

**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE  
PLANTAS**

**Expresión de las ARN polimerasas IV y V  
en *Oryza sativa***

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias presenta:**

**M. C. Leydi del Rocio Canche Moo**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.**

**Mérida, Yucatán, México**

**2012**





Mérida, Yucatán, México, a 24 de Enero de 2012.

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

M.C. Leydi del Rocio Canche Moo



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C**  
**POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Expresión de las ARN Polimerasas IV y V en *Oryza sativa*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción Doctorado después de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.



## **RECONOCIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, a quien agradezco la dedicación y apoyo brindado durante la planeación, desarrollo y evaluación del mismo.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (56001).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios de Doctorado (167009) otorgada a Leydi del Rocio Canche Moo.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna, por su paciencia y dedicación, así como por sus consejos y la confianza que me brindó durante la realización de este trabajo.

Al Dr. José Luis Stephano Hornedo, del Instituto de Biología Celular y Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., por darme la oportunidad de realizar la estancia en su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial y de evaluación de tesis integrados por los doctores: Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Felipe Sánchez Teyer, Dra. Ileana Echavarría Machado, Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, Dr. Erick Dumonteil, y Dr. Víctor Suárez, por sus valiosas sugerencias y la revisión crítica con la que enriquecieron este escrito.

A todos los profesores del Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas del CICY, porque al compartir sus conocimientos y experiencia hicieron una gran aportación a mi formación académica y personal.

A la Q. I. Ángela Kú González, por su ayuda en el proceso del análisis por el MEB.

A mi madre y hermana (Elvira y Mirna), por todo su amor, paciencia, y apoyo incondicional por que son estímulos fundamentales en mi vida.

A mi familia materna, por sus valiosos consejos y el gran cariño que siempre me han brindado.

A mis amigos y compañeros del CICY, especialmente al laboratorio 23, por todas las experiencias y los buenos momentos compartidos.

Al laboratorio "Meredith Gould" de la UABC, por brindarme su apoyo y amistad.



## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Gracias Dios por no dármelo todo, sino solo lo que necesito.

### **A mi madre Elvira**

Tus brazos siempre se abren cuando necesito un abrazo. Tu corazón sabe comprender cuándo necesito una amiga. Tus ojos sensibles se endurecen cuando necesito una lección. Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar. Doy gracias porque al nacer, te eligió Dios, como mi Madre, porque eres de mi vida, la mejor parte. Gracias, por haberme dado, lo mejor de tu existencia.

### **A mi hermana Mirna**

Porque eres alguien con quién siempre podré contar incondicionalmente y que en momentos de tristeza o de alegría estas conmigo. Gracias porque me conoces tal y como soy y me aceptas a pesar de todas mis faltas. Bendito el día en que Dios decidió que tú fueras mi hermana.



## ÍNDICE GENERAL

<b>RECONOCIMIENTOS</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>DEDICATORIAS</b>	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xiii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	xvii
<b>ABREVIATURAS</b>	xix
<b>RESUMEN</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxiii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Referencias bibliográficas	2
<b>CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES</b>	3
1.1 Introducción	3
1.2 Filogenia de las ARN Polimerasas IV y V	4
1.3 Subunidades que componen el complejo de las ARN Pol IV y V	6
1.4 Papel de la ARN Polimerasa IV en el mecanismo de biogénesis de los ARN de interferencia	8
1.5 Implicación de la ARN Polimerasa V en el silenciamiento génico	9
1.6 Embriogénesis somática	10

1.7 <i>Oryza sativa</i>	12
1.8 Justificación	13
1.9 Objetivo general	14
1.9.1 Objetivos particulares	14
1.10 Estrategia experimental	14
1.11 Referencias bibliográficas	16
<b>CAPÍTULO 2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y ESTRUCTURA DE LAS ARN POL IV Y V</b>	21
2.1 Introducción	21
2.2 Materiales y métodos	22
2.2.1 Análisis de secuencias de la ARN Pol IV y V	22
2.2.2 Análisis de estructura de la ARN Pol IV y V	23
2.3 Resultados	24
2.3.1 Análisis de las secuencias de las ARN Pol IV y V	24
2.3.2 Análisis de estructura de las ARN Pol IV y V	35
2.4 Discusión	40
2.5 Referencias bibliográficas	42
<b>CAPÍTULO 3 OBTENCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE ANTI-CUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA ARN POL IV POR LA TÉCNICA DE DESPLIEGUE DE FAGOS</b>	45
3.1 Introducción	45
3.2 Materiales y métodos	47

3.2.1	Inmunizaciones	47
3.2.2	Determinación de la producción de anticuerpos por medio de ensayo inmuno enzimático (ELISA)	48
3.2.3	RT-PCR	48
3.2.4	Purificación de los productos de PCR	49
3.2.5	Digestión de los productos de PCR y del vector pCOMB3X	49
3.2.6	Ligación de los productos de la digestión y transformación	50
3.2.7	Proliferación de las células transformadas	50
3.2.8	Obtención de los fagos	50
3.2.9	Rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable de cadena sencilla (FvSc)	51
3.2.10	Pruebas de ELISA con los fagos seleccionados que expresan FvSc contra la ARN Polimerasa IV	51
3.3	Resultados	53
3.3.1	Determinación de la producción de anticuerpos Por medio de ensayo inmuno enzimático (ELISA)	53
3.3.2	RT-PCR y PCR	55
3.3.3	Digestión de los productos de PCR y del vector pCOMB3X	59
3.3.4	Pruebas de ELISA con los fagos seleccionados que expresan FvSc contra la ARN Polimerasa IV	60
3.4	Discusión	62

3.5 Referencias bibliográficas	64
<b>CAPÍTULO 4 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ARN POL IV Y V</b>	<b>65</b>
4.1 Introducción	65
4.2 Materiales y métodos	66
4.2.1 Material biológico	66
4.2.2 Anticuerpos contra la ARN Pol IV y V	66
4.2.3 Inmunodetección de la ARN Pol IV y V	66
4.2.4 RT-PCR	67
4.3 Resultados	67
4.3.1 Inmunodetección de la ARN Pol IV y V	67
4.3.2 Expresión de las ARN pol IV y V en <i>O. sativa</i>	70
4.4 Discusión	71
4.5 Referencias bibliográficas	73
<b>CAPÍTULO 5 ANÁLISIS HISTOLOGICO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMATICA DE <i>O. sativa</i></b>	<b>75</b>
5.1 Introducción	75
5.2 Materiales y métodos	76
5.2.1 Material biológico	76
5.2.2 Análisis histológico	77
5.2.3 Inmunolocalización de la ARN Pol IV y V	77
5.3 Resultados	78

5.3.1 Análisis histológico de la embriogénesis somática	78
5.3.2 Inmunolocalización	80
5.4 Discusión	82
5.5 Referencias bibliográficas	84
<b>CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS</b>	<b>87</b>
6.1 Discusión general	87
6.2 Perspectivas	90
6.3 Referencias bibliográficas	91
<b>ANEXO I</b>	<b>93</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1	Relación filogenética de las subunidades principales y de la segunda subunidad principal de las ARN Polimerasas en eucariotes y Archeas.	5
Figura 1.2	Subunidades que componen el complejo de las ARN polimerasas IV y V.	7
Figura 1.3	Estrategia experimental.	15
Figura 2.1	Estructura de la molécula de la ARN Pol II.	23
Figura 2.2	Alineación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad 1a de la ARN polimerasa IV de <i>Oryza sativa</i> (OrsatD) con la subunidad 1a de la ARN Pol IV de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaD) y la subunidad 1a de la ARN pol II de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaB).	28
Figura 2.3	Alineación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad 1b de la ARN polimerasa IV de <i>Oryza sativa</i> (OrsatD) con la subunidad 1b de la ARN Pol IV de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaD) y la subunidad 1a de la ARN pol II de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaB).	32
Figura 2.4	Alineación de la secuencia de aminoácidos de la subunidad 2a de la ARN polimerasa IV de <i>Oryza sativa</i> (OrsatD) con la subunidad 2a de la ARN Pol IV de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaD) y la subunidad 2a de la ARN pol II de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ArthaB).	35
Figura 2.5	Análisis de estructura de la subunidad uno de las ARN Pol IV y V.	38
Figura 2.4	Análisis de estructura de la subunidad dos de las ARN Pol IV y V.	39

Figura 3.1	Procedimiento general de la técnica de despliegue de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos.	52
Figura 3.2	Determinación de la producción de anticuerpos por los conejos por ensayo inmuno enzimático (ELISA).	54
Figura 3.3	Determinación de la producción de anticuerpos por los gallos por ensayo inmuno enzimático (ELISA).	55
Figura 3.4	Amplificación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de AZYRO 1.	56
Figura 3.5	Amplificación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de AZYRO 2.	57
Figura 3.6	Traslape y Extensión de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de AZYRO 1.	58
Figura 3.7	Traslape y extensión de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de AZYRO 2.	59
Figura 3.8	Digestión con <i>sfi</i> I.	60
Figura 3.9	ELISA contra el péptido de la ARN polimerasa IV.	61
Figura 4.1	Patrón de proteínas de los tejidos de <i>Oryza sativa</i> .	68
Figura 4.2	Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V.	69
Figura 4.3	Desarrollo del embrión cigótico.	69
Figura 4.4	Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V en la embriogénesis cigótica.	69
Figura 4.5	Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V en la embriogénesis somática.	70
Figura 4.6	RT-PCR. Análisis semicuantitativo de la ARN Pol IV y V.	70

Figura 5.1	Estudio morfológico de embriones somáticos de <i>O. sativa</i> .	79
Figura 5.2	Cortes histológicos de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos mantenidos en medio EIM con 2 mg/L de 2,4-D.	80
Figura 5.3	Inmunolocalización de las ARN Pol IV y V.	81



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1	Secuencias analizadas para la generación de péptidos.	40
Cuadro 3.1	Secuencias de péptidos para la producción de anticuerpos.	53
Cuadro 3.2	Anticuerpos generados.	62



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARN Pol I</b>	ARN polimerasa I
<b>ARN Pol II</b>	ARN polimerasa II
<b>ARN Pol III</b>	ARN polimerasa III
<b>ARN Pol IV</b>	ARN polimerasa IV
<b>ARN Pol V</b>	ARN polimerasa V
<b>NRPB</b>	ARN polimerasa II
<b>NRPD</b>	ARN polimerasa IV
<b>NRPE</b>	ARN polimerasa V
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNt</b>	ARN de transferencia
<b>siARN</b>	ARN de interferencia
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>EIM</b>	Medio de inducción de embriones
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-dichlorofenoxiacético
<b>MS</b>	Medio Murashige & Skoog



## RESUMEN

Las ARN Pol IV y V son proteínas involucradas en el silenciamiento génico dirigido por los siARN, y metilación *de novo* del ADN respectivamente. Las ARN Pol IV y V son expresadas en todos los tejidos de *A. thaliana* con una mayor expresión en inflorescencia y raíz. Dentro de las células se localiza en el núcleo. ARN pol IV y V se encuentran conformadas por doce subunidades. Estas polimerasas comparten subunidades con la ARN Pol II, con la que tiene similitud en la secuencia y posiblemente en estructura. La carencia de expresión de estas ARN polimerasa en las líneas mutantes *A. thaliana* resulta en un retraso de floración, así como alteraciones en la formación de sus órganos florales. A la fecha se han encontrado las secuencias de la ARN Pol IV y V en diversas plantas incluyendo a *O. sativa*.

Debido a la importancia de *O. sativa* tanto industrialmente como de uso de modelo vegetal en monocotiledóneas fue que se realizó este estudio. En donde se plateo analizar el patrón de expresión de la ARN Pol IV y V en *O. sativa*. Utilizando tanto tejidos maduros como embriogénicos para este estudio. Embriones somáticos fueron generados con el fin de obtener una mayor cantidad de células en los primeros estados de desarrollo. Teniendo en cuenta que la reorganización nuclear y silenciamiento génico sería altamente expresado en estas fases de desarrollo.

Para el desarrollo de este trabajo se realizó el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las ARN Pol IV y V de *A. thaliana* y *O. sativa*, para obtener secuencias adecuadas para la síntesis de péptidos que fueran útiles para la producción de anticuerpos. Los péptidos generados permitieron obtener dos anticuerpos policlonales contra la subunidad uno de las ARN Pol IV y un anticuerpo contra la subunidad uno de la ARN pol V. Con estos anticuerpos se detectó la presencia de las ARN Pol IV y V, en *O. sativa* en los tejidos de inflorescencia, hoja, tallo y raíz al igual que en embriones somáticos y cigóticos.

Los embriones somáticos de *O. sativa* fueron obtenidos a partir de la inducción de los escutelos en medio EIM con 2,4-D. En estos embriones se inmunolocalizó a las ARN Pol IV y V en el núcleo de las células. En base a la información publicada es probable que la participación de estas proteínas sea importante para el silenciamiento génico y reorganización nuclear que ocurre en el proceso de embriogénesis somática.



## ABSTRACT

RNA Pol IV and V are proteins involved in directed gene silencing by siRNA and DNA methylation, respectively. RNA Pol IV y V are expressed in tissues of *A. thaliana* which are located in the nucleus and are conformed of 12 subunits. These polymerases shear subunits with RNA Pol II, from which they have a high degree of similarity and possibly of structure.

The lack of expression of these RNA polymerases in mutated lines of *A. thaliana* showed a delay in floral time and as well as alterations in the formation of floral organs. Up to date the sequences of RNA Pol IV and V from diverse plants have been found, such is the case of *O. sativa*. Due to the relevance of this plant model and the lack of information of these polymerases in monocots this study was carried out for adult and embryogenic tissue. The reasoning for using somatic embryos was to obtain large amount of cells in the first stages of development where several changes in gene expression take place. . The somatic embryos of *O. sativa* were obtain after induction of the scutellum with 2,4-D. Immunolocalization of both RNA polymerases showed their nuclear presence. Furthermore these proteins are also expressed in different tissues of the adult plant, particularly esteem and inflorescence as well as somatic embryogenesis. Based on current publish data it is probable that gene silencing and nuclear reorganization during somatic embryogenesis requires de presence of both of these polymerases.

For the development of this work I aligned the aminoacid sequences of RNA pol IV and V of *A. thaliana* and *O. sativa* to select sequences for peptide synthesis followed by their antibody production. I obtain two polyclonal antibodies against the first subunit of RNA Pol IV and one aganst the first subunit of RNA Pol V. With this antibodies we detected the presence of this proteins in *O. sativa*.



## INTRODUCCIÓN

La síntesis de ARN a partir de un templado de ADN, es uno de los pasos más importantes en el control del crecimiento y diferenciación celular. La transcripción se lleva a cabo por enzimas llamadas ARN polimerasas. En este proceso se requieren de un conjunto de proteínas reguladoras denominadas factores generales de transcripción los cuales están involucrados en el reconocimiento de la secuencia del promotor. La respuesta a los factores regulatorios y los cambios conformacionales son esenciales para la actividad de la polimerasa durante el ciclo de transcripción (Hampsey *et al.*, 1998).

Aunque la maquinaria de transcripción de eucariontes es mucho más compleja que la de procariontes o que de las archaeas, los principios generales de la transcripción y su regulación se encuentran conservados. Las bacterias y archaeas tienen solamente una ARN polimerasa, mientras que los eucariontes tienen tres para sintetizar diferentes clases de ARN; la ARN polimerasa I que sintetiza ARN ribosomal (ARNr), la ARN polimerasa II que sintetiza ARN mensajero (ARNm) y la polimerasa III que sintetiza ARN de transferencia (ARNt) (Lee *et al.*, 2000).

Sólo se conocían estos tres tipos de ARN polimerasa, hasta el descubrimiento de secuencias de posibles ARN polimerasas, a la que han denominado ARN polimerasa IV, y V. Son las plantas las que tienen secuencias que codifican subunidades catalíticas para estas ARN polimerasas (Herr *et al.*, 2005).

Esta máquina celular en las plantas, desempeña un papel relevante en la floración y en la metilación del ADN, que es un proceso químico esencial y dominante para el desarrollo de un organismo. Hay cierta especulación de que esta forma de polimerasa puede haber sido una molécula característica de las plantas por más de 200 millones de años (Onodera *et al.*, 2005).

En *A. thaliana* se ha observado la expresión de las ARN Pol IV y V en todos los tejidos de planta adulta, sin embargo, la expresión de estas proteínas podrían no ser similares en todas las especies debido a las diferencias evolutivas que existen entre las dicotiledóneas y las monocotiledóneas (Pikaard, 2009; Marcussen *et al.*, 2010). En este trabajo se plantea observar el patrón de expresión de las ARN Pol IV y V en los diferentes tejidos de *O. sativa*, así como durante el proceso de la embriogénesis cigótica y somática.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hampsey, M. (1998). *Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 465-503.
- Herr, A. J., M. B. Jensen, T. Dalmay and D.C. Baulcombe (2005). *RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA*. Science, 308, 118-120.
- Lee, T.I. and R.A. Young (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. Annual Review of Genetic. 34, 77-137.
- Marcussen, T., B. Oxelman, A. Skog, and J. Jakobsen (2010). *Evolution of plant RNA polymerase IV/V genes: evidence of subneofunctionalization of duplicated NRPD2/NRPE2-like paralogs in Viola (Violaceae)*. BMC Evolutionary Biology, 10, 45.
- Onodera, Y., J.R. Haag, T.S. Ream, P. Costa, O. Pontes and C.S. Pikaard (2005). *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation*. Cell, 120(5), 613-22.
- Pikaard, C. and S. Tucker (2009). *RNA-silencing enzymes pol IV and pol V in maize: more than one Flavor?* PLoS Genetics, 5(11), e1000736.

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La primera evidencia de la existencia de otros tipos de ARN Polimerasa (ARN Pol IV, V) adicionales a las ya reportadas, fue descubierta en *A. thaliana*. Al observar dos tipos de polipéptidos que podrían ser las subunidades clave de la ARN Pol IV, se demostró que no era una forma alternativa de alguna de las ARN Pol y se encontró que la ARN Pol IV no es funcionalmente coincidente con las ARN Pol I, II o III y no es esencial para la viabilidad de la planta (Onodera *et al.*, 2005).

Mediante el uso de anticuerpos se detectó en *A. thaliana* la presencia de la ARN Pol IV, en donde se encontró estar mayormente expresada en flores y raíces. Por otro lado, en líneas mutantes de *A. thaliana* (*rpd2a-2*, *rpd2b-1*), en las cuales se bloquearon los genes responsables de las dos subunidades de la ARN Pol IV, no se detectó a la proteína. Sin embargo, estas mutantes, aunque sobrevivieron, mostraron defectos florales, retraso en la floración y alteraciones en la identidad de sus órganos (Onodera *et al.*, 2005).

En la inmunolocalización de la ARN Pol IV se observó que es una proteína nuclear y se sugiere que esta proteína afecta la condensación de la heterocromatina, observando un núcleo más disperso. Es decir, que el ADN se encuentra empacado de manera diferente, siendo menos condensado en las mutantes *rpd2a-2* y *rpd2b-1* (Onodera *et al.*, 2005). La dispersión de la heterocromatina del gen 5S en las mutantes de la ARN Pol IV, sugirió una pérdida de cierto nivel de metilación de la citosina; sin la metilación apropiada del ADN, los organismos presentan problemas de desarrollo (Soppe *et al.*, 2002). Se ha observado que esta pérdida de metilación en el ADN no afecta niveles globales de metilación de la citosina (Onodera *et al.*, 2005). Por otro lado, se sugiere que la ARN Pol IV silencia secuencias de ADN repetitivo y ciertos transposones (*AtSN1*). Los ARNs pequeños llamados siARN (ARN de interferencia small interfering RNA) son eliminados por completo en las líneas mutantes de *A. thaliana* (*rpd1*, *rpd2*), lo que indica que la ARN Pol IV está implicada en la producción de los siARN, y que de algún modo está involucrado en la conservación de la integridad del genoma, principalmente en mantener silenciado el ADN (Onodera *et al.*, 2005). Por otra parte, se evaluó la producción de los

miRNAs; la vía de los miARN en estas mismas mutantes no se observa afectada (Herr *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2004; Zilberman *et al.*, 2004).

Las funciones conocidas de los sistemas siARN y miARN son muy variadas. Ya que pueden funcionar como defensa contra virus, y como control de transposones o de elementos génicos anómalos. Por otro lado, la formación de miRNA se ha revelado como un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica (Herr *et al.*, 2005).

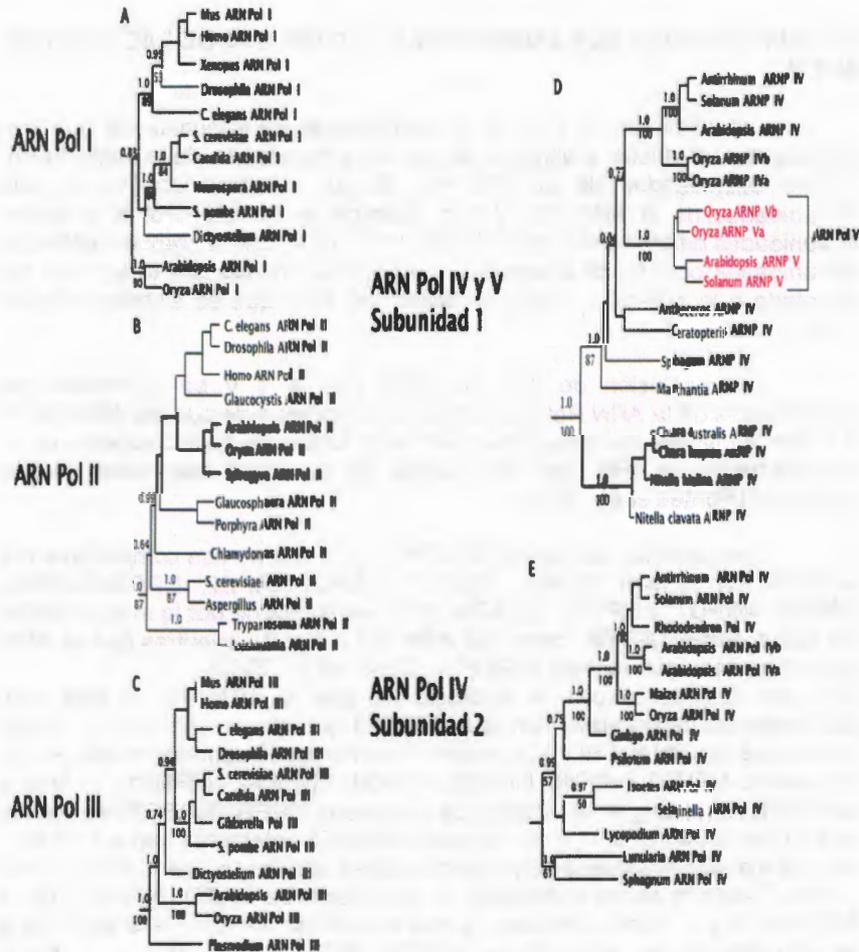
Dos genes codifican las distintas subunidades mayores de la ARN Pol IV y ARN Pol V, al igual que dos genes codifican las subunidades menores. Ambos tipos de subunidades son expresados, como productos de la ARN Pol IV 1 (NRPD1/NRPD1a) y ARN Pol V 1 (NRPE1/NRPE1b), pero solo una de las subunidades menores, la ARN Pol IV 2 (NRPD2a/NRPD2/NRPE2) es funcional (Onodera *et al.*, 2005; Portier *et al.*, 2005; Herr *et al.*, 2005; Wierzbicki *et al.*, 2008).

## 1.2 FILOGENIA DE LA ARN POLIMERASA IV Y V

Las ARN Pol IV y Pol V son enzimas específicas de plantas que, al parecer, tuvieron su origen en algas ancestrales que colonizaron la tierra hace millones de años (Luo & Hall 2007). Un árbol filogenético reveló que las subunidades grandes de la ARN Polimerasas de eubacterias, cianobacterias, cloroplastos, archaea y ARN Polimerasas de eucariontes pertenecen a distintos clados. Las subunidades grandes de las ARN polimerasas I, II, III de *A. thaliana* se agrupan con sus homólogos respectivos de arroz, levadura, *C. elegans*, *Drosophila* y humano. *A. thaliana* y *O. sativa* tienen genes adicionales que forman un clado distinto donde se agrupan las secuencias de las ARN Pol IV (Onodera *et al.*, 2005).

Se encontraron los genes para la subunidad mayor y la subunidad menor de las ARN Pol IV (NRPD) y V (NRPE) en todas las plantas terrestres analizadas y que incluyen a *S. lycopersicum*, *A. majus*, *Z. mays*, *M. polymorpha*, entre otras. (Figura 1.1) (Luo & Hall *et al.*, 2007). En los estudios iniciales sobre la ARN Pol IV y V, se notó que las NRPD2/NRPE2 estuvo más estrechamente relacionadas con la subunidad menor de la ARN Pol II (NRPB), que con las ARN Pol I (NRPA) o Pol III (NRPC) (Onodera *et al.*, 2005). Además, cinco intrones de los ocho posicionados en el inicio de las secuencias de la NRPD1 y NRPE1 coinciden con las posiciones de los intrones en NRPB1. Basados en estos análisis se propone que la NRPD1 surgió de una duplicación del gen NRPB1, posiblemente debido a una subsecuente duplicación de NRPD1. Esto pudo haber conducido a la evolución de NRPE1, después de la aparición de las plantas terrestres, lo

cual fue antes de la divergencia de angiospermas (Luo & Hall 2007; Ream *et al.*, 2009).



**Figura 1.1.** Relación filogenética de las subunidades principales y de la segunda subunidad principal de las ARN polimerasas en eucariotes y Archaeas (Modificado de Luo & Hall *et al.*, 2007). A) Clado de la subunidad uno de las ARN polimerasas I. B) Clado de las subunidades uno de las ARN polimerasas II. C) Clado de las subunidades uno de las ARN polimerasas III.

D) Clado de la subunidad uno de las ARN polimerasas IV y V. E) Clado de la segunda subunidad de las ARN polimerasas IV y V.

