musgo fue crecido a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz con un flujo fotónico de 100 μmol.m⁻².s⁻¹.

Las colonias de *P. patens* fueron crecidas directamente sobre el medio, respetando la relación 16 colonias por placa. Para la propagación de las mismas se realizó 2 pasajes de colonias, crecidas por 21 días, seguido por un pasaje por protonema. Luego de 9 a 13 días de crecimiento, se seleccionó 0.25 cm² de material vegetal para realizar un nuevo pasaje a medio para generar colonias.

El cultivo de protonema fue obtenido macerando en mortero estéril 16 colonias crecidas por 21 días en condiciones estándar en presencia de 3 mL de agua milli Q. El material vegetal así obtenido fue crecido en medio estándar sobre celofán de 9 a 13 días.

Para la generación de protoplastos, la obtención de ADN para Southern blot y el estudio de repetición nucleosomal se empleó protonema obtenido de esta forma, seguido de 4 a 5 pasajes en medio estándar. Para esto se procesó el tejido vegetal empleando el equipo Ultraturrax UTC de forma de obtener una suspensión uniforme. En el caso de experimentos de estrés abiótico, velocidad de crecimiento, estudio fenotípico y nivel de expresión en condiciones estándar, se empleó protonema obtenido luego de 2 a 3 pasajes.

Se realizaron controles de contaminación que implicaron el cultivo del material vegetal en medio LB por 2 días a 30°C seguido por 1 día a 37°C.

3.2 Análisis bioinformático

3.2.1 Búsqueda bioinformática de posibles genes codificantes para histonas del tipo H1

Con el fin de identificar en el genoma de *P. patens* posibles secuencias que codifiquen histonas tipo H1, se realizó una búsqueda en bases de datos de secuencias expresadas, ESTs, y de ADN genómico en la web: NIBB PHYSCObase (<http://moss.nibb.ac.jp/>), JGI –Joint Genome Institute- (<http://genome.jgi.doe.gov/>), The *Physcomitrella patens* computational biology resource (<http://www.cosmoss.org/>) y Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Para ello, se buscaron secuencias que presentaran homología a nivel aminoacídico con los dominios globulares de las histonas H1 de otras especies, plantas y no plantas, ya que la secuencia del dominio globular se encuentra relativamente conservada a lo largo de la evolución.

Las secuencias que se emplearon en este estudio se describen a continuación, incluyendo el organismo del cual provienen junto con el número de identificación en GenBank: *Zea mays* (maíz) (gi.162463950, gi.195637706), *Arabidopsis thaliana* (gi.16314, gi.15224536, gi.15227957), *Triticum aestivum* (trigo harinero) (gi.5230781, gi.5230783, gi.5230785, gi.5230788), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (gi.6681423, gi.5726575, gi.23506611, gi.145581063), *Solanum lycopersicum* (tomate) (gi.3021487), *Aspergillus nidulans* (gi.67524615), *Oryza sativa Indica* (arroz) (gi.149390683) y *Populus trichocarpa* (Álamo balsámico de California) (gi.224087971). No se realizó un análisis bioinformático en busca de las distintas regiones de plegamiento del dominio globular ya que dichos programas no predicen con exactitud las estructuras (Abreu, C., 2009).

3.2.2 Secuenciación, diseño de cebadores y programas informáticos

La secuenciación se llevó a cabo por el Servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur (Montevideo) y por el Servicio de secuenciación de MacroGen (Corea).

El diseño de cebadores se realizó mediante el programa Primer3 Plus (<http://primer3plus.com/>) y el programa Oligo Analyzer de Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

Los alineamientos de secuencias se realizaron empleando el programa Clustal Versión 2.1 y el Mega 5.0.

3.3 Preparación y análisis de ADN

3.3.1 Extracción de ADN a gran escala a partir de tejido vegetal

El siguiente protocolo corresponde a la extracción de ADN a gran escala, a partir de 1 a 2 placas de colonias o protonema.

Se molió con mortero, en presencia de nitrógeno líquido, 1 a 3 gramos de material vegetal hasta obtener un polvo fino. Inmediatamente, se agregó el polvo a un Falcon de 50 mL conteniendo 15 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM de NaCl, 50 mM EDTA pH 8, 10 mM de β -mercaptoetanol), seguido por 30 segundos de agitación tipo vortex. Posteriormente, se agregó 1 mL de SDS 20%. Se incubó a 65°C por 15 minutos. Se agregó 5 mL de acetato de potasio 5 M seguido de una incubación a 0°C por 30 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 2500 g y se filtró el sobrenadante a través de un blutex a otro Falcon de 50 mL para luego agregarle 10 mL de isopropanol e incubarlo a -20°C por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó 25 minutos a 2500 g. Se resuspendió el pellet en 500 μ L de una solución que contenía 0.3 M de cloruro de sodio en presencia de 2 μ L de RNasa 10 μ g/mL. Se transfirió a un eppendorf y se extrajo el ADN empleando 1 volumen de fenol y dos volúmenes de cloroformo-isoamílico (24:1). Se precipitó el ADN con 0.8 volúmenes de isopropanol y se resuspendió en 200 μ L de agua milli Q.

El protocolo de extracción de ADN a baja escala, utilizado en la identificación de la línea *knockout* generada, emplea de 2 o 3 colonias y es similar al planteado anteriormente.

3.3.2 Cuantificación de ADN

Para una cuantificación precisa de ADN se empleó el equipo NanoDrop de Thermo Scientific, registrando la concentración obtenida en ng/ μ L, la relación de absorbancia 260nm-280nm y 260nm-230nm respectivamente. Para una estimación rápida de la concentración se comparó de la intensidad de banda del ADN problema con respecto al marcador de peso molecular, obtenidos mediante separación electroforética en un gel de agarosa, ya sea al 0.8, 1 o 2% respectivamente y visualizado mediante el empleo de GelRed (Biotium, Inc) o SYBER Safe (Life Technologies) según sea el caso.

3.4 Preparación y análisis de ARN

3.4.1 Extracción y cuantificación de ARN

Las soluciones de cloruro de litio, acetato de sodio y agua milli Q deben ser tratadas con DEPC al 0.1% ON y autoclavadas por 40 minutos para eliminar los restos de DEPC (Sambrook *et al*, 1989). Los corex empleados fueron horneados por 4 horas a 280 °C.

Se molió, empleando un mortero y en presencia de nitrógeno líquido, 2 gramos de tejido vegetal, protonema o gametóforo según corresponda, se transfirió a un Falcon estéril de 50 mL que contenía 2.5 mL de fenol y 5 mL de NTES (0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M de NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1% SDS). Se realizó una agitación tipo vortex por 3 minutos y se le agregó 2.5 mL de cloroformo-isoamílico seguido de 20 segundos de agitación tipo vortex. Se centrifugó a 2500 g por 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió a un tubo corex y, para un sobrenadante de de 6 mL se le agregó 600 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol 96%. Se incubó *overnight* a -20°C. A continuación, se centrifugó a 2500 g por 25 minutos a 4°C y el pellet obtenido se seco brevemente y se resuspendió en 0.75 μ L de agua milli Q tratada con DEPC. Se mantuvo en hielo, realizando frecuentemente una agitación tipo vortex y luego se transfirió a un eppendorf que contenía 0.75 μ L de cloruro de litio 4 M. Se incubó *overnight* en hielo y heladera. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 8000 g a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 300 μ L de agua tratada con DEPC y se le agregó 30 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 800 μ L de etanol 96%. Se incubó a -20°C por 20 minutos y se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos para obtener un pellet que fue resuspendido en 60 μ L de agua tratada con DEPC, alicuotado y almacenado a -80°C.

La integridad del ARN obtenido fue evaluada mediante el empleo de electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones no desnaturalizantes, logrando la visualización de los ARN ribosomales mediante el empleo de SYBER Safe (Life Technologies).

La cuantificación de ARN fue llevada a cabo mediante el equipo NanoDrop de Thermo Scientific, registrando la absorbancia de las muestras obtenidas a 230, 260 y 280 nm respectivamente, como forma de evaluar restos de fenol y proteínas.

3.4.2 Retrotranscripción y control de contaminación con ADN genómico

La retrotranscripción fue llevada a cabo empleando la enzima SuperScript III Reverse Transcriptase de Invitrogen previo a un tratamiento con DNAsa (Promega).

Un microgramo de ARN fue mezclado con una solución que contenía 1 μL de buffer 10x Promega RQ1 con 1.5 μL de DNAsa (1U/ μg de ARN) y agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen de 9.4 μL . Se incubó 1 hora 30 minutos a 37°C. La reacción enzimática fue detenida agregando 1.5 μL de Stop Solution y fue calentada por 10 minutos a 65°C. A los 10.9 μL resultantes de este tratamiento, se le agregó 0.5 μL de Random Primers (Promega) de concentración 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 μL de dNTP mix (10 μM). Esta mezcla se calentó 5 minutos a 65°C e inmediatamente se incubó en hielo por al menos 1 minuto. Se centrifugó el tubo y se agregó 4 μL de First Strand Buffer 5x, 1 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de RNAsa inhibitor 40 U/ μL (Fermentas) y 1 μL de SuperScript III RT. Se mezcló por pipeteo y se incubó en termociclador 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C y para inactivar la reacción, 15 minutos a 70°C.

Para el control del estado del ADN copia y posible contaminación con ADN genómico se empleó la amplificación de actina. Los cebadores utilizados fueron Actinafw y Actinarv, con una temperatura de annealing de 57°C y un tiempo de extensión 13 segundos para el producto más largo. De esta forma, si la muestra se encuentra contaminada se esperará observar 2 bandas, una perteneciente a la amplificación con ADN copia (107 pb) y otra debido a ADN genómico (404 pb).

Inicialmente, el control de la contaminación del ADN copia con ADN genómico en las extracciones de la línea silvestre se realizó la reacción de PCR que se muestra a continuación y emplea los cebadores H1-5' ForKpnI y H1-5' RevHindIIIv. La amplificación de un producto de 532 pares de bases indica presencia de ADN copia mientras que el producto de 778 pares de bases indica la presencia de ADN genómico, ya que el producto amplificado contiene el intrón del gen de *PpH1*. El mix de PCR contenía:

ADN copia	2 μL
dNTP (10mM).....	0.50 μL
Cebador forward (10 μM).....	1.50 μL
Cebador reverse (10 μM)	1.50 μL
Buffer 10x	2 μL
H ₂ O.....	12.3 μL
UTaq polimerasa (SBS)	0.2 μL
Volumen total = 20 μL	

El programa utilizado fue el siguiente:

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 55°C 1min, 72°C 30 seg), 72°C 5min.

3.5 Medios, Preparación y transformación de cepas bacterianas

3.5.1 Medio para cultivo de bacterias

El medio Luria-Bertani (LB) se utilizó en el cultivo de la cepa de *E. coli* DH5 α . Su composición es 1% Bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1% NaCl, se ajustó pH a 7.5. Para la preparación de LB sólido, se incluyó 1.5 g de agar. En el caso de LB low salt se redujo a 0.5% el agregado de cloruro de sodio.

3.5.2 Preparación de células DH5 α quimiocompetentes y electrocompetentes

Se cultivó la cepa de *E. coli* DH5 α en 3 mL de LB suplementado con 3 μ L de ampicilina de concentración 100 μ g/mL. Dicho precultivo se dejó crecer a 37°C *overnight* en agitación a 200 r.p.m. Al día siguiente, se inoculó una dilución 1/100 de la cepa en un matraz que contenía 250 mL de LB suplementado con ampicilina, respetando la misma relación mencionada anteriormente, y se dejó crecer a 30°C hasta que la densidad óptica registrada a 620 nm fue de 0.300 UA. Se centrifugó 5 minutos a 3800 g en frío. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 mL de una solución que contenía 0.1 M de CaCl₂ y se centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con la misma solución y mismo volumen y se incubó 1 hora a 4°C. Luego se centrifugó bajo las mismas condiciones y se resuspendió el pellet en 3 mL de CaCl₂ 0.1 M en 20% glicerol. Por último, se alicuotó en eppendorfs pre-enfriados y se almacenó a -80°C.

El protocolo para preparar células electrocompetentes DH5 α es idéntico al anterior destacando que se realizaron tres lavados consecutivos sin incubaciones previas: el primero implicó agua milliQ estéril y los dos siguientes glicerol al 15%. El último pellet se resuspendió en 1 mL de glicerol al 15%, se alicuotó y se almacenó a -80°C.

3.5.3 Protocolo de transformación de células electrocompetentes y quimiocompetentes

Las células competentes *E. coli* DH5 α fueron transformadas mediante shock térmico o electroporación según sea el caso, mientras que las células de *A. tumefaciens* sólo fueron transformadas mediante electroporación.

La transformación mediante shock térmico implicó la incubación del plásmido a trabajar con 100 μ L de células quimiocompetentes durante 1 minuto a 42 °C. Posteriormente, se agregó 0.9 mL de medio LB líquido, se incubó a 37 °C durante 30 a 45 minutos en agitación a 200 r.p.m y finalmente se sembró en placas LB suplementadas con antibiótico correspondiente según la construcción trabajada y se incubaron a 37°C *overnight*.

El protocolo de transformación mediante electroporación implicó el agregado de 100 ng de plásmido en un volumen máximo de 1 μ L, a 50 μ L de *E. coli*. Las condiciones de electroporación fueron: capacitancia 25 uF, resistencia 200 Ω y un voltaje de 2.5 KV. Luego de la electroporación, se agregó 400 μ L de LB frío, y se incubó por 2 a 3 horas a 30°C sin agitación. Posteriormente, el cultivo fue concentrado centrifugando 2 minutos a 2000 g, el pellet fue resuspendido en 100 μ L del mismo medio empleado para cultivar dichas células y finalmente plaqueado en LB suplementado con

antibióticos correspondientes. Para el cultivo de *A. tumefaciens* C58C₁ se trabajó con medio LB suplementado con espectinomicina (100 µg/mL), carbenicilina (100 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL).

Luego de electroporado, se cultivó en LB sólido 3 días a 30°C para obtener transformantes. Para lograr una buena efectividad de transformación, a partir de este cultivo, se replaqueó en LB sólido, se seleccionó una UFC y se la cultivó a 220 rpm en MGL (medio líquido modificado: 2.5 g/L extracto de levadura, 5.0 g/L triptona, 5.0 g/L NaCl, 5.0 g/L manitol, 1.16 g/L glutamato monosódico, 0.25 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 µg/L biotina, pH 7).

3.5.4 Protocolo de obtención de ADN plasmídico mediante miniprep

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron según Sambrook *et al* (1989) empleando el método de lisis alcalina.

3.6 Generación de una línea *knockout* para el gen *PpHI*

La generación del mutante se realizó mediante remplazo dirigido de alelos (Quatrano *et al*, 2007). Esta metodología implica una construcción génica que porta un cassette de selección compuesto por ADN lineal doble hebra, flanqueado por dos segmentos de la secuencia genómica que dirigen los eventos de recombinación homóloga. Como resultado, la secuencia endógena es suplantada por el cassette de selección, sin generar disrupciones adicionales en la secuencia (Cho *et al*, 2007).

3.6.1 Construcción plasmídica

La construcción necesaria para la generación del mutante fue realizada por la MSc. Cecilia Abreu durante su Tesis de Maestría. El vector pUBW302-KO contiene, corriente arriba del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, CaMV 35S, la región de homología del gen *PpHI* comprendida entre los cebadores H1-5´ For2kpn y H1-5´ RevHindIII_n. Por otro lado, corriente abajo del terminador 3´ de octopina sintasa (3´ ocs), la región del gen de *PpHI* comprendida entre los cebadores H1-3´ ForBamHI y H1-3´ RevXBaI. Estas dos regiones que comprenden una longitud de 755 pares de bases y 753 pares de bases respectivamente, serán las responsables de la recombinación homóloga en la generación del mutante *knockout*.

Se realizó un chequeo del plásmido a linealizar, previo a la transformación, que involucró ensayos de restricción con enzimas *HindIII* (Amersham) y *BamHI* (Gibco). Los mismos se llevaron a cabo incubando 0.15 µg del vector purificado, obtenido a partir de una extracción de ADN plasmídico de cultivo bacteriano (miniprep) con antibiótico de selección genética G418, con las enzimas antes mencionadas a 37°C por 2 horas. Posteriormente, se secuenció el mismo a nivel de la región de homología 5´ y 3´.

Previo a la transformación, 40 µg el plásmido pUBW302-KO obtenido, fue linealizado mediante un único corte a nivel del extremo 5´ de la secuencia empleando la enzima de restricción *KpnI* (Gibco). Luego de su incubación por 2 horas a 37°C, se extrajo con un volumen de cloroformo-

isoamílico (24:1), se precipitó el sobrenadante con 1/10 volumen de acetato de potasio 3 M y 0.8 volumen de isopropanol y se resuspendió en un volumen máximo de 30 μ L con agua milli Q. El nivel de digestión junto con una estimación de la concentración del mismo, fue realizado mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%.

3.6.2 Transformación de *Physcomitrella patens* a partir de protoplastos

La transformación de protoplastos fue realizada por shock térmico en presencia de polietilenglicol y 20 a 30 μ g de la construcción plasmídica linealizada bajo condiciones de estricta esterilidad. La obtención de protoplastos fue realizada según Cove (2009). Se partió de placas de protonema que tenían entre 4 a 5 pasajes, como fue descrito anteriormente. El material vegetal fue digerido en oscuridad, *overnight* en cuarto de cultivo *in vitro*, en una placa de Petri que contenía driselasa al 0.2% en manitol al 8% (m/v). Una hora antes de comenzar la transformación, la placa fue agitada suavemente para colaborar con la enzima en la digestión de la pared celular. El nivel de digestión fue monitoreado empleando un microscopio óptico.

Posteriormente, la suspensión fue filtrada con un filtro de 100 μ m. Los protoplastos fueron centrifugados por 7 minutos a 80 g sin frenado. Se retiró el sobrenadante y se agregó por las paredes y de forma muy lenta, 10 mL de una solución de manitol al 8% (m/v). La elevada presión osmótica del medio en estas condiciones evita que las células estallen. Se centrifugó la muestra nuevamente repitiendo este procedimiento una vez más empleando 10 mL de una solución de CaPw. Por último, se resuspendieron los protoplastos obtenidos en un mismo volumen de CaPw y se contabilizaron éstos mediante una cámara de Neubauer. La cantidad óptima de trabajo es de 1.6 millones de protoplastos por mililitro. Luego de contabilizados, se centrifugaron y se resuspendieron en 300 μ L de 3M, se agregaron entre 20 y 30 μ g del ADN plasmídico linealizado en un volumen no mayor a 30 μ L de acuerdo a Schaefer *et al* (1991) y 250 μ L de PEGT. Se realizó un shock térmico a 45°C por 5 minutos y se dejaron reposar los protoplastos por 5 minutos a temperatura ambiente, evitando movimientos bruscos. Posteriormente, se agregaron 1, 2, 3 y 4 mL de la CaPw por las paredes del Falcon en etapas sucesivas, dejando reposar la suspensión por 3 minutos entre agregados. Los protoplastos fueron centrifugados y el pellet obtenido fue resuspendido en 300 μ L de PRML para luego agregarle 2.5 mL de PRMT, fundido previamente a 45°C, dispersando esta solución en placas de Petri que contenían PRMB cubiertas de celofán. Estas placas fueron incubadas durante 7 días bajo condiciones estándar de cultivo, para luego transferirlas mediante pasajes de celofanes a medio suplementado con antibiótico geneticina G418 (40 mg/L) por 7 días más, bajo las mismas condiciones. Este proceso que involucra períodos de no selección-selección, fue repetido 2 veces más de forma consecutiva para seleccionar sólo aquellos transformantes en los que el plásmido fue integrado al ADN genómico de *P. patens* (Schaefer, 2002).

Las colonias obtenidas luego de estos tratamientos fueron numeradas y analizadas mediante PCR para confirmación del evento de recombinación homóloga, mediante Southern blot para el chequeo del número de eventos de recombinación y mediante un ensayo de citometría de flujo para evaluar ploidía del mutante generado.

CaPwD-manitol..... 80 g.L⁻¹CaCl₂.2H₂O..... 7.35 g.L⁻¹H₂O destilada csp 1L

Esterilizada por autoclavado.

Solución de Driselasa 0,2%

Se disolvió la cantidad adecuada de driselasa en solución de D-manitol 8%. Se mezcló suavemente y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó a 2500g por 5 minutos y se removió el sobrenadante. Se esterilizó por filtrado.

Solución 3MD-manitol..... 910 mg.L⁻¹MgCl₂ 1M 150 µL

MES 1% pH 5.6..... 1 mL

H₂O destilada 8.85 mL

Esterilizada por filtrado.

Solución PEGT

2g de PEG 8000 (Sigma) autoclavado fueron fundidos a 37°C y se disolvieron en 5mL de una solución estéril, por filtración, que contiene 9 mL de D-manitol 8% (m/v), 1 mL de Ca(NO₃)₂ 1M y 100 µL de TRIS buffer 1M pH8.0.

Medio PRML (*liquid protoplast regeneration medium*)

Medio de cultivo estándar líquido con CaCl₂ (10mM) y manitol 8% (m/v).

Medio PRMT (*protoplast regeneration medium – top layer*)

Medio de cultivo estándar sólido con CaCl₂ (10mM), manitol 8% (m/v) y Plant agar (Duchefa) 0,6%.

Medio PRMB (*protoplast regeneration medium – bottom layer*)

Medio de cultivo estándar sólido con CaCl₂ (10mM), manitol 6% (m/v) y Plant agar (Duchefa) 0,8%.

3.6.3 Rastreo de mutantes *knockout* para el gen *PpH1* por PCR

Para identificar aquellos mutantes que recombinaron eficazmente a nivel del gen de *PpH1*, se planteó una PCR a tiempo final. Para ello se empleó un cebador del par que estuviera incluido en el cassette de selección (antisense35S, senseptII) mientras que el otro debía estar por fuera de la región de recombinación (BQ82ko5fw, BQ82ko3rv). La amplificación a partir del juego de cebadores BQ82ko5fw/antisense35S indica la integración del cassette a nivel de la región de homología 5' mientras que el producto del segundo juego, senseptII/BQ82ko3rv, indicaría la integración del cassette a nivel de la región de homología 3' (Frank *et al*, 2005).

Se extrajo ADN a partir de 2 o 3 colonias y se procedió a realizar dichas PCR a tiempo final, empleando la siguiente reacción:

ADN (aprox 40 ng/ μ L)	2 μ L
dNTP (10mM).....	0.50 μ L
Cebador forward (10 μ M).....	1.50 μ L
Cebador reverse (10 μ M)	1.50 μ L
Buffer 10x	2 μ L
H ₂ O.....	12.3 μ L
UTaq polimerasa (SBS)	0.2 μ L
Volumen total = 20 μ L	

El programa de ciclado fue:

➔ Amplificación de la región de integración a nivel 5´

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 54°C 1min, 72°C 30seg), 72°C 5min.

➔ Amplificación de la región de integración a nivel 3´

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 56°C 1min, 72°C 30seg), 72°C 5min.

Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% empleando SYBER Safe (Life Technologies).

3.6.4 Análisis mediante Southern blot de la línea mutante

El Southern blot se realizó según el protocolo establecido según el reporte de Maniatis (Sambrook *et al*, 1989).

El ADN genómico fue extraído de protonema según el protocolo ya descrito. Se trabajó con 12 μ g de ADN vegetal el cual fue digerido con *EcoRI* (Bioron). Se incubó a 37°C por 2 horas con 30 U de enzima, repitiendo este procedimiento 2 veces más. Se testeó el nivel de digestión a partir de una alícuota y posteriormente se precipitó el ADN con 1/10 volumen de acetato de potasio 5 M y 0.8 volúmenes de isopropanol, resuspendiendo el pellet en un volumen no mayor a 25 μ L.

El ADN digerido fue corrido en un gel de agarosa al 0.8% y transferido a una membrana de nylon (Tropix Tropilon-Plus, Applied Biosystems) y fijando el ADN mediante UV.

El kit empleado para la generación de la sonda fue DigDNA labeling and detection kit de Roche. El mismo utiliza desoxiuridinas marcadas con digoxigenina y anticuerpos anti-digoxigenina para su revelado. El producto de PCR empleado para la generación de la sonda fue el amplificado por los cebadores SensenptII y H1-3´RevXBaI. El mismo genera una sonda de 1096 pares de bases e hibrida parcialmente en la región de recombinación a nivel 3´, comprende parte de la secuencia de nptII y la región de homología 3´ a nivel del gen de *PpHI*. El mix para la reacción de PCR fue idéntico al utilizado en la sección anterior, empleando como molde 2 μ L del plásmido *knockout* (0.2 μ g/mL) y un programa de termociclado que se indica en la siguiente hoja.

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 58°C 1min, 72°C 30seg), 72°C 5min

Posteriormente, el producto de PCR fue purificado empleando el kit Gene Jet Extraction kit de Thermo Scientific y cuantificado según indicaciones del kit.

La membrana fue prehibridada a 55°C en solución de prehibridación (5x SSC, leche en polvo descremada 0.5% (m/v), N-laurilsarcosina 0.1 % (m/v), SDS 0.02% (m/v)) por 2 horas. Luego, la hibridación se llevó a cabo a 55°C *overnight* empleando una concentración de sonda cercana a 25 ng/mL. Posteriormente, se realizaron dos lavados a baja astringencia, cada uno de 5 minutos en una solución que contenía 2x SSC y 0,1% SDS, en agitación y a temperatura ambiente, seguidos por otros dos lavados de 15 minutos en condiciones de alta astringencia (0.5x SSC y 0.1% SDS en agitación y a 55°C).

El revelado se realizó según indicaciones del kit.

20x SSC (Buffer salino citrato de sodio) contiene 3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio, pH 7.

3.6.5 Determinación de la ploidía relativa por citometría de flujo

Este experimento se llevó a cabo para determinar el nivel de ploidía de los mutantes obtenidos en comparación con la cepa *P. patens* de tipo silvestre. La transformación de protoplastos implica el manejo de células sin pared celular los cuales pueden fusionarse (Schween *et al*, 2005) y generar una línea cuyo nivel de ploidía sea diferente a la línea silvestre.

El protocolo a seguir fue adaptado a partir del publicado en la base de datos de Physcobase por Yuji Hiwatáis (<http://moss.nibb.ac.jp/>), considerando, a su vez, las sugerencias del MSc. Federico Santiñaque, técnico del Servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Se tomó una colonia de la línea silvestre y de los mutantes a estudiar y se los trituró con bisturí en 0.5 mL de buffer de extracción Woody Plant Lysis buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 4 mM MgCl₂.6H₂O, 2 mM EDTA, 86 mM NaCl, 1% Tritón, 10 mM K₂S₂O₅, 1% polivinilpirrolidona 10). La suspensión obtenida fue filtrada empleando un filtro de 50 µm y se le agregó 50 µL de una solución de RNAsa (1 µg/µL) para degradar el ARN presente, ya que el ARN bicatenario puede retener al yoduro de propidio y aumentar el ruido de fondo. A su vez, se agregaron a la mezcla 50 µL de yoduro de propidio (1 mg/mL) dejando reposar la preparación por 10 minutos a temperatura ambiente.

Esta suspensión fue analizada empleando un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson, USA) del Servicio de citometría de flujo del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Este citómetro empleó un láser Innova 300 de emisión a 488nm (100mW de potencia durante el análisis). La fluorescencia emitida por los núcleos teñidos con yoduro de propidio se detectó en el canal FL2 con filtro de banda 575/26 y una fotomultiplicadora para su amplificación. Para la adquisición de los datos y su análisis se empleó el programa Cell Quest de Becton Dickinson.

De esta forma, se obtuvo información del alto (H), área (A) y ancho (W) de cada pulso y el conteo de eventos en función de la relación Intensidad yoduro de propidio-Área analizada, lo que permite definir si existen diferencias o no con respecto al control silvestre.

3.7 Análisis de la línea *knockout* en condiciones de crecimiento estándar

3.7.1 Estudio de la repetición nucleosomal

El estudio de la repetición nucleosomal fue llevado a cabo según lo descrito por Abreu (2009) y lo reportado por Ramón (2000) en su tesis de doctorado.

Tanto para la línea silvestre como para el mutante, el material de trabajo fue protonema, obtenido tras uno, tres o cinco pasajes. Luego de molido con nitrógeno líquido, el material fue disuelto en buffer de digestión (250 mM sacarosa, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.05 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 15 mM Tris-HCl pH 7.5) hasta obtener una relación de 100 mg/mL o 400 mg de tejido vegetal por mL de buffer. Posteriormente, se incubó a 37°C con una concentración dada de Nucleasa de micrococo (MNAsa) de Thermo Scientific, la cual varió según cada caso (50, 70, 90, 110, 200, 400 U/g de tejido vegetal), por un tiempo de 5 o 15 minutos. Luego, se detuvo la reacción empleando una concentración final en solución de 40 mM de EDTA y 2% de SDS. El ADN fue extraído con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo-isoamílico, precipitado con 1/10 volumen de acetato de potasio 5 M y 0.8 volumen de isopropanol. El pellet fue resuspendido en 20 µL de agua e incubado por 20 minutos a 37°C con 2 µL de RNAsa (10 mg/mL). Luego, la muestra fue corrida en un gel de agarosa al 2%. Como control de digestión, se trabajó con una muestra de *Aspergillus nidulans*, en las mismas condiciones que el tratamiento de la muestra de origen vegetal.

Se realizaron varios experimentos variando la relación material vegetal-volumen de buffer, trabajando con mayores rangos de concentración de enzima en comparación con los utilizados por Abreu, aumentando el tiempo de digestión e incluso trabajando con protoplastos obtenidos por digestión con driselasa.

3.7.2 Western blot de proteínas totales

Se realizaron extractos de proteínas totales de las muestras silvestre y mutante 23 (línea *knockout*) para los estadios protonema y gametóforo, macerando 100 mg de tejido vegetal en mortero con 500 µL de buffer de extracción (50 mM TRIS pH 7.2, 250 mM sacarosa, 5 mM EDTA pH 8, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF). Luego se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 15000 g. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford MM., 1976). El buen estado de las mismas se corroboró mediante SDS-PAGE.

