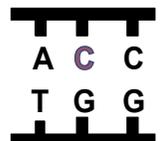
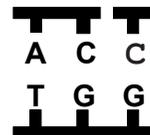
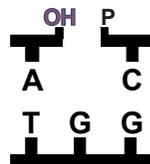
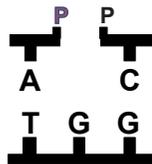
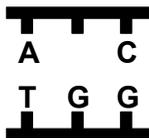
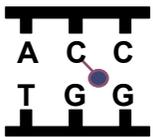


# Identificación de proteínas que participan en una ruta de desmetilación activa de DNA en *Arabidopsis thaliana*



M<sup>a</sup> Isabel Martínez Macías

TÍTULO: Identificación de proteínas que participan en una ruta de desmetilación activa de DNA en Arabidopsis thaliana

AUTOR: M<sup>a</sup> Isabel Martínez Macías

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)

[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Departamento de Genética

**Identificación de proteínas que participan en  
una ruta de desmetilación activa de DNA en  
*Arabidopsis thaliana***

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba  
para optar al grado de Doctor por la licenciada en Bioquímica:

**M<sup>a</sup> Isabel Martínez Macías**

Dirigido por:

**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Roldán Arjona**

Profesora titular

**Dr. Rafael Rodríguez Ariza**

Profesor titular

Córdoba, 2012





**TÍTULO DE LA TESIS: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN UNA RUTA DE DESMETILACIÓN ACTIVA DE DNA EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**DOCTORANDO/A: MARÍA ISABEL MARTÍNEZ MACÍAS**

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral de Dña. M<sup>a</sup> Isabel Martínez Macías se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, en el seno del Grupo "Mecanismos Moleculares de Mutagénesis y Reparación de ADN" (BIO-301). Su desarrollo ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación en Genética y Biología Molecular. Durante la realización de la Tesis, Dña. M<sup>a</sup> Isabel ha confirmado una excelente aptitud y vocación para la investigación científica, y ha demostrado poseer una espléndida capacidad de trabajo. Parte del trabajo reflejado en la Tesis se ha llevado a cabo en el Department of Botany and Plant Science (University of California, USA). De acuerdo con el Artículo 35 de la Normativa de Doctorado, la presente Tesis Doctoral se presenta para optar a la Mención Internacional.

El trabajo realizado ha permitido desentrañar parte de la ruta de desmetilación activa del ADN iniciada por la ADN glicosilasa ROS1 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos se han comunicado en varios congresos nacionales e internacionales, y se han recogido en las siguientes publicaciones:

- Martínez-Macías, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T and Zhu, J.K. (2012) A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 45, 357-370.
- Martínez-Macías, M.I., Ariza, R.R. and Roldán-Arjona (2012) XRCC1 functions at several stages during active DNA demethylation in plants. (En preparación)

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, \_ 18 \_ de \_ Junio \_ de \_ 2012 \_

Firma del/de los director/es

Fdo.: M<sup>a</sup> Teresa Roldán Arjona Fdo.: Rafael Rodríguez Ariza



Dra. M<sup>a</sup> Teresa Roldán Arjona, Profesora Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, y

Dr Rafael Rodríguez Ariza, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba,

Informan:

Que el trabajo titulado "**Identificación de proteínas que participan en una ruta de desmetilación activa de DNA en *Arabidopsis thaliana***" realizado por M<sup>a</sup>Isabel Martínez Macías bajo su dirección, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Dra M<sup>a</sup> Teresa Roldán Arjona

Dr Rafael Rodríguez Ariza

Córdoba, Junio 2012



## **AGRADECIMIENTOS**



# ÍNDICES



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1. Epigenética .....	11
2. La cromatina .....	11
2.1. Estructura de la cromatina .....	12
2.2. Modificaciones de la cromatina .....	13
3. Metilación del DNA .....	17
3.1. Distribución de la metilación en el genoma .....	18
3.2. DNA Metiltransferasas.....	20
3.3. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación .....	21
3.4. Metilación de DNA dirigida por RNA .....	26
4. Desmetilación del DNA.....	27
4.1. Desmetilación en mamíferos.....	29
4.2. Desmetilación en plantas.....	32
4.3. Mecanismos de desmetilación activa .....	36
5. La familia DML de 5-meC DNA desmetilasas .....	42
5.1. Identificación .....	42
5.2. Actividad Catalítica .....	45
5.3. Funciones in vivo.....	47
6. Reparación por escisión de bases .....	49
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
<b>ZDP PARTICIPA EN UNA RUTA DE DESMETILACIÓN ACTIVA DE DNA EN ARABIDOPSIS</b> .....	<b>59</b>
1. ZDP procesa el extremo 3'-fosfato creado por ROS1 e incrementa la procesividad de ROS1 <i>in vitro</i> .....	59
1.1. Análisis de la actividad enzimática de ZDP.....	59
1.2. Análisis de la interacción de ZDP con ROS1 .....	62
1.3. Análisis de la interacción de ZDP con el producto de reacción de ROS1 .....	64

1.4. Análisis del efecto de ZDP sobre la procesividad de ROS1 .....	65
2. Plantas mutantes <i>zdp</i> <sup>-/-</sup> son deficientes en la actividad 3'-fosfatasa .....	68
2.1. Identificación y caracterización molecular de mutantes <i>zdp</i> .....	68
2.2. Análisis fenotípico de los mutantes <i>zdp</i> <sup>-/-</sup> .....	71
3. Los mutantes <i>zdp</i> <sup>-/-</sup> muestran reducida la capacidad de completar la desmetilación de DNA <i>in vitro</i> .....	73
4. Papel de ZDP en la prevención del silenciamiento transcripcional .....	78
5. Análisis del efecto de ZDP en los niveles de metilación de DNA a escala genómica.....	83
6. ZDP co-localiza con ROS1 y ROS3 en regiones subnucleares .....	86
<b>XRCC1 PARTICIPA EN LA RUTA DE DESMETILACIÓN DE DNA INICIADA POR ROS1 EN ARABIDOPSIS .....</b>	<b>89</b>
1. XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP <i>in vitro</i> .....	89
2. Análisis de la unión de XRCC1 al DNA.....	92
3. XRCC1 estimula la actividad fosfatasa de ZDP .....	94
4. XRCC1 estimula la actividad de ROS1.....	95
5. Caracterización molecular de mutantes <i>xrcc1</i> .....	96
6. Las plantas <i>xrcc1</i> son menos eficientes en la desmetilación de DNA que las silvestres.....	99
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
1. La fosfatasa ZDP actúa con posterioridad a ROS1 en una ruta de desmetilación activa del DNA en plantas.....	110
2. Papel de ZDP en la prevención del silenciamiento transcripcional .....	112
3. Rutas alternativas en la desmetilación activa del DNA .....	113
4. ZDP, un nuevo factor de desmetilación.....	115
5. Papel de ZDP en la reparación de daños en el DNA .....	115
6. XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP y modula su actividad enzimática ....	116
7. XRCC1 participa en varias etapas de la ruta de desmetilación de DNA iniciada por ROS1.....	119
8. Un modelo para la ruta de desmetilación activa de DNA en <i>Arabidopsis</i> ....	121
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>125</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>133</b>

1. Material biológico .....	135
1.1. Plantas.....	135
1.2. Cepas bacterianas .....	135
1.3. Vectores de clonación .....	136
2. Medios de cultivo .....	137
2.1. Medios de cultivo bacteriano.....	137
2.2. Medios para cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	137
3. Cultivo y crecimiento de organismos.....	138
3.1. Cultivo y crecimiento de bacterias .....	138
3.2. Cultivo y crecimiento de plantas.....	138
4. Oligonucleótidos sintéticos .....	139
4.1. Cebadores empleados para la clonación del cDNA de <i>ZDP</i> , su extremo carboxilo, <i>XRCC1</i> y el extremo amino terminal de <i>ROS1</i> en vectores de expresión .....	140
4.2. Cebadores empleados para la detección de transcritos, estudio del nivel de expresión y CHOP PCR .....	140
4.3. Cebadores empleados para secuenciación con bisulfito.....	141
4.4. Cebadores empleados para el genotipado de plantas .....	141
4.5. Oligonucleótidos usados como sustrato .....	141
4.6. Otros cebadores.....	142
5. Programas para el análisis de datos.....	142
6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	143
6.1. Aislamiento de DNA plasmídico .....	143
6.2. Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	144
6.3. Aislamiento de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	145
7. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos.....	145
7.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción.....	145
7.2. Defosforilación .....	145
7.3. Ligación de fragmentos de DNA a vectores plasmídicos .....	146
8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	146
8.1. PCR estándar .....	146
8.2. PCR de colonia .....	147
8.3. PCR para genotipado de plantas.....	147
8.4. PCR con DNA polimerasas termoestables de alta fidelidad .....	147
8.5. Transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) .....	148

8.6. PCR a tiempo real .....	148
9. Electroforesis de ácidos nucleicos .....	149
9.1. Electroforesis en geles de agarosa .....	149
9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes .....	149
10. Transformación genética.....	150
10.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	150
11. Expresión y purificación de proteínas en <i>E.coli</i> .....	152
11.1. Expresión y purificación de ZDP .....	152
11.2. Expresión y purificación de ROS1 y sus versiones truncadas.....	155
11.3. Expresión y purificación de XRCC1 .....	156
12. Detección de proteínas mediante Western Blot .....	158
12.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)..	158
12.2. Transferencia .....	159
12.3. Bloqueo .....	160
12.4. Detección.....	160
13. Análisis de la interacción entre proteínas mediante ensayos pull-down ...	161
13.1. Pull-down usando proteínas de fusión a MBP como cebo y proteínas de fusión a cola de histidinas como presa .....	161
13.2. Pull-down usando proteínas de fusión a cola de histidinas como cebo y proteínas de fusión a MBP como presa .....	162
14. Aislamiento de extractos celulares de la planta .....	163
15. Análisis de la actividad enzimática .....	163
15.1. Preparación de los oligonucleótidos sintéticos .....	163
15.2. Análisis de la actividad 3´-fosfatasa de ZDP .....	164
15.3. Análisis de la actividad DNA glicosilasa de ROS1: efecto de ZDP y XRCC1 .....	165
16. Análisis de la interacción DNA-proteína mediante ensayos de retardo en gel .....	166
17. Aislamiento y caracterización de plantas mutantes.....	166
17.1. Análisis de actividad fosfatasa en extractos de plantas mutantes ....	167
17.2. Análisis de la capacidad de reparación completa de plantas mutantes .....	167
17.3. Estudio de la sensibilidad a estrés oxidativo y a agentes alquilantes en plantas mutantes .....	168
18. Análisis de bioluminiscencia en plántulas .....	169

19. Análisis de la metilación de DNA.....	169
19.1. Análisis de la metilación de DNA mediante CHOP-PCR .....	169
19.2. Análisis de la metilación de DNA del genoma completo usando tiling arrays .....	169
19.3. Secuenciación de DNA modificado con bisulfito.....	170
20. Inmunolocalización .....	171

**REFERENCIAS..... 173**



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de empaquetamiento de la cromatina .....	13
Figura 2. Modificaciones covalentes de histonas. ....	15
Figura 3. Estructura química de la citosina y la 5-metilcitosina. ....	16
Figura 4. Representación esquemática de los factores que interactúan con las histonas modificadas para establecer la regulación epigenética de la transcripción. ....	16
Figura 5. Mecanismos de represión de la transcripción mediados por la metilación del DNA. ....	17
Figura 6. Representación esquemática de la distribución de marcas epigenéticas en el genoma de <i>Arabidopsis</i> .....	19
Figura 7. Comparación de secuencia de DNA metiltransferasas. ....	21
Figura 8. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación.. ....	22
Figura 9. Mantenimiento en el contexto de secuencia CG.....	24
Figura 10. Regulación de la metilación de citosina en plantas.....	25
Figura 11. Metilación de DNA dirigida por RNA.. ....	27
Figura 12. Mecanismos de desmetilación de DNA.....	28
Figura 13. Dinámica de la metilación del DNA durante el desarrollo. ....	30
Figura 14. Un ejemplo de desmetilación activa de DNA específica de locus en células somáticas.....	31
Figura 15. Modelo del proceso dinámico de silenciamiento epigenético durante el ciclo vital de <i>Arabidopsis</i> .. ....	34
Figura 16. Mecanismos de desmetilación activa.....	37
Figura 17. Estructura química de la citosina y sus modificaciones encontradas en humanos. ....	41
Figura 18. Esquema del motivo Hélice-horquilla-Hélice y Glicina/Prolina-Aspártico (HhH-GPD).. ....	43
Figura 19. Alineamiento esquemático de algunos miembros representativos de la familia DML. ....	45
Figura 20. Desmetilación activa en plantas iniciada por 5-meC desmetilasas.....	46
Figura 21. Ruta de reparación por escisión de bases en mamíferos.....	51
Figura 22. Productos de reacción de ROS1.....	60
Figura 23. Análisis de la actividad enzimática de ZDP.....	61
Figura 24. Polimerización del extremo 3´-OH generado por ZDP.. ....	61
Figura 25. Ensayo de pull-down con MBP-ROS1 como proteína cebo. ....	62
Figura 26. Ensayo de pull-down con His-ROS1 como proteína cebo.....	63

Figura 27. Esquema de la proteína ROS1 completa y de las diferentes versiones truncadas usadas en los ensayos de pull-down. ....	63
Figura 28. Análisis de la región de ROS1 responsable de la interacción con ZDP. ...	64
Figura 29. EMSA. ....	65
Figura 30. Efecto de ZDP sobre la procesividad de ROS .....	66
Figura 31 Efecto de ZDP sobre la actividad de ROS1. ....	67
Figura 32. Asignación de genotipos a plantas mutantes en el gen ZDP.....	68
Figura 33. Localización de la inserción de T-DNA en los alelos <i>zdp-1</i> , <i>zdp-2</i> y <i>zdp-3</i> . .....	69
Figura 34. Análisis de la expresión de <i>ZDP</i> en plantas mutantes. ....	71
Figura 35. Sensibilidad de plantas silvestres y mutantes <i>zdp -/-</i> a MMS y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	72
Figura 36. Análisis de la actividad fosfatasa en extractos de plantas silvestres y mutantes <i>zdp</i> . ....	72
Figura 37. Análisis de la reparación de intermediarios de desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes <i>zdp</i> .. ....	74
Figura 38. Análisis de los productos de incisión de DNA generados durante el proceso de desmetilación en extractos celulares de plantas silvestres y mutantes <i>zdp</i> o <i>arp</i> .. .....	75
Figura 39. Análisis de la desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes <i>zdp</i> o <i>arp</i> .....	77
Figura 40. Silenciamiento del transgen <i>RD29A-LUC</i> en mutantes <i>ros1</i> . ....	78
Figura 41. Sistema para el análisis genético de desmetilación activa de DNA en <i>Arabidopsis</i> .....	79
Figura 42. Análisis del silenciamiento de <i>RD29A-LUC</i> en plantas mutantes <i>zdp</i> . ....	80
Figura 43. Análisis de la expresión de <i>LUC</i> y <i>RD29A</i> mediante PCR a tiempo real. ..	81
Figura 44. Análisis de la metilación en el promotor de <i>RD29A</i> .....	82
Figura 45. Perfil de metilación a escala genómica en plantas silvestres y mutantes <i>zdp-1</i> . ....	84
Figura 46. Ejemplos del análisis de secuenciación con bisulfito llevado a cabo para confirmar la hipermetilación de algunos loci. ....	85
Figura 47. Localización subnuclear de ZDP y colocalización con ROS1 y ROS3.. ....	87
Figura 48. Análisis de la interacción entre ROS1 y XRCC1 in vitro. ....	90
Figura 49. Análisis de la región de ROS1 responsable de su interacción con XRCC1.91	
Figura 50. Análisis de la interacción entre ZDP y XRCC1 in vitro.. ....	91
Figura 51. Unión de XRCC1 a sustrato, producto e intermediario de desmetilación de DNA.....	93
Figura 52. Unión de XRCC1 a intermediarios de BER. ....	93

Figura 53. Efecto de XRCC1 sobre la actividad fosfatasa de ZDP.....	94
Figura 54. Efecto de XRCC1 sobre la actividad de ROS1. ....	96
Figura 55. Esquema de la inserción del T-DNA en el gen <i>XRCC1</i> . ....	97
Figura 56. Asignación de genotipos a plantas mutantes en <i>XRCC1</i> . ....	98
Figura 57. Análisis de la expresión del gen <i>XRCC1</i> en plantas silvestres y mutantes.. .....	98
Figura 58. Análisis de la desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes <i>xrcc1</i> . ....	100
Figura 59. Análisis de la actividad endonucleasa en extractos de plantas silvestres y mutantes <i>xrcc1 -/-</i> . ....	101
Figura 60. Detección de His-XRCC1 por Western.. ....	102
Figura 61. Inhibición de la desmetilación en extractos celulares en presencia de anti- OsXRCC1.....	103
Figura 62. Inhibición del procesamiento de extremos 3´-P en presencia de anti- OsXRCC1.....	104
Figura 63. Inhibición de la ligación de una rotura de cadena sencilla en presencia de anti-OsXRCC1.....	105
Figura 64. Rutas alternativas de procesamiento de la rotura de cadena simple generada por ROS1. ....	114
Figura 65. Dominios de interacción de XRCC1. ....	118
Figura 66. Un modelo para la ruta de desmetilación activa iniciada por ROS1.. ....	122



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas .....	135
Tabla 1. Continuación .....	136
Tabla 2. Vectores de clonación utilizados .....	136
Tabla 3. Cebadores empleados para clonar <i>ZDP</i> y su extremo carboxilo, <i>XRCC1</i> y el extremo amino terminal de <i>ROS1</i> en vectores de expresión.....	140
Tabla 4. Cebadores empleados para RT-PCR, PCR a tiempo Real y CHOP PCR. ....	140
Tabla 5. Cebadores empleados para amplificar mediante PCR fragmentos de DNA tratados con bisulfito sódico. ....	141
Tabla 6. Cebadores empleados en el genotipado de plantas. ....	141
Tabla 7. Oligonucleótidos usados como sustrato. ....	142
Tabla 8. Otros cebadores empleados.....	142
Tabla 9. Programas empleados para la gestión y análisis de datos.....	143
Tabla 10. Condiciones estándar de la PCR. ....	146
Tabla 11. Condiciones de la reacción de PCR con Advantage-HF2. ....	148



## ABREVIATURAS

**5-meC:** 5-metilcitosina

**8-oxoG:** 8-oxoguanina

**3´-dRP:** aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado

**5´dRP:** desoxirribofosfato sin base

**Adomet:** S-adenosilmetionina

**AGO:** proteína ARGONAUTA

**AP:** sitio abásico (sitioapurínico o apirimidínico)

**ARP:** *Apurinic endonuclease-Redox Protein*

**AtZDP:** *Arabidopsis thaliana Zinc finger DNA 3´Phosphoesterase*

**BER:** mecanismo de reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*)

**CMT:** cromometiltransferasas

**DCL:** ribonucleasa DICER

**DDM1:** *Decrease in DNA Methylation 1*

**DME:** DEMETER

**DML:** DEMETER-LIKE, proteínas semejantes a DEMETER

**DRM:** *Domain Rearranged Methyltransferase*

**dsRNA:** RNA de doble cadena

**HDA:** histona desacetilasa

**HhH-GPD:** motivo hélice-horquilla-hélice seguido de glicina, prolina y ácido aspártico

**MBD:** dominio de unión a secuencias CpG metiladas (*methyl-CpG-binding domain*)

**MBP:** proteína de unión a maltosa (*Maltose Binding Protein*)

**mRNA:** RNA mensajero

**PCNA:** antígeno de proliferación celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

**PGCs:** células germinales primordiales

**RdDM:** metilación del DNA dirigida por RNA (*RNA-directed DNA methylation*)

**RNAi:** interferencia mediada por RNA

**ROS1:** *REPRESSOR OF SILENCING1*

**siRNA:** RNA pequeño interferente

**TDG:** timina DNA glicosilasa

**TF:** factor de transcripción

**TGS:** *Transcriptional Gene Silencing*

**UDG:** uracil DNA glicosilasa

**XRCC1:** *X-ray cross complementing group protein 1*



## **SUMMARY**



DNA methylation (5-methylcytosine, 5-meC) is an important epigenetic mark for transcriptional gene silencing that plays critical roles in regulation of developmental genes, genomic imprinting, X chromosome inactivation and transposon silencing. Methylation landscapes are established by the combined actions of methylation and demethylation reactions. The mechanisms responsible for active DNA demethylation in mammalian cells are still poorly understood. However, in plants there is convincing genetic and biochemical evidence that a subfamily of DNA glycosylases typified by *Arabidopsis* ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) remove 5-meC from DNA, initiating its replacement by unmethylated cytosine through a base excision repair (BER) process. After 5-meC removal, ROS1 and its homologous cleave the phosphodiester backbone, generating a substantial fraction of products containing a single-nucleotide gap flanked by 3'- and 5'-phosphate termini. In this work, it has been found that the DNA phosphatase ZDP removes the blocking 3'-phosphate, allowing subsequent DNA polymerization and ligation steps needed to complete demethylation. ZDP and ROS1 interact *in vitro* and co-localize *in vivo* in nucleoplasmic foci. It has also been found that extracts from *zdp* mutant plants are unable to complete DNA demethylation *in vitro*, and mutations in *ZDP* cause DNA hypermethylation and transcriptional silencing of a reporter transgene. Furthermore, genome-wide methylation analysis in *zdp* mutant plants identified hundreds of hypermethylated endogenous loci. Our results also indicate that, besides a role during DNA demethylation, ZDP participates in the repair of DNA damage, probably by processing single-strand breaks (SSB) generated either directly by DNA-damaging agents or indirectly as repair intermediates. This work also examined the possible role of plant XRCC1 (X-ray cross complementing group protein 1) in DNA demethylation. Our results suggest that XRCC1 is a component of plant BER and functions at several stages during active DNA demethylation. Thus, XRCC1 interacts with ROS1 and ZDP and stimulates their enzymatic activities *in vitro*. By other hand, cell extracts from *xrcc1* mutant plants exhibit a reduced capacity to complete DNA demethylation, and XRCC1 is required for efficient gap-tailoring and DNA ligation. Altogether, the results show that ZDP and XRCC1 function downstream of ROS1 in the active DNA demethylation pathway in plants, and contribute to

understand the role of DNA repair mechanisms in the modification of epigenetic patterns.

## **RESUMEN**



La metilación del DNA (5-metilcitosina, 5-meC) es una marca epigenética que promueve el silenciamiento génico y desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo, la impronta génica, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de elementos transponibles. Los patrones de metilación se establecen por la acción combinada de mecanismos de metilación y desmetilación. Los mecanismos responsables de la desmetilación activa del DNA en animales no se conocen con exactitud. Sin embargo, en plantas hay convincentes pruebas genéticas y bioquímicas de que proteínas de una subfamilia de DNA glicosilasas, tipificadas por la proteína de ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) de *Arabidopsis*, eliminan la 5-meC del DNA, iniciando su sustitución por una citosina no metilada a través de un proceso análogo a la reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, BER). Tras la eliminación de la 5-meC como base libre, ROS1 y sus homólogos rompen el esqueleto azúcar-fosfato del DNA, generando entre otros productos un hueco mono-nucleotídico flanqueado por extremos 3'-P y 5'-P. En esta tesis doctoral se ha demostrado que ZDP, una fosfatasa de DNA, procesa el grupo 3'-P y genera un extremo 3'-OH que puede ser usado por DNA polimerasas para rellenar el hueco y completar la desmetilación. ZDP y ROS1 interactúan *in vitro* y co-localizan *in vivo* en las mismas regiones nucleoplásmicas. También se ha demostrado que plantas mutantes *zdp* son incapaces de completar la desmetilación *in vitro*, y que las mutaciones en *ZDP* causan la hipermetilación y el consiguiente silenciamiento transcripcional de un transgén reportero. Además, un análisis de metilación a escala genómica ha revelado que el DNA de plantas mutantes *zdp* contiene cientos de regiones que se encuentran hipermetiladas. Por otra parte, los resultados de este trabajo indican que ZDP también desempeña un papel en la reparación de daños en el DNA, probablemente procesando roturas de cadena sencilla generadas directamente por agentes genotóxicos o surgidas indirectamente como intermediarios de reparación. También se ha examinado el posible papel de XRCC1 (X-ray cross complementing group protein 1) en la ruta de desmetilación activa de DNA. Nuestros resultados indican que XRCC1 es un componente del mecanismo de BER en plantas y que participa en varias etapas de la desmetilación. XRCC1 interactúa con ROS1 y ZDP, estimulando las actividades enzimáticas de ambas proteínas *in vitro*. Los extractos celulares de plantas mutantes *xrcc1* muestran

una menor capacidad de completar la desmetilación, y XRCC1 facilita tanto la eliminación del grupo 3'-P catalizada por ZDP como el paso final de ligación del DNA. En definitiva, los resultados de esta tesis demuestran que ZDP y XRCC1 funcionan con posterioridad a ROS1 en una ruta de desmetilación activa del DNA en plantas, y contribuyen a entender el papel de la maquinaria de reparación del DNA en la modificación de los patrones epigenéticos.

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. Epigenética

Históricamente, la palabra epigenética comenzó a utilizarse para describir aquellos procesos que no podían ser explicados por principios genéticos. Hoy en día se consideran fenómenos epigenéticos aquellos que ocasionan cambios en la función génica que son heredables (mitótica y/o meióticamente) pero que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA (Russo, 1996). El avance en el estudio de la epigenética ha favorecido el uso del concepto de *epigenoma* como responsable de la regulación del genoma (Beck et al., 1999). A diferencia del genoma, que es idéntico en todos los tipos celulares a lo largo de la vida, el epigenoma es dinámico y cambia en cada tipo celular y en cada momento del ciclo vital. El epigenoma incluye un conjunto de *marcas epigenéticas* que proporcionan una capa adicional de información superpuesta a la secuencia de DNA. Hasta la fecha los dos tipos de marcas epigenéticas identificadas son las modificaciones de las proteínas de la cromatina y la metilación del DNA (Holliday, 2005; Tamaru and Selker, 2001). Además, recientemente se ha descubierto que el RNA desempeña un papel importante en la regulación epigenética, ya que pequeñas moléculas de RNA no codificante intervienen en el control de múltiples procesos epigenéticos. Un claro ejemplo es el mecanismo de compensación de la dosis génica del cromosoma X en *Drosophila* y mamíferos, mediado por los RNAs roX y Xist, respectivamente, (Bernstein and Allis, 2005) Además, en *S. pombe* se ha identificado interacción entre pequeños RNAs y las proteínas Chp1, proteínas reguladoras de la cromatina (Grewal and Jia, 2007).

Con la secuenciación del genoma humano completada, los investigadores centran sus esfuerzos en intentar comprender los cambios epigenéticos que determinan cómo la información genética se manifiesta durante los diversos estados del desarrollo, en los diferentes tejidos y en diversas enfermedades (Bird, 2002; Goll and Bestor, 2005; Margueron et al., 2005).

## 2. La cromatina

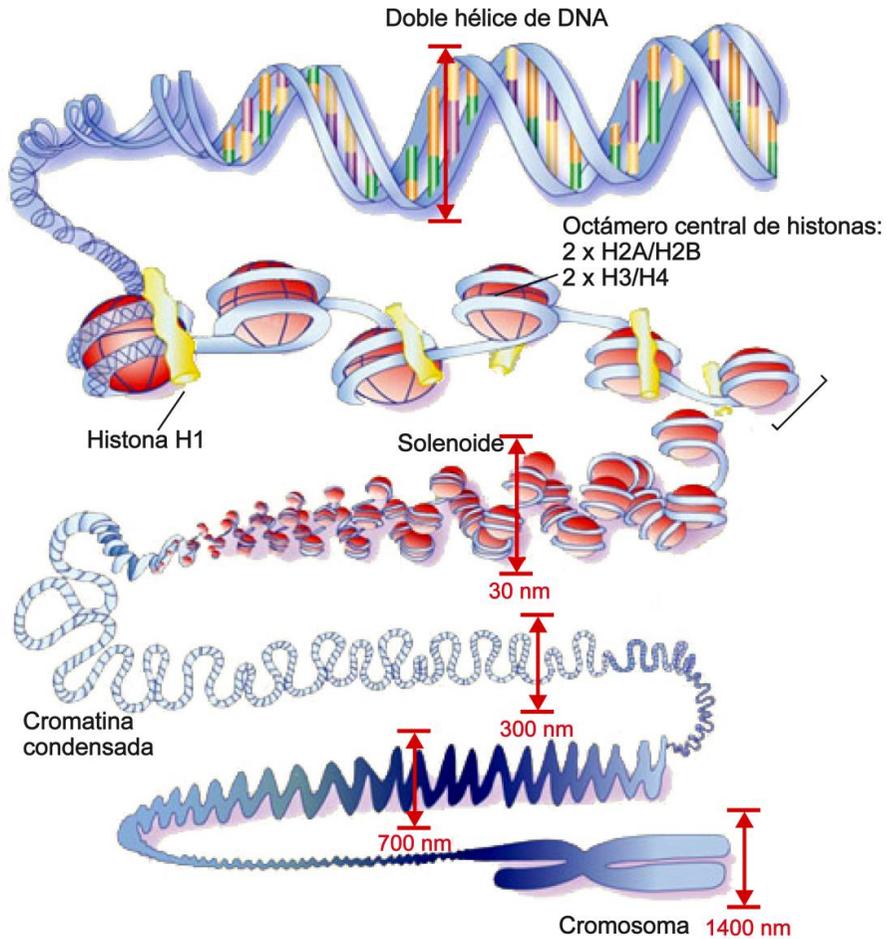
El DNA genómico de las células eucarióticas se encuentra compactado y organizado dentro del núcleo como cromatina (Hsieh and Fischer, 2005). La

cromatina es un complejo de DNA y proteínas de estructura dinámica que ejerce un control profundo sobre la expresión génica y otros procesos celulares. Los cambios en su estructura pueden ser heredados mitóticamente y/o meióticamente con independencia de la secuencia de DNA. El principal componente proteico de la cromatina son las proteínas denominadas histonas. El DNA se une a histonas para formar nucleosomas, la unidad repetitiva y básica de la cromatina (Felsenfeld and Groudine, 2003).

## **2.1. Estructura de la cromatina**

El DNA, de 2 nm de diámetro, se une a histonas para formar nucleosomas de 10 nm de diámetro. En cada nucleosoma, aproximadamente 150 pb de DNA envuelven un octámero central constituido por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Hayes and Hansen, 2001). Los nucleosomas, separados por segmentos de DNA de 50-70 pb, se asocian a su vez en un solenoide para formar una fibra de cromatina de unos 30 nm de diámetro. Este proceso se ve facilitado por una quinta histona, la histona H1 o histona de enlace. Esta estructura adopta a su vez niveles superiores de compactación hasta obtenerse el máximo nivel de condensación en los cromosomas metafásicos, que se hacen visibles durante la división celular (Felsenfeld and Groudine, 2003) (Figura 1).

En células en división, el complejo de DNA y proteínas de la cromatina es visible en forma de cromosomas individuales compactados, mientras que en las células que no están en división la cromatina aparece distribuida por el núcleo en regiones altamente condensadas (heterocromatina) o en regiones menos condensadas (eucromatina) (Felsenfeld and Groudine, 2003). A su vez, la heterocromatina puede ser de dos tipos: constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva es idéntica para todas las células del organismo y se corresponde en general con amplias regiones no codificantes. Está asociada a los telómeros y a las regiones pericéntricas de los cromosomas, zonas que suelen presentar un elevado contenido en secuencias repetitivas. La heterocromatina facultativa, por el contrario, es diferente en los distintos tipos celulares y se corresponde con regiones que se encuentran transcripcionalmente inactivas en ciertos tipos celulares o en momentos específicos del desarrollo (Richards and Elgin, 2002).



**Figura 1. Niveles de empaquetamiento de la cromatina**

## 2.2. Modificaciones de la cromatina

La cromatina no es un elemento inerte y sufre continuos cambios bioquímicos que alteran su estructura para regular el acceso al DNA. De esta forma, se controlan procesos que requieren la utilización del DNA como molde, tales como la replicación, transcripción, recombinación y reparación (Hsieh and Fischer, 2005).

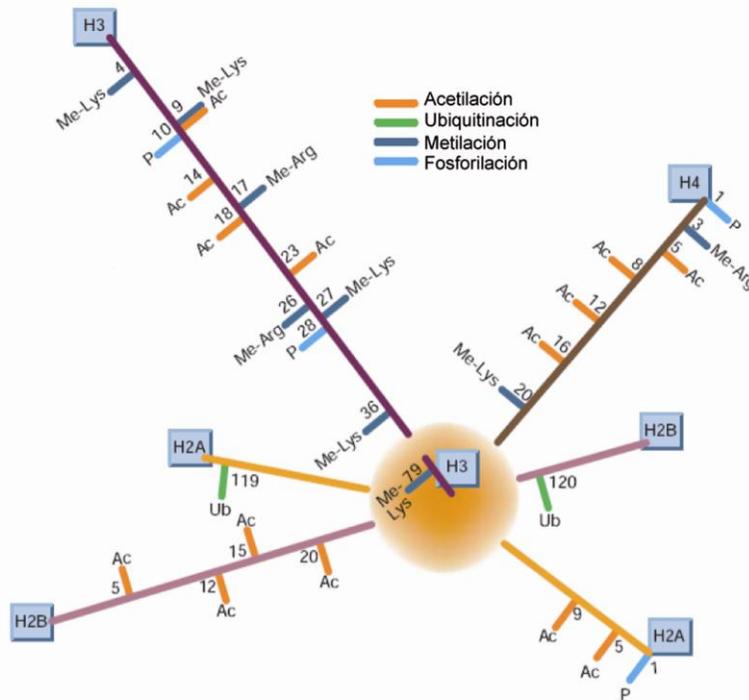
### Modificaciones de las histonas

Las células utilizan varios mecanismos para modificar la estructura de la cromatina. En primer lugar, la posición de los nucleosomas en el DNA puede ser modificada por complejos de proteínas dependientes de ATP que catalizan la translocación del DNA alrededor del nucleosoma y permiten la condensación o

descondensación de la cromatina (Hsieh and Fischer, 2005). Muchos de estos complejos pertenecen a la familia SWI/SNF, cuyos miembros se caracterizan por tener un dominio helicasa común y, dependiendo del dominio específico que contengan, se subdividen en varias subfamilias (SWI/SNF2, ISWI, y CHD) (Langst and Becker, 2004; Lusser and Kadonaga, 2003). Cada subfamilia difiere en el mecanismo utilizado para remodelar la estructura del nucleosoma. Los complejos remodeladores de la cromatina se asocian con co-factores que permiten su interacción selectiva con otras proteínas reguladoras que, a su vez, se unen a secuencias específicas del DNA (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Un segundo mecanismo que modifica la estructura de la cromatina es la modificación covalente de las histonas (Figura 2). Estas modificaciones afectan a la interacción del DNA con las histonas y ocurren en su mayor parte en los aminoácidos de los extremos amino terminales (las denominada "colas" de histonas), que se encuentran en el exterior del nucleosoma. Hasta la fecha, se han identificado distintas modificaciones covalentes de las histonas que en conjunto constituyen el llamado "código de histonas" que participaría en el control de la organización funcional de la cromatina (Jenuwein and Allis, 2001). Algunas de estas modificaciones afectan a residuos de lisina, que pueden ser acetilados, metilados o acoplados a ubiquitinas. También pueden llevarse a cabo modificaciones sobre otros aminoácidos como metilación de argininas o fosforilación de serinas. Todas estas modificaciones están relacionadas y asociadas con diversos patrones de expresión génica, reparación de DNA o replicación (Felsenfeld and Groudine, 2003).

La metilación y la acetilación de las histonas son las marcas epigenéticas en cromatina mejor caracterizadas. En plantas, animales y en la mayoría de las especies de hongos, la eucromatina está asociada con la metilación de la histona H3 en la lisina 4 y con la hiperacetilación de la histona H3 y H4. Por su parte, la heterocromatina se asocia con la metilación de la histona H3 en la lisina 9 y 27, y con la ausencia de acetilación tanto en la histona H3 como en la H4 (Bender, 2004a; Richards and Elgin, 2002; Tariq and Paszkowski, 2004).



**Figura 2. Modificaciones covalentes de histonas.** Las modificaciones de histonas incluyen, entre otras, acetilación, ubiquitinación, metilación y fosforilación. Modificado a partir de (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Otro tipo de modificación en las proteínas de la cromatina implica cambios no covalentes. La mejor documentada hasta la fecha es la incorporación de variantes histónicas de dos tipos de histonas, H2A y H3. Se han identificado cuatro variantes de la histona H2A en mamíferos H2A.Z, H2A.X, marcoH2A y H2A.Bbd (Malik and Henikoff, 2003). De éstas, la variante H2A.X es una de las más estudiadas debido a su fosforilación específica en respuesta a daños en el DNA (Rogakou et al., 1999). La variante H2AZ ejerce una función importante en la transcripción y en el desarrollo en plantas y animales (March-Díaz and Reyes, 2009; Mavrigh et al., 2008) y, recientemente se ha descubierto que existe una relación antagónica entre H2A.Z y la metilación del DNA (Zemach et al., 2010; Zilberman et al., 2008). El número de variantes de histona H3 difiere entre especies. Todos los eucariotas tienen una variante de H3 específica de los centrómeros (CenH3, o CENP-A en mamíferos), que es esencial para el ensamblaje del cinetocoro y la correcta segregación de los cromosomas (Ahmad and Henikoff, 2002; Santisteban et al., 2000; Smith, 2002). Además de CENP-A, los mamíferos contienen tres variantes de H3 que se expresan en todos los



### 3. Metilación del DNA

La metilación de la citosina es una modificación epigenética que se encuentra asociada a la inhibición de la expresión génica (Bird, 2002). Está presente en el genoma de diversos organismos eucarióticos, incluyendo vertebrados, plantas y algunos hongos (Bender, 2004b; Bird, 2002). Los niveles de metilación varían entre las distintas especies. En mamíferos un 3-8% de los residuos de citosinas se encuentran metilados, mientras que en plantas el porcentaje de metilación es de un 6-30% (Chen and Li, 2004). En otros organismos sin embargo, los niveles de metilación son mucho más bajos. En el DNA de *Drosophila melanogaster*, sólo el 0.001% de las citosinas se encuentran metiladas en moscas adultas (Gowher et al., 2000), y en levaduras y nematodos el nivel de metilación de citosina es indetectable (Doerfler, 1983). La metilación del DNA también se observa en los genomas procarióticos, pero en este caso la metilación ocurre tanto en adenina como en citosina y forma parte del sistema de restricción y modificación (Sistema R/M) (Wilson and Murray, 1991). Sólo la metilación de la adenina se utiliza como una señal epigenética en bacterias, que regula las interacciones DNA-proteína (Casadesus and Low, 2006).

Hay dos mecanismos generales a través de los cuales la metilación del DNA inhibe la expresión génica (Figura 5). En primer lugar, la modificación de residuos de citosina puede reprimir de forma directa la transcripción al bloquear la unión de activadores transcripcionales a sus secuencias diana (Figura 5A). En segundo lugar, proteínas que reconocen DNA metilado a través de sus dominios de unión a DNA metilado, MBD (Methyl Binding Domain), pueden reclutar co-represores que efectúan el silenciamiento de la expresión génica (Figura 5B).



**Figura 5. Mecanismos de represión de la transcripción mediados por la metilación del DNA.** (A) El factor de transcripción (TF) no se puede unir al DNA, puesto que no reconoce su secuencia de unión cuando el DNA se encuentra metilado. (B) Proteínas que se unen específicamente al DNA metilado (methyl binding proteins, MBP) reclutan correpresores, modificando el estado de la cromatina y silenciando la transcripción. Modificado a partir de (Klose and Bird, 2006).

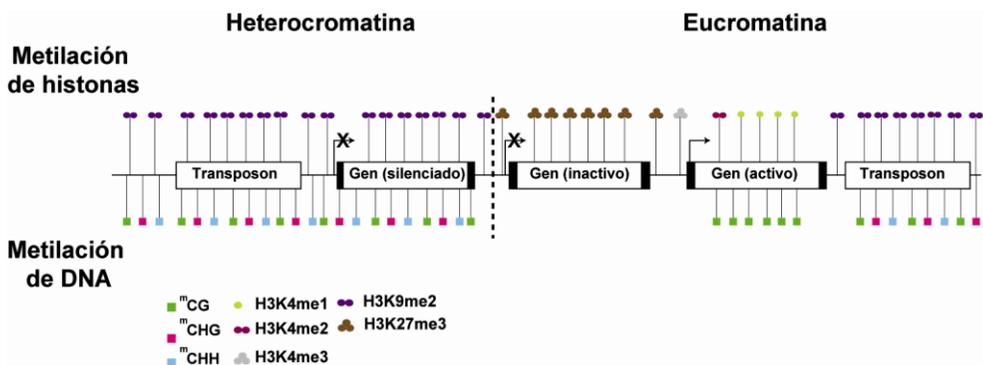
### 3.1. Distribución de la metilación en el genoma

La distribución de la metilación en el genoma varía entre mamíferos y plantas. En mamíferos, la metilación del DNA ocurre casi de forma exclusiva en la secuencias simétricas CG y se estima que aproximadamente el 70%-80% de las secuencias CG a lo largo del genoma se encuentran metiladas (Ehrlich et al., 1982). No obstante, se ha observado que en células embrionarias una pequeña cantidad de las citosinas metiladas se encuentran en contextos diferentes al simétrico CG (Bird, 2002; Lister et al., 2009; Ramsahoye et al., 2000). La mayoría de los dinucleótidos CG no metilados se encuentran de forma mayoritaria cerca de los promotores de los genes formando densos *clusters* denominados islas CpG (Cedar and Bergman, 2009; Suzuki and Bird, 2008).

En plantas la metilación de la citosina también se presenta predominantemente en el contexto CG, pero a diferencia de los animales tiene lugar a niveles apreciables en otros contextos como en el simétrico CHG y en el contexto asimétrico CHH (siendo H=C, A ó T) (Henderson and Jacobsen, 2007). En *Arabidopsis thaliana*, estudios en los niveles de metilación de DNA a escala genómica revelan que aproximadamente el 24%, 6,7% y 1,7% de la metilación ocurre en secuencias CG, CHG y CHH, respectivamente (Cokus et al., 2008). Aunque se ha encontrado una cantidad considerable de DNA metilado en regiones eucromáticas, la metilación del DNA en plantas se localiza mayoritariamente en regiones heterocromáticas con abundancia en secuencias repetitivas tales como centrómeros y telómeros, así como elementos transponibles (Finnegan et al., 1998; Zhang et al., 2006).

Avances recientes en la interpretación del mapa de la metilación del DNA (metiloma) han demostrado que existe metilación en la zona codificante de genes que se transcriben, y que esta metilación se halla altamente conservada en plantas y animales (Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008; Zemach et al., 2010; Zhang et al., 2006; Zilberman et al., 2007). En *Oryza Sativa* y *Arabidopsis*, los genes que se expresan a un nivel moderado y constitutivo tienen un alto nivel de metilación en su zona codificante (Zemach et al., 2010). Por ejemplo, en *Arabidopsis* más de un 20% de los genes que se transcriben se encuentran metilados (Zhang et al., 2006; Zilberman et al., 2007; Zilberman and Henikoff, 2007). Estos datos indican que a diferencia de lo que ocurre con la metilación de la región promotora, que usualmente inhibe la transcripción, la metilación en la zona codificante no afecta a la expresión génica o ejerce un

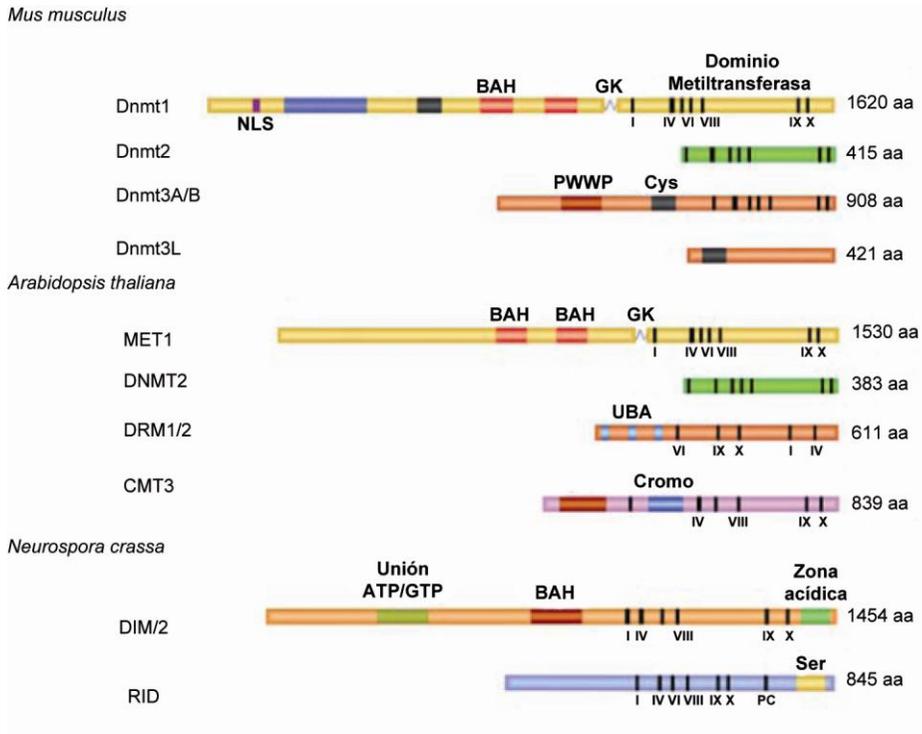
efecto moderado (Stam et al., 1998; Zilberman et al., 2007). Por otro lado, en plantas se observa una diferencia en la distribución de la metilación en transposones y en la zona codificante de los genes. Mientras el extremo final de los genes muestra una disminución en el nivel de metilación similar a la encontrada en su región promotora, los transposones se encuentran fuertemente metilados a lo largo de toda su secuencia (Hodges et al., 2009; Lister et al., 2009; Maunakea et al., 2010). Además, la metilación en la zona codificante de los genes sólo afecta a dinucleótidos CG, lo que contrasta con la metilación típicamente distribuida en secuencias CG, CHG o CHH observada en transposones y secuencias repetitivas de las plantas (Figura 6) (Cokus et al., 2008; Lister et al., 2008; Teixeira and Colot, 2009). Algunos autores sugieren que la metilación en la zona codificante podría tener como función silenciar promotores alternativos, para impedir que estos transcritos anormales interfieran con la expresión génica normal (Maunakea et al., 2010; Zilberman et al., 2007).



**Figura 6. Representación esquemática de la distribución de marcas epigenéticas en el genoma de *Arabidopsis*.** El genoma de *Arabidopsis* puede ser dividido en dos porciones, heterocromatina pericentromérica y los brazos de los cromosomas euromáticos. La heterocromatina contiene abundantes transposones y genes silenciados caracterizados por altos niveles de H3K9me2 y metilación de DNA en los tres contextos de secuencia. Los transposones en la eucromatina también contienen H3K9me2 y los tres tipos de metilación, pero solo en pequeñas zonas limitadas por la longitud del transposon. Algunos genes presentes en la eucromatina que carecen de metilación de DNA son reprimidos por la H3K27me3. Los genes activos presentan metilación en H3K4. Los genes con bajos niveles de expresión presentan metilación en secuencias CG, exceptuando en la zona 5' y 3'. Modificado a partir de (Feng and Jacobsen, 2011).

### 3.2. DNA Metiltransferasas

La metilación del DNA es llevada a cabo por enzimas específicas denominadas DNA metiltransferasas que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina (AdoMet) al carbono 5 de la citosina. Las DNA metiltransferasas procarióticas y eucarióticas contienen una serie de dominios conservados constituidos por el sitio activo, un dominio de unión a AdoMet y un dominio de unión a DNA. El sitio activo contiene dos residuos conservados de prolina y cisteína que se requieren para la transferencia del grupo metilo (Bestor, 2000; Cheng, 1995). Además, las DNA metiltransferasas eucarióticas poseen una extensa región amino-terminal que dirige a las enzimas a las regiones genómicas apropiadas. Aunque las enzimas de hongos presentan alguna diferencia, la mayoría de las DNA metiltransferasas pueden ser clasificadas en cuatro familias según la similitud de secuencia en sus dominios catalíticos. Las familias de DNA metiltransferasas identificadas en mamíferos son DNMT1, DNMT2, DNMT3 A/B y DNMT3L. En plantas se encuentran las familias MET1, DNMT2, DRM1/2 y CMT3 (Figura 7). Hay que destacar que algunos eucariotas, como *Caenorhabditis elegans* o *Saccharomyces cerevisiae*, carecen de metilación de citosinas detectable, y no contienen ninguna secuencia codificante para DNA metiltransferasas en su genoma (Goll and Bestor, 2005).