### 1.3 SUBUNIDADES QUE COMPONEN EL COMPLEJO DE LAS ARN POL IV Y V

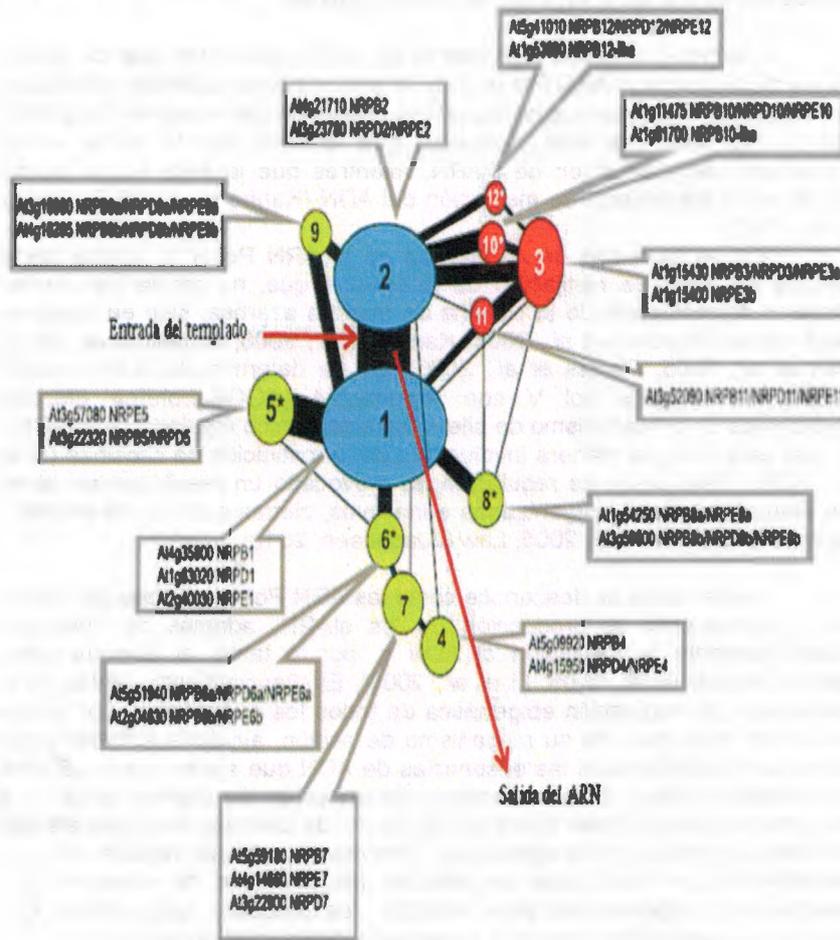
Las ARN Pol IV y V están compuestas de subunidades que son parálogos o idénticos a algunas de las 12 subunidades de la ARN Pol II. Cuatro subunidades de la ARN Pol IV son distintas de la ARN Pol II, seis subunidades de la ARN Pol V son distintos de la ARN Pol II, y cuatro subunidades difieren entre las ARN Pol IV y Pol V. Las diferencias entre las subunidades ocurren en posiciones claves relacionadas con la entrada del templado a la enzima y la vía de salida del ARN que se sintetiza (Figura 1.2).

La conclusión de que las ARN Pol IV y V se componen de subunidades de la ARN Pol II, encaja con la hipótesis de que las ARN Pol IV y V son derivadas de esta para desarrollar funciones especializadas en el silenciamiento de ARN, pero sin realizar las funciones esenciales para la viabilidad (Pontes *et al.*, 2006).

Las subunidades de las ARN Pol IV y V que no son compartidas por la ARN Pol II, son NRPD1, NRPE1, NRPD2/NRPE2, NRPD4/NRPE4, NRPE5, NRPD7, y NRPE7. La ARN Pol IV se compone por la misma familia de subunidades NRPB5, como las ARN Pol I, II y III; mientras que la ARN Pol V presenta una variante (NRPE5), (Ream *et al.*, 2009).

Esto es consistente con la hipótesis de que la ARN Pol V está más distantemente relacionada con la ARN Pol II que con la ARN Pol IV. Es un hecho que la ARN Pol IV y V comparten numerosas subunidades con Pol II, incluyendo NRPB3, NRPB6, NRPB8, NRPB9, NRPB10, NRPB11 y la familia de NRPB12 (Huang *et al.*, 2009). La subunidad NRPB3/NRPE3b se asocia in vivo con la ARN Pol V, a su vez que la NRPE3 interactúa con la NRPB11 en una manera equivalente a las subunidades alfa ( $\alpha$  y  $\alpha'$ ) de la ARN Pol de *E. coli*. También se ha confirmado la asociación de NRPD4/NRPE4 con la ARN Pol IV y V, cabe mencionar que la subunidad NRPB4 de la ARN Pol II es diferente de las subunidades NRPD4/NRPE4 de las ARN Pol IV y V (Lahmy *et al.*, 2009; Ream *et al.*, 2009). Dado que se propone que el complejo RPB4/RPB7 (las ARN Pol II, IV y V comparten la subunidad RPB7) es el que interactúa con el transcrito nascente de ARN, se sugiere que estas diferencias probablemente contribuyen a las funciones únicas de las ARN Pol II, IV y Pol V. La AtRPB5b resulto ser la subunidad NRPE5 de la ARN Pol V. La subunidad NRPD5 de la ARN Pol IV esta codificada por el

mismo gen que codifica la subunidad NRPB5 de la ARN Pol II y las subunidades equivalentes de las ARN Pol I y III. El hecho de que la ARN Pol V sea el único en usar la variante NRPE5 de la familia RPB5 probablemente que tenga un significado funcional. La estructura cristalográfica de la ARN Pol II en la levadura revela que RPB5 interacciona con RPB1 y RPB6 para formar una plataforma móvil que modula la estabilización del templado de ADN. La participación de la subunidad NRPD5 o NRPE5 de la ARN Pol IV o V podría diferir la especificidad de los diferentes templados, o el proceso de activación transcripcional (Ream et al., 2009).



**Figura 1.2.** Subunidades que componen el complejo de las ARN polimerasas IV y V (Ream *et al.*, 2009). De color rojo son las subunidades que están involucradas en el ensamblaje de la holoenzima, de color azul se pueden observar las subunidades que están involucradas en la catálisis, las subunidades de color amarillo tienen otras funciones, y las subunidades marcadas con un asterisco son las subunidades que son compartidas con las ARN polimerasas I, II y III.

#### **1.4 PAPEL DE LA ARN POLIMERASA IV EN EL MECANISMO DE BIOGÉNESIS DE LOS ARN DE INTERFERENCIA.**

Kanno *et al.*, 2005 y Portier *et al.*, 2005 observaron que los siARN en las mutantes de la ARN Pol IV 1 de *A. thaliana* se encuentran eliminados por completo, mientras que no sucede lo mismo en las mutantes de la ARN Pol V. Por esto, ha sido propuesto que la ARN Pol IV actúa en el mecanismo de producción de siARN, mientras que la ARN Pol V puede actuar en el mecanismo de metilación del ADN (Kanno *et al.*, 2005; Portier *et al.*, 2005).

En las mutantes de *A. thaliana* de la ARN Pol V 1, ocurre cierta pérdida del nivel de metilación de la citosina que, no afecta los niveles globales de metilación de la citosina de manera azarosa, sino en regiones específicas (Onodera *et al.*, 2005, Kanno *et al.*, 2005, Portier *et al.*, 2005, Herr *et al.*, 2005, Pontes *et al.*, 2006). Se ha determinado la interacción directa de la ARN pol V con Argonauta4 (AGO4-proteína efectora involucrada en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por siARN), el cual está de igual manera involucrado de la metilación de citosinas (Li *et al.*, 2006). Este grado de regulación ha provocado un reenfoque en cómo las plantas mantienen organizadas e inactivas, ciertas secuencias virales y de retrovirus (Herr *et al.*, 2005, Law & Jacobsen, 2010).

Hasta ahora se desconoce cómo las ARN Pol IV y V pueden actuar en el mecanismo de producción de los siARN, además de coordinar específicamente la metilación al ADN y, por lo tanto, el silenciamiento génico (Portier *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). El silenciamiento génico es el mecanismo de regulación epigenética de todos los eucariontes, por lo que una visión más clara de su mecanismo de acción, ayudaría a comprender como son seleccionadas las secuencias de ADN que serán empaquetadas en heterocromatina. El silenciamiento de genes en las plantas también es fundamental para obtener tolerancia al ataque de diversos virus que afectan de manera significativa la agricultura. Finalmente, hay que recalcar que los mecanismos por los cuales se realizan los procesos de silenciamiento génico son fundamentales para entender los procesos epigenéticos que controlan la expresión durante el desarrollo y diferenciación celular.

## 1.5 IMPLICACIÓN DE LA ARN POLIMERASA V EN EL SILENCIAMIENTO GÉNICO

La actividad catalítica de la ARN Pol V no ha sido aún demostrada. Sin embargo, algunas evidencias demuestran la existencia de transcritos dependientes de la ARN Pol V. Una hipótesis de cómo los sitios de iniciación son elegidos, por los cambios estructurales de los patrones de metilación del ADN o modificaciones de las histonas que atraen a la ARN Pol V. Por otra parte, las mutantes que afectan la producción de los siARNs o la metilación del ADN no afectan la abundancia de los transcritos de la ARN Pol V. Una alternativa posible es que la transcripción de la ARN Pol V inicie en todo el genoma, tanto en regiones silenciadas y no silenciadas, y que estos transcritos sean necesarios, pero no suficientes, para el silenciamiento génico. También se sugiere que la transcripción de la ARN Pol V hace a un *locus* competente para silenciamiento, pero el silenciamiento solo ocurriría si los siARNs complementarios a este *locus* son producidos. Los ARN no codificantes (ARNnc) se originan de regiones intergénicas y prevalecen en eucariotas, pero su significado funcional es casi desconocido. La evidencia indica que la ARN Pol V transcribe ARNs no codificantes que participan directamente en el silenciamiento génico (Wierzbicki *et al.*, 2008).

La transcripción de la ARN Pol V es necesaria, pero no es suficiente para silenciar *AtSN1* y los elementos LTR. Otras proteínas también son necesarias, incluidas la ARN Pol IV, RDR2, así como una o más proteínas DCL, AGO4, DRD1 y DRM2, las cuales son componentes de la vía de biogénesis de los siARNs de 24 nt, dirigidos a la metilación del ADN (Law *et al.*, 2011). Debido a que las mutantes que interrumpen la biogénesis de los siARNs (*nrdp1*, *rdr2*, *dcl*) no tienen efecto en la producción de los transcritos dependientes de la ARN Pol V, se sugiere que la transcripción de la ARN Pol V y la producción de los siARNs son evento independientes, pero colaboran en el silenciamiento génico (Pontes *et al.*, 2009). Esta hipótesis encaja con la observación de que la ARN Pol V, no es requerida para la producción de siARNs en la mayoría de los *loci* que les dan lugar a los de 24nt, incluyendo los *AtSN1* (Mosher *et al.*, 2008). Pero la ARN Pol IV y V si son requeridas para dar lugar a los siARNs de los *loci* de repeticiones endógenas, sin embargo, esto no implica necesariamente que los transcritos de la ARN Pol V sirvan como precursores de los siARNs (Li *et al.*, 2006, Pontes *et al.*, 2006, Chinnusamy & Zhu, 2009). En cambio, la formación de la heterocromatina dependiente de la ARN Pol V, puede estimular la producción de siARNs dependiente de la ARN Pol IV en un circuito positivo de retroalimentación que aplica en el silenciamiento génico (Wierzbicki *et al.*, 2008, Law & Jacobsen, 2010).

La metilación del ADN dirigida por ARN es importante no solo para la regulación génica y para el desarrollo de la planta, sino para la desmetilación y la activación de transposones en respuesta al estrés (Matzke *et al.*, 2009). Uno de los componentes de los que depende la metilación dirigida por ARN, es la biogénesis de los siARN. Las ARN Pol IV y V están involucradas en la biogénesis de los siARN (Huang *et al.*, 2009; Lahmy *et al.*, 2009; Ream *et al.*, 2009). Los siARN a través de la formación de complejos que contienen a AGO4, pueden inducir la metilación en secuencias que la requieran *de novo* o de su mantenimiento (Mosher *et al.*, 2008, Law & Jacobsen, 2010). Se desconoce si existe algún mecanismo por el cual las ARN Pol IV y V se involucren en la metilación inducida por el medio ambiente y el desarrollo.

El aspecto de la función de las ARN Pol IV y V son temas importantes en la actualidad, esto a su vez, abre el estudio sobre la dinámica de la expresión de las ARN Pol IV y V. Las pocas especies que han sido estudiadas (*A. thaliana*, *Zea mays*, y *Viola*), presentan un número variable de copias de los genes que codifican a las subunidades uno y dos de las ARN Pol IV y V, lo que sugiere que de acuerdo a las necesidades de determinada especie podría variar la producción de estas proteínas (Pikaard, 2009; Marcussen *et al.*, 2010 and Yokthongwattana *et al.*, 2010).

Un modelo experimental muy conveniente para el estudio de la expresión génica y los mecanismos de regulación es la embriogénesis somática (Steward *et al.*, 2000).

## 1.6 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis es el punto donde comienza el ciclo de vida, tanto en los animales como en las plantas. Como en otros organismos eucariontes, la embriogénesis en las plantas se inicia en el cigoto, que es el producto de la fusión de la célula huevo haploide y la célula espermática (Jürgens *et al.*, 1995). En las plantas el proceso de embriogénesis puede ser recapitulado en otras células diferentes al cigoto; como los embriones somáticos originados de las células somáticas desarrolladas *in vitro*, valiéndose de la totipotencialidad celular (Mordhorst *et al.*, 1997).

La embriogénesis somática es el desarrollo de embriones a partir de células somáticas capaces de generar una planta. Este proceso ha sido descrito en varias plantas monocotiledóneas (trigo, maíz, avena, sorgo, caña, mijo perla, cebolla) (Thorpe, 1995). Los embriones somáticos se originan directamente de una sola célula o indirectamente a partir de masas

proembriónicas (callos), que a su vez se originaron de una única célula (Vasil & Vasil, 1995). Esta formación a partir de una célula, comienza con divisiones internas de segmentación, engrosamiento de paredes celulares y una ruptura temprana de todas las conexiones plasmodémicas que indican un aislamiento con el tejido que rodea a dicha célula (Franz & Schell, 1991). En general, en los embriones somáticos no se siguen los patrones de división celular específicos de los embriones cigóticos aunque en muy poco tiempo aparecen embriones globulares que presentan todas sus características. En monocotiledóneas, la formación de una hendidura lateral en la región apical del embriónide globular indica el inicio de un estadio escutelar (Brisibe *et al.*, 1993). El escutelo (único cotiledón), comienza a hacerse evidente por un crecimiento lateral por encima de la hendidura. El embrión continúa su desarrollo por estadios cotiledonares donde se desarrolla el coleoptilo y se diferencian los meristemos apicales y radiculares (Vasil & Vasil, 1995).

El grado de similitud entre los embriones somáticos y cigóticos es alto. El hecho de que se puedan desarrollar embriones normales a partir de células somáticas demuestra que el programa genético de la embriogénesis está dentro de cada célula y puede funcionar en ausencia de productos génicos maternos. En condiciones *in vitro* es posible que la composición hormonal del medio de cultivo de los callos imite de alguna forma las señales para iniciar la embriogénesis.

Las hormonas que parecen implicadas directamente en la embriogénesis somática son las auxinas. Su disminución o desaparición del medio de cultivo sería la señal para disparar el desarrollo del embrión somático. El tiempo de exposición a esta hormona que necesitan los explantes es muy variable, desde unas pocas horas en microcallos de alfalfa (Dudits *et al.*, 1993) o hasta siete días para suspensiones de zanahoria (Nomura y Komamine *et al.*, 1985), eliminándose después la hormona del medio de cultivo para continuar el programa embriogénico.

Sin embargo, la diferencia más llamativa entre los embriones cigóticos y somáticos, es que los primeros pasan por una etapa de dormancia después de haber perdido el 95% de su contenido en agua y de detener la síntesis de ARN y proteínas (Golberg *et al.*, 1989). En la naturaleza también hay casos donde el embrión después de la maduración no entra en dormancia sino que germina precozmente como el caso de las mutantes viviparos de *A. thaliana* y maíz (Ooms *et al.*, 1993; Mc Carty *et al.*, 1991). Incluso si se aíslan del resto de la semilla y se cultivan *in vitro* los embriones de un gran número de plantas, pueden germinar sin pasar por un período de deshidratación y latencia.

### 1.7 *Oryza sativa*

El arroz (*Oryza sativa*) es, después del trigo, el cereal más consumido en el mundo y es uno de los alimentos principales del Asia. El grano proporciona el 75% de lo que necesita un ser humano para nutrirse. El arroz es una buena fuente de magnesio, contiene niacina, vitamina B6, tiamina, fósforo, zinc y cobre, así como rastros de ácido pantoténico y potasio. No obstante, el arroz es uno de los cereales más pobres en proteínas. En el continente asiático se cultivan cerca de 40,000 variedades de arroz, procediendo el 90% de la producción mundial de China, Tailandia, Vietnam, India, Indonesia, Paquistán y Birmania. El principal productor de América del Sur es Brasil. En Europa, los grandes arrozales están situados en Portugal, España, Francia e Italia, siendo este último país el principal productor europeo (Xi-ji *et al.*, 2002).

El arroz (*Oryza sativa*) se ha propuesto como modelo de estudio porque se conoce la secuencia completa de su genoma (Normile *et al.*, 2002), en la cual se ha identificado una secuencia con 30% de identidad a la de la subunidad 1a de la ARN Pol IV de *Arabidopsis thaliana* y que se ubican en el mismo clado de la filogenia (Figura 1.1) (Onodera *et al.*, 2005). Además, nos brinda la ventaja de que su tiempo de germinación es relativamente corto, no necesita grandes espacios para su cultivo y el proceso de embriogénesis somática de *Oryza sativa*, es de gran utilidad para estudios de expresión génica.

Sobre todo por la extensa reprogramación transcripcional que se lleva a cabo durante el desarrollo de la planta, lo que sugiere la necesaria función del mecanismo de silenciamiento génico. Aún se desconoce como las ARN Pol IV y V regulan este mecanismo. Sin embargo, el estudio de la expresión de estas proteínas podría contribuir a la elucidación de los mecanismos de regulación epigenética de diversos genes involucrados en el desarrollo de la planta y en respuesta al medio ambiente.

## 1.8 JUSTIFICACIÓN

Los estudios sobre la expresión e inmunolocalización de las ARN Polimerasas IV y V, se ha realizado en *A. thaliana*. Esta planta dicotiledónea modelo, ha permitido la identificación de características de un gran número de genes. Sin embargo, presentan algunas diferencias a lo largo de la evolución con respecto a las monocotiledóneas. Información sobre la expresión de las ARN Polimerasas IV y V en monocotiledóneas aún no ha sido generada a nivel proteico. El estudio de las ARN Pol IV y V en *Zea maíz* sugiere que su expresión podría ser diferente en cuanto a lo reportado en *A. thaliana*, debido a la divergencia evolutiva que se dio entre las angiospermas hace más de 140 millones de años. El estudio de estas enzimas en *Zea maíz* ha generados importantes hallazgos en el entendimiento de los procesos de paramutación mientras que en *A. thaliana* ha generado un gran avance en el área de silenciamiento génico tanto a nivel de siARN como de metilación del ADN. Sistemas que son requeridos en organismos multicelulares.

Los resultados de este estudio sobre el patrón de expresión tanto a nivel proteico como de ARN de ARN Pol IV y V, serán de utilidad para analizar posteriormente su función en tejidos donde se halla detectado su expresión.

De igual manera los anticuerpos generados son una importante herramienta para llevar a cabo estudios de inmunoprecipitación, inmunolocalización entre otros.

## 1.9 OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de las ARN Pol IV y V en diferentes tejidos de *Oryza sativa*.

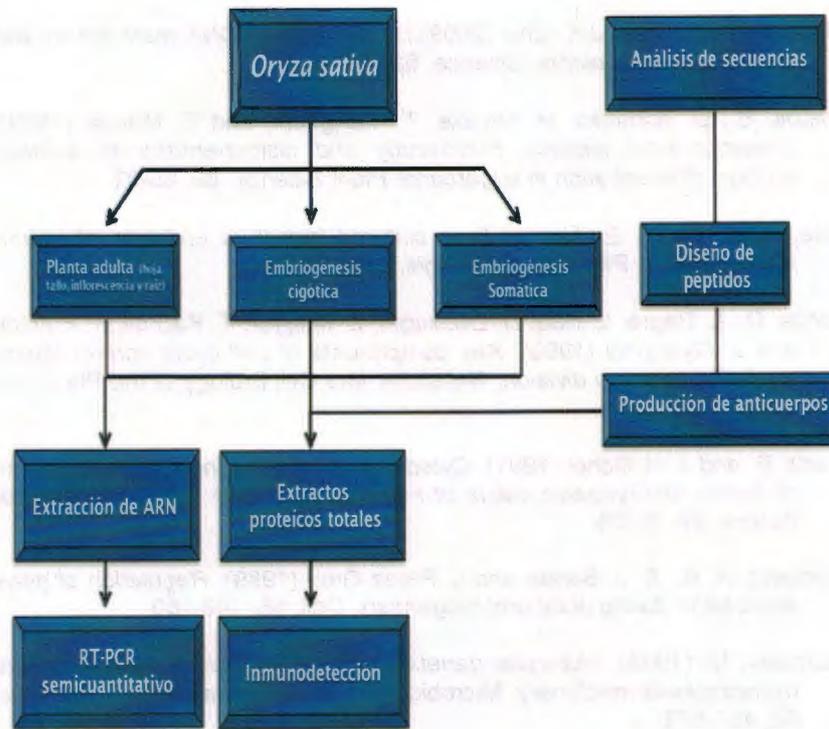
### 1.9.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un análisis comparativo de la secuencia de las subunidades de la ARN Pol IV y V de *O. sativa* para seleccionar de las regiones conservadas y no conservadas secuencias para el diseño de péptidos que sean útiles como antígenos específicos contra las ARN Pol IV y V de *O. sativa*.
2. Obtener un sistema de embriogénesis somática de *O. sativa*.
3. Determinar la presencia de las subunidades de la ARN Pol IV y V en tejidos embrionarios y diferenciados de *Oryza sativa*.

### 1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se esquematiza en la Figura 1.3 y consiste en lo siguiente:

1. Obtención de anticuerpos provenientes de la inmunización de gallos y conejos. Las inmunizaciones se realizarán con los péptidos que serán sintetizados a partir de las secuencias seleccionadas de los alineamientos de las secuencias de las subunidades principales de la ARN Pol IV y V.
2. Establecimiento de la embriogénesis somática a partir de la inducción de escutelos de *O. sativa* en medio EIM (medio de inducción de embriones) con 2,4-D. Así como la obtención de embriones cigóticos mediante la germinación de semillas en agua.
3. Evaluación de la expresión de las ARN Pol IV y V en extractos proteicos de tejidos de *O. sativa*, en los extractos de los días 5, 10, 15 y 30 posteriores a la inducción de los escutelos con 2,4-D, así como de los extractos de los embriones cigóticos extraídos de las semillas en un período de 0, 24, 36, 48 y 72 horas posteriores a la germinación de la semilla.
4. Evaluación de los transcritos de las ARN Pol IV y V de *O. sativa*.
5. Determinación de la localización de las ARN Pol IV y V en cortes histológicos, para analizar la posible correlación de su localización con su posible función en el silenciamiento génico.



**Figura 1.3. Estrategia experimental.**

## 1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chinnusamy, V. and J.K. Zhu (2009). *RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants*. *Science*, 52(4), 331-343.
- Brisibe, E., D. Nishioka, H. Miyake, T. Taniguchi, and E. Maeda (1993). *Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane*. *Plant Science*, 89, 85-92.
- Dale, P. J. (1980). *Embryoids from cultured immature embryos of Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiologie*, 100, 73-77.
- Dudits, D., L. Bagre, L. Báó, D. Dedeoglu, Z. Magyar, T. Kapros, F. Fefoldi, and J. Gyorgyey (1993). *Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division*. *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle*, 111-131.
- Franz, P. and J. H. Schel (1991). *Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (Zea mays)*. *Canadian Journal Botany*, 69, 26-33.
- Goldberg, R. B., S. J. Barker and L. Perez-Grau (1989). *Regulation of gene expression during plant embryogenesis*. *Cell*, 56, 148-160.
- Hampsey, M. (1998). *Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 465-503.
- Herr, A. J., M. B. Jensen, T. Dalmay and D.C. Baulcombe (2005). *RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA*. *Science*, 308, 118-120.
- Huang, L., A. Jones, I. Searle, K. Patel, H. Vogler, N. C. Hubner, and D. Baulcombe (2009). *An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II*. *Natural Structural and Molecular Biology*, 16, 91-93.
- Huettel, B., T. Kanno, L. Daxinger, W. Aufsatz, A. J. M. Matzke, and M. Matzke (2006). *Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and pol IV in Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 25, 2828-2836.
- Jürgens, G. (1995). *Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues*. *Cell*, 81, 467-470.

- Kanno, T., B. Huettel, M.F. Mette, W. Aufsatz, E. Jaligot, L. Daxinger, D. P. Kreil, M. Matzke and A. J. Matzke (2005). *Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation*. *Nature Genetics*, 37, 761-765.
- Lahmy, S., D. Pontier, E. Cavel, D. Vega, M. El-Shami, T. Kanno, and T. Lagrange (2009). *PolV (PolIVb) function in RNA-directed DNA methylation requires the conserved active site and an additional plant-specific subunit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 941-946.
- Law, J. A. and S. E. Jacobsen (2010). *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*. *Nature*, 465, 204-220.
- Law, J., A. Vashisht, J. Wohlschlegel and S. Jacobsen (2011). *SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, As well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV*. *PLoS Genetics*, 7(7), e1002195.
- Lee, T.I. and R. A. Young (2000). *Transcription of eukaryotic protein-coding genes*. *Annual Review of Genetics*, 34, 77-137.
- Li, F. C., O. Pontes, M. El-Shami, I. R. Henderson, Y. V. Bernatavichute, S. W. Chan, T. Lagrange, C. S. Pikaard and S. E. Jacobsen (2006). *An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with cajal bodies in Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 126, 93-106.
- Luo, J. and B. D. Hall (2007). *A multistep process gave a rise to RNA Polymerase IV of land plants*. *Journal of Molecular Evolution*, 64, 101-112.
- Magyar, Z., L. Bakó, L. Bogre, D. Dedeoglu, T. Kapros and D. Dudits (1993). *Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells*. *The Plant Journal*, 4, 151-161.
- Marcussen, T., B. Oxelman, A. Skog and K. Jakobsen (2010). *Evolution of plant RNA polymerase IV/V genes: evidence of subneofunctionalization of duplicated NRPD2/NRPE2-like paralogs in Viola (Violaceae)*. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 45.

- Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel and A. Matzke (2009). *RNA-mediated chromatin-based silencing in plants*. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 367-376.
- Mosher, R., A. Schwach, D. Studholme D and D. Baulcombe (2008). *Pol IVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis*. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, 105 (8), 3145-3150.
- Mc Carty, D. R., C.B. Carson, P. S. Stinard, and D. S. Robertson (1989) *Molecular analysis of viviparous-1: An abscisic acid-insensitive mutant of maize*. *Plant Cell*, 1, 523-532.
- Mordhorst, A. P., M. A. Toonen and S.C. De Vries (1997). *Plant embryogenesis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16, 535-576.
- Nomura, K., and A. Komamine (1985). *Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture*. *Plant Physiology*, 79, 988-991.
- Normile,, D. (2002). *Beijing genomics institute: vromrom standing start to sequencing superpower*. *Science*, 296, 36-39.
- Onodera, Y., J. R. Haag, T. S. Ream, P. Costa, O. Pontes and C.S. Pikaard (2005). *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation*. *Cell*, 120(5), 613-22.
- Ooms, J., J. Leon-Kloosterziel, K. Bartels, H. Koornneef, and C. Karssen (1993). *Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 102, 1185-1191.
- Pikaard, C. and S. Tucker (2009). *RNA-silencing enzymes pol IV and pol V in maize: more than one flavor?*. *PLoS Genetics*, 5(11), e1000736.
- Pontes, O., F. Li, N. Costa, J. Haag, T. Ream, A. Vitins, S. E. Jacobsen, and C. S. Pikaard (2006). *The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center*. *Cell*, 126, 79-92.
- Pontes, O., N. Costa, P. Vithayathil, and C. S. Pikaard (2009). *RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway*. *Molecular Plant*, 2(4), 700-710.

- Pontier, D., G. Yahubyan, D. Vega, A. Bulski, J. Saez-Vasquez, M. A. Hakimi, S. Lerbe-Mache, V. Colot V., and T. Lagrange (2005). *Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis*. *Genes and Development*, 19, 2030-40.
- Quiroz-Figueroa, F. R., C. F. J. Fuentes Cerda, R. Rojas-Herrera, and V. M. Loyola Vargas (2002). *Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20, 1141-1149.
- Ream, T. S., J. R. Hagg, A. T. Wierzbicki, C. D. Nicora, A. Norbeck, J. K. Zhu, G. Hagen, T. J. Guilfoyle, L. Pasa-Tolic, and C. S. Pikaard (2009). *Subunit compositions of the RNA-Silencing enzymes pol IV and pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II*. *Molecular Cell*, 33, 1-12.
- Steward, N., T. Kusano, and H. Sano (2000). *Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells*. *Nucleic Acids Research*, 28, 3250-3259.
- Soppe, W. J., Z. Jasencakova, A. Houben, T. Kakutani, A. Meister, M. S. Huang, S. E. Jacobsen, I. Schubert and P. F. Fransz (2002). *DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 21, 6549-6559.
- Thorpe, T. A. (1995). *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers. pp. 17-72.
- Vasil, Y. and I. K. Vasil (1980). "Clonal propagation", in *Perspectives in plant cell and tissue culture*. Vasil, I. K. (ed). International Review of Cytology. pp 143-173.
- Vasil, K. and Y. Vasil (1995). "In vitro culture of cereals and grasses", in *Plant cell and tissue culture*, Vasil, I. K. and T. A. Thorpe (eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 293-312.
- Wernicke, W. and R. Brettell (1980). *Somatic embryogenesis from Sorghum bicolor leaves*. *Nature*, 287, 138-139.

- Wierzbicki, C.S., J. R. Haag, and C. S. Pikaard (2008). *Noncoding transcription by RNA polymerase pol IVb/pol V mediate transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes*. Cell, 135, 635-648.
- Xie, Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen and J. C. Carrington (2004). *Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants*. PLoS Biology, 2(5), e104.
- Xi-ji, A. (2002). *Projecting China's grain demand and supply, China's agriculture at the crossroads*. Yang Y. and W. Tian (eds). St. Martin's Press, New York. pp. 180-193.
- Yokthongwattana, C., E. Bucher, M. Caikovski, I. Vaillant, J. Nicolet, O. Scheid and Paszkowski (2010). *MOM1 and pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing*. The EMBO Journal, 29, 340-351.
- Zilberman, D., X. Cao, L. K. Johansen, Z. Xie, J. C. Carrington, and S. E. Jacobsen (2004). *Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats*. Current Biology, 14, 1214-1220.
- Zimmerman, J. L. (1993). *Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants*. The Plant Cell, 5, 1411-1423.

## Capítulo 2

### Análisis de secuencias y estructuras de las ARN Pol IV y V

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

Los genes sufren mutaciones a través del tiempo. Como resultado, algunas proteínas sufren cambios, por ejemplo a nivel de su estructura primaria que pueden determinar un cambio o no en su estructura terciaria. Además de mutaciones puntuales (sustitución de un aminoácido por otro), la secuencia de una proteína puede perder aminoácidos (mutación por eliminación) o tener aminoácidos insertados (mutación por inserción). Si examinan las diferencias entre dos proteínas homólogas, se observará una tendencia general a encontrar residuos químicamente similares en la misma posición (residuos conservados) en ciertas regiones (Martínez-Frías, 2010).

El análisis de secuencias es uno de los procesos más extensos y complicados dentro de la bioinformática. La comparación de secuencias de aminoácidos permite descubrir qué partes de las secuencias están conservadas y descubrir qué proteínas tienen un origen común. La comparación de secuencias también nos ayuda a predecir la estructura de las proteínas (las proteínas homólogas tienen una misma arquitectura tridimensional) o predecir su función. No obstante cabe mencionar que proteínas con un origen común pueden terminar desarrollando distintas funciones (Hagen, 2000).

Este es el caso para las ARN Polimerasas, las cuales después de analizar su estructura tridimensional, de diferentes tipos y en organismos diversos, (bacterias, levaduras y humanos), se observa que aunque existen diversos cambios en aminoácidos, su estructura prevalece. Las diferencias principales radican en los péptidos asociados a ellas. Las dos primeras subunidades de todas las ARN polimerasas forman la estructura esencial donde se encuentra el sitio activo, en el que ocurre la síntesis de ARN (Zhang *et al.*, 1999).

Las ARN polimerasas I, II y III están formadas por un conjunto de 12-17 proteínas, y entre ellas comparten similitud de la secuencia y estructura (Cramer *et al.*, 2001). En el análisis de la secuencia del genoma de *A. thaliana*, se observaron específicamente dos tipos de polipéptidos que podrían ser las subunidades clave de la ARNP IV y V. No se descartó la posibilidad de que existiera en otros organismos, por lo que se analizó el genoma de *O. sativa* observando que en este también se encontraban

secuencias similares que podrían corresponder a las dos subunidades principales de la ARNP IV y V (Onodera *et al.*, 2005).

Debido a que las secuencias de las ARN Pol IV y V han sido identificadas, se procedió a un análisis comparativo con la ARN Pol II para determinar regiones de similitud para posteriormente seleccionar secuencias peptídicas que sirvan de respuesta inmune.

Esto se realizó debido a que la estructura de la ARN Pol II ha sido determinada por rayos X (Hahn *et al.*, 2004). Por lo cual se utilizó como esqueleto comparativo para determinar posibles regiones que puedan ser fácilmente reconocidas por anticuerpos y que estos permitan realizar estudios de inmunolocalización e inmunoprecipitación, en donde se encuentran en su estado nativo.

El análisis comparativo de las secuencias de las dos subunidades principales de las ARN Pol II, IV y V sirvió para definir secuencias peptídicas y de estas se seleccionaron secuencias tanto de las regiones conservadas como de las no conservadas. Posteriormente estos péptidos serán utilizados para producir anticuerpos contra la ARN Pol IV y V.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LAS ARN POL IV Y V

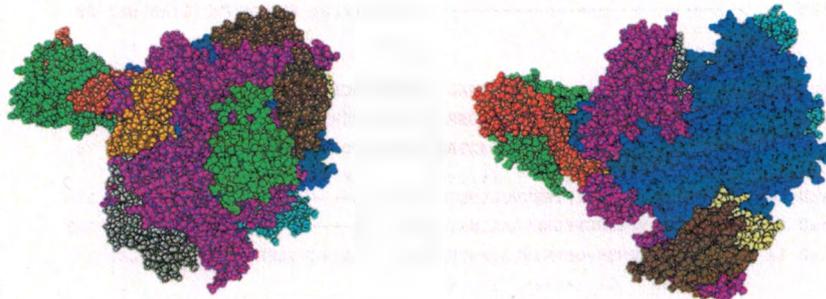
Las secuencias de aminoácidos de diferentes subunidades de la ARN Pol II de *A. thaliana*, de las ARN Pol IV y V de *O. sativa*, y *A. thaliana*, fueron obtenidas del Genbank; a partir del cual sus números de acceso son los siguientes: OsXP473570 (subunidad 1a de la ARN Pol IV de *O. sativa*), OsNP914279 (subunidad 1b de la ARN Pol IV/ ARN Pol V de *O. sativa*), OsAK121416 (subunidad 2a de la ARN Pol IV de *O. sativa*), At1g63020 (subunidad 1a de la ARN Pol IV de *A. thaliana*), AtNP181532 (subunidad 1b de la ARN Pol IV/ ARN Pol V de *A. thaliana*), At3g23780 (subunidad 2a de la ARN Pol IV de *A. thaliana*), At4g35800 (subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana*), y At4g21710 (subunidad 2a de la ARN Pol II de *A. thaliana*) (Onodera *et al.*, 2005). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente al alineamiento, se seleccionaron fragmentos de secuencias de las regiones conservadas y no conservadas, y se realizó el análisis estructural. Las secuencias seleccionadas se denominaron AZYRO, seguido de un número.

También se realizó una comparación de estos fragmentos seleccionados con la base de datos de NCBI mediante un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para asegurar que las secuencias no tuvieran similitud con otras proteínas de *Oryza sativa*.

### 2.2.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LAS ARN POL IV Y V

Para este análisis se utilizó el programa Cn3D-4.1 (Wang *et al.*, 2000), el cual es una herramienta que permite visualizar la estructura y la secuencia de una proteína determinada. Esta aplicación, combinado con esquemas de color, denota las regiones de interés en la proteína analizada. Se utilizó como base la ARN Pol II, cuya estructura fue obtenida por cristalografía de rayos X (Figura 2.1) (Hahn *et al.*, 2004).

Se compararon las secuencias de la ARN Pol IV con las secuencias de la ARN Pol II. Estos fragmentos que tuvieron un grado de conservación. Se visualizaron en la estructura de la molécula de la ARN Pol II. De igual manera se realizó este procedimiento con la ARN Pol V. Cabe mencionar que el programa nos permitió rotar la molécula por diferentes ángulos y ejes, lo que ayudó a tener una mejor visión del segmento marcado. De las secuencias que se analizaron se eligieron para sintetizar los péptidos, los segmentos de las secuencias que se encontraban expuestas en la superficie de la molécula.



**Figura 2.1.** Estructura de la molécula de la ARN Pol II vista desde dos ángulos diferentes. Resaltan las dos subunidades mayores: la subunidad uno (rosa) y la subunidad dos (azul).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS ARN POL IV Y V

Se realizaron tres alineaciones: la primera, con las secuencias de aminoácidos de las subunidades 1a de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OrsatD), la ARN Pol IV de *A. thaliana* (ArthaD) y la ARN Pol II de *A. thaliana* (ArthaB), la segunda alineación se hizo con la secuencia de aminoácidos de las subunidades 2a de estas proteínas y, la tercera con las secuencias las subunidades 1b de la ARN Pol IV/ARN Pol V de *O. sativa* (OrsatD), de la ARN Pol IV/ARN Pol V de *A. thaliana* (ArthaD) y la subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (ArthaB).

Para diseñar péptidos que sirvieran para la producción de anticuerpos, se seleccionaron secuencias tanto de las regiones no conservadas como de las regiones conservadas. En las Figuras 2.2, 2.3 y 2.4 se presentan las secuencias alineadas resaltando aquellas que preliminarmente se seleccionaron para generar los péptidos.

<b>Subunidad 1a</b>	
<b>AZYRO 1</b>	
OrsatD 1a	<b>MAVRPNDSRPSDVRPFPSQI</b> PRFRGGRKQHQ <b>M</b> EEPSLEVNN <b>PVAELNAIKFSL</b> MTSDM 60
ArthaD 1a	----- <b>MEDDCEELQVPVGLT</b> LSIGF <b>SIS</b> MNNDR 28
ArthaB 1a	----- <b>MDTRFPFSPA</b> EV <b>SKVRV</b> VQ <b>FGIL</b> SPDEI 28
	* : * : * : * : *
OrsatD 1a	<b>EKLSSATIIEMC</b> ----- <b>DVTNAKLG</b> L <b>PN</b> GAPQ <b>CATCG</b> RSIRDCD <b>GK</b> KL <b>TK</b> L 110
ArthaD 1a	<b>DKMSVLEVEAPN</b> ----- <b>QV</b> TD <b>SRLGL</b> PN <b>PDSV</b> CR <b>TCG</b> SKDR <b>KV</b> CEG----- 69
ArthaB 1a	<b>ROMSVIHVEH</b> SETTEK <b>GPKV</b> GG <b>LS</b> DT <b>RLGT</b> IDR <b>KVK</b> CE <b>T</b> MAN- <b>MAECPG</b> ----- 78
	:: * : : : : * * : * * : *
OrsatD 1a	<b>G</b> HFG <b>VIK</b> L <b>AATV</b> HNS <b>YFIE</b> EV <b>Q</b> LL <b>NQ</b> IC <b>PG</b> CL <b>TL</b> KQ----- <b>NGD</b> TK <b>KAD</b> GTT 158
ArthaD 1a	- <b>H</b> FG <b>VINE</b> A <b>YSI</b> IN <b>PY</b> FL <b>KE</b> VA <b>ALLN</b> K <b>IC</b> PG <b>CK</b> Y <b>IRK</b> ----- <b>HQ</b> FQ <b>IT</b> ED--- 113
ArthaB 1a	- <b>H</b> FG <b>YLE</b> L <b>AKP</b> MY <b>HV</b> GM <b>KTV</b> LS <b>IM</b> RC <b>V</b> FC <b>NS</b> SK <b>IL</b> A <b>DEV</b> CR <b>S</b> L <b>FR</b> Q <b>AM</b> K <b>IK</b> NP <b>KN</b> RL <b>KK</b> 137
	*** : * : : * : * : : * : * : :
OrsatD 1a	<b>I</b> Q <b>GT</b> CK <b>Y</b> CS <b>KD</b> GS <b>KL</b> Y <b>PSI</b> I <b>F</b> K <b>ML</b> TS <b>PR</b> VT <b>LS</b> RS <b>KL</b> HR <b>NT</b> SV <b>MD</b> K <b>MSI</b> IA <b>EV</b> AG <b>G</b> VA <b>H</b> KS 218
ArthaD 1a	<b>Q</b> PER <b>CR</b> Y <b>CT</b> LN <b>TG</b> -- <b>Y</b> PL <b>MK</b> FR <b>VT</b> T----- <b>K</b> EV <b>F</b> RR <b>S</b> GI <b>V</b> VE <b>V</b> NE <b>S</b> LM <b>KL</b> 157
ArthaB 1a	<b>I</b> LD <b>ACK</b> N <b>K</b> TK <b>CD</b> GG <b>DDI</b> DD <b>VQ</b> SH <b>S</b> T <b>DE</b> P <b>V</b> K <b>S</b> RG <b>G</b> CA <b>Q</b> PK <b>L</b> T <b>IE</b> GM <b>K</b> IA <b>EY</b> K <b>IQ</b> R <b>KK</b> 197
	* : . * : . : . *





**Continuación subunidad 1a**

OrsatD 1a **K**MENKSGKLGKNGLTGNECVKN-----**Q**TCCVTHVVQVEINS----- 961  
 ArthaD 1a **N**RELKLDIVDLDIQNTNHCCSSDDQAMKDDNVCIITVTVVEASKHS----- 1056  
 ArthaB 1a **N**VAKRIKTPSLSVYLTP**E**ASKSKEGAKTV**Q**CALEY**T**TLRSV**T**QA**T**EVWYDPPDMSTIIEE 1186  
 : : ..: . . . : . . : :

OrsatD 1a -----**M**SQLDVIKERVIP**S**ILATLLKGFLE**F**KN-----**V**KVQCQEDNELVLK 1003  
 ArthaD 1a -----**V**LELDAIRLVLI**P**FLDS**P**VKGDQ**G**IK**K**-----**V**NILWTRPKAPKR 1098  
 ArthaB 1a DFEFVRSYYEMP**D**ED**V**SPDK**I**SP**W**LLRIELNRE**M**V**D**KKLSMADIA**E**KINLE**F**DDDL**T**CI 1246  
 : : \* . : \* \* : : . : :

OrsatD 1a **V**VCKI**H**NRCY**W**KEYPS**T**AL**T**GCGR**L**P-----**I**CEWAV**P**WAK**Q**S**R**F**K**AA**K**DL**R**PA**H**S**F**I 1056  
 ArthaD 1a **N**GNHL**A**G**E**LY**L**K**V**TM**Y**GDR**G**-----**K** 1119  
 ArthaB 1a **F**ND**D**NA**Q****K**L**I**L**R**I**R**IM**N**DE**G**P**K**G**E**L**Q**DE**S**A**E**DD**V**L**K**K**I**ES**N**ML**T**EM**A**L**R**G**I**P**D**IN**K**V**F**I 1306  
 . . . :

OrsatD 1a **N**AA**K**R**D**S**V**DN**L**SG**T**LD**A**I**A**W**G**KE**P**C**A**G**S**SG**P**FK**I**L**Y**SG**K**SH**E**T**K**Q--**N**E**H**I**Y**DF**L**HN**P**EV 1114  
 ArthaD 1a **R**NC**W**T**A**LE**T**CL**P**IM**D**M**I**D**W**GR-----**S**HP**D**NI**R**Q--**C**CS**V**Y**G**ID**A**G--- 1159  
 ArthaB 1a **K**Q**V**R**K**S**R**F**D**E**E**GG**F**K**T**SE**E**W**M**LD**T**E**G**V**N**L**A**VM**C**H**E**D**V**D**P**K**R**TT**S**N**H**LI**E**IE**I**EV**L**GI**E**AV 1366  
 . : : \* . . . . : :

OrsatD 1a **Q**ALE**K**N**V**MD**T**Y**R**K**R**TE**K**TS**K**RR**S**AL**N**SE**G**N**A**T**I**NG**G**A**I**S**F**N**Q**K**F**L**N**A**K**V**G**I**W**EN**I**I**D**M**R**T 1174  
 ArthaD 1a **R**SI**F**VA**N**LE**S**AV**S**DT**G**KE**L**RE**H**LL**V**AD**S**LV**T**GE**F**VA**L**NA**K**W**S**K**Q**R----- 1208  
 ArthaB 1a **R**R**A**LL**D**EL**R**V**V**IS**F**D**G**S**Y**V**N**Y**R**HL**A**IL**C**D**T**M**T**Y**R**GH**L**MA**I**TR**H**GI**N**R**N**D----- 1415  
 : : . . . . . : : \* : : : : :

OrsatD 1a **S**L**Q**N**L**RE**Y****T**L**N**EV**T**E**Q**D**K**S**C**L**M**E**A**L**K**F**H**PR**G**Y**D**K**I**G**V**G**I**RE**I**K**I**G**V**N**P**G**H**P**S**S**R**C**F**I**V** 1234  
 ArthaD 1a --**Q**VE**S**T**P**AP**F**T**Q**AC**F**SS**P**S**Q**C**F**L**K**AA**K**E**G**V**R**--**D**DL**Q**GS**I**D**A**L**A**W**K**V**P**G**F**G**T**G**D**Q**F**E**I** 1264  
 ArthaB 1a -----**T**GPL**M**R**C**S**F**E**E**T**V**D**I**LL**D**AA**A**Y**A**E**T**--**D**CL**R**GV**T**EN**I**ML**G**Q**L**A**P**I**G**T**G**D**C**E**L**Y 1466  
 . : . . . . : : \* : : \* . . : :

OrsatD 1a **L**R**N**DD**T**T**A**D**F**S**Y**N**K**F**Q**G**V**C**S**R**G**CG**V**L**H**IG**G**SG**P**ML**L**AG**R**RY**G**DE**C**R**C**Y**L**H**A**GS**I**ND**G**F**S** 1294  
 ArthaD 1a **I**ISP-----**K**V**H**FT**T**F**V**D**V**Y**D**LL**S** 1284  
 ArthaB 1a **L**NDE**M**L**K**NA**E**IE**L**Q**L**PS**Y**MD**G**-----**L**E**F**GM**T**PAR**S**P**V**SG**T**P**Y**H**E**GM**S**P**N**Y**L**L**S**PN**M** 1518  
 : . : . . . : :

OrsatD 1a **L**L**T**PL**H**GH**Q**KE**P**LL--**F**V**G**IP**D**AV**K**AW**D**L**A**KL**Q**W**H**PF**W**S**Y**RS**Y**NA**L**ALL**G**S**I**S**I**IL**F**SG 1352  
 ArthaD 1a **S**TK**T**M**R**RT**N**S**A**P-----**K** 1297  
 ArthaB 1a **R**LS**P**MS**D**A**Q**FS**P**Y**V**GG**M**A**F**SP**S**SG**Y**SP**S**PG**Y**SP**S**PG**Y**SP**T**SP**G**Y**S**PT**S**PG**Y**SP**T**SP**G**Y**S**PT**S**P 1578  
 . : : \* . . . . : :

OrsatD 1a **S**NN**Q**L**G**C**Y**G**K**LE**T**GS**L**AV**T**Y**T**H**N**ED**H**G**A**L**A**L**A**GM**Q**DA**Q**L**N**P**I**LL**W**ST**N**Y**N**I**V**H**L**Y**E**LP**S** 1412  
 ArthaD 1a **S**DK**A**T**V**Q**P**F**G**L**H**S**A**F**L**K**D**I**K**V**L**D**G**K**G**I**P**MS**L**LR**T**I**F**W**K**N**I**EL**S**Q**S**L**K**R**I**L**H**S**Y**E**I**N**E** 1357  
 ArthaB 1a **T**YS**P**SP**G**Y**S**PT**S**PA**Y**S**P**T**S**PS**Y**SP**T**SP**S**Y**S**PT**S**PS**Y**SP**T**SP**S**Y**S**PT**S**PS**Y**SP**T**SP**S**Y**S**PT**S**PS**Y**SP 1638  
 : . : . . . : . : :

**Continuación subunidad 1a**

```

OrsatD 1a MEEQVRKAVFLNRETFGSQFALAISRI PYSVVEEYTSGLEELFADVGTWKKQVGDTSLS 1472
ArthaD 1a LLNER-----DEGLVKMVLQLHPNS 1377
ArthaB 1a TSPAYSPTSPAYSPTSPAYSPTSPSYSPSTSPSYSPSTSPSYSPSTSPSYSPSTSPSYSPSTSPA 1698
      . . . . .

OrsatD 1a RGLETVGTNHTLAQVQENGLSDLFLHFKITGSPWKRKNKHLNQQQMYDYQAMTLRPIQEM 1532
ArthaD 1a VEKIGPGVKGIRVAKSKHGDSCCFEVVRIDG----- 1408
ArthaB 1a YSPTSPGYSPTSPSYSPSTSPSYGPTSPSYNPQSAKYSPS----- 1737
      * . . . . *

OrsatD 1a MRNNTHEYGFNFFLEKLGQQTGTC TSDHLNKKVAVCSNLGMEINRNELG YTHLLASRL 1592
ArthaD 1a -----TFEDFSYHKCVLGATKI IAPKKM 1431
ArthaB 1a -----IAYS P NARLSPASPYSPTSPNYSPSTSPSYSPSTSPSYSPSTSPSYSPSTSPSS 1785
      : . . . . :

OrsatD 1a PLDVGAYLERTCNGVSSKREVGNHFTAHIPLRESSADRRPRENKRERKSKATMPVSTLV 1652
ArthaD 1a NFKYSKYLKN--GTLESGGFSENP----- 1453
ArthaB 1a PYSSGASPDYSPSAGYSPTLPGYSPSSTGQYTPHEGDKKDKTGKKDASKDDKGNP----- 1840
      . . . . .

OrsatD 1a TVLHITYSAIPS 1664
ArthaD 1a -----
ArthaB 1a -----

```

**Figura 2.2.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la subunidad 1a de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OrsatD) con la subunidad 1a de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (ArthaD) y la subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (ArthaB). Los residuos marcados con un asterisco representan aminoácidos idénticos. Las letras indicadas con puntos representan aminoácidos con propiedades similares. Las letras de color negro representan las regiones no conservadas; Las letras de color café representan las regiones conservadas. Las letras en negrita y subrayadas representan las secuencias seleccionadas para diseñar los péptidos. Los números de acceso de las secuencias se encuentran entre paréntesis subunidad 1a de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OsXP473570); subunidad 1a de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (At1g63020) y subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (At4g35800) (Onodera et al 2005). † representan el sitio activo (Cramer et al., 2001). La alineación múltiple se llevó a cabo con el programa ClustaW Se denomino AZYRO a las secuencias seleccionadas.