Las muestras de proteínas totales se sometieron a corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida al 12% y luego se realizó la electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific). Las mismas se bloquearon con 5% de leche descremada en polvo en buffer Tris salino con Tween 20 y se incubaron por tres horas con una dilución 1/50 de anticuerpo policlonal de conejo anti-histona H1 humana (Histone H1 (FL-219), Santa Cruz Biotechnology). Posterior a los lavados, las membranas se incubaron con antisuero anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) por una hora. Se reveló con quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). El “stripping” de la membrana se realizó incubando a 55°C en una solución que contenía 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoetanol. Posterior al “stripping”, la membrana fue teñida con rojo Ponceau y la banda correspondiente a la sub-unidad mayor de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) fue utilizada como control de carga.

3.7.3 Estudios fenotípicos y de velocidad de crecimiento

Para estos estudios, se emplearon 4 placas de Petri de medio estándar de cultivo, en cada una de las cuales se cultivaron sobre celofán 8 colonias silvestres y 8 mutantes.

El estudio fenotípico consistió en evaluar macroscópicamente de forma cualitativa, el estado general de las colonias.

Por otro lado, se evaluó el área horizontal de crecimiento de cada línea silvestre o mutante. Se registraron fotos de cada placa regularmente hasta el día 87, considerando el día 1 luego de pasados 21 días de crecido el protonema sobre el celofán. Se destaca que se realizaban pasajes a medios de cultivo estándar nuevos para evitar que las colonias entraran en senescencia por falta de nutrientes.

Las fotos fueron analizadas registrando el número de píxeles del área horizontal de crecimiento de cada grupo de 8 colonias, utilizando el programa PhotoShop CS5 y estableciendo, para comparar los resultados e independizarlos de la altura de la cámara de fotos, la relación Píxeles colonia/Píxeles placa.

3.8 Análisis de la línea *knockout* bajo condiciones de estrés abiótico

3.8.1 Tratamientos de la línea silvestre y mutante en condiciones de estrés

Se destaca que para los tratamientos se empleó 0.25 cm² de protonema silvestre o perteneciente a la línea *knockout*. Cada placa de Petri fue dividida a la mitad y se colocó, en medio de cultivo estándar sobre celofán, 8 protonemas pertenecientes a la línea silvestre y 8 pertenecientes a la línea *knockout* y se los dejó crecer por 21 días. Para las muestras expuestas a estrés osmótico y osmótico-tóxico, le siguió un tratamiento que implicó el pasaje a medio suplementado mientras que aquellas que fueron sometidas a estrés térmico se realizó un pasaje a medio estándar. El tiempo que se sometió al material vegetal a estrés fue variable según el estrés a estudiar. Luego del tratamiento de estrés, las colonias fueron pasadas a medio de cultivo estándar para evaluar su recuperación. Para cada tratamiento se extrajeron muestras durante el período de recuperación (días variables, ver Resultados) para analizar su contenido de clorofila y grado de muerte celular. A su vez, se extrajo ARN para evaluar, mediante Real Time, el nivel de expresión de los genes *PpH1* (*Pp1s53_134V6*), *Pp1s33* (*Pp1s33_295V6*) y *Pp1s72* (*Pp1s72_277V6*), actina (*Pp1s381_18V6*), *PpABR170* (*Pp1s51_28V6*), *PpLys* (*Pp1s4_282V6*) y *PpHSP16.4* (*Pp1s27_331V6*).

Para el estudio de estrés osmótico, se empleó medio de cultivo suplementado con manitol a dos concentraciones distintas: 0.4 M y 0.9 M. Para realizar el estudio fenotípico se analizó la recuperación de las colonias en medio suplementado con 0.9 M de manitol por 15 días de estrés seguido de un pasaje a medio de cultivo estándar, mientras que para el estudio de expresión se aplicaron sólo 3 días de estrés.

En el caso de estrés osmótico-tóxico, el reactivo utilizado fue cloruro de sodio a dos concentraciones finales distintas: 0.25 M y 0.5 M. Ésta última concentración fue la utilizada para exponer a 11 días de estrés a las colonias con el fin de evaluar su recuperación en condiciones estándar mientras que se redujo a 3 días de estrés en 0.5 M de cloruro de sodio para la extracción de ARN.

Para el estudio de estrés térmico se empleó un equipo en el cual se seteó un fotoperíodo de 16 horas de luz con una intensidad lumínica de 0.4 LV seguido de 8 horas de oscuridad, temperatura controlada a 37°C y humedad 65 %. Este hecho permite asegurar que los resultados obtenidos son debidos puramente al estrés termico y no a la contribución del estrés hídrico provocado por una posible deshidratación, ya que la humedad se mantuvo constante durante el experimento. El musgo se expuso a estas condiciones por 3 y 6 días, seguido de un pasaje a medio de cultivo estándar para evaluar cambios fenotípicos. Para analizar cambios fenotípicos, contenido de clorofila y muerte celular durante la recuperación, así como para extraer ARN y evaluar el nivel de expresión de las diferentes líneas, el tejido vegetal se sometió a 3 días de estrés. Para el estudio de expresión del gen *PpH1* en la línea silvestre en condiciones de estrés térmico a 37°C por 3 días, se empleó una estufa en oscuridad por lo que el medio de cultivo debió ser suplementado con 0.5% de glucosa.

3.8.2 Análisis fenotípicos cuantitativos

3.8.2.1 Determinación de muerte celular empleando el colorante vital Evans Blue

El análisis de muerte celular se realizó según Ponce de León *et al*, 2007. El ensayo fue efectuado por cuadruplicado tanto para las colonias silvestres como para los mutantes sometidos a diferentes condiciones de estrés. Se colocaron 8 colonias de cada condición (silvestres o mutantes, control o sometidas a estrés) en un Falcon de 15 mL y se le agregó 5 mL del colorante vital Evans Blue 0,05 % (m/v). Se dejaron reposar por 2 horas a temperatura ambiente agitando suavemente cada 20 minutos. Se enjuagaron 4 veces con agua destilada. Posteriormente, se realizaron 3 enjuagues de 15 minutos en agitación con 10 mL de agua. Las colonias fueron trasvasadas de a pares a tubos que contenían 6 mL de solución de desteñido (1% SDS con 50% metanol) y se incubaron por 45 minutos a 65°C en agitación. Se realizó la medida de absorbancia a 600 nm y se colocó el material vegetal analizado a 80°C por 48 horas para determinar el peso seco de las mismas y se calculó la relación entre Absorbancia y Peso seco en gramos.

3.8.2.2 Determinación del contenido de clorofila

El siguiente análisis fue llevado a cabo según Ruibal *et al* (2013) el cual presenta modificaciones de Arnon (1949).

El ensayo se realizó por cuadruplicado, determinando el peso seco en miligramos de 8 colonias silvestres o mutantes, sometidas a estrés y tratadas de a pares. Se maceraron con 5 mL de una solución acuosa de acetona al 80% para luego ser filtradas a través de blutex. Se determinó la absorbancia de las muestras en cubeta de vidrio a 663 nm y 645 nm antes de los 20 minutos de extraído. Posteriormente, se determinó la cantidad de clorofila total como mg clorofila/g peso fresco. Los cálculos se muestran a continuación.

Si se le denomina a la Clorofila Ia, ChIa, y a la clorofila Ib, ChIb, entonces dichas concentraciones, establecidas como mg de clorofila por g de peso fresco de tejido vegetal serán:

$$\text{ChIa} = [12,7 \times \text{Abs}^{663} - 2,6 \times \text{Abs}^{645}] \times 5 \text{ mL de acetona /mg de tejido fresco}$$

$$\text{ChIb} = [22,9 \times \text{Abs}^{645} - 4,68 \times \text{Abs}^{663}] \times 5 \text{ mL de acetona /mg de tejido fresco}$$

siendo la clorofila total, en mg clorofila/g peso fresco, la suma de ChIa y ChIb.

3.9 Análisis de otras posibles histonas tipo H1 de *P. patens*

3.9.1 Estudio del nivel de expresión de posibles histonas mediante PCR en tiempo final

A partir de las secuencias, se diseñaron cebadores para las posibles histonas Pp1s3, Pp1s27, Pp1s33 y Pp1s72. Trabajando con ADN copia obtenido en condiciones estándar de crecimiento, se realizaron PCRs a punto final para evaluar el nivel de transcripción de las mismas, seleccionando para estudios posteriores, aquellas que presenten mayor nivel de expresión.

El mix de PCR empleando la polimerasa Utaq (SBS), los cebadores utilizados, su temperatura de annealing, tiempo de extensión y programa de termociclado se detallan a continuación.

ADN (aprox 40 ng/μL)	2 μL
dNTP (10mM).....	0.50 μL
Cebador forward (10 μM).....	1.50 μL
Cebador reverse (10 μM)	1.50 μL
Buffer 10x	2 μL
H2O.....	12.3 μL
UTaq polimerasa (SBS)	0.2 μL
Volumen total = 20 μL	

Tabla 3.1: Cebadores utilizados en el estudio de otras posibles histonas tipo H1. Se incluye la temperatura de annealing, tiempo de extensión y producto de amplificación esperado.

Secuencia a amplificar	Cebador Forward Cebador reverse	Temp. Annealing en °C (Tm)	Tiempo extensión en seg (Text)	Producto de amplificación sobre ADN genómico o copia en pares de bases
Pp1s3	5´ GAAAACTGGAAGATGAAGTCTG 3´ 5´ CGCTATGGGATCATTTC 3´	54	4	124
Pp1s27	5´ GACAGAACTGCGAAGAAGG 3´ 5´ GTCTTCGACTTCGCAACC 3´	55	5	180
Pp1s33	5´ GCAGCGGGAGCTACTAAG 3´ 5´ GCTGCCTTAACCTTCACAC 3´	55	5	173
Pp1s72	5´ GAAGGCTGTAGCGGTTTC 3´ 5´ GTGACCTTGGACGATTC 3´	53	4	129

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, Tm 1min, 72°C Text), 72°C 5min.

3.9.2 Localización subcelular de otras posibles histonas de *P. patens*: *Pp1s33* y *Pp1s72*

3.9.2.1 Construcciones plasmídicas para la expresión de los genes a analizar fusionados a la proteína verde fluorescente

Los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* se clonaron en el vector pK7FWG2.0, el cual es un vector de expresión que permite analizar la localización subcelular de las proteínas de interés, ya que permite la fusión entre una secuencia dada y la proteína verde fluorescente (GFP) (Karimi *et al*, 2002). El sistema empleado fue kit comercial de Invitrogen, Gateway Cloning Technology.

Resumidamente, la estrategia experimental involucró la obtención de ARN de colonias en cultivo estándar y la generación de ADN copia para las secuencias *Pp1s33* y *Pp1s72*. Posteriormente, se realizó la reacción de ligación BP para obtener el vector pDONR/ZEO y la reacción LR entre este producto y el vector destino pK7FWG2.0. Este procedimiento se detallará en Resultados.

La generación del producto attB para las secuencias *Pp1s33* y *Pp1s72* se llevó a cabo empleando ADNc como molde y los cebadores forward y reverse que se muestran a continuación, para la amplificación de *Pp1s33* o *Pp1s72* respectivamente.

```
Pp33-DONR fw 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTGACGTCGTCGAGT 3'
Pp33-DONR rv 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCTTGACCTTCTTCGCC 3'
Pp72-DONR fw 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGCTGCCGCCGATT 3'
Pp72-DONR rv 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCTTTGCTTTCTTAGCAGG 3'
```

En ambos casos, la mezcla de reacción de PCR incluyó:

ADN (aprox 40 ng/μL)	2 μL
dNTP (10mM).....	0.75 μL
Cebador forward (10 μM).....	0.75 μL
Cebador reverse (10 μM)	0.75 μL
Buffer 5x	5 μL
H2O.....	13.25 μL
ADN polimerasa KAPA HiFi (KAPA Biosystems)	0.5 μL
Volumen total = 25 μL	

El programa de termociclado empleado fue el siguiente:

95°C 3min, 35x(98°C 20seg, 65°C 15 seg, 72°C 2min), 72°C 5min

Posteriormente, se chequeó el producto de reacción en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificó la banda de interés con el kit Isolate DNA Kits de Bioline para luego realizar la reacción BP empleando el kit de Invitrogen Gateway pDONR vectors. A partir de este producto, se

transformaron células DH5 α electrocompetentes y su cultivo se realizó en medio LB Low Salt suplementado con zeocina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El análisis de las minipreps generadas a partir de colonias aisladas se realizó por PCR. Se consideró que la correcta inserción de la secuencia luego de la recombinación BP a partir de los cebadores Pp1s33fw o Pp1s72fw y M13rv, generarían amplicones de 368 pares de bases y 351 pares de bases respectivamente. Para ello se empleó la enzima UTAq de SBS

Plásmido (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2 μL
dNTP (10mM).....	0.50 μL
Cebador forward (10 μM).....	1.50 μL
Cebador reverse (10 μM)	1.50 μL
Buffer 10x	2 μL
H ₂ O.....	12.3 μL
UTaq polimerasa (SBS)	0.2 μL
Volumen total = 20 μL	

Se realizó el siguiente ciclado:

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 54°C 1min, 72°C 15seg), 72°C 5min.

Una vez corroborada la correcta orientación, se procedió a purificar el plásmido analizado con el kit Plasmid mini kit de Bioline y secuenciar el producto de la reacción BP obtenido con los cebadores M13fw y M13rv.

A continuación, se realizó la reacción de recombinación LR entre los productos de BP y el vector pK7FWG2.0. El producto de recombinación obtenido fue utilizado para transformar células DH5 α electrocompetentes con un posterior cultivo en LB suplementado con espectinomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se seleccionaron colonias para la realización de minipreps. El control de la integración de las secuencias de *Pp1s33* y *Pp1s72* a nivel del plásmido pK7FWG2.0 fue realizado por PCR considerando los cebadores Pp33-DONRfw y Pp72-DONRfw y el cebador GFPnseq, reverse, cuya secuencia se muestra a continuación y se encuentra en la región Egfp del vector

GFPnseq 5' GCCGGTGGTGCAGATGAA 3'

Empleando estos cebadores se espera un producto de amplificación de 1040 pares de bases para el cebador Pp33-DONRfw y 1000 pares de bases para Pp72-DONRfw. La mezcla de PCR fue idéntica a la anterior mientras que el programa se detalla a continuación

94°C 2min 30seg, 35x(94°C 45seg, 58°C 1min, 72°C 35seg), 72°C 5min.

3.9.2.2 Infiltración de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SRI) crecidas en tierra: transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Se inoculó una colonia aislada a partir de estrías frescas de *A. tumefaciens* que contenían el vector pK7FWG2.0 con las construcciones *Pp1s33* y *Pp1s72*, en 3 mL de medio MGL suplementado

con espectinomicina (100 µg/mL), carbenicilina (100 µg/mL) y rifampicina (100 µg/mL), y se dejó crecer en agitación *overnight* a 28°C y 220 r.p.m. Posteriormente, se centrifugó 1 mL del precultivo a 2200 g por 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet en 1 mL de buffer de infiltración (50 mM MES pH 5.6, 2 mM Na₃PO₄, 0.5 % m/v Glucosa, 100 µM acetosiringona). Este procedimiento se realizó 1 vez más para luego resuspender el pellet hasta alcanzar una densidad óptica, a 600 nm, de 0.1 UA (Raffaele *et al*, 2009).

La planta de tabaco crecida en tierra, fue colocada cerca de una lámpara y sus hojas humedecidas 2 a 3 horas antes de ser inoculada con la suspensión. Posteriormente, con la punta de un tip de micropipeta de 200 µL, se realizaron pequeños agujeros en envés de la hoja para luego, empleando una jeringa sin aguja, infiltrar la hoja bajo presión. Empleando un marcador negro, se identificó la zona de la hoja que fue eficazmente infiltrada para luego, pasadas 24 horas, infiltrar de la misma forma con una solución que contenía 0.9 µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 2 horas antes de su visualización al microscopio confocal (Kim *et al*, 2008). Las hojas infiltradas con DAPI fueron protegidas de la luz empleando papel aluminio.

3.10 Estudios de expresión mediante Real Time

Para los estudios de Real Time se empleó el equipo Rotor-Gene 6000 de Corbett Research, el software del mismo versión 1.7 y el kit SensiMix dt SYBER Green de Quantace. El mix de trabajo fue reducido a 10 µL y su composición fue la siguiente:

ADN molde	2 µL
50x SYBERGreen (2x)	0.20 µL
Cebador forward (10 µM).....	0.20 µL
Cebador reverse (10 µM)	0.20 µL
SensiMix dT 2x	5 µL
H ₂ O.....	2.4 µL
Volumen total = 10 µL	

Programa de ciclado:

95°C 10min, 40x(95°C 15seg, Tm°C 30seg, 72°C Text seg, 72°C 0seg Acquire)

destacando que Tm hace referencia a la temperatura de annealing, Text al tiempo de extensión empleado para cada par de cebadores mientras que luego de la extensión, se realiza la medida de fluorescencia por parte del equipo indicada aquí como Acquire. Para todos los análisis se consideraron aplicó los blancos correspondientes y además las intensidades de fluorescencia fueron corregidas mediante Slope correction. Para todos los casos de empleó un un Threshold de 0.052.

Los análisis por Real time implicaron, inicialmente, la determinación de la eficiencia de los pares de cebadores forward y reverse de BQ82I2, Pp1s33, Pp1s72, PpABR170, PpLys, PpHSP16.4 y Actinafw/Actinarv. Para ello, se realizaron diluciones al cuarto a partir de 50 ng/ µL ADN genómico perteneciente a la línea silvestre hasta alcanzar una dilución 1/4096 para luego plantear un análisis por triplicado de cada una de las diluciones. El software determina la eficiencia en base a la

pendiente del gráfico Ct versus Concentración a través de la siguiente ecuación, junto con la correlación lineal de los datos según lo establecido por Pfaffl *et al*, 2004

$$[10 \exp (-1/\text{pendiente})] - 1$$

destacando que si se trabaja con dos muestras, en donde la concentración de una de ellas es cuatro veces mayor a la otra, entonces el Ct de la última será el Ct + 1 de la muestra más concentrada.

A su vez se analizaron las curvas obtenidas a partir de los ADN copia de dilución 1/8 para los distintos tratamientos o para el caso de controles. Este estudio implicó un análisis de réplica biológica por triplicado para todos los tratamientos o controles salvo para el estudio de estrés térmico, en el cual se llevó a cabo por duplicado biológico. Los cebadores Actinafw y Actinarv fueron empleados para evaluar la contaminación del ADN copia con ADN genómico, al igual que en las PCR a tiempo final.

Tabla 3.2: Se muestran los cebadores utilizados, la temperatura de annealing, tiempo de extensión y producto esperado para la amplificación de las distintas secuencias a ser analizadas mediante Real Time. Para el caso de Actina, se muestran dos tiempos de extensión y productos de amplificación si se considera como molde ADN copia o ADN genómico.				
Secuencia a amplificar	Cebador Forward Cebador reverse	Temp. annealing (Tm) en °C	Tiempo extensión (Text) en seg	Producto de amplificación en pares de bases
Actina (<i>Pp1s381_18V6</i>)	5´ GGAGAAGGTGAGGATGTTTCAG 3´ 5´ ACGATGCTGGGAAACACA 3´	55	3 / 7	107 / 404
Pp1s33	5´ GCAGCGGGAGCTACTAAG 3´ 5´ GCTGCCTTAACCTTCACAC 3´	55	4	173
Pp1s72	5´ GAAGGCTGTAGCGGTTTC 3´ 5´ GTGACCTTGGACGATTTTC 3´	53	4	129
BQ82I2	5´ TCAAGCCAAACCCTTC 3´ 5´ GCTTTCTTTGCGGGTGAC 3´	59	4	265
PpLys	5´ ACGAAGTCTGTTTCCAAGAGC 3´ 5´ CTTCTGGGTCTCCGCAGTA 3´	58	2	99
PpABR170	5´ CGAACTCTCTGACGTTTGTG 3´ 5´ CCGCAACTACTCTCTCAATG 3´	57	2	102
PpHSP16.4	5´ GCCGACGTGAAGGTACAAC 3´ 5´ AACTTTGGGATCTGGCTCCT 3´	58	2	84

En todos los casos se analizaron los Cts para las distintas muestras y sus curvas de melting respectivas, considerando que el duplicado técnico para las muestras problemas analizadas o el triplicado técnico para la determinación de la eficiencia de los cebadores idealmente deben poseer una desviación estándar menor a 0.25 pero a pesar de ello, para el análisis de los datos se considerará

una diferencia de 0.5 entre los valores de Ct hallados. Estas réplicas técnicas aseguran un buen control de calidad en la precisión de los datos obtenidos (D'haene *et al*, 2010).

El modelo empleado para la cuantificación relativa de los ADN copia en este trabajo considera las diferentes eficiencias de amplificación de los pares de cebadores empleados para la PCR. El gen de referencia utilizado en este trabajo fue el gen de actina (*Pp1s381_18V6*), por lo que el cálculo del cociente de expresión relativa (R) entre el control y la muestra será

$$\frac{(\text{Eff}_{\text{gen estudio}}) \exp [\text{Ct}_{\text{gen estudio}}^{\text{Control}} - \text{Ct}_{\text{gen estudio}}^{\text{Muestra}}]}{(\text{Eff}_{\text{actina}}) \exp [\text{Ct}_{\text{actina control}} - \text{Ct}_{\text{actina muestra}}]}$$

en donde Eff representa la eficiencia del par de cebadores empleados en la PCR del gen de estudio y actina respectivamente (Pfaffl M. W., 2001), el control implica el análisis del ADN copia obtenido a partir de la línea silvestre, bajo condición estándar de cultivo o asociados al estadio protonema en la línea silvestre, mientras que Muestra representa al ADN copia obtenido de la línea mutante, los distintos tratamientos de estrés o al estadio gametóforo de la línea silvestre (detallado en Resultados).

El gen de actina (*Pp1s381_18V6*) se empleó para normalizar los cálculos (Scheffe *et al*, 2006) pero el mismo no fue validado. Se asumió que su expresión no varía entre estados de desarrollo ni durante los distintos tipos de estrés pero se destaca que para estudios de PCR en tiempo real se sugiere el empleo de 3 o más genes de referencia validados (Derveaux *et al*, 2010; Bustin SA., 2010).

3.11 Cebadores utilizados

Actinafw	5´ GGAGAAGGTGAGGATGTTTCAG 3´
Actinarv	5´ ACGATGCTGGGAAACACA 3´
ANTISENSE35S	5´ CTTTCTCTGTGTTCTTTGATGCAGTTAG 3´
BQ82K05fw	5´ GCGCTCAAAGTCACAATCTTTA 3´
BQ82K03rv	5´ GAATCAGAAAAGTCAGGAATCGAC 3´
BQ82I2fw	5´ TCAAGGCCAAACCACTTC 3´
BQ82I2rv	5´ GTCACCCGCAAAGAAAGC 3´
GFPnseq	5´ GCCGGTGGTGCAGATGAA 3´
H1-3´ForBamH1	5´ CCACTTCCCCGCAA 3´
H1-5´For2kpn	5´ GTCATCCCCGTTCTAAGGGATCCAGCTT 3´
H1-5´Forkpnl	5´ GTGGTATTCCGCGTGTTCAT 3´
H1-5´RevHindIIIIn	5´ GCAGCGAAGGAAACAAGAAA 3´
H1-5´RevHindIIIv	5´ TTAAGCTTTGGCATACTGGCT 3´
H1-3´RevXBaI	5´ AGAGGTCTGAAGTA 3´
M13fw	5´ GTAAAACGACGGCCAG 3´
M13rv	5´ CAGGAAACAGCTATGAC 3´
Pp1s3fw	5´ GAAAACCTGGAAAGATGAAGTCTG 3´
Pp1s3rv	5´ CGCTATGGGATCATTTTC 3´
Pp1s27fw	5´ GACAGAAACTGCGAAGAAGG 3´
Pp1s27rv	5´ GTCTTCGACTTCGCAACC 3´
Pp1s33fw	5´ GCAGCGGGAGCTACTAAG 3´
Pp1s33rv	5´ GCTGCCTTAACCTTCACAC 3´
Pp33-DONR fw	5´ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTGACGTCGTCGAGT 3´
Pp33-DONR rv	5´ GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCTTGACCTTCTTCGCC 3´
Pp1s72fw	5´ GAAGGCTGTAGCGGTTTC 3´
Pp1S72rv	5´ GTGACCTTGGACGATTTTC 3´

Pp72-DONRfw 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGCTGCCGCCGATT 3'

Pp72-DONRrv 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCTTTGCTTTCTTAGCAGG 3'

PpABR170fw 5' CGAACTCTCTGACGTTTGTG 3'

PpABR170rv 5' CCGCAACTACTCTCTCAATG 3'

PpActinFor 5' TTTCAGCACACTCCCTTCCC 3'

PpActinRev 5' AACCATAGTCATCTGCGAAAATAAACC 3'

PpHSP16.4fw 5' GCCGACGTGAAGGTACAAC T 3'

PpHSP16.4rv 5' AACTTTGGGATCTGGCTCCT 3'

PpLYSfw 5' ACGAAGTCTGTTTCCAAGAGC 3'

PpLYSrv 5' CTTCTGGGTCTCCGCAGTA 3'

SENSENP11 5' CTACCCGTGATATTGCTGAAGAG 3'

4. RESULTADOS

4.1 Verificación del vector de remplazo para la generación de un mutante *knockout* para el gen *PpH1*

Durante su tesis de maestría, C. Abreu (Abreu, C., 2009) construyó un vector de remplazo alélico empleando el vector pUBW302 (Saavedra *et al*, 2006), que contiene una secuencia que codifica para la neomicinafototransferasa II (*nptII*), la cual confiere resistencia al antibiótico genético G418 expresado bajo el control del promotor fuerte pCaMV35S y el terminador 3'ocs (Figura 4.1).

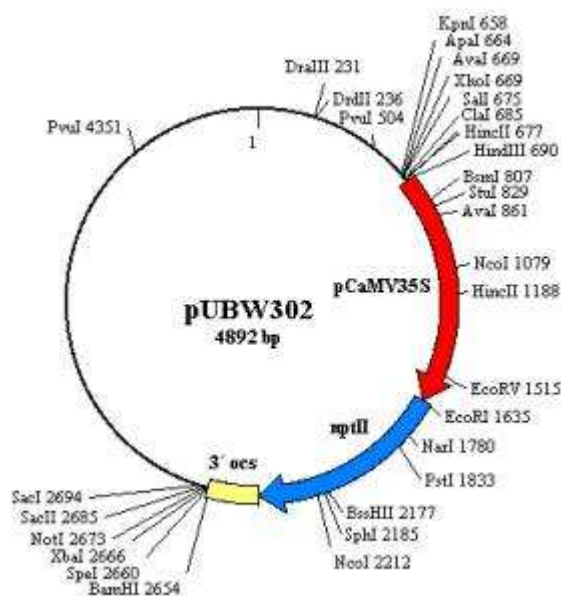


Figura 4.1 Esquema del vector pUBW302 donde se muestran los sitios de multiclonação y la región perteneciente al promotor pCaMV35S, *nptII* y el terminador 3'ocs. En la construcción del vector KO fueron empleados los sitios de restricción *KpnI* (658) y *HindIII* (690) para la inserción de la región de homología 5' mientras que los sitios *XbaI* (2666) y *BamHI* (2654) se utilizaron en la inserción de la región de homología 3' (Abreu, C., 2009).

En el vector construido, el gen de *nptII* se encuentra flanqueado por dos regiones homólogas al gen *PpH1* (*Pp1s53_134V6*), que serán las involucradas en el evento de recombinación homóloga (Prigge *et al*, 2010) (Figura 4.2).



Figura 4.2 Esquema en donde se representa el mecanismo de reemplazo alélico empleando un cassette de selección flanqueado por dos secuencias homólogas al gen a sustituir. Se representa en rojo y azul regiones de homología entre el cassette de selección y el gen involucrado, en violeta el cassette de selección o gen marcador (en este caso *nptII*) en gris los exones del gen y en negro los intrones. Adaptado de Prigge *et al* (2010).

Para la construcción del cassette de selección, Abreu empleó las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* para cortar el vector pUBW302 a nivel de la región río arriba del promotor pCaMV35S y ligar en este punto la región de homología 5', el fragmento amplificado entre los cebadores H1-5' For2kpn y H1-5' RevHindIII de 755 pares de bases. Por otro lado, la digestión con *XbaI* y *BamHI* permitió el corte y la ligación del fragmento de homología 3' de 753 pares de bases del gen *PpH1*, obtenido por PCR empleando los cebadores H1-3' ForBamH1 y H1-3' RevXbaI. Según lo reportado por Reski (1999), se recomienda que las dos regiones de homología posean al menos 600 pares de bases de secuencia homóloga y que además se encuentren orientados en la misma dirección 5'→3' en relación al gen a sustituir. El vector construido de esta forma fue denominado pUBW302-KOPpH1.

La clonación fue chequeada mediante ensayos de restricción con enzimas *HindIII* y *BamHI* como fue descrito en la sección Materiales y métodos (Figura 4.3). De esta forma, de una digestión con *BamHI* se esperarían dos bandas, de 3648 y 2702 pares de bases mientras que para *HindIII*, los productos de digestión serían de 4156 y 2194 pares de bases.