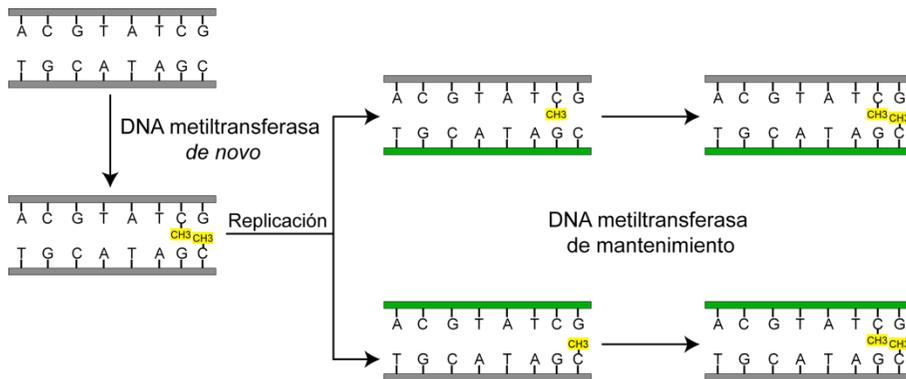


**Figura 7. Comparación de secuencia de DNA metiltransferasas.** Clases de DNA metiltransferasas y sus homólogos en *M.musculus*, *A. thaliana* y *N. crassa*. Además del dominio catalítico, se indican otros dominios conservados de interacción proteína-proteína y proteína-DNA. Modificado a partir de (Goll and Bestor, 2005).

### 3.3. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación

Los patrones de metilación del DNA son establecidos por DNA metiltransferasas *de novo*, que actúan sobre DNA bicatenario no metilado (Grace Goll and Bestor, 2005). La metilación en secuencias simétricas (CG y CHG) se preserva durante los sucesivos ciclos de replicación por la acción de metiltransferasas de mantenimiento, que muestran una preferencia por sustratos hemimetilados y modifican las citosinas simétricas presentes en la cadena de nueva síntesis (Bird, 2002; Finnegan et al., 1998; Kress et al., 2001) (Figura 8). Los mecanismos de mantenimiento de la metilación en secuencias asimétricas (CHH) se desconocen, pero se considera que deben incluir una metilación *de novo* después de cada ronda de replicación. La inactivación de distintos genes que codifican DNA metiltransferasas en mamíferos y plantas ha permitido entender la importancia biológica de la metilación durante el

desarrollo y su papel fundamental en la represión de la actividad de transposones, así como en otros procesos celulares (Goll and Bestor, 2005).



**Figura 8. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación.**

Los patrones de metilación se establecen por la acción de DNA metiltransferasas *de novo*, que actúan sobre DNA no metilado. Una vez establecidos, los patrones de metilación son heredados en sucesivas rondas de replicación mediante la acción de DNA metiltransferasas de mantenimiento que actúan preferentemente sobre DNA hemimetilado.

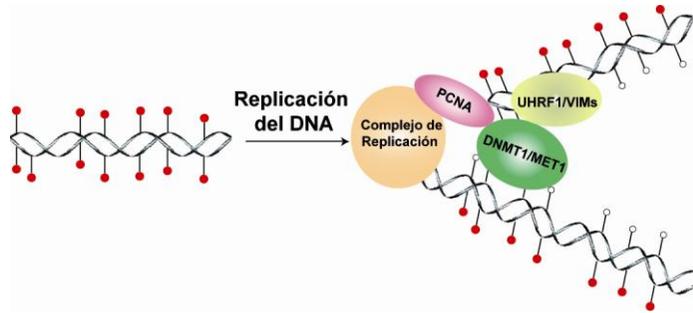
### **Establecimiento de los patrones de metilación**

En mamíferos, la metilación *de novo* del DNA se establece durante el proceso de implantación, en la embriogénesis temprana (Kafri et al., 1992; Monk et al., 1987), y es catalizada por DNMT3A y DNMT3B (DNA metiltransferasas 3A y 3B) (Reik, 2007; Sasaki and Matsui, 2008). Además, en las células germinales, tras la desmetilación que ocurre durante la gametogénesis, se establecen los patrones de metilación *de novo* en los genes improntados y en los elementos transponibles mediante la acción de DNMT3A y DNMT3L. Esta última proteína, está relacionada estructuralmente con DNMT3A y DNMT3B pero no presenta actividad metiltransferasa detectable (Cedar and Bergman, 2009; Reik, 2007; Sasaki and Matsui, 2008). Estudios recientes sugieren distintos mecanismos para la metilación de DNA en los elementos transponibles y la que tiene lugar en los genes improntados durante el desarrollo de la línea germinal. En los elementos transponibles la metilación es dirigida por RNA pequeños de interferencia Piwi (piRNAs) (Aravin et al., 2007), mientras que la metilación de los genes improntados depende de modificaciones específicas en las histonas, por mediación de DNMT3L que interacciona con la cola de H3K4 en su estado no metilado y recluta a DNMT3A a genes específicos (Jia et al., 2007; Ooi et al., 2007; Otani et al., 2009).

En plantas, los miembros de la familia DRM (Domain Rearranged Methyltransferase) son necesarios para el establecimiento inicial de la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) en todos los contextos de secuencia (Ver apartado 3.4).

### **Mantenimiento de los patrones de metilación**

En mamíferos, el mantenimiento de la metilación del DNA, depende de DNMT1. Tras la replicación semiconservativa del DNA, DNMT1 reconoce preferentemente secuencias simétricas CG hemimetiladas y cataliza la metilación de la citosina en la cadena de nueva síntesis (Bird, 2002; Finnegan et al., 1998; Kress et al., 2001). La interrupción del gen DNMT1 en células madre embrionarias de ratón causa una disminución de los niveles de metilación y da lugar a la muerte en etapas tempranas del desarrollo (Li et al., 1992). DNMT1 es reclutada a la horquilla de replicación mediante su interacción con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Chuang et al., 1997). Sin embargo, el papel de PCNA no está claro pues la eliminación de esta interacción solo resulta en una ligera reducción en la metilación (Egger et al., 2006; Schermelleh et al., 2007; Spada et al., 2007). Recientemente, se ha demostrado que la interacción de DNMT1 con UHRF1 (ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain 1), una proteína con afinidad por DNA hemimetilado, es necesaria para su asociación con la cromatina (Figura 9). Mutaciones en UHRF1 causan una severa disminución en los niveles de metilación (Bostick et al., 2007; Sharif et al., 2007). UHRF1 interactúa también con DNMT3A y DNMT3B (Meilinger et al., 2009), lo que sugiere que también, desempeña un papel en la metilación *de novo* y no sólo en la de mantenimiento. Además, el mantenimiento de los patrones de metilación también requiere de factores remodeladores de cromatina como LSH1 (lymphoid-specific helicase 1) (Dennis et al., 2001; Huang et al., 2004), aunque su función no se conoce con exactitud.

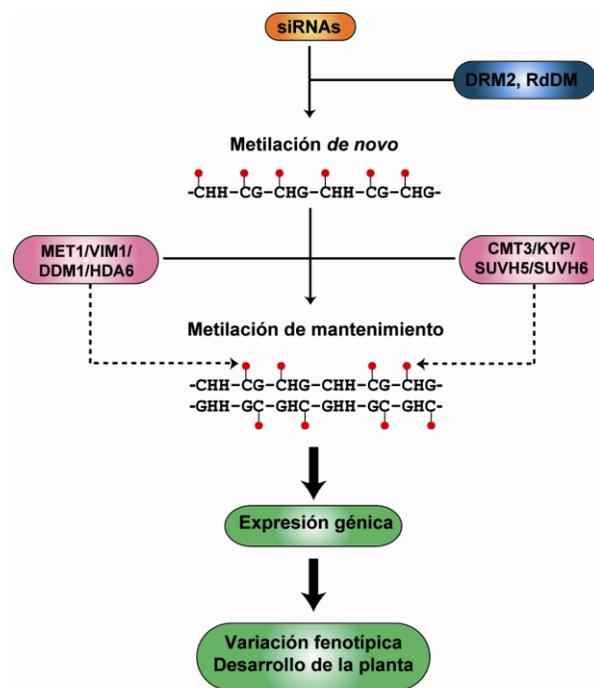


**Figura 9. Mantenimiento en el contexto de secuencia CG.** DNMT1 es reclutada a la horquilla de replicación mediante interacción con PCNA y UHRF1, proteína que se une específicamente a DNA hemimetilado. En plantas MET1 y VIM1, proteínas homólogas a DNMT1 y UHRF1, respectivamente, mantendrían los patrones de metilación en CG de una manera similar. Círculos rojos y blancos representan citosinas metiladas y no metiladas, respectivamente.

En plantas los patrones de metilación son mantenidos por tres rutas diferentes. MET1, ortólogo de DNMT1, es la metiltransferasa encargada del mantenimiento de la metilación en secuencias CG. Su actividad es necesaria para mantener la metilación durante la esporogénesis y la gametogénesis (Kankel et al., 2003; Saze et al., 2003). En *Arabidopsis*, los mutantes *met1* presentan un 60% de desmetilación en regiones que se encuentran normalmente metiladas, lo que provoca la reactivación de transposones y pseudogenes en regiones heterocromáticas (Zhang et al., 2006). Estos datos apoyan la idea de que la metilación mediada por MET1 es la principal responsable del silenciamiento de regiones heterocromáticas en el genoma de la planta (Suzuki and Bird, 2008). Además del control de la metilación en CG, MET1 también podría estar implicada en el mantenimiento de la metilación en otros contextos de secuencia (Finnegan et al., 2000; Lindroth et al., 2001). Además de MET1, en el mantenimiento de la metilación en CG se encuentran implicadas las proteínas VIM1 (Variant In Methylation 1) (Woo et al., 2008). DDM1 (Decrease In DNA Methylation 1), un factor remodelador de la cromatina perteneciente a la familia SNF2/SWI2 (Bender, 2004b) y la histona desacetilasa 6 (HDA6) (Chan et al., 2005) (Figura 10) .

La metilación en secuencias simétricas CHG es llevada a cabo por la metiltransferasa específica de plantas CMT3 (Chromomethylase 3) y la histona metiltransfera SUVH4/KRYPTONITE (KYP). Para ejercer su función, CMT3 interacciona con la histona H3 en su extremo amino terminal una vez que la lisina 9 de la histona H3 ha sido previamente dimetilada por acción de KYP

(Jackson et al., 2004; Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002). Así, la pérdida de función de CMT3 o de KYP ocasiona una disminución drástica de la metilación de DNA (Jackson et al., 2002; Malagnac et al., 2002). Otras dos histona metiltransferasa, SUVH5 y SUVH6, también contribuyen a la metilación en CHG (Ebbs et al., 2005; Ebbs and Bender, 2006) (Figura 10). Además, en algunos loci el mantenimiento de la metilación en secuencias CHG también depende de DRM1 y DRM2 (Cao and Jacobsen, 2002; Chan et al., 2004) y de RNA pequeños de interferencia (siRNAs) que dirigen la metilación (Chan et al., 2005).



**Figura 10. Regulación de la metilación de citosina en plantas.** La metilación *de novo* en todos los contextos de secuencia es llevada a cabo por DRM2, en cooperación con la maquinaria de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM). La metilación en CG y CHG es mantenida por MET1 y CMT3, respectivamente. La metilación de citosina en las regiones promotoras puede afectar a la expresión génica y contribuir a la variación fenotípica y al desarrollo de la planta. Para más detalles, ver texto.

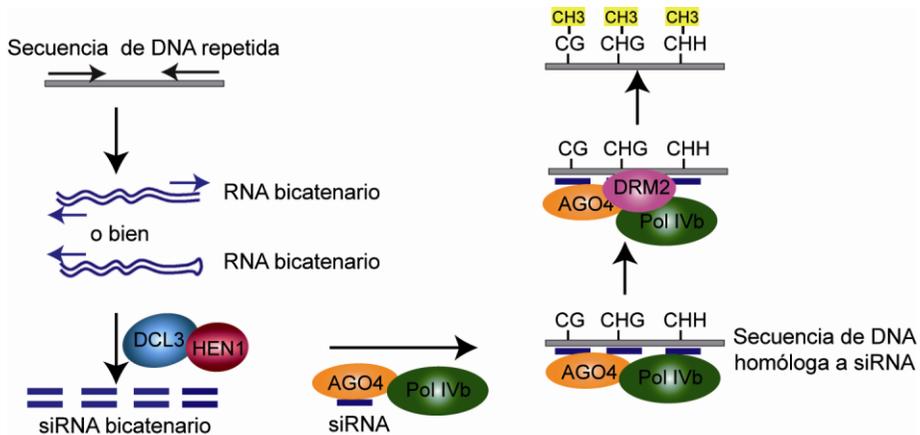
La metilación en secuencias con contexto asimétrico CHH es mantenida por una constante metilación *de novo* llevada a cabo por DRM2 y dirigida por siRNAs (Matzke and Birchler, 2005) (Ver apartado 3.4). En algunos loci, sin

embargo, la metilación en CHH es controlada por CMT3 y DRM2 (Cao et al., 2003).

### **3.4. Metilación de DNA dirigida por RNA**

El término Interferencia por RNA (RNAi) se usó originalmente para describir el silenciamiento génico a nivel postranscripcional mediado por RNA bicatenario (dsRNA) exógeno, un proceso inicialmente identificado en el nematodo *C. elegans* (Fire et al., 1998). Uno de los avances más significativos en los últimos años ha sido el descubrimiento de que la maquinaria celular de RNAi no sólo está implicada en el control génico a nivel postranscripcional, sino que también participa en el control transcripcional de la función génica, dirigiendo la deposición de diversas marcas epigenéticas en la cromatina. La metilación de DNA dirigida por RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM) ha sido claramente detectada en plantas, donde pequeñas moléculas de RNA interferentes (small interfering RNAs, siRNAs) producidas por la maquinaria de RNAi guían la metilación *de novo* de citosinas en todos los contextos (CG, CHG y CHH) en regiones con secuencia homóloga a la del siRNA (Chan et al., 2005; Huettel et al., 2007). Además, existen varias evidencias de que la RdDM contribuye no solo al silenciamiento de transposones sino también a regular genes con importancia para la fisiología y el desarrollo de la planta (Matzke et al., 2007).

La RdDM se inicia por la presencia de un RNA bicatenario. Las moléculas de siRNA que van a guiar la metilación se producen tras el procesamiento de este RNA de doble cadena por enzimas de la familia DICER. En *Arabidopsis thaliana* se propone a la enzima DCL3 (*DICER-like 3*) como responsable de dicho procesamiento (Huettel et al., 2007) (Figura 11). El resultado son pequeñas moléculas de RNA (21-26 nucleótidos) que se unen a un complejo efector que contiene PolVb y proteínas de la familia ARGONAUTA (AGO4 o AGO6), que reclutan a DRM2, produciéndose la metilación *de novo* del DNA en todos los contextos de secuencia (Chan et al., 2005; Matzke et al., 2007; Ream et al., 2009; Xin-Jian He and Co-Shine Wang, 2009) (Figura 11). En el caso de secuencias simétricas, esta metilación se mantendrá posteriormente gracias a las DNA metiltransferasas de mantenimiento MET1 y CMT3, incluso en ausencia de señales de RNA. Sin embargo, es posible que la persistencia de éstas sea necesaria para mantener la metilación en secuencias asimétricas (Mathieu and Bender, 2004).



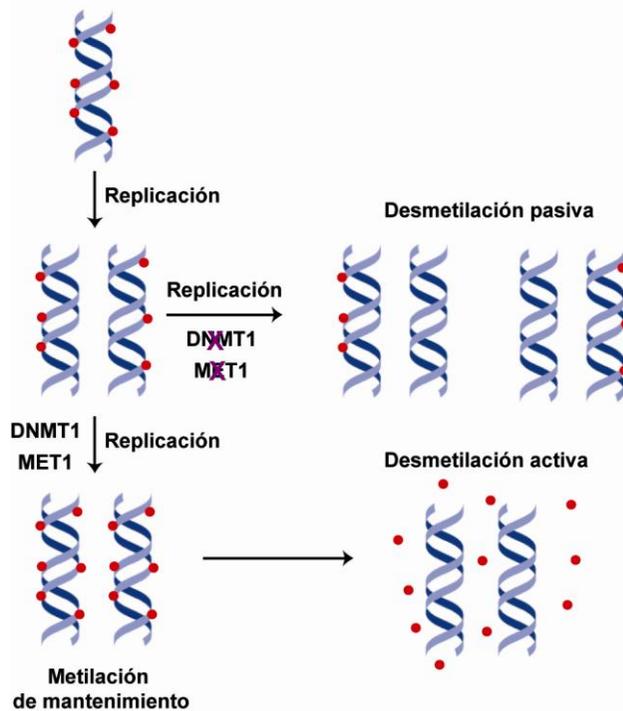
**Figura 11. Metilación de DNA dirigida por RNA.** Tras el procesamiento de RNA de doble cadena por enzimas de la familia DICER (DCL3), se originan moléculas pequeñas de RNA que se unen a proteínas de la familia ARGONAUTA y actúan reclutando la maquinaria de metilación, e induciendo la metilación *de novo* del DNA en todos los contextos en regiones con secuencia homóloga al RNA inicial.

En células de mamífero también se requiere un proceso de RdDM para el silenciamiento de transposones durante la gametogénesis masculina. Mientras que el RdDM en plantas participan siRNAs de 24 nucleótidos, en mamíferos intervienen Piwi-interacting RNAs (piRNAs) de 25-30 nt que se asocian con proteínas del complejo MIWI2 para establecer los patrones de metilación durante el desarrollo de la línea germinal (Aravin et al., 2007; Carmell et al., 2007).

## 4. Desmetilación del DNA

Los patrones de metilación del DNA se heredan tras la división celular gracias a la continua metilación de mantenimiento. Debido a este carácter de heredabilidad, se puede considerar a la metilación del DNA como una modificación estable. Sin embargo, al igual que otras marcas epigenéticas como la acetilación o la metilación de histonas, la metilación del DNA es un proceso reversible y dinámico (Goll and Bestor, 2005; Roldan-Arjona and Ariza, 2009). De este modo, aunque los patrones de metilación se mantienen estables durante sucesivas divisiones celulares, también se modifican por desmetilación global o local en etapas concretas del desarrollo (Reik et al., 2001).

Los niveles de 5-meC y los patrones de metilación son establecidos por la acción combinada de mecanismos de metilación y desmetilación del DNA. La desmetilación del DNA puede ser pasiva o activa. La pérdida de metilación de forma pasiva ocurre cuando las DNA metiltransferasas de mantenimiento permanecen inactivas tras sucesivas rondas de replicación (Saze et al., 2003) (Figura 12). Sin embargo, este modelo pasivo no puede explicar la pérdida de metilación en células que no están en división. En este caso son necesarios mecanismos activos de desmetilación que actúan en ausencia de replicación y requieren la presencia de una o más enzimas. Las proteínas que catalizan la eliminación de la 5-meC son conocidas como desmetilasas. Estas enzimas han sido identificadas y caracterizadas en plantas (Ver apartado 5). Sin embargo, en mamíferos, los mecanismos de desmetilación activa del DNA no son del todo conocido, y hasta la fecha, no se han identificado proteínas con actividad desmetilasa (Ver apartado 4.3).



**Figura 12. Mecanismos de desmetilación de DNA.** Modificado a partir de (Wu and Zhang, 2010).

Muchos estudios demuestran que la desmetilación del DNA juega un papel importante en varios procesos celulares durante el desarrollo, en la defensa del genoma o en la etiología de diversas enfermedades. En general los procesos de

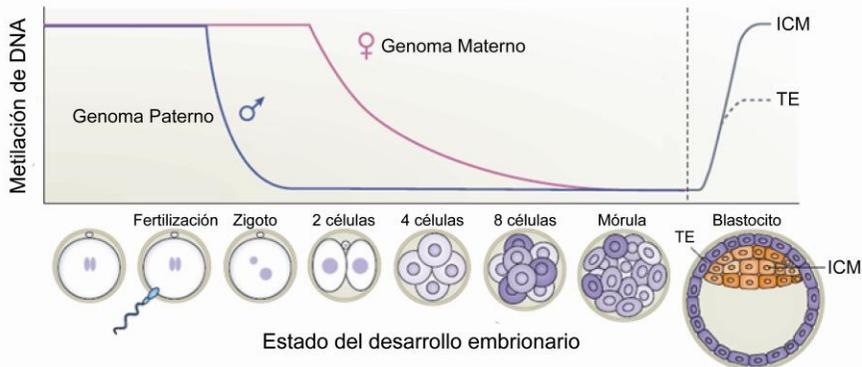
desmetilación influyen en muchos, si no en todos, los procesos donde la metilación del DNA es importante (Zhu, 2009). En mamíferos, varias evidencias apoyan la existencia de un proceso de desmetilación activa a escala global en cigotos y células germinales primordiales (PGCs) (Feng et al., 2010), así como a escala local en célula somáticas, tales como neuronas (Miller and Sweatt, 2007) y linfocitos T (Rai et al., 2010).

#### **4.1. Desmetilación en mamíferos**

En mamíferos se produce una reprogramación epigenética completa durante al menos dos etapas del ciclo vital: en el cigoto durante la fase de preimplantación y en las células germinales primordiales (PGCs) durante el desarrollo de la línea germinal (Hemberger et al., 2009; Sasaki and Matsui, 2008; Surani et al., 2007). Esta reprogramación comprende no sólo la eliminación de los patrones de metilación, sino cambios en las modificaciones de las proteínas cromatina y la pérdida de algunas variantes histónicas. Además, en células diferenciadas se observa desmetilación a nivel local de determinados genes (Frank et al., 1991).

##### **Desmetilación global durante la fase de preimplantación**

El cigoto de los mamíferos sufre inmediatamente tras la fertilización, un proceso de desmetilación activa generalizada. El genoma paterno sufre un borrado de las marcas epigenéticas antes de la replicación del DNA, mientras que el genoma materno no se ve afectado, quedando protegido de la desmetilación (Mayer et al., 2000; Nakamura et al., 2007; Oswald et al., 2000; Santos et al., 2002). También quedan protegidas de la desmetilación regiones diferencialmente metiladas en los genes improntados. Por ejemplo, se ha propuesto que algunas proteínas como Stella (Nakamura et al., 2007) o MBD3 (Methyl-CpG-binding domain 3) (Reese et al., 2007) protegen genes específicos improntados de la desmetilación (Ciccone et al., 2009). Tras la desmetilación activa del genoma paterno, se produce una desmetilación pasiva de ambos genomas parentales antes de la fase de implantación, seguida de una metilación *de novo* y una reorganización de las modificaciones histónicas. Estos procesos son necesarios para adquirir la pluripotencia y los patrones de metilación característicos en el animal adulto (Monk et al., 1987; Morgan et al., 2005; Weiss and Cedar, 1997).



**Figura 13. Dinámica de la metilación del DNA durante el desarrollo.**

Inmediatamente tras la fertilización, el genoma paterno sufre una rápida desmetilación activa y permanece desmetilado durante las siguientes rondas de división celular. Durante este tiempo el genoma materno sufre una pérdida de metilación mediante un proceso de desmetilación pasiva. Los patrones de metilación son establecidos mediante metilación *de novo* por DNMT3A y DNMT3B durante el desarrollo del blastocito. ICM: masa celular interna; TE: trofoectodermo. Modificado a partir de (Wu and Zhang, 2010).

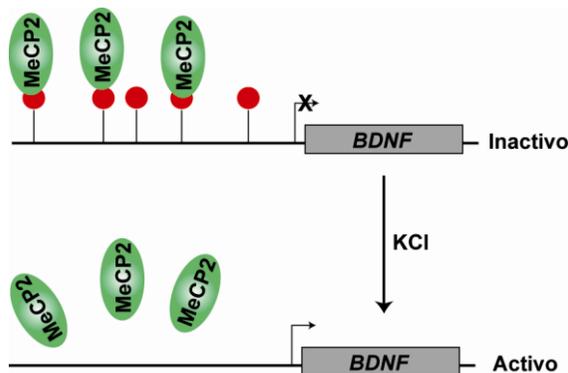
### **Desmetilación global durante el desarrollo de la línea germinal**

En las células precursoras de la línea germinal (PGCs, células germinales primordiales), la desmetilación del genoma a nivel global tiene lugar tras la implantación del embrión, y es necesaria para restablecer la pluripotencia en los futuros gametos (Reik et al., 2001; Surani et al., 2007). En PGCs femeninas de ratón, solo el 7% de las secuencias CGs permanecen metiladas (frente a un 70 a 80% en las células embrionarias y las células somáticas). En las PGCs, además de la pérdida de metilación es característica la eliminación de marcas epigenéticas represivas en las histonas, como la metilación de la lisina 9 de la histona H3 o la metilación de la arginina 3 de la histona H4 y de la histona H2A (Hajkova et al., 2008; Seki et al., 2007). Además genes específicos de las células de la línea germinal que se encuentran metilados en estados tempranos del desarrollo pierden la metilación y se expresan durante la reprogramación (Maatouk et al., 2006). Tras la desmetilación global de las células germinales, se produce una remetilación de los genes asociados a la pluripotencia (Maatouk et al., 2006).

## Desmetilación local en células somáticas

En células somáticas también se ha observado desmetilación activa del DNA, pero en este caso la desmetilación no es global, sino que tiene lugar de forma localizada en tejidos, en genes concretos y en momentos específicos del desarrollo. De hecho, existen pruebas de que la regulación de los patrones de metilación mediante desmetilación activa desempeña un papel importante en la neurogénesis en el cerebro adulto, en la respuesta inmune o en la tumorigénesis, entre otros procesos (Zhu, 2009).

En el caso de las neuronas, por ejemplo, se observa una desmetilación específica en el promotor de *BDNF* (factor neurotrófico derivado del cerebro), que codifica una proteína importante para la plasticidad neuronal en cerebro adulto. En neuronas no estimuladas, el promotor de *BDNF* está metilado, permitiendo el reclutamiento del factor represivo MeCP2. Cuando se depolariza con KCl, se estimula la expresión de *BDNF*, coincidiendo con una relajación de la unión de MeCP2 y con la desmetilación activa del promotor (Martinowich et al., 2003).



**Figura 14. Un ejemplo de desmetilación activa de DNA específica de locus en células somáticas.** En neuronas, la expresión del gen del factor neurotrófico derivado de cerebro (*BDNF*) está silenciado por metilación y la consiguiente unión de MeCP2 (proteína de unión a 5-meC). Tras la despolarización con KCl, se pierde la metilación y se activa la expresión de *BDNF*. Este proceso se considera una desmetilación activa del DNA porque ocurre en neuronas post-mitóticas. Círculos rojos: 5-meC. Modificado a partir de (Wu and Zhang, 2010).

Las citoquinas IL-2 (interleuquina 2) y IFN- $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ) son importantes para la función de las células T CD8. Durante la estimulación de los linfocitos T, se produce una desmetilación activa en la región del promotor de la *IL-2* y del

*IFN- $\gamma$* , lo que conlleva a una rápida formación de células T CD8 (Bruniquel and Schwartz, 2003; Kersh et al., 2006; Northrop et al., 2006). Además de las células T y las neuronas, también se ha detectado desmetilación activa del DNA durante la activación de genes regulados por hormonas. El promotor del gen *ps2* sufre un proceso periódico de metilación y desmetilación que coincide con la unión cíclica del receptor  $\alpha$  de estrógenos ( $E\alpha$ ) y la expresión de *ps2* (Kangaspeska et al., 2008; Metivier et al., 2008). Estos estudios sugieren que la metilación del DNA no sólo funciona como una marca silenciadora a largo plazo, sino también en la regulación dinámica de genes que requieren respuestas rápidas a estímulos específicos (Wu and Zhang, 2010).

En situaciones patológicas, los patrones de metilación en las células somáticas pueden verse alterados de forma significativa. Por ejemplo, los niveles de metilación del DNA en muchos tipos de cáncer se encuentran reducidos de forma global (Ehrlich, 2002; Feinberg et al., 2006; Wilson et al., 2007). Las regiones genómicas que se encuentran hipometiladas en cáncer incluyen secuencias repetitivas, genes improntados, genes específicos de tejido, oncogenes y genes asociados con invasión de tejido y metástasis (Kisseljova and Kisseljev, 2005; Wilson et al., 2007). Sin embargo varios loci, incluyendo genes supresores de tumores, se encuentran hipermetilados y silenciados durante la tumorigénesis (Feinberg et al., 2006; Jones and Baylin, 2002; Jones and Laird, 1999). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos que provocan los patrones aberrantes de metilación, la hipometilación global del DNA en cáncer podría implicar tanto mecanismos de desmetilación activa como pasiva, mientras que la inhibición de procesos de desmetilación activa del DNA podría contribuir a la hipermetilación de los genes supresores de tumor (Esteller, 2003; Esteller, 2007).

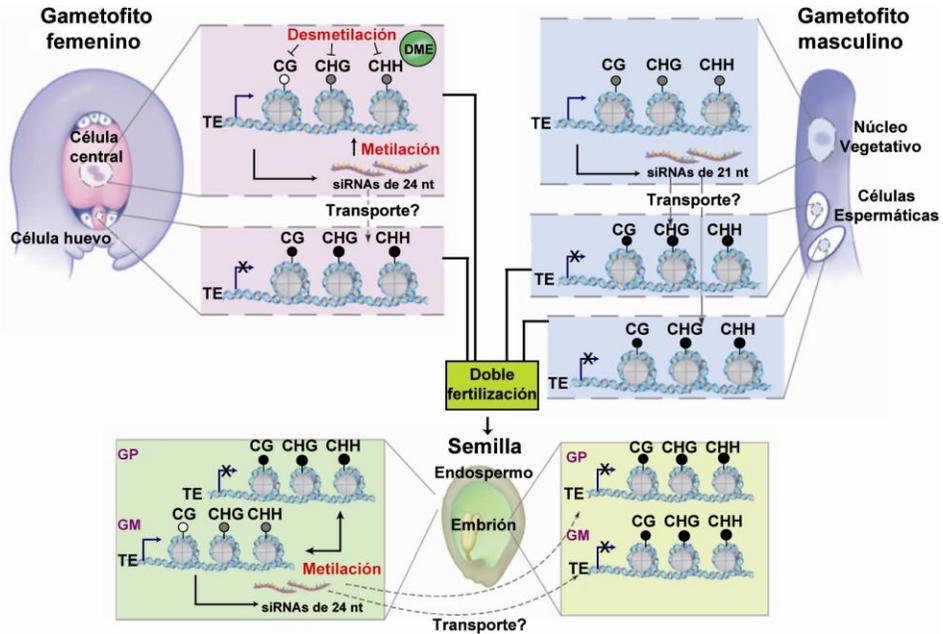
## **4.2. Desmetilación en plantas**

Las plantas, a diferencia de los animales, no llevan a cabo una desmetilación global del genoma del cigoto tras la fertilización ni una posterior remetilación durante el desarrollo embrionario, sino que, por el contrario, transmiten los patrones de metilación a la siguiente generación (Finnegan et al., 1998). Por ejemplo, en *Arabidopsis* los alelos hipermetilados del gen *SUPERMAN* se mantienen estables a lo largo de varias generaciones (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). Sin embargo, varios estudios han mostrado que ocurre reactivación de transposones y pérdida global de metilación durante la

gametogéneis masculina y femenina, respectivamente, indicando que los patrones de metilación del DNA en plantas son dinámicos durante el desarrollo. Esta hipometilación es similar a la desmetilación global observada en las PGCs y en el genoma paterno durante el desarrollo en mamíferos (Reik, 2007; Sasaki and Matsui, 2008).

En las angiospermas, durante la gametogénesis masculina se producen granos de polen tricelulares, que contienen un núcleo vegetativo y dos células espermáticas (Huh et al., 2008). Los transposones se encuentran metilados y silenciados en la mayoría de los tejidos de la planta, sin embargo, se expresan y son móviles en el polen (Slotkin et al., 2009). Esta reactivación de transposones parece estar limitada al núcleo vegetativo, quedando protegida la integridad genómica de las células espermáticas, responsables de transmitir la información genética a las siguientes generaciones (Huh et al., 2008). La secuenciación de la población de siRNA en el polen ha mostrado un incremento de los siRNAs de 21 nt en las células espermáticas. Se ha postulado que estos siRNAs se generan en el núcleo vegetativo y podrían viajar hacia las células espermáticas, donde provocarían el silenciamiento mediante RdDM (Slotkin et al., 2009) (Figura 15).

También tiene lugar un proceso de desmetilación activa durante la gametogénesis femenina. Las angiospermas se caracterizan por sufrir una doble fertilización (Chaudhury et al., 1997). Tras la fusión de una de las dos células espermáticas del grano de polen con la célula huevo del saco embrionario se forma el cigoto, que es diploide. La otra célula espermática se fusiona con la célula central binucleada del saco embrionario para formar el endospermo, que es triploide. Aunque estudios previos han documentado disminución en la metilación de varios loci imprintados en el endospermo (Huh et al., 2008), otros estudios más recientes muestran que la disminución en la metilación del DNA también se produce a escala global en el endospermo, y que esa reducción se origina probablemente por una desmetilación activa en la célula central del gametofito femenino catalizada por DME (DEMETER) (ver apartado 5.3). (Gehring et al., 2009; Hsieh et al., 2009). Al igual que el mecanismo propuesto para la célula vegetativa y reproductiva del polen, estos estudios sugieren que la activación de transposones por desmetilación y la acumulación de siRNAs en la célula central podría generar un aumento de la metilación y el consiguiente silenciamiento de transposones en la célula huevo, y posteriormente en el embrión, mediada probablemente por un transporte de siRNA (Figura 15) (Y. Z. Han, 2000).



**Figura 15. Modelo del proceso dinámico de silenciamiento epigenético durante el ciclo vital de *Arabidopsis*.** En el gametofito femenino, DME desmetila el DNA en la célula central (Ver apartado 5.3), lo que induce la expresión de transposones y la activación de RdDM. Los siRNAs producidos en la célula central son transportados hasta la célula huevo y provocarían a su vez el silenciamiento de transposones. En el gametofito masculino se producen siRNAs que se transportan hasta las células espermáticas reforzando el silenciamiento de transposones. Tras la doble fertilización, la expresión de los transposones en el genoma materno produce siRNAs de 24 nt que podrían causar silenciamiento por RdDM de los transposones del genoma paterno en el endospermo. Estos siRNAs podrían causar altos niveles de metilación en el embrión. Los colores de los círculos indican diferentes niveles de metilación: negro: alto; gris: medio; blanco: bajo. GP: Genoma paterno; GM: Genoma materno. Modificado a partir de (Feng et al., 2010).

En plantas, una función importante de la desmetilación activa del DNA es contrarrestar las actividades de las enzimas de la ruta de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM), evitando así que se acumule en secuencias repetitivas una metilación excesiva que podría interferir con la expresión de genes celulares cercanos (Penterman et al., 2007a). Además, es importante para otras funciones como las indicadas a continuación:

## **Prevención del silenciamiento transcripcional de transgenes y de genes endógenos**

En plantas, siRNAs de 24 nt pueden provocar silenciamiento transcripcional mediante la inducción de la metilación de citosinas en secuencias promotoras. Estos siRNAs son generados endógenamente a partir de transposones o de secuencias repetitivas de DNA. Cuando el promotor de un transgen o de un gen endógeno genera siRNAs de 24 nt, el promotor se silencia mediante RdDM (Baulcombe, 2004; Matzke et al., 2007; Matzke and Birchler, 2005). En *Arabidopsis thaliana* la proteína ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1), que codifica una 5-meC DNA desmetilasa (Ver apartado 5), se necesita para mantener la expresión de un transgen y del gen endógeno homólogo (Gong et al., 2002).

### **Regulación del imprinting**

En *Arabidopsis*, la desmetilación activa de DNA es necesaria para la expresión del alelo materno de genes improntados tales como FWA (Flowering WAGENINGEN) (Kinoshita et al., 2004), el grupo de genes de polycomb MEA (MEDEA) (Gehring et al., 2006), FIS2 (fertilization independent seed 2) (Jullien et al., 2006), y el dominio C-terminal de la proteína de unión a poli A, MPC (maternally expressed PAG C-terminal) (Tiwari et al., 2008). Estos genes improntados se encuentran hipermetilados y requieren la acción de la DNA glicosilasa DME para ser expresados a partir del alelo materno en la célula central del endospermo (Huh et al., 2008). (Ver apartado 5.3)

### **Regulación de transposones**

En plantas, los transposones y secuencias repetitivas se encuentran altamente metilados en toda su secuencia, particularmente en el contexto CHG, lo que conlleva a una represión de la transcripción. Sin embargo, se han detectado bajos niveles de expresión, sugiriendo que el silenciamiento de los transposones no es completo (Zhu et al., 2007). Un estudio ha mostrado que mutantes de *Arabidopsis* en la desmetilasa ROS1 presentan altos niveles de metilación en transposones, específicamente en secuencias CHG y CHH (Zhu et al., 2007). Este aumento en la metilación se correlaciona con menores niveles de expresión en estos loci, sugiriendo que, la desmetilación activa de DNA es importante para mantener a los transposones en un estado dinámico en el que su expresión no esté del todo silenciada. Los transposones y otros elementos

repetitivos representan la mayor parte del genoma de las plantas, y desempeñan un papel importante en la evolución y estructura del genoma promoviendo la variabilidad genética a través de la transposición (Bennetzen, 2005; Feschotte et al., 2002). El control dinámico de los transposones por metilación y desmetilación contribuye a la plasticidad del epigenoma de la planta de forma que puede responder eficientemente a los cambios ambientales y a señales durante el desarrollo (Zhu, 2009).

### **Descondensación de 5S rDNA cromatina**

En *Arabidopsis* las repeticiones 5S rDNA dentro de la zona heterocromática pericentromérica se silencian por RdDM y compactación de la cromatina (Pikaard, 2006). En una etapa temprana del desarrollo de la planta se produce una descondensación de la cromatina 5S rDNA producida por un mecanismo de desmetilación activa dependiente de ROS1. Poco tiempo después, 5S rDNA es metilada por RdDM y recondensada. Esta pequeña descondensación de la cromatina puede ser importante para desbloquear una fracción de las unidades de 5S rDNA de forma que la cromatina pueda responder a cambios ambientales. (Douet et al., 2008).

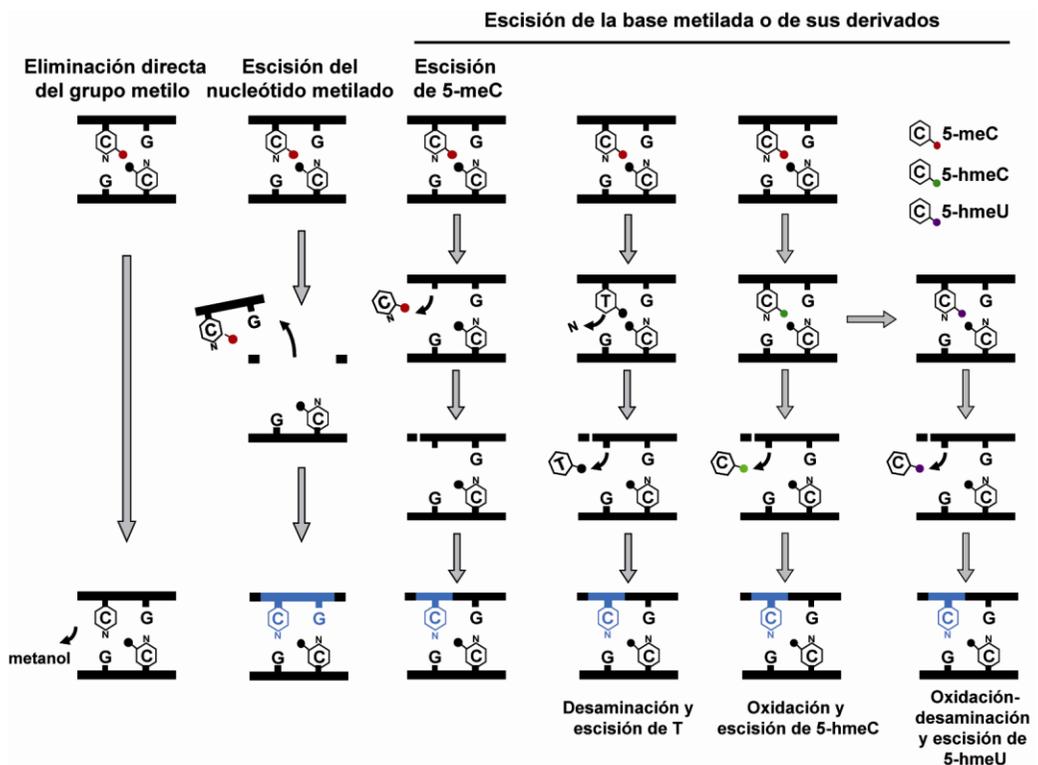
### **Respuesta de la planta a estrés biótico y abiótico**

La desmetilación del DNA podría ser necesaria para activar genes específicos o para borrar marcas epigenéticas en el genoma durante el desarrollo en respuesta a perturbaciones ambientales (Finnegan and Kovac, 2000; Kress et al., 2001). Así por ejemplo, la metilación global de DNA se reduce en plantas de *Arabidopsis* infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* (Pavet et al., 2006). Además, en plantas de tabaco, la metilación de DNA es rápidamente reducida en la región codificante de un gen similar a glicerofosfodiesterasa, tras tratamiento con aluminio, NaCl, frío o estrés oxidativo. (Choi and Sano, 2007). No obstante, se desconoce si dichos cambios son el resultado de un proceso de desmetilación activa.

## **4.3. Mecanismos de desmetilación activa**

Se han propuesto varios mecanismos por los que la desmetilación activa de DNA se puede llevar a cabo: eliminación directa del grupo metilo de la 5-meC, escisión de la base metilada a través de un mecanismo de reparación por escisión de bases (BER), desaminación de la 5-meC a T seguida de la reparación

por BER del apareamiento erróneo T:G, escisión del nucleótido metilado, junto con uno o más nucleótidos adyacentes, a través de la ruta de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y desmetilación oxidativa (Figura 16). Por el momento, ninguno de estos mecanismos ha sido aceptado en animales de forma generalizada, ni se ha podido demostrar que opere en condiciones fisiológicas. Por el contrario, en plantas existen pruebas bioquímicas y genéticas de que la 5-meC es eliminada de forma directa mediante un mecanismo análogo a la reparación por escisión de bases (BER).



**Figura 16. Mecanismos de desmetilación activa.** Para más detalles ver texto. Modificado a partir de (Roldan-Arjona and Ariza, 2009).

### Eliminación directa del grupo metilo

Se ha descrito que la proteína MBD2 de humanos es capaz de desmetilar el DNA *in vitro* mediante una hidrólisis de grupo metilo. Esta reacción resulta en el reemplazamiento del grupo metilo por un átomo de hidrógeno y la liberación de metanol como subproducto (Bhattacharya et al., 1999). Sin embargo, estos resultados no se han podido reproducir por otros laboratorios (Ng et al., 1999;

Wade et al., 1999) Además, ratones deficientes en MBD2 son viables y muestran unos patrones de metilación normales (Hendrich et al., 2001).

### **Escisión del nucleótido metilado**

Weiss et al. propusieron en 1996 otro mecanismo de desmetilación activa que implica la escisión del dinucleótido CG metilado (Weiss et al., 1996). La reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair, NER) es usada generalmente para reparar daños en el DNA que contienen lesiones voluminosas causadas por exposición a agentes químicos o radiaciones y requiere la eliminación de varios nucleótidos (24-32). Posteriormente, el hueco es reparado y sellado por una polimerasa y ligasa, respectivamente (Sancar et al., 2004). Recientemente, se ha propuesto que GADD45a (Growth Arrest and DNA Damage) tiene un papel en la desmetilación activa en mamíferos junto con XPG (Xeroderma Pigmentosum Complementation group G), una nucleasa que participa en el proceso de reparación de DNA por escisión de nucleótidos (Barreto et al., 2007). *GADD45a* es un gen inducible por p53 y BRCA1 (Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein), que participa en diversos procesos biológicos como en respuestas a daño en el DNA, progresión del ciclo celular, apoptosis o NER. Sin embargo, se ha cuestionado su posible papel en desmetilación ya que ratones deficientes en *GADD45A* no muestran defectos en la metilación del DNA ni a escala global ni en regiones concretas del genoma (Engel et al., 2009).

### **BER iniciado por una 5-meC glicosilasa**

Uno de los mecanismos propuestos para la desmetilación activa de DNA implica la escisión de la 5-meC como base libre catalizada por DNA glicosilasas. Las DNA glicosilasas son enzimas monoméricas, generalmente de pequeño tamaño (200-400 aminoácidos), que reconocen lesiones causadas por agentes genotóxicos endógenos o exógenos (Scharer and Jiricny, 2001). Estas proteínas catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico que une la base alterada con el esqueleto azúcar-fosfato y dejan un sitio abásico (sitio AP) que debe ser reparado por la ruta de reparación por escisión de bases (BER). El resultado final es la sustitución de una 5-meC por una citosina no metilada. Estudios genéticos y bioquímicos en *Arabidopsis* han revelado que las proteínas pertenecientes a la familia DML (DEMETER-LIKE) funcionan como desmetilasas y catalizan la liberación de 5-meC del DNA mediante un mecanismo BER (Agius et al., 2006;

Gehring et al., 2006; Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008; Penterman et al., 2007b) (Ver apartado 5).

Los animales, a diferencia de las plantas, carecen de proteínas pertenecientes a la familia DML. Sin embargo, se ha propuesto que las DNA glicosilasas TDG y/o MBD4 también pueden escindir directamente 5-meC del DNA. Sin embargo, estas glicosilasas tienen muy poca actividad 5-meC *in vitro* comparada con su actividad sobre apareamientos erróneos T:G (Jost et al., 2001; Zhu et al., 2001; Zhu et al., 2000a; Zhu et al., 2000b).

### **Desaminación de 5-meC seguida de BER**

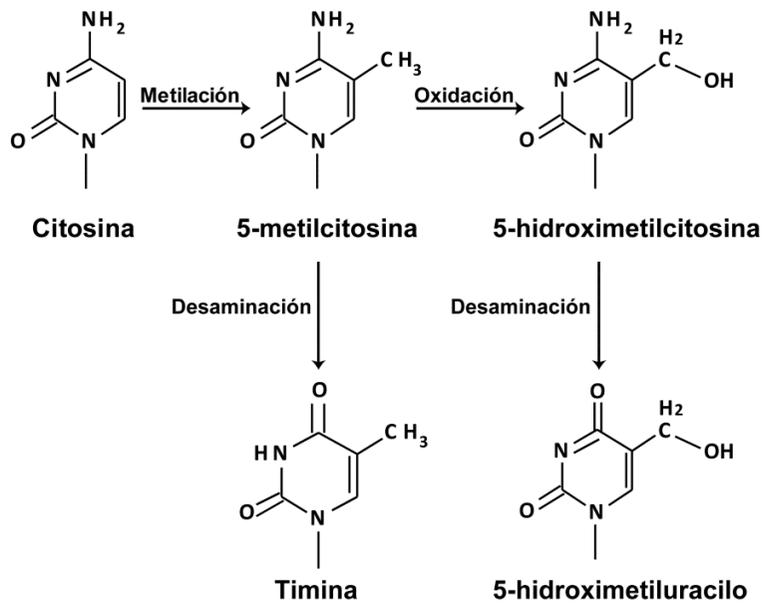
La desmetilación activa del DNA también podría ocurrir por una desaminación de 5-meC a T acoplada a la reparación del apareamiento erróneo T:G por DNA glicosilasas (Hajkova et al., 2010; Morgan et al., 2004; Popp et al., 2010). Recientemente se ha propuesto que en células de cáncer de pulmón en cultivo las DNA metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B pueden desaminar la 5-meC, y esta desaminación desempeña un papel crítico en una ruta dinámica de metilación-desmetilación durante la transcripción génica (Metivier et al., 2008). Se sabe que DNMT3A y DNMT3B interactúan con TDG (Boland and Christman, 2008; Li et al., 2007). Estas interacciones podrían reflejar el acoplamiento entre las actividades de desaminación de 5-meC y la reparación del apareamiento erróneo T:G para alcanzar el estado de desmetilación (Metivier et al., 2008). Alternativamente, las interacciones podrían simplemente permitir a la DNA glicosilasa ser reclutada en el sitio de metilación para prevenir las mutaciones C a T causadas por la desaminación espontánea de 5-meC (Boland and Christman, 2008; Li et al., 2007). La familia de proteínas AID/APOBEC-1 (Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B RNA Editing Catalytic Component-1), constituidas por citidina desaminasas de RNA, podrían también ser capaces de desaminar la 5-meC del DNA (Morgan et al., 2004). De hecho, en embriones de pez zebra la desmetilación activa global del DNA puede ser llevada a cabo por la acción acoplada de AID y MBD4 (Rai et al., 2008). No obstante, existen observaciones que no concuerdan con la idea de que AID/ APOBEC-1 o las DNA metiltransferasas *de novo* sean cruciales durante la desmetilación del DNA. Por una parte, los ratones deficientes en AID poseen alteraciones en sus linfocitos B pero son viables y fértiles (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Además, las DNA metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B no se expresan en las PGCs, que por otro lado presentan un nivel de

expresión de APOBEC-1 muy bajo (Hajkova et al., 2010). Por otro lado, otros estudios apoyan la implicación de la glicosilasa TDG en la desmetilación activa de DNA y en el mantenimiento de la estabilidad epigenética. Ratones deficientes en TDG mueren en estado embrionario (Cortazar et al., 2011; Cortellino et al., 2011). Además, fibroblastos derivados de embriones nulos para TDG muestran defectos en desmetilación en promotores de genes asociados con el desarrollo (Cortazar et al., 2011).