**Continuación subunidad 1b**

```
OrsatD 1b --TKGPREATFFLNLLQPLLMESLLIDCF SINLGDFTVPSPILEAIQNNP-----
ArthaD 1b FLEKGPKETLGFDFDSLQPLLMESLFAEGFSLSELDLSMSRADMDVIHNLII-----
ArthaB 1a WEEVGPDAARKFLGHTQWLVN YWLLQNGFTIGIGDTIADSSMTEKINETISNAKTAVKDL
      * * : * : . * * : * : : * : : * : . : : * : :

OrsatD 1b LELN-----KYREPIMDFITHSSAIGLLVDPKSDSNMNVVEQ
ArthaD 1b IREISPMVSRRLRSLYRDELQLENSIHKVKEVAANFMLKSYSIRNLIDIKNSAITKLVQQ
ArthaB 1a IRQFQKELDPEPGRTMRDTFENRVNQVLNKARDAGSSAQKSLAETNNLKAMVTAGSKG
      : . : : : : : : : : * : : : : : :

OrsatD 1b LGFLGPQLQHNRLYSSRLVEDCLSKSLHRC CGSTNCCNPLEEYGTVRSSIIYHGLNPYEA
ArthaD 1b TGFLGLQLSDKKKFFYTKLVEDMAIFCKRKYGRISSSG---DFGIVKGCFFHGLDPYEE
ArthaB 1a SFINISQMTACVQQQNVGKRI PF GFDGRTLPHFTKDDYGPESRGFVENS YLRGLTPQEF
      : * : * : : : : : : : : : : : * * * . . : * * *

OrsatD 1b LLHSICEREKIMRASKGLVEPGSLFKNMMSRLRDVTACYDGSIRTS SGNLVLQFGS----
ArthaD 1b MAHSIAAREVIVRSSRGLAEPGLFKNLMAVLRDIVITNDGTVRNTCSNSVIQFKYGVDS
ArthaB 1a FFHAMGGREGLIDTAVKTS ETGYIQRRLVKAMEDIMVKYDGTVRNSLG-DVIQLYGEDG
      : * : : * * : : : * * : : : : : : : * * : * * : * *

OrsatD 1b -RDASNCVTPGDPVGI LAATAVANAA YKAVLAPNQNNII SWDSMKEVLLTRASTKADANH
ArthaD 1b ERGHQGLFEAGEPVGVLAATAMSNPAYKAVLDSSPNSNSSWELMKEVLLCKVNFQNTTND
ArthaB 1a -MDAVWIESQKLDLKMKKSEFDRTFKYEIDDENWNP TYLSDEHLEDLKGIREL RDVFDA
      . : : : . . . : : * : : : * * : : : :

OrsatD 1b RKVILYLNQCSCENECMERALTIRACLRRRIKLEDCTTEISINTSLCDQHTDDDKKFKVSC
ArthaD 1b RRVILYLNCHCGKRFCEQENA ACTVRNKLNVSLKDTAVEFLVEYRKQPTISEIFGIDSC
ArthaB 1a EYSKLETDRFQLGTEIATNGDSTWPLPVNIK RHIWNAQKTFKIDLRKISDMHPVEIVDAV
      . * : . . . : : * : : : . . . :

OrsatD 1b LQFFLPG-----
ArthaD 1b LHGHIHLNKTL LQDWNISMQDIHQKCEDVINS LGQKKKKKATDDFKRTSLSVSECCSFRD
ArthaB 1a DKLQERL-----
      :

OrsatD 1b -----SITKNISESTERVIDFMTNAIFPIILD TVIKGDPRVEEANLVRIEPE
ArthaD 1b PCGSKGSDMPCLTFSYNATDPDLERTLDVLCNTVYPVLEIIVKGDSTRICSANIIWNSSD
ArthaB 1a -----LVVPGDDALSVEAQKNATLFFNILLRSTLASKRVLEEYKLSR----
      . . . : : : : : * : . . . : : : :

OrsatD 1b STFVWQSSGAEQKGEAALEITVEEAAAAESGNAGVAMNACIPVMDLIDTTRSMPYDIQQ
ArthaD 1b MTTWIRNRHASRRGEWLDVTV EKS AVKQSGDAWRVVIDSCLSVLHLIDTKRSIPYSVKQ
ArthaB 1a AFEWVIGIEI ESRFLQSLVAPGEMIGVAAQSIGEPATQMTLNTFHYAGVSAKNVTLGVPR
      * : . . : : : : . . . . . : : : : : : : : :

OrsatD 1b VRQVFGISSAF EKVTQVQLFPFLLLA EIQYLSKSVGMITKSVLQEHLLTVASSMCTGDGL
ArthaD 1b VQELLGLSCAF EQAVQR-----LSASVRMVSKGV LKEHII LLANNMTCSGTM
ArthaB 1a LREIINVAKRIKTPSLSVYLTPEASKSKE-GAKTVQCALEYTTLRSVTQATEVWYDPPDM
      : : : : : : : : : * : : : : : : : :

OrsatD 1b HGFNNSGYKATCQSLKVQAPFMEATLSRSIQCFEKA AAKAYS DQLGNVVSACSWGNNAEI
ArthaD 1b LGFNSSGGYKALTRSLNIKAPFTEATLIAPRKC FEKAAEKCHTDSLSTVVGCSWGKRV DV
ArthaB 1a STIIEEDFEFVRSYYEMPDEDVSPDKIS PWLLRIELNREMMV DKKLSMADIAEKINLEFD
      : . : : : : : : : : * : . . . . . :
```



**Continuación subunidad 1b**

```

OrsatD 1b -----
ArthaD 1b  QSQSQSPSQTQTQSPSQTQAQAQSPSSQSPSQTQT
ArthaB 1a  SSTGQYTPHEGDKKDKTKGKKDASKDDKGNP-----
    
```

**Figura 2.3.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la subunidad 1b de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OrsatD) con la subunidad 1b de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (ArthaD) y la subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (ArthaB). Los residuos marcados con un asterisco representan aminoácidos idénticos; Las letras indicadas con puntos representan aminoácidos con propiedades similares. Las letras en negrita y subrayadas representan las secuencias seleccionadas para diseñar los péptidos. Los números de acceso de las secuencias se encuentran entre paréntesis subunidad 1b de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OsNP914279); subunidad 1b de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (AtNP181532) y subunidad 1a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (At4g35800) (Onodera et al 2005). † representan el sitio activo (Haag et al., 2009). La alineación múltiple se llevó a cabo con el programa ClustaW. Se denominó AZYRO a las secuencias seleccionadas.

**Subunidad 2a**

```

                AZYRO 7
ArthaD 2a  -----MPDMDIDVK-----DLEEFEATTGEINLS----- 24
OrsatD 2a  ARTLLPPLHSPRKHRSHASDAGIPASGDGFALRRRPSSPLEVMEEPSKDNGQSSCVVDP 60
ArthaB 2a  -----MEYNEYEPEPQYVEDD----- 17
                : * . .
ArthaD 2a  ELGEGFLQSFCKKAATSFDKYGLIS-----HQLNSYNYFIEHGLQNVFQSFGEMLVE 77
OrsatD 2a  ELEPMLDDDAREGVSHTLDDDANGHSSMDVDRGCHSMDTTRSSLGDDGKKRDSYAQIPVD 120
ArthaB 2a  --DEEITQEDAWAVISAYFEEKLVR-----QQLDSFDEFIQNTMQEIVDESADIEIR 68
                : : . : : * : : : : : : : : : :
ArthaD 2a  PSFDVVKKKNDWRYATVKFGEVTVEKPTFFSDDKE---LEFLPWHARLQNMTYSARIKV 134
OrsatD 2a  MSIPSLEKFCKEAGPSLMRLVSAIRLITSLSHMGS---RNFLLWGKLWSLVMLQIED 177
ArthaB 2a  PESQHNPGHQSDFAETIYKISFGQIYLSKPMTESDGETATLFPKAARLRNLTYSAPLYV 128
                . : : : : . : . : : * . : :
ArthaD 2a  NVQVEVKNTVVKSDK----- 150
OrsatD 2a  QVAGDMLSSSLECNKQYFLMDVILMNRSNSQGMLAYRIHILPKKWFISRETLWRR 237
ArthaB 2a  DVTKRVIKKGHD----- 140
                * : : .
    
```





**Continuación subunidad 2a**

```

ArthaD 2a  RSMIFMGPTFYQRLVHMS†EDKVKFRNTG†VPVHPLTRQPVADRKRFGGIKEGEMERDCLIAH 1086
OrsatD 2a  HSLIFMGPTFYQRLIHMAEDKVKFRNTG†VPVHPLTRQPVADRKRFGGVKFGEMERDCLLAAH 1201
ArthaB 2a  TAMIFLGPTYYQRLKHMVDDKIHSRGRGVPVQILTRQPAEGRSRDGG†LRFGEMERDCMIAH 1102
      ::**::***::**** ** :***: * . ***: ***** . . . . . :-----:--

      AZYRO 8
ArthaD 2a  G†ASANLHERLFTLSDSSQM†HICRCK†YANVIERTPSSGRKI†GGPYCRVCVSSD†HVVRVY 1146
OrsatD 2a  GAAANLHERLFMLSD†FSQM†HVCQTCE†RVANVIMR†VP†G†GK†IE†GP†YCGFCRSSEN†IVRIN 1261
ArthaB 2a  GAAHFLKERLFDQSDAYRVHVCEVCG†LIAIANLKKNS-----FECRGCKNKT†DIVQVY 1155
      ** : *::*** ** :*:*. * * . : . * * .. :*:

ArthaD 2a  V†PYGAKLLCQELFSMGI†TLNFDTKL†C----- 1172
OrsatD 2a  V†PYGAKLLYQELFSMGI†CLRFETE†VCNSTSTIDSPCIYILVVPWFRCYGHCCSHMTSLPV 1321
ArthaB 2a  I†PYACKLLFQELMSMAI†APRMLTK†HLKSAKGRQ----- 1188
      :*. . . . . *** :*:. . . . . :

ArthaD 2a  -----
OrsatD 2a  GRWHSEGISQVKPF†FCYLFGR†LN†SHH†LP†MSCDQ†P†MALGM†IRG†LK†TLL†FDVSPWHCT 1381
ArthaB 2a  -----

ArthaD 2a  -----
OrsatD 2a  MHIWMKTHF 1390
ArthaB 2a  -----

```

**Figura 2.4.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la subunidad 2a de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OrsatD) con la subunidad 2a de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (ArthaD) y la subunidad 2a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (ArthaB). Los residuos marcados con un asterisco representan aminoácidos idénticos; Las letras indicadas con puntos representan aminoácidos con propiedades similares. Las letras de color negro representan las regiones no conservadas; Las letras de color café representan las regiones conservadas. Las letras marcadas en negrita y subrayadas representan las secuencias seleccionadas para diseñar los péptidos. Los números de acceso de las secuencias se encuentran entre paréntesis subunidad 2a de la ARN Pol IV de *O. sativa* (OsAK121416); subunidad 2a de la ARN Pol IV de *A. thaliana* (At3g23780) y subunidad 2a de la ARN Pol II de *A. thaliana* (At4g21710) (Onodera et al 2005). † representan el sitio activo (Cramer et al., 2001). La alineación múltiple se llevo a cabo con el programa ClustaW. Se denomino AZYRO a las secuencias seleccionadas.

Los análisis de comparación de secuencias de aminoácidos de la ARN Pol IV de *O. sativa* con la ARN Pol IV de *A. thaliana* mostraron una identidad entre las subunidades 1a del 30%, del 23% entre las subunidades 1b, mientras que entre las subunidades 2a fue de 55%. De igual manera, cabe destacar que se determinó en las secuencias de aminoácidos de regiones conservadas (figuras 2.2-2.4). Las proteínas ARN Pol reportadas en estas especies poseen un alto grado de similitud, lo que era de esperarse, dado que las ARN polimerasas son proteínas que se encuentran muy conservadas en todos los organismos eucariontes (Hahn *et al.*, 2004). La región de la proteína con mayor conservación es el sitio activo (Onodera *et al.*, 2005).

Para haber obtenido las secuencias de los péptidos del cuadro 2.1, cabe mencionar que después del análisis comparativo de las secuencias de las ARN Pol II, IV y V, se seleccionaron 28 posibles secuencias para la síntesis de los péptidos. Sin embargo durante el proceso de selección, se analizó que dichas secuencias no fueran similares a otras proteínas o a las ARN Pol I, II y III. De tal manera que se eligieron las once secuencias que se encuentran en el cuadro 2.1 para el análisis de estructura

### 2.3.2 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LAS ARN POL IV Y V

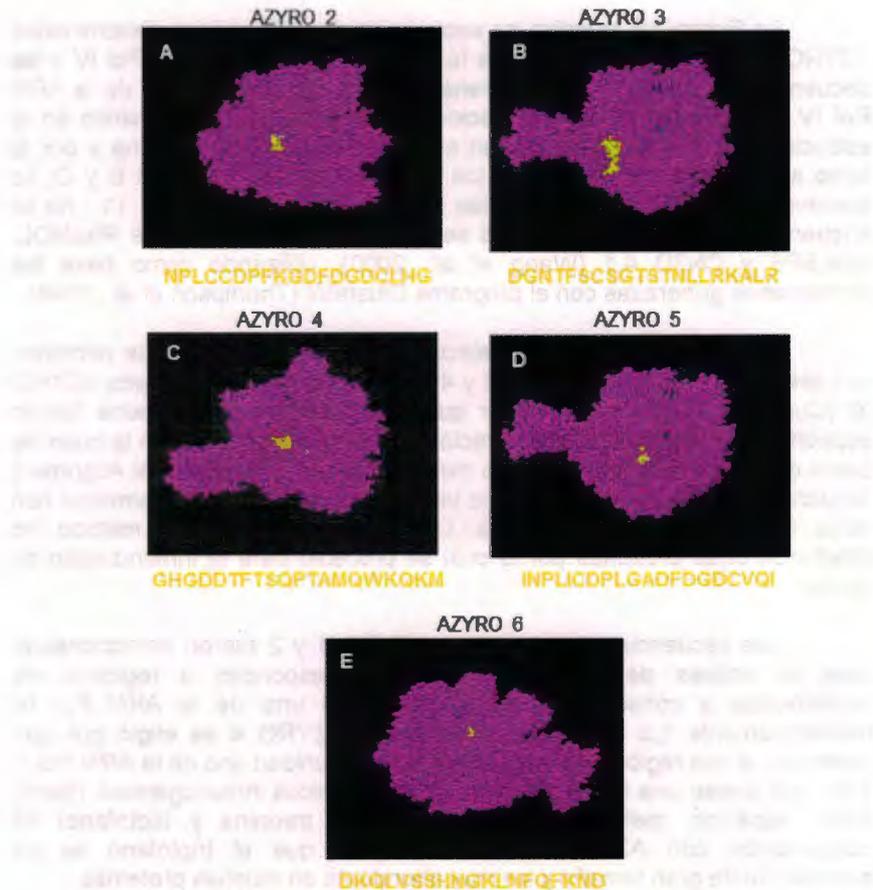
Para este análisis se utilizó como modelo la estructura de la ARN Pol II de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta estructura fue obtenida por cristalografía de rayos X (Allison *et al.*, 1985). El análisis se realizó para determinar si las secuencias seleccionadas se encontraban expuestas en la superficie de la proteína, ya que de esta forma se facilitaría la producción de epítopes para la producción de anticuerpos a la molécula. Se analizó en la estructura las secuencias seleccionadas. Los segmentos que se encontraban expuestos en la superficie de la molécula (amarillo) (Figuras 2.5-2.6), fueron elegidos para sintetizar los péptidos correspondientes.

En la Figura 2.5, se observa la secuencia de aminoácidos denominada AZYRO 2 correspondiente a la subunidad uno de la ARN Pol IV y muestra las secuencias AZYRO 3, 4, 5 y 6 pertenecientes a la subunidad uno de la ARN Pol V. La secuencia de aminoácidos marcadas de color amarillo en la estructura son las que se ubican en la superficie de la proteína y por lo tanto se eligieron para sintetizar los péptidos. Sin embargo, AZYRO 6 que muestra que la mayoría de los aminoácidos de su secuencia no se encuentran expuestos. En el caso de la secuencia denominada AZYRO 1, no se pudo ubicar similitud con las secuencias reportadas de la ARN Pol II, lo que no permitió la predicción de su posición tridimensional.

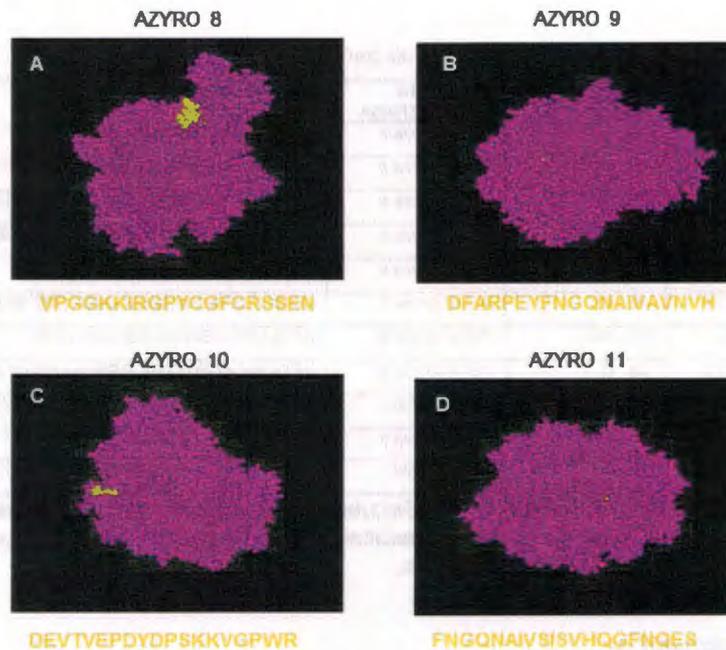
La Figura 2.6 muestra las secuencias de aminoácidos denominadas AZYRO 8 y 9 correspondientes a la subunidad 2a de la ARN Pol IV y las secuencias AZYRO 10 Y 11 pertenecientes a la subunidad 2b de la ARN Pol IV. La secuencia de aminoácidos marcadas de color amarillo en la estructura son las que se ubican en la superficie de la proteína y por lo tanto se eligieron para sintetizar los péptidos. En la Figura 2.6 B y D, se observa que los aminoácidos de las secuencias de AZYRO 9 y 11, no se encuentran expuestos. El análisis se realizó con los programas RasMOL, MDLSP6 y CN3D 4.1 (Wang *et al.*, 2000), utilizando como base las alineaciones generadas con el programa ClustaW (Thompson *et al.*, 1994).

Las secuencias que se seleccionaron para la síntesis de péptidos, son las denominadas AZYRO 1, 2 y 4 (posteriormente denominado AZYRO 3) (Cuadro 2.1). Para determinar que los péptidos seleccionados fueran específicos se realizó una comparación de estas secuencias con la base de datos de NCBI. Esto fue realizado mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para asegurarnos que las secuencias no tuvieran similitud con otras proteínas de *Oryza sativa*. Los resultados por este método no mostraron otras proteínas por lo cual se procedió para la inmunización en conejo.

Las secuencias denominadas AZYRO 1 y 2 fueron seleccionadas para la síntesis de péptidos por que corresponden a regiones no conservadas y conservadas de la subunidad uno de la ARN Pol IV respectivamente. La secuencia denominada AZYRO 4 se eligió por que pertenece a una región no conservada de la subunidad uno de la ARN Pol V y por que posee una mayor cantidad de aminoácidos inmunogénicos (lisina, ácido aspártico, metionina, serina, tirosina, treonina y triptófano) en comparación con AZYRO 3. Cabe resaltar que el triptófano es un aminoácido de gran tamaño y no muy abundante en muchas proteínas.



**Figura 2.5.** Análisis de estructura de la subunidad uno de las ARN Pol IV y V de *O. sativa*. A) AZYRO 2 (región 432-451), secuencia de aminoácidos de la subunidad uno de la ARN Pol IV. B-E) Secuencias de aminoácidos correspondiente a la subunidad uno de la ARN Pol V: AZYRO 3 (región 239-258), AZYRO 4 (región 298-317), AZYRO 5 (región 449-468) y AZYRO 6 (región 487-506) respectivamente, los segmentos en color amarillo representan las secuencias expuestas en la superficie.



**Figura 2.6.** Análisis de estructura de la subunidad 2a y 2b de la ARN Pol IV de *O. sativa*. A-B) Secuencia de aminoácidos de la subunidad 2a de la ARN Pol IV. AZYRO 8 (región 1237-1256) y 9 (región 883-902). C-D) Secuencias de aminoácidos correspondiente a la subunidad 2b de la ARN Pol IV: AZYRO 10 (región 73-92) y AZYRO 11 (región 738-757). Los segmentos en color amarillo representan las secuencias expuestas en la superficie.

**Cuadro 2.1. Secuencias analizadas para la generación de péptidos.**

PEPTIDO	SUBUNIDAD	ARN POLIMERASA	SECUENCIA
AZYRO 1	*1a NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	<b>MAVRPNDSRPSDVRPPFSQI (1-20)</b>
AZYRO 2	*1a C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	<b>INPLCCDPFKGDFDGDCLHG (432-451)</b>
AZYRO 3	1b NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	DGNTFSCSGTSTNLLRKALR (239-258)
AZYRO 4	*1b NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	<b>GHGDDTFTSQPTAMQWKQKM (298-317)</b>
AZYRO 5	1b C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	INPLICDPLGADFDGDCVQI (449-468)
AZYRO 6	1b C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	DKQLVSSHNGKLNLFQFKNDF (487-506)
AZYRO 7	2a NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	ARTLLPPLHSPRKHRSASD (1-20)
AZYRO 8	2a C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	VPGGKKIRGPYCGFCRSEN (1237-1256)
AZYRO 9	2a C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	DFARPEYFNGQNAIVAVNVH (883-902)
AZYRO 10	2b NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	DEVTVEPDYDPSKKGVPWRH (73-92)
AZYRO 11	2b C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	FNGQNAIVSISVHQGFNQED (738-757)

\* Secuencias seleccionadas; NC Secuencias no conservadas; C Secuencias conservadas. Las secuencias resaltadas con negritas son las que se enviaron para generar los péptidos.

## 2.4 DISCUSIÓN

Debido a que las ARN polimerasas I, II y III comparten similitud en su secuencia y estructura (Archambault y Friesen, 1993; Cramer et al., 2001; Zhang et al., 1999). En particular las dos subunidades principales del complejo proteico que forman el centro catalítico en el que ocurre la síntesis de ARN (Cramer et al., 2000; Zhang et al., 1999). Se pudo realizar el análisis de comparación de secuencias de aminoácidos de la ARN Pol IV de *O. sativa* con la ARN Pol IV de *A. thaliana*. Los cuales mostraron una identidad entre las secuencias de las subunidades 1a de 30% y del 23% entre las 1b. En el caso de la ARN Pol IV las subunidades más conservadas son las 2a de *O. sativa* y *A. thaliana* con 55% de identidad y las subunidades 2a y 2b de *A. thaliana* con 84% de identidad. La región de las proteínas con mayor conservación es su sitio activo (Figura 2.2-2.4) (Onodera et al., 2005). Este análisis es posible debido a que la molécula de la ARN Pol II se encuentra conservada en diferentes especies (Hahn et al., 2004).

Con base a esto se realizó el análisis estructural de la ARN Pol II. Nueve de las once secuencias seleccionadas, como se muestra en las Figuras 2.5-2.6 fueron comparadas con este método. Las dos secuencias

restantes carecían de correlación, ya que, no se pudo ubicar similitud con las secuencias reportadas de la ARN Pol II, por lo que no se pudo realizar su análisis estructural y no permitió la predicción adecuada de su posición tridimensional en la estructura determinada. Las secuencias denominadas como AZYRO 1, 2 y 4 (posteriormente denominado AZYRO 3) fueron seleccionadas para la generación de péptidos (Cuadro 2.1). A la fecha no existe un mecanismo sencillo para garantizar el diseño de epitopes útiles para estudios de proteínas en estado nativo (Huang *et al.*, 2012; Pleckaityte *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2011). Por lo cual se optó por este método. Claramente para el estudio de proteínas desnaturalizadas, como lo es por inmunoblot solo se requiere del estudio para obtener secuencias únicas en la base de datos. Sin embargo debido a la complejidad de esta proteína en particular y con el fin de utilizar los anticuerpos en estudios posteriores se realizó este análisis. Los experimentos de Onodera *et al.*, 2005, hicieron uso del anticuerpo específico contra ARN pol IV de Arabidopsis de una región no conservada de esta proteína, sin embargo se desconoce si trataron de generar otros anticuerpos (Law & Jacobsen, 2010, Onodera *et al.*, 2005, Pontes *et al.*, 2006). Claramente a la fecha no se ha descrito ningún anticuerpo contra las ARN IV y V de *O. sativa*.

## 2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, L.A., M. Moyle, M. Shales and C. J. Ingles (1985). *Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases*. Cell, 42 (2), 599-610.
- Archambault, J. and J. D. Friesen (1993). *Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III*. Microbiology Reviews, 57, 703-724.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P.R. David, and R. D. Kornberg (2000). *Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism*. Science, 288, 640-649.
- Cramer, P. D. A. Bushnell and R. D. Kornberg (2001). *Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution*. Science, 292, 1863-1876.
- Haag, J. R., O. Pontes and C. S. Pikaard (2009). *Metal A and metal B sites of nuclear RNA polymerases pol IV and pol V are required for siRNA dependent DNA methylation and gene silencing*. PLoS ONE, 4(1), 1-10.
- Hagen, J.B. (2000). *The origin of bioinformatics*. Natural Reviews Genetics, 1(3), 231-236.
- Hahn, S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery*. Nature Structural and Molecular Biology, 11, 394-403.
- Huang, CJ, H. Lin and X. Yang (2012). *Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1, 82-89
- Kang, P., J. Yun, P. Kaumaya and Y. R. Chen (2011). *Design and use of peptide-based antibodies decreasing superoxide production by mitochondrial complex I and complex II*. Biopolymers, 96(2), 207-221.
- Martinez-Frías, M.L. (2010). *Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones*. SEMERGEN, 36, 273-277.
- Onodera, Y., J. R. Haag, T. S. Ream, P. Costa, O. Pontes and C. S. Pikaard (2005). *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA*

*methylation-dependent heterochromatin formation*. Cell, 120(5), 613-622.

Pleckaityte, M., A. Zvirbliene, I. Sezaite and A. Gedvilaite (2011). *Production in yeast of pseudotype virus-like particles harboring functionally active antibody fragments neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin*. Microbial Cell Factories, 10(1), 109.

Tatusov, R., A. Darren, I. Garkavtsev, T. Tatusova, U. Shankavaram, S. Bachoti, M. Kiryutin, N. Fedorova, and E. Koonin (2001). *The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes*. Nucleic Acids Research, 29(1), 22-28.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680.

Wang, Y., L. Y. Geer, C. Chappay, J.A. Kans and S. H. Bryant (2000). *Cn3D: sequence and structure*. Trends in Biochemical Science, 25(6), 300-302.

Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov and S. A. Darst (1999). *Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution*. Cell, 98, 811-824.



## CAPÍTULO 3

### **Obtención de una biblioteca de anticuerpos monoclonales contra la ARN Pol IV y V de *O. sativa* por la técnica de despliegue de fagos**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

El uso de los anticuerpos abrió el campo a diferentes metodologías útiles para entender los mecanismos de acción, localización y obtención de proteínas y complejos proteicos. Esto se basa en que un antígeno genera una respuesta inmune en animales. Los cuales como resultado producen anticuerpos como parte natural del sistema de defensa a sustancias exógenas. Quedando claro que algunas sustancias generan una mayor respuesta que otras. Sin embargo uno de los problemas existentes con el uso de anticuerpos policlonales (anticuerpos que son generados de múltiples células) es que existen anticuerpos adicionales que pueden o no cazar con otro antígeno. Por lo cual en muchos casos se requiere de pasos adicionales para obtener anticuerpos purificados. Los procesos por los cuales se purifican resultan en grandes perdidos del anticuerpo. Esto aunado con la cantidad específica del anticuerpo dada por el suero del organismo que los genero limita mucho la producción y la calidad de estos. Tomando como calidad que los anticuerpos tengan una misma afinidad a la molécula deseada. Por lo cual durante los últimos años se han generado diferentes metodologías para obtener anticuerpos específicos al antígeno deseado en cantidades ilimitadas. Uno de estos es la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de ratones los cuales son tratados tanto con el antígeno como por métodos que generan cierto tipo particular de células cancerígenas que posteriormente son utilizadas para generar líneas celulares que expresen estos anticuerpos. Donde posteriormente estas líneas celulares son seleccionadas para obtener líneas únicas que provengan de una sola clona, luego entonces de ahí el nombre de anticuerpos monoclonales. Las cuales expresaran un mismo tipo de anticuerpo. Sin embargo los elevados costos de cultivo de tejidos animales y el tiempo requerido para obtener líneas celulares monoclonales han sido factores para buscar otros métodos (Crosnier *et al.*, 2010).