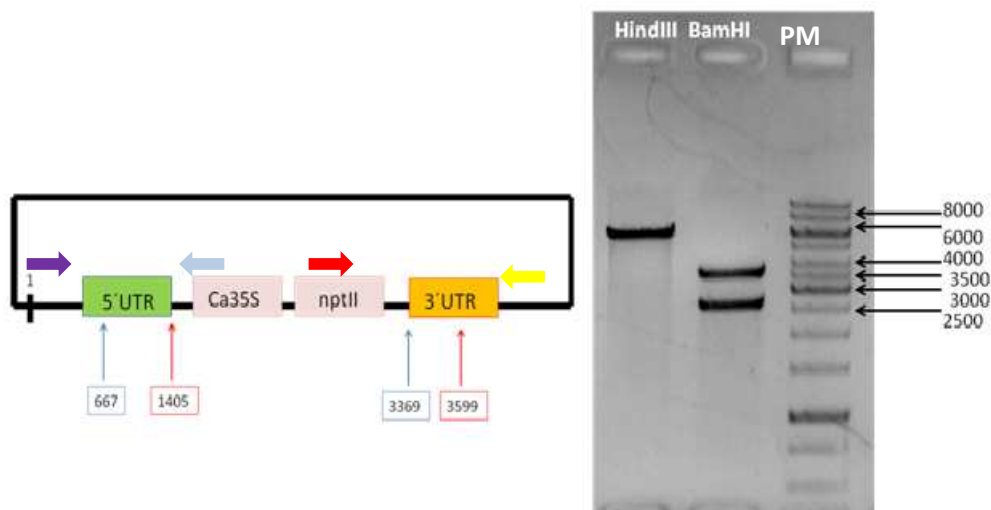


Figura 4.3 (izq) Esquema del plásmido pUBW302-KOPpH1. En azul se muestran los sitios de corte de *BamHI* mientras que en rojo los sitios reconocidos por *HindIII*. Se indican además las regiones de homología 5'UTR y 3' UTR del gen *PpH1*, el promotor pCaMV35S (en la figura Ca35S) y la región codificante para *nptII*. Las flechas violeta, celeste, rojo y amarillo, indican la posición y sentido de los cebadores M13fw, Antisense35S, Sense nptII y M13rv respectivamente, empleados para la secuenciación (ver más adelante en el texto). **(der)** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se muestran las digestiones del plásmido pUBW302-KOPpH1 utilizando las enzimas *HindIII* y *BamHI*. PM- Peso molecular

En el caso de la digestión con *BamHI* se observan dos bandas, una entre 2500 y 3000 pb y otra entre 3500 y 4000 pb, ambas esperadas. Por otra parte, el empleo de *HindIII* produjo una única banda, por lo que se sospecha que en la región 5' o 3' UTR se perdió un sitio de digestión. Se plantea

entonces, realizar una doble digestión con *Bam*HI y *Hind*III para demostrar cuál sitio de digestión es el faltante. De esta forma si el sitio *Hind*III que falta es el ubicado en la posición 1405, entonces los productos esperados serían de 3418, 2702 y 230 pb. Si el faltante es el sitio en la posición 3599, entonces la doble digestión daría como resultado bandas de 3648, 1964 y 738 pb (Figura 4.4). La doble digestión demostró que el sitio faltante es el ubicado a la altura de 1405.



Figura 4.4 Evaluación de la doble digestión *Hind*III-*Bam*HI (Dig) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como se muestra en la figura, la doble digestión generó tres productos, uno de ellos menor a 500 pb, y otros dos comprendidos entre 2500 a 3000pb y 3000 a 3500 pb. PM- peso molecular.

Para comprobar la secuencia y orientación del fragmento de homología 5'UTR insertado en el plásmido pUBW302-KOPpH1, se secuenció dicho plásmido empleando los cebadores M13fw y Antisense35S. Al comparar la secuencia obtenida con la secuencia esperada, se evidenció una mutación puntual (C por T) a nivel de la región 5'UTR. A su vez, se demostró que el promotor pCaMV35S posee una deleción de 87 pares de bases (Figura 4.5) dando lugar a la pérdida del sitio *Hind*III a nivel de la posición 1405.

```

KO_M13F.SECUENCIACION      CTTCGGACATACTTTGTTTCGTTTCAGAAAAGTTTCTTGTTTCCTTCGC
KO_M13F.PredicciOn         CTTCGGACATACTTTGTTTCGTTTCAGAAAAGTTTCTTGTTTCCTTCGC
*****
                               1410 ↓
KO_M13F.SECUENCIACION      TGCAAGCT-----
KO_M13F.PredicciOn         TGCAAGCTTGGACTTTCTCTATCTCTACGATCTAGGAAGAAAGTTTCGACG
*****

KO_M13F.SECUENCIACION      -----GCCTC
KO_M13F.PredicciOn         GAGAAGGTGACGATACCATGTTCCACCACCGATAATGAGAAGATTAGCCTC
*****
                               ↑ 1497
KO_M13F.SECUENCIACION      TTCAATTCAGAAAGAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCCTACGC
KO_M13F.PredicciOn         TTCAATTCAGAAAGAATGCTGACCCACAGATGGTTAGAGAGGCCTACGC
*****

```

Figura 4.5 Alineamiento de parte de la secuencia de pUBW302-KOPpH1 con la secuencia predicha empleando el cebador M13fw. Entre los nucleótidos 1410 y 1497 existe una deleción a nivel del promotor pCaMV35S.

A su vez se secuenció la región 3'UTR empleando los cebadores SensenptII y M13rv, demostrándose la presencia de algunas mutaciones puntuales en la región 3'UTR, por fuera de la

secuencia que codifica para *nptII*. A su vez, la secuencia demostró la presencia del segundo sitio de restricción esperado para la digestión con la enzima de restricción *HindIII* en la posición 3599.

Se concluye de esta forma que el vector es el esperado a nivel de secuencia y orientación, aunque presenta mutaciones puntuales y una deleción de 87 pares de bases en el promotor pCaMV35S que se esperan no afecten el proceso de la selección de las células transformadas.

4.2 Transformación de protoplastos de *P. patens* con el vector pUBW302-KOPpH1

La transformación de *P. patens* se realizó mediante shock térmico y polietilenglicol de protoplastos de *P. patens*. El ADN empleado fue el vector pUBW302-KOPpH1 digerido en el extremo 5' de la región 5'UTR con la enzima *KpnI* (Figura 4.6). La selección de los transformantes involucró períodos de selección-no selección empleando el antibiótico G418 en una concentración de 50 ug/mL con el propósito de eliminar, durante rondas de no selección, aquellos transformantes inestables (Schaefer, 2002).

Durante el período de selección se pudieron observar diferencias con respecto a la velocidad de crecimiento de los transformantes, observándose clones con crecimiento más lento que otros, los cuales podrían corresponder a transformantes inestables o a mutantes *knockout* si la histona *PpH1* se encontrara involucrada en el crecimiento en condiciones estándar de cultivo del musgo.

A partir de dos transformaciones independientes se obtuvieron mutantes que fueron caracterizados en detalle.

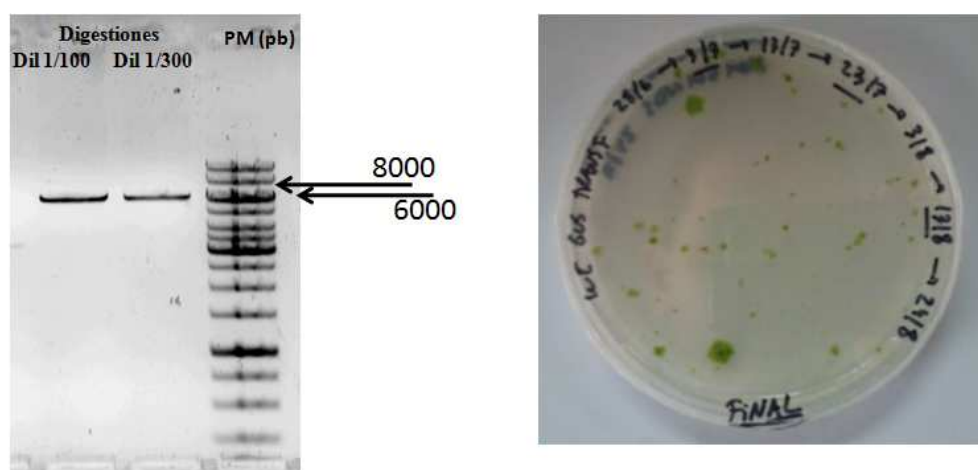


Figura 4.6 (izq) Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observa la linealización del vector pUBW302-KOPpH1 con *KpnI*. Se muestran dos diluciones del plásmido digerido, 1/100 y 1/300. PM- Peso molecular. **(der)** Transformantes obtenidos luego de tres rondas de selección con G418 (50 ug/mL). Nótese la diferencia de tamaños de las colonias obtenidas.

4.3 Análisis de los transformantes

4.3.1 Verificación de la integración del cassette de selección al locus del gen de *PpH1*

La verificación de la correcta integración del cassette de selección al *locus* deseado se realizó mediante dos reacciones de PCR distintas que amplifican la región 5' y 3' del cassette de selección. En cada caso se utiliza un cebador ubicado por fuera de la construcción que hibrida en el genoma de *P. patens* y un segundo cebador que es específico para una región de la construcción. En el caso de la región 5', se utiliza un cebador *reverse* específico para la región del promotor pCaMV35S y en el caso de la región 3', un cebador sentido *forward* para el gen *nptII* (Figura 4.7) (Kamisugiet al, 2006).

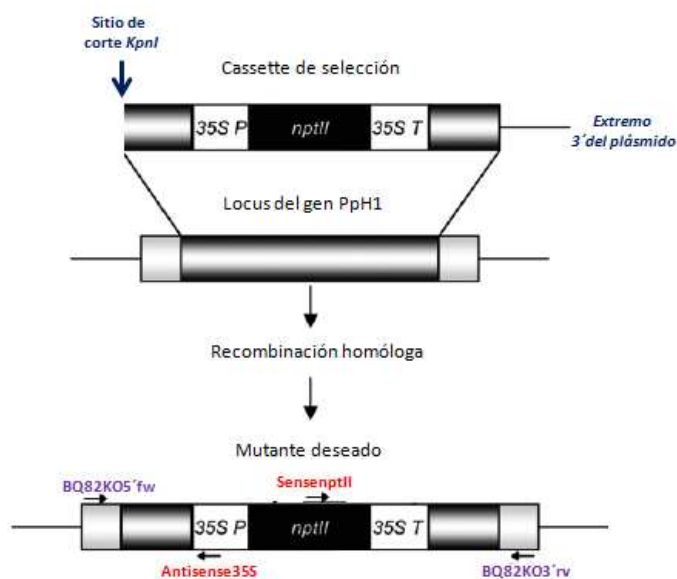


Figura 4.7 Representación esquemática del proceso de recombinación homóloga deseada para la obtención del mutante. Se muestra el plásmido pUBW302-KOPpH1 digerido en el extremo 5' por *KpnI*, el extremo 3' del mismo, el *locus* del gen *PpH1* y el mutante deseado. En color violeta se indican los cebadores *forward* y *reverse* ubicados por fuera de la región de recombinación y pertenecientes al genoma del *P. patens* mientras que en rojo se indican los cebadores pertenecientes al cassette de selección. Adaptado de Frank *et al* (2005).

En primera instancia, se trabajó con muestras de ADN de los distintos mutantes obtenidos y se intentó amplificar la región comprendida entre los cebadores BQ82KO5'fw y Antisense35S en base a temperaturas de annealing determinadas por el programa IDT, identificándose varios mutantes para los que se obtiene amplificación. Posteriormente, con aquellos mutantes que arrojaron resultados positivos, se planteó una segunda PCR trabajando con los cebadores SensenptII y BQ82KO3'rv. La figura 4.8 ejemplifica los resultados obtenidos para una de las líneas mutantes obtenidas.

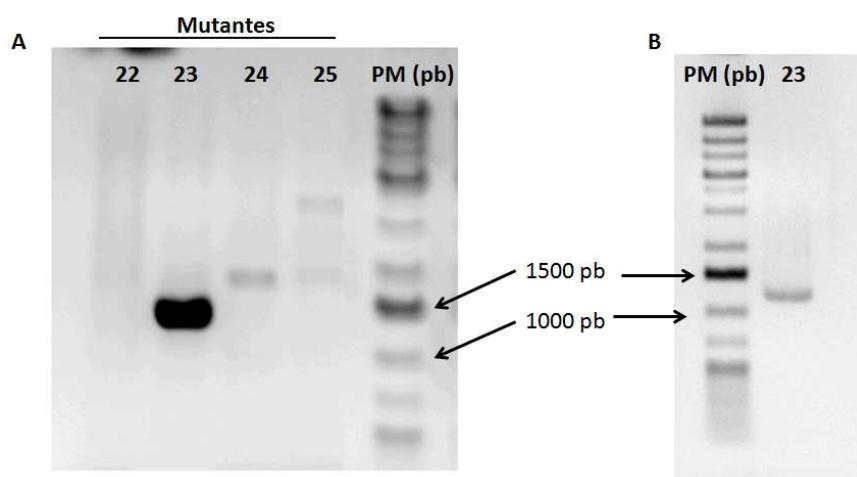


Figura 4.8 Verificación de la integración del cassette de selección en el locus de *PpHI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **(A)** PCR realizada con los cebadores BQ82KO5'fw y Antisense35S cuyo producto esperado es de 1333 pb. Sólo la muestra 2 presenta la integración del cassette a nivel 5' del locus del gen *PpHI*, mientras que las demás presentan inespecificidad de amplificación. **(B)** PCR planteada con cebadores SenseptII y BQ82KO3'rv sobre la muestra 2. El producto de amplificación comprendido entre 1000 y 1500 pb indica la correcta recombinación homóloga a nivel 3' del gen ya que el tamaño del fragmento esperado sería de 1332 pb. PM- Peso molecular.

Los mutantes 18, 23 y 49, a partir de los cuales se obtuvieron los productos de PCR del tamaño esperado para ambos sitios de inserción, fueron seleccionados para continuar con su caracterización.

4.3.2 Análisis por Southern blot de los mutantes *knockout* 18, 23 y 49

El estudio de Southern blot fue empleado para verificar la integración del cassette de selección al *locus* deseado e identificar a su vez, posibles recombinaciones ilegítimas. Para ello, se realizó una digestión del ADN de los mutantes 18, 23 y 49 con *Pst*I y *Eco*RI según lo descrito en Materiales y métodos. Se testearon dos enzimas ya que el ADN de *P. patens* es difícil de digerir. Los resultados demostraron que no se logró una buena digestión con *Pst*I pero sí con *Eco*RI (Figura 4.10).

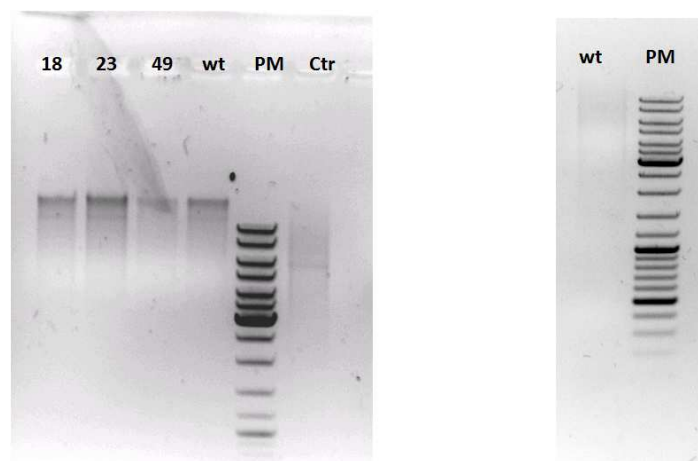


Figura 4.10 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las muestras digeridas con *Pst*I (izq) y *Eco*RI (der). Se digirió 10 µg de ADN de los mutantes 18, 23, 49 y de la línea silvestre (wt) (para más información ver Materiales y métodos) y se analizaron mediante electroforesis. A su vez, como control (Ctr) se trabajó con una muestra de ADN genómico de *A. nidulans* que evidencia que la enzima *Pst*I está en correctas condiciones ya que se observa una buena digestión. Este gel demuestra además que con *Eco*RI se logra una buena del ADN perteneciente a la línea wt. PM- Peso molecular.

El análisis por Southern blot implicó la síntesis de una sonda empleando como método de marcado desoxiuridinas marcadas con digoxigenina y los cebadores SensentpII y H1-3'RevXBaI, los cuales generan un producto de amplificación de 1096 pb que hibrida parcialmente con la región de recombinación a nivel 3'UTR (Figura 4.11). Esta sonda comprende parte de la secuencia de *nptII* y la región de homología 3' a nivel del gen de *PpHI*.

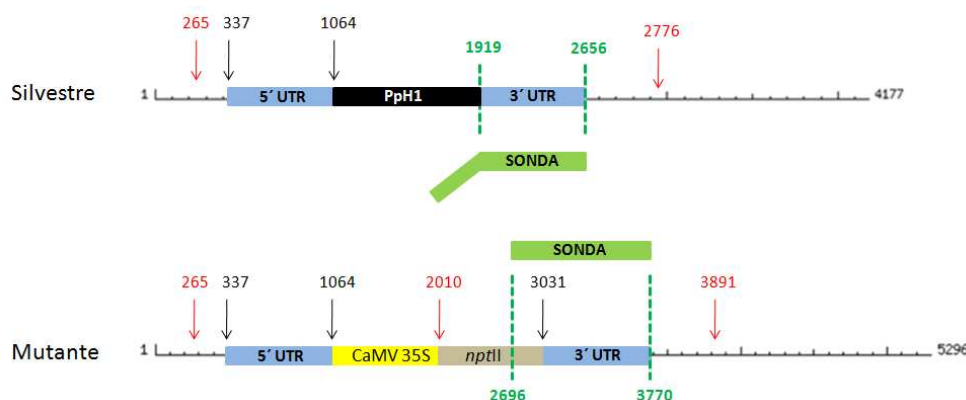


Figura 4.11 Esquema de digesteões empleando *EcoRI* sobre el genoma del organismo silvestre y el mutante. La base numero 1 corresponde a la primera base donde hibrida el cebador BQ82KO5'fw. Los números en rojo indican los sitios de corte de *EcoRI* mientras que los números en negro indican las posiciones de las regiones 5'UTR y 3'UTR. Se indica además el gen *PpHI*, el promotor pCaMV35S y el gen *nptII*. El rectángulo y los números en verde indican la zona de reconocimiento de la sonda. Para el caso del silvestre, existirá una zona de no reconocimiento que se indica como un rectángulo inclinado la cual reconoce la región del cassette de selección a nivel de la región de *nptII*. Como se observa, las digesteões con *EcoRI* generarán productos de diferentes longitudes que serán fáciles de reconocer: en el silvestre la sonda reconocerá un producto de 2511 pb mientras que en el mutante, uno de 1881 pb.

La Figura 4.12 muestra los resultados obtenidos del Southern blot. Las digesteões con *EcoRI* fueron completas para todas las muestras. El revelado mostró que el mutante 18 posee la inserción en el locus de *PpHI* (banda entre 1500 y 2000) pero también en otra región del genoma ya que presenta una banda a 6000 pb, probablemente debido a eventos de recombinación ilegítima. Los mutantes 23 y 49 evidencian una única banda entre 1500 y 2000 pb mientras que el wt presenta una única banda de 2500 pb.

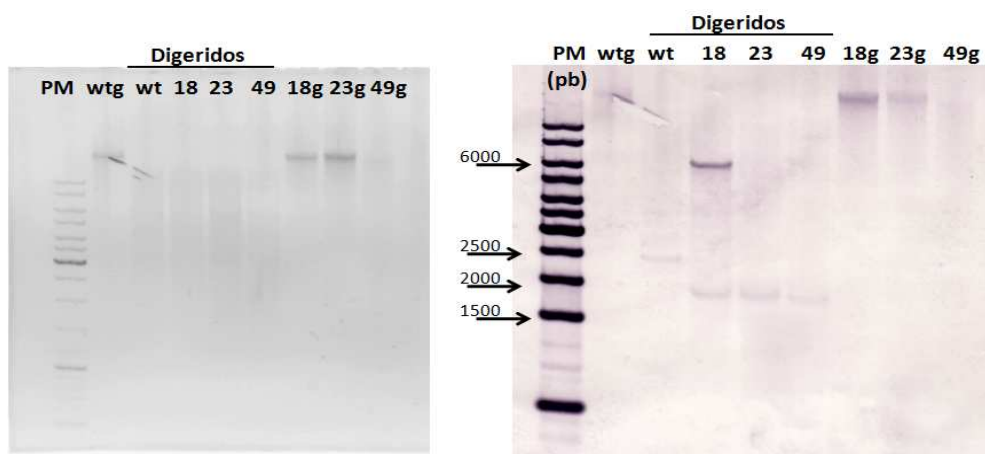


Figura 4.12 Southern blot de las muestras de los mutantes 18, 23 y 49. 12 μ g de ADN genómico fueron digeridos con *EcoRI*, separados en gel de agarosa al 0.8%, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con una sonda de 1096 pb. **(izq)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las muestras digeridas con *EcoRI*. **(der)** Resultado del Southern blot. Carriles: ADN genómico wt (wtg), ADN genómico wt digerido, ADN genómico mutante 18 digerido, ADN genómico mutante 23 digerido, ADN genómico mutante 49 digerido, ADN genómico 18 (18g), ADN genómico 23 (23g), ADN genómico 49 (49g). PM- Peso molecular.

Con los resultados obtenidos por PCR y Southern blot se confirma que en los mutantes 23 y 49 la construcción se insertó en el locus del gen *PpHI* mediante recombinación homóloga. Para el caso del mutante 18 el transgen se insertó a nivel del locus *PpHI* pero ocurrió un segundo evento de recombinación ilegítima, insertándose el cassette en otro *locus*.

Considerando los resultados obtenidos se seleccionan los mutantes 23 y 49 para estudios por citometría de flujo.

4.3.3 Análisis por citometría de flujo de los mutantes 23 y 49

La obtención de mutantes por transformación de protoplastos por shock térmico y polietilenglicol puede resultar en la fusión de éstos durante el proceso de transformación debido a la falta de pared celular. De esta forma, los mutantes obtenidos pueden resultar poliploides (Schween *et al*, 2005), afectando el crecimiento, la diferenciación del tejido vegetal y la morfología del mutante. Estos cambios fenotípicos podrían ser equivocadamente asociados a la falta de *PpHI* si no se realizara este estudio. Para determinar la ploidía de los mutantes identificados por PCR se realizó un estudio de citometría de flujo.

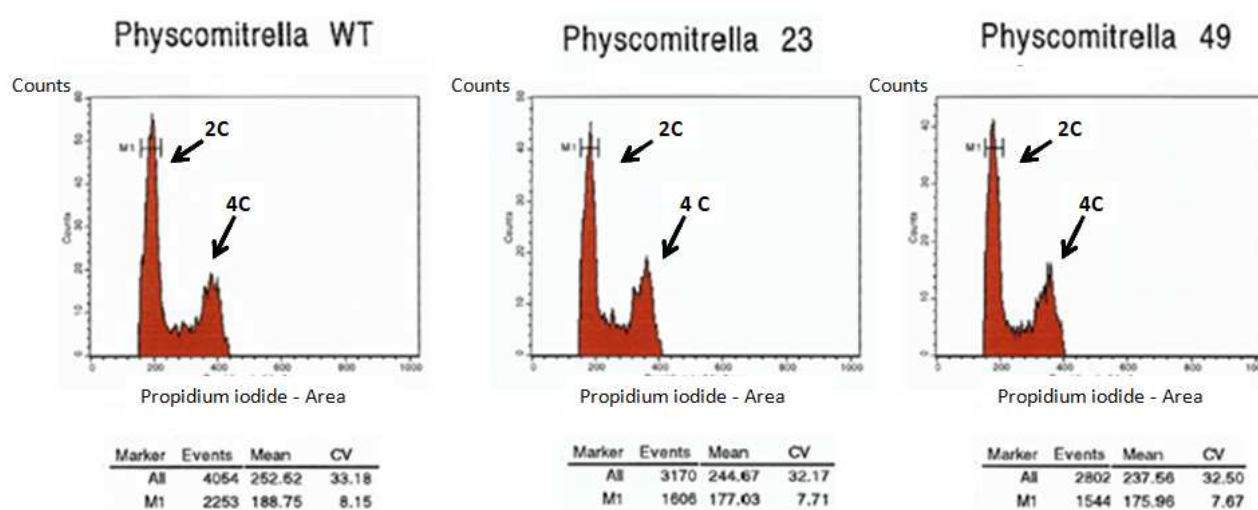


Figura 4.13 Diagramas de citometría de flujo obtenidos para la línea silvestre (*Physcomitrella wt*) y los mutantes 23 y 49 (*Physcomitrella 23* y *49* respectivamente). Ver texto para más información.

En la figura 4.13 se grafica el conteo de células versus la relación entre fluorescencia de yoduro de propidio y área analizada, observándose dos picos predominantes 2C y 4C, siendo C el contenido de ADN en haploidía. En la figura se pueden observar los eventos realmente analizados para cada caso indicados como “Events” correspondientes al total o sólo a la región indicada como M1 (pico correspondiente a 2C) y corte con el eje de las abscisas (Propidium iodide – Area).

El pico predominante en las tres muestras analizadas, indicado en la figura como M1, corresponde a 2C e indica el arresto en la fase G2 del ciclo celular de las células del clonema (Ishikawa *et al*, 2011). Este pico presenta una media en el eje de las abscisas de 188.75 para la línea silvestre, 177.03 para el mutante 23 y 175.96 para el caso de mutante 49. Las diferencias en estos resultados pueden estar asociadas al procesamiento independiente de las muestras destacando que esto podría llegar a normalizarse empleando un estándar interno. El pico siguiente, correspondiente a

4C, se relaciona con una endoreduplicación del ADN en las células del caulonema viejas (Ishikawa *et al*, 2011). A partir de estos datos se concluye que los genotipos analizados son haploides y por lo tanto, no existe diferencia entre el nivel de ploidía de los mutantes y de la línea silvestre.

Se seleccionó aleatoriamente el mutante 23 para su caracterización mediante análisis fenotípicos, genotípicos y su evaluación a nivel de expresión de otras posibles histonas y genes relacionados al estrés abiótico en este organismo.

4.3.4 Análisis de la expresión del gen *PpH1* en las línea wt y mutante 23

Para verificar la ausencia del transcripto generado por el gen *PpH1* (*Pp1s53_134V6*), se planteó una PCR con los cebadores H1-5' ForKpnI y H1-5' RevHindIIIv los cuales hibridan a nivel de dos exones consecutivos separados por un intrón de 245 pb. Para ello se trabajó con ADN copia de gametóforo como molde y la polimerasa Kapa HiFi. Como control se empleó el gen de actina (*Pp1s381_18V6*) amplificado con los cebadores Actinafw y Actinarv sobre el mismo molde. Como se muestra en la Figura 4.14, el transcripto del gen *PpH1* no pudo ser amplificado para el mutante 23 pero sí para la línea silvestre. A pesar de que el resultado es negativo, el mismo indicaría que el gen no se expresa en el mutante estudiado ya que el control de actina amplifica para ambas muestras.

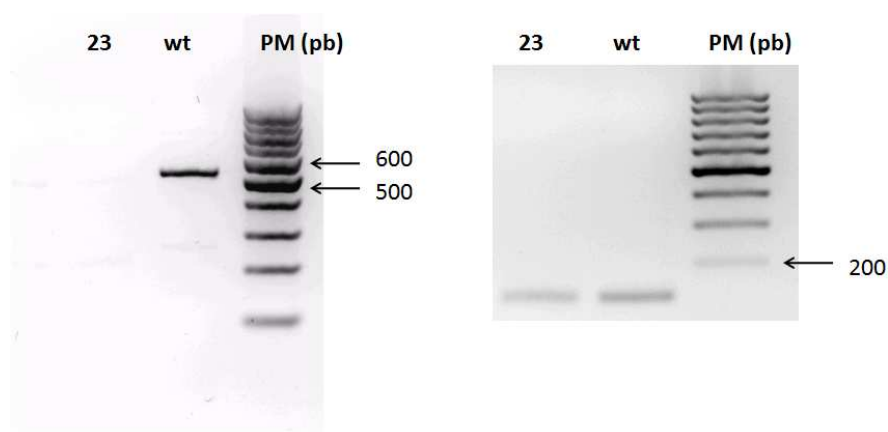


Figura 4.14 Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se demuestra que *PpH1* no se expresa en la línea mutante 23 (**izq**) Resultado de la amplificación con los cebadores H1-5' ForKpnI y H1-5' RevHindIIIv trabajando sobre ADN copia del mutante 23 (carril 1) y ADN copia de la línea silvestre (carril 2). Sólo existe amplificación del producto de 532 pb esperado para la línea silvestre pero no para la línea mutante. (**der**) Control del estado del ADN copia para las muestras 23 y silvestre. Se observa amplificación del gen de actina de 107 pb lo cual demuestra la no contaminación con ADN genómico y además el buen estado del ADN copia. Carril: 23-Mutante 23, Carril wt- Línea silvestre.

Para corroborar los resultados obtenidos, se llevó a cabo una PCR en tiempo real. Para ello se planteó el programa establecido para la evaluación del gen *PpH1* con los cebadores BQ82I2 *forward* y *reverse* (ver más adelante en la sección *Evaluación del nivel de expresión de histonas tipo H1 y genes relacionados al estrés abiótico mediante PCR en tiempo real*) y como molde se empleó ADN copia de la línea silvestre y del mutante 23, procedentes de plantas en las etapas de desarrollo protonema y gametóforo (Figura 4.15).