### **Desmetilación oxidativa seguida de BER**

Es posible que la desmetilación activa de DNA se pudiera producir por un mecanismo de desmetilación oxidativa. Las proteínas de la familia Alkb de *E. coli*, proteínas implicadas en la respuesta a daños en el DNA por agentes alquilantes, pueden eliminar el grupo metilo de 1-metiladenina (1-meA) y 3-metilcitosina (3-meC) por una desmetilación oxidativa empleando Fe (II) y  $\alpha$ -cetoglutarato como cofactores, y generando formaldehído como subproducto (Falnes et al., 2002; Trewick et al., 2002). Este es el mismo mecanismo usado por la familia de proteínas desmetilasas de histonas, JmjC (Klose and Bird, 2006; Tsukada et al., 2006). Aunque el enlace C-C en la 5-meC es energéticamente más difícil de romper que el enlace C-N en la 1-meA, 3 meC o las histonas metiladas, es factible que un nuevo tipo de oxidasa pudiera desmetilar la 5-meC por un mecanismo oxidativo (Zhu, 2009). De hecho, existen enzimas de hongos que pueden romper este enlace, como la timina 7-hidroxilasa, que puede catalizar la conversión de T a iso-orotato a través de tres reacciones consecutivas de oxidación (Warn-Cramer et al., 1983). Aunque no existen homólogos en mamíferos para estas proteínas, sí se han encontrado proteínas similares a éstas, como las JBP1 y JBP2 (Base J-Binding Protein) (Cliffe et al., 2009; Yu et al., 2007). En el intento de buscar proteínas de mamíferos con similitud a los dominios dioxigenasas de las proteínas JPB, se identificó la familia de proteínas TET. TET1, miembro fundador de la familia TET, puede catalizar la conversión de 5-meC a 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC), en cultivos de células *in vitro*, en una reacción dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato y Fe (II) (Tahiliani et al., 2009). En este sentido, TET1 podría catalizar la oxidación de 5-meC a 5-hmeC, que sería posteriormente reconocida y eliminada por una DNA glicosilasa específica. Se ha observado la expresión de TET1 y TET2 en PGCs (Hajkova et al., 2010). Hasta la fecha no se conocen DNA glicosilasas en mamíferos que puedan procesar la 5-hmeC. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que la 5-hmeC puede ser procesada a 5-hidroximetiluracilo (5-

hmeU) por proteínas desaminasas de la familia AID/APOBEC. De esta forma, hay estudios que muestran que la 5-meC y la 5-hmeC son desaminadas a T y 5hmeU, respectivamente, posteriormente procesadas por la glicosilasa TDG o SMUG1 para ser reparadas finalmente por la ruta BER (Cortazar et al., 2011; Cortellino et al., 2011; Guo et al., 2011). Sin embargo, estos autores no descartan la posibilidad de que la 5-hmeC sea procesada directamente a citosina por un mecanismo desconocido. Se ha encontrado 5-hmeC en células embrionarias de mamíferos, células neuronales Purkinje y en cerebro (Kress et al., 2006; Tahiliani et al., 2009). Hasta el momento no se ha detectado la base 5-hmeC en plantas. En la Figura 17 se muestra las bases modificadas de citosina que se encuentran en humanos.



**Figura 17. Estructura química de la citosina y sus modificaciones encontradas en humanos.**

Por otro lado, se han detectado altos niveles de proteínas que intervienen en la ruta BER como PARP1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1), APE1 (apurinic-apyrimidinic (AP) endonuclease I) y XRCC1 (X-ray cross complementing group protein 1) en cigotos de ratón (Hajkova et al., 2010). Además, se ha observado que XRCC1 se une a la cromatina en pronúcleos paternos, pero no en pronúcleos maternos, y su presencia coincide con el momento de la desmetilación del DNA. Por último, la inhibición de la ruta BER, resulta en un aumento significativo en el nivel de metilación del DNA en el genoma paterno

(Hajkova et al., 2010). Todos estos datos apuntan a un papel crucial del BER en la desmetilación activa de DNA en cigotos.

## 5. La familia DML de 5-meC DNA desmetilasas

### 5.1. Identificación

Hasta la fecha, las plantas son el único organismo donde se han encontrado pruebas genéticas y bioquímicas convincentes de la existencia de enzimas con actividad 5-meC DNA desmetilasa. Estas enzimas pertenecen a la familia denominada DML (DEMETER-LIKE) cuyos miembros fundadores son dos proteínas de *Arabidopsis thaliana* denominadas DME (DEMETER) y ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002).

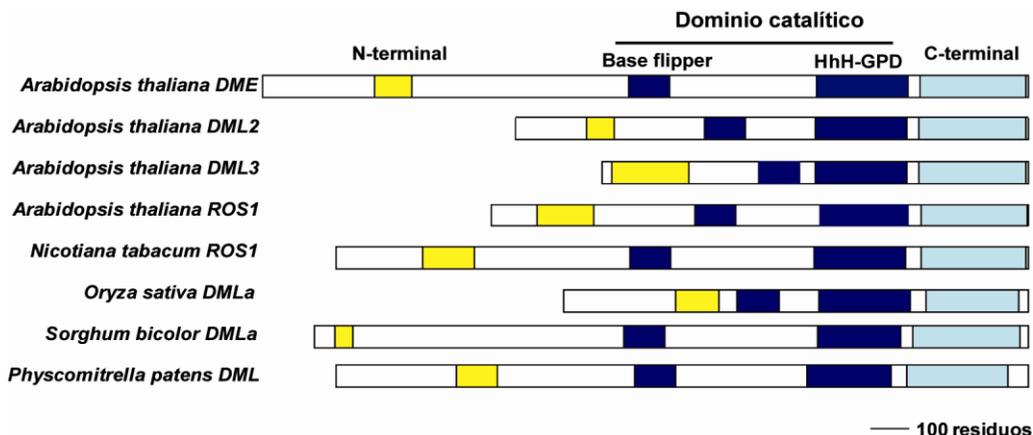
DME se identificó en un escrutinio diseñado para detectar mutaciones cuyos efectos en la viabilidad de las semillas dependiesen del origen parental del alelo mutante. La pérdida de función de esta proteína causa daños en el endospermo, alteraciones en el desarrollo del embrión y, como consecuencia, semillas abortivas (Choi et al., 2002). DME se expresa fundamentalmente en la célula central del gametofito femenino, donde se requiere para la expresión de los alelos maternos de los genes improntados *MEA*, *FWA* y *FIS2* (Choi et al., 2002; Jullien et al., 2006; Kinoshita et al., 2004). ROS1 se identificó en una búsqueda de mutantes con expresión desregulada en el transgen repetitivo *RD29A-LUC* (Gong et al., 2002). Mientras que en plantas silvestres el transgen y el gen endógeno homólogo se expresan, los mutantes *ros1* presentan silenciamiento transcripcional e hipermetilación de ambos loci (Gong et al., 2002). Al contrario que DME, que solo se expresa en el gametofito femenino, ROS1 se expresa en una amplia variedad de tejidos. Mutantes *ros1* muestran anomalías en su desarrollo vegetativo, con un crecimiento más lento y una menor producción de silicuas, y en el desarrollo reproductivo, con una alta proporción de semillas abortivas (Gong et al., 2002). Además de DME y ROS1, el genoma de *Arabidopsis* codifica dos parálogos adicionales, DML2 y DML3 (DEMETER-LIKE 2 y 3, respectivamente) (Choi et al., 2002). A diferencia de los mutantes *dme* y *ros1*, que presentan un fenotipo pleiotrópico con alteraciones severas en el desarrollo (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002), los mutantes *dml2* y *dml3* no muestran ninguna alteración fenotípica obvia bajo condiciones de crecimiento normales (Ortega-Galisteo et al., 2008).

Las proteínas de la familia DML son DNA glicosilasas bifuncionales que presentan una región con una significativa similitud de secuencia a las DNA glicosilasas de la superfamilia HhH-GPD (Hélice-horquilla-hélice y Glicina/Prolina-Aspártico) (Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006) (Figura 18). La familia HhH-GPD constituye el grupo de DNA glicosilasas más diverso con amplias diferencias en cuanto a especificidad de sustrato entre sus miembros. Algunas DNA glicosilasas pertenecientes a esta familia son Nth (timinglicol DNA glicosilasa/ AP liasa), AlkA (3-metiladenina glicosilasa II), Ogg1 (8-oxoguanina glicosilasa), MutY (adenina DNA glicosilasa), MBD4, MIG (timina-DNA glicosilasa), y sus homólogos en diferentes organismos (Huffman et al., 2005). Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia reparan diversas lesiones, incluyendo aquellas generadas por oxidación, alquilación y daño hidrolítico. Su estructura básica consiste en cuatro  $\alpha$ -hélices en su dominio N-terminal, y de seis a siete en su dominio C-terminal, unidas por una horquilla  $\beta$  tipo II. (Doherty et al., 1996). El motivo HhH está seguido por un bucle (motivo GPD) con residuos de glicina (G), prolina (P), y un residuo invariante de ácido aspártico (D) esencial para la actividad catalítica (Huffman et al., 2005) Las DNA glicosilasas bifuncionales pertenecientes a esta superfamilia presentan además un residuo conservado de lisina (K) (Figura 18) (Krokan et al., 1997). También contienen cuatro residuos de cisteína homólogos a los que forman un complejo sulfoférrico [4Fe-4S] en Nth y otras proteínas que desempeña un papel estructural en la unión al DNA (Fromme and Verdine, 2003).



**Figura 18. Esquema del motivo Hélice-horquilla-Hélice y Glicina/Prolina-Aspártico (HhH-GPD).** Alineamiento parcial de la secuencia aminoacídica correspondiente a las DNA glicosilasas Endo III, Mig, MutY, MBD4, Ogg1 y AlkA. El residuo invariante de ácido aspártico (D) y el residuo de lisina (K) característico de los miembros bifuncionales de la familia se indican con un asterisco. Los residuos de glicina (G) y prolina (P) se muestran en naranja.

No obstante, las proteínas de la familia DML se caracterizan por ser relativamente grandes (1100-2000 aa) en comparación con el resto de DNA glicosilasas de la superfamilia HhH-GPD (200-400 aa) (Denver et al., 2003). Además, las proteínas de la familia DML están dotadas de un dominio catalítico discontinuo constituido por dos segmentos no contiguos (Ponferrada-Marín et al., 2011). El primer segmento corresponde a una región que, en los miembros de la superfamilia HhH-GPD, contiene el residuo que ayuda a extraer la base diana fuera de la doble hélice (*base flipper*), además de residuos que tapizan el sitio activo (Mol et al., 2002). El segundo segmento incluye el motivo HhH-GPD, que presenta el residuo de ácido aspártico conservado en todas las proteínas HhH-GPD y que confiere su función catalítica (Nash et al., 1996). En las proteínas de la familia DML este aspartato es esencial para la escisión de la 5-meC (Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008; Penterman et al., 2007b). El segundo segmento, contiene además, el residuo de lisina distintivo de las proteínas HhH-GPD bifuncionales, y el motivo con 4 cisteínas característico de aquellas enzimas HhH-GPD que poseen un complejo sulfoférico [4Fe-4S] (Nash et al., 1996). Los dos segmentos se hallan interconectados por una región no conservada cuya secuencia y longitud varía ampliamente entre los distintos miembros de la familia DML (Ponferrada-Marín et al., 2011). Los miembros de la familia DML presentan también un dominio carboxilo-terminal muy conservado en los ortólogos de todas las especies donde se han detectado, pero que no está relacionado con ningún otro tipo de proteína conocida (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006). Además una característica adicional de estas 5-meC DNA glicosilasas es la presencia de un corto dominio N-terminal de carácter básico, rico en residuos de lisina, pero cuya secuencia no está conservada entre las distintas proteínas DML. Esta región es importante para la unión no específica de ROS1 al DNA y para su preferencia de sustrato (Ponferrada-Marín et al., 2010).

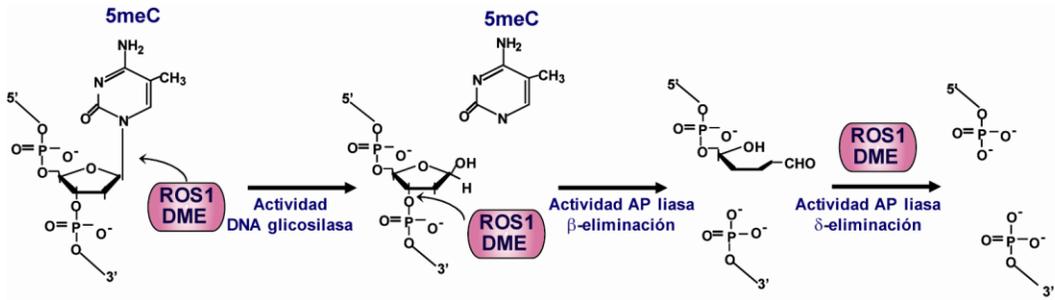


**Figura 19.** Alineamiento esquemático de algunos miembros representativos de la familia DML. Las cajas coloreadas representan regiones conservadas entre las proteínas de la familia.

Las DNA glicosilasas de la familia DML parecen ser específicas de plantas, con ortólogos presentes en musgos (*Physcomitrella patens*) y algas verdes unicelulares (por ejemplo *Ostreococcus*). Esto sugiere que la desmetilación activa por escisión de 5-meC podría haber surgido en una fase temprana de la evolución de las plantas (Roldan-Arjona and Ariza 2009).

## 5.2. Actividad Catalítica

Según su actividad catalítica las DNA glicosilasas pueden clasificarse en monofuncionales y bifuncionales. Las proteínas de la familia DML son DNA glicosilasas bifuncionales que catalizan no solo la eliminación de la base dañada, sino también la posterior rotura del esqueleto azúcar-fosfato en el sitio abásico resultante (Friedberg et al., 1995). ROS1 y DME son los miembros de la familia DML mejor caracterizados *in vitro* (Agius et al., 2006; Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006). Ambas proteínas eliminan 5-meC del DNA como base libre mediante un mecanismo glicosilasa/liasa (Morales-Ruiz et al., 2006), a continuación, una reacción de  $\beta$ -eliminación rompe el azúcar, lo que genera una rotura de cadena con un grupo fosfato en el extremo 5' y un aldehído  $\alpha,\beta$  insaturado en el extremo 3'. Esta reacción va seguida de una  $\delta$  eliminación que libera el aldehído y genera un extremo 3'-fosfato y un hueco que debe ser posteriormente procesado (Agius et al., 2006; Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006) (Figura 20).



**Figura 20. Desmetilación activa en plantas iniciada por 5-meC desmetilasas.**

DME y ROS1 eliminan 5-meC en secuencias CG, CHG y CHH, con preferencia por sitios CG, lo cual se ajusta al patrón de metilación de DNA en plantas (Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006). Ambas proteínas eliminan más eficientemente 5-meC en el contexto CAG que en la posición externa del contexto CCG (Morales-Ruiz et al., 2006), lo que concuerda con el hecho de que CCG es la secuencia con el nivel de metilación más bajo entre los sitios CHG (Cokus et al., 2008). Esto indica que la escisión de 5-meC *in vitro* es más eficiente en secuencias que tienen mayor probabilidad de ser metiladas *in vivo*. ROS1 elimina 5-meC *in vivo* en todos los contextos de secuencia de promotores de genes como *RD29A*, pero muestra una preferencia por contextos diferentes al simétrico CG en otros genes (Zhu et al., 2007).

DML2 y DML3 son también 5-meC DNA glicosilasas/liasas (Ortega-Galisteo et al., 2008; Penterman et al., 2007b). Aunque la actividad de DML2 es muy débil, al menos *in vitro*, DML3 posee una actividad enzimática y una especificidad de sustrato comparables a las de DME y ROS1 (Ortega-Galisteo et al., 2008; Penterman et al., 2007b). Además de la 5-meC apareada con guanina, DME, ROS1 y DML3 son capaces también de eliminar la timina en secuencias CG, CHG y CHH (Gehring et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008). Sin embargo, al contrario de la fuerte especificidad de sustrato que muestran TDG y MBD4 en mamíferos por los apareamientos erróneos T:G y U:G, DME y ROS1 muestran preferencias por 5-meC en un contexto CG, el contexto metilado más frecuente en plantas y animales, y no muestran actividad enzimática detectable sobre U:G (Morales-Ruiz et al., 2006) o sustratos con bases dañadas tales como la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (Agius et al., 2006). A pesar de su baja actividad sobre apareamientos erróneos T:G, no se puede excluir la posibilidad de que ROS1, DME y/o DML3 desempeñen una función en la neutralización de mutaciones

procedentes de la desaminación espontánea de 5-meC a timina (Roldan-Arjona and Ariza, 2009).

### 5.3. Funciones *in vivo*

Aún no se conocen con exactitud las funciones desempeñadas *in vivo* por las 5-meC DNA desmetilasas de plantas, pero al menos en el caso de DME y ROS1 parece que su papel está claramente relacionado con el control dinámico de la metilación. DME es necesaria para la regulación de genes con impronta y para la desmetilación generalizada de la célula central y del endospermo (ver apartado 4.2). ROS1 previene el silenciamiento de transgenes y algunos genes endógenos, y también mantiene un mínimo nivel de expresión de muchos transposones (He et al., 2011).

Al contrario de lo que ocurre en mamíferos, en donde el imprinting se establece por adición de metilación específica de alelo y se observa tanto en la placenta como en el embrión, en plantas el imprinting está restringido al endospermo, el equivalente de la placenta en plantas, y se establece por la desmetilación de DNA en el alelo materno llevada a cabo por DME en la célula central del gametofito femenino previa a la fertilización (Huh et al., 2008). DME es necesaria para desmetilar antes de la fertilización los alelos maternos de los genes *MEA*, *FWA*, *FIS2* y quizás de otros loci improntados (Gehring et al., 2006; Jullien et al., 2006; Kinoshita et al., 2004). Por comparación de los niveles de metilación en tejidos de embrión y de endospermo, Gehring et al. identificaron zonas con diferencias en la metilación y con expresión dependiente de alelo de 5 genes, además encontraron otros 40 genes candidatos de ser genes improntados (Gehring et al., 2009). La desmetilación llevada a cabo por DME forma parte de un proceso de desmetilación global en el endospermo que facilita la activación de transposones en este tejido con la consiguiente acumulación de siRNAs, lo que podría reforzar el silenciamiento de transposones en el embrión (Gehring et al., 2009; Hsieh et al., 2009) (Ver apartado 4.2 y Figura 15).

ROS1 previene el silenciamiento transcripcional de un transgen hipermetilado (Gong et al., 2002), pero además regula loci endógenos que muestran expresión reducida e hipermetilación en plantas mutantes *ros1* (Zhu et al., 2007). De hecho, los sitios CHG y CHH se encuentran hipermetilados en el gen *FWA* y en varios transposones en mutantes *ros1*, con un leve incremento adicional de metilación CG (Zhu et al., 2007). Un estudio basado en el análisis

de los patrones de metilación del genoma completo de *Arabidopsis* de plantas mutantes *ros1*, *dml2* y *dml3* mostró que estas desmetilasas funcionan redundantemente, aunque se observa especificidad para algunos loci. En el triple mutante *ros1 dml2 dml3* se identificaron 179 loci hipermetilados, sin embargo no se detectaron cambios en los niveles globales de metilación (Penterman et al., 2007b). Estas regiones se corresponden con transposones, elementos de DNA repetitivos y regiones que generan siRNA (Penterman et al., 2007a). La mayor parte de la hipermetilación localizada en regiones génicas, no afecta a ninguna clase génica particular y se acumula predominantemente en los extremos 5' y 3' de los genes, a diferencia del patrón de metilación característico de plantas silvestres (Penterman et al., 2007b). Estos datos sugieren que ROS1, DML2 y DML3 actúan sobre transposones y sobre regiones génicas que se encuentran en zonas heterocromáticas o cerca de ellas (límites entre eucromatina y heterocromatina). En dichas regiones estas DNA glicosilasas podrían actuar para contrarrestar la metilación *de novo* dirigida por RdDM, protegiendo al genoma de un exceso de metilación. (Penterman et al., 2007a).

Por otra parte, análisis detallados de la distribución de la metilación en el gen *FWA* y el transposon *AtGP1* en mutantes *dml*, sugieren que DML2 y DML3 podrían tener un papel adicional en el mantenimiento de la dinámica de la metilación. Mutaciones en DML2 y/o DML3 conllevan la hipermetilación en residuos de citosinas que se encuentran normalmente poco metilados o no están metilados en plantas silvestres, concordando con el papel de estas proteínas en proteger el genoma de un exceso de metilación, sin embargo, sitios que se encuentran altamente metilados en el plantas silvestres, se encuentran hipometilados en las plantas mutantes (Ortega-Galisteo et al., 2008). Además, en un estudio a escala de bases del metiloma de *Arabidopsis* se encontró, como se esperaba, cientos de regiones discretas hipermetiladas en el triple mutante *ros1dml2dml3*, pero también regiones donde la metilación es menor que en las plantas silvestres (Lister et al., 2008). Todos estos resultados sugieren que ROS1, DML2 y DML3 no solo son importantes para combatir el exceso de metilación, sino también para mantener el alto nivel de metilación en regiones correctamente metiladas, manteniendo el silenciamiento en un estado adaptable y dinámico (Roldan-Arjona and Ariza, 2009).

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, las desmetilasas ROS1, DML2 y DML3, no realizan una desmetilación global del genoma. El efecto

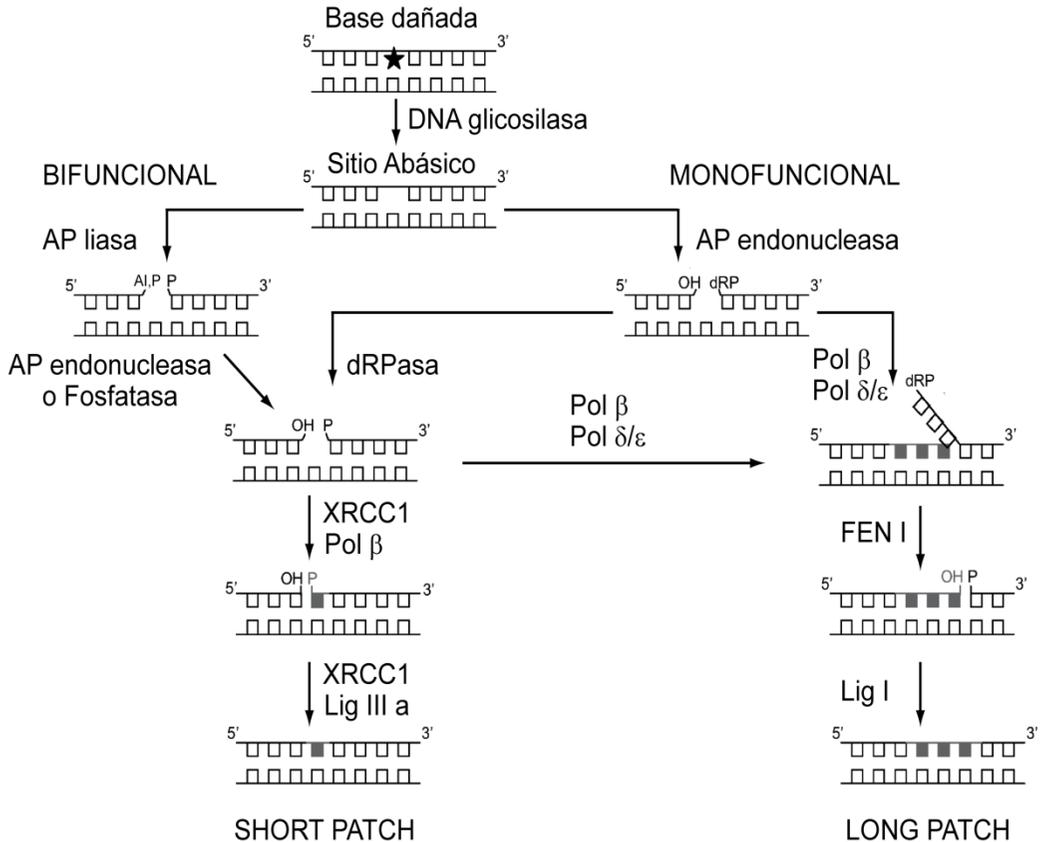
específico sobre ciertos loci sugiere que hay mecanismos que guían a estas proteínas hacia sus dianas. Sin embargo, aún se desconoce si estas proteínas son guiadas hacia secuencias de DNA específicas o simplemente a regiones genómicas con una alta probabilidad de sufrir una metilación excesiva. Al igual que la metilación dirigida por RNA (Ver apartado 3.4), la desmetilación podría ser guiada por pequeñas moléculas de RNAs. En este sentido, ROS3, un factor regulador de desmetilación de DNA en *Arabidopsis*, ha sido identificado en el mismo escrutinio genético que llevó a la identificación de ROS1 (Zheng et al., 2008). Mutantes *ros3* causan hipermetilación y silenciamiento transcripcional en varios loci, alguno de los cuales coincide con las regiones hipermetiladas en *ros1*. ROS3 codifica una proteína de reconocimiento de RNA (RMM, RNA Recognition Motif), que se une a pequeños RNAs de secuencias específicas. ROS1 y ROS3 podrían formar parte de un complejo de desmetilación, ya que colocalizan en discretos focos del nucleoplasma y en el nucléolo. Según estos datos, la desmetilación llevada a cabo por ROS1 puede ser dirigida por pequeños RNAs unidos a la proteína ROS3 (Zheng et al., 2008).

El estudio a nivel molecular de los procesos de desmetilación activa del DNA y de los factores que regulan y guían a las desmetilasas a sus secuencias diana, contribuirán al entendimiento de los procesos de regulación epigenética. En plantas, hasta la fecha, los dos factores de desmetilación conocidos que intervienen en la desmetilación activa del DNA son la desmetilasa ROS1 (y los miembros de su familia) y el factor regulador de la desmetilación ROS3. ROS1 inicia la sustitución de una 5-meC por una citosina no metilada a través de un proceso análogo a la reparación por escisión de bases (BER). El trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en la identificación de otras proteínas que puedan intervenir en esta ruta de desmetilación activa del DNA y con ello entender el papel que juega la maquinaria de reparación del DNA en la modificación de los patrones epigenéticos.

## **6. Reparación por escisión de bases**

Como ya se ha indicado anteriormente, en plantas, la desmetilación activa se realiza mediante un proceso análogo a la reparación por escisión de bases (BER), donde las desmetilasas de la familia DML inician la sustitución de una 5-meC por una citosina no metilada. Tras el paso inicial de eliminación de la base,

se genera un sitio abásico (sitioapurínico/apirimidínico o sitio AP) potencialmente citotóxico y mutagénico (Friedberg et al., 1995). Los sitios abásicos pueden ser procesados por dos vías diferentes: vía AP endonucleasas o vía AP liasas. Ambas rutas generan extremos distintos. Las AP endonucleasas son enzimas dependientes de magnesio que cortan en el lado 5' del sitio abásico, y generan extremos 3'OH y 5'dRP (desoxirribofosfato sin base). El grupo 5'dRP es eliminado por una desoxirribosa-fosfato diesterasa (dRPasa) para generar un grupo 5'-P adecuado para la polimerización y ligación (Lindahl et al., 1997). La actividad AP liasa suele estar asociada a las DNA glicosilasas bifuncionales, aunque también puede encontrarse en otras proteínas. No requiere magnesio y corta en el lado 3' del sitio abásico generando un aldehído insaturado o un grupo fosfato en el extremo 3', y un grupo fosfato en el 5'. En este caso, el extremo 3'-OH se genera por acción de una AP endonucleasa o una fosfatasa que actúan sobre el aldehído o el fosfato del extremo 3', respectivamente (Lindahl et al., 1997). A continuación, la restauración de la cadena puede completarse mediante la inserción de uno (short-patch BER) o varios nucleótidos (long-patch BER) (Fortini et al., 1999). Ambas ramificaciones de la ruta BER han sido extensivamente estudiadas en mamíferos. En la reparación short-patch participa la DNA polimerasa Pol  $\beta$ , que posee actividad dRPasa (Singhal et al., 1995), y la cadena es finalmente sellada por XRCC1 y LigIII $\alpha$  (Nash et al., 1997). La reparación vía long-patch no requiere actividad dRPasa. En este caso, Pol  $\beta$  probablemente se limite a incorporar el primer nucleótido (Podlutzky et al., 2001), y la elongación y desplazamiento de cadena adicionales son llevados a cabo por las DNA polimerasas replicativas Pol  $\delta$  y/o Pol  $\epsilon$  (Fortini et al., 1998; Stucki et al., 1998). La estructura resultante se elimina por acción de la endonucleasa FEN1, y la cadena es finalmente sellada por LigI (Levin et al., 1997).



**Figura 21. Ruta de reparación por escisión de bases en mamíferos.** Para los detalles, ver texto. AI: aldehído insaturado; P: grupo fosfato; dRP: desoxirribosfato. Modificado a partir de (Baute and Depicker, 2008).

Aunque en los últimos años los avances han sido mayores, la enzimología de la reparación por escisión de bases en plantas no se conoce con tanta exactitud. En varios estudios, se han identificado proteínas con actividad DNA glicosilasa, como por ejemplo, AtNTH1 que actúa sobre pirimidinas oxidadas (Roldán-Arjona et al., 2000) o AtOGG1, que inicia la reparación de 8-oxoG (Dany and Tissier, 2001; Garcia-Ortiz et al., 2001). Se conocen también proteínas AP endonucleasas como AtAPR (Babiychuk et al., 1994; Córdoba-Cañero et al., 2011). También se han identificado proteínas con actividad fosfatasa, como ZmDP2, una proteína de maíz que fue la primera enzima de plantas identificada con actividad sobre extremos 3'-P. ZmDP2 presenta homología con PNKP (polynucleotide kinase 3'-phosphatase) de mamíferos pero carece de la actividad 5' quinasa (Betti et al., 2001). AtZDP, una proteína modular con un dominio 3'-fosfatasa y un dominio de unión al DNA, es el

homólogo de ZmDP2 en *Arabidopsis* (Petrucco et al., 2002). Además, estudios recientes han demostrado que las plantas poseen un mecanismo de reparación por escisión de bases análogo al de mamíferos, con capacidad para procesar los daños mediante short-patch y long-patch BER (Córdoba-Cañero et al., 2009).

## **OBJETIVOS**



El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido la disección molecular de una ruta de desmetilación activa del DNA en *Arabidopsis thaliana*, mediante la identificación y caracterización de proteínas que actúan tras la escisión de 5-meC catalizada por ROS1. Para alcanzar este propósito el análisis se ha centrado en el estudio de la fosfatasa de DNA, ZDP, y la proteína de andamiaje XRCC1. Se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si existe una interacción directa entre ROS1 y ZDP.
2. Caracterizar bioquímicamente la actividad enzimática de ZDP sobre los productos de reacción generados por ROS1.
3. Identificar y caracterizar mutantes deficientes en ZDP, con el fin de dilucidar cuál es su papel fisiológico en la planta, y en particular aportar pruebas bioquímicas y genéticas de su posible implicación en la desmetilación del DNA en *Arabidopsis*.
4. Estudiar la posible interacción de XRCC1 con las proteínas ROS1 y ZDP.
5. Encontrar evidencias bioquímicas y genéticas de la implicación de XRCC1 en la reparación por escisión de bases (BER) en plantas y, en particular, en la desmetilación activa del DNA iniciada por ROS1.



## **RESULTADOS**



# **ZDP PARTICIPA EN UNA RUTA DE DESMETILACIÓN ACTIVA DE DNA EN *ARABIDOPSIS***

ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) es una DNA glicosilasa/liasa que activa la expresión de genes silenciados en *Arabidopsis thaliana*, iniciando el borrado de 5-metilcitosina (5-meC) mediante un mecanismo análogo a la reparación por escisión de bases (BER). ROS1 no sólo hidroliza el enlace N-glicosídico que une la 5-meC al DNA, sino que rompe el esqueleto azúcar-fosfato mediante  $\beta$ -eliminación generando una rotura de cadena simple (SSBs) con un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en el extremo 3' (3'-dRP). Esta reacción va seguida de una  $\delta$  eliminación que libera el aldehído y genera un hueco flanqueado por extremos 3'-fosfato (3'-P) y 5'-fosfato (5'-P) (Ver apartado 5.2 de la sección de Introducción; Figura 20, pág. 45). Para que el proceso de desmetilación se complete, el extremo 3'-P ha de ser convertido en 3'-hidroxilo (3'-OH), permitiendo que una DNA polimerasa inserte una citosina no metilada y una DNA ligasa selle la cadena. El primer objetivo planteado en esta tesis fue determinar qué proteína actúa con posterioridad a ROS1 reparando estos extremos y permitiendo así completar esta ruta de desmetilación activa de DNA en plantas.

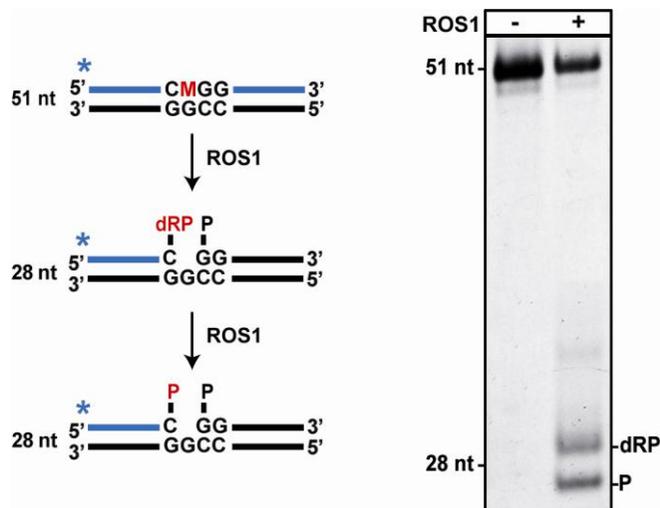
## **1. ZDP procesa el extremo 3'-fosfato creado por ROS1 e incrementa la procesividad de ROS1 *in vitro***

### **1.1. Análisis de la actividad enzimática de ZDP**

En mamíferos el extremo 3'-P generado tras una  $\beta,\delta$ -eliminación es convertido en un grupo 3'-OH por la polinucleótido quinasa 3' fosfatasa (PNKP) (Jilani et al., 1999; Karimi-Busheri et al., 1999; Whitehouse et al., 2001). El ortólogo de PNKP en *Arabidopsis* es la proteína AtZDP (*Arabidopsis thaliana* Zinc finger DNA 3' Phosphoesterase) (Petrucco et al., 2002). AtZDP (de ahora en adelante, ZDP) es una proteína modular con un dominio catalítico 3'-fosfatasa en su extremo carboxilo y un dominio de unión al DNA, que contiene tres dedos de zinc similares a los de la proteína PARP1, en su extremo amino terminal. Esta enzima se une a SSBs (roturas de DNA de cadena simple) y DSBs (roturas de

DNA de cadena doble) y defosforila los extremos 3'-P para generar extremos 3'-OH convencionales (Petrucco et al., 2002). Debido a su actividad catalítica, ZDP, es una buena proteína candidata para procesar los extremos 3'-P generados por ROS1 tras la escisión de 5-meC.

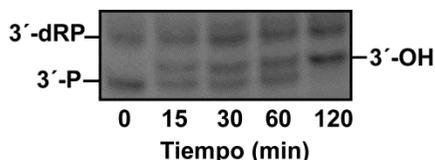
Para contrastar esta hipótesis, ZDP se expresó en *E. coli*, se purificó como proteína fusionada a una cola de histidinas (His-ZDP) (Ver apartado 11.1 de la sección de Materiales y Métodos, pág 152) y su actividad enzimática se analizó sobre los productos de reacción generados por ROS1. En primer lugar ROS1 se incubó con un DNA dúplex de 51 pb, con un residuo de 5-meC en la posición 29, y marcado con fluoresceína en el extremo 5' de la cadena metilada (Figura 22). La actividad enzimática de ROS1 se detecta por la incisión generada en la cadena marcada como resultado de la eliminación de la 5-meC y la posterior rotura del esqueleto azúcar-fosfato. Dicha actividad es detectable separando los productos de reacción en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y determinando la proporción de oligonucleótido marcado procesado (Figura 22).



**Figura 22. Productos de reacción de ROS1.** M: 5-metilcitosina, dRP: aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado, P:fosfato.

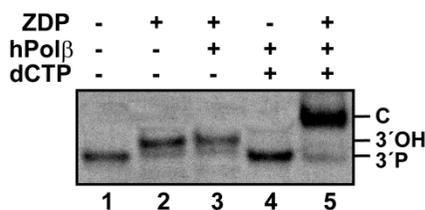
A continuación, los productos de reacción se purificaron y se incubaron con ZDP durante intervalos de tiempos crecientes (Figura 23). De acuerdo con los datos previamente publicados (Morales-Ruiz et al., 2006) no todas las incisiones generadas por ROS1 se procesan por  $\beta,\delta$ -eliminación hasta generar un extremo 3'-P; tal y como se observa en la Figura 23 (primer carril) parte de los

productos de ROS1 sólo han sufrido una  $\beta$ -eliminación y presentan un extremo 3' con un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-dRP). Los resultados obtenidos indican que ZDP no actúa sobre el extremo 3'-dRP pero sí cataliza de forma eficiente la conversión del extremo 3'-P en un extremo 3'-OH (Figura 23).



**Figura 23. Análisis de la actividad enzimática de ZDP.** Se incubó ROS1 (37.5 nM) con oligonucleótidos bicatenarios que contienen un residuo de 5-meC (40 nM) durante 16 h a 30°C. Tras purificación de los productos de reacción, éstos se incubaron con ZDP (1.5 nM) a 30°C y las reacciones se detuvieron en los tiempos indicados. Los productos se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% y se detectaron por fluorescencia.

Tras la generación del extremo 3'-OH, una DNA polimerasa debe insertar una citosina no metilada para que una DNA ligasa pueda sellar la cadena, completándose así el proceso de desmetilación. Para confirmar que el extremo 3'-OH generado por ZDP es un sustrato adecuado para DNA polimerasas, se incubó ZDP con el producto de reacción de ROS1 en presencia de la DNA polimerasa pol  $\beta$  de humanos y dCTP. Los resultados muestran que la incorporación de dCMP en el extremo 3' del hueco generado por ROS1 es estrictamente dependiente de la presencia de pol  $\beta$  y ZDP (Figura 24, carril 5).

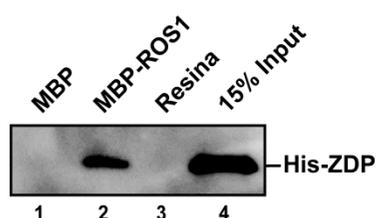


**Figura 24. Polimerización del extremo 3'-OH generado por ZDP.** Los productos de reacción de ROS1 se incubaron con ZDP (6 nM) y DNA polimerasa  $\beta$  (hPol  $\beta$ , 0.5 U) durante 30 min a 37°C, en ausencia (carril 3) o presencia (carril 5) de dCTP (0.2 mM).

En conjunto, estos resultados indican que la actividad fosfatasa de ZDP es capaz de procesar *in vitro* el extremo 3'-P del hueco mononucleotídico causado por ROS1 en la cadena metilada, produciendo un extremo 3'-OH que puede ser usado por DNA polimerasas para insertar una citosina no metilada.

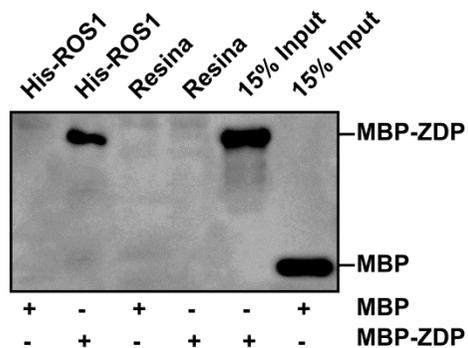
## 1.2. Análisis de la interacción de ZDP con ROS1

Con el objetivo de analizar si ZDP y ROS1 interaccionan *in vitro*, se realizaron ensayos de pull-down usando como cebo la proteína ROS1 fusionada a MBP (proteína de unión a maltosa). La proteína MBP-ROS1 se fijó a una columna de amilosa y se analizó su capacidad de retener de forma específica a la proteína His-ZDP. Como control se usó la proteína MBP. Los resultados obtenidos indican que ZDP queda retenida de forma específica en la columna que contiene MBP-ROS1, pero no en la que contiene MBP ni en la que contiene únicamente la matriz de amilosa (Figura 25).



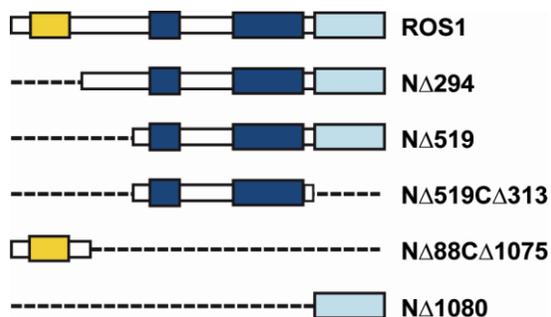
**Figura 25. Ensayo de pull-down con MBP-ROS1 como proteína cebo.** La proteína His-ZDP se incubó en columnas que contenían sólo la matriz de amilosa (carril 3), o bien las proteínas cebo MBP (carril 1) ó MBP-ROS1 (carril 2) previamente unidas a dicha matriz. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-His6. El carril 4 contiene como marcador un 15 % del total de proteína presa (His-ZDP) cargado en cada columna.

También se realizaron ensayos de pull-down usando como cebo la proteína ROS1 fusionada a una cola de histidinas (His-ROS1) y como presa la proteína ZDP fusionada a MBP (MBP-ZDP). En este caso, se fijó His-ROS1 a una columna de Ni-sefarosa y se analizó su capacidad de retener de forma específica la proteína MBP-ZDP (Figura 26). Los resultados obtenidos mostraron que MBP-ZDP, pero no MBP, queda retenida en la columna que contiene His-ROS1. Además, esta retención no tiene lugar en columnas que contienen únicamente la matriz de Ni-sefarosa. En conjunto, estos resultados indican que ZDP y ROS1 interaccionan de forma específica *in vitro*.



**Figura 26. Ensayo de pull-down con His-ROS1 como proteína cebo.** Se incubó la proteína MBP o la proteína MBP-ZDP en columnas que contenían sólo la matriz de Ni-Sefarosa o bien la proteína cebo His-ROS1 previamente unida a dicha matriz. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. Los dos últimos carriles contienen como marcadores un 15 % del total de proteína presa (MBP ó MBP-ZDP) cargado en cada columna.

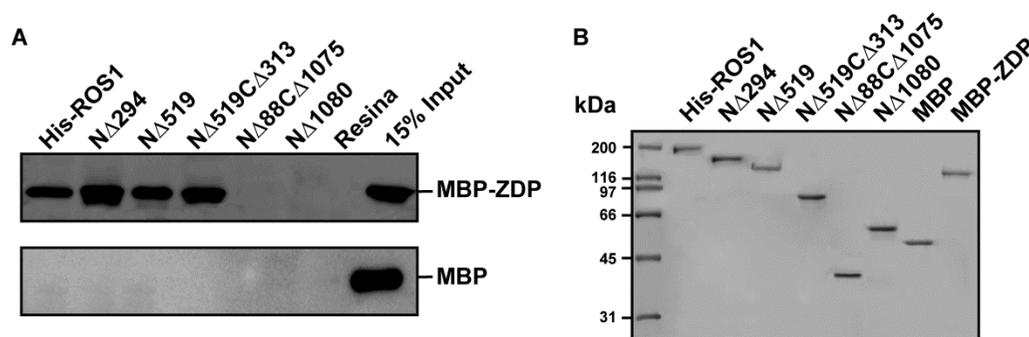
Con el fin de determinar cuál es la región de ROS1 implicada en la interacción con ZDP, se usaron una serie versiones truncadas de ROS1 con deleciones en la región amino-terminal (N-terminal) o carboxilo-terminal (C-terminal) de la proteína.



**Figura 27. Esquema de la proteína ROS1 completa y de las diferentes versiones truncadas usadas en los ensayos de pull-down.** Se muestran como bloques coloreados los dominios conservados en otros miembros de la familia DML de 5-meC DNA glicosilasas; amarillo: dominio amino-terminal rico en lisina; azul: dominio DNA glicosilasa; celeste: dominio carboxi-terminal.

Las distintas versiones truncadas de ROS1 se sobreexpresaron en *E. coli*, se purificaron como proteínas de fusión a una cola de histidinas y se usaron como proteínas cebo en ensayos de pull-down (Figura 28). Los resultados

obtenidos indican que tanto la región N-terminal de ROS1 comprendida entre los aminoácidos 1-519 como la región C-terminal correspondiente a los últimos 313 aminoácidos no son necesarias para la interacción con ZDP. Ello apunta a la región situada entre los residuos 520 y 1080 como responsable de la interacción. Hay que resaltar que dicha región contiene el dominio DNA glicosilasa discontinuo que presentan, además de ROS1, las demás proteínas de la familia DML (Ponferrada-Marín et al., 2011).

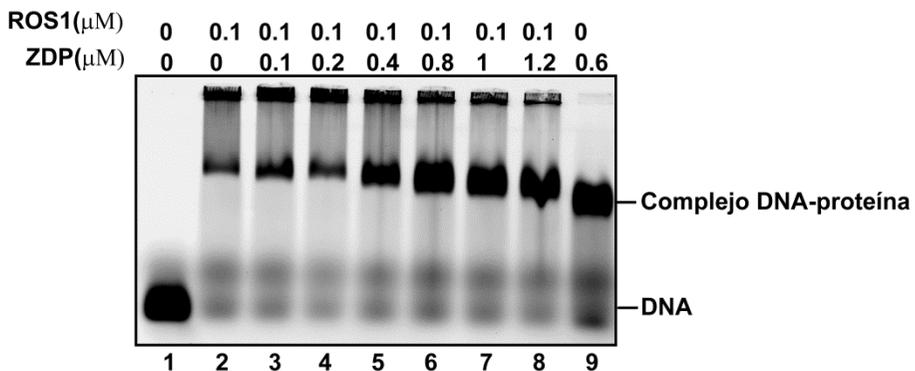


**Figura 28. Análisis de la región de ROS1 responsable de la interacción con ZDP.** (A) Se incubó MBP-ZDP (panel superior) ó MBP (panel inferior) en columnas que contenían como cebo la proteína His-ROS1 o sus diferentes versiones truncadas previamente fijadas a una matriz de Ni-Sefarosa. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel de SDP-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. (B) Proteínas usadas como cebo o presa en el ensayo de pull-down, detectadas en un gel de SDS-PAGE (10%) teñido con azul de coomassie.

### 1.3. Análisis de la interacción de ZDP con el producto de reacción de ROS1

ROS1 se une fuertemente al hueco mononucleotídico, flanqueado por extremos 3'P y 5'P, que genera en el DNA como producto de reacción (Ponferrada-Marín et al., 2010). El siguiente objetivo fue determinar mediante ensayos de retardo en gel si ZDP puede unirse a dicho producto en presencia de ROS1. Como se muestra en la Figura 29 en ausencia de ZDP solo se detectó una banda correspondiente al complejo formado entre ROS1 y su producto de reacción (carril 2). En estas condiciones, parte del DNA permanece atrapado en los pocillos del gel como consecuencia de la formación de complejos ROS1-DNA insolubles. Al aumentar la concentración de ZDP en la reacción (carriles 3-8), la cantidad de complejos insolubles fue desapareciendo gradualmente de los

pocillos. Además, la banda correspondiente al complejo ROS1-DNA fue creciendo en intensidad, convirtiéndose gradualmente en otra banda con mayor movilidad electroforética que el complejo ROS1-DNA (carril 2), pero de menor movilidad que el complejo correspondiente a ZDP-DNA (carril 9). Hay que resaltar que no se observó ninguna banda correspondiente a complejos sencillos ROS1-DNA o ZDP-DNA cuando las dos proteínas estaban presentes en la reacción. Estos resultados sugieren que ROS1 y su producto de reacción forman con ZDP un complejo ternario.

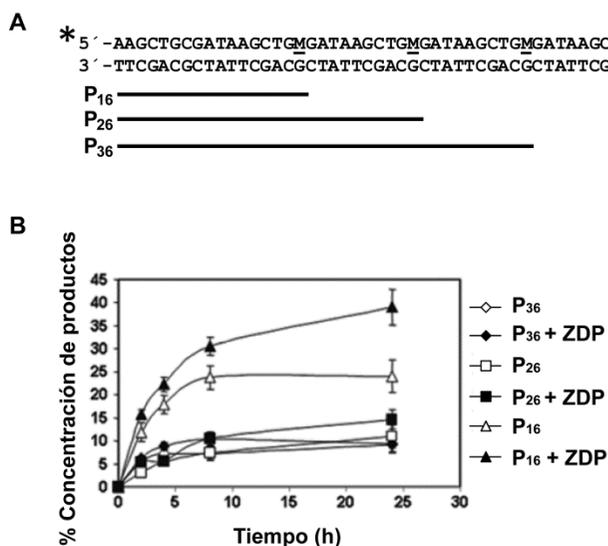


**Figura 29. EMSA.** Se incubó ROS1 (0.1  $\mu$ M) en presencia de concentraciones crecientes de ZDP con un oligonucleótido bicatenario que contiene un hueco mononucleotídico flanqueado por extremos 5'-P y 3'-P. Los complejos DNA-proteína se identificaron tras electroforesis en gel de agarosa por su retardo en la movilidad electroforética en comparación con el DNA libre.