Algunos de los mas recientes utilizando clonas de camélidos (camellos, llamas etc) han sido un gran avance debido a que los anticuerpos que poseen son generados a partir de un solo ARN lo cual simplifica la producción de librerías de ADNc que permitan obtener clonas que expresen el anticuerpo (Saerens, 2010). Sin embargo el acceso a este tipo de

animales no ha permitido un mayor uso de este tipo particular de anticuerpos. Sin embargo el clonamiento de ADNc de los anticuerpos ha permitido que se puedan expresar en diversos modelos. El más utilizado es por medio de sobre expresión en fagos (Dias-Neto *et al.*, 2009).

Los fagos o bacteriófagos, son virus que infectan bacterias. El fago M13 es un tipo de bacteriófago que infecta bacterias *E. coli* insertando en el genoma de la bacteria su ADN, y empleando las funciones vitales de la bacteria para reproducirse y producir más virus. Mediante técnicas de ingeniería genética, es posible manipular el material genético del fago e insertar en su genoma una secuencia externa de ADN. Estos fagos recombinantes consiguen expresar en su superficie o cubierta la proteína codificada por el ADN insertado. Cuando un fago recombinante portador de ADN codificante para un anticuerpo infecta una bacteria, se producen nuevos fagos que expresan en su superficie los anticuerpos de interés unidos a sus proteínas de tipo III. Los fagos así producidos han de ser seleccionados posteriormente al ponerse en contacto con el antígeno conocido. Los fagos portadores de anticuerpos en su cubierta capaces de unirse al antígeno, son seleccionados y empleados nuevamente para infectar bacterias con el fin de producir nuevos virus portadores de anticuerpos (Smith *et al.*, 2005).

Mediante esta tecnología, ha sido posible crear amplias colecciones de fragmentos de anticuerpos variables que se denominan bibliotecas de fragmentos de anticuerpos o genotecas de expresión de fagos (Janeway *et al.*, 2000).

La tecnología de presentación de péptidos en la superficie de fagos ha evolucionado rápidamente para convertirse en una técnica potente y de amplio uso que permite la selección de fragmentos de anticuerpos contra cualquier antígeno en pocos días o semanas, incluidos antígenos tóxicos o conservados. Por otro lado, la ingeniería de anticuerpos ofrece la posibilidad de escoger el tamaño, la valencia, la avidéz, la afinidad y las funciones efectoras de la molécula. La disponibilidad de grandes repertorios de anticuerpos y de nuevas técnicas de selección deben permitir el aislamiento rápido de moléculas para la quimioterapia dirigida y el bloqueo o activación de receptores (Knappik *et al.*, 2000).

El procedimiento empleado para la obtención de bibliotecas de anticuerpos tiene su base en la generación de múltiples fagos recombinantes, es decir, que contengan una gran diversidad de combinaciones genéticas de los diferentes genes de inmunoglobulinas.

Estas bibliotecas, al entrar en contacto con un antígeno de interés, son capaces de identificar y aislar el anticuerpo que se une con mayor afinidad. La técnica de despliegue de fagos permite obtener grandes cantidades del anticuerpo deseado (Brekke *et al.*, 2003).

El objetivo de utilizar bacteriófagos es de obtener clonas particulares que permitan la expresión indefinida de estos. Al igual que obtener anticuerpos homogéneos que puedan ser utilizados e incluso patentados. Los anticuerpos se podrían utilizar para la detección de la expresión de las ARN Pol IV y V se inmunizaron gallos y conejos, de los cuales se obtuvieron anticuerpos policlonales. A su vez de los gallos inmunizados se tomó el ARN de las células del bazo con el fin de obtener una biblioteca de anticuerpos presentados en la superficie de fagos (Figura 3.1), los cuales en el futuro podrían ser de gran utilidad para la identificación y purificación de las ARN Pol IV y V. Durante este trabajo se procedió con la generación y obtención de clonas preliminares que dieron una señal específica contra los péptidos utilizados. Sin embargo no fue posible encontrar clonas específicas y no se pudo concluir el estudio debido a la carencia de anticuerpos secundarios contra gallos. Por lo cual la librería de anticuerpos fue almacenada para estudios posteriores. La decisión de esto fue también en base a que los anticuerpos generados en conejo fueron útiles tanto para los experimentos de inmunoblot como de inmunolocalización.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Sistema biológico e inmunizaciones**

El sistema biológico utilizado fueron tres gallos White Legorn y tres conejos. Ambos para la obtención de anticuerpos policlonales. Los péptidos utilizados para las inmunizaciones se encuentran en la tabla 3.1. El bazo de los gallos fue utilizado para la obtención de ARN mensajeros de anticuerpos producidos.

Las inmunizaciones se realizaron con 30 µg de péptido para cada conejo y 50 µg de péptido para cada gallo en solución salina, el cual con ayuda de una jeringa de dos vías se mezcló hasta formar una emulsificación con 0.5 mL de adyuvante completo de Freund's en la primera inmunización, con 0.5 mL de Adyuvante incompleto en la segunda inmunización. Posteriormente, el emulsificado se inyectó en el pectoral del gallo y a los conejos se les inyectó en el lomo. Las inmunizaciones en los gallos fueron cada 10 días y en los conejos cada 20 días. Antes de la primera

inmunización se obtuvo el suero (suero preinmune) para ser utilizado como testigo.

### **3.2.2. Determinación de la producción de anticuerpos por medio de ensayo inmuno enzimático (ELISA).**

Para realizar el inmunoensayo se procede de la siguiente manera; se agregó 50  $\mu\text{L}$  del antígeno (péptido 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en cada pozo de una placa Limbro para ELISA, la cual fue incubada a 4°C toda la noche, posteriormente se lavó la placa 3 veces con 300  $\mu\text{L}$  de PBST (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl 10 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5% Tween 20; pH 7.4) y se bloqueó con 50  $\mu\text{L}$  de PBS/gelatina al 1%, luego se descarta el sobrenadante y se agregó 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario (suero diluido 1:100 en PBST) y se incubó durante 1 hr. a 37°C. Se realizó la remoción de los anticuerpos unidos inespecíficamente al antígeno, se retiró el sobrenadante y se lavó 3 veces con 300  $\mu\text{L}$  de PBST. Después se agregó 50  $\mu\text{L}$  del segundo anticuerpo (anti gallina o anti conejo conjugado con peroxidasa y diluido en PBST 1:1000) se incubó 1 hr. a 37°C, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente tres lavados con 300  $\mu\text{L}$  de PBST y dos con 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se Adicionó 50  $\mu\text{L}$  de sustrato (p-nitrofenilfosfato/ buffer de dietanolamina pH 9.8 5mg/5mL). Se incubó hasta que desarrolló un color amarillo o menos de 15 min. La reacción se detuvo con NaOH 3M y se cuantificó en un lector de placas de ELISA a 405 nm o cualitativamente se observa la intensidad del color.

Este procedimiento se realizó con cada uno de los anticuerpos primarios, es decir con cada uno de los sueros proveniente de los gallos y conejos inmunizados. Después de obtener el título adecuado en la producción de anticuerpos, se sacrificaron los gallos y se aisló el bazo para obtener el ARN.

### **3.2.3 RT-PCR y PCR**

La extracción de ARN total se obtuvo del bazo del gallo con el amortiguador comercial RNA-STAT (Tel test "B" inc.) y la síntesis de ADNc se realizó con el paquete comercial SUPERSORIPT II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La amplificación de las secuencias que codifican a las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo contra la ARN Pol IV de *O. sativa* producido en el gallo inmunizado y su unión por traslape y extensión se realizaron por PCR. Los cebadores para la amplificación de la cadena pesada de los anticuerpos contra la ARN Pol IV de *O. sativa* fueron los siguientes: CSCVHo-F 5'-GTCAGTCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTG

GACGAG-3' y CSCG-B5'-CTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGGAGAC GATGACTTCGGT-3'. Para la amplificación de la cadena ligera de los anticuerpos contra la ARN Pol IV de *O. sativa*, los cebadores fueron: CSVK 5'- GTGGCCAGGCGGC CCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTC-3' y CKJO-B 5'- GGAAGATCTAGAG GACTGACCTAGGACGGTGAGG-3'. Los cebadores para el traslape y extensión de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos contra la ARN Pol IV de *O. sativa* fueron: CSC-F 5'- GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCCTGACTCAG-3' y CSG-B 5'- GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGC CACTTGGAGG-3'. Para la amplificación de los productos de la cadena pesada y ligera se utilizó el siguiente programa: 5 min a 94°C; 30 ciclos (30 seg 94°C, 30 seg 60°C, 90 seg 72°C), seguidos por 10 min de extensión a 72 °C. Para el PCR de traslape se utilizó el siguiente programa; 15 min a 95°C; 40 ciclos (15 seg 94°C, 45 seg 62°C, 2 min 72°C), seguidos por 10 min de extensión a 72 °C. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%, y la tinción se realizó con bromuro de etidio.

#### 3.2.4 Purificación de los productos de PCR

Se precipitó el ADN sintetizado en 10 PCR con 1/10 vol de acetato de potasio 3M y 2.2 vol de etanol absoluto. Esto se incubó a -20°C toda la noche y se centrifugó a 16000 g por 30 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante, y se lavó el paquete con etanol al 70% y se resuspendió en 20 µL de agua estéril. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%, la banda de interés fue extraída del gel, la cual se colocó en un sobre de parafilm para ser congelado a -80°C por 30 min, seguidamente se trituró el pedazo de gel con la parte plana de un tubo eppendorf, se transfirió el líquido a un tubo con un filtro de 0.45 µm ultrafree (Amicon) y se centrifugó a 3000 g por 10 min. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se precipitó el ADN como anteriormente se describió.

#### 3.2.5 Digestión de los productos de PCR y del vector pCOMB3X

La digestión de los productos purificados del PCR fue realizada mezclando 10 µg de ADN, 360 U de la nucleasa *Sfi*1, 20 µL de amortiguador para la enzima y agua hasta un volumen final de 200µL. Se realizó una incubación por 8 horas a 50 °C. Posteriormente, el ADN se precipitó. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2%. La banda de interés se extrajo y se procedió a la purificación de la misma manera anteriormente mencionada. La digestión del vector pCOMB3X (UniProt), se realizó igual que los productos de PCR, únicamente variando las concentraciones de ADN plasmídico (20µg) y de *Sfi*1 (120 U).

### 3.2.6 Ligación de los productos de la digestión y transformación

Para la ligación de los productos de la digestión (PCR y vector), se mezcló 1.4 µg de vector, 700 ng del producto de PCR, 40 µL de amortiguador para la ligasa T4, T4 DNA ligasa en un volumen final de 200 µL con agua estéril. La mezcla se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente los productos ligados se precipitaron y el paquete se resuspendió en un volumen de 15µL de agua esteril. Seguidamente, se transformaron por electroporación células XL1-blue con el producto de ligación y las células transformadas se seleccionaron en un medio LB (Luria Bertani) sólido con carbencilina.

### 3.2.7 Proliferación de las células transformadas

Las células transformadas fueron cultivadas en 5 mL de medio de cultivo SOC (super óptimo con represor catabólico), (Bactotripton 2% w/v, Levadura bacteriológica 0.5% w/v; Cloruro sódico 10 mM; Cloruro potásico 2,5 mM; Cloruro magnésico 10 mM; Sulfato magnésico 20 mM; Glucosa 1M) por 1 h. a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de medio SB (Super Broth), (3,2% w/v de peptona; 2% w/v de extracto de levadura; 0,5% w/v de NaCl), y 3µL de carbencilina (100 mg/mL) más 30 µL de tetraciclina (5 mg/mL). Se incubó 1 h. a 37°C a 250 rpm, seguidamente se agregó 4.5 µL de carbencilina y se incubó nuevamente por 1hr a 37 °C. Una vez terminada la incubación, se agregaron 2 mL de fago ayudador y se transfirió a un matraz de 500 mL más 183 mL de medio SB, 92.5 µL de carbencilina y 370 µL de tetraciclina. Se incubó por 2 h. a 300 rpm y a continuación se le agregaron 280 µL de kanamicina (50 mg/mL) y se incubó toda la noche a 37°C a 300 rpm.

### 3.2.8 Obtención de los fagos

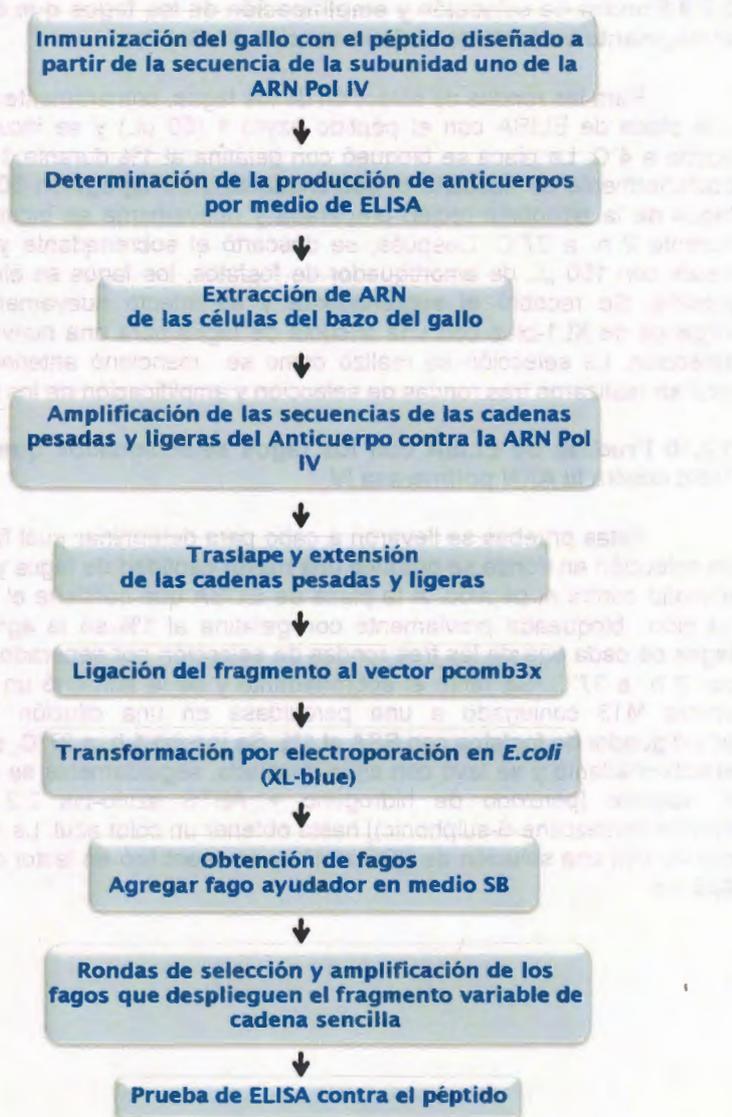
Posterior a la amplificación de las células transformadas se procedió a centrifugar los 200 mL de cultivo a 3000 g durante 30 min, se recuperó el sobrenadante y se depositó en un matraz nuevo, se le agregó 1 parte de la solución de PEG (polietilenglicol) 5X (50 mL), y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugo a 15000 g a 4°C durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 2 mL de BSA (albúmina sérica bovina) al 1% en amortiguador de fosfatos, seguidamente se centrifugo a 16000 g a 4°C por 10 min y el sobrenadante (fagos) se pasó a un tubo nuevo a través de un filtro de 0.2 µm y se almacenó a 4°C.

### **3.2.9 Rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable de cadena sencilla (FvSc)**

Para las rondas de selección de los fagos, primeramente se preparó una placa de ELISA con el péptido azyro 1 (50  $\mu$ L) y se incubó toda la noche a 4°C. La placa se bloqueó con gelatina al 1% durante 1 h. a 37°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregaron 50  $\mu$ L de los fagos de la biblioteca recién preparada y nuevamente se incubó la placa durante 2 h. a 37°C. Después, se descartó el sobrenadante y se lavó 5 veces con 150  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos, los fagos se eluyeron con tripsina. Se recobró el sobrenadante y se infectó nuevamente células vírgenes de XL1-blue con una alícuota de fagos para una nueva ronda de selección. La selección se realizó como se mencionó anteriormente, en total se realizaron tres rondas de selección y amplificación de los fagos.

### **3.2.10 Pruebas de ELISA con los fagos seleccionados que expresan FvSc contra la ARN polimerasa IV**

Estas pruebas se llevaron a cabo para determinar cuál fue la ronda de selección en donde se produce una mayor cantidad de fagos y una mejor afinidad contra el péptido. A la placa de ELISA que contiene el antígeno y ha sido bloqueada previamente con gelatina al 1% se le agregaron los fagos de cada una de las tres rondas de selección por separado, se incubó por 2 h. a 37°C. Se retiró el sobrenadante y se le adicionó un anticuerpo contra M13 conjugado a una peroxidasa en una dilución 1:5000 en amortiguador de fosfatos con BSA al 1%. Se incubó 1 h. a 37°C, se descartó el sobrenadante y se lavó con agua destilada, seguidamente se incubó con el sustrato [peróxido de hidrógeno + ABTS azino-bis 2.2 (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic)] hasta obtener un color azul. La reacción se detuvo con una solución de SDS al 1% y se cuantificó en lector de ELISA a 405 nm.



**Figura 3.1.** Procedimiento general de la técnica de despliegue de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Determinación de la producción de anticuerpos por medio de ensayo inmuno enzimático (ELISA).

Para producir los anticuerpos contra la ARN polimerasa IV y V de *O. sativa*, se sintetizaron los siguientes péptidos:

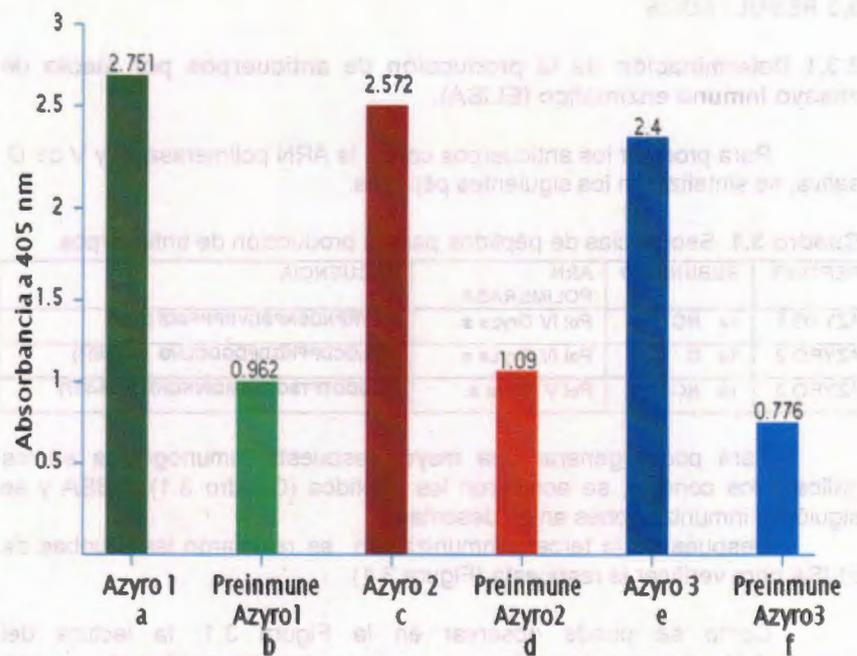
**Cuadro 3.1.** Secuencias de péptidos para la producción de anticuerpos.

PEPTIDO	SUBUNIDAD	ARN POLIMERASA	SECUENCIA
AZYRO 1	1a NC	Pol IV <i>Oryza s.</i>	MAVRPNDSRPSDVRPPFSQI (1-20)
AZYRO 2	1a C	Pol IV <i>Oryza s.</i>	INPLCCDPFKGDFDGDCLHG (432-451)
AZYRO 3	1b NC	Pol V <i>Oryza s.</i>	GHGDDTFTSQPTAMQWKQKM (298-317)

Para poder generar una mayor respuesta inmunogénica en los gallos y los conejos, se acoplaron los péptidos (Cuadro 3.1) a BSA y se siguió las inmunizaciones antes descritas.

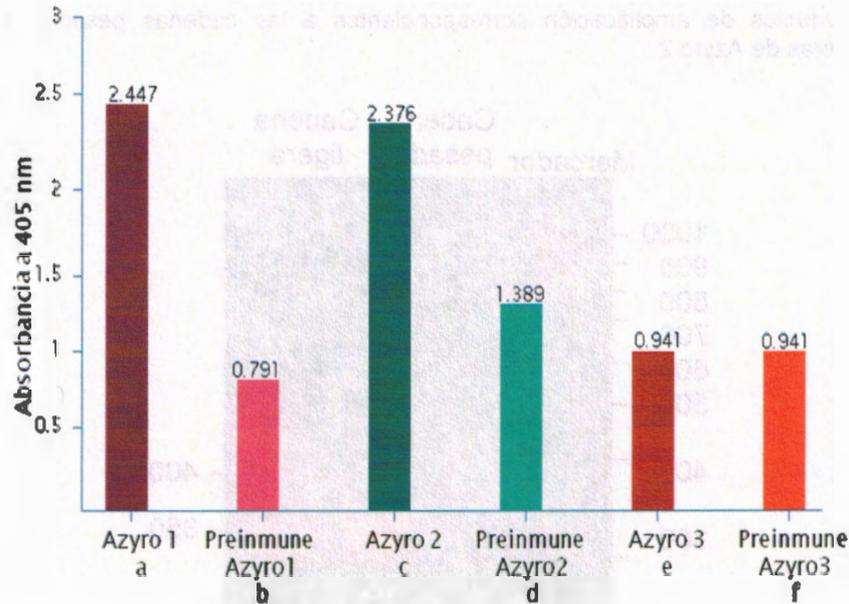
Después de la tercera inmunización se realizaron las pruebas de ELISA para verificar la respuesta (Figura 3.1).

Como se puede observar en la Figura 3.1, la lectura del espectrofotómetro para las columnas a, c y e que corresponden al suero de los conejos después de la tercera inmunización tienen una absorbancia mucho mayor, en comparación con las lecturas de las columnas b, d y f correspondientes al suero de los conejos antes de ser inmunizados. Lo anterior indica que se produjeron anticuerpos policlonales en los conejos inmunizados con los péptidos denominados AZYRO 1, AZYRO 2 (péptidos diseñados a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol IV) y AZYRO 3 (péptido diseñado a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol V), (Cuadro 3.2).



**Figura 3.2.** Determinación de la producción de anticuerpos contra la ARN Pol IV y V de *O. sativa* generados por los conejos mediante ensayo inmuno enzimático (ELISA). a) Suero del conejo inmunizado con el péptido Azyro 1; b) Suero preimmune del conejo inmunizado con el péptido Azyro 1; c) Suero del conejo inmunizado con el péptido Azyro 2; d) Suero preimmune del conejo inmunizado con el péptido Azyro 2; e) Suero del conejo inmunizado con el péptido Azyro 3; f) Suero preimmune del conejo inmunizado con el péptido Azyro 3.

En la Figura 3.2, se puede observar que se produjeron anticuerpos policlonales en los gallos inmunizados con los péptidos Azyro 1 y 2 (Cuadro 3.2). Subsecuentemente se procedió a sacrificar a los gallos para obtener el bazo y aislar el ARN total.



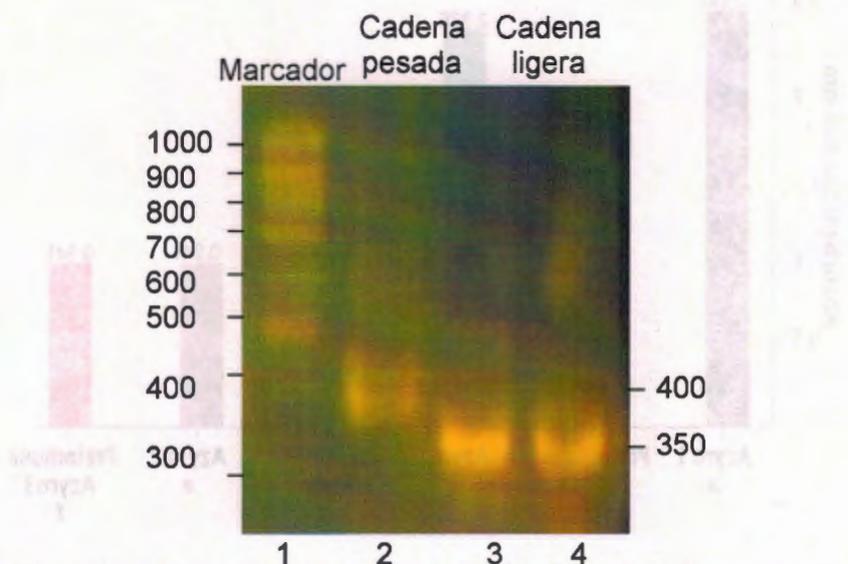
**Figura 3.3.** Determinación de la producción de anticuerpos por los gallos por ensayo inmuno enzimático (ELISA). a) Suero del gallo inmunizado con el péptido Azyro 1; b) Suero preinmune del gallo inmunizado con el péptido Azyro 1; c) Suero del gallo inmunizado con el péptido Azyro 2; d) Suero preinmune del gallo inmunizado con el péptido Azyro 2; e) Suero del gallo inmunizado con el péptido Azyro 3; f) Suero preinmune del gallo inmunizado con el péptido Azyro 3.

### 3.3.2 RT-PCR y PCR

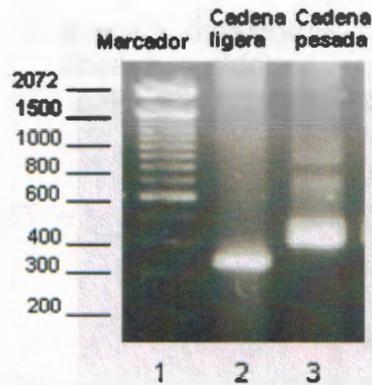
Se realizó la síntesis de ADNc con el ARN de los gallos, seguido de una reacción de PCR. Para la amplificación de la secuencia que codifica la región variable del anticuerpo se requieren hacer tres reacciones de PCR por separado, una para la amplificación de la cadena pesada, otra para la cadena ligera y una tercera reacción para vincular y extender las cadenas pesadas y ligeras.

Como se puede observar en la Figura 3.3, se logró la observar dos productos de amplificación de aproximadamente 400 y 350 pb que corresponden a los tamaños esperados para las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente de Azyro1 y en la Figura 3.4, se puede observar los

productos de amplificación correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de Azyro 2.