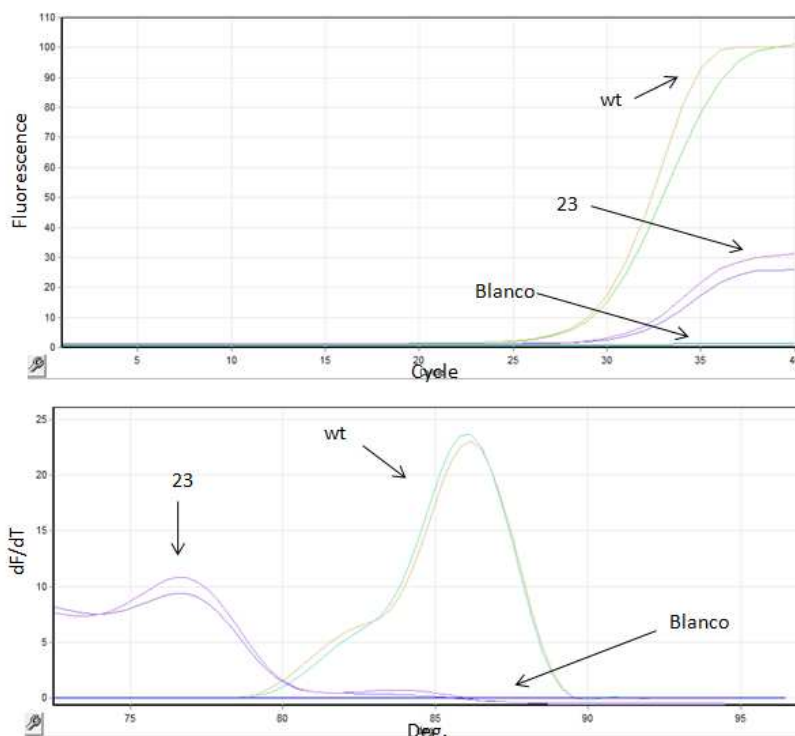


Figura 4.15 (arriba) Análisis de la curva de amplificación obtenida para el gen *PpH1* empleando los cebadores BQ8212 *forward* y *reverse*. Ambas curvas corresponden al estadio protonema pero a diferentes líneas. Se indica también el blanco. **(abajo)** Curvas de desnaturalización de los productos amplificados. Nótese como la línea 23 posee una curva de desnaturalización con un máximo a 76°C que correspondería a dímeros de cebadores mientras que en la línea wt el máximo se observa a 86°C atribuido al producto de amplificación. Los resultados aquí mostrados fueron similares para el estadio gametóforo.

Los datos obtenidos de este análisis concuerdan con los observados en el experimento de PCR en tiempo final: existe amplificación del ADN copia correspondiente al transcripto del gen *PpH1* en la línea silvestre pero no en la mutante. Las curvas de amplificación observadas en la figura 4.15, para el caso del mutante 23, se asocian con la presencia de dímeros de cebadores tal como se aprecia en la curva de desnaturalización. A pesar de que este es un resultado negativo, se destaca que el mismo es el esperado para el análisis de la línea 23, en el cual el gen de *PpH1* se encuentra deletado.

4.4 Estudio de la repetición nucleosomal del ADN genómico en el mutante 23

Se ha demostrado previamente que la histona tipo H1 promueve y estabiliza el plegamiento de la fibra de 30 nm mientras que la disminución en la relación H1 - nucleosomas conduce a una alteración del espaciamiento de los mismos de forma que la cromatina se presenta más laxa (Fan *et al*, 2005). La repetición nucleosomal se analizó mediante ensayos de digestión parcial con nucleasa de micrococo (MNasa) de Thermo Scientific, una endonucleasa capaz de digerir el ADN que se encuentra libre de proteína. De esta forma y empleando una digestión leve con tiempos de exposición a esta nucleasa cortos de entre 5 a la 10 minutos, el ADN “linker” ubicado entre dos nucleosomas que interactúe con las histonas H1 es protegido de la digestión mientras que el ADN *linker* libre de H1 será degradado (Gonzalez *et al*, 1997).

Se siguió el protocolo establecido por Abreu (2009). En el experimento se trabajó con material vegetal obtenido de protonema con un pasaje, 3 pasajes y 5 pasajes, incubado con 200 U/g de tejido por 5 minutos a 37°C. Dichos experimentos no fueron exitosos, no lográndose digerir el material

vegetal a pesar de repetir las mismas condiciones reportadas. Como control del estado de la enzima, se trabajó con una muestra de ADN de *A. nidulans* según lo reportado por Ramón (Ramón *et al*, 2000) lográndose digerir eficazmente la muestra (ver Figura 4.16).

A su vez, se planteó el uso de mayor cantidad de enzima para las digestiones de las muestras vegetales (400 U/g de tejido vegetal) y un tiempo mayor de digestión (15 minutos) pero tampoco se logró digerir la cromatina. Como última alternativa, se planteó trabajar con protoplastos obtenidos por digestión con driselasa pero los resultados no fueron buenos ya que tampoco fue posible digerir la muestra (resultado no mostrado). Se destaca que este mismo experimento podría plantearse a partir de núcleos purificados pero se descartó esta alternativa ya que la eficiencia de obtención de núcleos es baja (Abreu, Comunicación personal).

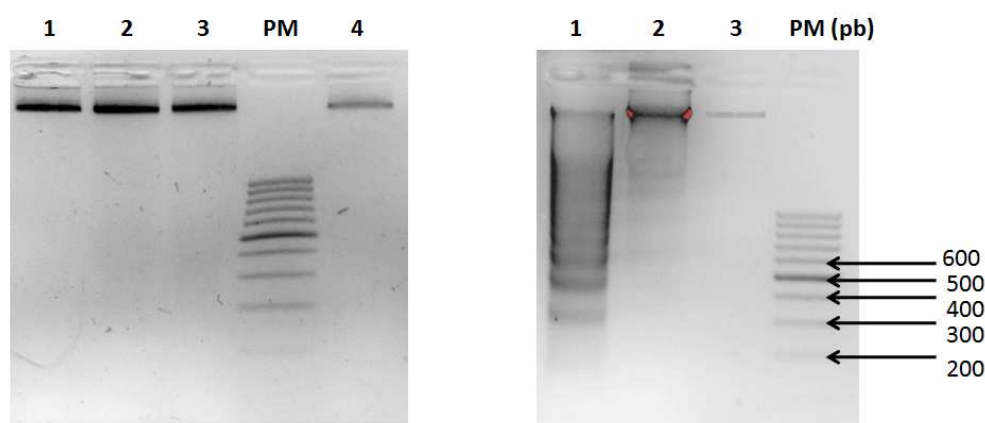


Figura 4.16 Electroforesis en gel de agarosa al 2% para el estudio de la repetición nucleosomal. **(izq)** Digestión de protonema de *P. patens* con 5 pasajes incubando con MNasa 100 U/g, 200 U/g, 400 U/g por 5 minutos y 200 U por 15 minutos de digestión (Carril 1-3, y 4) **(der)** Muestra de *A. nidulans* digerida por 5 minutos con 200 o 50 U/g. Carril: 1- *A. nidulans* 200 U/g, 2- *A. nidulans* 50 U/g, 3- *P. patens* wt 200 U/g, PM 100 pb.

En su tesis de maestría, Abreu logró buenas digestiones de la cromatina a partir de protonema con un solo pasaje, empleando el mismo protocolo de esta tesis pero trabajando con MNasa de marca Fermentas. Como posible explicación a los resultados obtenidos durante esta tesis, se podría hipotetizar que la enzima utilizada en este trabajo presente algún tipo de inhibición por algún componente de la muestra vegetal que no afectaba la actividad de la enzima empleada por Abreu.

4.5 Análisis fenotípico del mutante 23 *knockout* para la histona *PpH1*

4.5.1 Estudio de velocidad de crecimiento

El estudio de velocidad de crecimiento se llevó a cabo para analizar si existían diferencias a este nivel entre la línea mutante y la línea silvestre y consistió en analizar cuantitativamente el área radial de crecimiento. A su vez, se evaluó macroscópicamente de forma cualitativa el estado general de las colonias.

Este estudio involucró 4 placas de Petri conteniendo cada una 16 colonias en total, 8 pertenecientes a la línea silvestre y 8 a la línea mutante. No se observaron alteraciones morfológicas evidentes en las colonias mutantes.

Por otro lado, empleando el programa Photoshop, se llevó a cabo una cuantificación de los píxeles del área radial de crecimiento de cada línea silvestre o mutante. Como forma de comparar los resultados e independizarlos de la distancia de la cámara de fotos, se estableció el Índice de crecimiento por placa como la relación entre los píxeles de la colonia y los píxeles de la placa. De esta forma se realizó un seguimiento de las colonias a través del tiempo, registrando a través de fotos de la placa invertida el área horizontal de las colonias. Se realizaron promedios entre las 4 placas y se determinó el desvío estándar de las mismas, como se muestra en la figura a continuación.

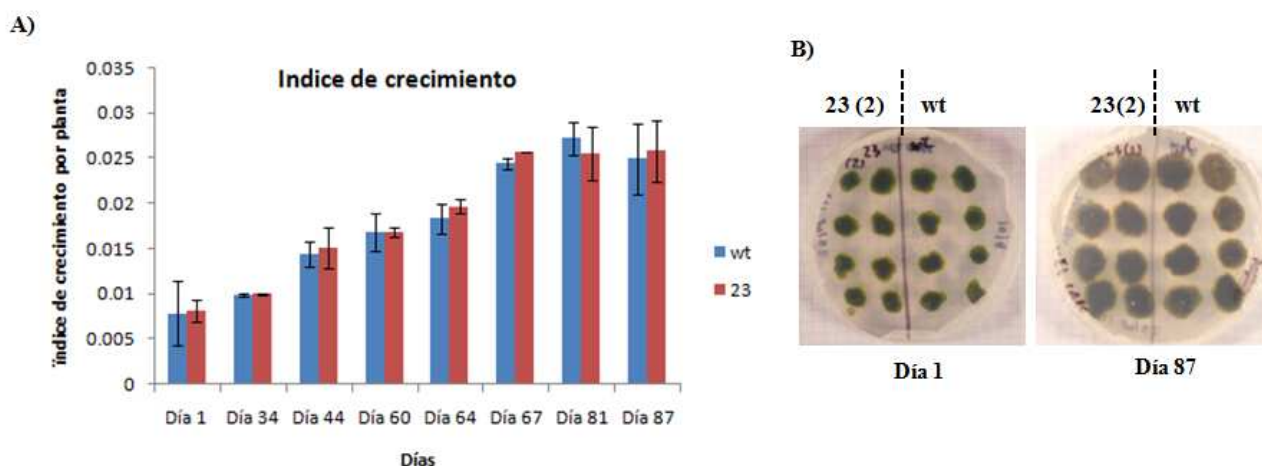


Figura 4.17 Evaluación del crecimiento radial de las colonias a lo largo del tiempo. **(A)** Índice de crecimiento por placa versus días. Se observa como las colonias aumentan el área de crecimiento horizontal a medida que pasa el tiempo, alcanzando una meseta a nivel del día 67 aproximadamente. **(B)** Fotos de la placa numerada como 23 (2)/wt en los días 1 y 87 para este experimento.

Analizando el gráfico anterior, se observa que no existe diferencia en el crecimiento del área radial entre las dos líneas y que, a partir del día 67 se observa una meseta en el gráfico lo que indicaría que el crecimiento radial se detiene.

A partir de estos datos se concluye que el mutante 23 no muestra diferencia significativa en la velocidad de crecimiento con respecto a la colonia silvestre en medio estándar de cultivo.

4.5.2 Efecto del estrés abiótico

La línea mutante no presentó anomalías morfológicas ni de velocidad de crecimiento en condiciones estándar de cultivo. En principio, se podría hipotetizar que la histona *PpH1* no juega un rol fundamental en el desarrollo ni en la morfología del organismo en condiciones normales de crecimiento, ya sea bien porque no tiene un rol en este proceso o porque su función es suplantada por otra histona mediante un efecto de compensación.

Por tal motivo y con el fin de evaluar la posible función de esta proteína, se estudió la respuesta fenotípica de la línea *knockout* sometida a condiciones de estrés abiótico (osmótico, salino-tóxico y térmico). Los experimentos planteados consistieron en analizar cuantitativamente el contenido de clorofila y muerte celular durante el período de recuperación post-estrés. El análisis de clorofila implicó su extracción con acetona al 80% mientras que el análisis de muerte celular se llevó a cabo empleando el colorante vital Evan's blue. Aquellas colonias más saludables presentarán mayor

contenido de clorofila y menor captación del colorante vital que se traduce en un menor índice de muerte celular.

4.5.2.1 Efecto del estrés salino-tóxico

El estudio del efecto salino-tóxico se llevó a cabo cultivando la línea *knockout* 23 junto con la línea silvestre en 0.25 y 0.5 M de cloruro de sodio por 11 días. Luego de ser expuestos al estrés, fueron transferidos a medio estándar de cultivo para observar su recuperación. En esta instancia se evaluó el comportamiento fenotípico macroscópico del mutante ya que por estudios previos (Abreu, C., 2009), se sabía que la línea silvestre resistiría al tratamiento con 0.5 M de NaCl pero no se sabía si la línea mutante, carente de *PpHI*, lo haría.

El tratamiento con 0.25 M de cloruro de sodio genera colonias de un verde más intenso en comparación con 0.5 M pero luego de 9 días de recuperación las mismas presentan un aspecto muy similar al control (Figura 4.18). Los resultados obtenidos para un estrés de 0.5 M de NaCl demostraron que el mutante 23 se recupera de forma similar a la línea wt luego de 9 días de recuperación. En el día 4 de recuperación las colonias parecen haber perdido clorofila ya que se pierde el color verde inicial pero al día 9 post-estrés, los bordes de las colonias muestran un tinte verde. A su vez, se observa pérdida de gametóforos bajo estas condiciones, igual a lo reportado por Begoña (2003).

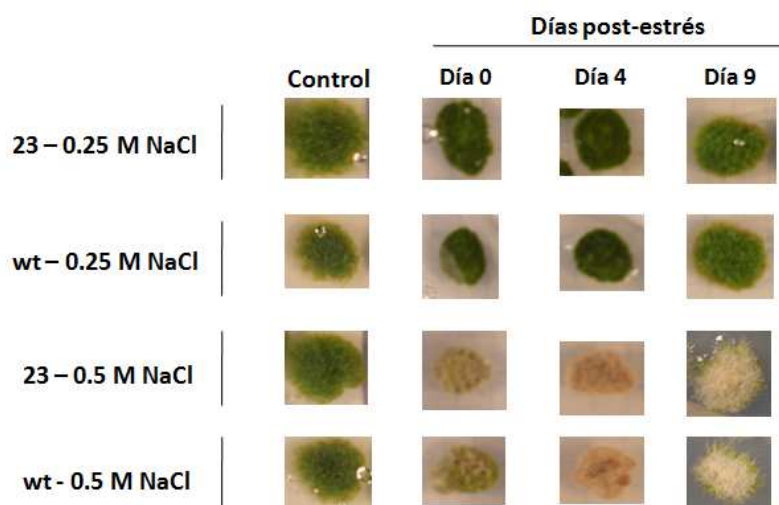


Figura 4.18. Evaluación del estado de las colonias luego de someterlas a 0.25 o 0.5 M de NaCl. El día 0 corresponde a las colonias luego de 11 días de estrés mientras que los días 4 y 9 corresponden a la recuperación.

Luego de comprobar que tanto la línea wt como la mutante se recuperan de forma similar luego del estrés de 0.5 M y que su fenotipo es claramente diferente al obtenido en 0.25 M, se decidió que los experimentos cuantitativos se realizarían sometiendo ambas líneas a un estrés de 0.5 M de NaCl por 11 días. Los resultados de este experimento se muestran a continuación.

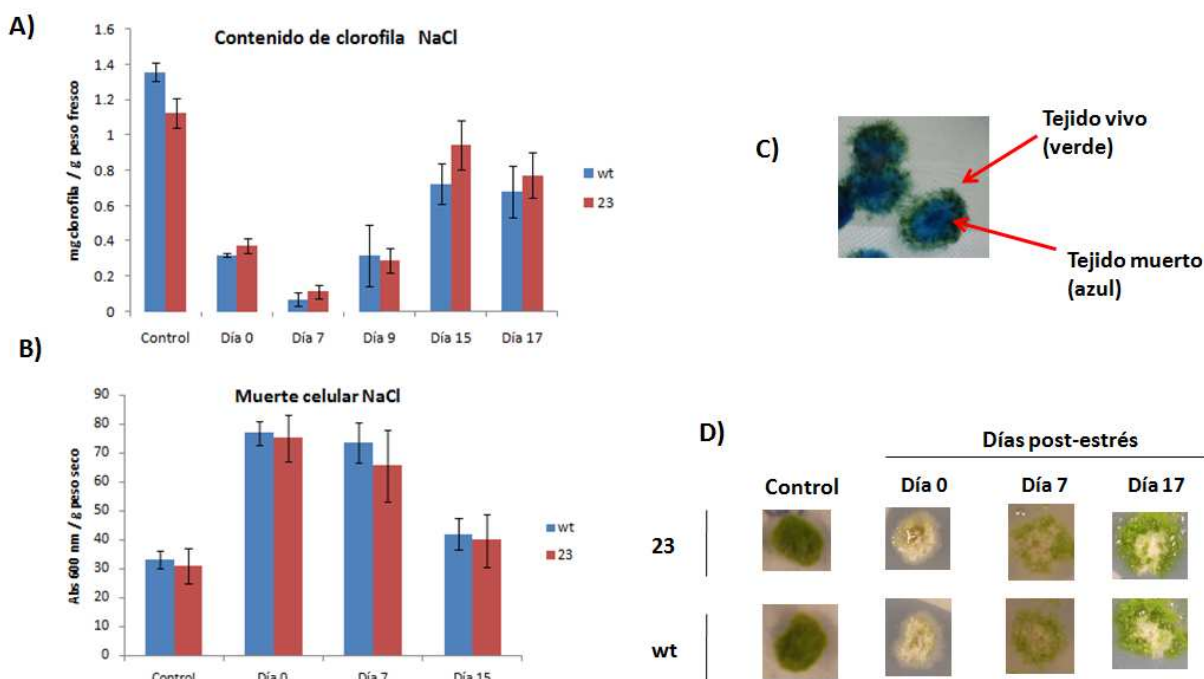


Figura 4.19 Evaluación fenotípica de las colonias luego de exponerlas por 11 días a 0.5 M de NaCl. **(A)** Contenido de clorofila expresado como la relación entre los miligramos de clorofila y los gramos de peso fresco de las colonias wt y 23 a día 0 y durante la recuperación. **(B-C)** Muerte celular evaluada por la incorporación del colorante vital Evan's blue, **B-** análisis cuantitativo expresado como la relación entre absorbancia registrada a 600 nm y gramos de peso seco **C-** análisis cualitativo. La foto fue obtenida después de la incubación con el colorante y de los lavados posteriores (ver Materiales y métodos). El color verde de las colonias demuestra la presencia de tejido vivo mientras que el azul, ubicado en el centro de las mismas, denota la presencia de tejido muerto. **(D)** Estado macroscópico de las colonias estudiadas que se correlacionan con los días de análisis del nivel de clorofila y muerte celular. Para cada condición se realizaron cuatro réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar y los controles a la línea wt o 23 en condiciones estándar de cultivo.

Los resultados de este estudio demuestran que a día cero post-tratamiento las colonias mutantes y las wt presentan un mayor nivel de muerte celular y un menor contenido de clorofila en comparación con el control sin tratar, lo cual se correlaciona con lo observado a nivel macroscópico de las colonias no existiendo diferencias entre ellas. En la etapa de recuperación, el nivel de muerte celular comienza a disminuir en comparación con el valor inicial (día 0) para ambas líneas, destacando que el tejido muerto se ubica a nivel central de las colonias asociado al color amarillo en el centro. Esta región coincide con la zona de color azul luego del tratamiento con el colorante vital (Figura 4.19 C). Además, se observa una disminución inicial de la concentración de clorofila entre el día 0 y 7. Luego de este tiempo se observa un aumento del nivel de clorofila.

En los estudios cuantitativos que se llevaron a cabo para este tratamiento, se destaca que no existió diferencia entre el comportamiento de las líneas wt y 23 y que ninguna alcanzó los valores del control para contenido de clorofila o muerte celular en los días de estudio. La tendencia que se presenta en los gráficos indicaría que en un tiempo mayor de estudio los valores de clorofila y muerte celular alcanzarían valores similares al de los controles.

4.5.2.2 Efecto del estrés osmótico generado por manitol

En el presente estudio, se evaluó el comportamiento de la línea *knockout* 23 frente a concentraciones de 0.4 M y 0.9 M de manitol.

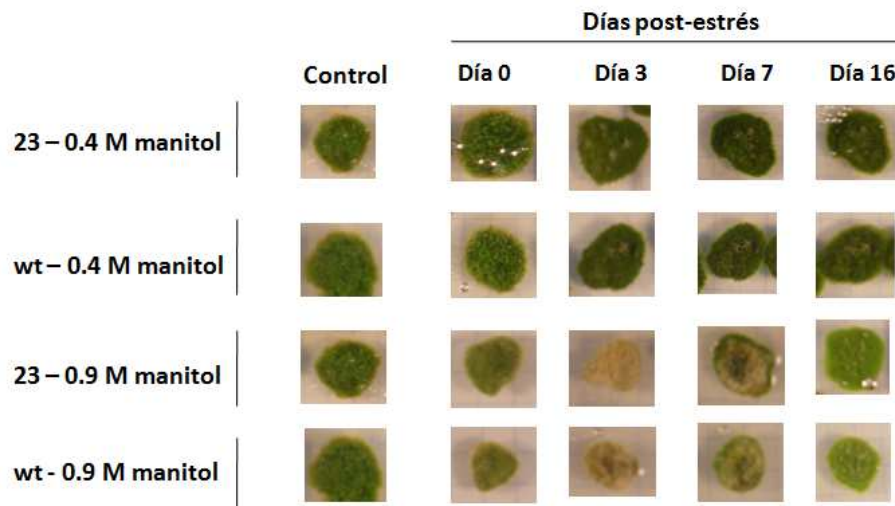


Figura 4.20 Evaluación del estado de las colonias luego de someterlas a 0.4 o 0.9 M de manitol por 15 días. El día 0 corresponde a las colonias luego del estrés mientras que los días 3, 7 y 16 corresponden a la recuperación.

Ambas líneas, la silvestre y la mutante, se recuperaron al tratamiento con manitol en las dos concentraciones ensayadas. Los cambios fenotípicos más evidentes se observaron a 0.9 M destacando que existen diferencias claras entre las colonias recuperadas luego de haber sido sometidas a 0.4 o 0.9 M.

Los resultados obtenidos indican que el tejido vegetal no parece desarrollar crecimiento vertical a 0.9 M ya que no se observan gametóforos desarrollados que sí se observan para el caso de 0.4 M. Por otro lado, el crecimiento radial de las colonias silvestre y mutante se ve reducido. Otra observación a destacar es que las colonias sometidas a 0.9 M en la etapa de recuperación generan un halo verde de crecimiento que rodea la colonia. Tomando en cuenta estos resultados y considerando que la línea *knockout* se recupera de forma similar a la wt, se estudiará su comportamiento fenotípico a nivel cuantitativo en condiciones de 0.9 M de manitol. Los resultados se muestran en la figura 4.21.

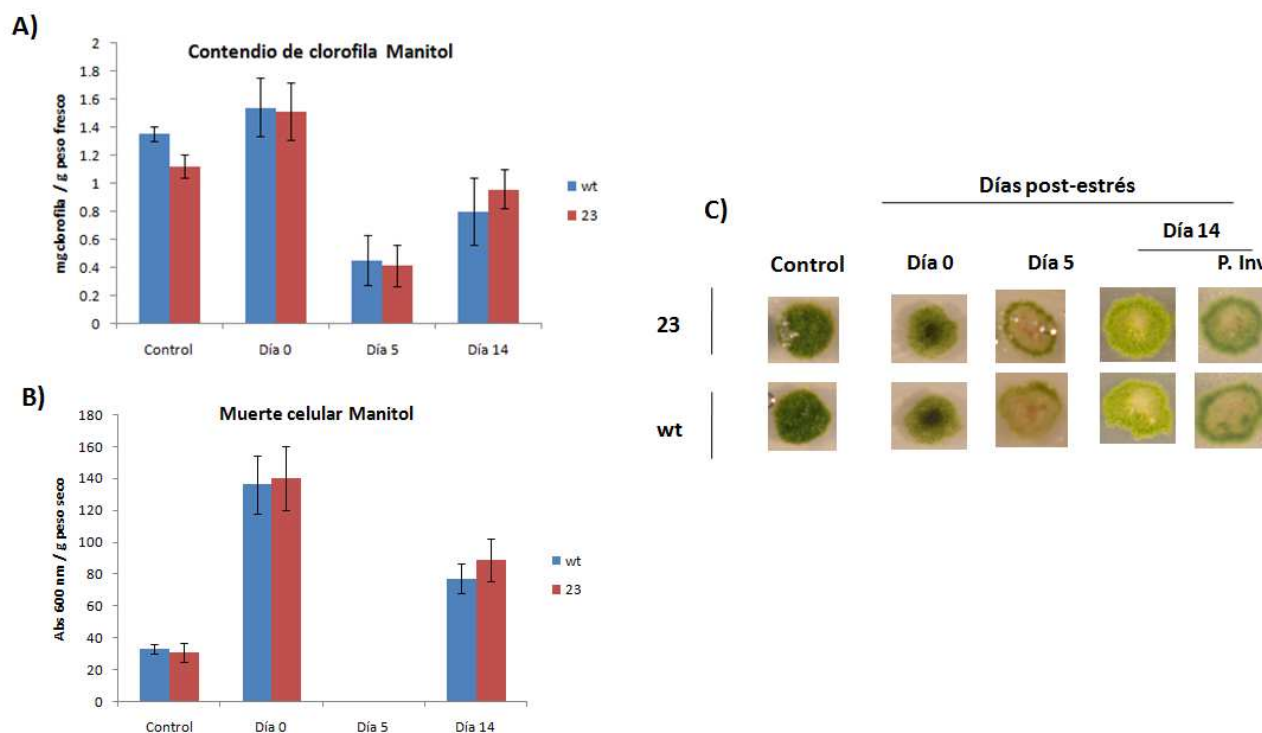


Figura 4.21 Evaluación fenotípica de las colonias luego de exponerlas por 15 días a 0.9 M de manitol. **(A)** Contenido de clorofila expresado como la relación entre los miligramos de clorofila y los gramos de peso fresco de las colonias wt y 23 a día 0 y durante recuperación. **(B)** Muerte celular expresado como la relación entre absorbancia registrada a 600 nm y gramos de peso seco. **(C)** Estado macroscópico de las colonias estudiadas que se correlacionan con los días de análisis del nivel de clorofila y muerte celular. Para el día 14 de recuperación se registraron dos fotos, una de placa directa y otra de placa invertida (P. Inv). Para cada condición se realizaron cuatro réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A día cero, el nivel de clorofila es mayor al control (colonias cultivadas en condición estándar) para ambas muestras, luego desciende para posteriormente aumentar. Este comportamiento fue similar al observado para estas líneas en cloruro de sodio.

Con respecto al nivel de muerte celular, éste es mayor a día cero en comparación con el control. Luego estos valores disminuyen.

Los resultados obtenidos aquí demuestran que parece no existir diferencia en la recuperación de ambas líneas.

4.5.2.3 Efecto del estrés térmico

Previo a realizar los ensayos cuantitativos, se sometió al mutante 23 a 3 y 6 días a una temperatura de 37°C bajo condiciones de intensidad de luz y humedad constante los que se detallan en la sección Materiales y métodos (Figura 4.22).

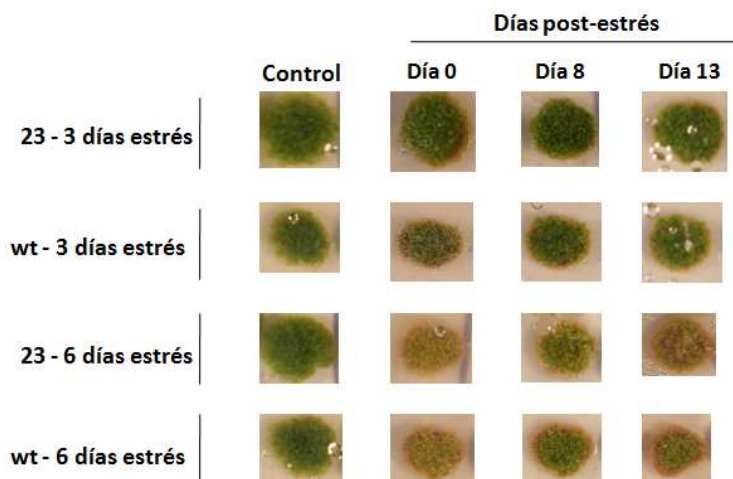


Figura 4.22 Evaluación del estado de las colonias luego de someterlas a 3 o 6 días a una temperatura de 37°C bajo humedad e intensidad de luz controlada. El día 0 corresponde al tejido vegetal luego del estrés mientras que los días 8 y 13 corresponden a la recuperación. El control corresponde a la línea silvestre o mutante en condiciones normales de cultivo.

Los resultados obtenidos son claros: las líneas sometidas a 3 días de estrés parecen no diferir demasiado de los controles. A 37°C por 6 días parecen tener menos clorofila ya que la intensidad de verde es mucho menor. No parece existir diferencia cualitativa entre la línea wt y 23. Además parecería que las líneas sometidas a 6 días de estrés aún no se han recuperado del todo luego de 13 días post-estrés ya que presentan un estado muy parecido al inicial pero con una mayor intensidad de verde. Al observar estos resultados macroscópicos, se planteó el estudio cuantitativo sometiendo al tejido vegetal a 4 días de estrés térmico a 37°C, tiempo medio entre 3 y 6 días de estrés (figura a continuación).