#### 1.4. Análisis del efecto de ZDP sobre la procesividad de ROS1

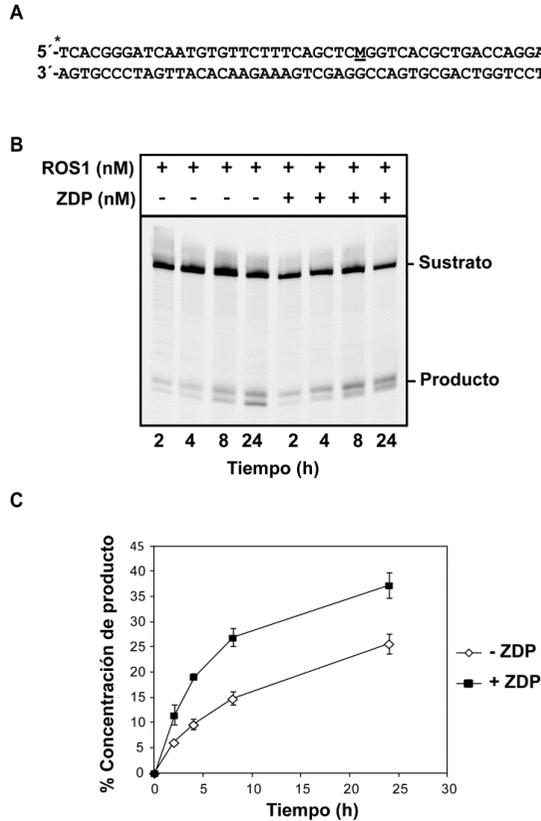
Cuando una DNA glicosilasa tiene carácter procesivo, se une al DNA y escinde varias bases diana sin disociarse de éste. Sin embargo, la actividad glicosilasa de ROS1 tiene *in vitro* un carácter claramente distributivo, ya que tiende a permanecer unida a su producto de reacción y no es capaz de catalizar varios eventos de excisión/incisión en la misma molécula (Ponferrada-Marín et al., 2010; Ponferrada-Marín et al., 2009). Puesto que ZDP es capaz de unirse al complejo formado por ROS1 y su producto de reacción, se examinó si puede ejercer algún efecto sobre el comportamiento enzimático de ROS1 y en concreto sobre su falta de procesividad. Se utilizó como sustrato un oligonucleótido bicatenario con tres residuos de 5mC localizados en idénticos contextos de secuencia (Figura 30A) que se incubó con ROS1 en presencia o en ausencia de

ZDP. En este ensayo, un comportamiento procesivo de la enzima convertirá rápidamente el sustrato en el fragmento marcado más corto (producto de 16 nt, P<sub>16</sub>), mientras que un mecanismo distributivo producirá la acumulación de intermediarios de reacción parcialmente procesados representados por fragmentos marcados más largos (productos de 26 y 36 nt, P<sub>26</sub> y P<sub>36</sub>). De acuerdo con los datos previamente publicados (Ponferrada-Marín et al., 2009), ROS1 mostró en ausencia de ZDP un comportamiento altamente distributivo, acumulando productos totalmente procesados (P<sub>16</sub>), pero también productos intermedios (P<sub>26</sub> y P<sub>36</sub>), incluso después de periodos de incubación largos. Sin embargo, aunque la adición de ZDP aumentó significativamente la cantidad de sustrato convertido en producto final (P<sub>16</sub>) por ROS1, no produjo cambio en la acumulación de productos intermedios (P<sub>26</sub> y P<sub>36</sub>).



**Figura 30. Efecto de ZDP sobre la procesividad de ROS1.** (A) Diagrama esquemático del sustrato usado en el ensayo y de los productos de reacción. M: 5-meC. (B) Se incubó ROS1 (18 nM) a 30°C con un oligonucleótido bicatenario que contiene tres residuos de 5-meC (40 nM), tanto en ausencia (símbolos huecos) como en presencia (símbolos rellenos) de ZDP (144 nM). Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas) y los productos de la reacción se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. Se determinó la concentración de productos mediante cuantificación de la fluorescencia: 16 nt (triángulos), 26 nt (cuadrados) y 36 nt (rombos). Se indica la media y el error estándar de tres experimentos independientes

Experimentos análogos con un sustrato que contiene un solo residuo de 5-meC (Figura 31), confirmaron que ZDP ejerce un efecto positivo sobre la actividad de ROS1. En conjunto, estos resultados indican que ZDP estimula la actividad glicosilasa/liasa de ROS1 y aumenta su procesividad *in vitro*.

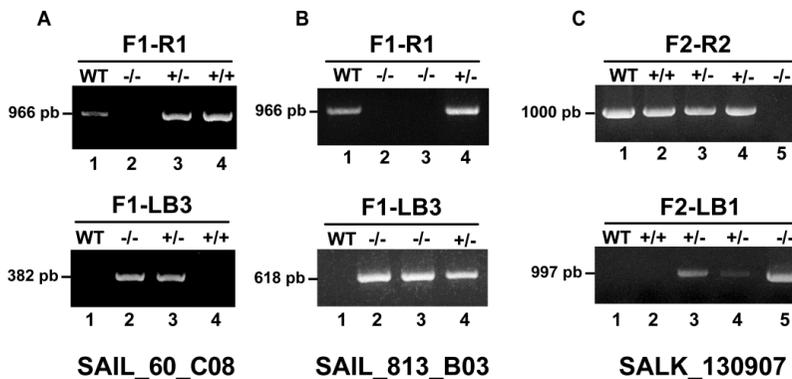


**Figura 31. Efecto de ZDP sobre la actividad de ROS1.** (A) Diagrama esquemático del sustrato usado en el ensayo. M: 5-meC. (B-C) Se incubó ROS1 (18 nM) a 30°C con un oligonucleótido bicatenario que contiene un residuo de 5-meC (40 nM), tanto en ausencia (símbolos huecos) como en presencia (símbolos rellenos) de ZDP (144 nM). Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas) y los productos de la reacción se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturante al 12%. En (B) se muestra un gel representativo.(C). Se determinó la concentración de producto mediante cuantificación de la fluorescencia Se indica la media y el error estándar de dos experimentos independientes

## 2. Plantas mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> son deficientes en la actividad 3´-fosfatasa

### 2.1. Identificación y caracterización molecular de mutantes *zdp*

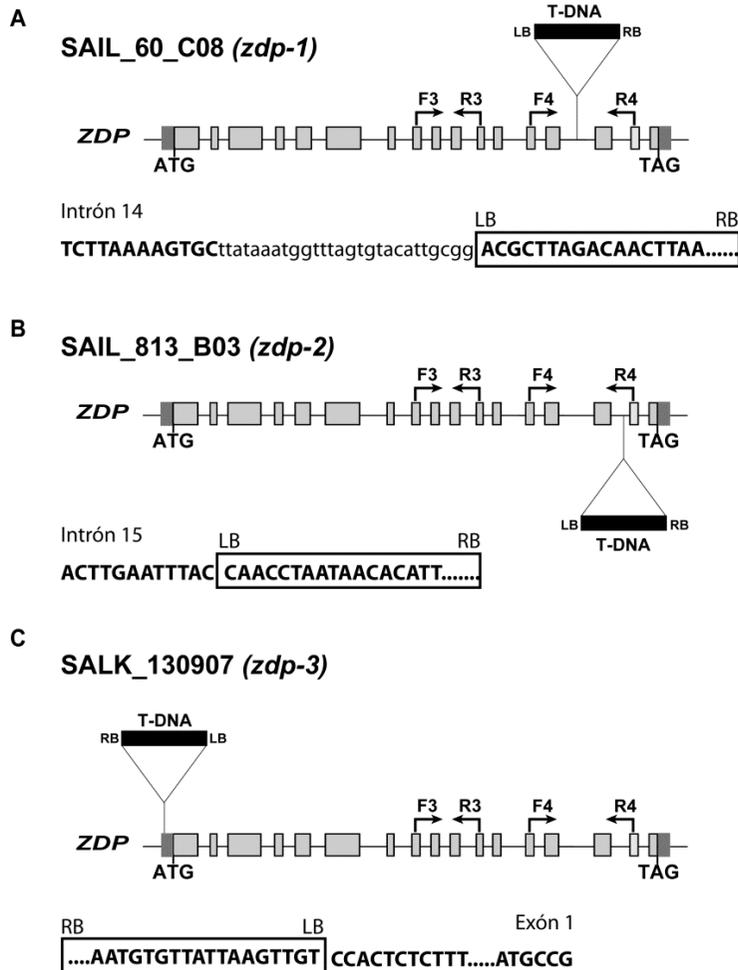
Para determinar la función de ZDP *in vivo* se identificaron y caracterizaron mutantes por inserción de T-DNA en el gen ZDP. Se realizó una búsqueda en la base de datos SIGNAL (<http://signal.SALK.edu/about.html>), y se identificaron tres líneas mutantes en el gen ZDP, SAIL\_60\_C08, SAIL\_813\_B03 y SALK\_130907. Los correspondientes alelos mutantes se denominaron *zdp-1*, *zdp-2* y *zdp-3*, respectivamente. A continuación, se procedió a asignar genotipos en las poblaciones segregantes y a confirmar la posición exacta del punto de inserción en cada línea. Para ello, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con combinaciones de cebadores específicos. En la Figura 32 se muestran resultados representativos de este análisis.



**Figura 32. Asignación de genotipos a plantas mutantes en el gen ZDP.** Los genotipos se asignaron mediante PCR utilizando DNA genómico de plantas silvestres (WT) y plantas de poblaciones segregantes de las líneas SAIL\_60\_C08 (A), SAIL\_813\_B03 (B) y SALK\_130907 (C). Se usaron parejas de cebadores que flanquean la zona de cada inserción para detectar el alelo silvestre (paneles superiores) y combinaciones de uno de dichos cebadores y otro correspondientes al T-DNA para detectar los alelos mutantes (paneles inferiores). Se indica en cada caso el tamaño en pb del fragmento amplificado.

En una de las reacciones se usó una pareja de cebadores que se unen a secuencias que flanquean el punto de inserción (*ZDP*-F1 y *ZDP*-R1, para las líneas SAIL y *ZDP*-F2 y *ZDP*-R2, para la línea SALK, ver Tabla 6) para detectar el

alelo silvestre. La otra PCR se realizó con uno de dichos cebadores y un cebador correspondiente al extremo izquierdo del T-DNA (ZDP-F1 y LB3, para las líneas SAIL y ZDP-F2 y LB1, para la línea SALK, ver Tabla 6) para detectar el alelo mutante. Se identificaron así plantas mutantes homocigotas *zdp-1*<sup>-/-</sup>, *zdp-2*<sup>-/-</sup> y *zdp-3*<sup>-/-</sup>.

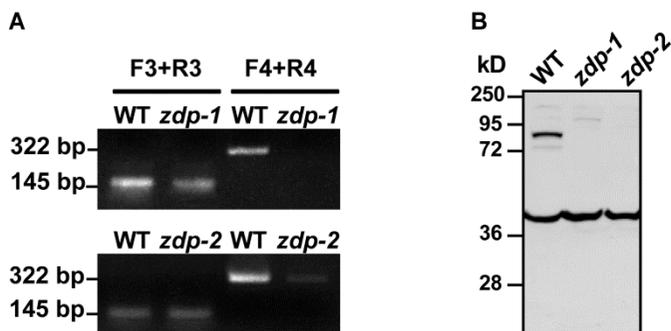


**Figura 33. Localización de la inserción de T-DNA en los alelos *zdp-1*, *zdp-2* y *zdp-3*.** Se muestran los exones (recuadros grises) y la posición de las inserciones de T-DNA (recuadros negros). LB y RB indican el borde izquierdo y el borde derecho del T-DNA, respectivamente. Las flechas indican la posición de los cebadores usados en el análisis de RT-PCR. En la parte inferior de cada panel se muestra la secuencia génica adyacente al borde izquierdo del T-DNA. La secuencia correspondiente al T-DNA está enmarcada. El DNA exógeno que acompaña a una de las inserciones se muestra en minúscula.

Para caracterizar molecularmente las inserciones, el DNA adyacente al borde izquierdo del T-DNA fue amplificado mediante PCR y secuenciado (Figura 33). En el alelo *zdp-1* el T-DNA se encuentra insertado en el intrón 14 y se acompaña de la inserción de 27 pb de DNA exógeno. En el alelo *zdp-2* el T-DNA se localiza en el intrón 15. En el alelo *zdp-3*, el T-DNA se encuentra insertado 76 pb antes del codón de inicio de la traducción, en la zona promotora, a 3 pb del principal sitio de inicio de la transcripción (Petrucco et al., 2002) (Figura 33).

Para examinar el efecto de la inserción de T-DNA sobre la expresión del gen ZDP se llevó a cabo un análisis de RT-PCR sobre RNA total de plantas silvestres y mutantes *zdp-1*<sup>-/-</sup> y *zdp-2*<sup>-/-</sup> (Figura 34A). Se emplearon cebadores que flanquean el T-DNA (F4 y R4; Figura 33 y Tabla 4), y como control una pareja de cebadores localizados fuera del punto de inserción (F3 y R3; Figura 33 y Tabla 4). La RT-PCR reveló que en el alelo *zdp-1*<sup>-/-</sup> la inserción del T-DNA impide el procesamiento correcto del intrón 14, ya que no se detecta el transcrito silvestre (Figura 34). La inserción en *zdp-2*<sup>-/-</sup> también interfiere negativamente con el procesamiento del intrón 15, siendo en este caso los niveles de transcrito silvestre prácticamente indetectables. Estos datos sugieren que las plantas mutantes *zdp-1* y *zdp-2* codifican probablemente una versión truncada de la proteína ZDP que carece del dominio catalítico o de parte de él.

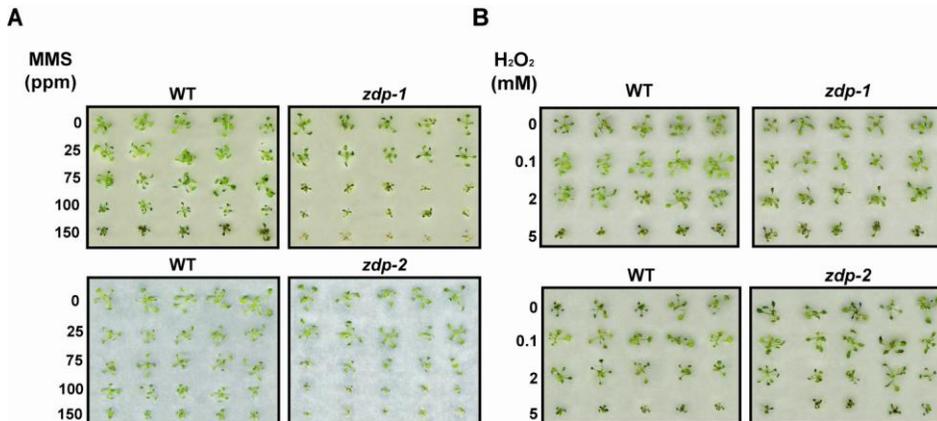
Para comprobar si las plantas mutantes son capaces de producir una proteína ZDP silvestre se realizó un ensayo Western usando un anticuerpo policlonal generado frente a la porción C-terminal de la proteína ZDP (aminoácidos 468-694) (ver apartado 12.4 de la Sección de Materiales y Métodos, pág 160). En extractos proteicos de plantas silvestres el anticuerpo detectó una proteína de tamaño aproximado a los 80 kDa correspondiente a la proteína ZDP, además de otra banda no específica cuya naturaleza se desconoce (Figura 34B). En los extractos de plantas mutantes, la banda de 80 kDa fue indetectable, confirmando así que las plantas *zdp-1*<sup>-/-</sup> y *zdp-2*<sup>-/-</sup> son incapaces de producir niveles apreciables de proteína ZDP silvestre.



**Figura 34. Análisis de la expresión de ZDP en plantas mutantes.** (A) Se llevó a cabo una RT-PCR con las parejas de cebadores que se indican (ver Figura 33) empleando RNA total de plantas silvestres, *zdp-1*<sup>-/-</sup> y *zdp-2*<sup>-/-</sup>. (B) Análisis Western empleando un anticuerpo anti-ZDP y extractos proteicos procedentes de plantas silvestres, *zdp-1*<sup>-/-</sup> y *zdp-2*<sup>-/-</sup>.

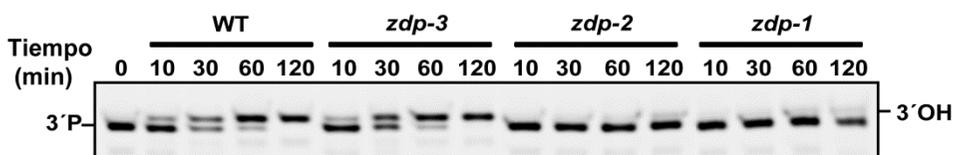
## 2.2. Análisis fenotípico de los mutantes *zdp*<sup>-/-</sup>

Los mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> no mostraron ninguna alteración fenotípica obvia bajo condiciones de crecimiento normales. Para determinar su comportamiento bajo condiciones de estrés, las plantas se crecieron en presencia de dos agentes genotóxicos: un agente alquilante (metilmetanosulfonato, MMS), y un agente oxidante (peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los resultados indican que las plantas mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> son más sensibles a MMS que las plantas silvestres (Figura 35A). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre las plantas silvestres y mutantes cuando se crecieron en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 35B).



**Figura 35. Sensibilidad de plantas silvestres y mutantes *zdp* <sup>-/-</sup> a MMS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Se crecieron plántulas silvestres y mutantes *zdp* <sup>-/-</sup> en placas con medio MS durante 10 días, y a continuación se transfirieron a placas que contenían cantidades crecientes de MMS (A) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). Las fotografías se tomaron tras 2 semanas de crecimiento en presencia del agente genotóxico.

Para estudiar el posible papel de ZDP en el procesamiento de extremos 3'-P, se examinó la actividad 3'-fosfatasa en extractos celulares procedentes de plantas silvestres y plantas mutantes *zdp* <sup>-/-</sup>. Para ello se incubaron los extractos con un oligonucleótido bicatenario que contiene un hueco flanqueado por extremos 3'-P y 5'-P y se midió la conversión del extremo 3'-P en extremo 3'-OH a lo largo del tiempo de incubación. Los resultados mostraron que las plantas mutantes *zdp-3* procesan el extremo 3'-P con la misma eficiencia que las plantas silvestres, mientras que las plantas mutantes *zdp-1* y *zdp-2* no presentan actividad fosfatasa detectable.

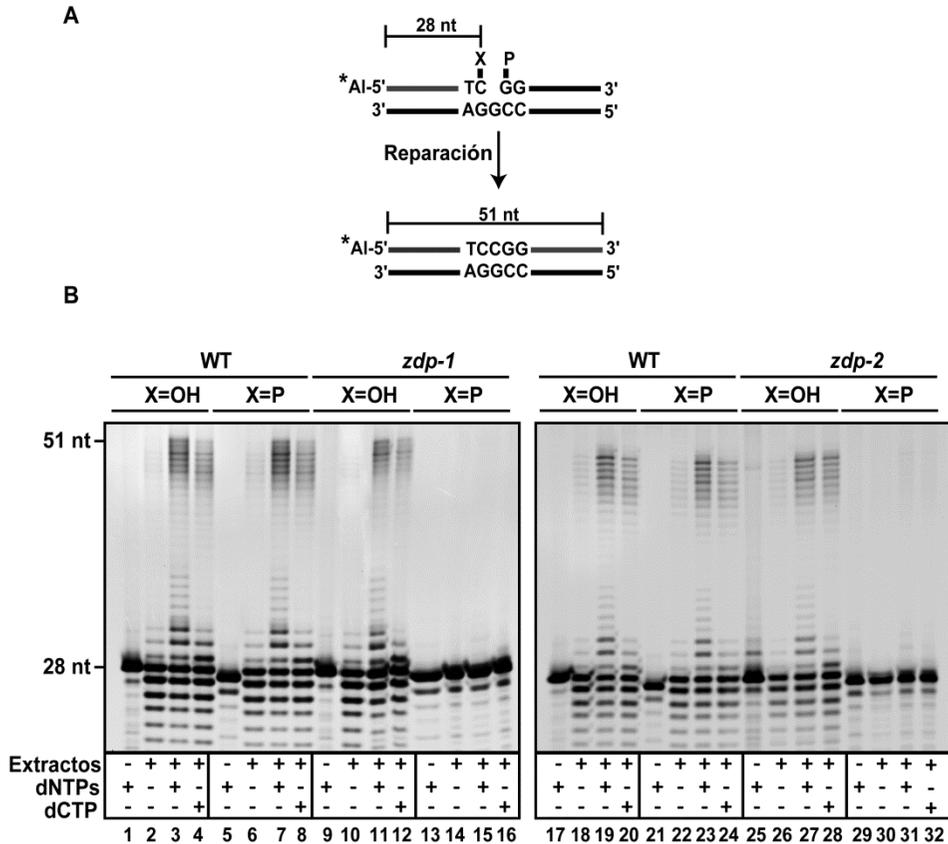


**Figura 36. Análisis de la actividad fosfatasa en extractos de plantas silvestres y mutantes *zdp*.** Extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *zdp* <sup>-/-</sup> se incubaron a 30°C con un sustrato de DNA que contiene un hueco flanqueado por extremos 3'-P y 5'-P. Las reacciones se detuvieron en los tiempos indicados. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% y se detectaron por fluorescencia.

Estos resultados confirman que las inserciones de T-DNA inactivan la función del gen *ZDP* en las plantas *zdp-1* <sup>-/-</sup> y *zdp-2* <sup>-/-</sup>.

### **3. Los mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> muestran reducida la capacidad de completar la desmetilación de DNA *in vitro***

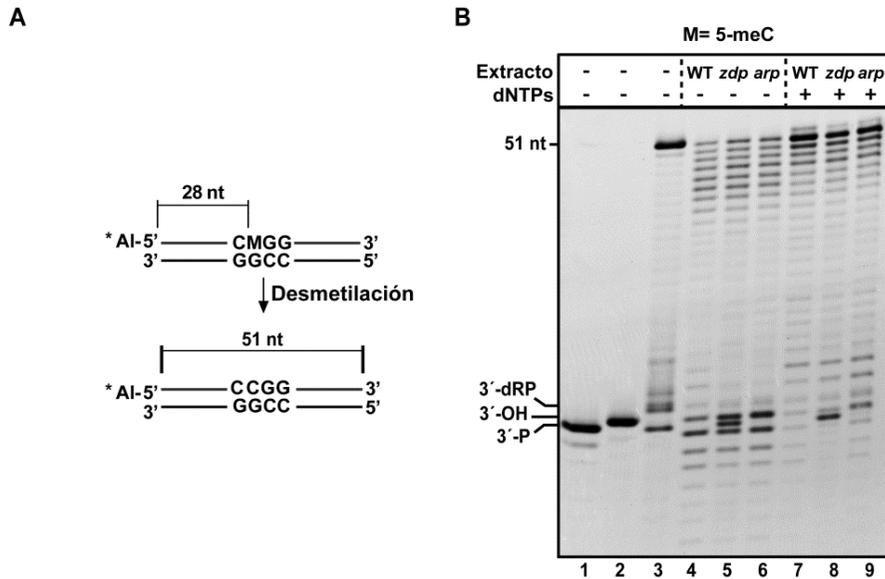
El siguiente objetivo fue examinar si los sucesivos pasos tras la eliminación de la 5-meC (por ejemplo, incorporación de nucleótidos y ligación), necesarios para completar la desmetilación, eran dependientes de ZDP. Para ello, se incubaron extractos de plantas mutantes *zdp-1*, *zdp-2* o silvestres, con sustratos de DNA que contienen un hueco flanqueado por un grupo 5'-P y por un grupo 3'-P o 3'-OH (Figura 37A). Como ambos sustratos están marcados en el extremo 5' de la cadena que contiene el hueco, la síntesis de DNA y ligación son fácilmente detectados por la generación de un fragmento de 51 nt marcado (Figura 37A). Los datos indicaron que ambos mutantes procesan el sustrato que contiene un 3'-OH con eficiencia similar a las plantas silvestres. En presencia de los cuatro dNTPs se detectó un fragmento marcado de 51 nt correspondiente al producto reparado, acompañado con la aparición de fragmentos de 29, 30 y 31 nt de productos de DNA intermedios (Figura 37B, carriles 3, 11, 19 y 27). Estos resultados muestran que cuando los cuatro dNTPs están presentes en la reacción, se insertan hasta tres nucleótidos, y la reparación del DNA tiene lugar por la vía del long-patch. En presencia de un único nucleótido, dCTP, la cantidad de producto reparado disminuyó, y el mayor producto intermedio detectado correspondía a un fragmento de 29 nt, correspondiente a la síntesis de DNA mediante la vía short-patch, que solo inserta un dCMP para reparar el gap (Figura 37B, carriles 4, 12, 20 y 28). Cuando se incubaron extractos de plantas silvestres con el sustrato que contiene un 3'-P, el nivel de producto reparado y de intermediarios de reacción fue similar al observado con el sustrato que contiene un gap con un 3'-OH (Figura 37B, carriles 7, 8, 23 y 24). Sin embargo, no se detectó reparación en las plantas mutantes cuando el sustrato contenía el hueco con el extremo 3'-P (Figura 37B, carriles 15, 16, 31 y 32). El estudio de los intermediarios de reacción reveló que las plantas mutantes eran incapaces de eliminar el 3'-P para generar un extremo 3'-OH adecuado para el posterior paso de incorporación de nucleótidos (comparar carril 6 y 14 o 22 y 30). Estos resultados indican que los extractos de las plantas mutantes *zdp* son incapaces de reparar el hueco mononucleotídico generado tras la escisión de 5-meC, y sugieren que ZDP es requerida para completar la desmetilación de DNA iniciada por ROS1.



**Figura 37. Análisis de la reparación de intermediarios de desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes *zdp*.** (A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de reparación: un oligonucleótido bicatenario que contiene un hueco con un extremo 3'-P (X= P) o un extremo 3'-OH (X=OH). Se indica con una estrella el extremo 5' marcado con Alexa-Fluor y el tamaño del oligo sin reparar (28 nt) y reparado (51 nt). (B) Extractos celulares de plantas silvestres y *zdp*<sup>-/-</sup> se incubaron a 30°C durante 3 horas con los sustratos de DNA indicados. Los productos de reacción se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% y se detectaron por fluorescencia.

Tal y como se ha mencionado anteriormente (Ver apartado 5.2 de la Sección de Introducción, pág 45) algunas de las incisiones generadas por ROS1 no se procesan mediante  $\beta,\delta$ -eliminación hasta productos con extremos 3'-P, sino que solo sufren una  $\beta$ -eliminación que genera un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-dRP) (Figura 20). Puesto que este extremo no es un sustrato para ZDP (Figura 23), debe existir en *Arabidopsis* una enzima capaz de procesarlo. En bacterias y mamíferos los extremos 3'-dRP son convertidos en 3'-OH por la acción de AP endonucleasas (Demple and Harrison, 1994; Pascucci et al., 2002).

La principal, si no única, actividad AP endonucleasa detectada en extractos celulares de *Arabidopsis* es la de la proteína ARP (Apurinic endonuclease-Redox Protein), que desempeña un papel esencial en la reparación de uracilo y sitios abásicos *in vitro* (Córdoba-Cañero et al., 2011). Así pues, se decidió examinar hasta qué punto los pasos que completan la desmetilación iniciada por ROS1 (síntesis de DNA y ligación) son dependientes de ZDP y/o ARP.



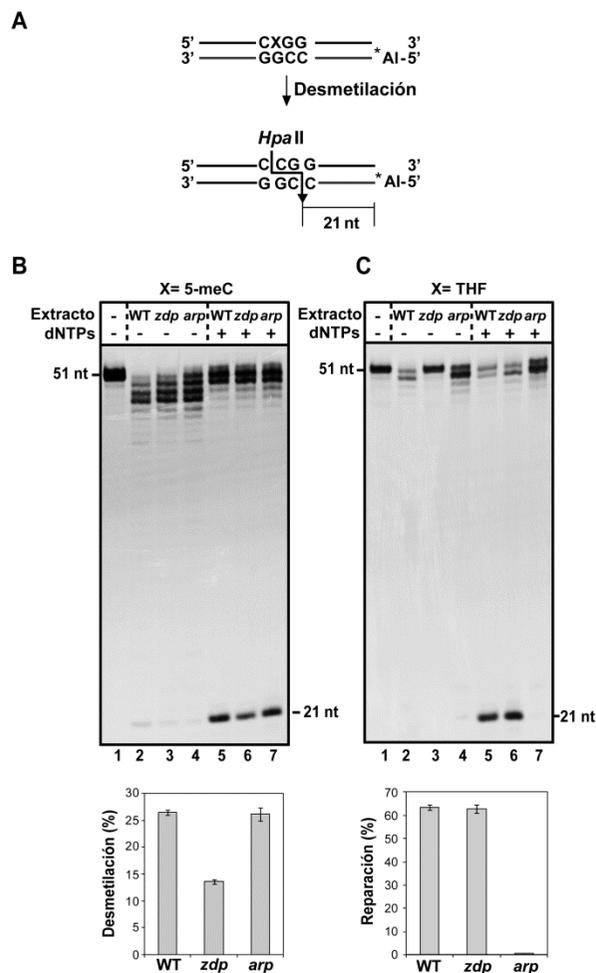
**Figura 38. Análisis de los productos de incisión de DNA generados durante el proceso de desmetilación en extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *zdp* o *arp*.** (A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de desmetilación: un oligonucleótido bicatenario que contiene un residuo de 5-meC (M) y está marcado con Alexa-Fluor en el extremo 5' de la cadena metilada. (B) Se incubó ROS1 (32 nM) con el sustrato de DNA (20 nM) a 30°C durante 4 horas. Los productos de esta reacción (carril 3) se incubaron durante 3 horas a 30°C con extractos celulares (50 µg) de plantas silvestres, *zdp* o *arp*, tanto en ausencia (carriles 4-6) como en presencia de dNTPS (carriles 7-9). Los productos se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% y se detectaron por fluorescencia. Los carriles 1 y 2 contienen marcadores de 28 nt con extremos 3'-P y 3'-OH, respectivamente.

La actividad de ROS1 es demasiado baja para ser detectada directamente en extractos celulares de *Arabidopsis* (datos no mostrados). Por tanto, se incubó proteína ROS1 purificada con un sustrato bicatenario conteniendo un residuo de 5-meC (Figura 38A), y los productos de reacción, constituidos por

una mezcla de  $\beta$  ( $3'$ -dRP) y  $\beta,\delta$ -eliminación ( $3'$ -P), (Figura 38B, carril 3) se incubaron con extractos celulares de plantas silvestres, y mutantes *zdp-1* o *arp* (Córdoba-Cañero et al., 2011). Los datos revelaron que tanto las plantas silvestres como las plantas *arp* procesan los dos tipos de extremos generando un grupo  $3'$ -OH (Figura 38B, carril 4 y 6) que es utilizado como cebador por la(s) DNA polimerasa(s) del extracto cuando se añaden a la reacción dNTPs (Figura 38B, carril 7 y 9). Por el contrario, los extractos de plantas *zdp-1* eliminan eficientemente el extremo  $3'$ -dRP pero no el extremo  $3'$ -P (Figura 38, carril 5), que permanece sin procesar incluso en presencia de dNTPs, y por tanto constituye un obstáculo para completar la desmetilación (Figura 38B, carril 8).

Con el fin de detectar el producto final del proceso de desmetilación se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción HpaII en sustratos cuya cadena no metilada se hallaba marcada en el extremo  $5'$  (Figura 39). En estos sustrato, cuando la 5-meC se sustituye por un citosina no metilada se regenera una diana para HpaII, cuya actividad da lugar a un fragmento marcado de 21 nt (Figura 39A). Como se muestra en la Figura 39B, las plantas silvestres y los mutantes *arp* completan el proceso de desmetilación con la misma eficiencia relativa (Figura 39B, carriles 5 y 7). Sin embargo, el nivel de desmetilación en extractos de plantas *zdp* se ve reducido prácticamente a la mitad (carril 6). Como control, se usó un sustrato con un sitio abásico sintético (THF, tetrahidrofurano) que confirmó que los extractos mutantes *zdp* mantienen intacta el resto de la maquinaria de BER (Figura 39C, carriles 5-7).

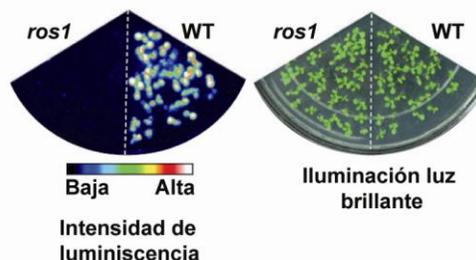
En conjunto, estos resultados indican que el proceso de desmetilación iniciado por ROS1 es parcialmente dependiente de ZDP. Además, sugieren que los productos de  $\beta$ -eliminación generados por ROS1 son procesados en una vía independiente de ZDP y ARP, mediante la acción de una actividad enzimática aún por identificar.



**Figura 39. Análisis de la desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes *zdp* o *arp*** (A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de desmetilación: un oligonucleótido bicatenario que contiene una base modificada (X=5-meC o THF) situada en una diana de restricción HpaII. El extremo 5' de la cadena no metilada está marcado con Alexa-Fluor. Se indica el tamaño del fragmento marcado generado tras la digestión con HpaII del producto desmetilado (B y C) Detección del producto de reacción desmetilado y reparado, respectivamente. Tras la incubación de ROS1 (32 nM) con los sustratos bicatenarios (20 nM), durante 4 horas a 30°C, los productos de reacción se incubaron con extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *zdp* o *arp* (50 µg) durante 3 horas. Tras digestión con HpaII, los productos se separaron en un gel al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra el valor de la media correspondiente a dos experimentos independientes.

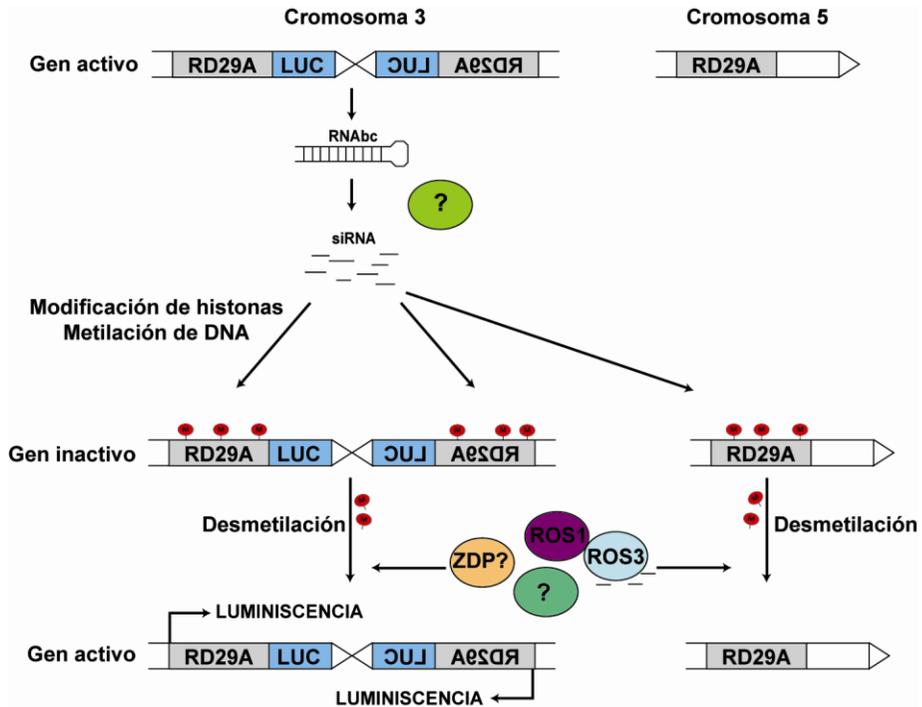
## 4. Papel de ZDP en la prevención del silenciamiento transcripcional

Algunos transgenes que se sitúan bajo el control de promotores de genes de la planta pueden causar la metilación y el silenciamiento transcripcional (TGS) en trans del correspondiente gen endógeno mediante un proceso mediado por RNAs (Mette et al., 2000) (Ver apartado 3.4 de la sección de Introducción, pág 26). El análisis genético de este proceso ha permitido identificar factores cuya actividad es necesaria para prevenir dicho silenciamiento y que participan en el control dinámico de la metilación. Así, mutaciones en el gen *ROS1* causan silenciamiento transcripcional de un transgen y del gen homólogo no alélico endógeno en líneas transgénicas de *Arabidopsis* Col-g1 (Columbia gl1) (Gong et al., 2002). Estas plantas transgénicas contienen el gen reportero de la luciferasa (*LUC*) bajo el control del promotor del gen de respuesta a estrés *RD29A*. El transgen *RD29A-LUC* (insertado en el cromosoma 3) se comporta como el gen endógeno *RD29A* (en el cromosoma 5), y las plantas emiten bioluminiscencia en respuesta a diversos tipos de estrés, incluyendo bajas temperaturas (Zhu et al., 2002). Las plantas mutantes *ros1* no emiten bioluminiscencia en respuesta a frío (Gong et al., 2002) (Figura 40) ya que el transgen *RD29A-LUC* y el gen endógeno *RD29A* se encuentran silenciados transcripcionalmente como consecuencia de la hipermetilación de sus promotores (Gong et al., 2002).



**Figura 40. Silenciamiento del transgen *RD29A-LUC* en mutantes *ros1*.** A la izquierda imagen de luminiscencia de plantas silvestres y mutantes *ros1*, a la derecha iluminación de las plántulas con luz brillante. La intensidad de la escala de luminiscencia varía de negra (la más baja) a blanca (la más fuerte). Modificado a partir de (Zhu, 2009).

Esta hipermetilación es consecuencia de un desequilibrio entre el proceso de metilación dirigida por RNA (RdDM) y la ruta de desmetilación activa iniciada por ROS1 (Figura 41).

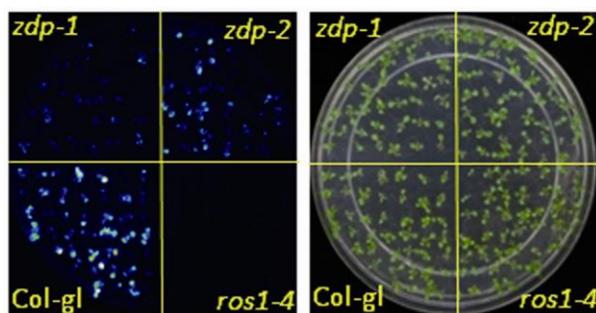


**Figura 41. Sistema para el análisis genético de desmetilación activa de DNA en *Arabidopsis*.** En este sistema las repeticiones del transgen *RD29A-LUC* generan pequeños RNAs que provocan la hipermetilación y el silenciamiento de *LUC* y del gen endógeno *RD29A*, situados en dos cromosomas diferentes. ROS1 contrarresta este silenciamiento mediante desmetilación activa del DNA. La proteína ROS3 interacciona con ROS1 y se une al RNA, por lo que podría dirigir a la desmetilasa a las secuencias a desmetilar. Los interrogantes representan a otras proteínas que podrían intervenir junto a ROS1 en la desmetilación activa del DNA o que participan en la producción o la acción de los RNAs bicatenarios (RNAbc) o pequeños RNAs (siRNAs) que producen el silenciamiento.

El transgen *RD29A-LUC* se encuentra insertado en el genoma de la planta como una serie de repeticiones en tándem que generan siRNAs de 24 nt (Kapoor et al., 2005). Estos siRNAs dirigen la maquinaria de RdDM hacia los promotores del transgén y del gen endógeno, causando el silenciamiento de ambos en los mutantes *ros1* (que son defectivos en la ruta de desmetilación activa) pero no en plantas silvestres (He et al., 2009; Zheng et al., 2007). Es posible que en la

ruta de desmetilación participen igualmente moléculas de RNA; ya que defectos en ROS3 (una proteína de unión a RNA que colocaliza con ROS1 en las mismas regiones sub-nucleares) también causan hipermetilación del transgen RD29A-LUC y su homólogo endógeno (Zheng et al., 2008) (Figura 41). Por otra parte, la inactivación de distintos componentes de la maquinaria de RdDM suprime el silenciamiento de *LUC* en los mutantes *ros1*, confirmando que el transgen *RD29A-LUC* está sometido a un control dinámico de metilación y desmetilación (He et al., 2009).

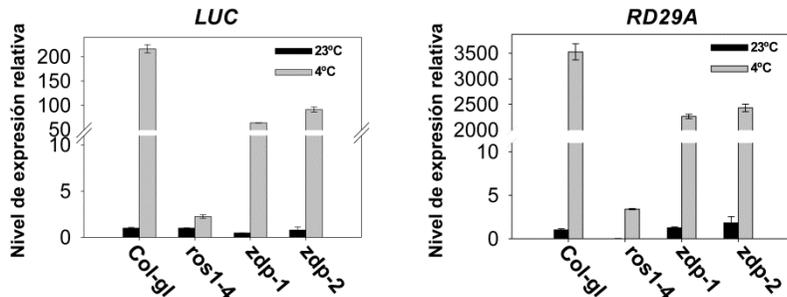
Puesto que los resultados expuestos en los apartados anteriores de esta tesis implican a ZDP en la ruta de desmetilación iniciada por ROS1, el siguiente objetivo fue determinar el papel de ZDP en la prevención del silenciamiento transcripcional de transgenes y genes endógenos causado por RdDM. Para comprobar esta hipótesis se cruzaron plantas mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> con plantas transgénicas Col-gl. Se obtuvieron así mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> que contienen la construcción quimérica del gen de la luciferasa bajo el control del promotor de *RD29A* (*RD29A-LUC*). Tras 15 días de crecimiento a 23°C, las plantas se sometieron a bajas temperaturas (4°C) durante dos días y a continuación se analizó su bioluminiscencia (Figura 42). Los resultados mostraron que la expresión de *RD29A-LUC* se reduce considerablemente en las plantas mutantes *zdp-1* y *zdp-2* en comparación con las silvestres. La disminución de la luminiscencia fue más intensa en los mutantes *zdp-1* que en los *zdp-2*, aunque no llega a ser tan drástica como la observada en los mutantes *ros1-4*.



**Figura 42. Análisis del silenciamiento de *RD29A-LUC* en plantas mutantes *zdp*.** Se capturó la imagen de luminiscencia en plantas que, tras 2 semanas de crecimiento a 23°C, fueron sometidas a un tratamiento a 4°C durante 2 días.

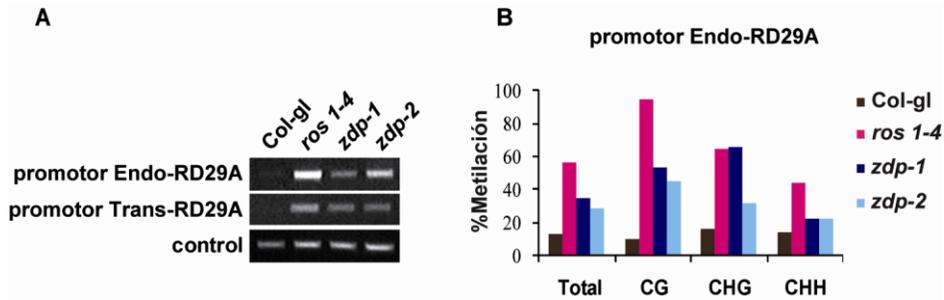
Para examinar en detalle el nivel de expresión del transgen *RD29A-LUC* y del gen endógeno *RD29A* se realizó un análisis mediante RT-PCR a tiempo real con RNA extraído de plantas silvestres y mutantes antes y después de

someterlas a baja temperatura (Figura 43). Se observó un menor nivel de expresión, tanto del transgen *LUC* como del gen endógeno *RD29A*, en las plantas mutantes *zdp-1* y *zdp-2* comparadas con la silvestres (*Col-gI*). De nuevo, esta reducción no fue tan drástica como la observada en los mutantes *ros1-4*. En conjunto, estos resultados sugieren que ZDP protege parcialmente a transgenes y genes endógenos del silenciamiento transcripcional.



**Figura 43. Análisis de la expresión de *LUC* y *RD29A* mediante PCR a tiempo real.** El gen *TUB8* se usó como control. Se indica la media y el error estándar de tres experimentos independientes

Con el fin de comprobar si esta reducción en el nivel de expresión era consecuencia de un aumento en la metilación del promotor *RD29A*, se realizó una digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación (*BstUI*, para el promotor *RD29A* del transgen y *BsmAI*, para el promotor del gen endógeno) sobre DNA genómico de plantas silvestres *Col-gI* y mutantes *zdp* y *ros1-4*. El DNA digerido se usó como molde en una PCR con cebadores específicos para cada locus (Tabla 4) (Figura 44A). En este ensayo el nivel de amplificación es proporcional al grado de metilación. Los resultados mostraron que al igual que para los mutantes *ros1-4*, los mutantes *zdp* presentan hipermetilación en los promotores endógeno y transgénico de *RD29A* (Figura 44A)



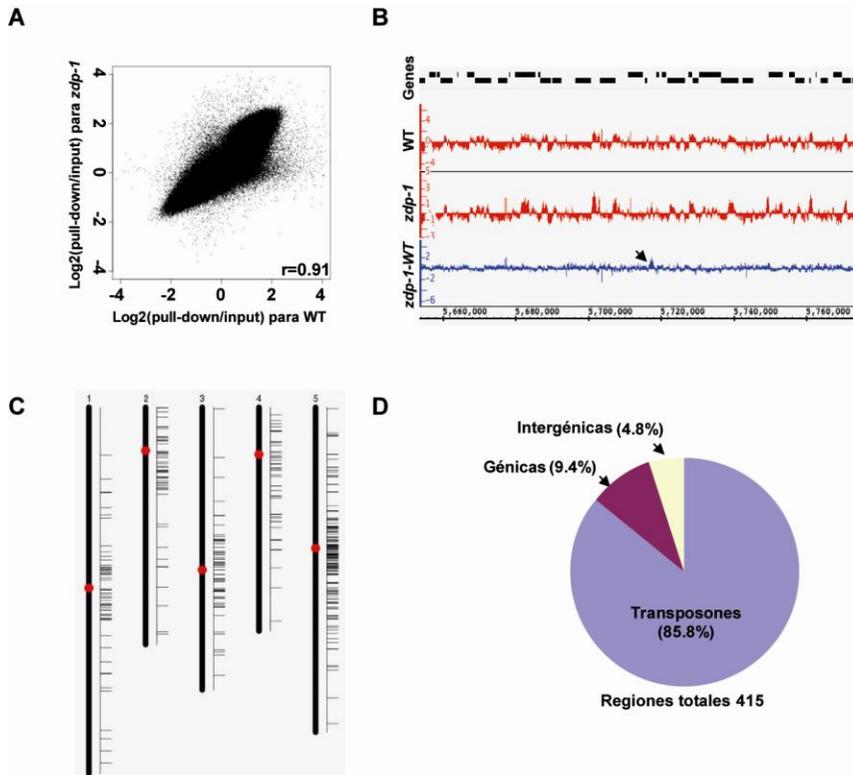
**Figura 44. Análisis de la metilación en el promotor de *RD29A*.** (A) Análisis de la metilación del promotor de *RD29A* transgénico (Trans-*RD29A*) y endógeno (Endo-*RD29A*). (B) Análisis del estado de metilación del promotor endógeno de *RD29A* mediante secuenciación de DNA modificado con bisulfito.

Para confirmar estos resultados se llevó a cabo una secuenciación de DNA modificado con bisulfito del promotor *RD29A* endógeno (Figura 44B). La secuenciación con bisulfito permite obtener mapas de metilación con la máxima resolución posible, al detectar el estado de metilación de cada residuo de citosina en la región analizada. El método se basa en la desaminación selectiva de citosina a uracilo por tratamiento previo del DNA con bisulfito, la amplificación por PCR de la región a analizar, la clonación en un vector apropiado, y su posterior secuenciación. A diferencia de la citosina, la 5-meC no reacciona con bisulfito. Así pues, en la secuencia obtenida, las citosinas metiladas y no metiladas presentes en la muestra original aparecen como citosina y timina respectivamente tras la secuenciación (Zilberman and Henikoff, 2007). El análisis de un número significativo de clones permite cuantificar el estado de metilación de cada residuo de citosina.

Como se muestra en la Figura 44B, los resultados confirmaron que el promotor endógeno de *RD29A* en los mutantes *zdp-1* y *zdp-2* se encuentra hipermetilado con respecto a las plantas silvestres. Este aumento de la metilación se observó no solo en el contexto de secuencia CG sino también en los contextos asimétricos CHG y CHH. Estos resultados sugieren que, al igual que ROS1, ZDP previene la hipermetilación y, en consecuencia, el silenciamiento transcripcional de transgenes y genes endógenos.