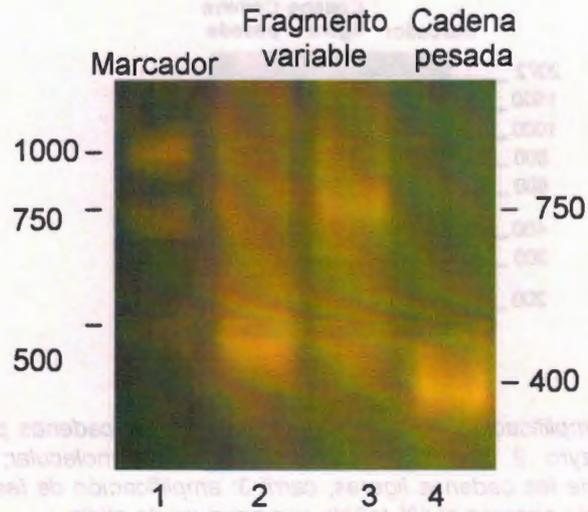


**Figura 3.4.** Amplificación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de Azyro 1. Carril 1: Marcador de masa molecular; carril 2: amplificación de las cadena pesada; carril 3 y 4: amplificación de las cadenas ligeras. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

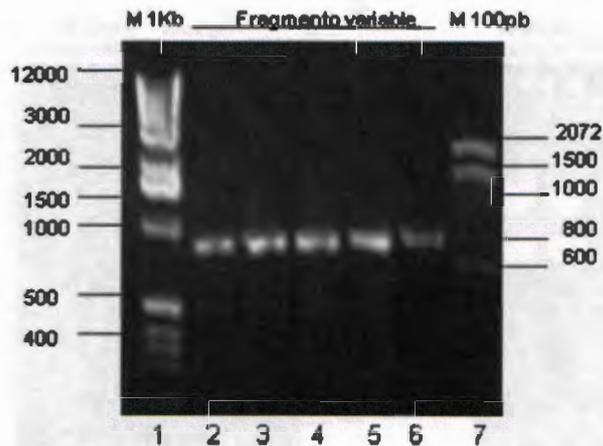


**Figura 3.5.** Amplificación de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de Azyro 2. Carril 1: Marcador de masa molecular; carril 2: amplificación de las cadenas ligeras; carril 3: amplificación de las cadenas pesadas. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

Para el traslape y extensión de las cadenas fueron mezclados 100 ng del producto de amplificación de las cadenas pesadas y ligeras y se realizó una amplificación para obtener el traslape de las cadenas pesadas y ligeras. Como se puede observar, se logró el traslape de las cadenas pesadas y ligeras, y la extensión de las cadenas de Azyro 1 y 2 (Figuras 3.5 y 3.6, respectivamente), obteniendo un producto de aproximadamente 750 pb que corresponde al tamaño esperado para el fragmento variable del anticuerpo.



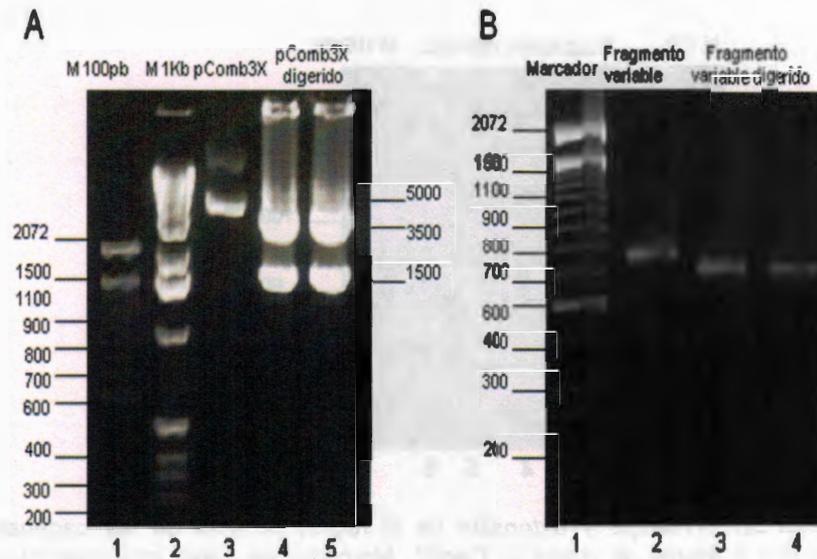
**Figura 3.6.** *Traslape y extensión de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de Azyro 1. Carril 1: Marcador de masa molecular; carril 2 y 3: amplificación del fragmento variable; carril 4: amplificación de las cadenas pesadas. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.*



**Figura 3.7.** *Traslape y extensión de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de Azyro 2. Carril 1: Marcador de masa molecular 1kb; carril 2 - 6: amplificación del fragmento variable; carril 7: Marcador de masa molecular 100pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.*

### 3.3.3 Digestión de los productos de PCR y del vector pCOMB3X

Se purificó el fragmento amplificado y se realizó la digestión del fragmento variable con la enzima *Sfi*1, como se puede observar en la Figura 3.7-B y en la Figura 3.7-A se observan los fragmentos esperados de 3500 pb y 1500 pb como resultado de la digestión del vector pcomb3x con *Sfi*1 (Figura 3.7). Después se llevó a cabo la ligación del fragmento de 3500 pb del vector con el fragmento variable digerido, seguido de la transformación y la proliferación de las células transformadas, así como las rondas de selección y amplificación de los fagos que despliegan el fragmento variable contra la ARN Pol IV.

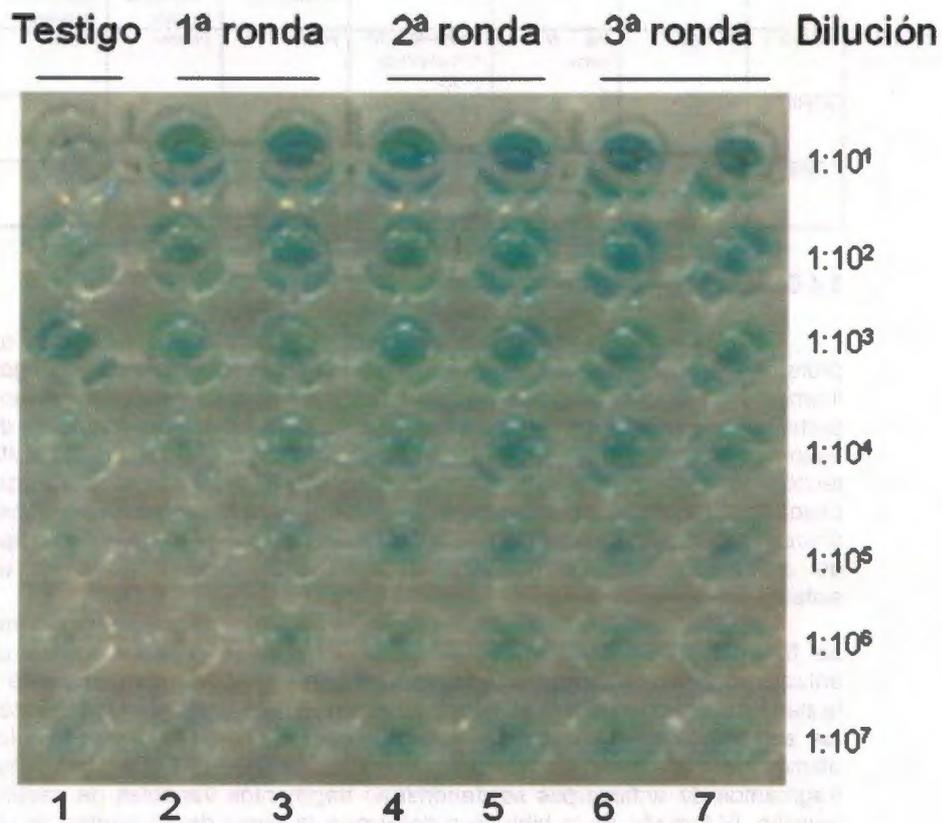


**Figura 3.8.** Digestión con *Sfi* I. A. Vector *pcomb3X*. Carril1: Marcador de masa molecular 100pb; Carril12 Marcador de masa molecular 1kb; carril 3: *pComb3X*; carril 4 - 5: vector *pcomb3X* digerido. B. Carril 1: Marcador de masa molecular 100pb; carril 2: fragmento variable de *Azyro 2*; carril 3 - 4: fragmento variable digerido de *azyro2*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### 3.3.4 Pruebas de ELISA con los fagos seleccionados que expresan FvSc contra la ARN Pol IV

Después de que se obtuvo la tercera ronda de selección de los fagos que despliegan el fragmento variable, se realizó un ELISA contra el péptido de la ARN Pol IV (Figura 3.8). En esta figura se puede observar la presencia de los anticuerpos específicos contra la ARN Pol IV, en las tres rondas de selección de los fagos, se observa que en la primera ronda de selección la presencia del anticuerpo empieza a disminuir a partir de la dilución  $1:10^3$ , en la segunda y tercera ronda se observa una disminución significativa a partir de la dilución  $1:10^4$ . Con base al resultado obtenido, se puede concluir que se logró generar una librería de anticuerpos

monoclonales específicos para el péptido Azyro 1, que pertenece a la secuencia de la subunidad uno de la ARN Pol IV (Cuadro 3.2).



**Figura 3.9.** ELISA contra el péptido de la ARN polimerasa IV. Carril 1: Medio SB como testigo negativo; carriles 2 y 3: 1<sup>a</sup> ronda de selección de fagos que despliegan el fragmento variable; carriles 4 y 5: 2<sup>a</sup> ronda de selección de fagos que despliegan el fragmento variable; carriles 6 y 7: 3<sup>a</sup> ronda de selección de fagos que despliegan el fragmento variable.

**Cuadro 3.2. Anticuerpos generados.**

PEPTIDO	SUBUNIDAD	ARN POLIMERASA	SECUENCIA	Anticuerpos monoclonales	Anticuerpos Policlonales en gallos	Anticuerpos Policlonales en conejo
AZYRO 1	1a NC	Pol IV O. <i>saffva</i> .	MAVRPND SRP SDVRPPFSQI (1-20)	Positivo	Positivo	Positivo
AZYRO 2	1a C	Pol IV O. <i>sativa</i> .	INPLCCDPFKG DFDGDCLHG (432-451)		Positivo	Positivo
AZYRO 3	1b NC	Pol V O. <i>saffva</i> .	GHGDDTFTSQ PTAMQWKQKM (298-317)		Negativo	Positivo

### 3.4 Discusión

La técnica de despliegue en fagos, consiste en la expresión de proteínas, en particular anticuerpos o péptidos en la superficie de los fagos filamentosos. Las secuencias de ADN de interés, son insertadas en una parte en el genoma del fago filamentosos, lo cual origina un producto de fusión en una de las proteínas de la cápside del fago (Barbas, 2001). Esta tecnología permite mantener clonas de fagos que expresen el anticuerpo deseado. El sistema de selección del sistema permite seleccionar clonas únicas, por lo que la expresión de los anticuerpos proviene de un solo tipo de anticuerpo. Esto permite obtener anticuerpos monoclonales en un sistema de expresión estable.

Esta técnica hace posible la producción tanto de anticuerpos como de fragmentos de anticuerpos, es decir, lo que se produce no es un anticuerpo entero sino que solamente se inserta el ADN correspondiente a la parte del anticuerpo que es capaz de reconocer el antígeno. Se producen los segmentos de los dominios variables de los anticuerpos que son los últimos responsables de la unión con el antígeno. Estos pequeños fragmentos de anticuerpos se denominan fragmentos variables de cadena sencilla. El tamaño de la biblioteca determina la gama de afinidades de los anticuerpos recuperados. No obstante, se debe tener en cuenta que en el primer ciclo de selección se obtienen típicamente  $10^5$  clones. Como el máximo factor de enriquecimiento de la biblioteca que se ha reportado es de aproximadamente  $10^6$ , el tamaño límite que permite realizar un muestreo completo de la biblioteca sería  $10^{11}$  (Hawkins *et al.*, 1992).

Los resultados que se obtuvieron con la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, fue exitosa para obtener una librería de anticuerpos específicos contra el péptido de la ARN polimerasa IV denominado Azyro 1, ya que en la tercera ronda de selección se obtuvo  $10^4$

clones. En lo correspondiente a las inmunizaciones de los conejos se obtuvieron anticuerpos policlonales con los péptidos denominados AZYRO 1, AZYRO 2 (péptidos diseñados a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol IV) y AZYRO 3 (péptido diseñado a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol V), y en las inmunizaciones realizadas en los gallos se generaron anticuerpos policlonales para los péptidos Azyro 1 y 2 (péptidos diseñados a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol IV) (Cuadro 3.2).

### 3.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbas, C. F., D. R. Burton, J. M. Scott (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Silverman (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-23.
- Brekke, O. H. and I. Sandlie (2003). *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*. Nature Reviews, Drug Discovery, 2, 52-62.
- Crosnier, C., N. Staudt and G. Wright (2010). *A rapid and scalable method for selecting recombinant mouse monoclonal antibodies*. BMC Biology, 8, 76.
- Dias-Neto, E., D. N. Nunes, R. J. Giordano, J. Sun and G. H. Botz (2009). *Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis*. PLoS ONE, 4(12), e8338.
- Hawkins, R. E., S. J. Russell and G. Winter (1992). *Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation*. Journal of Molecular Biology, 226, 889-896.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and D. Capra (2000). *Producción de anticuerpos por linfocitos B en Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Masson S.A., Barcelona. pp. 309-324.
- Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer and G. Wellenhofer (2000). *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides*. Journal of Molecular Biology, 296, 57-86.
- Mechetner, E., M. Donzeau and A. Knappik (2007). *Monoclonal antibodies: methods and protocols*. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 1-64.
- Saerens, D. (2010). *Isolation and optimization of camelid single-domain antibodies: Dirk Saerens work on nanobodies*. Journal of Biological Chemistry, 1(7), 235-238.
- Smith, J., E. Roland, Kontermann, J. Embleton and S. Kumar (2005). *Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis*. The FASEB Journal, 19, 331-341.

## Capítulo 4

### Detección de la expresión de las ARN Pol IV y V

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

La primera evidencia de la existencia de las ARN Pol IV y V, que se encuentra exclusivamente en plantas, fue advertida por Craig Pickard cuando analizaba secuencias de genes en *Arabidopsis thaliana*. En un principio le pareció una forma alternativa de alguna de las ARNP. De la misma manera observó específicamente dos tipos de polipéptidos que podrían ser las subunidades clave de las ARNP IV y V, si es que fuera funcional. Posteriormente evidencias genéticas y bioquímicas indicaron que la ARN polimerasa IV no es funcionalmente coincidente con las ARN polimerasas I, II o III y que no es esencial para la viabilidad de la planta (Onodera *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de las ARN Pol IV y V es desconocido, pero se ha determinado que su actividad es diferente a la de otras ARN polimerasas. Las líneas mutantes de esta enzima en *A. thaliana* sobreviven, pero presentan retraso en su floración, y algunos defectos en el fenotipo floral, en ocasiones las plantas mostraron alteraciones en la identidad de sus órganos florales. Estas alteraciones coinciden con las zonas de la planta donde se ha reportado la presencia de la enzima. En *A. thaliana* las ARN Pol IV y V se encuentran principalmente en flores y raíces (Onodera *et al.*, 2005; Matzke *et al.*, 2009).

La expresión de las ARN Pol IV y V se han estudiado en otras plantas como *Zea mays* y en 18 especies de *Viola*, en donde al parecer llevan a cabo las mismas funciones en el silenciamiento génico, y se ha observado que presentan un número variable de copias de genes de las dos principales subunidades de las ARN Pol IV y V, lo que sugiere que la expresión de estas proteínas no solo puede variar en los diferentes tejidos de la planta, si no también depende de la especie que se analice (Pikaard, 2009; Marcussen *et al.*, 2010 and Yokthongwattana *et al.*, 2010).

En *O. sativa* se tiene conocimiento de las secuencias de la ARN Pol IV y V, sin embargo no se han realizado estudios sobre la expresión de la ARN Pol IV, por lo que haciendo uso de los anticuerpos policlonales generados en conejo (Cuadro 3.2), se han realizado detecciones de la presencia de las ARN Pol IV y V, en tejidos de planta adulta y en etapas de

la embriogénesis cigótica y somática, con el fin observar si existe una expresión diferencial de estas proteínas durante el desarrollo de la planta.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Material biológico**

Las plantas de *O. sativa* var. *milagro filipino*, de las cuales se obtuvieron los diferentes tejidos para los extractos proteicos, fueron colectadas de una plantación situada en Pocyaxum, Campeche.

### **4.2.3 Anticuerpos contra las ARN Pol IV Y V**

Los anticuerpos contra la ARN Pol IV Y V que se utilizaron en la inmunodetección se obtuvieron del suero de conejos. Los péptidos utilizados para las inmunizaciones se encuentran en el cuadro 3.1.

Las inmunizaciones se realizaron con 30 µg de péptido para cada conejo, el cual con ayuda de una jeringa de dos vías se mezcló hasta formar una emulsificación con 0.5 mL de adyuvante completo de Freund's en la primera inmunización, con 0.5 mL de Adyuvante incompleto en la segunda inmunización. Posteriormente, el emulsificado se inyectó en el lomo de los conejos. Las inmunizaciones en los conejos fue cada 20 días. Antes de la primera inmunización se obtuvo el suero (suero preinmune) para ser utilizado como testigo.

### **4.2.3 Inmunodetección de la ARN Pol IV Y V**

Un gramo de cada uno de los tejidos de *Oryza sativa* (flor, hoja, tallo y raíz) fue macerado con N<sub>2</sub> líquido, homogeneizado con la ayuda de un politrón en un buffer de extracción (50 mM NaCl; 50mM Tris-HCl; 1. mM EDTA; 10% glicerol; 1mM 2-β mercaptoetanol; 200 mM fenilmetil sulfonil; 1% Polivilpirrolidona) y centrifugado a 25000 g durante 30 min (Magyar *et al.*, 1993). La concentración de proteína, utilizando como estándar albúmina sérica bovina se determinó por el método de Bradford (1976). Las proteínas totales (30 µg) fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8% y electrotransferidas. El procedimiento de electrotransferencia se realizó de la proteína a la membrana de nitrocelulosa utilizando amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3). La transferencia se realizó a 100 V por 2 h. o 26V por 12 h. El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución lo que refrigeró el sistema a 4°C. Una vez terminada la transferencia la membrana fue incubada en una solución de leche descremada al 5% en TBST (0.5 M

Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% de Tween 20, pH 8), durante 1 h a temperatura ambiente. Después la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo policlonal contra la ARN Pol IV y V, en una dilución 1:2000 (Se realizó una titulación de 1:500-1:8000, utilizando extracto de proteínas del tallo, para saber la concentración de anticuerpo que fue utilizado). El lavado de la membrana se realizó tres veces con TBST por 15 min. Incubada con un anticuerpo secundario policlonal (anti conejo conjugado a la peroxidasa de rabano) en una dilución 1:5000 durante 2 h. a temperatura ambiente. Se Repitieron los tres lavados de la membrana con TBST. La detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

#### **4.2.4 RT-PCR**

La extracción de ARN total fue obtenido de 1 gr de inflorescencias y de tallo de *O. sativa* por el método de Trizol (Invitrogen) y la síntesis de ADNc se realizó con el paquete comercial SUPERSSCRIPT II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

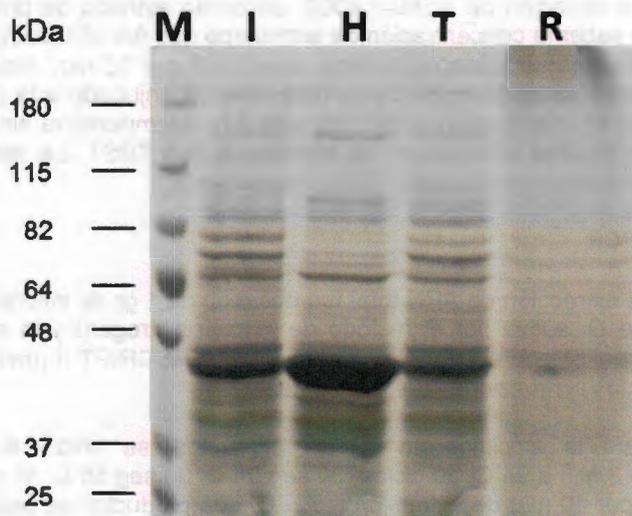
Para la amplificación de los productos, se utilizó el siguiente programa: 3 min a 94°C; 30 ciclos (30 seg 94°C, 30 seg 55°C, 45 seg 72°C), seguidos por 10 min de extensión a 72 °C. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Para la amplificación del fragmento de aproximadamente 309 pares de bases de la subunidad uno de la ARN polimerasa IV, las secuencias de los cebadores fueron: PEP4F 5' -GGT ATA TGG GAG AAC ATC ATT- 3' y PEP6R 5' -CCC ACT GCC TCC AAT ATG CAG- 3'. El fragmento de aproximadamente 486 pares de bases de la subunidad dos de la ARN polimerasa IV, fue amplificado con las siguientes secuencias de cebadores: ECIR3F 5' -CTT GGA AGA GAA CTC CGT GCG- 3' y ECIR4R 5' -AGG AAC CTC CTC TGT AGG AAT- 3'. Para el análisis semicuantitativo se realizó una variación a la cantidad de ciclos del PCR que fue entre 24- 32 ciclos.

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Inmunodetección de la ARN Pol IV y V DE *O. sativa***

La detección de la ARN Pol IV y V en *O. sativa*, se realizó con los extractos proteicos de diferentes tejidos de *O. sativa*. Separando 30 µg de proteína en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 8% y transferidas a una membrana de nitroceluosa (Figura 4.1). En esta figura se puede

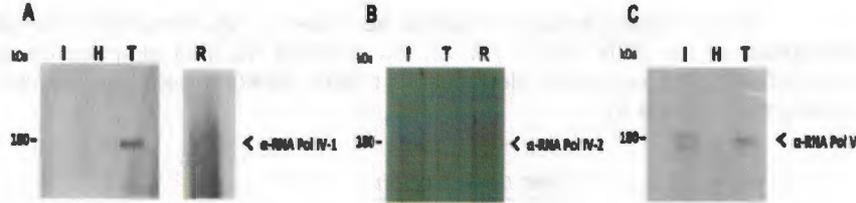
observar el patrón proteico de los extractos de la inflorescencia, hoja, tallo y raíz.



**Figura 4.1.** Patrón de proteínas de los tejidos de *Oryza sativa*. Marcador (M); inflorescencia (I), hoja (H), tallo (T) y raíz (R). Tinción con azul de Coomasie.

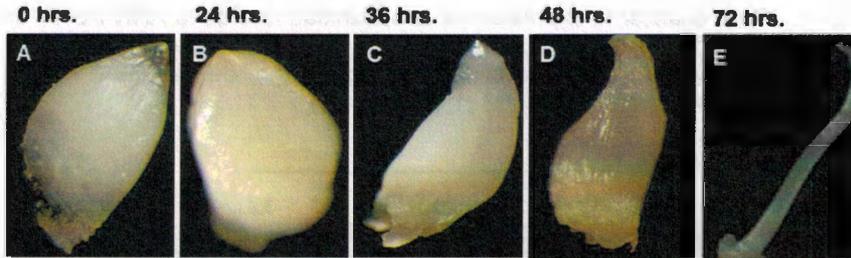
El anticuerpo azyro 1 (diseñado para una región no conservada de la ARN Pol IV de *O. sativa*) y el anticuerpo azyro 2 (diseñado para una región conservada de la ARN Pol IV de *O. sativa*), detectaron una proteína en los extractos proteicos de tallo y raíz de aproximadamente 180 KD que es el peso molecular de la subunidad 1 de la ARN Pol IV (Figura 4.2 A y 4.2 B respectivamente). Los resultados nos sugieren que la ARN Pol IV se expresa o almacena en inflorescencias, tallo y raíz.

El anticuerpo azyro 3 (diseñado para una región no conservada de la ARN Pol V de *O. sativa*) detectó una proteína en los extractos de inflorescencias y de tallo de aproximadamente 150 KD que es la masa molecular aproximada de la subunidad 1 de la ARN Pol V de *O. sativa*. Los resultados nos sugieren que la ARN Pol V se encuentra principalmente en inflorescencias y tallo (Figura 4.2 C). La presencia de otras bandas podría deberse a productos de degradación de estas mismas proteínas.

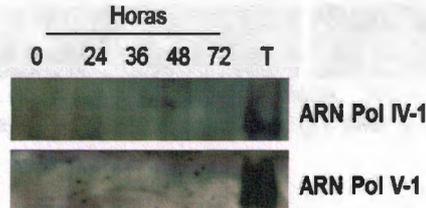


**Figura 4.2.** Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V. A) Inmunodetección con anticuerpos generados a partir del péptido azyro 1 (ARN Pol IV-1). B) Inmunodetección con anticuerpos generados a partir del péptido azyro 2 (ARN Pol IV-2). C) Inmunodetección con anticuerpos generados a partir del péptido azyro 3 (ARN Pol V-1). Inflorescencia (I); hoja (H), tallo (T) y raíz (R).

En la embriogénesis cigótica (Figura 4.3) se detectó la presencia de la ARN Pol IV desde las primeras horas de desarrollo. La presencia de la ARN Pol V no se observó. En ambos estudios se utilizó como extracto testigo el tallo (Figura 4.4).



**Figura 4.3.** A-E. Desarrollo del embrión cigótico. Se muestra el embrión cigótico a las 0, 24, 36, 48 h. A las 72 h. ya se puede observar el escutelo.



**Figura 4.4.** Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V en la embriogénesis cigótica. Las muestras se tomaron en un periodo de 0-72 horas. Tallo (T).

En la embriogénesis somática se observa un incremento de la presencia de las ARN Pol IV y V en los primeros 15 días después de la inducción de los escutelos, después se puede observar señal de manera constante (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Inmunodetección de las ARN polimerasas IV y V en la embriogénesis somática. Muestras tomadas a partir del día 5 después de la inducción hasta el día 30. Tallo (T).

#### 4.3.3 Expresión de la ARN POL IV Y V EN *O. sativa*

Para analizar la expresión de la subunidad uno de la ARN Pol IV en diferentes tejidos, se amplificó un fragmento de aproximadamente 309 pb y los cebadores diseñados para la subunidad uno de la ARN Pol V, amplificaron un fragmento de 486 pb (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** RT-PCR. Análisis semicuantitativo de la ARN Pol IV V. Inflorescencia (I) y tallo (T) en *oryza sativa*. 24-32 es la cantidad de los ciclos del PCR.

El resultado de las ampliaciones para ambas subunidades, es del tamaño esperado, de 309 pb y 486 pb para las subunidades uno de las ARN Pol IV y V respectivamente. Se observó una concentración similar de los

transcritos de las ARN pol IV en tallo e inflorescencia y una mayor presencia de los transcritos de las ARN Pol V, en los tejidos de inflorescencia. No se pudo realizar este análisis en los otros tejidos debido a la degradación de los cebadores que se utilizaron en este análisis.