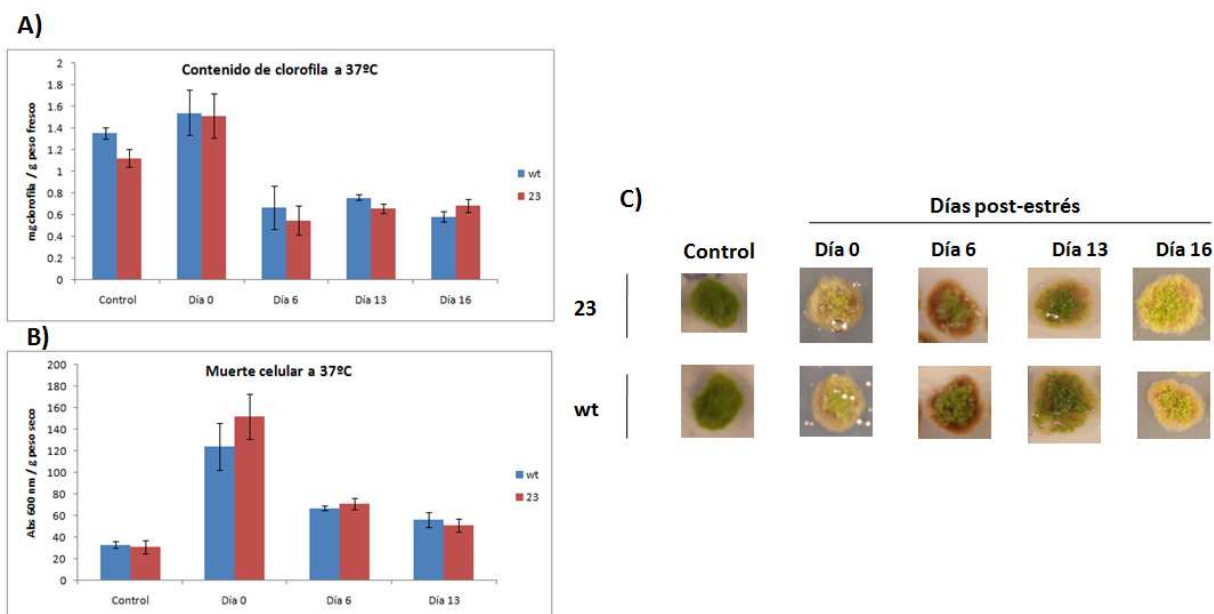


Figura 4.23 Evaluación fenotípica de las colonias luego de exponerlas por 4 días a una temperatura de 37°C bajo humedad e intensidad de luz controlada. (A) Contenido de clorofila expresado como la relación entre los miligramos de clorofila y los gramos de peso fresco de las colonias wt y 23 a día 0 y durante la recuperación. (B) Muerte celular expresado como la relación entre absorbancia registrada a 600 nm y gramos de peso seco. (C) Estado macroscópico de las colonias estudiadas que se correlaciona con los días de análisis del nivel de clorofila y muerte celular. Para cada condición se realizaron cuatro réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El nivel de clorofila de las muestras control parece ser menor al nivel de clorofila en las colonias expuestas al estrés. Si se considera el desvío, los valores no parecen diferir entre ellos. En los días post-estrés, este nivel desciende a valores inferiores al control. No se observó diferencia en el contenido de clorofila entre las muestras wt y 23 para los días estudiados. Con respecto al nivel de muerte celular a día 0, es mayor al control pero no existe diferencias entre las líneas.

Las fotos obtenidas indican que no parece existir diferencia en el aspecto global de las colonias analizadas considerando los días post-estrés si bien a simple vista parecería que el control tuviese más clorofila que las colonias tratadas.

4.6 Búsqueda y caracterización de otras posibles histonas H1

4.6.1 Búsqueda bioinformática de posibles genes codificantes para histonas del tipo H1

Durante su tesis de Maestría, C. Abreu (Abreu, C., 2009) llevó a cabo la búsqueda bioinformática en el genoma de *P. patens* de genes que codifican histonas tipo H1. Para ello, realizó una búsqueda en las bases de datos Physcobase y JGI, considerando secuencias expresadas y de ADN genómico para el organismo *P. patens*. Trabajó con homología a nivel aminoacídico con los dominios globulares de distintas histonas tipo H1 de los organismos *A. thaliana*, *S. lycopersicum* L y *Z. mays*.

De este modo identificó 9 posibles histonas tipo H1, estudió las características proteicas de éstas a través de cálculos teóricos, haciendo hincapié en el peso molecular, punto isoelectrico y composición en residuos aminoacídicos. Para la identificación de posibles genes codificantes para histonas tipo H1, consideró que estas proteínas altamente conservadas poseen un peso molecular entre 25 a 35 KDa, punto isoelectrico mayores a 10, carencia de residuos de cisteínas y triptófanos entre otras características. Posteriormente, realizó un estudio filogenético a partir de los residuos aminoacídicos del dominio globular de estas proteínas.

Los resultados obtenidos sugirieron que las secuencias de los genes *Pp1s33_295* (Alias *Phypa_206410*), *Pp1s72_277* (Alias *Phypa_232290*), *Pp1s3_400* (Alias *Phypa_64749*), *Pp1s27_179* (Alias *Phypa_70268*) y *Pp1s53_134V6* corresponderían a histonas tipo H1, destacándose que esta última sería la histona denominada *PpH1* en el trabajo de Abreu.

C. Abreu realizó predicciones de estructura secundaria de estas proteínas pero sus resultados fueron poco concluyentes, ya que como se argumenta en su tesis, las estructuras de α -hélices y láminas β no son predichas con exactitud. Este estudio no fue repetido en este trabajo.

En este trabajo se realizó una actualización de posibles secuencias que codifiquen histonas tipo H1 en las bases de datos NIBB PHYSCObase, JGI, Cosmoss, y Phytozome (detallado en la sección Materiales y métodos) considerando homología a nivel aminoacídico con los dominios globulares de las histonas tipo H1 de *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Aspergillus nidulands*, *Oryza sativa Indica* y *Populus trichocarpa*. Los resultados que se obtuvieron fueron idénticos a los reportados por Abreu.

Las posibles secuencias codificantes para Histonas tipo H1 en *P. patens* serían *Pp1s3*, *Pp1s27*, *Pp1s33* y *Pp1s72*. Su alineamiento aminoacídico se muestra en el Anexo 1.

4.6.2 Estudio de la expresión de las posibles histonas en estadio gametóforo bajo condiciones estándar de cultivo

Una vez puesto a punto el programa de termociclado para la amplificación de los genes *Pp1s3*, *Pp1s27*, *Pp1s33* y *Pp1s72* sobre ADN genómico como molde, se procedió a evaluar su nivel de expresión mediante PCRs a tiempo final utilizando como molde ADN copia obtenido a partir de ARN proveniente de gametóforo de la línea silvestre crecido en condiciones estándar.

Para ello se extrajo ARN según el protocolo detallado en Materiales y métodos y se chequeó la calidad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones no desnaturizantes. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción empleando la enzima SuperScript III trabajando con “random primers” y se corroboró si existía presencia de ADN genómico en la muestra. Empleando los cebadores H1-5´ ForKpnI y H1-5´ RevHindIIIv, los cuales hibridan en el gen *PpH1* a nivel de dos exones consecutivos separados por un intrón de 245 pb, el producto de PCR de 532 pb indica amplificación sobre molde de ADN copia mientras que el producto de 778 pb indica la presencia indeseada de ADN genómico (Figura 4.24). Todos los ADN copias trabajados amplificaron una única banda a la altura de 500 pares de bases lo que permitió afirmar que los mismos no contenían ADN genómico.

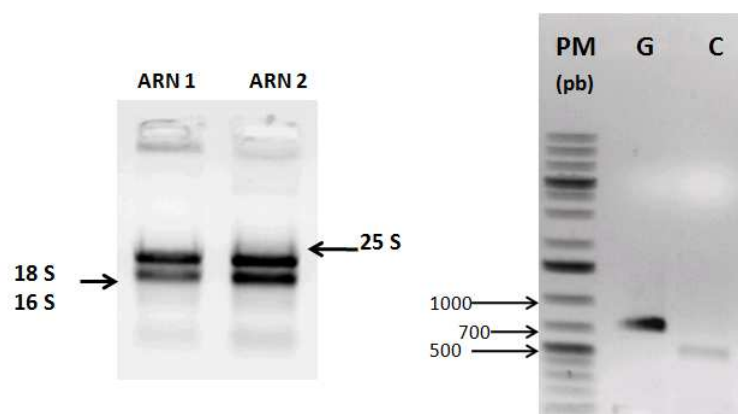


Figura 4.24 (izq) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de ARN. El ARN obtenido es de buena calidad ya que se observan dos bandas intensas de ARN ribosomal correspondientes a 25S y 18S y 16 S respectivamente. **(der)** Control de contaminación con ADN genómico. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se demuestran los productos de amplificación de los cebadores H1-5´ ForKpnI y H1-5´ RevHindIIIv sobre ADN genómico de la línea silvestre (G) o sobre ADN copia (C). Los productos esperados son de 778 pb para ADN genómico y 532 pb para ADN copia. Esta figura es la esperada ya que se demuestra la no presencia de ADN genómico luego de la retrotranscripción.

Posteriormente, se realizaron PCRs a tiempo final para evaluar el nivel de expresión de las posibles histonas *Pp1s3*, *Pp1s27*, *Pp1s33* y *Pp1s72* en condiciones estándar de crecimiento para el estadio gametóforo silvestre. Para ello se trabajó con el ADN copia obtenido y los programas de termociclado puestos a punto para cada par de cebadores sobre ADN genómico. Para ambos casos, genómico y copia, los tamaños esperados son idénticos y se detallan más adelante en esta sección. Los resultados se muestran en la figura 4.25.

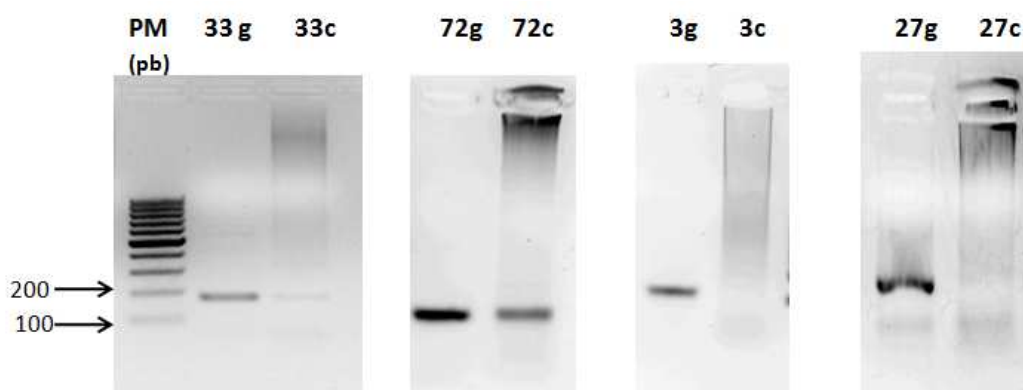


Figura 4.25 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR empleado los distintos juegos de cebadores para las posibles histonas tipo H1. El número representa la histona a estudiar, *Pp1s3* (3), *Pp1s27* (27), *Pp1s33* (33) y *Pp1s72* (72) respectivamente, (g) representa la amplificación empleando como molde ADN genómico mientras que (c) indica PCR realizada sobre ADN copia. Se muestra que todos los cebadores amplifican sobre ADN genómico, no así trabajando con ADN copia.

No fue posible amplificar a partir de ADN copia las posibles histonas *Pp1s3* y *Pp1s27* como lo demuestra en la figura 4.25 carriles 3C y 27C. Por otro lado, los ADN copias de las posibles histonas *Pp1s33* y *Pp1s72* sí pudieron ser amplificadas y por lo tanto dichos genes serán caracterizados en este trabajo. Es de destacar que no se puede comparar las intensidades de bandas entre estas dos muestras (y por lo tanto su nivel de expresión) ya que las mismas deben ser previamente normalizadas frente a la intensidad de banda de un gen *housekeeping* actina.

4.6.3 Obtención del vector de expresión para el estudio de la localización subcelular de las posibles histonas *Pp1s33* y *Pp1s72*

Para evaluar si los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* codifican proteínas nucleares, se construyeron plásmidos en los que dichas secuencias codificantes se encontraban fusionadas a la secuencia de la proteína verde fluorescente. Para ello, se obtuvo ADN copia a partir de ARN de colonias crecidas en medio estándar, se amplificó la secuencia codificante de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* para posteriormente clonaras en el vector de expresión pK7FWG2.0 empleando el sistema Gateway. Esto permitió la fusión de la secuencia de los genes a la secuencia de la proteína verde fluorescente, obteniendo como producto de la traducción las proteínas codificadas por *Pp1s33* o *Pp1s72* fusionadas a nivel Ct con la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP).

En este experimento, se empleó una ADN polimerasa de alta fidelidad, la enzima KAPA HiFi, y los cebadores Pp33-DONR y Pp72-DONR *forward* y *reverse* para amplificar las secuencias codificantes de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72*. El cebador *forward* contiene en el extremo 5' una región denominada attB1 de 31 pb seguida, hacia el extremo 3', de la secuencia del gen de interés la cual comienza con el primer triplete codificante y se continúa con 13 a 16 bases de la secuencia codificante. Por otro lado, el cebador *reverse* posee entre 18 a 25 bases complementarias a nivel de la región 3' del gen en el cual el codón de terminación es eliminado y le sigue, hacia el extremo 3', la región denominada attB2. Ambas regiones, attB1 y attB2 serán esenciales para que el producto amplificado sea insertado en el vector de entrada pDONR/ZEO mediante recombinación por acción de la enzima BP clonasa (Figura 4.26).

Luego de llevar a cabo esta reacción de recombinación, se procedió a transformar células electrocompetentes *E. coli* DH5 α con el plásmido obtenido denominado pDONR-Pp1s33 y pDONR-Pp1s72 (identificado en la figura 4.26 como pDONR-GEN) y se seleccionaron, para realizar

minipreps, aquellos clones que crecieron en medio LB low salt suplementado con 50 ug/mL de zeocina.

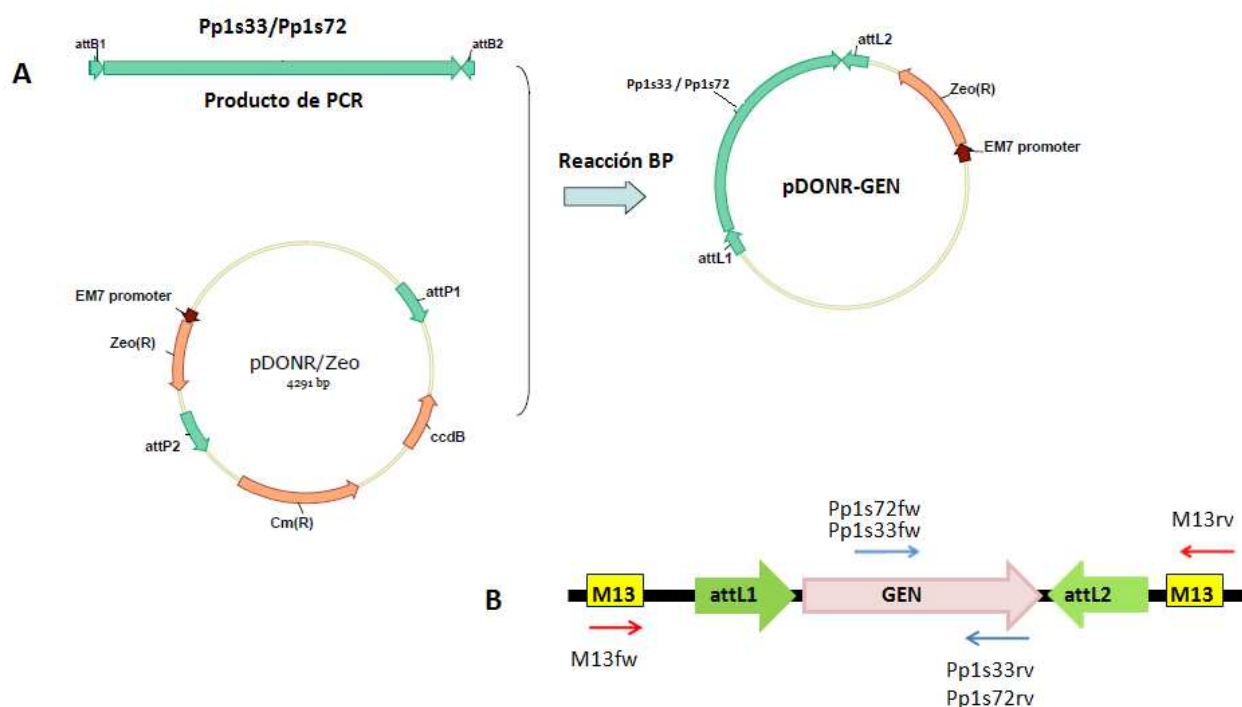


Figura 4.26 (A) Esquema de la reacción BP entre el producto de PCR amplificado y el vector pDONR/ZEO. El producto de PCR obtenido contiene en sus extremos las regiones denominadas *attB1* y *attB2*, las cuales son reconocidas por la enzima BP y recombinadas en el plásmido pDONR/ZEO a nivel de *attP1* y *attP2*. El vector denominado pDONR-GEN obtenido luego de la recombinación homóloga, carece de la región *ccdB* (gen empleado en la selección negativa de los transformantes) y confiere resistencia a zeocina (gen ZEO (R) sujeto bajo la actividad del promotor EM7). (B) Esquema de la región comprendida entre *attL1* y *attL2* en el vector pDONR-GEN. Por fuera de estas regiones se encuentra la secuencia M13 la cual será empleada para el chequeo de la correcta inserción y orientación del producto deseado. Se indican en rojo los cebadores para la región M13 y en azul aquellos correspondientes al gen de interés. GEN hace referencia a *Pp1s33* o *Pp1s72*.

Los plásmidos obtenidos de 5 colonias transformantes para cada construcción fueron analizados mediante PCR empleando los cebadores *Pp1s33fw* o *Pp1s72fw* y *M13rv*, esperando productos de amplificación de 368 pb y 351 pb respectivamente. Se destaca que solamente una correcta inserción del producto generará el amplicón deseado. De las 10 colonias analizadas, 5 para el gen *Pp1s33* y 5 para *Pp1s72*, todas poseían el producto de PCR en la orientación correcta, por lo que se seleccionó un plásmido para cada gen y se secuenció la región de interés empleando los cebadores *M13fw* y *M13rv* (los resultados no se muestran). Luego de corroborar que no existían mutaciones en la secuencia de los genes de interés, se procedió con la reacción LR (ver Figura 4.27) entre el vector pDONR-GEN y el vector de expresión pK7FWG2.0 de forma de fusionar a nivel del extremo Ct de la proteína GFP la proteína codificada por *Pp1s33* y *Pp1s72* (Karimiet al, 2002).

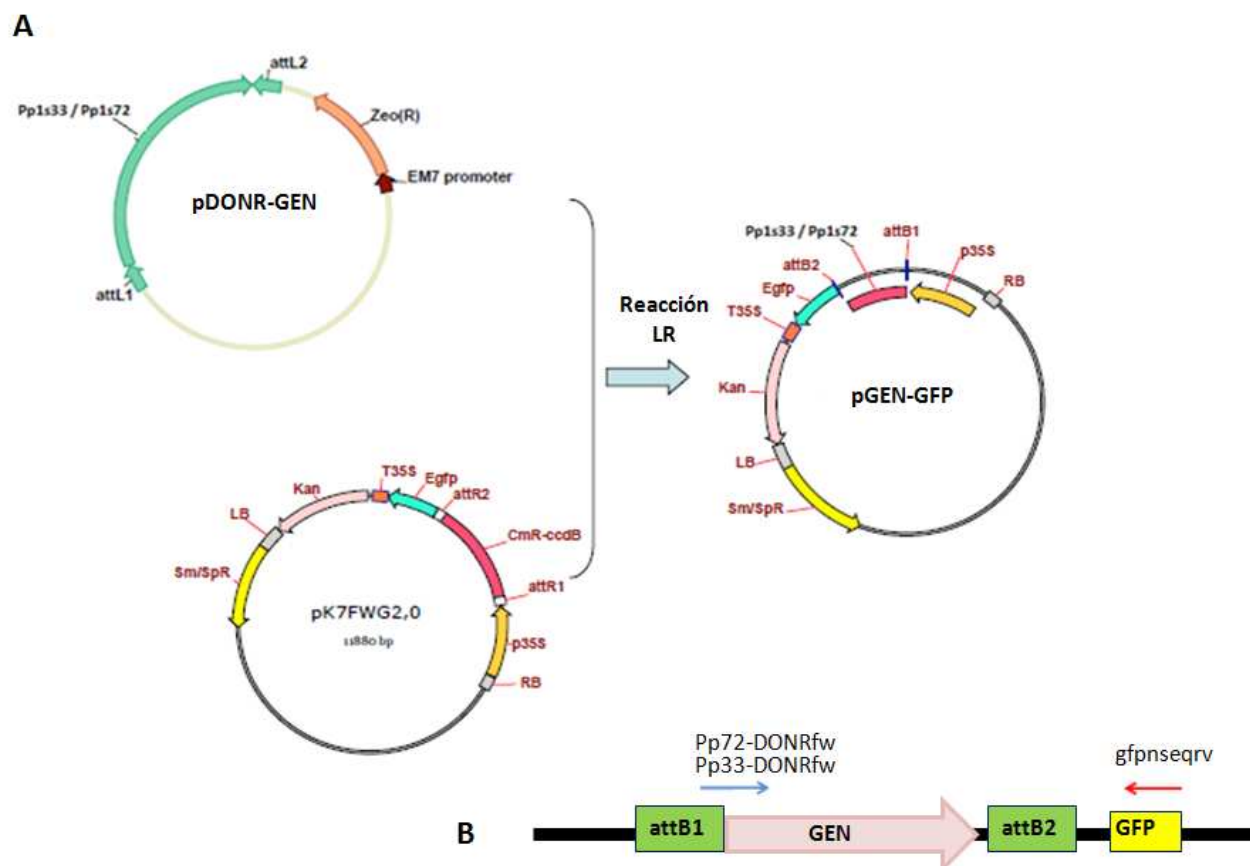


Figura 4.27 (A) Reacción LR entre el vector pDONR-GEN y pK7FWG2.0. Mediante la reacción LR se logra recombinar los vectores pDONR-GEN con pK7FWG2.0 a nivel de attL1/attL2 y attR1/attR2 respectivamente. Esto genera un vector de expresión denominado pGEN-GFP en el cual la secuencia de *Pp1s33* o *Pp1s72* se encuentra fusionada a la proteína verde fluorescente GFP. Referencias: p35S- promotor pCaMV35S, T35S- terminador, Egfp- GFP, Kan- gen que proporciona resistencia a kanamicina, Sm/SpR- confiere resistencia a espectinomocina, ccdB- gen empleado en la selección negativa de los transformantes, ZEO (R)- confiere resistencia a zeocina, EM7- promotor. (B) Esquema de la región comprendida entre attB1 y GFP en el vector pGEN-GFP. Para el chequeo de la correcta recombinación mediante la reacción LR se emplearon los cebadores que se indican en azul y rojo, los *forward* hibridan en el gen de *Pp1s33* o *Pp1s72* y el *reverse* en la secuencia de la proteína GFP (gfpnseqrv).

Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α mediante electroporación y se seleccionaron aquellos transformantes que crecieron en LB suplementado con espectinomocina (50 μ g/mL) para realizar minipreps, obtener el vector de expresión y analizarlo mediante PCR. La correcta inserción de la secuencia del gen fue verificada mediante PCR empleando los cebadores Pp33-DONRfw y Pp72-DONRfw que hibridan a nivel de attB1 y el gen y, como cebador *reverse*, gfpnseqrv que hibrida a nivel de la secuencia de GFP. Los productos de amplificación esperados son de 1040 pb y 1000 pb respectivamente (los resultados no se muestran).

Una vez obtenidos los vectores de expresión para los genes *Pp1s33* y *Pp1s72*, se procedió a transformar protoplastos y hojas de tabaco mediante electroporación o transformación medida por *A. tumefaciens*.

4.6.4 Localización subcelular de los productos de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72*

Mediante este estudio se busca identificar si las proteínas codificadas por *Pp1s33* o *Pp1s72*, fusionadas a GFP colocalizan con el núcleo celular. Para ello, se empleó el colorante DAPI que posee alta afinidad por el ADN a nivel de las regiones ricas en AT.

El análisis de las construcciones de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* se llevaron a cabo mediante la transformación de hojas de tabaco empleando *A. tumefaciens* como ya fue descrito en detalle en la sección Materiales y métodos. Para la obtención de las imágenes se utilizó el microscopio confocal de la Facultad de Medicina. Los resultados se muestran a continuación:

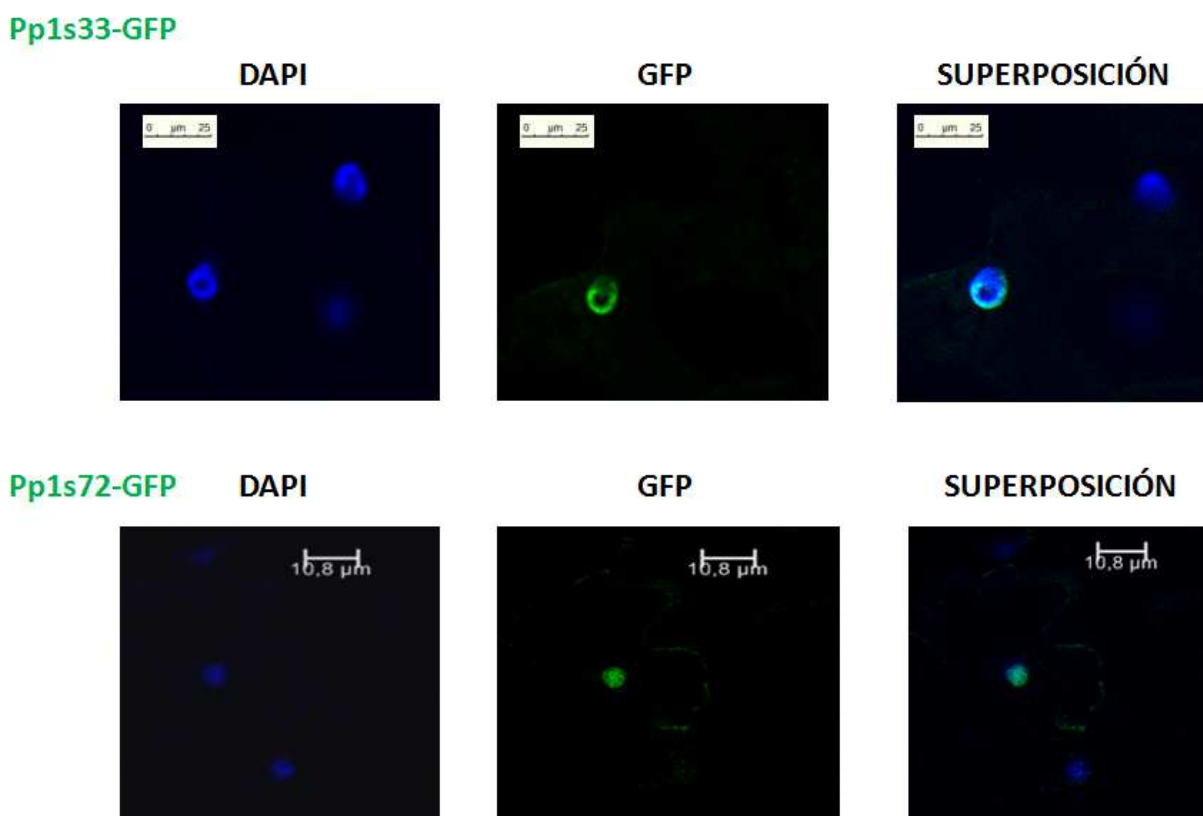


Figura 4.28 Localización subcelular de Pp1s33-GFP (**superior**) y Pp1s72-GFP (**inferior**). Se observan los canales para DAPI y GFP, incluyendo la superposición de ambas imágenes. Se destaca la colocalización entre el núcleo y la proteína verde fluorescente y núcleos que solo presentan tinción con DAPI pero no con GFP. Dichas células no fueron transformadas con *A. tumefaciens*. Objetivo: 60x.

La figura anterior muestra las imágenes obtenidas de la observación de hojas de tabaco transformadas. La superposición de las imágenes obtenidas indican que existe colocalización GFP-DAPI lo cual permite afirmar que ambas proteínas, Pp1s33 y Pp1s72 presentan una localización nuclear y por lo tanto, se reafirma su identidad como histonas tipo H1 de *Physcomitrella patens*.

4.7 Ensayos de Western blot en las líneas silvestre y mutante 23

Mediante un estudio de Western blot empleando un anticuerpo policlonal anti-H1 se esperaba poder verificar, en el caso de que no existiese un mecanismo compensatorio, una disminución en el nivel de la histona PpH1 presente en la línea mutante debido a la falta del gen codificante para esta proteína.

Se empleó un anticuerpo policlonal anti-H1 humana -Histone H1 (FL-219)-. Debido a la similitud de pesos moleculares que presentan las diferentes histonas tipo H1 predichas -Pp1s33 24 KDa, Pp1s3 y Pp1s72 28 KDa, Pp1s27 y PpH1 de 30 KDa- si el anticuerpo reconociera todas o varias de éstas, sería imposible evaluar mediante Western blot cada histona en particular. Sin embargo, se podía esperar una disminución en la intensidad de la banda a la altura de 30 KDa como resultado de la delección de *PpH1*, a menos que existiese un mecanismo de compensación involucrando a Pp1s27. Asimismo, era también razonable esperar observar variaciones de los niveles de las otras histonas H1 como resultado de este mecanismo compensatorio.