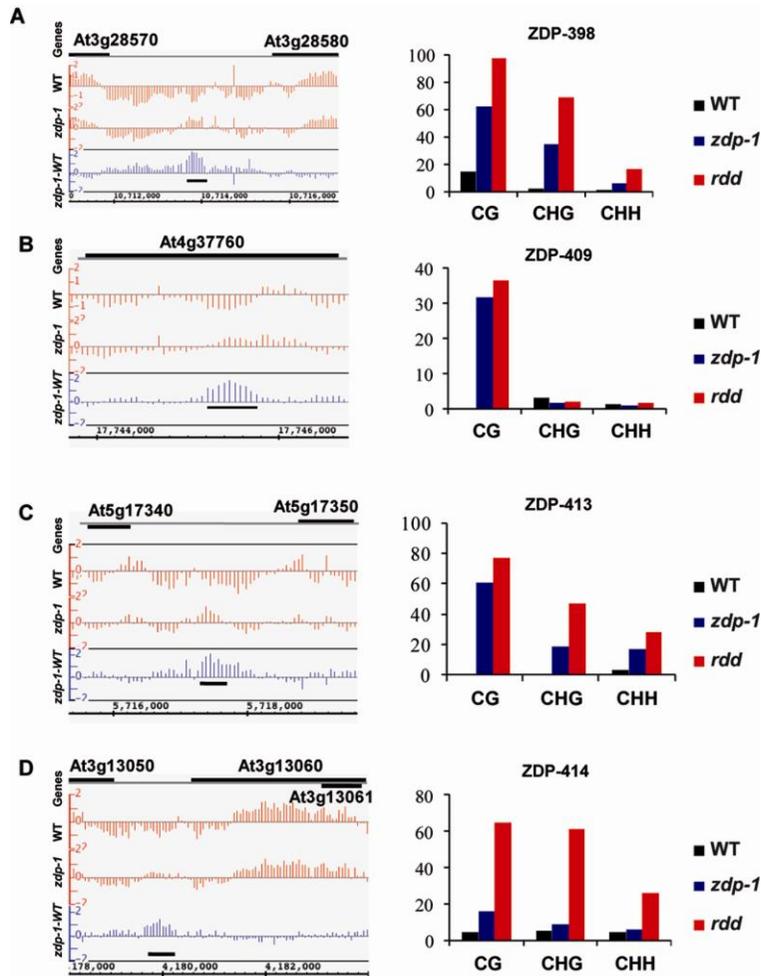
## 5. Análisis del efecto de ZDP en los niveles de metilación de DNA a escala genómica

Para examinar a escala genómica el efecto de ZDP sobre los niveles de metilación de DNA se realizó un análisis mediante *tiling arrays* (NimbleGen) (Penterman et al., 2007b) (Figura 45). Como sonda se usó DNA genómico de plantas silvestres y mutantes *zdp-1* obtenido tras inmunoprecipitación de 5-metilcitosina. Los resultados mostraron que, aunque los niveles globales de metilación en plantas silvestres y mutantes *zdp-1* son similares, hay 415 loci donde las plantas *zdp-1* muestran un incremento en el nivel de metilación y 28 loci que se encuentran hipometilados. Los loci hipermetilados se encuentran distribuidos a lo largo de los cinco cromosomas, aunque se localizan en mayor medida en las regiones centroméricas. (Figura 45C). Los loci hipermetilados son en su mayoría transposones (85,8%), aunque también se encuentran algunas regiones génicas (9,4%) e intergénicas (4,8%) con hipermetilación.



**Figura 45. Perfil de metilación a escala genómica en plantas silvestres y mutantes *zdp-1*.** (A) Diagrama de dispersión que muestra la correlación entre los datos obtenidos en el *tiling array* para las plantas silvestres (Col-0) y plantas mutantes *zdp-1*.  $r=0.91$ . (B) Ejemplo representativo de los resultados del *tiling array*. Las cajas negras indican genes, con dirección 5´-3´ en la parte de arriba y con la inversa en la parte de abajo. La escala horizontal representa posiciones en el cromosoma 1 en pares de bases. Cada barra roja representa el nivel de metilación detectado en las plantas silvestres y *zdp-1*, estimado como el log2 del cociente entre las señales del DNA inmunoprecipitado y del DNA total usado como input. Las barras azules representan la diferencia entre los niveles de metilación de las muestras *zdp-1* y silvestres. La flecha negra indica una zona hipermetilada. (C) Distribución de los loci hipermetilados en los 5 cromosomas en plantas mutantes *zdp-1*. (D) Gráfico circular mostrando los loci hipermetilados en las plantas mutantes *zdp-1*.

Para confirmar los datos del *tiling array* se eligieron al azar 12 regiones de la lista de loci hipermetilados y se analizaron mediante secuenciación de DNA modificado con bisulfito (Figura 46).



**Figura 46. Ejemplos del análisis de secuenciación con bisulfito llevado a cabo para confirmar la hipermetilación de algunos loci.** (A-D) El panel de la izquierda muestra para cada región la zona hipermetilada (indicada con una barra negra horizontal bajo las barras azules). El panel de la derecha muestra para cada locus el nivel de metilación determinado por secuenciación con bisulfito en plantas silvestres y mutantes *zdp-1* y *rdd*.

Los resultados demostraron que once de estos loci se encuentran hipermetilados en el mutante *zdp-1*, así como en el triple mutante *ros1dml2 dml3* (de ahora en adelante, *rdd*) (Penterman et al., 2007b) que se usó como control. En la mayoría de los loci analizados, se observó hipermetilación en todos los contextos de secuencia (CG, CHG y CHH) (Figura 46). No obstante, se encontraron variaciones en el nivel de hipermetilación entre los mutantes *zdp-1* y *rdd*. En alguno de los loci examinados, el incremento en la metilación en el mutante *zdp-1* es comparable a la observada en el triple mutante *rdd* (Figura

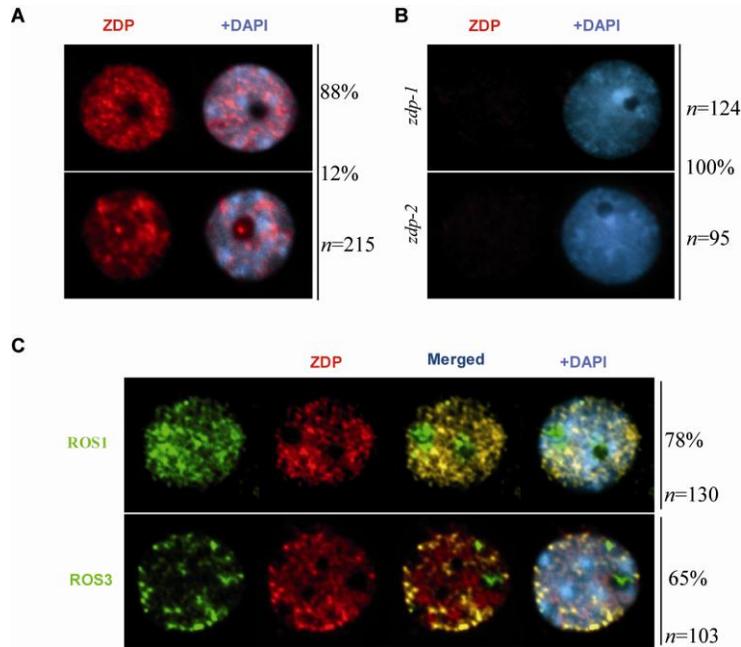
46B), mientras que en otros loci el mutante *zdp-1* presenta un menor grado de hipermetilación que el triple mutante (Figura 46A y C). Por último, un locus como el *ZDP-414* (Figura 46D) presenta mayor nivel de metilación en el mutante *rdd* que en el *zdp-1*. En cualquier caso, los datos de secuenciación con bisulfito confirmaron la fiabilidad de los datos obtenidos mediante *tiling arrays*, y sugieren que ZDP es importante para prevenir la hipermetilación de cientos de loci a lo largo del genoma de *Arabidopsis*

## **6. ZDP co-localiza con ROS1 y ROS3 en regiones subnucleares**

Aparte de ROS1, la única proteína implicada en la desmetilación activa de DNA conocida hasta la fecha es ROS3. Esta proteína se une a RNAs de pequeño tamaño y colocaliza con ROS1 en el nucléolo y en zonas discretas del nucleoplasma (focos nucleoplásmicos) (Zheng et al., 2008). Se ha propuesto que ROS3 podría dirigir a ROS1 hacia secuencias específicas para iniciar la desmetilación. (Zheng et al., 2008).

Puesto que los datos descritos hasta ahora indican que ZDP es un componente de la maquinaria de desmetilación activa de DNA, se decidió comprobar si ZDP muestra la misma localización subnuclear que ROS1 y ROS3. Para ello se generaron anticuerpos específicos de la proteína ZDP y se usaron para la inmunolocalización de ZDP en el núcleo de hojas de *Arabidopsis* (Figura 47). Como se muestra en la Figura 47A, ZDP se encuentra ampliamente distribuida por el núcleo, encontrándose de forma más abundante en focos nucleoplásmicos discretos. No se observó señal cuando se añadió el anticuerpo a preparaciones de plantas mutantes *zdp-1* y *zdp-2*, demostrando que el patrón de localización de la proteína observado en las plantas silvestres no se debe a interacciones inespecíficas del anticuerpo (Figura 47B). Para examinar en mayor detalle la localización subnuclear de ZDP, se llevó a cabo un análisis de co-inmunolocalización con ROS1 y ROS3. Para ello se usaron líneas de plantas transgénicas que expresan la proteína ROS1 y ROS3 como proteínas de fusión al epítipo MYC (en el caso de ROS1) y al epítipo FLAG (en el caso de ROS3), bajo el control de sus promotores nativos (Zheng et al., 2008). Mediante uso de anticuerpos específicos frente a estos epítopos y de anticuerpos frente a ZDP se detectó la localización de las tres proteínas (Figura 47C). Como se esperaba, se

observó un patrón de localización muy similar para ROS1 y ROS3; aunque los focos de inmunolocalización de ROS1 fueron generalmente más pequeños y más difusos que los de ROS3, ambas proteínas se encuentran dispersas en el nucleoplasma y en el nucleólo. Además, se encontró que ZDP colocaliza con ROS1 y ROS3 en los mismos focos nucleoplásmicos, como demuestra la fuerte señal de color amarillo que indica el solapamiento de las señales rojas y verdes. No obstante, mientras que la gran mayoría de las señales nucleoplásmicas de ZDP colocalizan en los focos de ROS1, solo colocalizan con ROS3 en 10-15 focos (Figura 47C). Por otra parte, y a diferencia de ROS1 y ROS3, no se encontró ninguna señal de ZDP en el nucleólo (Figura 47 A-C).



**Figura 47. Localización subnuclear de ZDP y colocalización con ROS1 y ROS3.** (A) y (B) La distribución nuclear de ZDP se analizó usando anticuerpos anti-ZDP (rojo) en plantas silvestres (A) y mutantes *zdp* (B). (C) Inmunolocalización doble usando anticuerpos anti-ZDP (rojo) en líneas transgénicas que expresan las proteínas recombinantes MYC-ROS1 (verde, panel superior) y FLAG-ROS3 (verde, panel inferior). En todos los paneles el DNA se tiñó con DAPI (azul). A la derecha de cada fotografía se indica el porcentaje de núcleos que presentan el patrón mostrado.



# **XRCC1 PARTICIPA EN LA RUTA DE DESMETILACIÓN DE DNA INICIADA POR ROS1 EN ARABIDOPSIS**

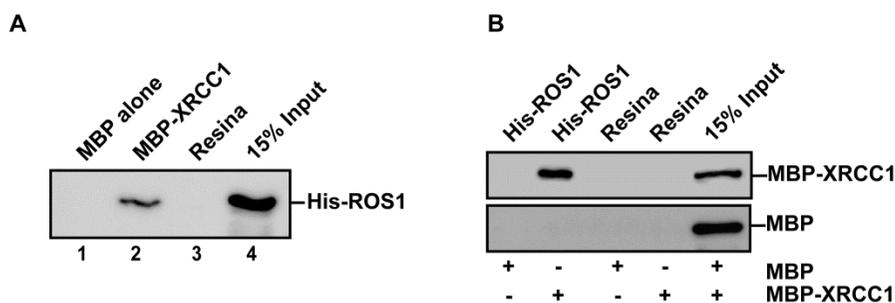
En células de mamífero, la proteína XRCC1 (X-ray cross complementing group protein 1) carece de actividad enzimática pero desempeña un papel crucial coordinando la actividad de las distintas proteínas durante la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación de roturas de cadena simple (SSBR) (Thompson and West, 2000; Whitehouse et al., 2001). XRCC1 interactúa con la DNA Ligasa III (Caldecott et al., 1994), la DNA polimerasa  $\beta$  (Caldecott et al., 1996; Dianova et al., 2004; Kubota et al., 1996; Parsons et al., 2004), y con otras proteínas implicadas en BER y SSBR en mamíferos. Se ha propuesto que funciona como una proteína de andamiaje coordinando los pasos iniciales y finales de la reparación (Kubota et al., 1996) El genoma de *Arabidopsis* codifica un ortólogo de XRCC1 (Taylor et al., 2002) pero su papel no es del todo conocido. Recientemente, se ha demostrado que la proteína XRCC1 de *Arabidopsis* funciona en una ruta de reparación de roturas de cadena doble (DSB) independiente de Ku mediante unión de extremos no homólogos (non-homologous end-joining, NHEJ) (Charbonnel et al., 2010). Además, XRCC1 de arroz interactúa con DNA de cadena simple y doble *in vitro* e interactúa con PCNA *in vitro* e *in vivo* (Uchiyama et al., 2008). Sin embargo, en plantas, está aun por estudiar el posible papel de XRCC1 en BER y, específicamente, durante la desmetilación activa de DNA. Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis fue determinar la función que desempeña la proteína XRCC1 de *Arabidopsis* en la ruta de desmetilación iniciada por ROS1 y si podría coordinar, no sólo la actividad de ROS1, sino también la de ZDP.

## **1. XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP *in vitro***

El primer objetivo planteado fue analizar si XRCC1 y ROS1 interaccionan *in vitro*. Para ello, XRCC1 se expresó en *E. coli* y se purificó fusionada a MBP (ver apartado 11.3 de la sección de Materiales y Métodos, pág 156). La proteína MBP-XRCC1 se unió a una columna de amilosa y se analizó su capacidad de retener de forma específica a la proteína His-ROS1 mediante ensayos de pull-down. Además, se purificó la proteína MBP y se unió a una columna de amilosa para usarla como control. Los resultados obtenidos indican que ROS1 queda

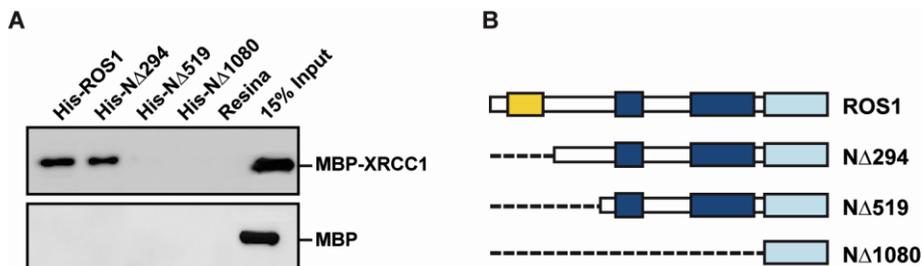
retenida en una columna que contiene XRCC1, no observándose retención cuando la columna solo contiene MBP (Figura 48A).

Para confirmar la interacción entre ROS1 y XRCC1, se realizaron ensayos de pull-down a la inversa, es decir, usando His-ROS1 como proteína cebo y MBP-XRCC1 como proteína presa. His-ROS1 se unió a una columna de Ni-sefarosa y se analizó su capacidad de retener de forma específica la proteína MBP-XRCC1. Como se muestra en la Figura 48B, MBP-XRCC1, pero no MBP, queda retenida en una columna a la que se ha fijado ROS1. Esta unión no se detecta en columnas que contienen únicamente la matriz de Niquel-sefarosa.



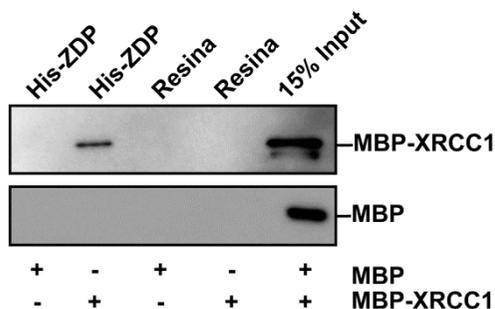
**Figura 48. Análisis de la interacción entre ROS1 y XRCC1 in vitro.** (A) La proteína His-ROS1 se incubó en columnas que contenían sólo la matriz de amilosa (carril 3), o bien las proteínas cebo MBP (carril 1) ó MBP-ROS1 (carril 2) previamente unidas a dicha matriz. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-His<sub>6</sub>. El carril 4 contiene como marcador un 15 % del total de proteína presa (His-ROS1) cargado en cada columna. (B) Se incubó la proteína MBP o la proteína MBP-XRCC1 en columnas que contenían sólo la matriz de Ni-Sefarosa o bien la proteína cebo His-ROS1 previamente unida a dicha matriz. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. El último carril contiene como marcadores un 15 % del total de proteína presa (MBP ó MBP-XRCC1) cargado en cada columna.

Con el fin de determinar cuál era la región de ROS1 implicada en la interacción con XRCC1, se usaron como proteínas cebo una serie de versiones truncadas de ROS1 que presentaban deleciones en la región amino-terminal (N-terminal) o carboxilo-terminal (C-terminal) de la proteína (Figura 49B) Los resultados mostraron que la región necesaria para la interacción entre ROS1 y XRCC1 se encuentra en la región comprendida entre los aminoácidos 295 y 520 de la DNA glicosilasa.



**Figura 49. Análisis de la región de ROS1 responsable de su interacción con XRCC1.** (A) Se incubó MBP-XRCC1 (panel superior) ó MBP (panel inferior) en columnas que contenían como cebo la proteína His-ROS1 o sus diferentes versiones truncadas previamente fijadas a una matriz de Ni-Sefarosa. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel de SDP-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. (B) Esquema de la proteína ROS1 completa y de las diferentes versiones truncadas usadas en el ensayo pull-down. Dominio rico en lisina (amarillo), Dominio DNA glicosilasa (azul) y dominio C-terminal (celeste)

Puesto que la proteína XRCC1 de mamíferos interactúa con PNK (Whitehouse et al., 2001), que es el ortólogo de ZDP, se analizó la interacción entre ZDP y XRCC1 de *Arabidopsis* mediante ensayos pull-down (Figura 50).



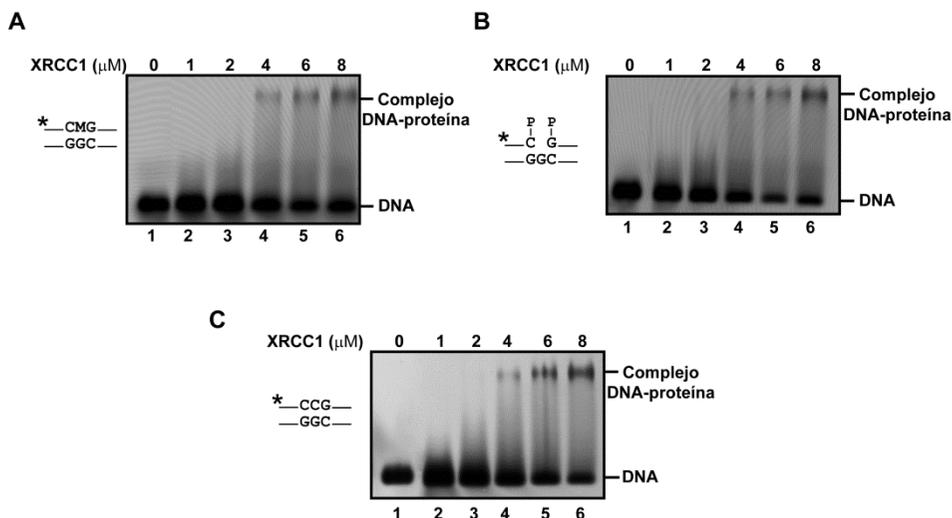
**Figura 50. Análisis de la interacción entre ZDP y XRCC1 *in vitro*.** Se incubó la proteína MBP-XRCC1 (panel superior) o la proteína MBP (panel inferior) en columnas que contenían sólo la matriz de Ni-Sefarosa o bien la proteína cebo His-ZDP previamente unida a dicha matriz. Tras lavar, las proteínas retenidas se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se detectaron con un anticuerpo anti-MBP. El último carril contiene como marcadores un 15 % del total de proteína presa (MBP ó MBP-XRCC1) cargado en cada columna.

Para ello se usó His-ZDP como proteína cebo y MBP-XRCC1 como proteína presa. His-ZDP se unió a una columna de Ni-sefarosa y se analizó su capacidad de retener de forma específica la proteína MBP-XRCC1. Los resultados obtenidos

mostraron que MBP-XRCC1 pero no MBP queda retenida en una columna a la que se ha fijado ZDP. Esta unión no se detecta en columnas que contienen únicamente la matriz de Niquel-sefarosa.

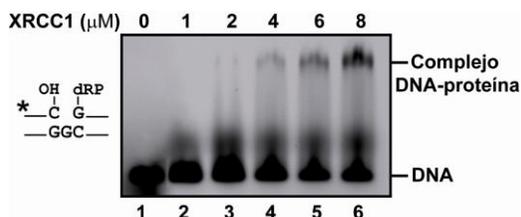
## **2. Análisis de la unión de XRCC1 al DNA**

La proteína XRCC1 de mamíferos se une a varios intermediarios de DNA que pueden ser generados o procesados por la ruta BER, por ejemplo, sitios abásicos producidos por acción de DNA glicosilasas o DNA con rotura de cadena simple con diferentes extremos. Algunos de estos extremos pueden ser aldehído 3'- $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-dRP) o 5' desoxiribosa-fosfato (5'-dRP) generados por la acción de AP liasas o AP endonucleasas, respectivamente (Nazarkina et al., 2007). Ya que la eliminación de la 5-meC se inicia por ROS1 mediante un mecanismo de BER y que XRCC1 podría acompañar a ROS1 en el paso inicial de la ruta, el siguiente objetivo fue analizar la unión de XRCC1 al sustrato (DNA conteniendo un residuo de 5-meC), al producto de ROS1 (DNA con un hueco mono-nucleotídico flanqueado por dos grupos fosfato), así como al producto final de un proceso de desmetilación (DNA sin metilar) y se realizaron ensayos de retardo en gel. Como se muestra en la Figura 51, al aumentar su concentración, XRCC1 se unió al sustrato, intermediario y producto final de desmetilación con una afinidad muy similar (Figura 51 A, B y C carriles 4-6).



**Figura 51. Unión de XRCC1 a sustrato, producto e intermediario de desmetilación de DNA.** Se incubaron cantidades crecientes de XRCC1 con oligonucleótidos bicatenarios que contienen un residuo de 5-meC (A), un hueco mono-nucleotídico flanqueado por extremos fosfato (B) o un par C:G (C). Los complejos DNA-proteína se identificaron tras electroforesis en gel de agarosa por su retardo en la movilidad electroforética en comparación con el DNA libre.

Además, se decidió examinar la interacción de XRCC1 con otros intermediarios de la ruta BER. Para ello, se realizaron ensayos de retardo en gel usando un oligonucleótido que contiene un hueco flanqueado por un extremo 3'-OH y 5'-dRP. Este sustrato mimetiza el producto generado por una actividad AP endonucleasa. Los resultados mostraron que XRCC1 forma un complejo con el DNA al aumentar su concentración (Figura 52, carriles 4-6).

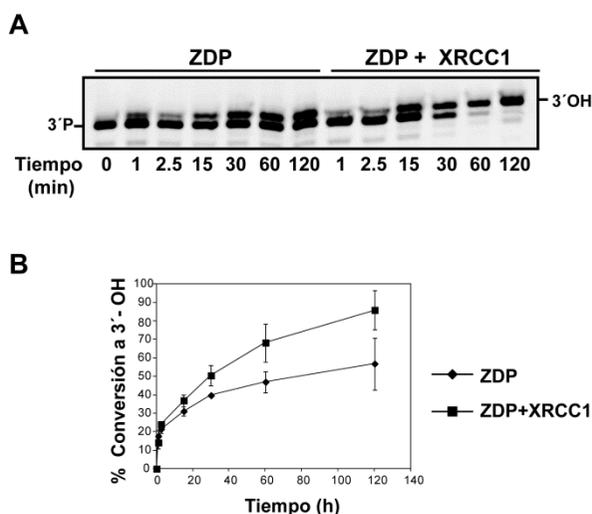


**Figura 52. Unión de XRCC1 a intermediarios de BER.** Se incubaron cantidades crecientes de XRCC1 con oligonucleótidos bicatenarios que contienen un hueco mono-nucleotídico flanqueado por extremos 3'-OH y 5'-dRP. Los complejos DNA-proteína se identificaron tras electroforesis en gel de agarosa por su retardo en la movilidad electroforética en comparación con el DNA libre.

En conjunto, estos resultados sugieren que la proteína XRCC1 de *Arabidopsis* posee la capacidad de unirse a una variedad de moléculas de DNA que mimetizan sustratos, intermediarios y productos de la ruta de desmetilación.

### 3. XRCC1 estimula la actividad fosfatasa de ZDP

En células de mamífero, XRCC1 estimula la actividad quinasa y fosfatasa de PNK sobre DNA dañado acelerando el proceso de reparación (Whitehouse et al., 2001). Se analizó por ello el efecto de la proteína XRCC1 de *Arabidopsis* sobre la actividad fosfatasa de ZDP usando como sustrato un oligonucleótido que contiene un hueco mono-nucleotídico flanqueado por dos grupos fosfato.



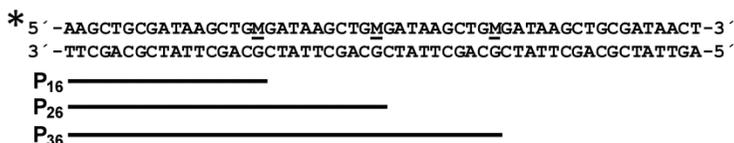
**Figura 53. Efecto de XRCC1 sobre la actividad fosfatasa de ZDP.** Se incubó ZDP (0,09 nM) con oligonucleótidos bicatenarios que contienen un hueco flanqueado por grupos fosfato (20 nM) en ausencia o presencia de XRCC1 (0,9 nM) a 30°C. Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (1, 2,5, 15, 30, 60 y 120 minutos). (A) Los productos de la reacción se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida al 15%. Se muestra un gel representativo. (B) Se cuantificó la conversión de 3'-fosfato (3'P) a 3'-hidroxilo (3'-OH) en ausencia (rombos) o presencia (cuadrados) de XRCC1. Se indica la media y el error estándar de dos experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 53, en presencia de XRCC1 la actividad de ZDP se ve estimulada llegando a la conversión casi completa del extremo 3'-P a extremo 3'-OH tras 2 horas de incubación. En ausencia de ZDP, la proteína XRCC1 no mostró ninguna actividad detectable sobre el sustrato (datos no mostrados), confirmando que el aumento en la actividad se debe a la estimulación de ZDP más que a una posible contaminación de la preparación con una DNA fosfatasa.

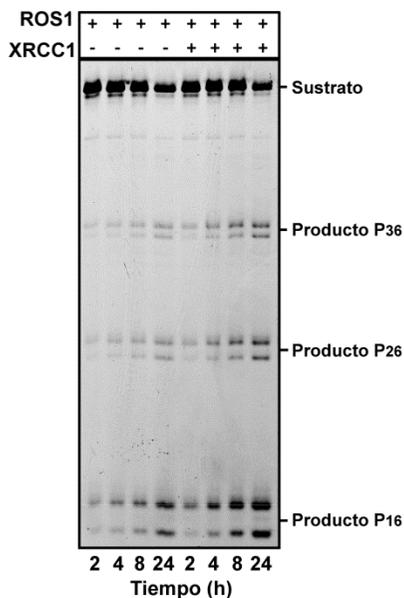
#### **4. XRCC1 estimula la actividad de ROS1**

Para estudiar si, al igual que con la actividad fosfatasa de ZDP, XRCC1 tiene algún efecto sobre la actividad de ROS1, se incubó la DNA glicosilasa con oligonucleótidos que contienen tres residuos de 5 me-C (Figura 54A) y se analizó la actividad de ROS1 en presencia o ausencia de XRCC1. De acuerdo con resultados anteriores (Ponferrada-Marín et al., 2009), y esta tesis, Figura 30, pág 66), ROS1 muestra un comportamiento altamente distributivo, acumulando productos totalmente procesados ( $P_{16}$ ), pero también productos intermedios ( $P_{26}$  y  $P_{36}$ ), incluso después de 24 h de incubación (Figura 54B). En presencia de XRCC1 se observó una estimulación de la actividad de ROS1 (Figura 54B-C), incrementándose la cantidad de producto final de la reacción ( $P_{16}$ ), pero también la acumulación de productos intermediarios de la reacción ( $P_{26}$  y  $P_{36}$ ) (Figura 54C). Estos datos indican que en presencia de XRCC1 la baja procesividad de ROS1 no aumenta, sugiriendo que el efecto positivo de XRCC1 sobre ROS1 probablemente no se debe al desplazamiento de la DNA glicosilasa de su producto de reacción.

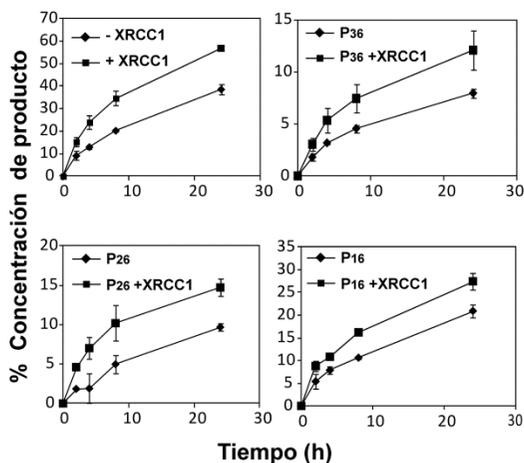
A



B



C

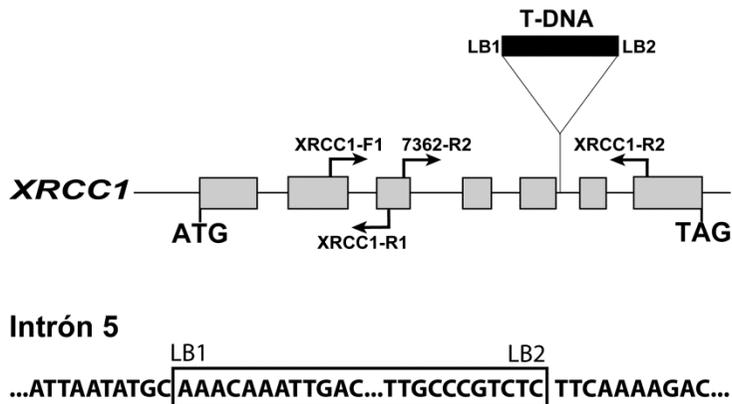


**Figura 54. Efecto de XRCC1 sobre la actividad de ROS1.** (A) Diagrama esquemático del sustrato usado en el ensayo. M: 5-meC. (B) y (C) Se incubó ROS1 (18 nM) con oligonucleótidos bicatenarios que contienen tres residuos de 5-meC (40 nM) en ausencia (rombos) o presencia (cuadrados) de XRCC1 (18 nM) a 30°C. Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas). (B) Los productos de la reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%. Se muestra un gel representativo. (C) Se determinó la concentración total de producto (P<sub>36</sub>+P<sub>26</sub>+P<sub>16</sub>) y de cada uno de los productos por separado mediante cuantificación de la fluorescencia. Se indica la media y el error estándar de dos experimentos independientes

## 5. Caracterización molecular de mutantes *xrcc1*

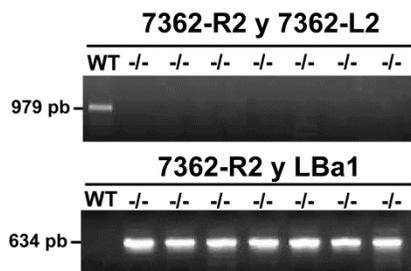
El ortólogo de XRCC1 de *Arabidopsis thaliana* está codificado por el locus AT1G80420, que se localiza en el cromosoma 1 (Taylor et al., 2002; Uchiyama et al., 2008). Para determinar la función de XRCC1 *in vivo* se usaron mutantes

por inserción de T-DNA en el gen *XRCC1* procedentes de la línea SALK\_027362, (suministrada por Charles White, de la Universidad Blaise Pascal, Francia). En el alelo mutante *xrcc1* el T-DNA se encuentra insertado en el intrón 5. La inserción de T-DNA tiene dos bordes izquierdos y se ha producido una delección de tres nucleótidos del gen *XRCC1* en el sitio de inserción (Charbonnel et al., 2010) (0).



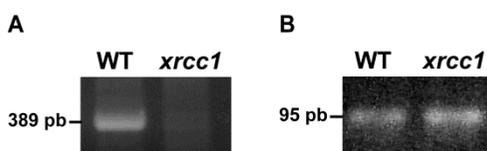
**Figura 55. Esquema de la inserción del T-DNA en el gen *XRCC1*.** Se muestran los exones (recuadros grises) y la posición de las inserciones de T-DNA (recuadros negros). En la parte inferior se muestra la secuencia que flanquea la inserción. La secuencia correspondiente al T-DNA está enmarcada. LB1 y LB2, los dos bordes del T-DNA. Se indican la posición de los cebadores usados para RT-PCR (ver Tabla 4). Modificado a partir de (Charbonnel et al., 2010)

En primer lugar se verificó el genotipo de las plantas mediante PCR. Para ello se realizaron dos reacciones de PCR con dos combinaciones de cebadores específicos. En una de las combinaciones se usó una pareja de cebadores que flanquean el punto de inserción, 7362-R2 y 7362-L2 (ver Tabla 6). La otra reacción de PCR se realizó con un cebador que se sitúa dentro del extremo izquierdo del T-DNA y con un cebador localizado fuera del punto de inserción, 7362-R2 y LBa1 (ver Tabla 6). Como se muestra en la Figura 56, todas las plantas mostraron el genotipo homocigótico para el alelo mutante *xrcc1*.



**Figura 56. Asignación de genotipos a plantas mutantes en *XRCC1*.** Asignación de genotipos mediante PCR sobre DNA genómico de plantas silvestres (WT) y mutantes *xrcc1*. 7362-R2 y 7362-L2 oligonucleótidos que flanquean el sitio de inserción. LBa1 cebadores que se encuentran dentro del T-DNA. -/-: individuos homocigóticos para la inserción. Se muestra el tamaño del fragmento amplificado por PCR en pares de bases (pb).

Para examinar el efecto de la inserción de T-DNA sobre la expresión del gen *XRCC1*, se analizaron mediante RT-PCR los niveles de transcritos del alelo *xrcc1* en RNA total de plantas silvestres y mutantes *xrcc1* (Figura 57). La RT-PCR se realizó con cebadores que flanquean el T-DNA (7362-R2 y *XRCC1*-R2, Tabla 4 y 0). Como control se usó una pareja de cebadores que se situaban fuera del punto de inserción (*XRCC1*-F1 y *XRCC1*-R1, ver Tabla 4 y 0). Como se muestra en la Figura 57A, no se detectó transcrito cuando se usaron los cebadores que flanquean el punto de inserción, indicando que muy probablemente el T-DNA interfiere en el procesamiento correcto del intrón 5. Sin embargo, sí se produjo amplificación tanto en las plantas silvestres como en las mutantes cuando se usaron cebadores localizados fuera del punto de inserción (Figura 57B).

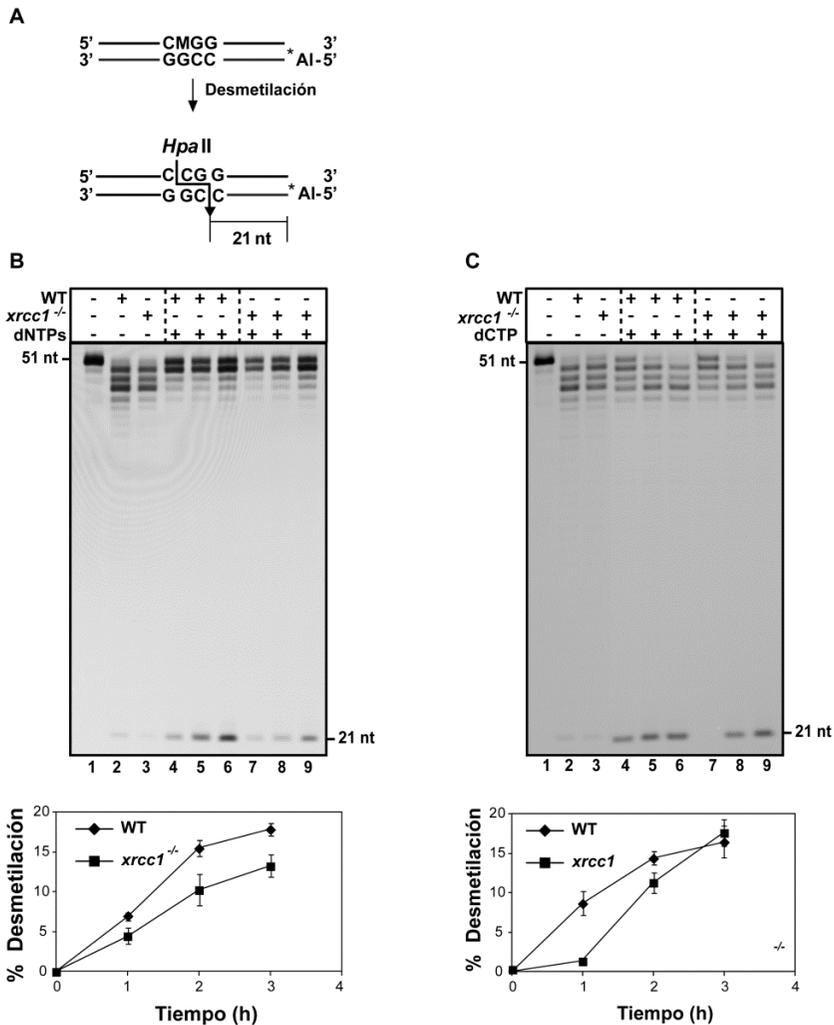


**Figura 57. Análisis de la expresión del gen *XRCC1* en plantas silvestres y mutantes.** Se llevó a cabo una RT-PCR empleando RNA total aislado de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*, usando las parejas de cebadores que se muestran en la Figura 56(A) Fragmento amplificado usando los cebadores que flanquean la inserción: 7362-R2 y *XRCC1*-R2. (B) Fragmento amplificado usando cebadores situados fuera del punto de inserción: *XRCC1*-F1 y *XRCC1*-R1. Se indica el tamaño del fragmento de cDNA amplificado en pares de bases (pb).

Estos datos concuerdan con los previamente publicados (Charbonnel et al., 2010) y sugieren que las plantas mutantes *xrcc1* codifican probablemente una versión truncada de la proteína XRCC1 que carece del extremo carboxilo.

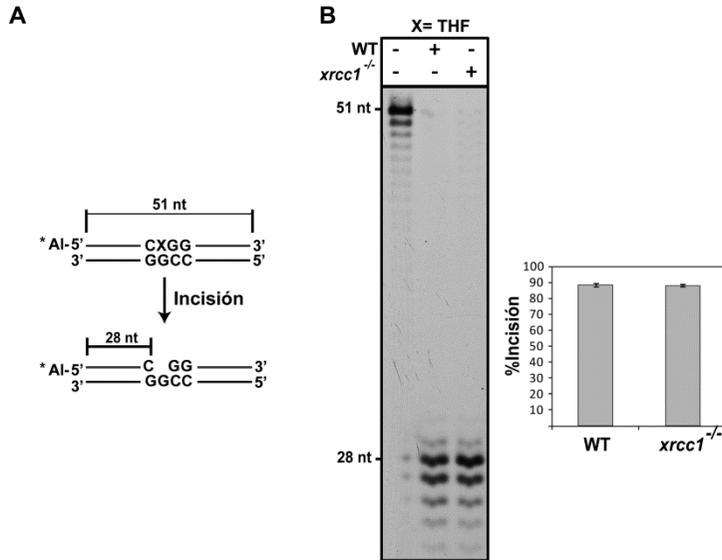
## **6. Las plantas *xrcc1* son menos eficientes en la desmetilación de DNA que las silvestres**

Para analizar la implicación de la proteína XRCC1 en la desmetilación activa de DNA, se incubaron extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> con el producto de reacción de ROS1 y se analizó el producto desmetilado tras digestión enzimática con HpaII. Para la obtención del producto de reacción de ROS1 se incubó la glicosilasa purificada con un sustrato bicatenario conteniendo un residuo de 5-meC (Figura 58A). Las reacciones se realizaron en presencia de los cuatro dNTPs (Figura 58B) o de un único nucleótido, dCTP (Figura 58C), para distinguir entre la desmetilación llevada a cabo por la vía long-patch (LP-BER) y por la vía short-patch (SP-BER). Como se muestra en la Figura 58, y de acuerdo con resultados previos de esta tesis (Figura 37, pág 74), los extractos de *Arabidopsis* son capaces de completar la desmetilación tanto en presencia de dCTP (Figura 58C) como de los cuatro dNTPs (Figura 58B). Sin embargo, las plantas mutantes (Figura 58B y C, carriles 7-9) completaron la desmetilación del sustrato con menor eficiencia que las plantas silvestres (Figura 58B y C, carriles 4-6). Esta disminución en la capacidad de desmetilación de los extractos celulares de *xrcc1*<sup>-/-</sup> se hizo apreciable después de 2-3 h de incubación en condiciones de LP-BER, mientras que sólo se detectó a tiempos de incubación corto en condiciones de SP-BER.



**Figura 58. Análisis de la desmetilación de DNA en extractos de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*.** (A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de desmetilación: un oligonucleótido bicatenario que contiene un residuo de 5-meC en una diana de restricción HpaII, y se encuentra marcado con Alexa-Fluor en el extremo 5' de la cadena complementaria. Se indica el tamaño generado tras digestión con HpaII del producto desmetilado. (B) y (C) Detección del producto de reacción desmetilado. Se incubó el sustrato de DNA (20 nM) con ROS1 (70 nM) a 30°C durante 8 horas. Los productos de reacción se purificaron y se incubaron con extractos celulares (35 µg) de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> en presencia de dNTPs (B) o únicamente de dCTP (C). Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas). Los productos de reacción se digirieron con HpaII, se separaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra los valores de la media y el error estándar de dos experimentos independientes WT (rombos) y *xrcc1*<sup>-/-</sup> (cuadrados).

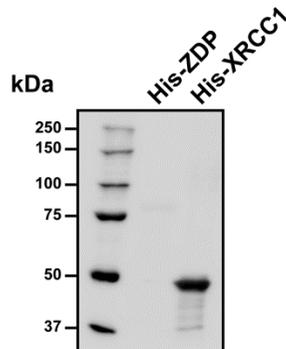
Para confirmar que esta menor eficiencia no se debía a una diferencia en la calidad de los extractos, se realizó un ensayo control para detectar la incisión en un oligonucleótido bicatenario con un sitio abásico sintético (THF, tetrahidrofurano) (Figura 59). Los resultados indicaron que los dos tipos de extracto procesan el sitio abásico con la misma eficacia, y por tanto la deficiencia observada durante la desmetilación en los extractos de mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> se debe a un defecto específico.



**Figura 59. Análisis de la actividad endonucleasa en extractos de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup>.** (A) Diagrama esquemático de la molécula usada como sustrato en el ensayo de incisión: un oligonucleótido bicatenario que contiene un sitio abásico (THF) en la cadena cuyo extremo 5' está marcado con Alexa-Fluor. Se incubó el sustrato de DNA (20 nM) con extractos celulares (35 µg) de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> durante 3 horas a 30°C. Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra un gel representativo. El gráfico de la derecha muestra los valores de la media y el error estándar de dos experimentos independientes

Puesto que las plantas mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> muestran disminuida la capacidad de generar productos desmetilados, se buscaron pruebas adicionales que XRCC1 de la implicación en el proceso de desmetilación. Para ello, se bloqueó la acción de XRCC1 mediante el uso de un anticuerpo que reconoce a la proteína XRCC1 de *Oryza Sativa* (anti-OsXRCC1) (Uchiyama et al., 2008). En primer lugar, y para confirmar que este anticuerpo también reconoce de forma específica la proteína XRCC1 de *Arabidopsis*, se realizó un ensayo Western con proteínas

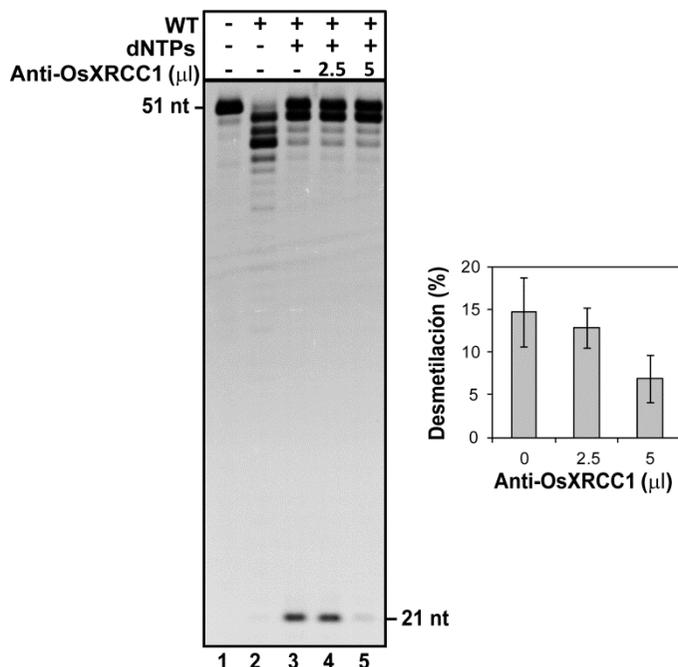
recombinantes. Como se muestra en la Figura 60 el anticuerpo se une de forma específica a XRCC1 de *Arabidopsis* (45,8 kDa), pero no a la proteína ZDP (80 kDa) utilizada como control.



**Figura 60. Detección de His-XRCC1 por Western.** Se usó anticuerpo frente OsXRCC1 para detectar His-XRCC1 (0,5  $\mu$ g). La proteína His-ZDP (0,5  $\mu$ g) se usó como control. El primer carril contiene una mezcla de proteínas con distintos tamaños cuyos pesos moleculares se indican a la izquierda.

Tras comprobar la especificidad del anticuerpo se incubaron extractos celulares de plantas silvestres y mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> con el producto de reacción de ROS1 en ausencia o en presencia de suero anti-OsXRCC1 y se analizó el producto desmetilado tras digestión enzimática con HpaII (Figura 61). Los datos mostraron que al aumentar la cantidad de anticuerpo (Figura 61, carril 4 y 5) la cantidad de producto desmetilado fue menor.

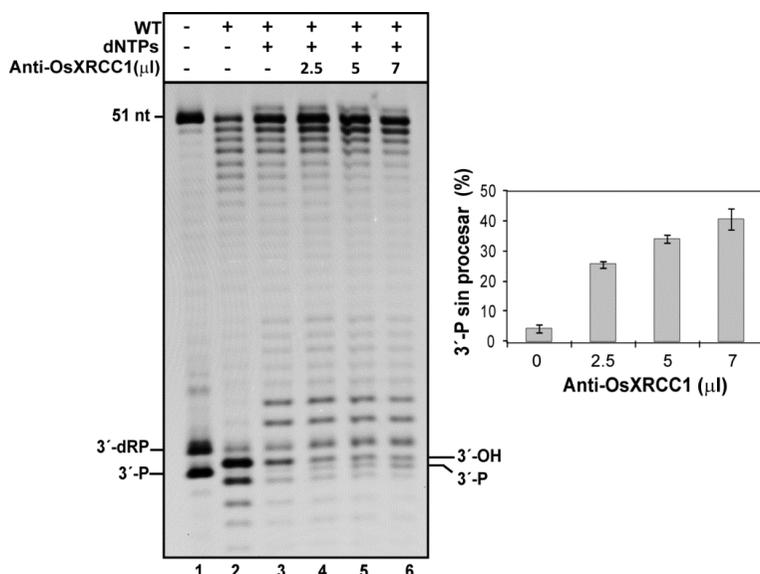
Estos resultados apoyan la hipótesis de que la proteína XRCC1 es necesaria para un nivel óptimo de procesamiento de los intermediarios de DNA generados en la ruta de desmetilación.