#### 4.4 DISCUSIÓN

Con los anticuerpos policlonales contra las ARN Pol IV y V de *O. sativa* generados en conejo, fue detectada la ARN Pol IV en tallo y raíz; y la ARN Pol V se observó en inflorescencia, hoja y tallo semejante a lo observado en *A. thaliana*, donde la expresión de estas polimerasas ocurre en todos los tejidos, pero principalmente en flor y en raíz (Onodera *et al.*, 2005). En *O. sativa* la subunidad uno de la ARN Pol IV se expresa principalmente en tallo, la subunidad dos de la ARN Pol IV se expresa en inflorescencia y tallo, y la ARN Pol V principalmente se expresa en inflorescencia y tallo. Sin embargo difieren con *A. thaliana* en que no se detectó la presencia de la ARN Pol IV en hoja y en el caso de la ARN Pol V no se detectó en hoja y raíz.

En los RT-PCR realizados se observó en las inflorescencias y el tallo, la expresión de las ARN Pol IV y V. La expresión de la ARN Pol IV en tallo es mayor que la expresión de la ARN Pol V, mientras que en inflorescencia se encuentran expresadas de manera similar. Estas diferencias en los patrones de expresión de las ARN polimerasas se pueden deber a los cambios que lleva a cabo el mecanismo de silenciamiento durante el desarrollo de la planta.

Los resultados obtenidos en *O. sativa* muestran un nivel bajo de expresión en embrión cigótico a diferencia embriones somáticos donde se detecto una mayor cantidad de las ARN Pol IV y V. El incremento de ambas polimerasas fue hasta después de los 30 días posteriores a la inducción de los escutelos con auxinas.

La auxina ha sido demostrado que es un factor determinante en la regulación celular en el gametofito femenino de *A. thaliana* y en el desarrollo del embrión (Ulmasov *et al.*, 1997). Por lo que de alguna manera el 2,4-D, podría estar induciendo la expresión de las ARN Pol IV y V en la embriogénesis somática. A su vez se ha observado una desmetilación durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana* (Mosher *et al.*, 2009), motivo por el cual no se haya detectado una señal significativa de las ARN Pol IV y V en el desarrollo del embrión cigótico de *O. sativa*.

Las diferencias en la cantidad presente de las ARN Pol IV y V en los tejidos de planta adulta y en la embriogénesis cigótica y somática, podría deberse a la cantidad de células meristemáticas o dediferenciadas presentes en los tejidos. En donde el mecanismo de silenciamiento génico en el cual están implicadas las ARN polimerasas IV y V puede ser activado para controlar el silenciamiento durante la diferenciación celular. Cabe mencionar que los embriones cigóticos ya se encontraban formados a diferencia de los somáticos. Motivo por el cual se sugiere que el tejido somático generado presenta un aumento en estas polimerasas.

#### 4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding*. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Huettel, B., T. Kanno, L. Daxinger, W. Aufsatz, A. J. M. Matzke, and M. Matzke (2006). *Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and pol IV in Arabidopsis*. EMBO Journal, 25, 2828-2836.
- Kanno, T., B. Huettel, M. F. Mette, W. Aufsatz, E. Jaligot, L. Daxinger, D. P. Kreil, M. Matzke and A. J. Matzke (2005). *Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation*. Nature Genetics, 37, 761-765.
- Li, F. C., O. Pontes, M. El-Shami, I. R. Henderson, Y. V. Bernatavichute, S. W. Chan, T. Lagrange, C. S. Pikaard and S. E. Jacobsen (2006). *An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with cajal bodies in Arabidopsis thaliana*. Cell, 126, 93-106.
- Magyar, Z., L. Bakó, L. Bogre, D. Dedeoglu, T. Kapros and D. Dudits (1993). *Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells*. The Plant Journal, 4, 151-161.
- Marcussen, T., B. Oxelman, A. Skog and K. Jakobsen (2010). *Evolution of plant RNA polymerase IV/V genes: evidence of subneofunctionalization of duplicated NRPD2/NRPE2-like paralogs in Viola (Violaceae)*. BMC Evolutionary Biology, 10, 45.
- Matzke, M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel and A. Matzke (2009). *RNA-mediated chromatin-based silencing in plants*. Current Opinion in Cell Biology, 21, 367-376.
- Mosher, R. A., C. W. Melnyk, K. A. Kelly, R. M. Dunn, D. J. Studholme and D. C. Baulcombe. (2009). *Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis*. Nature, 460, 283-286.
- Pikaard, C. and S. Tucker (2009). *RNA-silencing enzymes pol IV and pol V in maize: more than one flavor?*. PLoS Genetics, 5(11), e1000736.
- Pontes, O., F. Li, N. Costa, J. Haag, T. Ream, A. Vitins, S. E. Jacobsen, and C. S. Pikaard (2006). *The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear*

*siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center.* Cell, 126, 79-92.

Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen and T. J. Guilfoyle (1997). *Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements.* Plant Cell, 9, 1963-1971.

Yokthongwattana, C., E. Bucher, M. Caikovski, I. Vaillant, J. Nicolet, O. Scheid and Paszkowski (2010). *MOM1 and pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing.* The EMBO Journal, 29, 340-351.

30

## Capítulo 5

### Análisis histológico de la embriogénesis somática de *O. sativa*

#### 5.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática (ES) es el proceso por el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, pasando por una serie de cambios bioquímicos que resultan en la formación de un embrión. Es un proceso con la capacidad para producir embriones morfológicamente bien formados y desarrollarse a partir de células somáticas en cultivo sin organización (Kawahara *et al.*, 1995).

La alternativa más eficiente para la propagación masiva de plantas es la ES, debido a se obtiene una planta de mejor calidad que en la micropropagación por organogénesis. Las ventajas del proceso, en este estudio hacen un sistema ideal para realizar estudios a nivel morfohistológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Los datos de la literatura indican que existen diferencias significativas entre especies y en muchos casos, los resultados que se obtienen no pueden ser aplicados a otras especies e inclusive entre variedades (Quiroz, 2003).

Los principales factores involucrados para un determinado tipo de respuesta dependerán de la naturaleza del regulador de crecimiento utilizado, el origen del explante, el estadio fisiológico y la especie utilizada (Halperin *et al.*, 1995).

En *O. sativa* se ha reportado la regeneración de plantas por vía de organogénesis o ES (Tsukahara *et al.*, 1996), sin embargo, hay versiones contradictorias en el proceso de regeneración. Uno de los procesos más convincente de embriogénesis somática parece ser la embriogénesis directa en escutelo (Jones & Rost *et al.*, 1989b).

Pocos estudios morfológicos se han hecho sobre la embriogénesis somática en *O. sativa*. Según Robert *et al.*, (1985), la superficie de la célula es el ensamblaje completo de la pared celular, membrana plasmática y el citoesqueleto cortical. La dinámica e integración del ensamblaje en conjunto, se considera ahora que juega un papel fundamental y central en la definición de la forma celular, la polaridad celular y la morfogénesis en las plantas.

Las observaciones de la inmunolocalización muestran que la ARN Pol IV y V son proteínas nucleares y sugiere que esta proteína afecta la condensación de la heterocromatina, ya que se observó un núcleo más disperso, es decir, el ADN se encuentra empacado de manera muy diferente observándose menos condensado en las mutantes de *Arabidopsis* (*rpm2a-2*, *rpm2b-1*) (Onodera *et al.*, 2005). La dispersión de la heterocromatina del gen 5S en los mutantes de ARNP IV, sugirieron una pérdida de cierto nivel de metilación de la citosina, sin la metilación apropiada del ADN los organismos presentan problemas de desarrollo (Soppe *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis thaliana* ya han demostrado que los primeros estadios de gametogénesis requieren la expresión de las ARN Pol IV y V (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010); probablemente, para llevar a cabo de manera ordenada los cambios de territorios nucleares. Con base a esta información y con la hipótesis de que los cambios de reorganización nuclear involucrarían la maquinaria de silenciamiento y en particular a la ARN Pol IV y V, se analizó si hay una correlación entre la presencia de las ARN Pol IV y V y la reorganización del núcleo que se lleva a cabo durante la embriogénesis somática. Por lo cual se realizaron los experimentos de inmunohistoquímica con el fin de determinar si los anticuerpos obtenidos localizaban a la ARN pol IV y V en el núcleo y en particular que células del tejido embrionario mostraban diferencias en el nivel de señal dado por estos anticuerpos. Esto es fundamental para determinar si los anticuerpos pueden ser utilizados con la proteína en estado nativo. Adicionalmente permiten definir que células son las que tienen expresión de estas proteínas y en que lugar se encuentran.

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Material biológico

Se usaron semillas de *O. sativa* var. *Filipina* las cuales fueron esterilizadas con alcohol al 70% durante 5 min, seguido por cloro al 50% durante 1 h. en agitación y tres lavados con agua estéril. Las semillas fueron germinadas en agua destilada estéril. Después de 2 a 4 días de cultivo, los embriones inmaduros fueron disectados de forma transversal para obtener el escutelo; y estos fueron transferidos a medio de inducción EIM (sacarosa 4%; Medio MS 4.3 g/L; 2, 4-D 2 mg/L<sup>-1</sup>) e incubados en un cuarto de cultivo en oscuridad y a 60 rpm de agitación. Este protocolo de embriogénesis fue modificado de Mariani *et al.*, 1998.

### 5.2.2 Análisis histológico

Los embriones en diferentes etapas de desarrollo, se fijaron en formaldehído al 10 % (en buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.2), 5% de ácido acético y 50% de etanol por 24 h. bajo presión negativa. Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de etanol absoluto: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% y tres veces al 100% se realiza el procedimiento para el análisis de las muestras por microscopía electrónica de barrido o el de inmunolocalización. Las secciones, fueron doblemente teñidas con la reacción de Ácido peryódico-Schiff (PAS, por sus siglas en inglés), en combinación con azul negro de naftol. Las muestras fueron observadas en el microscopio Axioplan con luz visible.

### 5.2.3 Inmunolocalización de la ARN Pol IV Y V

Los embriones en diferentes etapas de desarrollo, se fijaron en formaldehído al 4 % (en buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.2), 5% de ácido acético y 50% de etanol por 72 horas. Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de etanol absoluto: 30%, 50%, dos veces cada dos h.; 70%, dos veces, una h. la primera vez y 24 h. la segunda vez; 85%, dos veces cada 2 h.; 96%, dos veces cada 30 min; desechar el etanol al 96% y adicionar butanol al 100% por 24 horas a temperatura ambiente. Este paso se realizó tres veces y a la tercera vez se agregaron aprox. 15 hojuelas de parafina y se colocaron en agitación (60 rpm) toda la noche a temperatura ambiente. Se colocaron diversos frascos con hojuelas de parafina a 60°C para contar con parafina líquida para los cambios posteriores. Posteriormente, las muestras se incubaron a 60 °C, ya derretida la parafina se agregaron más hojuelas durante 2-3 h. (2 o 3 veces en todo el día). Al día siguiente, se realizó el primer cambio de parafina líquida, decantando la mitad del volumen y se agregó la parafina líquida pura, previamente colocada en la estufa a 60°C 2 días antes del cambio (2 cambios por día). En total, se realizaron de 4 -6 cambios de parafina líquida por no más de 4 días. Se colocaron las muestras en los moldes y se añadió más parafina al molde, se colocó la tapa y se deja enfriar a temperatura ambiente por 20 min. Los cortes se realizaron en el micrótopo (Microm HM 340E), seguido de un proceso de desparafinización, con un lavado con butanol, y dos lavados de ultraclean. Posteriormente se sometieron a lavados con etanol al 100, 50 y 30%. Los residuos de parafina fueron eliminados con dos lavados de xileno al 100%, seguido de etanol absoluto, etanol al 70% y finalmente agua destilada. Posteriormente, para la inmunolocalización se lavaron las muestra con PBST y se incubaron a 37°C, después se incubó con el anticuerpo primario en una dilución 1:500 (los anticuerpos denominados Azyro 1 y 3) toda la noche, seguido de tres lavados con PBST y de la

incubación en una dilución 1:2000 con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa fluor 488 a 37°C. La observación se realizó en el microscopio confocal (Leica TCS SP5 AOBS TANDEM). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolina) (Pontes *et al.*, 2006)

Los cortes histológicos se hidrolizaron en ácido periódico por cinco minutos, después se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Éstos se tiñeron con el reactivo de Schiff en oscuridad por 1 min, se lavaron con agua hasta que el agua quedó incolora y se secaron. Finalmente los cortes se tiñeron en una solución de azul de naftol al 1% en ácido acético al 7% (1 minuto), se lavaron con agua y se dejaron secar (Davey, 1977).

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Análisis histológico de la embriogénesis somática

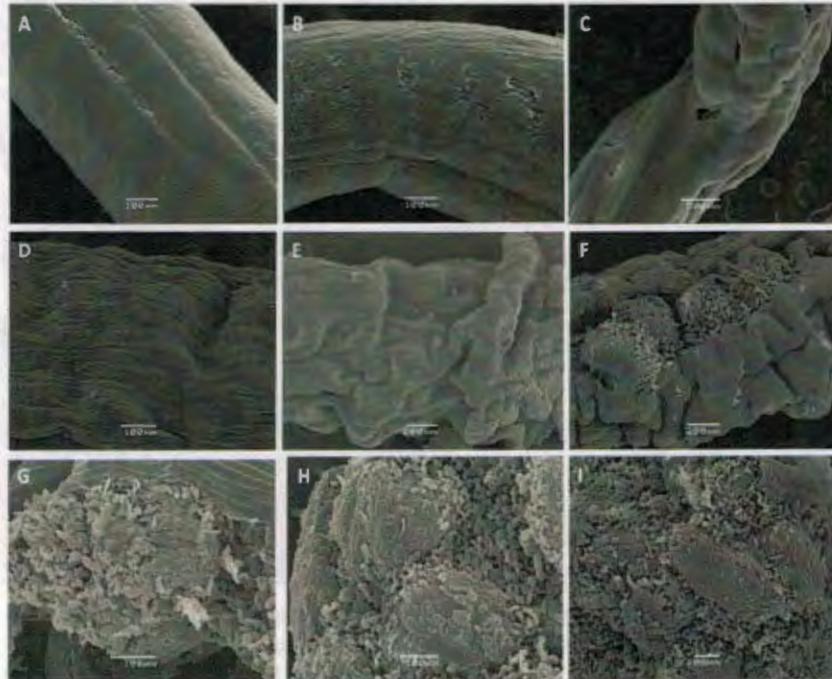
Los embriones de *O. sativa* L. formados directamente sobre la superficie del escutelo de embriones cigóticos, desarrollan patrones estructurales y de desarrollo semejantes a los del embrión cigótico. Las etapas proembriogénica, globular, escutelar y coleoptilar fueron observadas por estereomicroscopía y por microscopía electrónica de barrido (MEB). La formación del protodermo y su diferenciación de la epidermis son importantes en el inicio de la embriogénesis somática (Mariani *et al.*, 2002).

Un evento temprano durante la inducción de la embriogénesis es la ruptura de la integridad del tejido. Esta ruptura da como resultado el aislamiento de células. Las células están libre de los tejidos circundantes lo que promueve la conexión celular entre las células vecinas, se sugiere que este hecho podría estimular la embriogénesis (Mariani *et al.*, 1998).

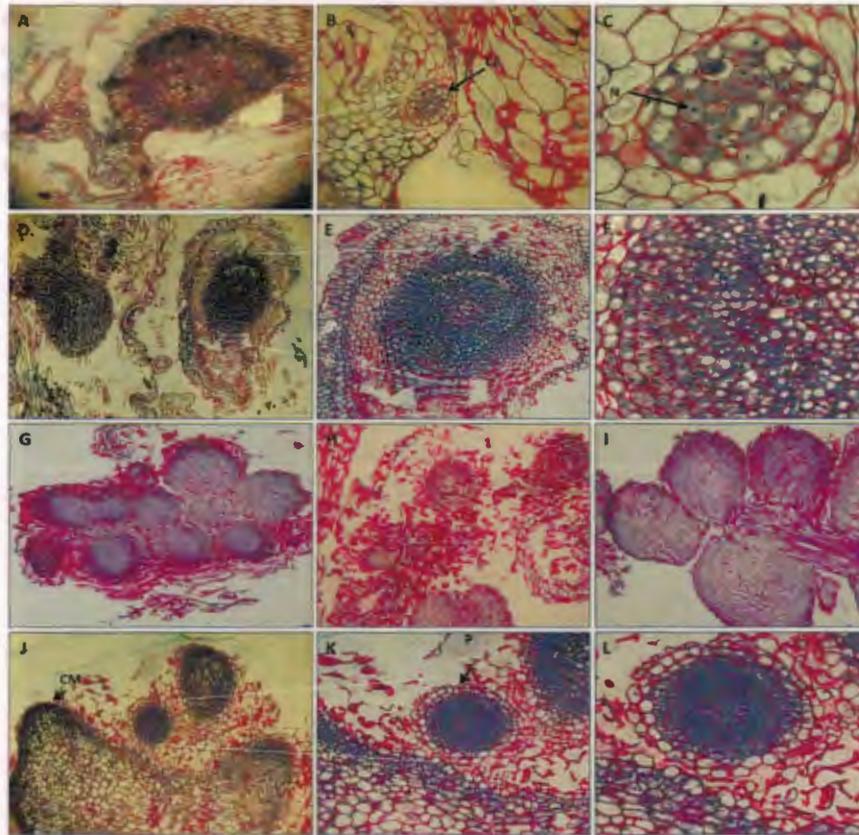
Se puede observar el proceso de la embriogénesis somática en las etapas de subcultivo, en el cual al parecer se desarrollaron estructuras embrionarias (Figura 5.1). Se puede observar en la figura 5.1-A, la superficie lisa de la pared celular del escutelo, seguido de una disrupción en las células de la superficie del escutelo (Figura 5.1B-E). Posteriormente se observa gradualmente la formación de estructuras nodulares al parecer embriogénicas (Figura 5.1 F-I).

A partir de los escutelos con posibles estructuras embriogénicas se realizó la disección histológica. Estos análisis mostraron las primeras etapas de la embriogénesis, en donde se pudo observar células pequeñas e isodiamétricas con prominentes núcleos y paredes celulares delgadas,

(figuras 5.2 A-C). Se presentaron células meristemáticas pequeñas densamente tefidas, que empiezan a dar lugar a la segmentación por pro embriones (figuras 5.2 D-F); Se observó el embrión en un estadio que semeja a una etapa globular en dicotiledóneas, en el que se pueden apreciar los centros meristemáticos la protodermis y el inicio de la diferenciación celular que establece la estructura básica de una nueva planta. (Figuras 5.2 G-L).



**Figura 5.1.** Estudio morfológico de embriones somáticos de *O. sativa* en medio EIM con 2,4-D  $2 \text{ mg/L}^{-1}$  por MEB. A) Escutelo de *O. sativa* en el día cero de inducción de la embriogénesis somática. B) Escutelo de *O. sativa* en el día 5 de inducción. C) Escutelo de *O. sativa* en el día 10 de inducción. D) Escutelo de *O. sativa* en el día 15 de inducción. E) Escutelo de *O. sativa* en el día 20 de inducción. F) Escutelo de *O. sativa* en el día 25 de inducción. G) Escutelo de *O. sativa* en el día 30 de inducción. H) Escutelo de *O. sativa* en el día 35 de inducción. I) Escutelo de *O. sativa* en el día 40 de inducción.



**Figura 5.2.** Cortes histológicos de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos mantenidos en medio EIM con  $2 \text{ mg/L}^{-1}$  de 2,4.-D. A-C) embriones con 5 días de subcultivo, D-F) embriones con 10 días de subcultivo, G) embriones con 15 días de subcultivo. H) embriones con 20 días de subcultivo. I) embriones con 25 días de subcultivo. J-L) embriones con 30 días de subcultivo. CE: Células embriogénicas. N: Núcleo. CM: Centros meristemáticos. P: Protodermis.

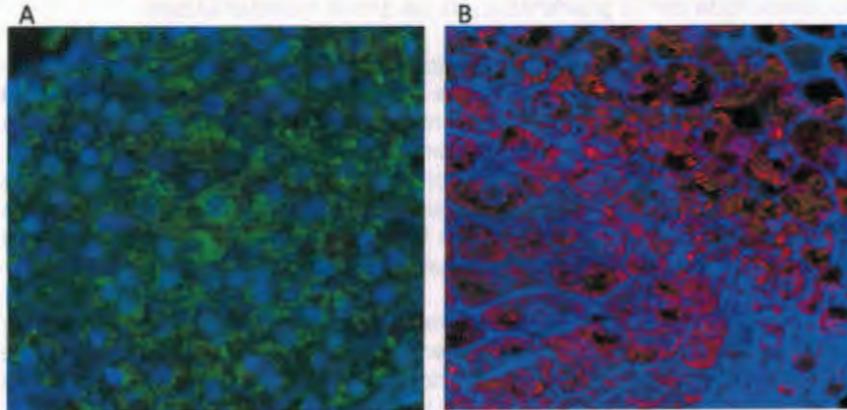
### 5.3.2 Inmunolocalización

En *A. thaliana*, las ARN Pol IV y V fueron localizadas en el núcleo, utilizando anticuerpos generados a partir de péptidos específicos para estas proteínas. Debido a que las ARN Pol IV y V están implicadas en la

producción de los siARN y en el complejo de silenciamiento génico. Se sugiere que estas proteínas participen en el mantenimiento de la heterocromatina (Pontes *et al.*, 2006). En estudios de metilación en embriones de *A. thaliana* se observó que los embriones se encuentran hipermetilados en comparación con los tejidos vegetativos (Mosher & Melnik, 2010).

Para la inmunolocalización de las ARN Pol IV y V se utilizaron los anticuerpos policlonales generados en conejo (Cuadro 3.2). En color azul, se pueden observar los núcleos de la célula teñidos con DAPI (Figura 5.3). En la Figura 5.3-A se observa la localización de la ARN Pol V en color verde. Mientras que en la Figura 5.3-B se observa en color rojo la localización de la ARN Pol IV. Se puede observar sobre el núcleo, la localización en forma punteada correspondientes a las ARN Pol IV y V. Siendo esto una marca característica en polimerasas y en complejos donde actúan un gran número de un mismo tipo de proteína. Adicionalmente se encuentra en una proporción similar la presencia de estas ARN Polimerasas en el citoplasma. Los puntos fluorescentes muy brillantes se deben a la precipitación del anticuerpo secundario lo cual coincide principalmente en la pared celular.

Al encontrarse la presencia de las ARN Pol IV y V en compartimentos nucleares, es posible que estas proteínas estén implicadas en funciones nucleares como las de silenciamiento génico que fue definido en *A. thaliana* y que la planta necesita en sus etapas de desarrollo.



**Figura 5.3.** Inmunolocalización de las ARN Pol IV y V. A) Corte histológico de embriones somáticos con el anticuerpo contra la ARN Pol IV. B) Corte histológico de embriones somáticos con el anticuerpo contra la ARN Pol V. Los núcleos en color azul.

#### 5.4 DISCUSIÓN

Una de las técnicas de cultivo *in vitro* es la ES que se refiere a la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas, que no son producto de la fusión de gametos (Kumria *et al.*, 2001). Los embriones somáticos son estructuras globulares con un eje radical apical que son capaces de crecer y formar una planta completa. Estos tejidos contienen una gran cantidad de células en diferentes estados de diferenciación celular. Por lo cual es de gran utilidad esta técnica para obtener material de estudio y a su vez compararla con embriones cigóticos.

Durante este trabajo se determinaron las etapas de la embriogénesis en embriones cigóticos de *Oryza sativa*, los cuales fueron caracterizados en el escutelo durante el cultivo de embriones cigóticos inmaduros. Las etapas proembriogénica, globular, escutelar y coleoptilar fueron observadas por estereomicroscopia, histoquímica y por microscopia electrónica de barrido (MEB), lo que permite tener una información más detallada en lo concerniente a los cambios en la forma y la superficie durante el desarrollo embriogénico. En la embriogénesis somática de *O. sativa*, a partir de escutelo, se pudo observar un proceso similar al reportado en Mariani *et al.*, 1998. En los cortes histológicos, se pudo observar, las zonas meristemáticas de los embriones, y a su vez, en el estudio por MEB se observa la respuesta morfogénica del escutelo al medio de inducción. La aparición de las estructuras embriogénicas está correlacionada con la proliferación de las zonas meristemáticas.

Los estudios de inmunolocalización de ARN pol IV y V demostraron la expresión de estas enzimas en las zonas meristemáticas generadas. La presencia encontrada en las células nucleadas de los embriones somáticos de *O. sativa*, se encuentran correlacionadas con los datos observados en *A. thaliana* (Pontes *et al.*, 2009) y sugieren que si las ARN Pol IV y V se encuentran implicadas en el mecanismo de silenciamiento génico podrían tener una importante participación en la organización nuclear durante el los primeros estadios de diferenciación celular.

Se sugiere de acuerdo a lo observado en la inmunolocalización que las ARN Pol IV y V en *O. sativa* tienen una localización nuclear al igual que en *A. thaliana* (Li *et al.*, 2006) se podría sugerir que interactúan con algunas de las proteínas nucleares con las que se han colocalizado en *A. thaliana*, (Law *et al.*, 2011). Los experimentos realizados a la fecha en *A. thaliana* siempre han sido realizados con núcleos extraídos por lo cual se desconoce la cantidad de estas proteínas en el citoplasma. El experimento muestra que las ARN Polimerasas en células diferenciadas se relocaliza al citoplasma, lo

cual puede ser para ser degradada al no requerirse en cantidades mayores después de ser diferenciadas o quizás participa en otras funciones en el citoplasma, como puede ser el sistema inmune de las plantas. Aunque aun se desconoce la regulación del mecanismo que controla la respuesta inmune, existe evidencia reciente de la participación de estas polimerasas en la modulación de la respuesta inmune a patógenos (Chinnusamy & Zhu, 2009, López *et al.*, 2011). Sin embargo falta mucho por resolver para determinar la razón de este evento.

Sin embargo una cantidad particular debe mantenerse expresada para mantener cierto nivel de regulación epigenética que llevan a cabo las ARN Pol IV y V, también podrían estar implicadas en mantener inactivas ciertas secuencias virales (Herr *et al.*, 2005, Chinnusamy & Zhu, 2009). Debido a la carencia del sistema inmune de las plantas estas polimerasas han sido propuestas como parte del sistema que utilizan las plantas para obtener tolerancia al ataque de diversos virus que afectan a las plantas (Herr *et al.*, 2005, Chinnusamy & Zhu, 2009). Es importante acentuar que el proceso de silenciamiento génico como parte fundamental para entender los procesos epigenéticos que controlan la expresión de los genes durante el desarrollo y diferenciación celular.