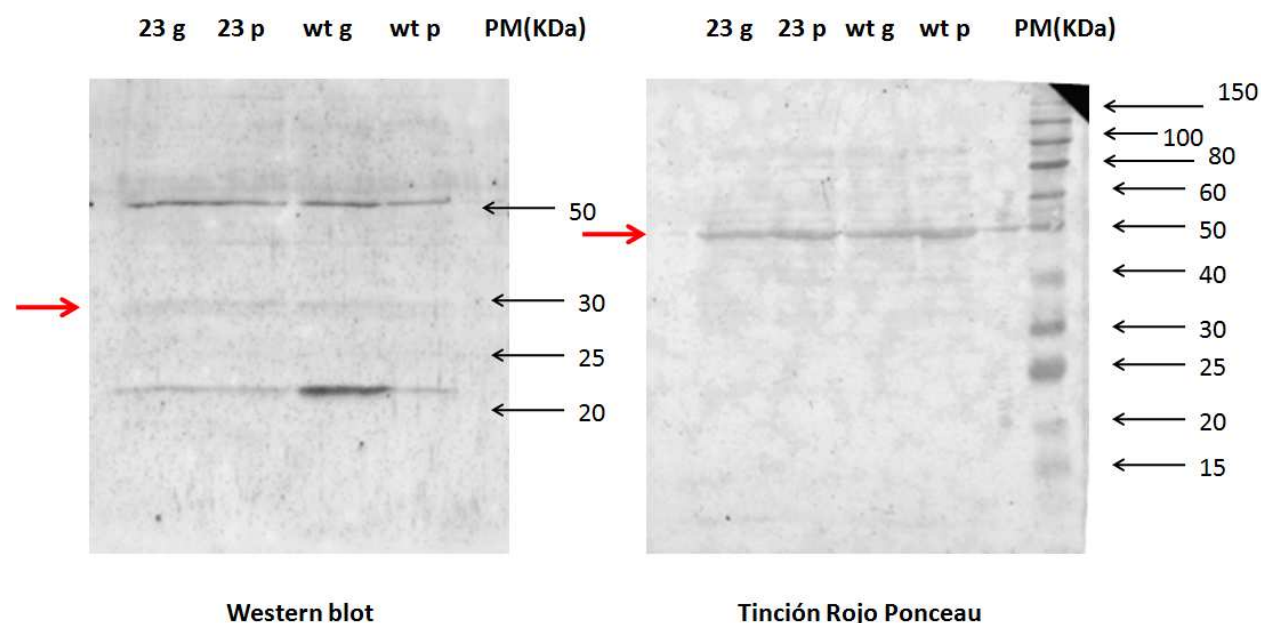


Figura 4. 29 (izq) Western blot contra histona tipo H1 en las líneas silvestre y mutante 23 en los estadios protonema (p) y gametóforo (g) en condiciones estándar de cultivo. La flecha roja indica las bandas que corresponderían a las histonas tipo H1 de 30 KDa (**der**) Tinción con Rojo Ponceau luego de realizado un *stripping*. En rojo se indica la banda perteneciente a la subunidad mayor de la enzima Rubisco. La intensidad de esta banda indica que fue sembrado en los cuatro carriles una cantidad similar de microgramos de proteína.

La banda de interés ubicada a 30 KDa es muy tenue para la línea silvestre o mutante, ya sea para el estadio gametóforo o protonema, lo que no permite concluir si existe algún cambio de intensidad asociado a la falta de PpH1 o un mecanismo de compensación notorio por parte de las otras variantes de histonas tipo H1.

A su vez, se observan bandas una a un peso molecular alrededor de 50 KDa y otra banda menor entre 20 y 25 KDa. La banda de 50 KDa no correspondería a una histona tipo H1 ya que su peso es mayor a los pesos característicos de histonas tipo H1, ubicados entre 25 a 35 KDa (Abreu, C., 2009). Por otro lado, la banda de menor peso molecular identificada por el anticuerpo podría corresponder a la histona Pp1s33 pero se destaca que su peso molecular es menor a 24 KDa por lo que no se

descarta que corresponda a una banda inespecífica. Interesantemente, esta última presenta una intensidad mayor para la línea silvestre en estadio gametóforo si se la compara con el mutante 23.

4.8 Evaluación del nivel de expresión de histonas tipo H1 y genes relacionados al estrés abiótico mediante PCR en tiempo real

El estudio de expresión a nivel de ARN mensajero de los genes de interés se llevó a cabo por PCR en tiempo real. Los genes codificantes para histonas tipo H1 estudiados fueron *PpH1* (*Pp1s53_134V6*), *Pp1s33* (*Pp1s33_295V6*) y *Pp1s72* (*Pp1s72_277V6*). Asimismo, se estudió el comportamiento de la línea mutante frente a estrés abiótico, ya que se ha vinculado a la histona H1 con la regulación de la expresión de genes relacionados con este tipo de estrés (Kim *et al*, 2010). A su vez, en esta sección se incluirá el estudio del nivel de expresión de los genes de respuesta a estrés abiótico *PpABR170* (*Pp1s51_28V6*), *PpLys* (*Pp1s4_282V6*) y *PpHSP16.4* (*Pp1s27_331V6*). Para todos los casos los resultados fueron normalizados mediante la utilización del gen que codifica para la actina (*Pp1s381_18V6*) como gen de referencia.

En un principio, mediante PCR a tiempo final, se pusieron a punto los programas de termociclado que fueron los empleados para los programas de las PCRs en tiempo real trabajando con ADN genómico como molde. Se analizaron las curvas de desnaturalización (Derivada primera de la Intensidad de fluorescencia con respecto a la Temperatura versus Temperatura) obtenidas mediante PCR en tiempo real para evaluar que los productos amplificados fueran únicos. De esta forma, si se observaba un pico único en este gráfico el resultado indicaba que se obtuvo un solo producto de amplificación (D'haene *et al*, 2010) destacando que los picos ubicados a temperaturas menores corresponderían a dímeros de cebadores.

El modelo que se empleó para la cuantificación relativa de los ADN copia se detalla en la sección Materiales y métodos, y considera las diferentes eficiencias de amplificación para los juegos de cebadores empleados (Pfaffl M. W., 2001). Para ello, se determinó la eficiencia de los distintos cebadores trabajando con una dilución de ADN genómico de concentración 50 ng/μL y diluciones seriadas al cuarto hasta alcanzar una dilución de 1/4096. Dos microlitros de estas diluciones fueron utilizadas como molde para la amplificación (reacción que fue realizada por triplicado). Los Cts obtenidos fueron empleados para determinar la eficiencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes *PpH1*, *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpLys*, *PpABR170*, *PpHSP16.4* y el gen de actina. La figura 4.30 ilustra los resultados obtenidos para el par de cebadores que amplifican el gen *PpABR170*, los cuales fueron similares para el resto de los genes. Los resultados determinados para cada par de cebadores se muestran en la Tabla 4.1.

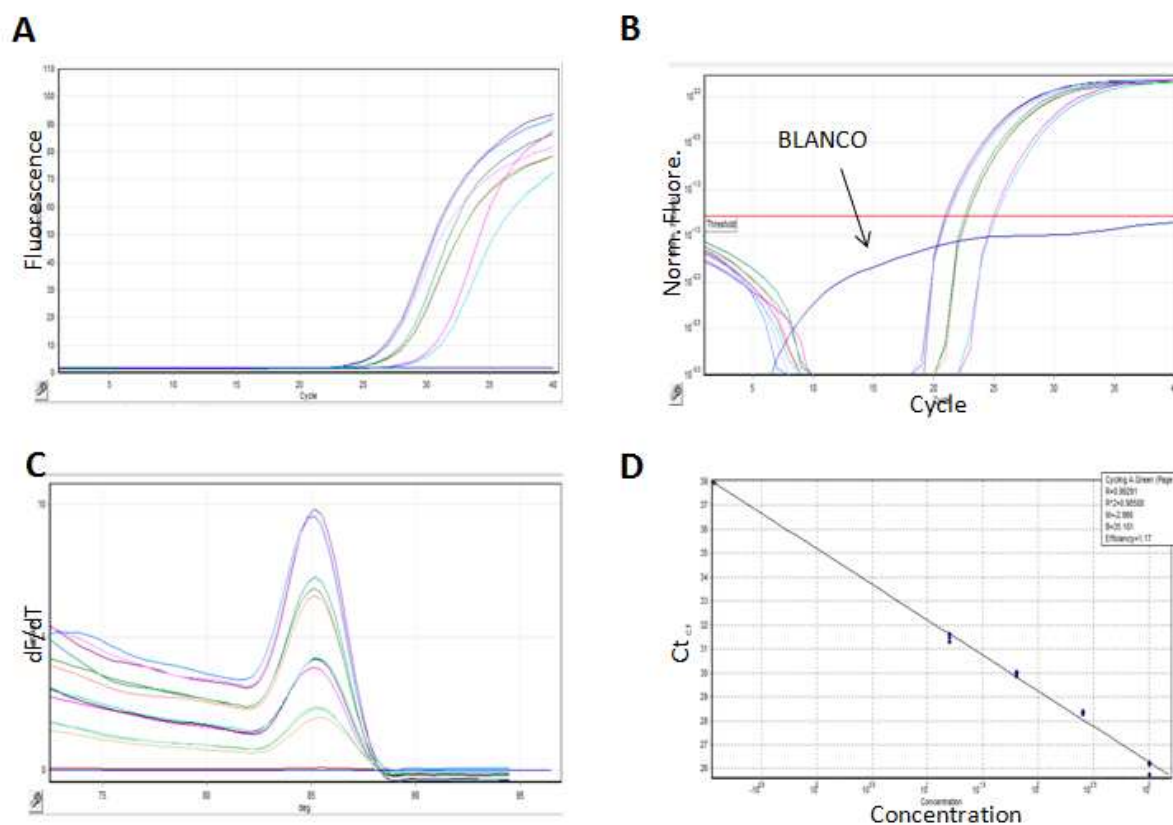


Figura 4.30 PCR en tiempo real del gen PpABR170 sobre ADN genómico. **(A)** Fluorescencia versus ciclos. Se observa como la fluorescencia comienza a aumentar a partir del ciclo 25. **(B)** Fluorescencia normalizada versus ciclos. Aquí se empleó corrección de pendiente (“slope correction”). La línea roja representa el *threshold*. Se indica además la curva perteneciente al blanco. **(C)** Curvas de desnaturalización para los productos amplificadas. Nótese el pico único del gráfico que indica que se obtuvo un único producto de amplificación. **(D)** Eficiencia de los cebadores empleados. Se grafica Ct versus Concentración, definiendo el valor de 1 a la concentración 1/4096 y el valor de 4096 a la dilución de 50 ng/ μ L.

Tabla 4.1: Valores de eficiencias determinadas junto con los coeficientes de correlación para cada par de cebadores utilizados.

Cebadores (fw y rv)	Eficiencia calculada	Coef. de correlación
Actina	1.91	0.9973
Pp1s33	2.17	0.9929
Pp1s72	1.97	0.9940
BQ82I2	1.97	0.9824
PpLys	1.90	0.9989
PpABR170	2.03	0.9908
PpHSP16.4	2.57	0.9896

Como referencia se considerará que eficiencias aceptables se encuentran entre los valores 1.8 y 2.2, correspondientes al 90% y 120% de la eficiencia ideal la cual asume un valor de 2. Este valor indica que durante una ronda de PCR la concentración del producto duplica su concentración inicial (Applied Biosystems; Nolan *et al*, 2006).

Por otro lado, las eficiencias de amplificación fueron aceptables para todos los cebadores excepto para el par PpHSP16.4, cuyo valor de eficiencia fue de 129%, valor mayor al deseado. Se decide entonces que el mismo no será tenido en cuenta en los análisis posteriores mediante PCR en tiempo real. Como alternativa se realizó un estudio semicuantitativo de este gen mediante PCR en tiempo final (ver *Determinación semicuantitativa de la expresión de PpHSP16.4 mediante PCR en tiempo final*).

Para evaluar el nivel de expresión de los genes estudiados, se obtuvo ADN copia de muestras control y sometidas a los distintos tratamientos de estrés (ver Materiales y métodos). Se chequeó la ausencia de ADN genómico en éstos mediante PCR en tiempo final empleando los cebadores Actinafw y Actinarv. Los mismos generan un producto de amplificación de 107 pares de bases a partir de ADN copia y 404 pb a partir de ADN genómico. Posteriormente, este chequeo se llevó a cabo empleando PCR en tiempo real para asegurar que se estaba trabajando con una muestra de buena calidad, ya que la sensibilidad de este estudio es mayor a la determinada por gel (Figura 4.31).

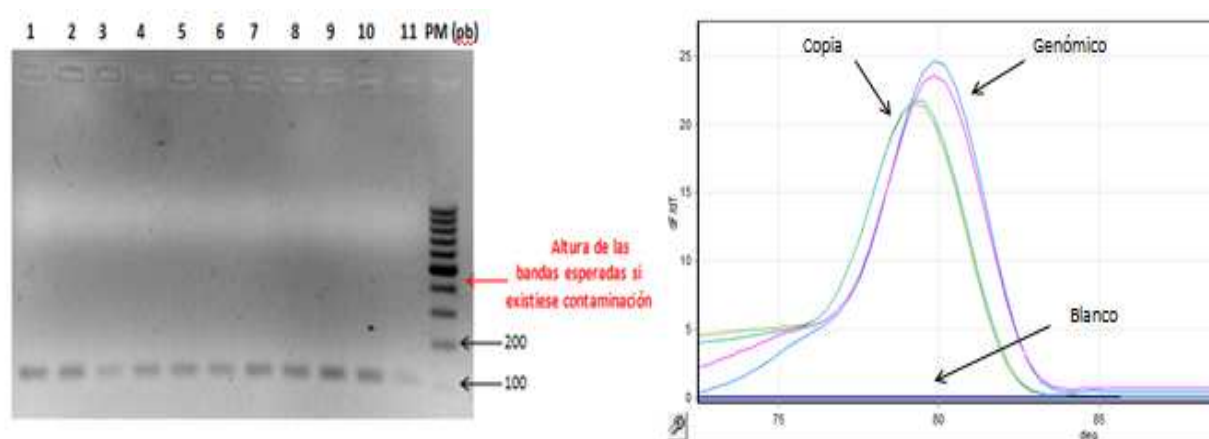


Figura 4.31 Resultados del análisis de contaminación del ADN copia con ADN genómico empleando los cebadores Actinafw y Actinarv. **(izq)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR amplificados a partir de ADN copia. La banda comprendida entre 100 y 200 pb implica amplificación sobre el copia. No se observa amplificación a la altura de 400 pb por lo que se descarta la presencia indeseada de ADN genómico. Carril: 1 y 2- wt protonema, 3 y 4- wt gametóforo, 4 y 5- Mutante 23 protonema, 6 y 7- Mutante 23 gametóforo, 8 y 9- wt sometido a NaCl, 10 y 11- Mutante 23 sometido a NaCl. **(der)** Curvas de desnaturalización para una muestra de ADN copia, ADN genómico y para el blanco amplificadas con el mismo programa utilizado para PCR en tiempo final. Nótese como los picos de las curvas obtenidas difieren entre muestras.

Una vez verificada la ausencia de ADN genómico en las muestras de los ADN copias, se procedió a realizar las PCR en tiempo real para cada par de cebadores, trabajando con replicas técnicas y promediando los Ct obtenidos, para utilizarlos en los cálculos del cociente de expresión relativa (R). A su vez, cada control y tratamiento implicó triplicados biológicos. De esta forma, se determinó el R para cada uno de ellos, se los promedió y se determinó el desvío estándar. La obtención de la muestra se detalla en Materiales y métodos al igual que el cálculo de R.

4.8.1 Análisis del nivel de expresión de los genes *PpH1*, *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpLys* y *PpABR170* en condiciones estándar de crecimiento

En este estudio lo que se pretende evidenciar es un posible efecto compensatorio por parte de las otras histonas tipo H1 a nivel de la línea mutante. A su vez, se busca evaluar si existe una alteración a nivel de expresión de los genes *PpLys* y *PpABR170* en la línea mutante debido a la falta de *PpH1*.

Los genes estudiados fueron *PpH1*, *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpLys* y *PpABR170* en los estadios de desarrollo de protonema y gametóforo para la línea silvestre y mutante. Se evaluó el nivel de expresión relativa (R) del gen *PpH1* en la línea silvestre en estadio gametóforo respecto al estadio protonema. Para el estudio del resto de los genes, se evaluó el nivel de expresión relativa del mutante respecto al silvestre para los estadios protonema y gametóforo (Tabla 4.2 y Figura 4.32).

Tabla 4.2 Nivel de expresión relativa (R) de los genes de estudio en condiciones estándar de crecimiento para los estadios protonema y gametóforo realizado por triplicado biológico. El nivel de expresión relativo del gen <i>PpH1</i> en la línea silvestre se determinó considerando el estadio gametóforo respecto a protonema, mientras que para el resto de los genes, se calculó el nivel de expresión en la línea mutante frente a la silvestre. gam: gametóforo. proto: protonema.			
Gen	Muestra	Promedio R	Desviación estándar
<i>PpH1</i>	wt proto / wt gam	1.1	0.7
<i>Pp1s33</i>	wt gam / 23 gam	6	4
<i>Pp1s33</i>	wt proto / 23 proto	0.21	0.03
<i>Pp1s72</i>	wt gam / 23 gam	18	17
<i>Pp1s72</i>	wt proto / 23 proto	1.0	0.3
<i>PpABR170</i>	wt gam / 23 gam	3.6	0.6
<i>PpABR170</i>	wt proto / 23 proto	4	1
<i>PpLys</i>	wt gam / 23 gam	6	4
<i>PpLys</i>	wt proto / 23 proto	1.4	0.5

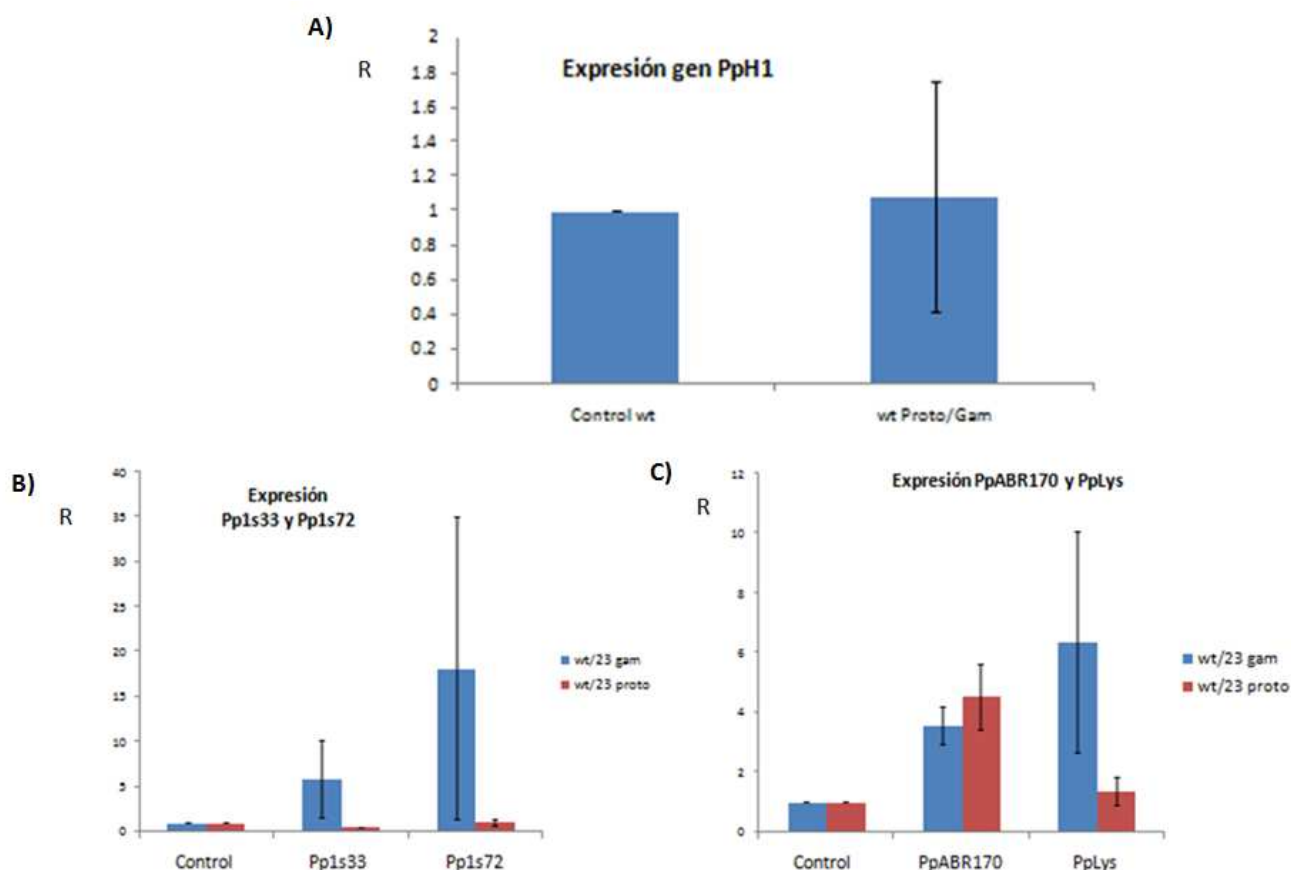


Figura 4.32 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio. Estudio (A) gen *PpH1* empleando el par de cebadores BQ82I2 (B) genes *Pp1s33* y *Pp1s72* y (C) genes *PpABR170* y *PpLys*. Los valores determinados se indican en la tabla anterior. El control de expresión relativa de un determinado gen se le asigna el valor 1 y corresponde al valor teórico determinado cuando se asume que la muestra de trabajo es igual al control. De esta forma, si los Cts son iguales para el control y la muestra, el cociente de expresión relativa corresponde a 1 unidad. Si el valor de expresión relativa experimental para el gen en estudio es mayor a la unidad significa que este gen se encuentra sobreexpresado mientras que si su valor es menor a la unidad, dicho gen estará subexpresado (Pfaffl M. W., 2001). gam: Gametóforo. proto: Protonema.

Los resultados mostrados en la figura 4.32 demuestran que la expresión del gen *PpH1* no varía entre los estadios protonema y gametóforo en la línea silvestre.

Los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* se encuentran sobreexpresados en la línea mutante respecto a la silvestre en el estadio gametóforo. Por otra parte, en la línea mutante el gen *Pp1s33* se encuentra subexpresado en el estadio protonema.

A su vez, se demuestra que el gen *PpABR170* en la línea mutante se encuentra sobreexpresado para los estadios protonema y gametóforo al igual para el gen *PpLys* en el estadio gametóforo.

4.8.2 Análisis del nivel de expresión de los genes *PpH1*, *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpABR170* y *PpLys* durante los distintos tipos de estrés abiótico en la línea silvestre

Este estudio pretende evidenciar mediante PCR en tiempo final si en la línea silvestre los niveles de expresión de *PpH1*, *Pp1s33* y *Pp1s72* se alteran debido al estrés osmótico y/o salino. A su vez, se estudiaron los niveles de expresión de *PpABR170* y *PpLys* bajo las mismas condiciones de estrés.

La muestra de ADN copia se obtuvo de cultivo sometido a condiciones de estrés osmótico (0.9 M de manitol) y salino-tóxico (0.5 M de cloruro de sodio) por 3 días mientras que la muestra control fue ADN copia del cultivo sin estrés. Los resultados de expresión relativa de los genes evaluados se calcularon como se detalla en la sección Materiales y métodos y se muestran en la Figura 4.33.

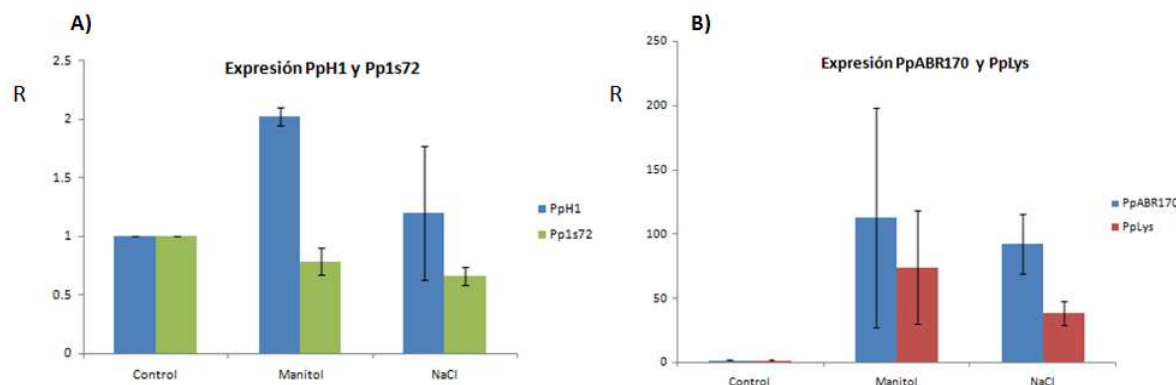


Figura 4.33 (A) Análisis del nivel de expresión relativa de los genes *PpH1* y *Pp1s72* codificantes para histonas tipo H1 en la línea silvestre. **(B)** Expresión de los genes *PpABR170* y *PpLys* bajo condiciones de estrés osmótico y salino-tóxico.

Tabla 4.3 Nivel de expresión relativa en la línea silvestre de los genes de estudio en condiciones de estrés abiótico. El control teórico corresponde a 1 unidad (Pfaffl M. W., 2001). Si el valor de expresión relativa es mayor a uno indica sobreexpresión de este gen de lo contrario es subexpresión. El gen *Pp1s33* no pudo ser amplificado de forma confiable en ninguna de las dos condiciones de estrés abiótico.

Gen	Muestra	Promedio R	Desviación estándar
<i>PpH1</i>	wt control / wt manitol	2.03	0.07
<i>PpH1</i>	wt control / wt salino	1.2	0.6
<i>Pp1s33</i>	wt control / wt manitol	-	-
<i>Pp1s33</i>	wt control / wt salino	-	-
<i>Pp1s72</i>	wt control / wt manitol	0.8	0.1
<i>Pp1s72</i>	wt control / wt salino	0.66	0.08
<i>PpABR170</i>	wt control / wt manitol	112	85
<i>PpABR170</i>	wt control / wt salino	93	23
<i>PpLys</i>	wt control / wt manitol	74	44
<i>PpLys</i>	wt control / wt salino	39	9

Los resultados obtenidos aquí demuestran que el gen codificante para la histona *PpH1* se encuentra sobreexpresado cuando se somete a la línea silvestre a estrés osmótico. A su vez, se demostró que el gen *Pp1s72* se encuentra subexpresado en condiciones de estrés osmótico o salino-tóxico. Por otro lado, no fue posible amplificar de forma confiable mediante PCR en tiempo real la

histona *Pp1s33* en condiciones de estrés salino y osmótico pero sí en condiciones estándar de cultivo. Las réplicas técnicas de los Ct para los casos de estrés abiótico no eran aceptables ya que la diferencia entre ellas era mayor a 0.5 llegando incluso a adoptar valores de 2 o, para algunos de los casos, solo una de las muestras amplificaba.

Por otro lado, se demostró una sobreexpresión de los genes *PpABR170* y *PpLys* frente a ambos tipos de estrés. Este resultado concuerda con lo ya reportado por Ruibal (Ruibal, C., 2009) en donde se demostró mediante Northern blot que estos genes se encontraban sobreexpresados si se sometía a la línea silvestre a estas mismas condiciones de estrés abiótico.

4.8.3 Análisis de perfiles de expresión génica en la línea wt y mutante durante la exposición a estrés abiótico

Para evaluar el nivel de expresión de los genes codificantes de histonas tipo H1 *PpH1*, *Pp1s33*, *Pp1s72* y los genes de respuesta a estrés abiótico *PpABR170* y *PpLys* en la línea mutante bajo condiciones de estrés abiótico se procedió de la siguiente manera. El tejido vegetal fue expuesto por 3 días a 0.5 M de cloruro de sodio (estrés salino-tóxico), 0.9 M de manitol (estrés osmótico) y a 37°C (estrés térmico) para extraer ARN. Posteriormente, se lo retrotranscribió y se realizó un estudio por PCR en tiempo real.

Estrés salino-tóxico:

Los resultados obtenidos para este estudio demostraron que el gen *Pp1s72*, *PpABR170* y *PpLys* se encuentran subexpresados en el mutante con respecto al control wt (ver Tabla 4.4 y Figura 4.34). Se destaca que el gen *Pp1s33* no pudo ser amplificado de forma confiable a partir del ADN copia obtenido bajo estrés salino. Las réplicas técnicas de los Ct no fueron aceptables a pesar de que se obtuvo buena amplificación en las muestras sin tratamiento.

Tabla 4.4 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio sometidos por 3 días a 0.5 M de NaCl. El valor del control teórico corresponde a 1 unidad. Análisis realizado por triplicado biológico.

Gen	Promedio R	Desviación estándar
<i>Pp1s33</i> wt/23	-	-
<i>Pp1s72</i> wt/23	0.3	0.1
<i>PpABR170</i> wt/23	0.4	0.3
<i>PpLys</i> wt/23	0.3	0.2

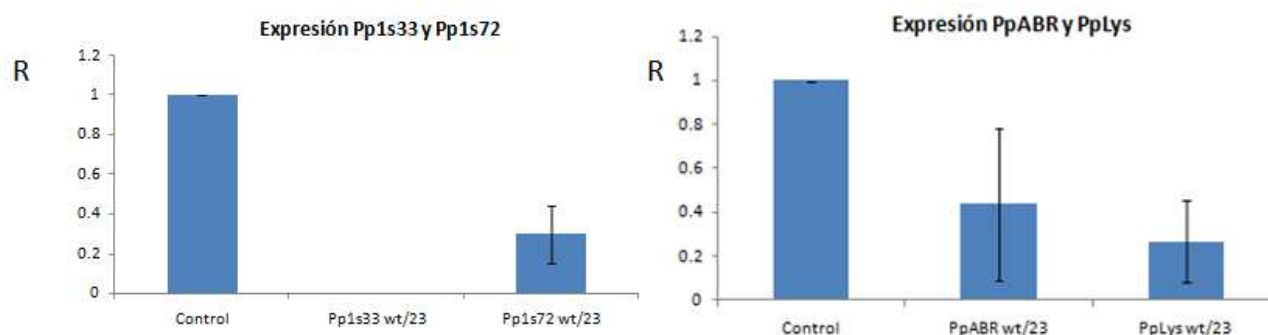


Figura 4.34 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio bajo condiciones de estrés salino. Se graficaron los valores experimentales reportados en la Tabla 4.5. Se asumió, para el cálculo de la expresión relativa, que la muestra control correspondió a la línea silvestre mientras que la muestra a analizar fue la línea 23. **(izq)** Genes *Pp1s33* y *Pp1s72* **(der)** Genes *PpABR170* y *PpLys*.