**Figura 61. Inhibición de la desmetilación en extractos celulares en presencia de anti-OsXRCC1.** Detección del producto de reacción desmetilado. Se incubó el sustrato de DNA (20 nM) (un oligonucleótido bicatenarios que contiene un residuo de 5-meC en una diana de restricción HpaII y está marcados con Alexa-Fluor en la cadena complementaria, ver Figura 58A), con ROS1 (70 nM) a 30°C durante 8 horas. Los productos de reacción se purificaron e incubaron con extractos celulares de plantas silvestres (35 μg) a 30°C durante 3 horas en presencia dNTPs y de cantidades crecientes de anti-OsXRCC1 (0, 2,5 y 5 ml). Los productos se digirieron con HpaII, se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de desmetilación observado en presencia de diferentes cantidades de antisuero. Se indica la media y el error estándar de dos experimentos independientes

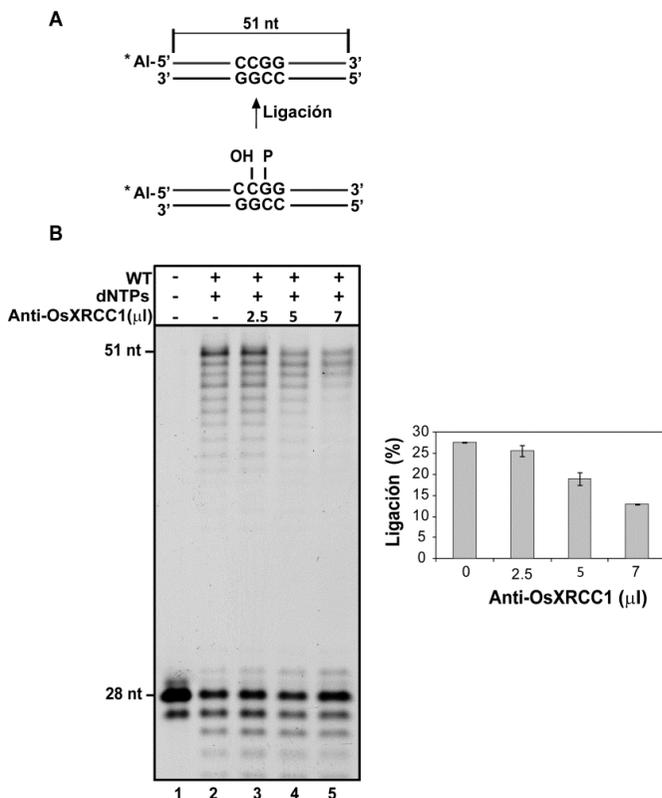
A continuación se examinó si la adición de anti-OsXRCC1 afecta al procesamiento correcto de los intermediarios de desmetilación. Para ello se incubó ROS1 con sustratos bicatenarios marcados en el extremo 5' de la cadena que contiene el residuo de 5-meC (Figura 38A). Los productos de reacción, que son una mezcla de  $\beta$  (3'-dRP) y  $\beta,\delta$ -eliminación (3'-P) (Figura 62, carril 1), se incubaron con extractos celulares de plantas silvestres en presencia de dNTPs y de cantidades crecientes de anti-OsXRCC1. Consistente con nuestras observaciones previas (ver Figura 38, pág 75), los datos mostraron que los extractos de plantas silvestres procesaban eficazmente tanto el aldehído insaturado como el fosfato del extremo 3' del hueco mono-nucleotídico

generando un extremo 3'-OH (Figura 62, carril 2) y pequeños fragmento probablemente procedentes de la degradación por exonucleasas presentes en el extracto. Cuando se añadió dNTPs a la reacción, el extremo 3'-OH fue usado para insertar hasta 3 nucleótidos (Figura 62, carril 3). Sin embargo, la adición de cantidades crecientes de anti-OsXRCC1 produjo la acumulación de extremos 3'-P sin procesar (Figura 62, carriles 4-6 y gráfica de la derecha). Ya que la actividad 3'fosfatasa de ZDP es la única detectable en extractos celulares de *Arabidopsis* (Figura 36, pág 72), estos resultados indican que la función de ZDP durante la desmetilación del DNA es parcialmente dependiente de XRCC1. Además, estos datos apoyan la idea de que ZDP y XRCC1 interactúan durante el procesamiento del extremo bloqueado 3'-P.



**Figura 62. Inhibición del procesamiento de extremos 3'-P en presencia de anti-OsXRCC1.** Se incubaron oligonucleótidos bicatenarios marcados en el extremo 5' de la cadena que contiene el residuo de 5-meC (20 nM)(Figura 38A) con ROS1 (70 nM) a 30°C durante 8 horas. Los productos de reacción se purificaron e incubaron con extractos celulares de plantas silvestres (35 μg) a 30°C durante 3 horas en presencia de dNTPs y de cantidades crecientes de suero anti-OsXRCC1 (0, 2,5, 5 y 7 μl). Los productos se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra un gel representativo. El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de DNA con extremos 3'-P sin procesar detectado en presencia de diferentes cantidades de antisuero. Se indica la media y el error estándar de dos experimentos independientes

Finalmente, se decidió investigar si XRCC1 desempeña algún papel durante la etapa de ligación, que constituye la última fase de la ruta y completa el proceso de desmetilación del DNA. Para ello se incubaron extractos celulares de plantas silvestres con oligonucleótidos bicatenarios que contienen un corte de cadena sencilla y se analizó su capacidad de procesar este sustrato en presencia de cantidades crecientes de anticuerpo anti-OsXRCC1 (Figura 63).



**Figura 63. Inhibición de la ligación de una rotura de cadena sencilla en presencia de anti-OsXRCC1.** (A) Diagrama esquemático del sustrato de DNA usado en el ensayo de ligación: un oligonucleótido bicatenario que contiene una rotura con extremos 3´-OH y 5´-P en la cadena cuyo extremo 5´ está marcado con Alexa-Fluor. (B) Se incubó el sustrato de DNA (20 nM) con extractos celulares de plantas silvestres (35 μg) a 30°C durante 3 horas en presencia de dNTPs y de cantidades crecientes de suero anti-OsXRCC1 (0, 2,5, 5 y 7 μl). Los productos de reacción se separaron en un gel desnaturalizante de poliácridamida al 12% y se detectaron por fluorescencia. Se muestra un gel representativo. El gráfico de la derecha muestra el porcentaje de producto reparado en presencia de diferentes cantidades de anti-OsXRCC1.

Los datos revelaron que a concentraciones crecientes de anticuerpo se detecta un nivel de producto reparado (51 nt) significativamente menor, lo que indica una clara disminución de la capacidad de ligación.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que XRCC1 participa en diferentes etapas de la ruta de desmetilación, incluyendo al menos la iniciación catalizada por ROS1, el procesamiento de los intermediarios con extremos 3´-P catalizada por ZDP, y el paso final de ligación que sella la cadena procesada.

## **DISCUSIÓN**



La metilación del DNA es una modificación epigenética frecuente en el genoma de plantas y animales. La presencia de residuos de 5-metilcitosina (5-meC) reprime la transcripción, al impedir que factores activadores se unan a sus secuencias diana, y al favorecer la interacción con factores represores que a su vez potencian la formación de cromatina inactiva (Bird and Wolffe, 1999). Los patrones de metilación desempeñan un papel esencial en el desarrollo y en la defensa del genoma frente a elementos transponibles (Zilberman, 2008), y su alteración está relacionada con diversas patologías, incluyendo el desarrollo de tumores en humanos (Esteller, 2007). La metilación del DNA es un proceso reversible, y por tanto los niveles de 5-meC y los patrones de metilación en el genoma son el resultado dinámico de la acción combinada de mecanismos de metilación y desmetilación.

La desmetilación activa del DNA contrarresta el silenciamiento transcripcional de algunos genes y es esencial para un desarrollo normal en animales y plantas. Aunque los mecanismos de metilación del DNA se encuentran bien caracterizados, los procesos mediante los cuales las células desmetilan su genoma no se conocen con tanta exactitud. En células animales, y a pesar de los numerosos intentos por caracterizar los mecanismos de demetilación activa, su naturaleza enzimática sigue siendo controvertida (Kress et al., 2001; Wolffe et al., 1999). Sin embargo, estudios recientes sugieren que al menos uno de los mecanismos de desmetilación activa del DNA puede ser mediado por la ruta de reparación por escisión de bases (Base Excision Repair, BER), aunque la 5-meC debe ser procesada por Tet1 y/o desaminasas antes de que las DNA glicosilasas puedan actuar (Gong and Zhu, 2011; Guo et al., 2011; Popp et al., 2010; Rai et al., 2008).

En plantas, por el contrario, los avances han sido mayores. Estudios genéticos y bioquímicos en *Arabidopsis* han revelado que las proteínas de la familia DML (ROS1, DME, DML2 y DML3) funcionan como desmetilasas de DNA y realizan la desmetilación activa mediante un proceso análogo a la reparación por escisión de bases. (Agius et al., 2006; Choi et al., 2002; Gehring et al., 2006; Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006). La caracterización bioquímica de estas proteínas ha demostrado que son DNA glicosilasas bifuncionales que eliminan la 5-meC como base libre, y a continuación rompen el esqueleto azúcar-fosfato del DNA mediante una  $\beta,\delta$ -eliminación dejando un hueco flanqueado por extremos 5'-P y 3'-P (Morales-Ruiz et al., 2006). La hipótesis aceptada hasta el momento es que estas DNA glicosilasas catalizan la etapa

inicial de una ruta de escisión de 5-meC, y que dicha ruta debe incluir enzimas adicionales que completen el procesamiento de la cadena afectada y permitan sustituir la 5-meC por una citosina no metilada. El objetivo principal de esta tesis ha sido identificar algunas de las principales proteínas participantes en esta ruta de desmetilación activa del DNA en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos indican que ZDP y XRCC1 son dos componentes de la ruta de desmetilación activa de DNA iniciada por ROS1.

## **1. La fosfatasa ZDP actúa con posterioridad a ROS1 en una ruta de desmetilación activa del DNA en plantas**

En esta tesis se aportan diversas pruebas experimentales de que ZDP, una fosfatasa de DNA, actúa con posterioridad a ROS1 en una ruta de desmetilación activa del DNA en *Arabidopsis*. La función bioquímica principal de ZDP en esta ruta es procesar parte de los productos generados tras la incisión catalizada por ROS1. En concreto, ZDP convierte el extremo 3'-fosfato (3'-P) de los productos surgidos por  $\beta,\delta$ -eliminación en un extremo 3'-hidroxilo (3'-OH) que puede ser usado por una DNA polimerasa en la siguiente etapa de la ruta. Sin embargo, ZDP no procesa el extremo aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-dRP) presente en aquellos productos de ROS1 que sólo han sufrido una  $\beta$ -eliminación (Figura 23). Una situación equivalente se ha observado en células de mamífero con la proteína polinucleótido quinasa 3'-fosfatasa (PNK), que no presenta actividad sobre extremos 3'-dRP generados por una DNA glicosilasa bifuncional tras una  $\beta$ -eliminación (Wiederhold et al., 2004).

ZDP interacciona con ROS1 *in vitro*, y en esta interacción es necesario el dominio catalítico discontinuo de ROS1 (Figura 28) característico de las desmetilasas de la familia DML (Ponferrada-Marín et al., 2011). La interacción con ZDP conlleva además una estimulación de la actividad de ROS1 que puede ser relevante para su eficiencia catalítica en la planta. Los loci que desmetila ROS1 *in vivo* contienen múltiples residuos de 5-meC y muchos de estos residuos se encuentran próximos entre sí (Gong et al., 2002; Zhu et al., 2007). Sin embargo, la actividad enzimática de ROS1 *in vitro* es muy poco procesiva, ya que tras la eliminación de la 5-meC la enzima permanece fuertemente unida al producto de la reacción (Ponferrada-Marín et al., 2010; Ponferrada-Marín et al.,

2009). Mediante el uso de sustratos con varios residuos de 5-meC, en este trabajo se ha demostrado que ZDP incrementa la procesividad de ROS1 *in vitro* (Figura 30). Además, ZDP también estimula la actividad enzimática de ROS1 sobre sustratos que contienen un residuo de 5-meC (Figura 31). Dos observaciones sugieren que ZDP puede incrementar la procesividad promoviendo la separación de ROS1 de su producto de reacción, liberando a la enzima del DNA y dejándola disponible para sucesivos ciclos catalíticos. En primer lugar, para un sustrato que contiene varios residuos de 5-meC, en presencia de ZDP el incremento en el producto de incisión final es mayor que el obtenido para los productos de incisión intermedios (Figura 30). En segundo lugar, los ensayos de retardo en gel mostraron que ZDP disminuye la formación del complejo insoluble formado entre ROS1 y su producto de reacción (Figura 29). Al igual que ocurre con otros mecanismos de reparación de DNA, los diferentes pasos del proceso de desmetilación *in vivo* deben estar fuertemente coordinados. Esta coordinación es probablemente esencial para impedir la acumulación de intermediarios potencialmente citotóxicos durante el proceso de desmetilación. La interacción física entre ZDP y ROS1 podría contribuir a esta coordinación que garantiza que el proceso de desmetilación ocurra correctamente.

Por otro lado, mediante el uso de extractos celulares de *Arabidopsis* se ha demostrado que ZDP es la mayor, si no la única, actividad 3'-fosfatasa detectada en los extractos de la planta, y que dicha actividad es necesaria para completar el procesamiento de parte de los intermediarios de desmetilación de DNA generados por ROS1. (Figura 36 y Figura 37). Otros datos importantes encontrados durante el desarrollo de esta tesis son que en la ruta de desmetilación dependiente de ROS1 y ZDP, la sustitución de la 5-meC por una citosina no metilada puede llevarse a cabo mediante la inserción de un solo nucleótido (short-patch BER) o de varios (long-patch BER) (Figura 37) como ya se había mostrado para otras modificaciones del DNA, como uracilo o sitios abásicos (Córdoba-Cañero et al., 2010; Córdoba-Cañero et al., 2009). La existencia de dos rutas alternativas para el relleno del hueco y la ligación, expanden el número potencial de proteínas, particularmente DNA polimerasas, que podrían participar en los eventos de post-incisión que tienen lugar durante la desmetilación activa de DNA mediada por BER. En células de mamífero, los huecos generados durante la escisión de bases son rellenados por la DNA polimerasa  $\beta$ , pero *Arabidopsis* carece de un ortólogo de esta enzima. Sin

embargo, se ha propuesto que su papel puede ser desempeñado por otro miembro de la familia X de DNA polimerasas, denominado pol  $\lambda$  (AtPOLL) (Britt, 2002; Garcia-Diaz et al., 2000).

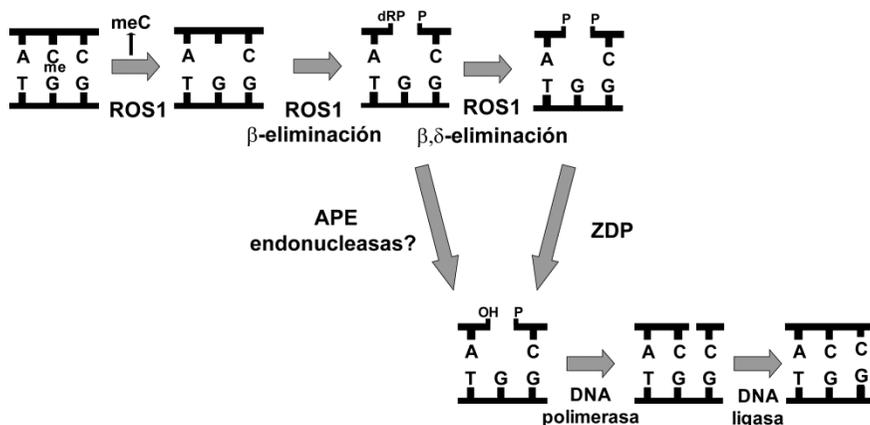
## **2. Papel de ZDP en la prevención del silenciamiento transcripcional**

Al igual que los mutantes *ros1* (Gong et al., 2002), los mutantes *zdp* mostraron hipermetilación y silenciamiento transcripcional (TGS) de un transgen generador de pequeños RNAi y del gen endógeno homólogo (Figura 42). Además, estos mutantes presentaron un aumento en los niveles de metilación del DNA en más de 400 loci alrededor del genoma (Figura 45). Al igual que en el caso de los mutantes *ros1* y mutantes triples *rd* (Lister et al., 2008; Penterman et al., 2007b; Zhu et al., 2007), las regiones hipermetiladas son en su mayoría transposones (85,8%), aunque también se encuentran representadas algunas regiones génicas (9,4%) e intergénicas (4,8%) (Figura 45D). Estos resultados sugieren que, al igual que ROS1, ZDP podría funcionar para contrarrestar la robusta maquinaria de metilación del DNA que reconoce y silencia transposones aunque también afecta a la expresión de determinados genes.

De hecho, los niveles de expresión de ROS1 y ZDP se correlacionan con el estado de metilación del genoma de la planta. Por ejemplo, en mutantes en la DNA metiltransferasa de mantenimiento MET1, donde la metilación del DNA disminuye drásticamente (Lister et al., 2008), la presencia de mRNA de *ROS1* es prácticamente indetectable. De forma similar, en mutantes de la ruta de metilación del DNA dirigida por RNA (RdDM) tales como, *nrpd1a*, *rdr2*, *dcl2*, y *drm2*, *drd1*, *nrpd2a*, *nrpd1b* y *ago6* los niveles de mRNA de *ROS1* son muy bajos (Huettel et al., 2006; Mathieu et al., 2007; Zheng et al., 2008). Al igual que *ROS1*, la expresión de *ZDP* también se ve reducida en mutantes *met1* y en mutantes de la ruta RdDM (Martínez-Macías et al., 2012), sugiriendo una fuerte coordinación entre los mecanismos de metilación y desmetilación del DNA.

### 3. Rutas alternativas en la desmetilación activa del DNA

En el transcurso de esta tesis se han obtenido y analizado plantas homocigóticas para la inserción de T-DNA en el gen *ZDP*. A diferencia de los mutantes *dme*<sup>+/-</sup> y *ros1*<sup>-/-</sup>, que presentan un fenotipo pleiotrópico con alteraciones severas en el desarrollo (Choi et al., 2002; Gong et al., 2002; Morales-Ruiz et al., 2006) y a pesar de su importancia como factor que actúa con posterioridad a ROS1 (y probablemente a DME, DML2, y DML3) en la desmetilación activa de DNA, las plantas mutantes en *ZDP* no muestran ninguna alteración fenotípica obvia, al menos, bajo condiciones de crecimiento normales. Una posible explicación es que las inserciones de T-DNA en los alelos 14 y 15 generen alelos extremadamente hipomórficos, pero no nulos. Además, aunque no hay secuencias parecidas a *ZDP* en el genoma de *Arabidopsis*, no se puede excluir la posibilidad de que otra enzima con una actividad fosfatasa similar a la de *ZDP* se exprese de forma específica en la célula central del gametofito femenino y funcione junto a DME en el proceso de desmetilación. Sin embargo, otra posible explicación es la existencia de rutas alternativas que pueden tener lugar tras el primer paso de eliminación de la 5-meC, y que no requieran una actividad 3'-fosfatasa (Figura 64). En este sentido, es conveniente recordar que algunos de los productos generados por ROS1 *in vitro* no se procesan hasta una  $\beta,\delta$ -eliminación (3'-P), y sólo sufren una  $\beta$ -eliminación que genera un extremo aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (3'-dRP) (Figura 20). En bacterias y mamíferos las endonucleasas apurínicas-apirimidínicas (APEs) son las principales encargadas de procesar estos extremos para generar 3'-OH (Demple and Harrison, 1994; Pascucci et al., 2002). El genoma de *Arabidopsis* codifica para tres proteínas homólogas de APE endonucleasas. Una de ellas (Ape2) es similar a la endonucleasa APE2 humana, y las otras dos (Ape1L y ARP) son similares a la principal AP endonucleasa en humanos APE1. Solo ARP ha sido caracterizada bioquímicamente y se ha demostrado que realiza incisiones en DNA con sitios abásicos (Babiychuk et al., 1994) y que constituye la mayor actividad AP endonucleasa detectada en extractos celulares de *Arabidopsis* (Córdoba-Cañero et al., 2011). Sin embargo, los datos obtenidos en esta tesis indican que el procesamiento de los extremos 3'-dRP generados por ROS1 no requiere la proteína ARP. No puede descartarse que Ape2 y/o Ape1L lleven a cabo este procesamiento, o que exista un mecanismo enzimático alternativo todavía desconocido.



**Figura 64. Rutas alternativas de procesamiento de la rotura de cadena simple generada por ROS1.**

Los loci cuya metilación se ha analizado en este trabajo pueden agruparse en tres categorías que podrían reflejar el uso de diferentes rutas alternativas para el procesamiento del extremo 3' bloqueado generado por ROS1. El grupo I, representado por *ZDP409* (Figura 46B), es dependiente de ZDP y los niveles de metilación son similares en plantas mutantes *zdp-1* y *rdd*. El grupo II, representado por *ZDP398*, en la que están implicados tanto mecanismos de desmetilación ZDP-dependientes como ZDP-independientes, muestran una hipermetilación menos severa en mutantes *zdp-1* que en mutantes *rdd* (Figura 46A). Por último grupo III, representados por el loci, *ZDP414* (Figura 46D), que solo muestran hipermetilación en el mutante *rdd* sugiriendo que los mecanismos de desmetilación en estos loci siguen procesos independientes de ZDP.

Varios autores han identificado modelos alternativos para la reparación de bases dañadas en el DNA. Por ejemplo, un modelo de rutas alternativas se ha propuesto para la reparación de bases oxidadas en células de mamíferos. La 8-oxoguanina puede ser reparada por una vía dependiente de OGG1/APE1 donde OGG1 cataliza una β-eliminación que genera un extremo 3'-dRP que posteriormente es convertido en 3'-OH por APE1, o bien por la vía NEIL/PNK-dependiente, donde NEIL procesa el producto generado por OGG1 mediante β,δ-eliminación generando un extremo 3'-P que es posteriormente procesado por PNK (Wiederhold et al., 2004). Los datos obtenidos en esta tesis indican que mecanismos similares a los observados en la reparación de daños en mamíferos podrían ocurrir durante la desmetilación activa en plantas.

## 4. ZDP, un nuevo factor de desmetilación

Otra prueba importante aportada en este trabajo de la implicación de ZDP en la desmetilación activa de DNA es su colocalización en focos nucleoplásmicos con los dos factores de desmetilación conocidos hasta la fecha, ROS1 y ROS3 (Figura 47). Por otra parte, esta observación es consistente con los datos encontrados de interacción física *in vitro* entre ZDP y ROS1. Por lo que se sabe hasta la fecha, parece que las DNA desmetilasas y sus reguladores no se encuentran distribuidos uniformemente por el núcleo. ROS1 y ROS3 se localizan en focos discretos del nucleoplasma que no se corresponden con regiones cromocéntricas, donde la metilación del DNA es más abundante (Zheng et al., 2008). Una fracción de ROS1 y ROS3 se encuentra en el nucleolo, lo que sugiere que la demetilación activa de DNA puede estar implicada en la regulación epigenética de genes de rRNA (Preuss and Pikaard, 2007). Sin embargo, y a diferencia de ROS1 y ROS3, ZDP no se encuentra en el nucléolo. Esto sugiere que los loci procesados por mecanismos dependientes de ZDP (grupos I y II) son desmetilados en el nucleoplasma, mientras que los que son desmetilados en el nucléolo podrían ser procesados por mecanismos independientes de ZDP. Probablemente en estos loci nucleolares las desmetilasas procesen el extremo 3' hasta  $\beta$ -eliminación más que hasta  $\beta,\delta$ -eliminación.

## 5. Papel de ZDP en la reparación de daños en el DNA

La hipersensibilidad de los mutantes *zdp*<sup>-/-</sup> a metilmetanosulfonato (MMS) (Figura 35) sugiere que, además de su papel en la desmetilación del DNA, ZDP también participa en la reparación de roturas de cadena simple (SSBs), generadas directamente por agentes mutágenos o bien surgidas como intermediarios de la reparación, como ya se había sugerido anteriormente (Petrucco et al., 2002). El MMS no causa directamente roturas de cadena de DNA, pero genera bases metiladas que son reparadas por la ruta BER. Las enzimas que inician esta reparación son DNA glicosilasas de N-metilpurinas (Mitra and Kaina, 1993). El genoma de *Arabidopsis* codifica para varios homólogos de N-metilpurina DNA glicosilasas, y al menos uno de ellos, una 3-meA DNA glicosilasa, ha sido caracterizado con cierto detalle. Esta proteína complementa la sensibilidad a MMS de un doble mutante en *E. coli tag alk*

(Santerre and Britt, 1994). El hecho de que los mutantes *zdp* sean hipersensibles a MMS sugiere que la reparación de las bases metiladas en *Arabidopsis* puede llevarse a cabo por un mecanismo dependiente de glicosilasas N-metilpurina y de ZDP. En células de mamífero se ha propuesto un mecanismo similar para la reparación de lesiones inducidas por MMS, mediado por la DNA glicosilasa/liasa NEIL y la 3'-DNA fosfatasa PNK (Wiederhold et al., 2004). Células de mamíferos deficientes en PNK o NEIL son sensibles a radiaciones y MMS. Al igual que ocurre en mamíferos, una ruta iniciada por DNA glicosilasas y continuada por la 3'-DNA fosfatasa ZDP puede ser importante *in vivo* para reparar daños causados por compuestos alquilantes y otros agentes genotóxicos.

## **6. XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP y modula su actividad enzimática**

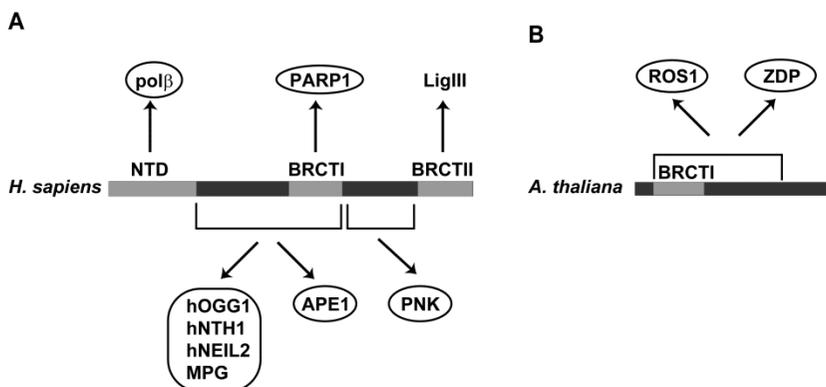
El hallazgo de múltiples interacciones entre las diferentes proteínas implicadas en la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación de roturas de cadena simple (SSBR) atestigua la importancia de la coordinación de los diferentes pasos de ambas rutas reparadoras. En particular, en células de mamífero, la proteína XRCC1 desempeña un papel central en la coordinación de las actividades enzimáticas en BER y SSBR. Los ratones *xrcc1*<sup>-/-</sup> mueren en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Tebbs et al., 1999), y las células que carecen de una proteína XRCC1 funcional son hipersensibles a radiaciones ionizantes, estrés oxidativo y agentes alquilantes (Thompson et al., 1990; Thompson and West, 2000). Esta sensibilidad se acompaña de una elevada inestabilidad genética con una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas y deleciones (Thompson and West, 2000). Además, también se han asociado polimorfismos de XRCC1 con la aparición de tumores (Hu et al., 2002; Ladiges et al., 2003; Seedhouse et al., 2002; Smith et al., 2003). Todas estas observaciones demuestran el papel esencial de XRCC1 en el mantenimiento de la capacidad de reparación del DNA en células de mamífero.

En plantas se han identificado ortólogos de XRCC1 en *Arabidopsis* (Taylor et al., 2002) y en arroz (Uchiyama et al., 2008). La proteína XRCC1 de arroz (OsXRCC1) se une tanto a roturas de cadena simple como roturas de cadena doble y además interactúa *in vivo* con PCNA (Uchiyama et al., 2008). Un estudio

reciente llevado a cabo en raíces de mutantes *xrcc1* y *ku80* irradiadas con rayos  $\gamma$  ha demostrado la existencia de una ruta de reparación de roturas de cadena doble (DSB) dependiente de XRCC1 en *Arabidopsis* (Charbonnel et al., 2010).

En esta tesis se han encontrado pruebas de la implicación de XRCC1 en la ruta de desmetilación del DNA iniciada por la DNA glicosilasa ROS1 en *Arabidopsis*. En concreto, mediante el uso de proteínas recombinantes se ha demostrado que XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP *in vitro* (Figura 48 y Figura 50). La interacción física de XRCC1 con ambas proteínas podría ayudar a coordinar el orden y la progresión de los diferentes eventos que tienen lugar durante la desmetilación del DNA, al igual que ocurre con otros procesos de reparación (Campalans et al., 2005), con el fin de prevenir una reparación incompleta o la exposición del sustrato a una nueva lesión.

La capacidad de XRCC1 de actuar como proteína de andamiaje viene dada por la presencia de dominios de interacción proteína-proteína del tipo BRCT (BRCA1 carboxy-terminal). La proteína XRCC1 de humanos posee dos dominios BRCT (BRCTI y BRCTII) que están localizados en la región central y carboxi-terminal de la proteína, respectivamente, y de un dominio conservado en la porción amino terminal (NTD) (Bork et al., 1997; Callebaut and Mornon, 1997). Cada uno de estos dominios es importante para la interacción de XRCC1 con diferentes proteínas de BER y SSBR. El dominio BRCTII media la interacción con LigIII (Caldecott et al., 1994), el dominio NTD participa en la interacción con pol  $\beta$  (Caldecott et al., 1996) y el dominio BRCTI y la región que lo precede modula la interacción con varias DNA glicosilasas, APE1 y PARP1 (Caldecott et al., 1996; Marsin et al., 2003). En la región que separa los dos dominios BRCT se encuentra un cluster de aminoácidos fosforilados por CK2, y que participa en la interacción con PNK (Breslin and Caldecott, 2009; Loizou et al., 2004). El dominio BRCTII está conservado en mamíferos, pero no en otros organismos como *Drosophila melanogaster* o *Arabidopsis thaliana*. Por el contrario, el dominio BRCTI está presente en todos los homólogos de XRCC1 identificados hasta ahora (Taylor et al., 2002). La ausencia de los dominios BRCTII y NTD en la proteína XRCC1 de *Arabidopsis* sugiere que en las interacciones con ROS1 y ZDP podría intervenir el dominio BRCTI y/o la zona que sigue a este dominio, que conserva el cluster de aminoácidos fosforilados por CK2 (Loizou et al., 2004) (Figura 65).



**Figura 65. Dominios de interacción de XRCC1.** (A) Diagrama con los dominios de interacción de XRCC1 de humanos con proteínas de BER. (B) Diagrama con un posible modelo de interacción de XRCC1 de *Arabidopsis* con proteínas implicadas en la desmetilación del DNA.

En esta tesis también se ha demostrado que XRCC1 estimula la actividad desmetilasa de ROS1 (Figura 54) y la actividad fosfatasa de ZDP (Figura 53) *in vitro*, y esta estimulación enzimática podría resultar en un proceso de desmetilación más eficiente. En células de mamífero XRCC1 interacciona y modula la actividad de varias DNA glicosilasas como hOGG1 (Marsin et al., 2003), hNEIL1 (Wiederhold et al., 2004), hNTH1, MPG (Campalans et al., 2005). XRCC1, también, estimula la actividad fosfatasa y quinasa de PNK (polinucleótido quinasa 3'-fosfatasa), acelerando la reparación de roturas de cadena simple. (Whitehouse et al., 2001). A pesar de que XRCC1 estimula la actividad de ROS1, no aumenta su procesividad, lo que sugiere que no incrementa la tasa de recambio de la enzima. Una posibilidad es que XRCC1 estabilice el complejo de ROS1 con su sustrato. Los datos previamente publicados (Ponferrada-Marín et al., 2010) indican que el primer contacto de ROS1 con el DNA tiene lugar de forma inespecífica, es decir, independientemente de la presencia o no de 5-meC en la zona de contacto, y que a continuación la enzima se desliza aleatoriamente y de forma pasiva sobre la molécula en busca de su base diana. En ambas fases, la región básica del extremo N-terminal probablemente desempeñe un papel fundamental, proporcionando a ROS1 la capacidad de unirse al DNA de forma no específica y permitiendo a la proteína escanear la molécula en una difusión unidimensional, concediéndole una amplia oportunidad de reconocer y eliminar la 5-meC (Ponferrada-Marín et al., 2010).

La idea de que XRCC1 actúa como proteína de andamiaje, no sólo para las enzimas de BER y SSB, sino también para los sustratos e intermediarios de DNA, ha sido apoyada por varios estudios, como por ejemplo, uno basado en la reparación de bases oxidadas y alquiladas en células de mamífero en el que XRCC1 es reclutada al sitio del daño mediante su interacción con las DNA glicosilasas y posteriormente acompaña al sustrato de DNA en todo el proceso de reparación. En este modelo el DNA es transferido de un complejo proteico al siguiente en la ruta de reparación (Campalans et al., 2005). Apoyando esta idea, además de la interacción observada de XRCC1 con dos de las proteínas de la ruta de desmetilación, en este trabajo se ha demostrado que XRCC1 de *Arabidopsis* se une al sustrato (oligonucleótido metilado), intermediario (oligonucleótido conteniendo un hueco flanqueado por grupos fosfato) y producto de la desmetilación del DNA (oligonucleótido con un par CG). (Figura 51). Además la unión de XRCC1 al producto de una actividad AP endonucleasa (oligonucleótido que contiene un extremo 5'-dRP) (Figura 52) sugiere la unión de XRCC1 o otros intermediarios de DNA generados durante la ruta BER, en particular aquel generado por una actividad AP endonucleasa. Esto ya se ha demostrado para XRCC1 de mamíferos, que se une a varios intermediarios de DNA de BER, como los sitios abásicos generados por hOGG1 o incisiones generadas por APE1 (Nazarkina et al., 2007). Todos estos datos sugieren que XRCC1 podría ser dirigida hacia el sitio de desmetilación mediante su interacción con ROS1 y podría coordinar el paso siguiente mediante interacción con ZDP. Además, XRCC1 podría dirigir la transferencia de sustrato de DNA desde la desmetilasa hacia la fosfatasa y así como en sucesivas etapas de la ruta.

## **7. XRCC1 participa en varias etapas de la ruta de desmetilación de DNA iniciada por ROS1**

En esta tesis se ha trabajado con plantas homocigóticas para una inserción de T-DNA en el gen *XRCC1*. Estos mutantes presentan hipersensibilidad a rayos  $\gamma$  y defectos en la reparación de roturas de cadena doble (DSBs) (Charbonnel et al., 2010). Además, datos obtenidos en este trabajo muestran que los mutantes *xrcc1*<sup>-/-</sup> presentan un ligero retraso en la desmetilación en comparación con las plantas silvestres (Figura 58). La inserción de T-DNA se localiza en el intrón 5 y afecta al procesamiento correcto del RNA mensajero, produciendo probablemente una proteína truncada en el extremo carboxilo. De ser así, dicha

proteína truncada contendría intacto el dominio BRCTI, que es fundamental para la función de XRCC1 y se localiza en la parte amino-terminal de la proteína (Taylor et al., 2002). (Figura 65). Sin embargo, carecería de un cluster conservado de ocho residuos serina/treonina fosforilables por CK2, que se encuentra en la zona que sigue al dominio BRCTI (Loizou et al., 2004). En mamíferos esta fosforilación favorece la interacción de XRCC1 con PNK facilitando la reparación de SSB *in vitro* e *in vivo* (Breslin and Caldecott, 2009; Loizou et al., 2004). La pérdida de alguno de estos sitios de fosforilación provocaría que XRCC1 estuviera deficientemente fosforilada o no fosforilada, lo que podría tener como consecuencia una incorrecta estimulación de la actividad de ZDP y en última instancia, un defecto en el proceso de desmetilación global.

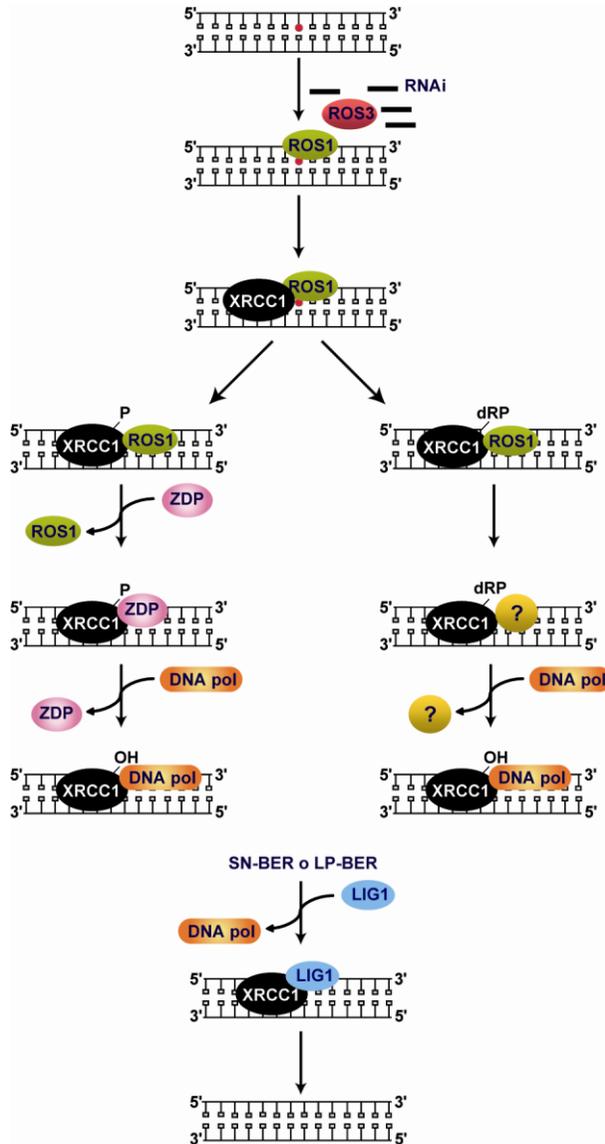
El hecho de que en presencia de un anticuerpo anti-XRCC1 se produzca una disminución en la capacidad desmetilante de extractos celulares de *Arabidopsis* (Figura 61) constituye una prueba adicional de la participación de XRCC1 en la ruta iniciada por ROS1. En concreto, los datos indican que el anticuerpo disminuye indirectamente la actividad 3'-fosfatasa del extracto (Figura 62), lo que sugiere que una de las principales funciones de XRCC1 es interaccionar con ZDP y estimular su actividad fosfatasa. En ese caso, la presencia de XRCC1 evitaría que la actividad fosfatasa de ZDP sea limitante *in vivo*, de manera análoga a su función estimuladora de PNK en células de mamífero, necesaria para una rápida y eficiente reparación de las SSB tras daño por estrés oxidativo (Breslin and Caldecott, 2009).

Los datos obtenidos en esta tesis sugieren que XRCC1 no sólo facilita la excisión/incisión y el procesamiento del extremo 3'-P, sino que participa en la etapa final de la ruta desmetilación. Así, se ha observado que la capacidad de extractos celulares de catalizar la ligación de un corte de cadena sencilla en el DNA disminuye significativamente en presencia de anti-XRCC1 (Figura 63). La implicación de XRCC1 en el paso de ligación durante BER y SSBR en mamíferos está bien documentada. Las células de mamífero contienen tres DNA ligasas: ligasa I (Lig1), ligasa III (Lig3) y ligasa IV (Lig4). XRCC1 interacciona directamente con Lig3 mediante el dominio BCRTII y la estabiliza en un complejo cuya formación es necesaria para una correcta actividad de Lig3 *in vivo* (Caldecott et al., 1996; Caldecott et al., 1994; Caldecott et al., 1995). En plantas no hay un homólogo de Lig3, y la proteína XRCC1 carece de BCRTII. El genoma de *Arabidopsis* codifica para tres ligasas: LIG1, LIG4 y LIG6. LIG1 es el ortólogo de Lig1 (Taylor et al., 1998; Wu et al., 2001). La interrupción del gen

*LIG1* es letal en *Arabidopsis* (Babiychuk et al., 1998), y líneas RNAi-*LIG1* con una expresión reducida de *LIG1* muestran defectos severos en el crecimiento y una reparación más lenta de SSBs y DSBs (Waterworth et al., 2009). *LIG4* es un ortólogo de la proteína de mamíferos Lig4 y funciona en la reparación de DSBs (van Attikum et al., 2003; West et al., 2000). *LIG6* pertenece a una familia de DNA ligasas específicas de plantas (Bonatto et al., 2005), y junto a *LIG4* desempeña un papel importante para la viabilidad y longevidad de las semillas bajo condiciones de germinación adversas (Waterworth et al., 2010). Un estudio reciente ha demostrado que *LIG1* es la principal, si no la única, actividad ligasa detectable en extractos celulares de *Arabidopsis*, y que es necesaria para la reparación de uracilo y sitios abásicos vía BER *in vitro*, así como en general para sellar cortes de cadena sencilla en el DNA, con independencia de su origen (Córdoba-Cañero et al., 2011). Estas observaciones sugieren que probablemente la mayoría de los eventos de tipo BER en *Arabidopsis* son completados por *LIG1*. Tales eventos incluirían el proceso de desmetilación de DNA iniciado por ROS1 y por el resto de proteínas de la familia DML. De hecho, se han encontrado pruebas genéticas de que *LIG1* actúa en un paso posterior a DME durante la desmetilación específica del alelo materno y la impronta génica en el endospermo (Andreuzza et al., 2009). Así pues, el efecto positivo de XRCC1 sobre la actividad DNA ligasa de extractos celulares de *Arabidopsis* observado en esta tesis podría deberse a una interacción directa con *LIG1*. En este sentido, hay que resaltar que estudios recientes en células de mamífero sugieren que en el núcleo la ruta BER XRCC1-dependiente podría usar Lig1, y no Lig3 (Gao et al., 2011; Simsek et al.).

## **8. Un modelo para la ruta de desmetilación activa de DNA en *Arabidopsis***

Los resultados descritos en esta tesis, junto con la información contenida en otros trabajos, permiten proponer un modelo para la ruta de desmetilación activa del DNA iniciada por ROS1 (Figura 66).



**Figura 66. Un modelo para la ruta de desmetilación activa iniciada por ROS1.**  
Para los detalles, ver texto.

ROS1 es probablemente dirigida al sitio de desmetilación por la proteína ROS3 unida a su vez a pequeños RNAi. XRCC1 podría ser reclutada a la zona mediante su interacción con ROS1, y estimularía la actividad de esta última, quizá estabilizando su unión al DNA. Tras la eliminación de la 5-meC, ROS1 genera una rotura de cadena simple con extremos 3'-P y 3'-dRP bloqueantes que deben ser reparados. ZDP es reclutada al hueco en el DNA por su interacción con XRCC1 y ROS1, y procesa el extremo 3'-P generando un

extremo 3'-OH. El extremo 3'-dRP es eliminado por otra proteína todavía no identificada, en una sub-ruta independiente de ZDP, pero en la que posiblemente también participe XRCC1. Una vez generados los extremos 3'-OH convencionales, el proceso de desmetilación continúa por la vía SP-BER o por la vía LP-BER, donde una o más DNA polimerasas, todavía no identificada(s), incorpora(n) un nucleótido o varios, respectivamente. Finalmente la cadena es sellada por acción de LIG1. XRCC1 coordina al menos tres pasos de la ruta: excisión/incisión, defosforilación y ligación, aunque probablemente, y al igual que ocurre en mamíferos con otros procesos de BER/SSBR, se encuentre formando complejos proteicos coordinando cada etapa del proceso.



## **CONCLUSIONS**



1. ZDP functions downstream of ROS1 in one branch of the active DNA demethylation pathway.
2. A deficiency in ZDP disrupts the demethylation pathway leading to a hypermethylated state in many loci across the genome.
3. Together with ROS1, ZDP functions to counteract the robust DNA methylation machinery that recognizes and silences parasitic transposable elements but also can affect normal gene expression.
4. Besides a role during DNA demethylation, ZDP may also participate in the repair of DNA damage.
5. XRCC1 interacts with both ROS1 and ZDP and stimulates their enzymatic activities.
6. Plant XRCC1 functions both at the initial stages of demethylation, by stimulating ROS1 activity, and also at pos-incision steps, by favouring 3'-end cleaning and DNA ligation.



## **CONCLUSIONES**



1. ZDP actúa tras ROS1 en la ruta de desmetilación activa del DNA en plantas.
2. La deficiencia en ZDP perturba la ruta de desmetilación y provoca un estado de hipermetilación en muchos loci a lo largo del genoma de la planta.
3. Junto a ROS1, ZDP ayuda a contrarrestar la robusta maquinaria de metilación del DNA que reconoce y silencia elementos transponibles pero que también puede afectar a la expresión génica normal.
4. Además de su función en el proceso de desmetilación, ZDP podría participar en la reparación de daños en el DNA.
5. XRCC1 interacciona con ROS1 y ZDP y estimula la actividad enzimática de ambas proteínas.
6. XRCC1 funciona tanto en los pasos iniciales de la desmetilación, mediante la estimulación de la actividad de ROS1, como en pasos posteriores, favoreciendo el procesamiento del extremo 3' y la ligación del DNA.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1. Material biológico

## 1.1. Plantas

En esta tesis se ha utilizado una estirpe silvestre de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) y 5 líneas mutantes por inserción de T-DNA correspondientes a dicho ecotipo. Tres de estas líneas corresponden a plantas mutantes en el gen *ZDP*, SAIL\_60\_C08, SAIL\_813\_B03 y SALK\_130907, suministradas por el Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Otra línea mutante en el gen *ARP*, SALK\_021478, fue suministrada también por ABRC (Córdoba-Cañero et al., 2011). La quinta línea mutante, SALK\_027362, que contiene la inserción de T-DNA en el gen *XRCC1*, fue suministrada por Charles White, de la Universidad Blaise Pascal, Francia. Además, líneas transgénicas con ecotipo C24 portadoras del transgen *RD29A-LUC* y líneas mutantes en el gen *ROS1* (*ros1-4*), que contienen una inserción de T-DNA en el exón 17, fueron suministradas por Jian-Kang Zhu, de la Universidad de Purdue (Indiana), EEUU.

## 1.2. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que han sido utilizadas se detallan a continuación:

**Tabla 1. Cepas bacterianas**

Especie	Cepa	Genotipo	Observaciones
<i>Escherichia Coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (</i> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Cepa receptora utilizada en la clonación de fragmentos de DNA y en la propagación de plásmidos.  La mutación $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 permite la $\alpha$ -complementación con el extremo amino-terminal de la $\beta$ -galactosidasa, codificada en los vectores pUC y sus derivados (Hanahan, 1983).
	XL1-Blue	<i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Cepa receptora utilizada en la clonación de fragmentos de DNA y en la propagación de plásmidos.  La mutación $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 permite la $\alpha$ -complementación con el extremo amino-terminal de la $\beta$ -galactosidasa, codificada en los vectores pUC y sus derivados (Hanahan, 1983).

**Tabla 1. Continuación**

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Observaciones</b>
<i>Escherichia Coli</i>	BL21(DE3) CodonPlus	F <sup>-</sup> <i>dcm<sup>-</sup> ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> ) gal λ(DE3) Hte[ <i>argU, ileY,</i> <i>leuW, Cam<sup>r</sup></i> ]	Cepa empleada para obtener altos niveles de expresión de genes que contienen codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> y se sitúan bajo el control del promotor del bacteriófago T7  Expresa los tRNA correspondientes a 4 codones de uso frecuente en eucariotas pero raros en <i>E.coli</i> (AUA, AGG, AGA, CUA)  Resistente a cloranfenicol.

### 1.3. Vectores de clonación

Se utilizaron los siguientes vectores de clonación:

**Tabla 2. Vectores de clonación utilizados**

<b>Vector</b>	<b>Características</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
pGEM-T Easy	Utilizado en experimentos de clonación de fragmentos obtenidos por PCR.  Disponible comercialmente en forma abierta con una timina adicional en el extremo 3' de cada cadena, a la que se empareja la adenina terminal que incorporan a los productos de PCR algunas polimerasas termoestables.	Promega
pET28a/c pET30b	Permite altos niveles de expresión de proteínas o péptidos en <i>E.coli</i> .  Para facilitar el proceso de purificación posterior, este vector permite la fusión de 6 residuos de histidina a la proteína de interés.	Novagen
pMAL-c2X	Permite altos niveles de expresión de proteínas o péptidos en <i>E.coli</i> .  Para facilitar el proceso de purificación posterior, este vector permite la fusión de la proteína de interés a la proteína de unión a maltosa ( <i>Maltose Binding Protein, MBP</i> ).	New England Biolabs
pADGAL4-2.1	Vector fagémido	Stratagene

## 2. Medios de cultivo

### 2.1. Medios de cultivo bacteriano

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (120 °C, 20 min) o mediante filtración.

**Medio Luria-Bertani (LB):** para el crecimiento de *E. coli* o como base de otros medios de cultivo.

*Líquido:* bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l) y NaCl (5 g/l).

*Sólido:* se añade bactoagar (15 g/l) a la mezcla anterior previamente disuelta.

**Medio X-Gal (LB+IPTG+X-Gal):** medio selectivo estándar para experimentos de transformación de la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$  o XL1-Blue. Cuando se utilizan vectores con dianas de inserción localizadas en la región codificante del péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, la presencia de isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) y X-Gal permite la identificación directa de clones recombinantes por inactivación insercional de dicha enzima. LB sólido previamente esterilizado y suplementado con 134  $\mu$ M IPTG, 0,005% XGal (p/v en formamida).

**Medio PSI-b:** para la preparación de células competentes.

*Líquido:* bacto triptona (20 g/L), extracto levadura (5 g/L), NaCl (0,6 g/l), KCl (0,185g/L); ajustar el pH a 7.0. Después de esterilizar en autoclave se añade 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

### 2.2. Medios para cultivo de *Arabidopsis thaliana*

#### 2.2.1. Medios estériles

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (120°, 20 min) o mediante filtración.