Estrés osmótico:

Los resultados del nivel de expresión relativa de los genes *Pp1s72*, *PpABR170* y *PpLys* no muestran diferencia con respecto a la línea silvestre sometida a este tipo de estrés. Al igual que para el estudio de estrés salino, no fue posible amplificar de forma confiable el gen *Pp1s33* (Tabla 4.5 y Figura 4.35).

Tabla 4.5 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio durante estrés osmótico (manitol 0.9 M). El ARN fue extraído luego de 3 días de exposición y fue empleado para determinar la expresión relativa de los genes codificantes para histonas tipo H1 *Pp1s33* y *Pp1s72* junto con los genes de respuesta a estrés abiótico *PpLys* y *PpABR170*. Análisis realizado por triplicado biológico.

Gen	Promedio R	Desviación estándar
<i>Pp1s33</i> wt/23	-	-
<i>Pp1s72</i> wt/23	1.0	0.2
<i>PpABR170</i> wt/23	0.9	0.2
<i>PpLys</i> wt/23	0.8	0.2

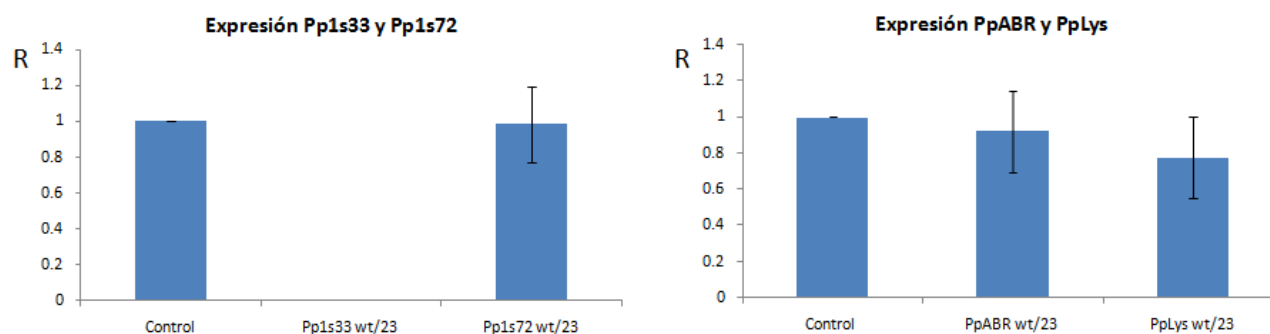


Figura 4.35 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio bajo condiciones de estrés osmótico (manitol 0.9 M). (izq) Genes *Pp1s33* y *Pp1s72* (der) Genes *PpABR170* y *PpLys*.

Estrés térmico:

La expresión relativa de los genes *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpABR170* y *PpLys* demostró que, bajo condiciones de estrés térmico, su nivel de expresión es mayor al control y por lo tanto estos genes se encuentran sobreexpresados si se compara la línea mutante con la silvestre (Tabla 4.6 y Figura 4.36). Los datos obtenidos en este punto corresponden a análisis de réplicas biológicas realizadas por duplicado.

Tabla 4.6 Nivel de expresión relativa de los genes *Pp1s33*, *Pp1s72*, *PpABR170* y *PpLys* luego de la exposición de la línea silvestre y mutante a 37°C por 3 días.

Gen	Promedio R	Desviación estándar
<i>Pp1s33</i> wt/23	3	1
<i>Pp1s72</i> wt/23	2.8	0.3
<i>PpABR170</i> wt/23	2.4	0.4
<i>PpLys</i> wt/23	1.50	0.08

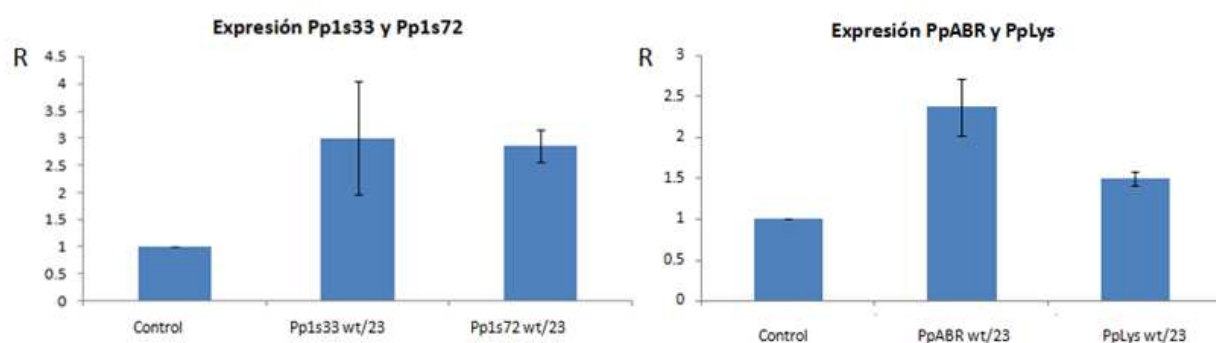


Figura 4.36 Nivel de expresión relativa de los genes de estudio bajo condiciones de estrés térmico. La figura ilustra los valores representados en la tabla 4.6. (izq) Genes *Pp1s33* y *Pp1s72* (der) Genes *PpABR170* y *PpLys*.

4.8.4 Determinación semicuantitativa del nivel de expresión de *PpHSP16.4* mediante PCR en tiempo final

Debido a que la eficiencia de los cebadores *PpHSP16.4* no fue la adecuada para la cuantificación relativa del nivel de expresión del gen *PpHSP16.4* mediante PCR en tiempo real, se planteó una PCR en tiempo final. Para ello, se trabajó con dichos cebadores y los ADN copia control y sometidos a estrés abiótico por 3 días tanto para la línea silvestre como para la mutante. A su vez, se amplificó el gen que codifica para actina para normalizar las bandas obtenidas (Figura 4.37).

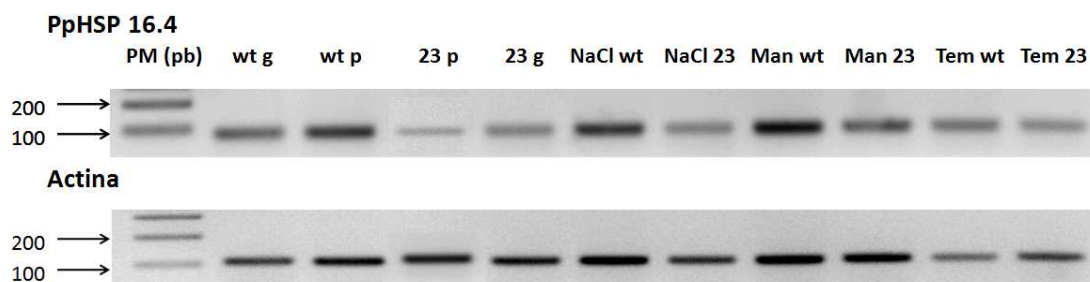


Figura 4.37 Determinación semicuantitativa del nivel de expresión del gen *PpHSP16.4*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Arriba: Resultado de la amplificación del gen *PpHSP16.4* y abajo gen que codifica para la actina. Las muestras corresponden a gametóforo (g) y protonema (p) cultivados en condiciones estándar, y bajo condiciones de estrés salino - 0.5 M de cloruro de sodio- (NaCl), osmótico -0.9 M de manitol- (Man) y térmico -37°C- (Tem) para las muestras silvestre (wt) y mutante (23).

Las intensidades de bandas obtenidas se cuantificaron por triplicado empleando el programa ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/) y se estableció la relación entre la intensidad de la banda obtenida para *PpHSP16.4* y para la actina. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4.7 y Figura 4.38.

Tabla 4.7 Relación entre las intensidades relativas para las bandas obtenidas por PCR en tiempo final para los genes <i>PpHSP16.4</i> y actina. NaCl, manitol, térmico indican que las muestras analizadas corresponden a tejido vegetal sometido a estrés salino-tóxico por 0.5 M de cloruro de sodio, osmótico por 0.9 M de manitol y térmico por incubación a 37°C, en todos los casos expuestos a 3 días de estrés.			
Muestra	Relación <i>PpHSP16.4</i> /Actina	Muestra	Relación <i>PpHSP16.4</i> /Actina
wt gametóforo	0.9	23 gametóforo	0.4
wt protonema	1.1	23 protonema	0.5
wt NaCl	0.9	23 NaCl	0.7
wt manitol	1.0	23 manitol	0.7
wt térmico	1.0	23 térmico	0.7

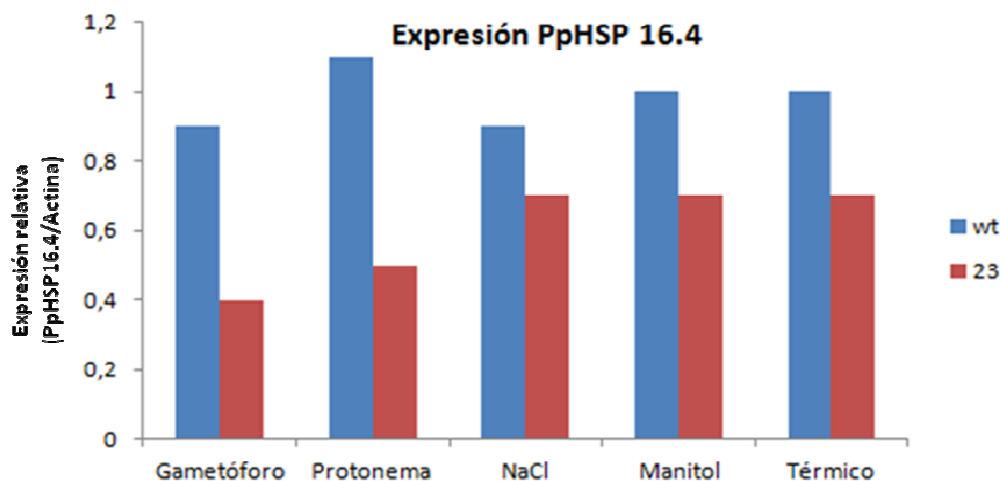


Figura 4.38 Nivel de expresión del gen *PpHSP16.4*. Este gráfico evalúa el nivel de expresión de este gen para los distintos estadios de desarrollo (protonema y gametóforo) de la línea silvestre (wt). Se analizó a su vez, la línea silvestre y mutante (23) frente a distintos tipos de estrés abiótico. NaCl, manitol, térmico indican que las muestras analizadas corresponden a tejido vegetal sometido por 3 días a estrés salino-tóxico por 0.5 M de cloruro de sodio, osmótico por 0.9 M de manitol y térmico por incubación a 37°C.

Para el caso de la línea silvestre, parecería no existir variación en el nivel de expresión de *PpHSP16.4* en los estadios de desarrollo protonema y gametóforo o luego de someter al tejido vegetal a 3 días de estrés térmico. Por otro parte, parecía que la línea mutante no presenta diferencias a nivel de expresión de este gen si se comparan ambos estadios de desarrollo. Si se compara con el nivel de expresión de *PpHSP16.4* en la línea silvestre, el mutante presentaría una subexpresión del mismo para condiciones estándar de cultivo.

Este estudio debería ser repetido en un futuro ya que el mismo se realizó con una única muestra de material vegetal en estadio protonema y gametóforo y frente a condiciones de estrés abiótico.

5. DISCUSIÓN

En esta tesis se llevó a cabo un trabajo de genética reversa, el cual implicó la generación de una línea *knockout* para el gen *PpH1* (*Pp1s53_134V6*) como forma de analizar su posible función. Trabajando con esta línea se planteó un análisis fenotípico en condiciones estándar de cultivo y frente a estrés abiótico, una evaluación de la repetición nucleosomal y además la expresión de otras dos histonas tipo H1, *Pp1s33* (*Pp1s33_295V6*) y *Pp1s72* (*Pp1s72_277V6*), para analizar un posible efecto compensatorio en la línea *knockout* ante la falta de *PpH1*. Los genes de respuesta a estrés abiótico *PpABR170* (*Pp1s51_28V6*), *PpLys* (*Pp1s4_282V6*) y *PpHSP16.4* (*Pp1s27_331V6*), fueron analizados por PCR en tiempo real para evaluar posibles cambios a nivel de la expresión de éstos por falta de la histona *PpH1*.

5.1 Obtención del mutante *knockout* estable para el gen *PpH1*

La generación del mutante *knockout* en el musgo *Physcomitrella patens* se llevó a cabo empleando la construcción plasmídica denominada pUBW302-KOPpH1, lográndose la disrupción del gen codificante para *PpH1* mediante la integración por recombinación homóloga del cassette de selección *nptII*. De esta forma, la resistencia al antibiótico G418 de los clones obtenidos (Cove *et al*, 2009) permitió la selección de los mutantes estables.

Se obtuvieron 3 mutantes, denominados 18, 23 y 49, en los que el plásmido recombinó de forma homóloga en el locus *PpH1* mientras que en dos de ellos, el 23 y el 49, se observó un único evento de recombinación exclusiva para este locus.

Según Schween (2005), los transformantes obtenidos mediante polietilenglicol se les debe realizar un estudio de ploidía ya que el proceso de transformación puede generar líneas poliploides por fusión de protoplastos. Estas líneas pueden mostrar alteraciones fenotípicas independientemente de la presencia de mutaciones por inserción o delección de ADN por lo que en ausencia de este control, se puede cometer el error de asignar las alteraciones fenotípicas observadas a la mutación del gen *PpH1*. Estudios de citometría de flujo demostraron que ambos mutantes, el 23 y el 49, presentaban el mismo perfil citométrico que la línea silvestre por lo que se descarta la posibilidad de que estos mutantes deriven de una fusión de protoplastos.

Estudios de retrotranscripción y PCR en tiempo final y en tiempo real, demostraron la ausencia del transcripto de *PpH1* en la línea 23, lo cual permite confirmar la no esencialidad del gen *PpH1*.

5.2 Estudio de la repetición nucleosomal

En diversos trabajos reportados por Fan (Fan *et al*, 2003; Fan *et al*, 2005), en los que se había depletado o silenciado un gen codificante para una histona tipo H1 en ratones, se observó que dichos mutantes presentaban cambios importantes en la estructura de la cromatina que incluían variación en el espaciamiento nucleosomal. Esto llevó a pensar que la falta de *PpH1* podría alterar el espaciamiento entre nucleosomas por lo que se planteó realizar el experimento de digestión con nucleasa de micrococo bajo las mismas condiciones reportadas por Abreu (Abreu, C., 2009). En esa ocasión, se llegó a la conclusión que no existían diferencias entre el espaciamiento nucleosomal de la línea silenciada para el gen *PpH1* con respecto a la línea control.

A pesar de que existía un reporte previo de digestión del ADN de *P. patens* con MNAsa trabajando directamente con el material vegetal (Abreu, C., 2009), en este trabajo fue imposible digerir el ADN a pesar de que se siguió paso a paso el protocolo reportado. Para intentar resolver este problema, inicialmente se varió las concentraciones de enzima empleadas hasta más del doble que las empleadas por Abreu y se aumentó el tiempo de incubación con MNAsa hasta el triple de lo reportado (Abreu, C., 2009) pero a pesar de esto tampoco fue posible lograr una buena digestión. Por otra parte, la actividad de la enzima fue corroborada con una muestra de *A. nidulans* cuyo ADN pudo ser digerido bajo las condiciones anteriormente descritas, lo que permite afirmar que la actividad de enzima era buena.

La MNAsa utilizada por Abreu de la marca Fermentas, por lo que para el presente trabajo se utilizó la MNAsa de Thermo Scientific que según el proveedor sustituyó a la primera luego de la compra de Fermentas por Thermo. Las dificultades encontradas para la digestión del ADN podrían ser explicadas por diferencias entre las dos enzimas, por ejemplo a nivel de la sensibilidad diferencial de las mismas a la acción de inhibidores. Se descarta la posibilidad de que la alta metilación del ADN vegetal interfiera con la acción enzimática de la MNAsa.

5.3 Evaluación fenotípica de la línea *knockout*

5.3.1 Análisis de velocidad de crecimiento y morfología macroscópica

Desde este punto de partida, se planteó inicialmente una evaluación fenotípica de la línea mutante y se estudió la velocidad de crecimiento de la misma en condiciones estándar de cultivo. Inicialmente se buscaba encontrar diferencias estadísticamente significativas con respecto al comportamiento de la línea silvestre.

El estudio macroscópico de la línea mutante en condiciones estándar de crecimiento demostró que las colonias *knockout* no exhiben diferencias notorias a nivel fenotípico si se las compara con la línea silvestre.

Posteriormente, se analizó la velocidad de crecimiento de la línea mutante y se la comparó con la silvestre. En condiciones estándar de crecimiento, se demostró que no existía diferencia entre ellas como quedó demostrado en los gráficos analizados de la sección 4.8.1.

Considerando ambos resultados, se concluye que el gen codificante para la histona PpH1 no poseería un rol evidente vinculado con el crecimiento y desarrollo de las colonias ya que no se observaron diferencias en el estudio de velocidad de crecimiento. Además, no participaría en el desarrollo de la morfología de las colonias ya que tampoco se observaron diferencias macroscópicas evidentes en el estado general de las mismas. Sin embargo, no puede descartarse un posible efecto compensatorio en el cual la función de esta histona sea suplantada por otra variante de histona tipo H1 (ver más adelante).

5.3.2 Análisis macroscópico, de contenido de clorofila y muerte celular de la línea mutante frente a estrés abiótico

Estudios previos en tomate demostraron que mutantes con un silenciamiento de una determinada variante de histona tipo H1 (Scippa *et al.*, 2004) presentaban alteraciones fenotípicas frente a estrés

abiótico. A su vez, Abreu demostró que la línea silenciada para PpH1 presentaba alteraciones fenotípicas en comparación con la línea silvestre cuando se la sometía a estrés salino-tóxico, osmótico y térmico. Estos hechos permitirían hipotetizar que el mutante *knockout* para PpH1 podría presentar diferencias con respecto al silvestre en condiciones de estrés abiótico si esta histona se encuentra vinculada a un rol en la respuesta a estos tipos de estrés.

Para evaluar una posible función del gen *PpH1* frente a estrés abiótico, se expuso la línea mutante a estrés salino-tóxico, osmótico y térmico y se evaluó cualitativamente el comportamiento fenotípico de las colonias y cuantitativamente, el contenido de clorofila y el nivel de muerte celular.

En una primera etapa se evaluó si la línea mutante resistiría al estrés salino-tóxico por cloruro de sodio (0.25 y 0.5 M), osmótico por manitol (0.4 y 0.9 M) y térmico (37°C). Para todos los casos se demostró que la línea mutante resistía al estrés y que además presentaba un comportamiento macroscópico similar a la línea silvestre. Se ensayaron distintas concentraciones y tiempo de estrés encontrando que las condiciones de 0.5 M de cloruro de sodio, 0.9 M de manitol y 4 días de exposición a 37°C generan efectos más notorios en las colonias. Estas condiciones fueron las seleccionadas para analizar cuantitativamente la recuperación de las mismas lo largo del tiempo, mediante dosificación de clorofila y evaluación del nivel de muerte celular.

Estrés salino-tóxico: exposición de las colonias por 11 días a 0.5 M de cloruro de sodio

Los resultados obtenidos para la recuperación del estrés salino-tóxico indicarían que no existe diferencia en el comportamiento de la línea 23 en comparación con la silvestre para los días de recuperación en los que se realizó este estudio.

Por otro lado, los resultados obtenidos durante la recuperación fueron similares a los observados por Abreu para algunos tipos de estrés estudiados. En cambio, para otros tipos de estrés la línea silenciada presentó algunas diferencias con la línea *knockout*.

Es importante considerar en esta discusión que la línea silenciada obtenida por Abreu no se le estudió el nivel de ploidía e incluso no se llevó a cabo un estudio de Southern blot para evidenciar el número de integraciones del cassette empleado. No se puede descartar entonces que dicha línea puede ser producto de fusión de protoplastos e incluso que el cassette empleado se haya integrado en más de un locus. Esta integración podría haber ocurrido en algún gen o incluso en regiones promotoras o potenciadoras del mismo que afecten de alguna forma la recuperación del mutante al estrés salino-tóxico. No se puede descartar el hecho de que el silenciamiento de *PpH1* en esta línea haya provocado un silenciamiento de las otras posibles H1 debido a la alta homología presente entre ellas.

Estrés osmótico: exposición de las colonias por 15 días a 0.9 M de manitol

El análisis cuantitativo realizado a las colonias de la línea mutante durante la recuperación no mostró diferencias en el contenido de clorofila y muerte celular con respecto al control silvestre. Por otro lado Abreu planteaba que la línea silenciada mostraba menor cantidad de clorofila con respecto al control hasta aproximadamente el día 10 post-estrés. Esto no fue observado para el caso de la línea *knockout*. La posible explicación de esta diferencia es similar a la planteada para lo observado en estrés salino-tóxico.

Estrés térmico: exposición de las colonias por 4 días a 37°C

Por último, el análisis del efecto térmico en la línea *knockout* se llevó a cabo incubando colonias de la línea 23 y silvestre a 37°C por 4 días para posteriormente analizar el contenido de clorofila y muerte celular durante la recuperación de las colonias. Los resultados de dicho análisis demuestran que no existen diferencias entre la línea mutante y la línea silvestre.

El experimento térmico realizado por Abreu, a diferencia del planteado en esta tesis, fue llevado a cabo a 37°C por 4 días pero en oscuridad, en una estufa donde no fue controlada la humedad. A pesar de que los resultados no son del todo comparables ya que las condiciones de estudio fueron diferentes, ni la línea mutante ni la silenciada mostraron diferencias en la recuperación frente al control silvestre.

En conclusión

Considerando el comportamiento de la línea mutante frente a los diferentes tipos de estrés abiótico estudiados, los resultados indicarían que el gen *PpH1* no jugaría un rol evidente en la resistencia y recuperación de *P. patens* frente a estos tipos de estrés o, como fue mencionado anteriormente, una de las variantes de histona tipo H1 podría suplantar su función como parte de un efecto compensatorio ante la falta de este gen. Sin embargo, sería interesante evaluar su comportamiento frente a hormonas y otros tipos de estrés abiótico y biótico como falta de luz, temperaturas bajas o por microorganismos patógenos.

5.4 Análisis de un posible efecto compensatorio mediante Western blot

Debido a que el análisis fenotípico cualitativo y cuantitativo de la línea mutante frente a condiciones estándar de cultivo o frente a estrés abiótico no arrojaron evidencias de que PpH1 juegue un rol importante en el desarrollo, velocidad de crecimiento y/o respuesta a estrés abiótico, es importante considerar entonces un posible efecto compensatorio por parte de otras variantes de histonas tipo H1 que suplanten la función de la histona deletada. Como estrategia experimental para evaluar esta posibilidad, se recurrió a un ensayo de Western blot.

Para el revelado del mismo se consideró la compra de un anticuerpo anti-histona tipo H1 desarrollada para *P. patens* y vendido por la compañía Agrisera (<http://www.agrisera.com>). Dicho anticuerpo, al momento que se realizó la consulta en la compañía, estaba bajo validación por una empresa colaboradora independiente de Agrisera, lo que impidió saber la posible fecha de venta. Debido a esto, el estudio por Western blot no se pudo realizar bajo condiciones ideales y debió recurrirse a un anticuerpo policlonal anti-H1 humano.

El ensayo de Western blot realizado sobre extractos proteicos totales empleando dicho anticuerpo reveló una banda de intensidad muy tenue a 30 KDa (peso molecular esperado para la histona PpH1) tanto para la línea silvestre como para la mutante. A esta altura de peso molecular, se encuentra otra posible histona tipo H1, Pp1s27 y a 28 KDa las posibles histonas Pp1s3 y Pp1s72.

La baja intensidad registrada no permitió determinar si existe algún cambio de intensidad asociado a la falta de PpH1. A su vez, tampoco puede concluirse si existe o no un mecanismo de

compensación notorio por parte de *Pp1s27*. Sin duda alguna, este experimento debería ser repetido en un futuro luego de la compra de ese anticuerpo específico para este organismo.

5.5 Análisis y caracterización de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72*

Debido a que el ensayo de Western blot no permitió evidenciar un posible efecto compensatorio, se planteó la caracterización de otras histonas tipo H1 en este organismo para luego determinar su nivel de expresión y evaluar, de esta forma, un posible efecto compensatorio.

Además de caracterizar la histona PpH1, Abreu identificó 5 posibles secuencias codificantes para histonas tipo H1 en *P. patens* en base a homología a nivel aminoacídico con el dominio globular de histonas tipo H1 de diversos organismos. En esta tesis se realizó una actualización de dichos resultados, concluyendo que las posibles histonas a ser caracterizadas serían *Pp1s33_295* (Alias *Phypa_206410*), *Pp1s72_277* (Alias *Phypa_232290*), *Pp1s3_400* (Alias *Phypa_64749*) y *Pp1s27_179* (Alias *Phypa_70268*).

Se decidió analizar semi-cuantitativamente, en base a RT-PCR en tiempo final, cuales de los transcriptos eran mayoritariamente expresados en las condiciones estándar de cultivo a pesar de que existen reportados ESTs en la base de datos Genevestigator. Los resultados de electroforesis en gel de agarosa demostraron que sólo los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* fueron amplificados a partir de ADN copia mientras que *Pp1s3* y *Pp1s27* no se lograron amplificar. La ausencia de amplificación podría asociarse con la falta de expresión o con un nivel transcripcional bajo, no detectable mediante retrotranscripción y PCR en tiempo final.

Para analizar la localización sub-celular de *Pp1s33* y *Pp1s72* la estrategia experimental consistió en fusionar la proteína codificada por ambas secuencias a GFP y transformar hojas de tabaco con dichas construcciones. Las observaciones al microscopio confocal demostraron que ambas poseen localización nuclear al observarse colocalización entre GFP y el colorante nuclear DAPI.

Estos resultados sumados al análisis de homología del dominio globular y estudios bioquímicos para estas proteínas: peso molecular, punto isoelectrico, número de residuos de cisteína y triptófano y análisis del dominio Ct reportados por Abreu (Abreu, C., 2009), permitieron afirmar que *Pp1s33* y *Pp1s72* podrían ser histonas tipo H1 de *P. patens*.

5.6 Evaluación del nivel de expresión de las histonas *Pp1s33* y *Pp1s72*

Para evaluar los niveles de expresión de *Pp1s33* y *Pp1s72* se empleó la metodología de PCR en tiempo real debido a su alta sensibilidad en comparación con PCR a tiempo final. Para ello se determinó el nivel de expresión relativa de dichos genes trabajando con la ecuación establecida por Pfaffl (Pfaffl MW., 2001). En un principio, se planteó una evaluación del nivel de expresión de las histonas *PpH1*, *Pp1s33* y *Pp1s72* bajo condiciones estándar de cultivo en los diferentes estadios de desarrollo protonema y gametóforo y frente a estrés abiótico.

En este punto se está considerando, al igual que para las conclusiones obtenidas en la evaluación del nivel de expresión relativa de genes vinculados con la respuesta a estrés abiótico, que los transcriptos son traducidos a proteínas sin someterse a un mecanismo de regulación asociado con la degradación de los mismos o a la inhibición de su traducción.

Análisis de la expresión de las histonas PpH1, Pp1s33 y Pp1s72 en la línea silvestre en condiciones estándar de cultivo y frente a estrés abiótico

Para completar los estudios realizados por Abreu sobre la histona PpH1, se decidió analizar si el nivel de expresión de la misma difiere entre los estadios protonema y gametóforo. Los resultados del nivel de expresión relativa realizados por triplicado biológico demuestran que no existiría diferencia entre los estadios protonema y gametóforo (Figura 4.32).

Por otro parte, empleando el motor de búsqueda Genevestigator (www.genevestigator.com) se analizó la expresión de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* en condiciones estándar de cultivo en protonema y gametóforo encontrándose que el nivel de expresión de ambas variantes no difiere entre estos estadios de desarrollo.

A su vez, se analizó la expresión de *PpH1* frente a estrés abiótico (salino-tóxico y osmótico) en las mismas condiciones en las cuales fueron realizados los experimentos fenotípicos pero considerando 3 días de exposición. Se demostró que frente a estrés osmótico dicho gen se encontraba sobreexpresado (Figura 4.33).

En paralelo, se analizó el nivel de expresión relativa de *Pp1s72* frente a dichas condiciones demostrando que para la línea silvestre existe una subexpresión del gen *Pp1s72* en ambos tipos de estrés abiótico estudiado (Figura 4.33). Se destaca que el gen *Pp1s33* no pudo ser amplificado de forma confiable.

Evaluación del nivel de expresión de las histonas Pp1s33 y Pp1s72 en la línea mutante en condiciones estándar de cultivo y frente a estrés abiótico

El mecanismo de compensación propuesto en los párrafos anteriores ha sido demostrado en otros trabajos (Rabini *et al*, 2000; Jerzmanowski A., 2007) en donde se generaron líneas mutantes para diversas histonas tipo H1 demostrándose que la falta o disminución del nivel de expresión de una variante dada generaba un aumento en el nivel de expresión de otra variante. Esto permite hipotetizar que la falta de *PpH1* podría generar una alteración en la expresión de las variantes de histonas tipo H1.

Para demostrar esta hipótesis, se comparó el nivel de expresión de las histonas *Pp1s33* y *Pp1s72* en condiciones estándar de desarrollo, para los estadios de protonema y gametóforo entre la línea silvestre y mutante (Figura 4.32). El análisis por triplicado biológico de estas histonas demostraron que para el caso de *Pp1s33* existían diferencias de expresión con respecto a la línea silvestre. Se observó una sobreexpresión en la línea mutante en el estadio gametóforo mientras que en la misma línea se observó una subexpresión de este gen en el estadio protonema. Por otro lado, el análisis de la histona *Pp1s72* no demostró diferencias de expresión entre la línea silvestre y mutante para ambos estadios de desarrollo estudiados (Figura 4.32). Esto permitiría afirmar que el aumento en el nivel del transcripto de *Pp1s33* podría asociarse a un efecto compensatorio por falta de PpH1.

Posteriormente, se decidió evaluar que sucedía con el nivel de expresión relativa de los genes *Pp1s33* y *Pp1s72* en la línea mutante frente a estrés abiótico. Durante la exposición a estrés salino-tóxico *Pp1s72* se encuentra subexpresado mientras que frente a estrés térmico se observó una sobreexpresión de ambos genes, *Pp1s33* y *Pp1s72*. Esta sobreexpresión podría asociarse a un efecto de compensación.

El posible efecto de compensación por parte de las variantes de histonas mencionadas sugiere que las mismas podrían suplantar la función de PpH1 a nivel del desarrollo, crecimiento o respuesta frente a estrés abiótico estudiado. Sin embargo, para poder afirmar efectivamente que existe tal mecanismo de compensación por parte de las variantes en el mutante *knockout* para *PpH1*, frente a condiciones estándar de crecimiento o frente a estrés abiótico, se debería realizar un estudio de Western blot cuantitativo para evaluar si existe un cambio en el nivel de síntesis proteica de las distintas variantes en la línea mutante frente a la silvestre. Para ello, se podría generar anticuerpos específicos contra *Pp1s33* y *Pp1s72* o incluso agregarles un tag de histidina, en un ensayo realizado en paralelo para ambos genes. Un posible aumento en las variantes estaría asociado a un mecanismo compensatorio en la línea *knockout*. A su vez, podría plantearse un experimento de inmunoprecipitación cromatínica seguido de secuenciación para evaluar si existe una interacción diferencial en las regiones de la cromatina que interactúa PpH1 y las variantes de histonas tipo H1 en la línea silvestre y mutante.

Otro experimento alternativo para comprobar que las histonas *Pp1s33* o *Pp1s72* juegan un rol ante la falta de *PpH1* sería un experimento de doble y triple mutante, *knockout* para estas histonas. Este experimento consistiría en generar una línea simple *knockout* para los genes *Pp1s33* y *Pp1s72*, doble *knockout* para *PpH1 - Pp1s33* y *PpH1 - Pp1s72* y triple *knockout* para *PpH1, Pp1s33* y *Pp1s72* y evaluar mediante análisis fenotípicos y de expresión el comportamiento de estas líneas. De existir diferencias al comparar la línea simple *knockout* para los genes *Pp1s33* o *Pp1s72* con las líneas doble y triple mutantes se podría argumentar un rol compensatorio por parte de estas variantes de histonas tipo H1.

5.7 Evaluación del nivel de expresión de los genes de respuesta a estrés abiótico *PpABR170*, *PpLys* y *PpHSP16.4*

El estudio de los genes *PpABR170*, *PpLys* y *PpHSP16.4* durante la exposición de la línea silvestre a estrés salino-tóxico, osmótico y térmico ya había sido realizada previamente por Ruibal (Ruibal, C., 2009). En este estudio se demostró, mediante experimentos de Northern blot, que luego de la exposición por 24 horas de colonias silvestres a dichos tipos de estrés, se inducía la expresión de estos genes. Este mismo estudio fue llevado a cabo en el presente trabajo de tesis mediante PCR en tiempo real pero destacando que la exposición fue realizada por 3 días en vez de 24 horas. Los resultados obtenidos de triplicados biológicos concuerdan con lo reportado por Ruibal, los genes *PpABR170* y *PpLys* se encuentran sobreexpresados frente a estrés salino-tóxico y osmótico (Figura 4.33).

Planteando la misma metodología de trabajo mencionada en el párrafo anterior, se comparó el nivel de expresión de los genes *PpABR170* y *PpLys* en condiciones estándar de cultivo para la línea mutante (Figura 4.32) mediante PCR en tiempo real. Para el gen de estudio *PpABR170* se demostró una sobreexpresión en la línea mutante para los estadios de desarrollo protonema y gametóforo al igual que para el caso de *PpLys* en el estadio gametóforo. Sin embargo, no se observó una diferencia en el nivel de expresión de este gen para el estadio protonema. Los estudios de expresión relativa del gen *PpHSP16.4* mediante PCR en tiempo final mostraron que para ambos estadios de desarrollo, protonema y gametóforo, este gen parecería encontrarse subexpresado en la línea mutante (Figura 4.38) en comparación con la línea silvestre en condiciones estándar de cultivo.

Bajo condiciones de estrés salino-tóxico se demostró una subexpresión de *PpABR170* y *PpLys* y una sobreexpresión de los mismos bajo condiciones de estrés térmico en la línea mutante.

Los resultados obtenidos demuestran que la falta de *PpH1* provoca una alteración de los niveles de expresión de los genes relacionados con el estrés abiótico *PpABR170*, *PpLys* y *PpHSP16.4* en condiciones estándar de cultivo y bajo estrés abiótico. De esta forma se demuestra que *PpH1* podría estar asociado a un rol específico a nivel de la regulación de la transcripción de genes específicos y que su función no puede ser totalmente suplantada por las otras variantes de histonas tipo H1 presentes en el organismo. También se podría asociar la falta de *PpH1* a un estado de estrés constante que provoca que los genes de respuesta a estrés abiótico posean un nivel de expresión relativa mayor en la línea 23 en condiciones estándar de cultivo. Es importante destacar el hecho de que es probable que no sólo estos genes se encuentren desregulados en comparación con la línea silvestre, por lo que se debería realizar un estudio de expresión global de genes ya sea por microarreglos o secuenciación masiva que permitiera identificar todos aquellos genes se encuentran desregulados y evaluar así, el rol general de PpH1 como inhibidor o activador de la expresión génica.

Para evaluar la presencia y ubicación de variantes de histonas tipo H1 en regiones promotoras de los genes *PpABR170*, *PpLys* y *PpHSP16.4* se podría realizar un estudio de digestión con MNAsa seguido de hibridización con una sonda que reconozca dicha región reguladora. Variaciones en los tamaños revelados entre la línea wt y mutante demostrarían una diferencia en el posicionamiento nucleosomal a nivel de los promotores de estos genes lo que permitiría asociar dichos cambios a una mayor accesibilidad por parte de la maquinaria transcripcional. Cabe mencionar que primeramente se debería poner a punto la digestión con MNAsa del tejido vegetal.

Como alternativa a dicho experimento, se podría realizar una inmunoprecipitación cromatínica (ChIP) con anticuerpos anti PpH1 y anti Pp1s33 o Pp1s72, seguida de PCR en tiempo real cuantitativo (Mukhopadhyay *et al*, 2008) empleando primers específicos para las regiones promotoras de los genes de reespuesta a estrés. De no lograr poner a punto este experimento se podría realizar una amplificación con *random primers* del ADN obtenido por ChIP, seguido de un Southern blot empleando una sonda que reconozca parte de la region promotora. Un resultado positivo para la amplificación luego de la precipitación empleando anticuerpos anti Pp1s33 o Pp1s72 en la línea mutante y un resultado negativo en la línea silvestre, frente a condiciones estándar de cultivo o a estrés abiótico, implicará la presencia de la variante de histona tipo H1 estudiada en la región del promotor dado. De esta forma se podría explicar la alteración en el nivel de expresión de estos genes en la línea mutante y de esta forma atribuirle a PpH1 un rol en la regulación de los mismos.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- ✓ El nivel de expresión relativa del gen *PpH1* no presenta diferencias entre los estadios de desarrollo protonema y gametóforo para la línea silvestre, lo que podría indicar que este gen no está involucrado en la diferenciación de estos tejidos.
- ✓ Se demostró la no esencialidad del gen *PpH1* en el organismo *P. patens* ya que fue posible generar una línea *knockout* para este gen.
- ✓ La línea mutante no exhibe diferencias fenotípicas ni de velocidad de crecimiento en condiciones estándar de cultivo respecto a la línea silvestre, lo que indica que *PpH1* no posee un rol en estos procesos.
- ✓ No se registraron diferencias en relación a morfología, contenido de clorofila y muerte celular entre el *knockout* y la línea silvestre durante estrés salino-tóxico, osmótico o térmico.
- ✓ Las proteínas codificadas por las secuencias *Pp1s33* y *Pp1s72* presentan una localización nuclear y muestran todas las características bioquímicas de una histona tipo H1. De esta forma se demuestra que hasta el momento *P. patens* posee tres histonas tipo H1.
- ✓ El estudio de la expresión relativa mediante PCR en tiempo real de genes codificantes para histonas tipo H1 *Pp1s33* y *Pp1s72* demostraron que los mismos presentan diferencias en el nivel de expresión si se compara la línea mutante con la silvestre frente a condiciones estándar de cultivo e incluso frente a condiciones de estrés. Esto

sugeriría que las variantes de histona tipo H1, *Pp1s33* y *Pp1s72*, estarían asociadas a un posible efecto de compensación en la línea mutante carente de *PpH1*.

- ✓ La desregulación de la expresión de los genes *PpABR170*, *PpLys* y *PpHSP16.4* en la línea mutante demuestra que PpH1 podría estar asociada a un rol específico a nivel de la regulación de la transcripción de genes específicos. Además su función no podría ser suplantada por las otras variantes de histonas tipo H1 presentes en el organismo. Por otro lado, no se puede descartar que la falta de esta histona provoque un efecto de estrés constante en la línea mutante asociado un aumento en los niveles de expresión de dichos genes.

Perspectivas

- ✓ El estudio de repetición nucleosomal podría repetirse intentando una optimización en el procedimiento de extracción de núcleos como alternativa a trabajar directamente con el tejido vegetal.
- ✓ El estudio de Western blot debería realizarse empleando un anticuerpo específico contra histonas tipo H1 de *P. patens* u anticuerpo anti-H1 diferente al empleado aquí. De esta forma, se espera que las bandas correspondientes a histonas tipo H1 se revelen de forma más clara.
- ✓ El análisis de las posibles modificaciones en el nivel de metilación CpG de diversas secuencias genómicas en la línea *knockout* en comparación con la silvestre podrá vincular la falta de la histona PpH1 con el grado de metilación CpG.
- ✓ Evaluar el comportamiento del *knockout* frente a distintas hormonas y otros tipos de estrés abiótico y no abiótico como falta de luz, temperaturas bajas o incubación con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Esto permitiría determinar si la histona PpH1 juega un rol importante en estos casos o es inducida por patógenos.

- ✓ El estudio de la compactación de la cromatina a nivel de las regiones promotoras de los genes de respuesta a estrés abiótico permitiría analizar el hecho de que la falta de esta histona provoque mayor accesibilidad a la maquinaria transcripcional. Este hecho permitiría explicar el porque se observa un mayor nivel de transcripción de estos genes en la línea mutante bajo condiciones estándar de cultivo.

- ✓ El análisis de expresión de transposones en la línea mutante permitiría evaluar si la falta de *PpH1* podría relacionarse con un aumento en su expresión, como lo revelan estudios actuales (Vujatovic et al, 2012). Se podría especular que la falta de PpH1 podría alterar la estructura cromatínica de regiones del genoma que normalmente se encuentran silenciadas y ocasionar un aumento en la expresión de estos elementos transponibles.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abreu, C. (2009). Caracterización de una histona H1 de *Physcomitrella patens*. Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología.

Alatzas A, Srebrev L, Foundouli A. (2008). Distribution of linker histone variants during plant cell differentiation in the developmental zones of the maize root, dedifferentiation in callus culture after auxin treatment. *Biol Res.*, 41 (2), 205-215.

Alder D, Gorovsky MA. (1975). Electrophoretic analysis of liver and testis histones of the frog *Rana pipiens*. *J Cell Biol.*, 64 (2), 389-397.

Ammar R, Torti D, Tsui K, Gebbia M, Durbic T, Bader GD, Giaever G, Nislow C. (2012). Chromatin is an ancient innovation conserved between Archaea and Eukarya. *Elife*, 1:e00078.

Arnon D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24 (1).

Ascenzi R, Gantt JS. (1999). Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*, 41 (2), 159-169.

Ashton NC, DJ. (1977). The isolation and preliminary characterization of auxotrophic mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol Gen Genet.*, 154, 87-95.

Ausio J. (2000). Are linker histones (histone H1) dispensable for survival? *Bioessays*, 22 (10), 873-877.

Ausio, J. (2006). Histone variants the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic.*, 5 (3), 228-243.

Azzabi, G., Pinnola, A., Betterle, N., Bassi, R., Alboresi, A. (2012). Enhancement of Non-Photochemical Quenching in the Bryophyte *Physcomitrella patens* During Acclimation to Salt and Osmotic Stress. *Plant Cell Physiol*, 53 (10), 1815–1825.

Barra, J. L., Rhounim, L., Rossignol, J. L., Faugeron, G. (2000). Histone H1 is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascobolus immersus* and essential for long life span. *Mol. Cell Biol.*, 20, 61-69.

Barraco Vega, M. (2009). Estudios de expresión génica de los transportadores de purinas en *Phanerochaete chrysosporium* mediante PCR en tiempo real. Tesis de Grado, Licenciatura en Bioquímica, UdelaR.

Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95 (24), 14173-14178.

- Benito, B, Rodríguez-Navarro, A. (2003). Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, 36 (3), 382-389.
- Blank TA, Becker PB. (1995). Electrostatic mechanism of nucleosome spacing. *J Mol Biol.*, 252 (3), 305-313.
- Bogdanova VS, Kosterin OE, Berdnikov VA. (2007). Phenotypic effect of substitution of allelic variants for a histone H1 subtype specific for growing tissues in the garden pea (*Pisum sativum* L.). *Genetica*, 130 (1), 61-72.
- Bogdanova VS, Lester DR, Berdnikov VA, Andersson I. (2005). Structure of allelic variants of subtype 5 of histone H1 in pea *Pisum sativum* L. *Heredity*, 94 (6), 582-588.
- Bresnick EH, Bustin M, Marsaud V, Richard-Foy H, Hager GL. (1992). The transcriptionally-active MMTV promoter is depleted of histone H1. *Nucleic Acids Res.*, 20 (2), 273-278.
- Bustin M, Catez F, Lim JH. (2005). The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell*, 17 (5), 617-620.
- Castro Novelle, A. (2006). Estudio de la función de las α -Dioxigenasas en la respuesta de defensa del musgo *Physcomitrella patens* frente a microorganismos patógenos. Tesis de Maestría, PEDECIBA.
- Caterino TL, Fang H, Hayes JJ. (2011). Nucleosome linker DNA contacts and induces specific folding of the intrinsically disordered H1 carboxyl-terminal domain. *Mol Cell Biol*, 31 (11), 2341-2348.
- Chen Z.J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Plant Sci*, 15, 57-71.
- Cho, S., Quatrano, R., Shin, J. (2007). Transgenesis of *Physcomitrella patens*. *Trans. Plant Journal*, 1, 99-103.
- Clausell J, Happel N, Hale TK, Doenecke D, Beato M. (2009). Histone H1 subtypes differentially modulate chromatin condensation without preventing ATP-dependent remodeling by SWI/SNF or NURF. *PLoS One*. 2009 Oct 1,4(10), 4 (10), e0007243.
- Cove, D. J., Perroud P-F., Charron, A. J., McDaniel S. F., Khandelwal, A., Quatrano R. (2009). The Moss *Physcomitrella patens*: A Novel Model System for Plant Development and Genomic Studies. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4 (2).
- Cove, D. (2000). The Moss, *Physcomitrella patens*. *J Plant Growth Regul.*, 19, 275-283.
- Cove, D.J., Perroud, P. F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., and Quatrano, R.S. (2009). Transformation of the moss *Physcomitrella patens* using direct DNA uptake by protoplasts. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 4 (2).
- Crane-Robinson C. (1999). How do linker histones mediate differential gene expression? *Bioessays*, 21 (5), 367-371.

- Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, 306 (5701), 1571-1573.
- Downs JA, Kosmidou E, Morgan A, Jackson SP. (2003). Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol Cell*, 11 (6), 1685-1692.
- Dudnikov A.J. (2011). Geographic patterns of histone H1 encoding genes allelic variation in *Aegilops tauschii* Coss (Poaceae). *Mol Biol Rep*, 39, 2355–2363.
- Eriksson PR, Ganguli D, Nagarajavel V, Clark DJ. (2012). Regulation of histone gene expression in budding yeast. *Genetics*, 191 (1), 7-20.
- Fan Y, Nikitina T, Morin-Kensicki EM, Zhao J, Magnuson TR, Woodcock CL, Skoultchi AI. (2003). H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol.*, 23 (13), 4559-4572.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C. L., Skoultchi, A.I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, 123 (7), 1199-1212.
- Folco HD, Freitag M, Ramón A, Temporini ED, Alvarez ME, García I, Scazzocchio C, Selker EU, Rosa AL. (2003). Histone H1 Is required for proper regulation of pyruvate decarboxylase gene expression in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*, 2 (2), 341-350.
- Frank, W., Ratnadewi, D., Reski, F. (2005). *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta*, 220, 384–394.
- Frank, W, Decker, E. L., Reski, R. (2005). Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol.*, 7, 220-227.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 3470–3488.
- Furt F, Lemoi K, Tüzel E, Vidali L. (2012). Quantitative analysis of organelle distribution and dynamics in *Physcomitrella patens* protonemal cells. *BMC Plant Biol*, 12:70.
- Gajiwala KS, Burley SK. (2000). Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 10 (1), 110-116.
- Godde JS, Ura K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *J Biochem*, 143 (3), 287-293.
- Godde, J.S., Ura, K. (2009). Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int. J. Dev. Biol.*, 53, 215-229.
- Gonzalez, R., Scazzocchio, C. (1997). A rapid method for chromatin structure analysis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*, 25, 3955–3956.

- Grimsley N. A., Cove, D. J. (1977). The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss *Physcomitrella patens*. *Molec. Gen. Genet.*, 154, 97-100.
- Happel N, Doenecke D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431 (1-2), 1-12.
- Harshman SW, Young NL, Parthun MR, Freitas MA. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res*, 41 (21), 9593-9609.
- Hotta T, Haraguchi T, Mizuno K. (2007). A novel function of plant histone H1: microtubule nucleation and continuous plus end association. *Cell Struct Funct.*, 32 (2), 79-87.
- Ponce de León I, Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Bentancor M, Vidal S. (2007). *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* , 7 (52).
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguri Y, Friedman WE, Hasebe M, Kubo M. (2011). *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell*, 23 (8), 2924-2938.
- Izzo A, Kamieniarz K, Schneider R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol Chem*, 389 (4), 333-343.
- Jedrusik MA, Schulze E. (2001). A single histone H1 isoform (H1.1) is essential for chromatin silencing and germline development in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 128 (7), 1069-1080.
- Jedrusik-Bode M. (2013). Histone H1 and heterochromatin protein 1 (HP1) regulate specific gene expression and not global transcription. *Worm*, 2 (2), e23703.
- Jerzmanowski A. (2007). SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1769 (5-6), 330-345.
- Jerzmanowski A., Przewłoka, M., Grasser K. D. (2000). Linker Histones and HMG1 Proteins of Higher Plants. *Plant Biol.*, 2, 586-597.
- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing SA, Schween G, von Stackelberg M, Cuming AC, Reski R, Cove DJ. (2006). The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Res*, 34 (21), 6205-6214.
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Science*, 7 (5), 193-195.
- Karrer KM, VanNuland TA. (2002). Methylation of adenine in the nuclear DNA of *Tetrahymena* is internucleosomal and independent of histone H1. *Nucleic Acids Res.*, 30 (6), 1364-1370.
- Kasinsky HE, Lewis JD, Dacks JB, Ausió J. (2001). Origin of H1 linker histones. *FASEB J.*, 15 (1), 34-42.

- Kim K-C., Lai Z., Fan B., Chen Z. (2008). Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 Transcription Factors Interact with Histone Deacetylase 19 in Basal Defense. *Plant Cell*, 20, 2357–2371.
- Kim, J.M., To, T.K., Nishioka, T., Seki, M. (2010). Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, 33 (4), 604-611.
- Kosterin OE, Bogdanova VS, Kechin AA, Zaytseva OO, Yadrikhinskiy AK. (2012). Polymorphism in a histone H1 subtype with a short N-terminal domain in three legume species (Fabaceae, Fabaceae). *Mol Biol Rep*, 39 (12), 10681-10695.
- Kowalski A, Pałyga J. (2012). Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol Int*, 36 (11), 981-996.
- Kroemer, K., Reski, R., Frank, W. (2004). Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Rep*, 22, 864–870.
- Lang D., Zimmer, A. D., Rensing, S. A., Reski, R. (2008). Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends Plant Science*, 13 (10).
- Levy A, Noll M. (1981). Chromatin fine structure of active and repressed genes. *Nature*, 289 (5794), 198-203.
- Lim H-S, Bragg J. N, Ganesan U., Schichnes D., Lee M. Y., Vaira A. M., Ryu K. H., Hammond J., Jackson A. O. (2009). Subcellular Localization of the Barley Stripe Mosaic Virus Triple Gene Block Proteins. *Journal of Virology*, 23 (18), 9432–9448.
- Lu X, Wontakal SN, Emelyanov AV, Morcillo P, Konev AY, Fyodorov DV, Skoultchi AI. (2009). Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes Dev*, 23 (4), 452-465.
- Lu X, Wontakal SN, Kavi H, Kim BJ, Guzzardo PM, Emelyanov AV, Xu N, Hannon GJ, Zavadil J, Fyodorov DV, Skoultchi AI. (2013). *Drosophila* H1 regulates the genetic activity of heterochromatin by recruitment of Su(var)3-9. *Science*, 340 (6128), 78-81.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389 (6648), 251-260.
- Lunde, C., Drew, D. P., Jacobs, A. K., Tester M. (2007). Exclusion of Na⁺ via Sodium ATPase (PpENA1) Ensures Normal Growth of *Physcomitrella patens* under Moderate Salt Stress. *Plant Physiol.*, 144, 1786–1796.
- Markmann-Mulisch U., Wendeler E., Zobell. O., Schween G., Steinbiss H-H, Reissa B. (2007). Differential Requirements for RAD51 in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* Development and DNA Damage Repair. *The Plant Cell*, 19, 3080–3089.
- Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid

- elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102 (8), 2808-2813.
- Mazzio EA, Soliman KF. (2012). Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*, 7 (2), 119-130.
- Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 408 (6814), 877-881.
- Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, Tissenbaum HA. (2008). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to detection by quantitative real-time PCR to study transcription factor binding to DNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc.* , 3 (4), 698-709.
- Nishiyama T, Fujita T, Shin-I T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y, Hasebe M. (2003). Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100 (13), 8007-8012.
- Öberg C, Izzo A, Schneider R, Wrangé Ö, Belikov S. (2012). Linker histone subtypes differ in their effect on nucleosomal spacing in vivo. *J Mol Biol.*, 419 (3-4), 183-197.
- Over RS, Michaels SD. (2013). Open and Closed: The Roles of Linker Histones in Plants and Animals. *Mol Plant.*, 7 (3), 481-491.
- Paponov IA, Teale W, Lang D, Paponov M, Reski R, Rensing SA, Palme K. (2009). The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evol Biol*, 9:126.
- Patterton HG, Landel CC, Landsman D, Peterson CL, Simpson RT. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 273 (13), 7268-7276.
- Pérez-Montero S, Carbonell A, Morán T, Vaquero A, Azorín F. (2013). The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Dev Cell*, 26 (6), 578-590.
- Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9), 2003-2007.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26, 509-515.
- Ponte I, Vila R, Suau P. (2003). Sequence complexity of histone H1 subtypes. *Mol Biol Evol*, 20 (3), 371-380.
- Prigge M. J, Bezanilla, M. (2010). Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development*, 137 (21), 3535-3543.

- Prymakowska-Bosak M, Przewłoka MR, Slusarczyk J, Kuraś M, Lichota J, Kiliańczyk B, Jerzmanowski A. (1999). Linker histones play a role in male meiosis and the development of Pollen Grains in Tobacco. *Plant Cell*, 11, 2317-2329.
- Pusarla RH, Bhargava P. (2005). Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J.*, 272 (20), 5149-5168.
- Quatrano, R. S., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., Perroud, P-F., Cove, D. (2007). *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. *Curr Opin Plant Biol.*, 10, 182–189.
- Rabini, S., Franke, K., Saftig, P., Bode, C., Doenecke, D., Drabent, B. (2000). Spermatogenesis in mice is not affected by histone H1.1 deficiency. *Exp Cell Res*, 255 (1), 114-124.
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S. (2009). Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *The plant cell*, 21, 1541–1555.
- Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature*, 362 (6417), 219-223.
- Ramakrishnan V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 26, 83-112.
- Ramón A, Muro-Pastor MI, Scazzocchio C, Gonzalez R. (2000). Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 35 (1), 223-233.
- Ramón A. (2000). Structure chromatinienne et expression génique chez *Aspergillus nidulans*. In U.F.R Scientifique d'Orsay, Le grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris XI Orsay Université de Paris-Sud .
- Rea, M., Zheng, W., Chen, M., Braud, C., Bhangu, D., Rognan, T.N., Xiao, W. (2012). Histone H1 affects gene imprinting and DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 71 (5), 776-86.
- Reski, R. (1999). Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta*, 208, 301-309.
- Roche J, Gorka C, Goeltz P, Lawrence JJ. (1985). Association of histone H1(0) with a gene repressed during liver development. *Nature*, 314 (6007), 197-198.
- Roque A, Ponte I, Suau P. (2009). Role of charge neutralization in the folding of the carboxy-terminal domain of histone H1. *J Phys Chem B.*, 113 (35), 12061-12066.
- Ruderman JV, Gross PR. (1974). Histones and histone synthesis in sea urchin development. *Dev Biol.*, 36 (2), 286-298.

- Ruibal C., Alexandra Castro A., Carballo V., Szabados L., Vidal S. (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4. *BMC Plant Biology* 2013, 13:174, 13, 174-192.
- Ruibal C., Pérez Salamó I., Carballo V., Castro A., Bentancor M., Borsani O., Szabados L., Vidal S. (2012). Differential contribution of individual dehydrin genes from *Physcomitrella patens* to salt and osmotic stress tolerance. *Plant Science*, 190, 89-102.
- Ruibal, C. (2009). Caracterización funcional de genes de *Physcomitrella patens* inducidos por factores de estrés abióticos. Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología.
- Rupp RA, Becker PB. (2005). Gene regulation by histone H1: new links to DNA methylation. *Cell*, 123 (7), 1178-1179.
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J.*, 45 (2), 237-249.
- Sambrook JF, EF. Maniatis, TA. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaefer D., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J. (1991). Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genet.*, 226, 418-424.
- Schaefer, D. G. (2002). A new moss genomics: Targeted Mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 477-501.
- Schaefer, D. G., Zry J-P. (2001). The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant Physiol.*, 127, 1430–1438.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet.*, 37 (5), 501-506.
- Schween G., Schultea J., Reskia R., Hoheb A. (2005). Effect of Ploidy Level on Growth, Differentiation and Morphology in *Physcomitrella patens*. *The Bryologist*, 108 (1), 27-35.
- Scippa GS, Di Michele M, Onelli E, Patrignani G, Chiatante D, Bray EA. (2004). The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *J Exp Bot*, 55 (394), 99-109.
- Sera T, Wolffe AP. (1998). Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol.*, 18 (7), 3668-3680.
- She W, Grimanelli D, Rutowicz K, Whitehead MW, Puzio M, Kotlinski M, Jerzmanowski A, Baroux C. (2013). Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants. *Development*, 140 (19), 4008-4019.

- Shen X, Gorovsky MA. (1996). Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell*, 86 (3), 475-483.
- Steinbach OC, Wolffe AP, Rupp RA. (1997). Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*. *Nature*, 389 (6649), 395-399.
- Steinmetz M, Streeck RE, Zachau HG. (1978). Closely spaced nucleosome cores in reconstituted histone-DNA complexes and histone-H1-depleted chromatin. *Eur J Biochem.*, 83 (2), 615-628.
- Strahl BD, Allis CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 (6765), 41-45.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M, Toshimori K, Okabe M, Nishimune Y. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol.*, 25 (16), 7107-7119.
- Thoma F, Koller T, Klug A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol.*, 83 (2 Pt 1), 403-427.
- Thomas JO, Stott K. (2012). H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure. *Biochem Soc Trans*, 40 (2), 341-346.
- Transgenic plants. Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* (286).
- Trivedi I, Ranjan A, Sharma YK, Sawant S. (2012). The histone H1 variant accumulates in response to water stress in the drought tolerant genotype of *Gossypium herbaceum* L. *Protein J.*, 31 (6), 477-486.
- Trouiller, B., Charlot, F., Choinard, S., Schaefer, D. G., Nogue, F. (2007). Comparison of gene targeting efficiencies in two mosses suggests that it is a conserved feature of Bryophyte transformation. *Biotechnol. Lett.*, 29, 1591-1598.
- Ushinsky SC, Bussey H, Ahmed AA, Wang Y, Friesen J, Williams BA, Storms RK. (1997). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13 (2), 151-161.
- Verbsky ML, Richards EJ. (2001). Chromatin remodeling in plants. *Curr Opin Plant Biol.*, 4 (6), 494-500.
- Vidali L, Bezanilla M. (2012). *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation. *Curr Opin Plant Biol*, 15 (6), 625-631.
- Vujatovic O, Zaragoza K, Vaquero A, Reina O, Bernués J, Azorín F. (2012). *Drosophila melanogaster* linker histone dH1 is required for transposon silencing and to preserve genome integrity. *Nucleic Acids Res.*, 40 (12), 5402-5414.
- Weintraub H. (1984). Histone-H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. *Cell*, 38 (1), 17-27.

- Weisbrod S. (1982). Active chromatin. *Nature*, 297 (5864), 289-295.
- Wierzbicki, A. T., Jerzmanowski, A. (2005). Suppression of Histone H1 Genes in Arabidopsis Results in Heritable Developmental Defects and Stochastic Changes in DNA Methylation. *Genetics*, 169 (2), 997–1008.
- Woodcock CL, Skoultchi AI, Fan Y. (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res*, 14 (1), 17-25.
- Wu C, Bassett A, Travers A. (2007). A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep*, 8 (12), 1129-1134.
- Wu M, Allis CD, Richman R, Cook RG, Gorovsky MA. (1986). An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83 (22), 8674-8678.
- Xiao B, Freedman BS, Miller KE, Heald R, Marko JF. (2012). Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly. *Mol Biol Cell*, 23 (24), 4864-4871.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 296 (5565), 79-92.