**Medio MS+Sacarosa (1%):** medio nutritivo para la siembra de semillas en placas de Petri. Compuesto por: *Murashige and Skoog Basal Medium* (MS) (2,2 g/l), sacarosa (10 g/l), agar de plantas (8 g/l); Ajustar pH a 5.8 (con KOH).

**Agar de cobertera para plantas:** para la siembra de las semillas en cajas de medio MS+sacarosa. Agar de plantas 0,8 % (p/v). Se esteriliza en autoclave. Para la siembra se mantiene a 45 °C.

### **2.2.2. Medios no estériles**

Para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en condiciones no estériles se utilizó como sustrato una mezcla comercial de turba y perlita (Compo Sana<sup>®</sup>, Compo).

## **3. Cultivo y crecimiento de organismos**

### **3.1. Cultivo y crecimiento de bacterias**

*Escherichia coli* se cultivó en placas de Petri con medio LB sólido, o en matraces y/o tubos de ensayo con medios de cultivo apropiados y agitación a 250 rpm. La temperatura de incubación fue de 37 °C.

La conservación de las estirpes bacterianas durante largos períodos se llevó a cabo a -80 °C en medio LB líquido con 15% glicerol (v/v). Para periodos cortos, se mantuvieron a 4 °C en medio LB sólido.

### **3.2. Cultivo y crecimiento de plantas**

#### **3.2.1. Cultivo de plantas en maceta**

El crecimiento de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo en macetas con sustrato Compo Sana<sup>®</sup>. En cada maceta se dispensó sustrato hasta una altura de unos 4 cm. y se compactó. Seguidamente se añadió agua y se rellenó con sustrato hasta el borde de la maceta sin compactar demasiado. De nuevo se humedeció y se sembró el número elegido de semillas. A continuación, las macetas se cubrieron con plástico transparente. Para sincronizar la germinación de las semillas, las macetas se incubaron a 4 °C durante 48 horas. Tras este tiempo, se colocaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 23±1 °C. Transcurrida una semana (o tras la aparición de los cotiledones), se retiró el plástico y se incubaron en las mismas condiciones hasta que alcanzaron la fase de desarrollo deseada. Las plantas se regaron mediante subirrigación con agua de grifo cada dos días. Cuando las plantas dejaron de producir flores se suspendió la irrigación y se dejaron secar en bolsas de papel. Las semillas se recogieron y se tamizaron con coladores convencionales. Su conservación se

realizó a temperatura ambiente, en tubos eppendorf cerrados y rodeados de gel de sílice.

### **3.2.2. Cultivo de plantas en placas de Petri**

Previamente a la siembra, las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en etanol 95% (v/v) y agitándolas durante 1 min. A continuación, se retiró el etanol y se añadió lejía 50% (v/v), manteniéndolas en agitación durante 15 min. Por último, se realizaron 4 lavados consecutivos de 5 min cada uno con agua destilada estéril. Para la siembra se tomaron de forma sucesiva pequeñas alícuotas de la solución acuosa que contenía las semillas esterilizadas y se añadieron a 3 ml de agar de cobertera para plantas, previamente precalentado a 45 °C. Dicha mezcla se dispensó en placas de Petri con medio MS al 1%, con sacarosa (3%). Las placas se sellaron con papel de parafina y se incubaron en una cámara con tubos fluorescentes (36 W, 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 23±1 °C durante 15 días. Tras este período las plántulas se recogieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## **4. Oligonucleótidos sintéticos**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones de amplificación y/o secuenciación, se diseñaron con la ayuda del programa Oligo 4.0 y Vector NTI, analizando en cada caso su estabilidad interna, la formación de dímeros y horquillamientos no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos ( $T_m$ ,  $T_d$ , %G+C, %A+T). Se obtuvieron comercialmente de la compañía Bonsai Technologies.

#### 4.1. Cebadores empleados para la clonación del cDNA de *ZDP*, su extremo carboxilo, *XRCC1* y el extremo amino terminal de *ROS1* en vectores de expresión

**Tabla 3. Cebadores empleados para clonar *ZDP* y su extremo carboxilo, *XRCC1* y el extremo amino terminal de *ROS1* en vectores de expresión. En negrita se indican las dianas de restricción.**

Nombre	Secuencia (5´-3´)
ZDP-EcoRI-F5	ATTAG <b>GAATTC</b> CATGCCGGTGGTTGCTGAG
ZDP-Xba-R5	GCGC <b>TCTAGAC</b> AGTCATGCTAGCCATACG
ZDP-NdeI-F3	CT <b>CATATGA</b> TGAGTGAGTCAACTTCTC
ZDP-XhoI-R3	CT <b>CTCGAG</b> AGTCCCTGGCGATGTACTTG
XRCC1-Xho-F	TC <b>CTCGAG</b> ATGTCTCAGAAGCGAAATCTTC
XRCC1-Xba-R	CG <b>TCTAGA</b> TGGAATTCCTTAAGAGATCATATGC
ΔN88ΔC1075ROS1F	CG <b>GAATTC</b> AAATGCAAAAAGGTACTGAAGAAG
ΔN88ΔC1075ROS1R	GAAC <b>CTCGAG</b> TCAGGCATCATATCTCATCC

#### 4.2. Cebadores empleados para la detección de transcritos, estudio del nivel de expresión y CHOP PCR

**Tabla 4. Cebadores empleados para RT-PCR, PCR a tiempo Real y CHOP PCR.**

Nombre	Secuencia (5´-3´)
ZDP-F3	AACTAAAGCGAAACAACAGATGGCT
ZDP-R3	CCATTTTGGTAATAGATTGGCATCC
ZDP-F4	GTATCCTTCCATTCTCTGAGAACTG
ZDP-R4	CCCAACGTAGAAGGATTTATCCATA
ZDP-F1b	TCTCAGACTATCGCTGCAAAG
ZDP-R1b	ACCAATGTCCTCTACCGAAAC
ROS1-F	AAGGACCAACTTGTGGCAG
ROS1-R	AGGACTCTATTAGCACTGAGC
ROS3-F	CCTTCACGACTAAGCTTTCC
ROS3-R	TCTATGTGCGATGACACAGC
TUB8-F	ATAACCGTTTCAAATCTCTCTCTC
TUB8-R	TGCAAATCGTTCTCTCCTTG
XRCC1-F1	CTCCAAAGTTCCGTCAAGTTG
XRCC1-R1	GATATCTACCAACTTCTTCTG
7362-R2	GCATGCTGGAAAACCATGGAGG
XRCC1-R2	TCACTACACGAGGGACAAAGCT
RD29A-F1	ATATGATGGGTTAATAGATATGGAT
RD29A-R1	ATCTATAATTTATATTCAACCCATATC
RD29A-F2	ATGGGCCAATAGACATGGAC
RD29A-R2	GCTGCTGGTGTGTGTTGAGT

### 4.3. Cebadores empleados para secuenciación con bisulfito

**Tabla 5. Cebadores empleados para amplificar mediante PCR fragmentos de DNA tratados con bisulfito sódico.**

Nombre	Secuencia (5´-3´)
ZDP-398-F	GATTAAGTGTGAAAGTTAAAATTAAGTATGG
ZDP-398-R	CCCCCTTTTAACATCATAACTCTAC
ZDP-409-F	TGGAAGAAAATGGAATAATTAAAGGTG
ZDP-409-R	ACACATCACCTAAAAACAAAACCTCC
ZDP-413-F	GAAGGATTTGTTTGAATGTGTTTATATAA
ZDP-413-R	CTCTACAAAACCAAACCTTTCCTC
ZDP-414-F	GATTGGATTTTGGTTTGGATTATATAAGG
ZDP-414-R	CTCCAAAATCTTTTTTCTCTTTTTTCTATTC
RD29AendoBi R1	CTAAAATTTAAAATCTACCTAAAATACTAC
RD29AendoBi R2	ATAATAATTCCTCTATTTAATCCATTTTCC

### 4.4. Cebadores empleados para el genotipado de plantas

**Tabla 6. Cebadores empleados en el genotipado de plantas.**

Nombre	Secuencia (5´-3´)
ZDP-F1	AATGAATCCAACATTGATCGATGGAAG
ZDP-R1	ATACAGCTAAGTCCCTGGCGATGTACTT
LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC
ZDP-F2	TGGTGACAACAGAACGACAAGAAAA
ZDP-R2	CTTCTTCTCATCAGGCTGCTTTAAGTTTA
LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
7362-R2	GCATGCTGGAAAACCATGGAGG
7362-L2	GCCCCGGTTTTGCTAGCTCAGCT
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG

### 4.5. Oligonucleótidos usados como sustrato

Los oligonucleótidos utilizados como sustrato se obtuvieron de Operon y fueron purificados por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).



**Tabla 9. Programas empleados para la gestión y análisis de datos.**

Programa		Aplicación
LaserGene (DNA-Star)	EditSeq	Edición de secuencias.
	MapDraw	Análisis de las ORF y los sitios de restricción.
	MegAlign	Alineamiento de secuencias.
	SeqMan	Gestión de contigios y ensamblaje de secuencias de DNA.
OLIGO (Mol. Biology Insights Inc., EE. UU.)		Diseño de oligonucleótidos con las características deseadas en una secuencia problema.
KODAK 1D Image Analysis		Captura y análisis de imágenes de geles de DNA y RNA
Sistema de Imagen FLA-5100		Captura de imágenes de geles de DNA
Vector NTI (Invitrogen)		Edición de secuencias, análisis de las ORF y sitios de restricción, alineamiento, análisis de secuencias y diseño de oligonucleótidos
MyiQ (Biorad)		Análisis de datos en RT-PCR a tiempo real
Microsoft Excel		Cálculos y análisis estadísticos.
Multigauge (Fujifilm)		Análisis de imágenes de geles de DNA

## 6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

### 6.1. Aislamiento de DNA plasmídico

#### 6.1.1. Miniprep método CTAB

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Murray y Thompson (Murray and Thompson, 1980) con algunas modificaciones.

Se partió de un cultivo estacionario de la estirpe portadora del plásmido crecido en 5 ml de medio LB con la selección apropiada. Se centrifugaron 3 ml de este cultivo durante 2 min a 13.000 rpm, y las células se resuspendieron en 200 µl de STET\*. A continuación se añadieron 4 µl de lisozima (50 mg/ml) y 2 µl de RNasa (10 mg/ml), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente la muestra se calentó a 100 °C durante 45 seg y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm Los restos celulares de aspecto mucoso se retiraron con un palillo estéril, se añadieron 10 µl de CTAB\*\* y se incubó 5-10 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 5 min a 13.000 rpm se desechó el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 300 µl de una solución 1,2 M de NaCl.

Se añadieron 750 µl de etanol frío al 100%, y el precipitado obtenido, tras centrifugar durante 10 min a 13.000 rpm, se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó mediante centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril.

\**STET*: 8% sacarosa (p/v); 0,1% Tritón X-100 (v/v); 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

\*\**CTAB*: 5% bromuro de hexadeciltrimetilamonio (p/v).

### **6.1.2. Miniprep con Perfectprep® PlasmidMini Kit (Eppendorf)**

La purificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento está basado en una lisis alcalina, seguida de la unión del DNA plasmídico a una matriz de sílice y su posterior elución en condiciones apropiadas de pH y concentración salina.

## **6.2. Aislamiento de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana***

### **6.2.1. Extracción con *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen)**

Se partió, en general, de 100 mg de tejido y el aislamiento de DNA de la planta se realizó según las instrucciones del fabricante. El procedimiento está basado en una lisis alcalina seguida de un tratamiento con RNasa y una precipitación de polisacáridos y proteínas. Posteriormente el DNA se une a una membrana de sílice y se eluye en condiciones salinas y de pH adecuadas.

### **6.2.2. Extracción de DNA para PCR de genotipado**

Una muestra de tejido procedente de una hoja de roseta se introdujo en un tubo eppendorf y se añadieron 400 µl de tampón de extracción II\*. El tejido se trituró con ayuda de una punta de pipeta estéril y el contenido del tubo se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y el DNA se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol e incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Por último, el DNA se secó por centrifugación en vacío (*Speed-Vac*) y se resuspendió en 100 µl de tampón TE.

\**Tampón de extracción II*: 200 mM Tris HCl pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS (p/v).

### **6.3. Aislamiento de RNA total de *Arabidopsis thaliana***

El RNA se aisló de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecida durante 15 días.

#### **6.3.1. Extracción con RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)**

Se partió de 100 mg de tejido y el aislamiento del RNA total de la planta se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento consiste en la unión del RNA a una membrana de sílice en condiciones altamente salinas, con un paso previo de lisis en presencia de guanidinisotiocinato y un paso final de elución del RNA en agua desionizada libre de RNasas.

## **7. Tratamiento enzimático de ácidos nucleicos**

### **7.1. Tratamiento con endonucleasas de restricción**

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por las casas comerciales Roche y New England Biolabs. Los tratamientos enzimáticos del DNA se llevaron a cabo a la temperatura recomendada en el tampón adecuado aportado por la casa comercial durante al menos 1 hora utilizando 3-4 unidades de enzima por microgramo de DNA.

### **7.2. Defosforilación**

La defosforilación de plásmidos linearizados antes de su unión con el inserto correspondiente disminuye drásticamente la frecuencia de reacciones intramoleculares y, por tanto, el número de plásmido sin inserto que se obtienen tras la ligación. La reacción se llevó a cabo usando 1 unidad de fosfatasa alcalina de gamba (SAP) (Roche) por cada 50 ng de plásmido linearizado en el tampón aportado por la casa comercial e incubando a 37°C durante 1h. Posteriormente la enzima se inactivó calentando a 65°C durante 15 min.

### 7.3. Ligación de fragmentos de DNA a vectores plasmídicos

La unión de fragmentos de DNA a vectores linearizados se llevó a cabo utilizando el *kit Rápido de Ligación de DNA* (Roche), la DNA ligasa del fago T4 (Roche y/o dominion MBL), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para clonar fragmentos de DNA amplificados por PCR se empleó el sistema *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de la ligación, los productos de PCR se purificaron utilizando el *kit QIAquick Gel Extraction*, de Qiagen. Cuando la polimerasa empleada en la PCR (por ejemplo *Advantage HF2 Polymerase Mix*) no incorporaba una adenina terminal al fragmento de PCR, antes de realizar la ligación con el vector se procedió a la adición de adeninas terminales mediante una incubación del fragmento amplificado en presencia de dATP (0,2mM) y Taq DNA Polimerasa (0,1 U) (Bioline o Biotools) durante 30 min a 70 °C.

## 8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 8.1. PCR estándar

Para la amplificación estándar de fragmentos de menos de 4,5 kb se emplearon Taq DNA polimerasas termoestables (Biotools, Bioline o MBL), con los tampones suministrados por la correspondiente casa comercial, y las condiciones de reacción que se indican en la Tabla 10.

**Tabla 10. Condiciones estándar de la PCR.** N es 30 si el molde utilizado es DNA plasmídico y 35 si es DNA genómico,  $T_{un}$  es la temperatura de unión de los cebadores al molde y  $T_{ext}$  el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 min por cada kb de producto.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	
Unión al cebador	$T_{un}$	30 s	N
Extensión	72°C	$T_{ext}$	
Extensión final	72°C	10 min	1
	10°C	indefinido	-

La reacción se realizó con 1,5 pmol/ $\mu$ l de cada cebador, una concentración 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs y 0,6 U de polimerasa. La cantidad de DNA molde empleada fue de 80-100 ng cuando la reacción se realizó con DNA genómico y 30 ng cuando se usó DNA plasmídico.

## **8.2. PCR de colonia**

Para realizar una PCR a partir de una colonia bacteriana, se tomó la colonia con una punta de pipeta estéril y se resuspendió en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada. Una alícuota de esta suspensión se utilizó para inocular 3-5 ml de medio selectivo que se incubó toda la noche a 37 °C. El volumen restante se hirvió durante 10 min, y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm. Las reacciones de PCR se realizaron con 5  $\mu$ l del sobrenadante. El DNA de los clones que resultaron positivos se aisló a partir de los cultivos preparados con anterioridad.

## **8.3. PCR para genotipado de plantas**

Las condiciones de la reacción son las que se indican para la PCR estándar (Ver apartado 8.1). En esta PCR se emplearon dos mezclas de reacción, una de ellas contenía dos cebadores homólogos a la región genómica que flanquea la inserción de T-DNA y en la otra mezcla, uno de los cebadores contiene una región homóloga perteneciente al T-DNA insertado y el otro cebador flanquea la inserción. Como molde se usan 5  $\mu$ l de DNA obtenido según el protocolo de extracción de DNA para PCR de genotipado (Ver apartado 6.2.2).

## **8.4. PCR con DNA polimerasas termoestables de alta fidelidad**

En los casos en que resultó de especial importancia evitar la introducción de mutaciones durante la amplificación se utilizó la polimerasa *Advantage HF 2* (BD Biosciences Clontech), una combinación de dos enzimas: *Titanium Taq DNA Polymerase* y una polimerasa con actividad correctora. Esta mezcla de polimerasas permite amplificar moléculas de DNA cuya concentración es muy baja, pero con una alta fidelidad debido a la presencia de la enzima actividad correctora. La reacción se llevó a cabo con 0,4 pmol/ $\mu$ l de cada uno de los cebadores, una concentración 0,2 mM de dNTPs y 1 U de polimerasa. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

**Tabla 11. Condiciones de la reacción de PCR con Advantage-HF2.** Tun es la temperatura de unión de los cebadores al molde y Text el tiempo de extensión de la reacción, normalmente 1 min por cada kb de producto.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	1 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s	30
<b>Unión del cebador/Extensión</b>	Tun	Tex	
<b>Extensión final</b>	68°C	3 min	1
	10°C	indefinido	-

Hay que resaltar que esta DNA polimerasa no incorpora una adenina terminal al fragmento amplificado.

## 8.5. Transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR)

Esta técnica se utilizó para determinar el nivel de transcritos de los genes *ZDP* y *XRCC1* en plántulas silvestres y mutantes tras 15 días de crecimiento. Una mezcla de reacción que contenía 1µg de RNA total, 50 µM del cebador oligodT y 0,5 mM de dNTPs se incubó a 65°C durante 5 min. A continuación se añadieron 4 µl de tampón de reacción (5x *First Strand Buffer*), 40 U de RNAGuard (Amersham), 5 mM DTT, 200 U de retrotranscriptasa SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y se añadió agua hasta 20 µl. La incubación se continuó durante 1 hora a 50°C y la mezcla se calentó durante 15 min a 70 °C para inactivar la enzima. La reacción de PCR se realizó siguiendo el protocolo estándar (Ver apartado 8.1) utilizando 1 µg del cDNA obtenido tras la transcripción inversa y los cebadores que se incluyen en la Tabla 4.

## 8.6. PCR a tiempo real

Esta técnica se empleó para estudiar el nivel relativo de transcritos de *LUC*, *RD29A* en plantas mutantes *ros 1-4*, *zdp-1*, *zdp-2* y plantas silvestres. Se usaron 5 µg de RNA total de cada uno de los genotipos para obtener el cDNA mediante Superscript III System (Ver apartado 8.5). Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo usando la mezcla de reacción SYBR Green (Biorad) y los cebadores descritos en la Tabla 4. Como control interno se usó el gen *TUB8*.

## 9. Electroforesis de ácidos nucleicos

### 9.1. Electroforesis en geles de agarosa

La separación e identificación de moléculas de DNA o RNA se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (CONDA, pronadisa) disuelta en tampón TAE\*. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos a separar, oscilando entre 0,7-2% (p/v). Para poder visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió bromuro de etidio (0,5 µg/ml) a la solución de agarosa fundida. Cada muestra se mezcló con tampón de carga para geles de agarosa\*\* en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm. Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak modelo DC290. La iluminación inferior procedía de un transiluminador de luz ultravioleta (Modelo TCX, Vilber Lourmat). Como patrón de peso molecular se emplearon diversas mezclas comerciales de fragmentos de DNA de peso molecular conocido. La concentración de DNA o RNA se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop® ND-1000).

\**Tampón TAE*: 40 mM Tris-acetato (Trizma-base y ácido acético glacial); 1mM EDTA pH 8.0.

\*\**Tampón de carga para geles de agarosa*: 0,25% azul de bromofenol (p/v); 0,25% azul de xilencianol (p/v); 40% sacarosa (p/v) en 5X TAE.

#### 9.1.1. Recuperación de los fragmentos de DNA de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de DNA se realizó usando el kit *QIAquick Gel Extraction* de Qiagen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las soluciones incluidas en el kit proporcionan la concentración salina y pH adecuados para la unión del DNA a una membrana de sílice, y su posterior elución en condiciones básicas.

### 9.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para la caracterización de las proteínas y de los extractos celulares de *Arabidopsis* se realizaron diversos ensayos, cuyos productos de reacción se

resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% o 15%, dependiendo del ensayo, y urea 7 M. Los cristales de 20 cm. x 20 cm, para los geles medianos, o 40 cm x 20 cm, para los geles grandes, se coloraron separados por espaciadores apropiados (0,5 mm o 0,2 mm, respectivamente), sobre el soporte y la cubeta suministrados por el fabricante (CBS Scientific). Cada gel mediano (30 ml) se preparó disolviendo 12,5 g de urea en una mezcla que contenía 9 ml (geles al 12%), o 11 ml (geles al 15%) de solución 40% Acrilamida: Bis 19:1 (Bio-Rad), 3 ml de tampón 10x TBE\* y agua desionizada. La polimerización se inició añadiendo 300 µl de Persulfato de amonio (0,1%, v/v) y 30 µl de N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED). Tras verter la mezcla entre los dos cristales, se introdujo el peine, y se dejó polimerizar durante toda la noche. Cada gel grande (60 ml) se preparó utilizando el doble de las cantidades usadas para un gel mediano. Se usaron geles grandes para la mayoría de los ensayos exceptuando donde se indique. Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga desnaturalizante\*\*, se calentaron a 95°C durante 10 min y se aplicaron en los pocillos correspondientes. La electroforesis se llevó a cabo en tampón 1xTBE a un voltaje constante de 300-500 voltios para los geles medianos, o de 1300-1500 V para los geles grandes. Previamente a la carga de las muestras los geles se precalentaron mediante electroforesis en las mismas condiciones anteriores durante al menos dos horas.

\**Tampón 10x TBE*: 0,9M Tris (Trizma Base); 0,9M ácido bórico; 20 mM EDTA pH 8.0.

\*\**Tampón de carga desnaturalizante*: 80% formamida (v/v); 10 mM EDTA pH 8.0; 1mg/ml azul de bromofenol (p/v).

## **10. Transformación genética**

### **10.1. Transformación de *E. coli***

#### **10.1.1. Preparación de células competentes**

Una colonia fresca de *E. coli* (DH5α o XL1-Blue) se inoculó en 5 ml de PSI-b y se incubó toda la noche con agitación a 37 °C. Todo el cultivo estacionario se transfirió a 100 ml de PSI-b en un matraz de 1 L (precalentado a 37 °C) y se continuó la incubación con agitación vigorosa hasta que la DO<sub>600</sub> fue 0,45-0,5. A continuación el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó durante 5 min a 5.000 g

y 4 °C. Seguidamente, las células se resuspendieron suavemente en 40 ml de solución Tfb-1\* fría. Tras una incubación de 5 min en hielo se volvieron a centrifugar durante 5 min a 5.000 *g* y 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron suavemente en 4 ml de solución Tfb-2\*\* fría. Por último, esta suspensión celular se incubó en hielo durante 15 min, se distribuyó en alícuotas de 100 µl, se congeló rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se conservó a -80 °C hasta su uso.

\*Solución Tfb-1: 30 mM acetato potásico pH 6.9; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 100 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.

\*\*Solución Tfb-2: 10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 15% glicerol (v/v). Filtrar para esterilizar.

### **10.1.2. Transformación de células competentes**

A 50 µl células competentes se añadieron 5 µl de DNA o de mezcla de ligación y se incubaron 30 min en hielo. Transcurrido ese tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 2 min a 42 °C e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo durante 5 min. Para permitir la expresión de los genes clonados, las células transformadas se incubaron a temperatura ambiente durante 15-30 min con 100 µl de LB. Por último toda la mezcla de transformación se sembró en placas de medio selectivo que se incubaron a 37°C.

### **10.1.3. Protocolo de transformación "rápida" de *E. coli***

Este protocolo se utilizó para la transformación de la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus. Se partió de un cultivo bacteriano crecido en medio LB líquido hasta estado estacionario. El cultivo se refrescó transfiriendo 50 µl del mismo a 5 ml de medio LB fresco y se continuó la incubación con agitación a 37°C hasta que la DO<sub>600</sub> fue 0,5-0,8. Una vez alcanzada la densidad adecuada, 1ml del cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 30 seg a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1M, y se incubaron en hielo durante 5 min. De nuevo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 30 seg y, tras retirar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1M y se incubaron 5 min en hielo. La transformación se realizó añadiendo 1 µl de la solución que contenía el DNA (10 a 100 ng) e incubando en hielo durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se realizó un choque térmico de 2 min a 42 °C e inmediatamente se volvieron a dejar en hielo

durante 5 min. Posteriormente se añadió 200 µl de medio LB y se incubó a 37°C durante 5 min. A continuación se sembraron en placas de medio selectivo y se incubaron a 37 °C toda la noche.

## **11. Expresión y purificación de proteínas en *E.coli***

### **11.1. Expresión y purificación de ZDP**

La construcción pET-ZDP (cDNA de ZDP clonado en el vector de expresión pET28b) fue obtenida por el grupo de Stefania Petrucco (Universidad de Parma, Italia). La estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) codon plus fue transformada con la construcción pET-ZDP, siguiendo el protocolo de transformación "rápida" de *E. coli* (Ver apartado 10.1.3). El cDNA se sitúa bajo el control del promotor del fago T7, cuya RNA polimerasa permite la expresión selectiva e inducible de genes en *E.coli* (Studier et al., 1990). Se obtiene así una proteína recombinante, His-ZDP, con seis residuos de histidina añadidos en tándem a su extremo amino-terminal. Esto facilitó la posterior purificación mediante el empleo de cromatografía de afinidad altamente específica usando columnas de sefarosa HisTrap™ HP (Amersham Biosciencias) que contienen Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa TM de alta resolución.

Las condiciones para la expresión de la proteína recombinante His-ZDP fueron las siguientes: una colonia transformante fresca se inoculó en 10 ml de LB con kanamicina (30 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) y se creció a 37 °C durante toda la noche con agitación hasta alcanzar estado estacionario. Una alícuota de 2,5 ml de este cultivo se reinoculó en 250 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,1. El cultivo se incubó entonces a 30°C y se prolongó la incubación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,7, momento en el que se añadió isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, con el fin de inducir la expresión de la proteína. Transcurrido 4 horas de tiempo de inducción, las células se recogieron centrifugando a 13.000 g durante 30 min a 4 °C y se congelaron a -80 °C.

Los pellet bacterianos se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 5 ml de Solución de Sonicación 1\* (SB1) suplementada con 5 mM de imidazol y un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), y se rompieron mediante

sonicación. Los restos celulares se eliminaron centrifugando a 4°C durante 30 minutos a 20.000 g. El lisado bacteriano se filtró usando membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm. La purificación se llevó a cabo utilizando el sistema de cromatografía ÄKTA Prime (Amershan Biosciences) inyectando la muestra en tres columnas en tándem, Hi Trap Q XL, HiTrap SP XL y Ni<sup>+2</sup>-Sefarosa (columnas de intercambio aniónico, catiónico y afinidad, respectivamente, GE Healthcare). Las columnas se equilibraron con 10 volúmenes de SB1 suplementado con 5 mM de imidazol. El lisado bacteriano se filtró usando membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm y se inyectó en la columna. Con esta primera inyección conseguimos eliminar proteínas con elevada carga positiva y negativa, que quedan unidas a las columnas Hi Trap Q XL y HiTrap SP XL, respectivamente, eliminando así proteínas que pudieran quedar pegadas inespecíficamente a la columna de afinidad. A continuación, se desconectaron las columnas de intercambio iónico y se lavó la columna de afinidad con 10 volúmenes de Solución de Sonicación 2\*\* (SB2) suplementado con 5mM imidazol, seguido de otro lavado con 10 volúmenes de SB2 suplementado con 40 mM de imidazol. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 30 ml de SB2 40 mM de imidazol a SB2 1M de imidazol. Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1ml/min a 4°C. Las proteínas eluidas se recogieron en fracciones de 0,5 ml y una alícuota de cada fracción se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) (ver apartado 12.1). Aquellas que presentaban una única banda correspondiente a la proteína recombinante fueron mezcladas y dializadas durante 1 hora frente Solución de Diálisis (SD)\*\*\* y durante toda la noche frente a SD suplementado con glicerol al 50%. Esta preparación se alícuotó, y se congeló a -80°C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

\**Solución de Sonicación 1 (SB1)*: 20mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM NaCl; 20% glicerol; 15mM β-mercaptoetanol; 1% Tween-20

\*\**Solución de Sonicación 2 (SB2)*: 20mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; 20% glicerol (v/v); 15mM β-mercaptoetanol; 1% Tween-20.

\*\*\**Solución de Diálisis (SD)*: 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; 1mM ditiotreititol.

Para obtener ZDP fusionada a la proteína de unión a la maltosa (MBP), se clonó el cDNA de ZDP en el vector de expresión pMAL-c2X (New England Biolabs) mediante amplificación por PCR sobre pET-ZDP usando los cebadores

ZPD-EcoRI-F5 y ZDP-Xba-R5 (Ver Tabla 3). El fragmento amplificado por PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI y se clonó en el vector de expresión. Se crea así una fusión con el gen *malE* de *E. coli* que codifica la MBP, lo que posibilita su purificación mediante el empleo de cromatografía de alta afinidad usando columnas de amilosa (New England Biolabs).

Para su expresión en bacterias la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) codon plus se transformó siguiendo el protocolo de transformación "rápida" de *E. coli*. Las condiciones para la expresión de la proteína MBP-ZDP fueron las siguientes: una colonia transformante fresca se inoculó en 10 ml de LB suplementado con glucosa 2 g/l (LB-gluc), carbenicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) y se incubó hasta alcanzar el estado estacionario. Una alícuota de 2,5 ml de este cultivo se reinoculó en 250 ml de LB-gluc suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,1. El cultivo se continuó incubando a 30° C con agitación y al alcanzar la DO<sub>600</sub> de 0,5 se añadió IPTG a una concentración final de 0,3 mM con el fin de inducir la expresión de la proteína. La incubación se continuó durante 4 horas más y finalmente, las células se recogieron centrifugando a 15.000 g durante 15 min a 4°C, se resuspendieron en 10 ml de solución Column Buffer\* (CB) suplementada con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma) y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Las células se descongelaron en hielo, se rompieron mediante sonicación y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 30 min a 9.000 g y 4°C. El sobrenadante obtenido, se filtró, se diluyó 1:2 con CB y se cargó en una columna de afinidad de dextrina sefarosa de 1 ml (MBPTrap HP, GE Healthcare) a un flujo constante de 1 ml/min. A continuación, la columna se lavó con 12 volúmenes de CB y la proteína se eluyó con CB suplementado con maltosa 10mM. Las proteínas eluidas se recogieron en fracciones de 0,5 ml y una alícuota de cada fracción se analizó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Aquellas fracciones que presentaban una única banda correspondiente a la proteína de fusión fueron mezcladas y dializadas durante 1 hora en CB y durante toda la noche en CB suplementado con 50% de glicerol. Esta preparación se alícuotó y se congeló a -80°C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford.

\*Column Buffer (CB): 20mMTris-HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10mM β-mercaptoetanol.

## 11.2. Expresión y purificación de ROS1 y sus versiones truncadas

El cDNA de *ROS1* se obtuvo de la construcción pET28a-ROS1 (Morales-Ruiz et al., 2006). La versión truncada de la proteína correspondiente al extremo amino terminal (N $\Delta$ 88C $\Delta$ 1075) se obtuvo amplificando por PCR el cDNA correspondiente a la región 568-1260 usando los cebadores  $\Delta$ N88 $\Delta$ C1075ROS1F y  $\Delta$ N88 $\Delta$ C1075ROS1R (Ver Tabla 3). Posteriormente este fragmento se clonó en el vector de expresión pET28c (Novagen) mediante digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. El resto de las versiones truncadas de ROS1 fueron obtenidas de las construcciones previamente descritas en (Ponferrada-Marín et al., 2010).

Para su expresión en bacterias, la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) codon plus se transformó con cada una de las construcciones siguiendo el protocolo de transformación "rápida" de *E. coli*. Las condiciones para la expresión de His-ROS1 y sus versiones truncadas fueron las siguientes: una colonia transformante fresca se inoculó en 10 ml de LB con kanamicina (30  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (34  $\mu$ g/ml) y se creció a 37 °C durante toda la noche con agitación hasta alcanzar estado estacionario. Una alícuota de 2,5 ml de este cultivo se reinoculó en 250 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,1. Se continuó incubando el cultivo bien a 23°C, en el caso de His-ROS1 o 15°C, en el caso de sus versiones truncadas, y se prolongó la agitación durante 90 minutos, tras los cuales se añadió 5mM betaina, 5mM Na-glutamato y 0.5M NaCl. Cuando la DO<sub>600</sub> fue aproximadamente de 0,7 se añadió IPTG a una concentración final de 1mM, con el fin de inducir la expresión de la proteína. Transcurrido 2 horas de tiempo de inducción, las células se recogieron centrifugando a 13.000 *g* durante 30 min a 4 °C y se congelaron a -80 °C.

Los pellet bacterianos se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 3,5 ml de SB2 suplementado con 5 mM de imidazol y un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), y se rompieron mediante sonicación. Los restos celulares se eliminaron centrifugando a 4°C durante 30 minutos a 20.000 *g*. La purificación se llevó a cabo utilizando el sistema de cromatografía ÄKTA Prime (Amershan Biosciences) inyectando la muestra en columnas de afinidad de 1 ml de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa (HisTrap HP).. La columna se equilibró con 10 volúmenes de SB2 suplementado con 5 mM de imidazol. El lisado bacteriano se filtró usando

membranas de un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  y se inyectó en la columna. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes de SB2 suplementado con 5mM imidazol, seguido de otro lavado con 10 volúmenes de SB2 suplementado con 100 mM de imidazol. La proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de 30 ml con SB2 100 mM y SB2 1M de imidazol. En el caso de las proteínas His-N $\Delta$ 294 y His-N $\Delta$ 1080, se llevó a cabo una purificación con tres columnas en tándem, siguiendo el mismo procedimiento indicado antes para His-ZDP (Ver apartado 11.1). Las proteínas se eluyeron en un gradiente de 30 ml con SB2 60 mM y SB2 1M para His-N $\Delta$ 294 o un gradiente de SB2 100 mM y SB2 1M para His-N $\Delta$ 1080. Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1ml/min a 4°C. Las proteínas eluidas se recogieron en fracciones de 0,5 ml y una alícuota de cada fracción se analizó mediante electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE. Aquellas que presentaban una única banda correspondiente a la proteína recombinante fueron mezcladas y dializadas durante 1 hora frente SD y durante toda la noche frente a SD suplementado con glicerol al 50%. Esta preparación se alícuotó, se determinó su concentración mediante el método Bradford y se congeló a -80°C.

Para la obtención de ROS1 fusionada a MBP, se utilizó la construcción pMAL-c2X-ROS1 previamente descrita en (Morales-Ruiz et al., 2006). Las condiciones para la expresión y purificación de la proteína recombinante MBP-ROS1 fueron las seguidas para la proteína MBP-ZDP (ver apartado 11.1), exceptuando que para la inducción de la expresión los cultivos se incubaron a 15°C durante 3 horas tras la adición de IPTG.

### **11.3. Expresión y purificación de XRCC1**

El cDNA de *XRCC1* se obtuvo mediante amplificación por PCR, con los cebadores XRCC1-Xho-F y XRCC1-Xba-R (Ver Tabla 3), sobre pZL1-XRCC1 (Arabidopsis Biological Resource Center, Clon 210J9). El fragmento amplificado se subclonó en el vector pGEMT-Easy (Promega), obteniéndose la construcción pGEM-XRCC1. Tras digestión con las enzimas de restricción SalI y NotI se obtuvo el fragmento que se clonó en el vector pET30b (New England Biolabs).

Se transformó la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) codon plus mediante transformación "rápida" para la expresión de la proteína His-XRCC1. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: una colonia transformante fresca se inoculó en 10 ml de LB con kanamicina (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y cloranfenicol (34  $\mu\text{g/ml}$ )

y se creció a 37 °C durante toda la noche con agitación hasta alcanzar estado estacionario. Una alícuota de 2,5 ml de este cultivo se reinoculó en 250 ml de LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0,7, momento en el que se induce la expresión proteica mediante la adición de 1 mM de IPTG. La incubación se prolongó 2 horas, tras las cuales, las células se recogieron centrifugando a 13.000 g durante 30 min a 4 °C y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

Los pellet bacterianos se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 3,5 ml de Solución de Sonicación 4\* (SB4) suplementado con 20 mM de imidazol y un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), y se rompieron mediante sonicación. Los restos celulares se eliminaron centrifugando a 4°C durante 30 min a 20.000 g. La muestra se inyectó en una columna de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa. Las columnas se equilibraron con 10 volúmenes de SB4 suplementado con 20 mM de imidazol, seguido de dos lavados consecutivos con 10 volúmenes de SB4 suplementado con 40 mM de imidazol, el primer lavado, y suplementado con 80 mM de imidazol, el segundo lavado. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 30 ml de SB4 80mM de imidazol a SB4 300 mM de imidazol. Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1ml/min a 4°C. Las proteínas eluidas se recogieron en fracciones de 0,5 ml y una alícuota de cada fracción se analizó mediante electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE. Aquellas que presentaban una única banda correspondiente a la proteína recombinante fueron mezcladas y dializadas durante 1 hora frente SB4 y durante toda la noche frente a SB4 suplementado con glicerol al 50%. Esta preparación se alicuotó, se determinó su concentración mediante el método Bradford y se congeló a -80°C.

*\*Solución de Sonicación 4 (SB4): 50mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; 10% glicerol; 0,1 mM de EDTA; 1 mM ditioneitol.*

Para obtener la proteína recombinante MBP-XRCC1, se realizó una digestión sobre pGEM-XRCC1 con las enzimas de restricción XhoI y XbaI. El fragmento resultante se clonó en el vector pADGAL4-2.1 (Stratagene) obteniéndose la construcción pGAD-XRCC1. Finalmente el cDNA de XRCC1 se obtuvo mediante digestión sobre pGAD-XRCC1 con las enzimas de restricción XhoI-PstI y posterior ligación del fragmento resultante en el vector pMAL-c2X.

Para la expresión y purificación de MBP-XRCC1 se procedió igual que para las proteínas MBP-ZDP y MBP-ROS (ver apartados 11.1y 11.2) pero con la

excepción de que la inducción de la expresión de la proteína se llevó a cabo por la adición de IPTG a 37°C durante 2 horas.

## **12. Detección de proteínas mediante Western Blot**

Esta técnica se utilizó para la detección de proteínas en los ensayos pull-down (ver apartado 13) y para la detección de las proteínas ZDP y His-XRCC1 con anticuerpos específicos.

### **12.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las proteínas se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis*) (Laemmli, 1970). Se utilizaron dos geles en paralelo, uno de ellos se tiñó coomassie y el otro se transfirió a una membrana para proceder a su posterior detección con anticuerpos.

#### **12.1.1. Preparación del gel**

Para un gel al 7,5% de acrilamida se preparó:

*GEL SEPARADOR* (5 ml): se mezclaron 1,25 ml de solución LGB\* (*Lower Gel Buffer*), 0,9 ml de 40% Acrilamida: Bis 37,5:1 (Bio-Rad) y 2,8 ml de agua. La polimerización se inició añadiendo 30 µl de 0,1% APS (v/v) (Persulfato de amonio) y 10 µl de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina).

*GEL CONCENTRADOR* (5 ml): se mezclaron 1,25 ml de solución UGB\*\* (*Upper Gel Buffer*), 0,5 ml de 40% Acrilamida: Bis 37,5:1 (Bio-Rad) y 3,25 ml de agua. Para permitir la polimerización se añadieron 30 µl de 0.1% APS v/v y 10 µl de Temed.

\*LGB: 1,5 M Tris-HCl pH 8.8; 0,4% SDS (p/v).

\*\*UGB: 0,5 M TrisHCl pH 6.8; 0,4% SDS (p/v).

### **12.1.2. Preparación de las muestras**

Las muestras a analizar se mezclaron con tampón de carga para proteínas\*, se desnaturalizaron durante 10 min a 100 °C, se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm y se aplicaron en el gel SDS-PAGE.

\**Tampón de carga para proteínas*: 50 mM Tris-HCl pH 6.8; 8% glicerol (v/v); 1,6% SDS (p/v); 4% β-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol (p/v).

### **12.1.3. Electroforesis**

La electroforesis se realizó en tampón Tris-Glicina\* a un voltaje constante de 180 V, en el sistema vertical *Mini Protean® cell* de Bio-Rad. Como patrón de peso molecular se utilizó una mezcla comercial de proteínas (Bio-Rad) compuesta por: miosina (200kDa), β-galactosidasa (116,25 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbumina (66,2kDa), ovalbumina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Para el gel que se transfirió a una membrana se utilizó un patrón de peso molecular (Precision Plus Protein Western c Standard, Bio-Rad) que contiene una mezcla de proteínas marcadas con peroxidasa. con tamaños comprendidos en un rango de 10 a 250 KDa.

\**Tampón Tris-Glicina*: 25 mM Tris (Trizma base); 192 mM glicina; 0,1% SDS (p/v) pH 8.3.

### **12.1.4. Tinción**

Los geles paralelos al de la transferencia se tiñeron con Solución de Coomassie\*. Para eliminar el exceso de tinción se lavaron con High Destain\*\* durante al menos 30 minutos y con Low Destain\*\*\* durante al menos 1 hora.

\**Solución de Coomassie*: 0,2% Coomassie Blue (brilliant blue R-250) (p/v); 60% metanol (v/v); 10% ácido acético (v/v).

\*\**High Destain solution*: 50% metanol (v/v); 10% ácido acético (v/v).

\*\*\**Low Destain solution*: 5% metanol (v/v); 7% ácido acético (v/v).

## **12.2. Transferencia**

Para que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Roche). La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia\* a un voltaje constante de 100 V durante

2 horas a 4°C o de 30 V durante toda la noche, en el sistema vertical *Mini Trans-Blot cell* de Bio-Rad.

\*Tampón de transferencia: 48 mM Tris (Trizma base); 39 mM glicina; 20% metanol; 0,04% SDS (p/v) pH 9.2.

### **12.3. Bloqueo**

Para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana, ésta se incubó en solución de bloqueo (BS)\* durante una hora a temperatura ambiente.

\**Solución de bloqueo (BS)*: 1% p/v de leche en polvo (Difco™ Skim Milk, BD) en solución de lavado (TBS-T)\*\*

\*\**Solución de lavado (TBS-T)*: 10 mM tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 0,05% de Tween-20.

### **12.4. Detección**

La detección de la proteína se llevó a cabo por la adición de anticuerpos específicos. Para la detección de proteínas con cola de histidinas se usó un anticuerpo monoclonal frente a cola de histidinas (His-Tag Monoclonal Antibody, Novagen) a una dilución 1:1.000 en BS. Para la detección de proteínas de fusión a MBP se usó un anticuerpo monoclonal frente a MBP (Monoclonal Anti-Maltose Binding Protein, Sigma) a una dilución 1:5.000 en BS. En ambos casos la incubación con el anticuerpo primario se realizó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección de ZDP en extractos celulares de plantas, se usó un anticuerpo Anti-ZDP a una dilución 1:1.000 en BS. Este anticuerpo fue generado mediante inmunización de conejos con la porción C-terminal de la proteína (aminoácidos 468-694) y posterior purificación por cromatografía de afinidad. Para la detección de His-XRCC1, se usó un anticuerpo policlonal frente a la proteína XRCC1 de *Oryza sativa*, a una dilución 1:10.000 en BS. Este antisero fue donado por Kengo Sakaguchi (Universidad de Tokio, Japón). En ambos casos la incubación se realizó en agitación a 4°C durante toda la noche.

Tras lavar las membranas dos veces durante 20 minutos con TBS-T, se añadió el anticuerpo secundario. Para los anticuerpos monoclonales comerciales

(anti-His y anti-MBP) se usó como secundario un anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-mouse horseradish peroxidase-linked, Amersham). En el caso de proteínas con cola de histidinas el anticuerpo se añadió a una dilución de 1:5.000 en BS. En el caso de proteínas de fusión a MBP, el anticuerpo secundario se diluyó 1:25.000. Para los anticuerpos policlonales (anti-ZDP y anti-XRCC1), se usó como secundario un anticuerpo conjugado con peroxidasa producido en conejo (anti-rabbit IgG secondary antibody, Sigma). Las diluciones usadas fueron de 1:5.000 en BS en el caso de ZDP y 1:10.000 en BS, en el caso de XRCC1. En todos los casos la incubación se llevó a cabo en agitación 1 hora a temperatura ambiente, seguidos de dos lavados de 20 minutos con TBS-T. Para la detección se usó como sustrato de la peroxidasa los agentes de detección ECL (Amersham). Se añadió 500 µl de la solución A y 500 µl de la solución B. Tras esperar 2 minutos a que se produjera la reacción la membrana se reveló usando una cámara CCD (Fujifilm Intelligent Dark Box Las 3000).

## **13. Análisis de la interacción entre proteínas mediante ensayos pull-down**

### **13.1. Pull-down usando proteínas de fusión a MBP como cebo y proteínas de fusión a cola de histidinas como presa**

Los ensayos pull-down permiten la detección *in vitro* de interacciones entre dos o más proteínas. En ellos se inmoviliza una proteína, a la que se denomina proteína cebo, y tras incubación con otra proteína o con una mezcla proteica, se analiza con que proteína/s interacciona. Las proteína/s con la que interacciona la proteína cebo se denominan proteína/s presa. La proteína/s presa se detectan posteriormente mediante ensayo Western.

Para el análisis de la interacción por pull-down entre MBP-XRCC1 y MBP-ROS1 con His-ROS1 y His-ZDP, respectivamente, se procedió de la siguiente manera: se aplicó 100 µl de resina de amilosa (New England Biolabs) a una columna *spin* de 900 µl (Handee Spin Columns-Screw Cap, Pierce) y se equilibró con CB. Se le añadió a la columna 100 µl de Solución de Unión 1\*(SU1) conteniendo 50 pmol de la proteína cebo (MBP-XRCC1 o MBP-ROS1) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Tras esta primera incubación la columna se centrifugó a 800 rpm durante 1 min. La resina se lavó dos veces con 600 µl de Solución de

Unión 2\*\*(SU2). Tras los lavados, queda en la columna la proteína cebo unida a la matriz de amilosa. Se añadió a la columna 12 pmol de la proteína presa (His-ROS1 o His-ZDP) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Como control, se utilizaron columnas que solo contenían la proteína de unión a la maltosa (MBP) unida a la matriz de amilosa, así descartamos uniones inespecíficas de la proteína presa a la MBP. Mediante centrifugación a 800 rpm durante 1 minuto, eliminamos todas las proteínas que no quedan retenidas en la columna. La resina se lavó 2 veces con SU2 y se le añadió 60 µl de tampón de carga para proteínas. Tras ser tratadas, las muestras se aplicaron a un gel SDS-PAGE al 7,5% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos frente a la cola de histidinas (Novagen).

\*Solución de Unión 1 (SU1): 20 mM Tris pH 7.4; 200 mM NaCl; 1mM EDTA; 10 mM β- mercaptoetanol.

\*\*Solución de Unión 2 (SU2): 20 mM Tris pH 7.4; 1 mM EDTA; 10 mM β-mercaptoetanol; 0.5% Tritón X-100.

### **13.2. Pull-down usando proteínas de fusión a cola de histidinas como cebo y proteínas de fusión a MBP como presa**

Este ensayo se utilizó para confirmar la interacción de ROS1 con ZDP y XRCC1 y para localizar la región de ROS1 responsable de estas interacciones. Además, también se usó para analizar la interacción entre ZDP y XRCC1. Para ello se utilizó como proteína cebo His-ROS1, sus versiones truncadas o His-ZDP. En cada uno de los casos se le añadió como proteína presa MBP-ZDP o MBP-XRCC1, exceptuando para His-ZDP, en donde se testó su interacción con MBP-XRCC1.

Se procedió de la siguiente manera: se aplicó 100 µl de resina de Ni<sup>2+</sup>-Sefarosa (Amersham) a la columna y se equilibró con Solución de Unión 3\*(SU3). Se le añadió a la columna 400 µl de SU3 conteniendo 50 pmol de la proteína cebo (His-ROS1, sus versiones truncadas o His-ZDP) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Tras una centrifugación de 1 minuto a 800 rpm, la resina se lavó dos veces con Solución de Unión 2\* (SU2) suplementado con 60 mM de imidazol. A continuación, se añadió 12 pmol de la proteína presa (MBP-ZDP o MBP-XRCC1) y se incubó 1 hora a 4°C. Como control se usó una columna que solo contenía resina de sefarosa, además, se añadió a una de las columnas la

proteína MBP para descartar uniones inespecíficas entre MBP y las proteínas presa. Con la adición de imidazol evitamos que las proteínas se unan de forma inespecífica a la resina de sefarosa. Se centrifugaron las columnas durante 1 minuto a 800 rpm. La resina se lavó 2 veces con SU2 suplementado con 60 mM de imidazol y se le añadió 60 µl de tampón de carga para proteínas. Tras ser tratadas, las muestras se aplicaron a un gel SDS-PAGE al 7,5% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos frente MBP (Sigma).

\*Solución de Unión 3 (SU3): 20 mM Tris pH 8.0; 500 mM NaCl

## **14. Aislamiento de extractos celulares de la planta**

Se aislaron extractos celulares de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecida durante 15 días en placas petri. Se machacó 500 mg del tejido vegetal en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se resuspendió en 1 ml de solución de extracción\* con inhibidores de proteasas específicos de plantas (Calbiochem) y se incubó en hielo durante 30 min. Para eliminar la parte insoluble del extracto, éste se centrifugó a 13.500 rpm durante 1 hora a 4°C. La parte soluble se filtró con un monodur de 20 µm y se dializó frente a solución de diálisis de extractos\*\* durante toda la noche. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

\*Solución de extracción: 25 mM HEPES KOH pH 7.8; 100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM Sacarosa; 10% glicerol (v/v); 1 mM DTT.

\*\*Solución de diálisis de extractos: 25 mM HEPES KOH pH 7.8; 100 mM KCl; 17% glicerol (v/v); 2 mM DTT.

## **15. Análisis de la actividad enzimática**

### **15.1. Preparación de los oligonucleótidos sintéticos**

Los oligonucleótidos usados como sustratos en reacciones enzimáticas (Ver Tabla 7) fueron purificados mediante PAGE (*Polyacrilamide Gel*

*Electroforesis*) y adquiridos en Operon. Estos oligonucleótidos se encuentran marcados con fluoresceína o con Alexa-Fluor en el extremo 5' o en el extremo 3'. Para la obtención de sustratos de doble cadena, 5 pmol/ $\mu$ l del oligonucleótido marcado se mezcló en 10mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM NaCl con 10 pmol/ $\mu$ l del oligonucleótido complementario correspondiente en un volumen final 5  $\mu$ l. La mezcla se calentó a 95° C durante 5 min y se dejó enfriar lentamente hasta que alcanzó la temperatura ambiente.

## **15.2. Análisis de la actividad 3'-fosfatasa de ZDP**

Para analizar la actividad fosfatasa de ZDP sobre el producto de ROS1, se incubó 37,5 nM de ROS1 con 40 nM de sustrato de doble cadena con un residuo de 5-meC en una mezcla de reacción que contenía 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA en un volumen final de 50  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 30 °C durante 16 horas y la reacción se detuvo añadiendo proteinasa K mix\* e incubando a 37°C durante 30 min. A continuación, para precipitar el DNA, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (Sigma) y tras centrifugar, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadió 0,3 mM NaCl , 16  $\mu$ g/ml de glicógeno y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA se precipitó a -20°C, durante al menos 20 min. Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min y se lavó con 200  $\mu$ l de etanol al 70%. Los productos de reacción de ROS1 se resuspendieron en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10% glicerol (v/v) y 1.5 nM de proteína ZDP purificada, en un volumen total de 15  $\mu$ l y se incubó a 30°C. La reacción se detuvo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 min) y el DNA se precipitó como se ha indicado anteriormente. Las muestras se resuspendieron en 10  $\mu$ l de 90% formamida (v/v), se calentaron a 95°C durante 5 min y se separaron cargándolas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15%, 7 M de urea. El DNA marcado con fluoresceína se visualizó empleando el láser azul del sistema de imagen FLA-5100 y se analizó con el software Multigaugue de Fujifilm.

Para comprobar si el extremo 3'-OH generado por ZDP era un sustrato adecuado para DNA polimerasas, el producto de ROS1, obtenido como se indicó anteriormente, se incubó con 6 nM de ZDP purificada en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10 % glicerol (v/v), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de DNA polimerasa  $\beta$  humana (Trevigen) y 0.2 mM de dCTP en un volumen total de 15  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30

min. Las muestras se trataron, se separaron y analizaron como se indicó anteriormente.

Para ver el efecto de XRCC1 sobre la actividad de ZDP se usaron sustratos de DNA conteniendo un hueco flanqueado por dos grupos fosfato. Se incubó 0,09 nM de la proteína ZDP con 0,9 nM de XRCC1 en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10% glicerol (v/v) y 20 nM de sustrato de doble cadena en un volumen total de 50  $\mu$ l y se incubó a 30°C. Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (1, 2,5, 15, 30, 60 y 120 minutos). Como control se realizó la misma cinética pero en reacciones que no contenían XRCC1. Las muestras se trataron, se separaron y analizaron como se indicó anteriormente

*\*Proteinasa K mix: 20 mM EDTA; 0,6% SDS (p/v) y 0,5 mg/ml proteinasa K*

### **15.3. Análisis de la actividad DNA glicosilasa de ROS1: efecto de ZDP y XRCC1**

Para ver si las proteínas ZDP y XRCC1 tienen algún efecto sobre la actividad de ROS1, se usaron como sustrato DNA que contiene tres grupos metilo. En el caso del estudio del efecto de ZDP sobre la actividad de ROS1 se utilizó además sustratos de DNA conteniendo un solo grupo metilo (Ver Tabla 7). Se incubó 18 nM de ROS1 con 40 nM de sustrato de doble cadena en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10% glicerol (v/v) y 144 nM de ZDP en un volumen final de 50  $\mu$ l. O bien ROS1 se incubó con el sustrato en una mezcla de reacción que contenía 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA y 18 nM de XRCC1 en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las mezclas se incubaron a 30 °C y la reacción se detuvo a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24 horas) añadiendo proteinasa K mix. El DNA se precipitó tal y como se indica en el apartado anterior. Las muestras se resuspendieron en 10  $\mu$ l de 90% formamida (v/v), se calentaron a 95°C durante 5 min y se separaron cargándolas en un gel desnaturalizante al 12%, 7 M de urea. Para el caso del análisis del efecto de ZDP en la actividad de ROS1 sobre un sustrato con un grupo metilo, las muestras se separaron en un gel mediano al 12%, 7 M de urea. El DNA marcado con fluoresceína se visualizó y analizó empleando sistema de imagen FLA-5100 y software Multigauge de Fujifilm.

## **16. Análisis de la interacción DNA-proteína mediante ensayos de retardo en gel**

Para el estudio de la interacción de ZDP con el producto de reacción de ROS1, se utilizaron como sustrato oligonucleótidos de doble cadena marcados con Alexa-Fluor que contienen un hueco flanqueado por dos grupos fosfato (Ver Tabla 7). Se incubó 100 nM de sustrato, 0.1  $\mu$ M de ROS1 y diferentes cantidades de ZDP (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1 y 1,2  $\mu$ M) en 15  $\mu$ l finales de una mezcla de reacción que contenía 10 nM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10  $\mu$ g/ml BSA y 1 mM EDTA.

Para el análisis de la unión de XRCC1 a productos intermediarios de una ruta de desmetilación de DNA y BER, se emplearon sustratos con diferentes modificaciones y marcados con Alexa-Fluor (Ver Tabla 7). En este caso la mezcla de reacción contenía: 100 nm de sustrato de doble cadena, diferentes cantidades de XRCC1 (1, 2, 4, 6 y 8  $\mu$ M), 10 nM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10  $\mu$ g/ml BSA y 1 mM EDTA en 15  $\mu$ l finales.

En ambos casos, tras 60 minutos de incubación a 25°C, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.2%. La electroforesis se realizó a un voltaje de 80V durante 40 min a temperatura ambiente. El DNA marcado se visualizó empleando el sistema de imagen FLA-5100 y se analizó con el software Multigaue de Fujifilm.

## **17. Aislamiento y caracterización de plantas mutantes**

Para determinar la función *in vivo* de las proteínas ZDP y XRCC1 se identificaron y caracterizaron mutantes por inserción de T-DNA en los genes correspondientes. Se realizó una búsqueda en la base de datos SIGNAL (<http://signal.SALK.edu/about.html>), que incluye datos sobre mutantes generados al azar por inserción de T-DNA (Alonso and Stepanova, 2003) y se identificaron tres líneas mutantes SAIL\_60\_C08, SAIL\_813\_B03 y SALK\_130907 con inserciones en el gen *ZDP*. A continuación, se procedió a asignar genotipos en las poblaciones segregantes mediante PCR (Ver apartado 8.3) y a confirmar la posición exacta del punto de inserción en cada una de las líneas. En el caso de las líneas mutantes en el gen *XRCC1*, se confirmó el genotipo de las plantas

homocigotas *xrcc1*<sup>-/-</sup> correspondientes a la línea SALK\_027362 suministradas por Charles White de la Universidad Blaise Pascal, Francia.

### **17.1. Análisis de actividad fosfatasa en extractos de plantas mutantes**

Para analizar si las plantas mutantes *zdp* retenían la actividad fosfatasa sobre un sustrato que contiene un hueco flanqueado por dos grupos fosfato, se incubó 20 nM de sustrato de doble cadena con 45 µg de extracto proteico procedente de plantas silvestres y plantas mutantes *zdp* (ver apartado 14 para la obtención de extracto proteico), a 30°C, en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT y 10 % glicerol (v/v) en un volumen final de 50 µl. La reacción se detuvo a diferentes tiempos (0, 10, 30, 60 y 120 min) añadiendo proteinasa K mix e incubando a 37°C durante 30 min. A continuación, para precipitar el DNA, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (Sigma) y tras centrifugar la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadió 0,3 mM NaCl, 16 µg/ml de glicógeno y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA se precipitó a -20°C, durante al menos 20 min. Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min y se lavó con 200 µl de etanol al 70%. Las muestras se resuspendieron en 10 µl de 90% formamida (v/v), se calentaron a 95°C durante 5 min y se separaron cargándolas en un gel desnaturante al 15%, 7 M de urea. El DNA marcado con Alexa-Fluor se visualizó empleando el sistema de imagen FLA-5100 y se analizó con el software Multigauge de Fujifilm.

### **17.2. Análisis de la capacidad de reparación completa de plantas mutantes**

Para analizar la capacidad de las plantas mutantes *zdp*, *xrcc1* o de plantas silvestres de rellenar y ligar el hueco generado durante la reacción de desmetilación iniciada por ROS1, se realizaron ensayos donde se usó como sustrato oligonucleótidos de doble cadena conteniendo un gap flanqueado por dos grupos fosfato o el producto de reacción de ROS1.

Excepto en los casos donde se especifican otras condiciones (Ver Sección de Resultados), cada mezcla de reacción contenía 45 mM HEPES-KOH pH 7.8, 70 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.4 mM EDTA, 2 mM ATP, 36 µg de BSA, 1 mM NAD, 2 % glicerol (v/v), 20 µM de dNTPs (dCTP, dGTP, dATP y dTTP,

excepto donde se indique), 2 mM ATP, 22 mM fosfocreatina, 0.25 ng de creatina fosfoquinasa, 20 nM de sustrato o producto de reacción de ROS1 (obtenido como se indica en el apartado 15.2) y 45 µg de extracto proteico procedentes de plantas silvestres o mutantes (*zdp<sup>-/-</sup>*, *xrcc1<sup>-/-</sup>* o *arp<sup>-/-</sup>*), en un volumen final de 50 µl. Tras incubar la mezcla durante 3 h a 30°C, las reacciones se detuvieron añadiendo proteinasa K mix e incubando a 37°C durante 30 min. A continuación, para precipitar el DNA, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (Sigma) y tras centrifugar la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadió 0,3 mM NaCl, 16 µg/ml de glicógeno y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA se precipitó a -20°C, durante al menos 20 min, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min y se lavó con 200 µl de etanol al 70%. Las muestras se resuspendieron en 10 µl de 90% formamida (v/v) y se calentaron a 95°C durante 5 min. En los casos donde se indique, las muestras se resuspendieron en 5 µl de SuRE/Cut Buffer L, que contenía 5 U de la enzima de restricción HpaII (Roche) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron añadiendo 5 µl de 90% formamida (v/v) y se calentaron a 95°C durante 5 min. Los productos de reacción se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%, 7 M de urea, se visualizaron mediante el sistema de imagen FLA-5100 y se analizaron con el software Multigauge de Fujifilm.

### **17.3. Estudio de la sensibilidad a estrés oxidativo y a agentes alquilantes en plantas mutantes**

Se sembraron 20-25 semillas de cada genotipo (silvestre, *zdp-1* y *zdp-2*) en medio MS+Sacarosa, en placas petri (12x12 cm) donde previamente habíamos colocado un filtro. La germinación de las semillas se sincronizó incubando las placas a 4 °C durante 48 horas. Tras este tiempo, se colocaron en cámaras de crecimiento con tubos fluorescentes (36 W, 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) a una temperatura de 23 ± 1 °C. Cuando aparecieron las dos primeras hojas verdaderas (aproximadamente 10 días), los filtros con las plántulas se transfirieron a placas que contenían MS+Sacarosa con cantidades crecientes de metilmetanosulfonato, MMS, (0, 25, 75, 100 y 150 ppm) (Sigma) o peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (0, 0,1, 2 y 5 mM) (Sigma). Tras prolongar dos semanas el crecimiento, las placas se escanearon y se analizaron los resultados.

## **18. Análisis de bioluminiscencia en plántulas**

Para estudiar el papel de ZDP en el silenciamiento transcripcional, se analizó la expresión del transgen RD29A-LUC y del correspondiente gen RD29A endógeno en plantas mutantes (*zdp-1*, *zdp-2* y *ros1-4*) y plantas silvestres (C-24). Las plantas se crecieron en placas de petri durante 15 días a 23°C y durante 2 días a 4°C. Para detectar la luminiscencia, las plantas se pulverizaron con luciferina 1 mM, y tras 5 min se tomó una imagen con una cámara CCD (Ishitani et al., 1997) Las placas se analizaron antes y después del tratamiento a baja temperatura.

## **19. Análisis de la metilación de DNA**

### **19.1. Análisis de la metilación de DNA mediante CHOP-PCR**

Para el análisis de la metilación del promotor del gen *RD29A* se digirió 1 µg de DNA genómico con una enzima de restricción sensible a metilación (BstUI para el promotor del transgen *RD29A-LUC*, y BsmAI para el promotor endógeno), realizando en paralelo como control una incubación sin enzima. A continuación, 1 µl de de cada mezcla de reacción se usó como molde en una PCR con cebadores específicos de la zona a analizar (Ver Tabla 4), y los productos se separaron en un gel de agarosa al 1 %

### **19.2. Análisis de la metilación de DNA del genoma completo usando tiling arrays**

Se aisló DNA genómico de plántulas de *Arabidopsis thaliana* tras 15 días de crecimiento, usando el DNeasy Plant Maxi kit (Qiagen). Tras fragmentar el DNA por sonicación, se incubaron 2 mg del DNA sonificado con 20 µl de anticuerpo anti-5-metilcitosina (Anti-5-methylcytosine mouse mAb, Calbiochem) en 600 µl de solución de inmunoprecipitación\* (IB). Tras incubar la muestra a 4°C durante toda la noche, se añadieron 100 µl de proteína A/G sefarosa (GE Healthcare) y se continuó la incubación a 4°C durante 8 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó y se lavó 6 veces con 600 µl de IB. El DNA inmunoprecipitado se recuperó con tres eluciones consecutivas de 200 µl de TE\*\* suplementado con 1.5 % SDS, 0.5 % SDS y 0.1 % SDS,

respectivamente. Tras mezclar las tres eluciones, el DNA se recuperó mediante una extracción con fenol: cloroformo seguida de una precipitación con etanol. Finalmente, el DNA inmunoprecipitado se resuspendió en TE.

El DNA inmunoprecipitado y 500 ng de DNA control sin inmunoprecipitar se sometieron a una amplificación lineal usando la RNA polimerasa de T7 (Zilberman et al., 2007). De cada reacción se tomó una alícuota de 5 µg de RNA que se convirtió en DNA bicatenario mediante el SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis kit (Invitrogen) y se marcó con los fluoróforos Cy3 y Cy5, respectivamente. Las muestras marcadas se enviaron a NimbleGen (<http://www.nimblegen.com/>) para su hibridación con un microarray que contenía 382.178 sondas que cubren el genoma completo de *Arabidopsis thaliana* (Zilberman et al., 2007). Las diferencias entre las señales normalizadas de plantas mutantes y silvestres fueron calculadas y ordenadas a lo largo de cada cromosoma, de acuerdo con la posición de las sondas, y a continuación se usó el algoritmo TAMALg (Bieda et al., 2006) para identificar las regiones que mostraban una metilación diferencial.

\**Solución de inmunoprecipitación (IB)*: 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA

\*\* *TE*: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8.0

### **19.3. Secuenciación de DNA modificado con bisulfito**

Se purificó DNA genómico de plantas silvestres y mutantes *zdp* empleando el *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). El tratamiento con bisulfito sódico se llevó a cabo con 100 ng de DNA total, empleando el *BisulFlash DNA Modification Kit* (Epigentek) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, 1 µl de DNA modificado se usó para cada reacción de PCR, que se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl usando la polimerasa ExTaq (Takara) y cebadores específicos de cada región a analizar (Ver Tabla 5). Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada locus se secuenciaron más de 8 clones independientes. Los resultados de la secuenciación se analizaron con CyMATE-v2 (<http://www.gmi.oeaw.ac.at/en/cymate-index/cymate-v2/>) (Hetzl et al., 2007).

## **20. Inmunolocalización**

La localización por inmunofluorescencia se llevó a cabo usando hojas de plantas silvestres tras 2-3 semanas de crecimiento, tal y como se describe en (Li et al., 2006). Las preparaciones de núcleos se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpo anti-ZDP, anti-cMyc (Millipore) y anti-Flag (Sigma). Los anticuerpos primarios se visualizaron mediante anticuerpos secundarios de ratón conjugados con Alexa-488 y de conejo conjugados con Alexa-594, a una dilución 1:200 durante 2 horas a 37°C. El DNA se detectó mediante contratinción con DAPI (Invitrogen). Los núcleos se analizaron usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800i.



## **REFERENCIAS**



- Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11796-11801.
- Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
- Alonso, J.M. and Stepanova, A.N. (2003) T-DNA mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol Biol*, **236**, 177-188.
- Andreuzza, S., Li, J., Guitton, A.E., Faure, J.E., Casanova, S., Park, J.S., Choi, Y., Chen, Z. and Berger, F. (2009) DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **137**, 73-81.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. and Hannon, G.J. (2007) Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*, **316**, 744-747.
- Babiychuk, E., Cottrill, P.B., Storozhenko, S., Fuangthong, M., Chen, Y., O'Farrell, M.K., Van Montagu, M., Inze, D. and Kushnir, S. (1998) Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J*, **15**, 635-645.
- Babiychuk, E., Kushnir, S., Van Montagu, M. and Inze, D. (1994) The Arabidopsis thaliana apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3299-3303.
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F. and Niehrs, C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, **445**, 671-675.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- Baute, J. and Depicker, A. (2008) Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **43**, 239-276.
- Beck, S., Olek, A. and Walter, J. (1999) From genomics to epigenomics: a loftier view of life. *Nat Biotechnol*, **17**, 1144.
- Bender, J. (2004a) Chromatin-based silencing mechanisms. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 521-526.
- Bender, J. (2004b) DNA methylation and epigenetics. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 41-68.
- Bennetzen, J.L. (2005) Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 621-627.
- Bernstein, E. and Allis, C.D. (2005) RNA meets chromatin. *Genes Dev*, **19**, 1635-1655.
- Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**, 2395-2402.

- Betti, M., Petrucco, S., Bolchi, A., Dieci, G. and Ottonello, S. (2001) A plant 3'-phosphoesterase involved in the repair of DNA strand breaks generated by oxidative damage. *J Biol Chem*, **276**, 18038-18045.
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N. and Szyf, M. (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, **397**, 579-583.
- Bieda, M., Xu, X., Singer, M.A., Green, R. and Farnham, P.J. (2006) Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Res*, **16**, 595-605.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.
- Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
- Boland, M.J. and Christman, J.K. (2008) Characterization of Dnmt3b:thymine-DNA glycosylase interaction and stimulation of thymine glycosylase-mediated repair by DNA methyltransferase(s) and RNA. *J Mol Biol*, **379**, 492-504.
- Bonato, D., Revers, L.F., Brendel, M. and Henriques, J.A. (2005) The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Braz J Med Biol Res*, **38**, 321-334.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. and Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J*, **11**, 68-76.
- Bostick, M., Kim, J.K., Esteve, P.O., Clark, A., Pradhan, S. and Jacobsen, S.E. (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, **317**, 1760-1764.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Breslin, C. and Caldecott, K.W. (2009) DNA 3'-phosphatase activity is critical for rapid global rates of single-strand break repair following oxidative stress. *Mol Cell Biol*, **29**, 4653-4662.
- Britt, A.B. (2002) *Repair of Damaged Bases*.
- Bruniquel, D. and Schwartz, R.H. (2003) Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol*, **4**, 235-240.
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. and Shall, S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4387-4394.
- Caldecott, K.W., McKeown, C.K., Tucker, J.D., Ljungquist, S. and Thompson, L.H. (1994) An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol*, **14**, 68-76.

- Caldecott, K.W., Tucker, J.D., Stanker, L.H. and Thompson, L.H. (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4836-4843.
- Callebaut, I. and Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, **400**, 25-30.
- Campalans, A., Marsin, S., Nakabeppu, Y., O'Connor T, R., Boiteux, S. and Radicella, J.P. (2005) XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 826-835.
- Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M.F., Huang, M.S., Matzke, M. and Jacobsen, S.E. (2003) Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol*, **13**, 2212-2217.
- Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002) Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol*, **12**, 1138-1144.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G. and Hannon, G.J. (2007) MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, **12**, 503-514.
- Casadesus, J. and Low, D. (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 830-856.
- Cedar, H. and Bergman, Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, **10**, 295-304.
- Ciccone, D.N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E. and Chen, T. (2009) KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, **461**, 415-418.
- Cliffe, L.J., Kieft, R., Southern, T., Birkeland, S.R., Marshall, M., Sweeney, K. and Sabatini, R. (2009) JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1452-1462.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, **452**, 215-219.
- Córdoba-Cañero, D., Dubois, E., Ariza, R.R., Doutriaux, M.P. and Roldán-Arjona, T. (2010) Arabidopsis uracil DNA glycosylase (UNG) is required for base excision repair of uracil and increases plant sensitivity to 5-fluorouracil. *J Biol Chem*, **285**, 7475-7483.
- Córdoba-Cañero, D., Morales-Ruiz, T., Roldán-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2009) Single-nucleotide and long-patch base excision repair of DNA damage in plants. *Plant J*, **60**, 716-728.
- Córdoba-Cañero, D., Roldán-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2011) Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J*, **68**, 693-702.

- Cortazar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A.L., Siegrist, F., Steinacher, R., Jiricny, J., Bird, A. and Schar, P. (2011) Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*, **470**, 419-423.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi, M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L. and Bellacosa, A. (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, **146**, 67-79.
- Chan, S.W., Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet*, **6**, 351-360.
- Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, **303**, 1336.
- Charbonnel, C., Gallego, M.E. and White, C.I. (2010) Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in *Arabidopsis* plants. *Plant J*, **64**, 280-290.
- Chaudhury, A.M., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E.S. and Peacock, W.J. (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4223-4228.
- Chen, T. and Li, E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol*, **60**, 55-89.
- Cheng, X. (1995) DNA modification by methyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 4-10.
- Choi, C.S. and Sano, H. (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, **277**, 589-600.
- Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E. and Fischer, R.L. (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*, **110**, 33-42.
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, **277**, 1996-2000.
- Dany, A.L. and Tissier, A. (2001) A functional OGG1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 293-301.
- Demple, B. and Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*, **63**, 915-948.
- Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q. and Muegge, K. (2001) Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev*, **15**, 2940-2944.

- Denver, D.R., Swenson, S.L. and Lynch, M. (2003) An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases. *Mol Biol Evol*, **20**, 1603-1611.
- Dianova, II, Sleeth, K.M., Allinson, S.L., Parsons, J.L., Breslin, C., Caldecott, K.W. and Dianov, G.L. (2004) XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2550-2555.
- Doerfler, W. (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem*, **52**, 93-124.
- Doherty, A.J., Serpell, L.C. and Ponting, C.P. (1996) The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2488-2497.
- Douet, J., Blanchard, B., Cuvillier, C. and Tourmente, S. (2008) Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1783-1791.
- Ebbs, M.L., Bartee, L. and Bender, J. (2005) H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. *Mol Cell Biol*, **25**, 10507-10515.
- Ebbs, M.L. and Bender, J. (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the Arabidopsis SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell*, **18**, 1166-1176.
- Egger, G., Jeong, S., Escobar, S.G., Cortez, C.C., Li, T.W., Saito, Y., Yoo, C.B., Jones, P.A. and Liang, G. (2006) Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14080-14085.
- Ehrlich, M. (2002) DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr*, **132**, 2424S-2429S.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A. and Gehrke, C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, **10**, 2709-2721.
- Engel, N., Tront, J.S., Erinle, T., Nguyen, N., Latham, K.E., Sapienza, C., Hoffman, B. and Liebermann, D.A. (2009) Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice. *Epigenetics*, **4**, 98-99.
- Esteller, M. (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol*, **4**, 351-358.
- Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, **8**, 286-298.
- Falnes, P.O., Johansen, R.F. and Seeberg, E. (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in Escherichia coli. *Nature*, **419**, 178-182.

- Feinberg, A.P., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, **7**, 21-33.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Feng, S. and Jacobsen, S.E. (2011) Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biol*.
- Feng, S., Jacobsen, S.E. and Reik, W. (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, **330**, 622-627.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R. (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet*, **3**, 329-341.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1998) DNA Methylation in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 223-247.
- Finnegan, E.J. and Kovac, K.A. (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol*, **43**, 189-201.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 217-223.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J. and Dogliotti, E. (1999) The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem*, **274**, 15230-15236.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, **37**, 3575-3580.
- Frank, D., Keshet, I., Shani, M., Levine, A., Razin, A. and Cedar, H. (1991) Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature*, **351**, 239-241.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Fromme, J.C. and Verdine, G.L. (2003) Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate. *Embo J*, **22**, 3461-3471.
- Garcia-Diaz, M., Dominguez, O., Lopez-Fernandez, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Parraga, M., Garcia-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernad, A. and Blanco, L. (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, **301**, 851-867.
- Garcia-Ortiz, M.V., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. (2001) An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine DNA glycosylase/lyase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **47**, 795-804.

- Gehring, M., Bubb, K.L. and Henikoff, S. (2009) Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science*, **324**, 1447-1451.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B. and Fischer, R.L. (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell*, **124**, 495-506.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **74**, 481-514.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldan-Arjona, T., David, L. and Zhu, J.K. (2002) ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, **111**, 803-814.
- Gong, Z. and Zhu, J.K. (2011) Active DNA demethylation by oxidation and repair. *Cell Res*, **21**, 1649-1651.
- Gowher, H., Leismann, O. and Jeltsch, A. (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *Embo J*, **19**, 6918-6923.
- Grace Goll, M. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **74**, 481-514.
- Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, **8**, 35-46.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L. and Song, H. (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, **145**, 423-434.
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R. and Surani, M.A. (2008) Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*, **452**, 877-881.
- Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P. and Surani, M.A. (2010) Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, **329**, 78-82.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hayes, J.J. and Hansen, J.C. (2001) Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 124-129.
- He, X.J., Chen, T. and Zhu, J.K. (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res*, **21**, 442-465.
- He, X.J., Hsu, Y.F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.L., Wang, C.S., Jin, H. and Zhu, J.K. (2009) An effector of RNA-directed DNA methylation in arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell*, **137**, 498-508.
- Hemberger, M., Dean, W. and Reik, W. (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 526-537.

- Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E. (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, **447**, 418-424.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. and Bird, A. (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev*, **15**, 710-723.
- Henikoff, S. and Ahmad, K. (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 133-153.
- Hetzl, J., Foerster, A.M., Raidl, G. and Mittelsten Scheid, O. (2007) CyMATE: a new tool for methylation analysis of plant genomic DNA after bisulphite sequencing. *Plant J*, **51**, 526-536.
- Hodges, E., Smith, A.D., Kendall, J., Xuan, Z., Ravi, K., Rooks, M., Zhang, M.Q., Ye, K., Bhattacharjee, A., Brizuela, L., McCombie, W.R., Wigler, M., Hannon, G.J. and Hicks, J.B. (2009) High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing. *Genome Res*, **19**, 1593-1605.
- Holliday, R. (2005) DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 500-504.
- Hsieh, T.F. and Fischer, R.L. (2005) Biology of chromatin dynamics. *Annu Rev Plant Biol*, **56**, 327-351.
- Hsieh, T.F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L. and Zilberman, D. (2009) Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science*, **324**, 1451-1454.
- Hu, J.J., Smith, T.R., Miller, M.S., Lohman, K. and Case, L.D. (2002) Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Environ Mol Mutagen*, **39**, 208-215.
- Huang, J., Fan, T., Yan, Q., Zhu, H., Fox, S., Issaq, H.J., Best, L., Gangi, L., Munroe, D. and Muegge, K. (2004) Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res*, **32**, 5019-5028.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2006) Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *Embo J*, **25**, 2828-2836.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A.J. and Matzke, M. (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1769**, 358-374.
- Huffman, J.L., Sundheim, O. and Tainer, J.A. (2005) DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res*, **577**, 55-76.
- Huh, J.H., Bauer, M.J., Hsieh, T.F. and Fischer, R.L. (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell*, **132**, 735-744.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J.K. (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and

- convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, **9**, 1935-1949.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. and Jacobsen, S.E. (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, **112**, 308-315.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, **416**, 556-560.
- Jacobsen, S.E. and Meyerowitz, E.M. (1997) Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science*, **277**, 1100-1103.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A. and Cheng, X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, **449**, 248-251.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W. and Lasko, D.D. (1999) Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem*, **274**, 24176-24186.
- Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, **3**, 415-428.
- Jones, P.A. and Laird, P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, **21**, 163-167.
- Jost, J.P., Oakeley, E.J., Zhu, B., Benjamin, D., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, Y.C. (2001) 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4452-4461.
- Jullien, P.E., Kinoshita, T., Ohad, N. and Berger, F. (2006) Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell*, **18**, 1360-1372.
- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. and Razin, A. (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, **6**, 705-714.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F. and Reid, G. (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, **452**, 112-115.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L. and Richards, E.J. (2003) *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, **163**, 1109-1122.

- Kapoor, A., Agius, F. and Zhu, J.K. (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett*, **579**, 5889-5898.
- Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D.J., Sgouros, J., Miller, G.G., Fakhrai, H., Davis, E.M., Le Beau, M.M. and Weinfeld, M. (1999) Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem*, **274**, 24187-24194.
- Kersh, E.N., Fitzpatrick, D.R., Murali-Krishna, K., Shires, J., Speck, S.H., Boss, J.M. and Ahmed, R. (2006) Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol*, **176**, 4083-4093.
- Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y., Kinoshita, Y., Cao, X., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L. and Kakutani, T. (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. *Science*, **303**, 521-523.
- Kisseljova, N.P. and Kisseljov, F.L. (2005) DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 743-752.
- Klose, R.J. and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 89-97.
- Kress, C., Thomassin, H. and Grange, T. (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*, **494**, 135-140.
- Kress, C., Thomassin, H. and Grange, T. (2006) Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11112-11117.
- Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*, **325 ( Pt 1)**, 1-16.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J*, **15**, 6662-6670.
- Ladiges, W., Wiley, J. and MacAuley, A. (2003) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech Ageing Dev*, **124**, 27-32.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2004) Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 58-63.
- Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A.E. (1997) An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12863-12868.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S. and Jacobsen, S.E. (2006) An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in Arabidopsis thaliana. *Cell*, **126**, 93-106.

- Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-926.
- Li, Y.Q., Zhou, P.Z., Zheng, X.D., Walsh, C.P. and Xu, G.L. (2007) Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Res*, **35**, 390-400.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D. (1997) DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 158-169.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. and Jacobsen, S.E. (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*, **292**, 2077-2080.
- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H. and Ecker, J.R. (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell*, **133**, 523-536.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B. and Ecker, J.R. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, **462**, 315-322.
- Loizou, J.I., El-Khamisy, S.F., Zlatanou, A., Moore, D.J., Chan, D.W., Qin, J., Sarno, S., Meggio, F., Pinna, L.A. and Caldecott, K.W. (2004) The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell*, **117**, 17-28.
- Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*, **25**, 1192-1200.
- Maatouk, D.M., Kellam, L.D., Mann, M.R., Lei, H., Li, E., Bartolomei, M.S. and Resnick, J.L. (2006) DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development*, **133**, 3411-3418.
- Malagnac, F., Bartee, L. and Bender, J. (2002) An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *Embo J*, **21**, 6842-6852.
- Malik, H.S. and Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, **10**, 882-891.
- March-Díaz, R. and Reyes, J.C. (2009) The Beauty of Being a Variant: H2A.Z and the SWR1 Complex in Plants. *Molecular Plant*, **2**, 565-577.
- Margueron, R., Trojer, P. and Reinberg, D. (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 163-176.
- Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Menissier-de Murcia, J., Le Page, F., Boiteux, S., de Murcia, G. and Radicella, J.P. (2003) Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem*, **278**, 44068-44074.

- Martínez-Macías, M.I., Qian, W., Miki, D., Pontes, O., Liu, Y., Tang, K., Liu, R., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T. and Zhu, J.K. (2012) A DNA 3' phosphatase functions in active DNA demethylation in Arabidopsis. *Mol Cell*, **45**, 357-370.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G. and Sun, Y.E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, **302**, 890-893.
- Mathieu, O. and Bender, J. (2004) RNA-directed DNA methylation. *J Cell Sci*, **117**, 4881-4888.
- Mathieu, O., Reinders, J., Caikovski, M., Smathajitt, C. and Paszkowski, J. (2007) Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell*, **130**, 851-862.
- Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L. and Matzke, A.J. (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 512-519.
- Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, **6**, 24-35.
- Maunakea, A.K., Nagarajan, R.P., Bilenky, M., Ballinger, T.J., D'Souza, C., Fouse, S.D., Johnson, B.E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V.M., Rowitch, D.H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S.J., Haussler, D., Marra, M.A., Hirst, M., Wang, T. and Costello, J.F. (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, **466**, 253-257.
- Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., Gilmour, D.S., Albert, I. and Pugh, B.F. (2008) Nucleosome organization in the Drosophila genome. *Nature*, **453**, 358-362.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, **403**, 501-502.
- Meilinger, D., Fellinger, K., Bultmann, S., Rothbauer, U., Bonapace, I.M., Klinkert, W.E., Spada, F. and Leonhardt, H. (2009) Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep*, **10**, 1259-1264.
- Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F. and Salbert, G. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, **452**, 45-50.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. and Matzke, A.J. (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J*, **19**, 5194-5201.
- Miller, C.A. and Sweatt, J.D. (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, **53**, 857-869.

- Mitra, S. and Kaina, B. (1993) Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **44**, 109-142.
- Mol, C.D., Arvai, A.S., Begley, T.J., Cunningham, R.P. and Tainer, J.A. (2002) Structure and activity of a thermostable thymine-DNA glycosylase: evidence for base twisting to remove mismatched normal DNA bases. *J Mol Biol*, **315**, 373-384.
- Monk, M., Boubelik, M. and Lehnert, S. (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, **99**, 371-382.
- Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A.P., Ponferrada-Marín, M.I., Martínez-Macías, M.I., Ariza, R.R. and Roldán-Arjona, T. (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6853-6858.
- Morgan, H.D., Dean, W., Coker, H.A., Reik, W. and Petersen-Mahrt, S.K. (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem*, **279**, 52353-52360.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W. (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**, R47-58.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, **102**, 553-563.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, **8**, 4321-4325.
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., Tanaka, S., Shiota, K. and Nakano, T. (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, **9**, 64-71.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Schärer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol*, **6**, 968-980.
- Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1997) XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry*, **36**, 5207-5211.
- Nazarkina, Z.K., Khodyreva, S.N., Marsin, S., Lavrik, O.I. and Radicella, J.P. (2007) XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 254-264.
- Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.

- Northrop, J.K., Thomas, R.M., Wells, A.D. and Shen, H. (2006) Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol*, **177**, 1062-1069.
- Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X. and Bestor, T.H. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, **448**, 714-717.
- Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T. (2008) Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol Biol*, **67**, 671-681.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. and Walter, J. (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, **10**, 475-478.
- Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M. and Shirakawa, M. (2009) Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep*, **10**, 1235-1241.
- Parsons, J.L., Dianova, II and Dianov, G.L. (2004) APE1 is the major 3'-phosphoglycolate activity in human cell extracts. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3531-3536.
- Pascucci, B., Maga, G., Hubscher, U., Bjoras, M., Seeberg, E., Hickson, I.D., Villani, G., Giordano, C., Cellai, L. and Dogliotti, E. (2002) Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2124-2130.
- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L. and Alvarez, M.E. (2006) Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**, 577-587.
- Penterman, J., Uzawa, R. and Fischer, R.L. (2007a) Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **145**, 1549-1557.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J.H., Ballinger, T., Henikoff, S. and Fischer, R.L. (2007b) DNA demethylation in the Arabidopsis genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6752-6757.
- Petrucco, S., Volpi, G., Bolchi, A., Rivetti, C. and Ottonello, S. (2002) A nick-sensing DNA 3'-repair enzyme from Arabidopsis. *J Biol Chem*, **277**, 23675-23683.
- Pikaard, C.S. (2006) Cell biology of the Arabidopsis nuclear siRNA pathway for RNA-directed chromatin modification. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**, 473-480.
- Podlutzky, A.J., Dianova, II, Podust, V.N., Bohr, V.A. and Dianov, G.L. (2001) Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *Embo J*, **20**, 1477-1482.

- Ponferrada-Marín, M.I., Martínez-Macías, M.I., Morales-Ruiz, T., Roldán-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2010) Methylation-independent DNA binding modulates specificity of repressor of silencing 1 (ROS1) and facilitates demethylation in long substrates. *J Biol Chem*.
- Ponferrada-Marín, M.I., Parrilla-Doblas, J.T., Roldán-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2011) A discontinuous DNA glycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res*.
- Ponferrada-Marín, M.I., Roldán-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2009) ROS1 5-methylcytosine DNA glycosylase is a slow-turnover catalyst that initiates DNA demethylation in a distributive fashion. *Nucleic Acids Res*, **37**, 4264-4274.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. and Reik, W. (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, **463**, 1101-1105.
- Preuss, S. and Pikaard, C.S. (2007) rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta*, **1769**, 383-392.
- Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A. and Cairns, B.R. (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, **135**, 1201-1212.
- Rai, K., Sarkar, S., Broadbent, T.J., Voas, M., Grossmann, K.F., Nadauld, L.D., Dehghanizadeh, S., Hagos, F.T., Li, Y., Toth, R.K., Chidester, S., Bahr, T.M., Johnson, W.E., Sklow, B., Burt, R., Cairns, B.R. and Jones, D.A. (2010) DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. *Cell*, **142**, 930-942.
- Ramsahoye, B.H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P. and Jaenisch, R. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5237-5242.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Pasa-Tolic, L. and Pikaard, C.S. (2009) Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol Cell*, **33**, 192-203.
- Reese, K.J., Lin, S., Verona, R.I., Schultz, R.M. and Bartolomei, M.S. (2007) Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3. *PLoS Genet*, **3**, e137.
- Reik, W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, **447**, 425-432.
- Reik, W., Dean, W. and Walter, J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **293**, 1089-1093.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeouze, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. and Durandy, A. (2000) Activation-

- induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, **102**, 565-575.
- Richards, E.J. and Elgin, S.C. (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, **108**, 489-500.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M. (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, **146**, 905-916.
- Roldan-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2009) *DNA demethylation*.
- Roldan-Arjona, T. and Ariza, R.R. (2009) DNA demethylation. In Grosjean, H. (ed.), *DNA and RNA modification Enzymes: Comparative Structure, Mechanism, Functions, Cellular Interactions and Evolution*. Landes Bioscience, Austin, TX, pp. 149-161.
- Roldán-Arjona, T., García-Ortiz, M.V., Ruiz-Rubio, M. and Ariza, R.R. (2000) cDNA cloning, expression and functional characterization of an Arabidopsis thaliana homologue of the Escherichia coli DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol*, **44**, 43-52.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., and Riggs, A.D. (1996) Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, **73**, 39-85.
- Santerre, A. and Britt, A.B. (1994) Cloning of a 3-methyladenine-DNA glycosylase from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2240-2244.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, **103**, 411-422.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. and Dean, W. (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, **241**, 172-182.
- Sasaki, H. and Matsui, Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, **9**, 129-140.
- Saze, H., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet*, **34**, 65-69.
- Scharer, O.D. and Jiricny, J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*, **23**, 270-281.
- Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rosing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, M.C. and Leonhardt, H. (2007) Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4301-4312.
- Seedhouse, C., Bainton, R., Lewis, M., Harding, A., Russell, N. and Das-Gupta, E. (2002) The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base

- excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **100**, 3761-3766.
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y. and Saitou, M. (2007) Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, **134**, 2627-2638.
- Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M. and Koseki, H. (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, **450**, 908-912.
- Singhal, R.K., Prasad, R. and Wilson, S.H. (1995) DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *J Biol Chem*, **270**, 949-957.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijo, J.A. and Martienssen, R.A. (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell*, **136**, 461-472.
- Smith, M.M. (2002) Histone variants and nucleosome deposition pathways. *Mol Cell*, **9**, 1158-1160.
- Smith, T.R., Levine, E.A., Perrier, N.D., Miller, M.S., Freimanis, R.I., Lohman, K., Case, L.D., Xu, J., Mohrenweiser, H.W. and Hu, J.J. (2003) DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 1200-1204.
- Spada, F., Haemmer, A., Kuch, D., Rothbauer, U., Schermelleh, L., Kremmer, E., Carell, T., Langst, G. and Leonhardt, H. (2007) DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol*, **176**, 565-571.
- Stam, M., Viterbo, A., Mol, J.N. and Kooter, J.M. (1998) Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *Mol Cell Biol*, **18**, 6165-6177.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. and Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**, 835-843.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Surani, M.A., Hayashi, K. and Hajkova, P. (2007) Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, **128**, 747-762.
- Suzuki, M.M. and Bird, A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, **9**, 465-476.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L. and Rao, A. (2009) Conversion

- of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, **324**, 930-935.
- Tamaru, H. and Selker, E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, **414**, 277-283.
- Tariq, M. and Paszkowski, J. (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet*, **20**, 244-251.
- Taylor, R.M., Hamer, M.J., Rosamond, J. and Bray, C.M. (1998) Molecular cloning and functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* DNA ligase I homologue. *Plant J*, **14**, 75-81.
- Taylor, R.M., Thistlethwaite, A. and Caldecott, K.W. (2002) Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**, 2556-2563.
- Tebbs, R.S., Flannery, M.L., Meneses, J.J., Hartmann, A., Tucker, J.D., Thompson, L.H., Cleaver, J.E. and Pedersen, R.A. (1999) Requirement for the *Xrcc1* DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol*, **208**, 513-529.
- Teixeira, F.K. and Colot, V. (2009) Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? *Embo J*, **28**, 997-998.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Jones, N.J., Allen, S.A. and Carrano, A.V. (1990) Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, **10**, 6160-6171.
- Thompson, L.H. and West, M.G. (2000) XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res*, **459**, 1-18.
- Tiwari, S., Schulz, R., Ikeda, Y., Dytham, L., Bravo, J., Mathers, L., Spielman, M., Guzman, P., Oakey, R.J., Kinoshita, T. and Scott, R.J. (2008) MATERNALLY EXPRESSED PAB C-TERMINAL, a novel imprinted gene in *Arabidopsis*, encodes the conserved C-terminal domain of polyadenylate binding proteins. *Plant Cell*, **20**, 2387-2398.
- Trewick, S.C., Henshaw, T.F., Hausinger, R.P., Lindahl, T. and Sedgwick, B. (2002) Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, **419**, 174-178.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-816.
- Uchiyama, Y., Suzuki, Y. and Sakaguchi, K. (2008) Characterization of plant XRCC1 and its interaction with proliferating cell nuclear antigen. *Planta*, **227**, 1233-1241.
- van Attikum, H., Bundock, P., Overmeer, R.M., Lee, L.Y., Gelvin, S.B. and Hooykaas, P.J. (2003) The *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4247-4255.

- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. and Wolffe, A.P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet*, **23**, 62-66.
- Warn-Cramer, B.J., Macrander, L.A. and Abbott, M.T. (1983) Markedly different ascorbate dependencies of the sequential alpha-ketoglutarate dioxygenase reactions catalyzed by an essentially homogeneous thymine 7-hydroxylase from *Rhodotorula glutinis*. *J Biol Chem*, **258**, 10551-10557.
- Waterworth, W.M., Kozak, J., Provost, C.M., Bray, C.M., Angelis, K.J. and West, C.E. (2009) DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC Plant Biol*, **9**, 79.
- Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M. and West, C.E. (2010) A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J*, **63**, 848-860.
- Weiss, A. and Cedar, H. (1997) The role of DNA demethylation during development. *Genes Cells*, **2**, 481-486.
- Weiss, A., Keshet, I., Razin, A. and Cedar, H. (1996) DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell*, **86**, 709-718.
- West, C.E., Waterworth, W.M., Jiang, Q. and Bray, C.M. (2000) Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J*, **24**, 67-78.
- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M. and Caldecott, K.W. (2001) XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, **104**, 107-117.
- Wiedemann, S.M., Mildner, S.N., Bonisch, C., Israel, L., Maiser, A., Matheisl, S., Straub, T., Merkl, R., Leonhardt, H., Kremmer, E., Schermelleh, L. and Hake, S.B. (2010) Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J Cell Biol*, **190**, 777-791.
- Wiederhold, L., Leppard, J.B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A.E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S.H., Mitra, S. and Hazra, T.K. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell*, **15**, 209-220.
- Wilson, A.S., Power, B.E. and Molloy, P.L. (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1775**, 138-162.
- Wilson, G.G. and Murray, N.E. (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet*, **25**, 585-627.
- Wolffe, A.P., Jones, P.L. and Wade, P.A. (1999) DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5894-5896.
- Woo, H.R., Dittmer, T.A. and Richards, E.J. (2008) Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG

- methylation and epigenetic silencing in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **4**, e1000156.
- Wu, S.C. and Zhang, Y. (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 607-620.
- Wu, Y.Q., Hohn, B. and Ziemienowic, A. (2001) Characterization of an ATP-dependent type I DNA ligase from Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, **46**, 161-170.
- Xin-Jian He, Y.-F.H., Shihua Zhu, Andrzej T. Wierzbicki, Olga Pontes, Craig S. Pikaard, Hai-Liang Liu, and Co-Shine Wang, H.J., and Jian-Kang Zhu. (2009) An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell* **137**, 498-508.
- Y. Z. Han, B.Q.H., S. Y. Zee, M. Yuan. (2000) Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* Lind. before and during fertilization. *Planta*, **211**.
- Yu, Z., Genest, P.A., ter Riet, B., Sweeney, K., DiPaolo, C., Kieft, R., Christodoulou, E., Perrakis, A., Simmons, J.M., Hausinger, R.P., van Luenen, H.G., Rigden, D.J., Sabatini, R. and Borst, P. (2007) The protein that binds to DNA base J in trypanosomatids has features of a thymidine hydroxylase. *Nucleic Acids Res*, **35**, 2107-2115.
- Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P. and Zilberman, D. (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, **328**, 916-919.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. and Ecker, J.R. (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis. *Cell*, **126**, 1189-1201.
- Zheng, X., Pontes, O., Zhu, J., Miki, D., Zhang, F., Li, W.X., Iida, K., Kapoor, A., Pikaard, C.S. and Zhu, J.K. (2008) ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. *Nature*, **455**, 1259-1262.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2007) Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo J*, **26**, 1691-1701.
- Zhu, B., Benjamin, D., Zheng, Y., Angliker, H., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, J.P. (2001) Overexpression of 5-methylcytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells EcR293 demethylates the promoter of a hormone-regulated reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5031-5036.
- Zhu, B., Zheng, Y., Angliker, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M. and Jost, J.P. (2000a) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4157-4165.
- Zhu, B., Zheng, Y., Hess, D., Angliker, H., Schwarz, S., Siegmann, M., Thiry, S. and Jost, J.P. (2000b) 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5135-5139.

- Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C.P., Damsz, B., Inan, G., Koiwa, H., Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell*, **14**, 3009-3028.
- Zhu, J., Kapoor, A., Sridhar, V.V., Agius, F. and Zhu, J.K. (2007) The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in Arabidopsis. *Curr Biol*, **17**, 54-59.
- Zhu, J.K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet*, **43**, 143-166.
- Zilberman, D. (2008) The evolving functions of DNA methylation. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 554-559.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. and Henikoff, S. (2008) Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, **456**, 125-129.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T. and Henikoff, S. (2007) Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, **39**, 61-69.
- Zilberman, D. and Henikoff, S. (2007) Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, **134**, 3959-3965.