## 5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A. and J. Escalant (1994). *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. CATIE. Turrialba, Costa Rica, 38.
- Chinnusamy, V. and J.K. Zhu.(2009). *RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants*. *Science*, 52(4), 331-343.
- Davey, F. R. and D. A. Nelson (1977). "Periodic acid Schiff (PAS) stain", en *Hematology*. Williams, J., E. Buettler, A. J. Erslev and R. W. Rundles (eds). McGraw-Hill, New York. pp.1630-1632.
- Halperin, W. (1995). "In vitro embryogenesis: some historical issues and unresolved problems", en *In vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe T. A. (ed). Kluwer, Dordrecht. pp. 1-16.
- Herr, A. J., M. B. Jensen, T. Dalmay and D.C. Baulcombe (2005). *RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA*. *Science*, 308, 118-120
- Jones ,T. J. and T. L. Rost (1989b). *The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (Oryza sativa L.) scutellum epithelial cells*. *Botanical*, 150, 41-49
- Kawahara, R. and A. Komamine (1995) "Molecular basis of somatic embryogenesis", en *Biotechnology in agriculture and forestry. somatic embryogenesis and synthetic seed*. Bajaj Y.P. (ed.). Springer-Verlang, Berlin. pp. 30-40.
- Kumria, R., B. Waie and M. V. Rajam (2001). *Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via Agrobacterium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 67(1), 63-71.
- Law, J., A. Vashisht, J. Wohlschlegel and S. Jacobsen (2011). *SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV*. *PLoS Genetics*, 7(7), e1002195.
- Li, F. C., O. Pontes, M. El-Shami, I. R. Henderson, Y. V. Bernatavichute, S. W. Chan, T. Lagrange, C. S. Pikaard and S. E. Jacobsen (2006). *An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with cajal bodies in Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 126, 93-106.

- López, A., V. Ramírez, J. García-Andrade, V. Flors and P. Vera (2011). *The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity*. PLoS Genetics, 7(11), e1002434.
- Mariani, T. S., H. Miyake, R. Esyanti, and Y. Takeoka (1998). *Changes in surface structure during direct somatic embryogenesis in rice scutellum observed by scanning electron microscopy*. Plant Production Science, 1, 223-231.
- Mariani, T.S., H. Miyake and Y. Takeoka (2002). *Direct somatic embryogenesis in rice (Oryza sativa L.): Structural and development patterns*. Jurnal Matematika dan sains, 7(2), 53-56.
- Mosher, R. A. and C. W. Melnik (2010). *siARN and DNA methylation: seedy epigenetics*. Trends in Plant Cell, 15(4), 204-210.
- Quiroz, F. F. (2003). Estudio de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, 6-8. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas.
- Olmedo-Monfil, V., N. Durán-Figueroa, M. Arteaga-Vázquez, E. Demesa-Arévalo, D. Autran, D. Grimanelli, R. K. Slotkin, R. A. Martienssen and J. P. Vielle-Calzada (2010). *Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis*. Nature, 464(7288), 628-632.
- Onodera, Y., J.R. Haag, T.S. Ream, P. Costa, O. Pontes and C.S. Pikaard. (2005). *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation*. Cell. 120(5):613-22.
- Pontes, O., F. Li, N. Costa, J. Haag, T. Ream, A. Vitins, S. E. Jacobsen, and C. S. Pikaard (2006). *The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center*. Cell, 126, 79-92.
- Pontes, O., N. Costa, P. Vithayathil, and C. S. Pikaard (2009). *RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway*. Molecular Plant, 2(4), 700-710.
- Robert, K., A. W. B. Johnston, C. W. Llyod, P. Shaw and H. W. Woolhouse (1985). *The cell surface in plant growth and development*. Journal of Cell Science, 2, 78.

- Sharp, W. R., M. R. Söndahl, L. S. Caldas and S. B. Marrafa (1980). *The physiology of in vitro asexual embryogenesis*. Horticultural Reviews, 2, 268-310.
- Soppe, W.J., Z. Jasencakova, A. Houben, T. Kakutani, A. Meister, M. S. Huang, S. E. Jacobsen, I. Schubert and P. F. Fransz (2002). *DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis*. EMBO Journal, 21, 6549-6559.
- Tsukahara, M., T. Hirose and S. Kishine (1996). *Efficient plant regeneration from cell suspension cultures of rice (Oryza sativa L.)*. Journal of Plant Physiology, 149, 157-162.
- Williams, E. G. and G. Maheswaran (1986). *Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group*. Annals of Botany, 57, 443-462.

## Capítulo 6

### Discusión general

#### 6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las ARN polimerasas son enzimas esenciales para la expresión de la información genética. Realizan su trabajo copiando una plantilla de ADN a fin de generar ARN los cuales pueden ser de varios tipos y de múltiples funciones. En organismos eucariontes se han estudiado tres tipos de ARN polimerasa: las ARN polimerasa I, II y III (ARN Pol I, ARN Pol II y ARN Pol III). Estas enzimas codifican para ARN Ribosomal, Mensajeros y de Transferencia respectivamente (Woychik *et al.*, 2002).

El análisis de la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló la evidencia de la existencia de una cuarta ARN polimerasa que se encuentra exclusivamente en plantas. En un principio pareció una forma alternativa de las otras Polimerasas, pero al parecer no era funcionalmente coincidente con ARN Pol I, ARN Pol II o ARN Pol III, además de ser no esencial para la vida de la planta. Se observaron específicamente dos tipos de polipéptidos que podrían ser las subunidades clave de la ARN Pol IV (ARN Pol IV y V), (Onodera *et al.*, 2005). No se descartó la posibilidad de que existiera en otros organismos, por lo que se analizó el genoma de *Oryza sativa* observando que en este también se encontraban secuencias similares que podrían corresponder a las dos subunidades principales de la ARN Pol IV, cabe mencionar que hasta el momento no se ha encontrado evidencia de la ARNP IV en animales (Onodera *et al.*, 2005).

Las ARN Pol IV y V están compuestas de subunidades que son parálogos o idénticos a algunas de las 12 subunidades de la ARN Pol II. Las dos subunidades más grandes del complejo proteico de las ARN polimerasa II forman el centro catalizador en el que ocurre la síntesis de ARN. Las diferencias entre las subunidades ocurren en posiciones claves relacionadas con la entrada del templado a la enzima y la vía de salida del ARN que se sintetiza, debido a esto, podría ser que las ARN Pol IV y V puedan desarrollar funciones especializadas en el silenciamiento de ARN, pero sin realizar las funciones esenciales para la viabilidad (Ream *et al.*, 2009). Los análisis de comparación de secuencias de aminoácidos de la ARN Pol IV de *O. sativa* con la ARN Pol IV de *A. thaliana* mostraron una identidad entre las subunidades 1a (ARN Pol IV) del 30% y del 23% entre las subunidades 1b (ARN Pol V). En el caso de la ARN Pol IV las subunidades más conservadas son las subunidades 2a de *O. sativa* y *A.*

*thaliana* con 55% de identidad y las subunidades 2a y 2b de *A. thaliana* con 84% de identidad.

Se determinó las secuencias de aminoácidos de regiones conservadas y no conservadas (Figuras 2.2-2.4), para su posterior análisis estructural. Las proteínas ARN Pol reportadas en estas especies poseen un alto grado de similitud, lo que era de esperarse, dado que las ARN polimerasas son proteínas que se encuentran muy conservadas en todos los organismos eucariontes (Hahn *et al.*, 2004). Observando que la región de la proteína con mayor conservación es el sitio activo (Onodera *et al.*, 2005).

El análisis estructural en la molécula de la ARN Pol II, se realizó en nueve de las once secuencias seleccionadas, como se muestra en las Figuras 2.5-2.6. Las dos secuencias restantes carecían de correlación, ya que, no se pudo ubicar similitud con las secuencias reportadas de la ARN Pol II, lo cual dificultó su análisis estructural y no permitió la predicción adecuada de su posición tridimensional en la estructura determinada. Las secuencias denominadas como AZYRO 1, 2 y 4 (posteriormente denominado AZYRO 3) fueron seleccionadas para la sintetizar los péptidos (Tabla 3.1), que se utilizaron para la producción de anticuerpos contra la ARN Pol IV y V. Este análisis fue posible con los programas RasMOL, MDLSP6 y CN3D 4.1 utilizando como base las alineaciones generadas con el programa ClustalW y también debido a que la molécula de la ARN Pol II se encuentra conservada en diferentes especies (Hahn *et al.*, 2004).

La propiedad de los anticuerpos de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como una herramienta para detectar y cuantificar niveles de expresión; determinar la localización de la expresión de los genes en los tejidos, e identificar las interacciones moleculares (Bruggemann *et al.*, 1989). Se pueden producir anticuerpos específicos al introducir un antígeno en el cuerpo de un mamífero. Los animales normalmente utilizados son conejos, cabras y ratones. Los anticuerpos creados como resultado de la inyección de una porción del antígeno son particulares solo para ese antígeno. La sangre aislada de este animal contiene anticuerpos policlonales (Delves, 2000).

Actualmente la técnica de despliegue en fagos, es una de las más utilizadas y bien establecidas para el desarrollo de anticuerpos, consiste en la expresión de proteínas, en particular anticuerpos o péptidos en la superficie de los fagos filamentosos. Las secuencias de ADN de interés, son insertadas en una parte en el genoma del fago filamentosos, lo cual origina como producto de fusión en una de las proteínas de la cápside del fago. Estas construcciones de bibliotecas proveen, unos repertorios de

anticuerpos con alta afinidad para un amplio número de antígenos (Barbas, 2001).

Los anticuerpos que se utilizaron para realizar la detección de la expresión de las ARN polimerasas IV y V, se obtuvieron de conejos inmunizados con los péptidos sintetizados a partir de las secuencias del cuadro 3.1; los cuales produjeron anticuerpos contra los péptidos denominados AZYRO 1, AZYRO 2 (péptidos diseñados a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol IV) y AZYRO 3 (péptido diseñado a partir de la secuencia de la subunidad 1 de la ARN Pol V).

Con la técnica de despliegue de anticuerpos en fagos filamentosos, se obtuvo una librería de anticuerpos específicos contra el péptido de la ARN polimerasa IV denominado Azyro 1, además de que se produjeron anticuerpos policlonales en los gallos inmunizados con los péptidos Azyro 1 y 2. Estos anticuerpos podrían ser utilizados posteriormente en ensayos de inmunodetección o purificación de esta proteína.

Con los anticuerpos policlonales generados en conejo, se detectó a la ARN pol IV y V en los diferentes tejidos de *O. sativa*, los resultados son concordantes con lo observado en *A. thaliana*, en donde se observó la expresión de las proteínas en todos los tejidos (Onodera *et al.*, 2005). La expresión de las ARN Pol IV y V en *A. thaliana* se encuentra principalmente en inflorescencia y raíz pero no en tallo como en *O. sativa*. Lo que sugiere que la función de silenciamiento que realizan las ARN Pol IV y V afectan a genes que se encuentran relacionados con el proceso de desarrollo floral.

Durante el proceso de la embriogénesis somática se ha detectado un incremento de la presencia de las ARN Pol IV y V particularmente a partir de los primeros quince días después de su inducción con 2,4-D. Sin embargo en los embriones cigóticos no se observó una concentración significativa de la presencia de estas proteínas. Estas diferencias en los patrones de expresión de las ARN polimerasas, sugiere que el silenciamiento génico llevado a cabo por las ARN Pol IV y V es necesario para el desarrollo del meristemo en los embriones somáticos, a su vez que en este proceso el 2,4-D podría estar afectando el mecanismo de silenciamiento.

Los estudios de inmunolocalización de ARN pol IV y V demostraron la expresión de estas proteínas en las zonas meristemáticas generadas. El patrón de marcas observadas en las células nucleadas de los embriones somáticos de *O. sativa*, se encuentran relacionadas con los datos conocidos en *A. thaliana* (Pontes *et al.*, 2009). Al encontrarse la presencia de las ARN

Pol IV y V en compartimentos nucleares, es posible que estas proteínas estén implicadas en la organización nuclear que la planta necesita en sus etapas de desarrollo.

## 6.2 PERSPECTIVAS

Los resultados del patrón de expresión de estas proteínas y los anticuerpos generados podrían ser de utilidad para posteriores análisis funcionales de las ARN Pol IV y V, no solo en *O. sativa* si no en otras monocotiledóneas. Aun más el sistema utilizado para la generación de epítopes útiles para la producción de anticuerpos al igual que las secuencias de estos para la subunidad dos pueden ser de gran utilidad para siguientes estudios.

Los mecanismos mediante los cuales, las ARN Pol IV y V se encuentran implicadas en la regulación génica todavía no se encuentran elucidadas. Una mejor comprensión sobre el silenciamiento génico y sus funciones en el desarrollo de las plantas y en la respuesta a estrés ambiental podrían sentar las bases de estrategias para el mejoramiento genético mediante la activación o inhibición de los genes.

Con respecto a los resultados obtenidos de la inducción de embriogénesis, lo consiguiente es establecer los diferentes estadios del desarrollo del embrión somático, hasta obtener plántulas regeneradas con este sistema.

### 6.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbas, C.F. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. D.R. Burton, J.M. Scott, G.J. Silverman (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapters 1-23.
- Bruggemann, M., H. M. Caskey, C. Teale, H. Waldmann, G. T. Williams, M. A. Suranim and M. S. Neuberger (1989). *A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 86, 6709-6713.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David and R. D. Kornberg (2000). *Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism*. Science, 28, 640-649.
- Delves, P. and I. M. Roitt (2000). *The immune system*. New England Journal of Medicine, 343(1), 37-49.
- Hahn, S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery*. Nature Structural and Molecular Biology, 11, 394-403.
- Onodera, Y., J. R. Haag, T. S. Ream, P. Costa, O. Pontes and C. S. Pikaard (2005). *Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation*. Cell, 120(5), 613-622.
- Pontes, O., N. Costa, P. Vithayathil, and C. S. Pikaard (2009). *RNA polymerase V functions in Arabidopsis interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway*. Molecular Plant, 2(4), 700-710.
- Ream, T. S., J. R. Hagg, A. T. Wierzbicki, C. D. Nicora, A. Norbeck, J. K. Zhu, G. Hagen, T. J. Guilfoyle, L. Pasa-Tolic, and C. S. Pikaard (2009). *Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes pol IV and pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II*. Molecular Cell, 33, 1-12.



## ANEXO I

### ARTICULO ACEPTADO EN ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY (12 de enero de 2012)

#### Expression of RNA polymerase IV and V in *Oryza sativa*

Leydi de Rocio Canche Moo<sup>1</sup>, Angela Ku Gonzalez<sup>1</sup>, Luis Carlos Rodríguez-Zapata<sup>2</sup>, Victor Suarez<sup>3</sup> and Enrique Castaño<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina. Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica Av. Itzáes entre 59 y 59 – A. C.P. 97000, Mérida Yucatán, México.

\*e-mail: Enriquec@cicy.mx.  
Phone number +999 9428330  
Fax number +999 9813900

Research supported by CONACYT grant number 56001

#### Abstract

RNA polymerase IV and V are principal players in the RdDM pathway, where their current study has shown the interaction of several factors that control DNA silencing of intergenic regions. DNA silencing is an important process during cell differentiation, nuclear structure and viral control. RNA pol IV and V are yet to be study in model monocot systems like *Oryza sativa* and can provide further data to define if the genetic silencing mechanism has diverged over time as compared to Dicots. Here we showed the expression pattern of these polymerases in *Oryza sativa*. Detectable amounts of these polymerases are found in specific adult plant tissues and particularly during somatic embryogenesis but not during the early stages of normal embryo development. Synthetic auxin leads to induction of both RNA

pol IV and V. Their nuclear localization which may be required for genome reorganization and gene silencing.

Keywords: RNA POL IV, RNA POL V, *Oriza sativa*, Somatic embryogenesis, zygotic embryogenesis

## Introduction

Gene silencing has become important in the field of research in recent years. During the last decade with the emerging view of the RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway (Herr et al. 2005; Law et al. 2010; Matzke et al. 2009). The study of RNA polymerase IV and V have become highlighted within the field of gene silencing. The complete mechanism remains unclear but it is known that generation and targeting of siRNAs requires RNA Polymerase IV (pol IV), which is proposed to generate single stranded RNA transcripts (Pikaard et al. 2008; Lahmy et al. 2010). These transcripts are then processed by RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 and DICER-LIKE 3 to produce a 24 nt siRNAs which are methylated on their 3' ends by HUA ENHANCER 1 (Li et al. 2005), followed by the union to ARGONAUTE 4 which is an effector protein for silencing (Law et al. 2010; Matzke et al. 2009; Duran-Figueroa et al. 2010; Olmedo-Monfil et al. 2010; Wierzbicki et al. 2009). In addition to siRNAs, RdDM is also associated with the presence of intergenic noncoding (IGN) RNA transcripts. The accumulation of IGN transcripts has been shown to depend on RNA polymerase V (Pol V) in *Arabidopsis thaliana* (Wierzbicki et al. 2008). These transcripts may act as scaffolds to recruit RdDM effector proteins, which in turn aid in the recruitment of DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 to loci that produce both siRNAs and IGN transcripts. Regardless of these advances in understanding the RdDM pathways there are many questions unsolved about the two plant specific RNA polymerases (Pol IV and Pol V) in particular during cell differentiation (Havecker et al. 2010; Olmedo-Monfil et al. 2010). Currently most of the research trying to understand the mechanism underlying these polymerases has been carried out in *Arabidopsis thaliana*. However, the study in other plant models like *Oryza sativa* remains largely uncharacterized. Monocots have long diverged and their main study has been in *Zea mays* where it already showed clues about how paramutation takes place (Pikaard et al. 2009). Our results show that high amounts pol IV are expressed in stem and pol V is expressed predominantly on inflorescence but surprisingly very low level of pol IV or V are expressed during zygotic embryogenesis, unlike that of somatic embryogenesis where large amounts are produced. Early somatic embryos show nuclear localization of both polymerases while older more developed tissue show that pol IV is found in the cytoplasm while RNA pol V maintains its nuclear pattern.

## Materials and methods

### Plant material.

Seeds from *Oryza sativa* var. *Filipina* were obtained from the commercial producer Arroz Covadonga, Champoton Campeche. Seeds sterilized with 70% ethanol for 5 min, followed by chlorine at 50% for 1 hour and 3 water washes. The seeds are incubated for the number of days for extraction. As previously published by Mariani *et al.*, 1998 the scutellum was obtained after the 3 day by dissecting the embryos and transferring it to an induction media EIM (sucrose 4%; MS Media 4.3 g/L; 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 2 mg/L<sup>-1</sup>) following incubations were carried out in the dark room for the number of days stated in the legends.

### Antibodies

Peptide sequence was selected for antibody production by comparing possible structure similarities between RNA pol II and V. Surface sequence highlighted the peptide sequence INPLCCDPFKGDFDGLHG (432-451) for RNA pol IV subunit I. For Pol V subunit I the unique sequence chosen was MAVRPNDSPSDVRPPFSQI (1-20). Polyclonal antibodies were raised in rabbit as published by Vaitukaitis *et al.*, 1971.

### Protein extraction

One gr of selected tissues from *Oryza sativa* were grinded in liquid nitrogen, followed maceration as previously published (Valadez-Gonzalez *et al.* 2007). Protein content was measured by Bradford and extracts were normalized by protein content.

### Western blot analysis

Equivalent amount of total proteins from the different tissues were separated on an 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Pall Corporation, USA). After 1 h of blocking with 5% non-fat milk in TBST (TBS, 0.1% Tween-20), the membrane was incubated with either anti-RNA pol IV or V as mentioned in the legends in TBST with 5% milk overnight at 4°C then washed with TBST. Immunoreactive bands were detected with anti-rabbit antibodies conjugated with HRP followed by AlkPhos direct labeling reagents (Amersham).

### RT-PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy plant mini kit (Qiagen). Reverse transcription reactions were performed using 2 µg of RNA, 200 U of M-MLV, 0.4 µM oligo dT primer and 2.5 µM dNTPs for 1 hour at 37°C.

The PCR reactions were performed with PIVF; GGT ATA TGG GAG AAC ATC ATT with PIVR; CCC ACT GCC TCC AAT ATG CAG for RNA pol IV subunit I and PVF; CTT GGA AGA GAA CTC CGT GCG with PVR; AGG AAC CTC CTC TGT AGG AAT for RNA pol V subunit 1 and primers 0.4 μM each, Taq platinum DNA polymerase 2.5 U (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, 200 nM each dNTP. Cycling conditions were 94°C 2 min 1 cycle; 94°C 30 sec, 45°C 30 sec and 72°C 1 min for the indicated number of cycles. The PCR products were separated on 1% agarose gel

### **Histology**

Samples representative somatic and zygotic embryos from all the stages were removed from culture and seeds respectively were fixed in a FAA: solution [formaldehyde (10%) ethanol (50%) and acetic acid glacial (5%)] for 48 h at room temperature, progressively dehydrated in an alcohol series, and infiltrated with paraffin (Kendall). Sections (5 μm) were cut using a Leica microtome and stained with a 0.5% (w/v) aqueous solution of Toluidine blue O (TBO) (Sigma) for examining cell reorganization. Some sections were directly observed without any staining. Sections were examined with a Axioplan microscope coupled to camera.

### **Immunofluorescence**

The Somatic embryos after 15 days of induction were fixed in tubes containing FAA with aspiration for 24 h. They were dehydrated through an ethyl alcohol series and embedded in paraffin (melting point 54–56 °C) with a graded series of tertiary butyl alcohol. The paraffin blocks were sectioned serially at 5 μm thickness using a microtome. Followed by deparaffinization with 4 washes with Histology grade Xylene for 2 min followed by removal of xylene with Absolute ethanol followed by 70% ethanol followed by water for 1 minute each. Somatic embryos and surrounding tissue were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min, respectively. After washes with PBST they were either incubated with anti-RNA pol IV or anti-RNA pol V. As secondary antibodies donkey anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 (Invitrogen), goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 647 (Invitrogen). After being washed for 30 min with PBST cells were mounted with moviol (DAPI-DABCO). Images were taken in confocal microscope (Leica TCS SP5 AOBSTANDEM).

### **Scanning electron microscopy**

Somatic and zygotic embryos were fixed in FAA solution and passed through increasing concentrations of ethanol (30%, 50%, 70%, 96%, 100% thrice [W/V]). The fixed embryos were dried in a Sandri-795 semi automatic critical point drying apparatus, mounted on stubs, coated with a 12 nm layer

of gold in a Denton vacuum Desk II sputer coater, and visualized using a scanning electron microscope JEOL (6360 LV, Japan).

## Results

The first subunit of pol IV from *Oryza sativa* has a distinct sequence at the amino terminus which is unique in the data base and was selected for antibody production. Western blots of both RNA polymerases subunits 1 were carried out. The highest pol IV amount was in esteem, while pol V expression was higher in the inflorescence tissue showing an additional band in inflorescence and esteem tissue. Protein expression correlated well with semi-quantitative RT-PCR (figure 1c and 1d). Somatic embryogenesis requires a high level of nuclear reorganization therefore we tested if pol IV or pol V increased after 2-4D as source of auxin induction. We evaluated up to 30 days after induction of the scutellum. Protein extracts were carried out at different times and large amounts of both polymerases were found as would be expected from chromosomal rearrangement particular after 15 days (figure 2d). We therefore decided to check if this was also the case when compared to zygotic embryos. We extracted embryos 0- 36 hours after hydration as seen in figure 3 which triplicate in size after 36 hours after hydration. Repeated western analysis showed a lack of expression of both RNA polymerase IV and V in any of the early stages of zygotic development (figure 3d). Immunolocalization of both polymerases was carried out in somatic embryo slides as seen in figure 4. Pol IV is mainly located in the nucleus of somatic embryos but not in the nucleus of somatic nucleated cells. Figure 4f and 4l shows pol V speckle pattern in the nucleus of cell types.

## Discussion

Pol IV and V are known to be key players in gene silencing either in RNAi production or IGS methylation. The observation that mutant pol IV cells had an alter nuclear esturcture led to their involment in DNA methylation. Their study in *A. thaliana* has shown particular exprestion in the root and inflorescence while our result are similar for inflorescence that suggest the need of gene silencing and proper nuclear structure at the early stages of gametogenesis, meristem formation and cell differentiation. 2,4-D is widely used as a synthetic auxin that can induce organogeneesi or somatic embryos (Mariani et al. 1998). The analisis of early somatic embryo provided a good source of tissue with large amount of cells that were in the processes of differentiation. Western blot data from figure 2 correlated well with immunolocalization seen in figure 4.

Our immunolocalization correlate well with the known data from immunolocalizations in *Arabidopsis* as well as with the western blot profile seen in figure 1. The speckle pattern observed from large nucleated cells of *Oryza* somatic embryos from RNA Pol IV (figure 4) are similar to that observed in *Arabidopsis* (Pontes et al. 2005) in particular in somatic embryos with large nuclear compartments where most of the silencing and chromosome reorganization need to take place. However, peripheral nucleated cells show a large nuclear exclusion of pol IV but not of pol V which always showed a nuclear pattern. Our tissue slides allowed cytoplasmic and tissues position of the cells, unlike previous nuclei extraction for immunolocalization (Pontes et al. 2005; He et al. 2009; Pontes et al. 2009) which may render higher resolution but lack the information from whole cells in the were is mainly in inflorescence and roots but not in esteem as in *Oryza sativa* tissue (Ondera et al. 2005; Havecker et al. 2010). Moreover, early stages of somatic embryos were used and tested for the expression of RNA pol IV and V. Expression increased during the formation of the somatic embryos as one would expect for nuclear reorganization in particular after the first stages. However to our surprise zygotic embryos did not showed any expression of either polymerase (figure 3). These are significant differences that may involve different cellular strategies to generate the new plants and how high levels of synthetic auxin hormones like 2-4D can affect the silencing machinery. It will be important in the future to define which regions of DNA required silencing during the reorganization during cell differentiation and how is the process control to generate of a new expression profiles.

**Acknowledgments** this research was supported by grants from the CONACYT grant number 56001 and also for the technical help of Fernando Contreras.

## References

Armache KJ, Mitterweger S, Meinhart A, Cramer P. (2005) Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25;280(8):7131-4. doi:10.1016/j.sbi.2005.03.002

Duran-Figueroa N, Vielle-Calzada JP. (2010) ARGONAUTE9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* 5:1476-1479. doi:10.4161/psb.5.11.13548

Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC. (2010) The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonauts functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell.* 22:321-334. doi:10.1105/tpc.109.072199

He XJ, Hsu YF, Zhu S, Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu HL, Wang CS, Jin H, Zhu JK. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell.*137:498-508. doi:10.1016/j.cell.2009.04.028

Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science.* Apr 1;308(5718):118-20. DOI: 10.1126/science.1106910

Lahmy S, Bies-Etheve N, Lagrange T. (2010) Plant-specific multisubunit RNA polymerase in gene silencing. *Epigenetics.* 5:4-8. doi.org/10.4161/epi.5.1.10435

Law JA, Ausin I, Johnson LM, Vashisht AA, Zhu JK, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE. (2010). A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Curr Biol.* 20:951-956. doi:10.1016/j.cub.2010.03.062

Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol.*15:1501-1507. doi:10.1016/j.cub.2005.07.029

Luo J, Hall BD. (2007), A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants. *J Mol Evol.* Jan;64(1):101-12. DOI: 10.1007/s00239-006-0093-z

Magyar Z., L. Bakó, L. Bogre, D. Dedeoglu, T. Kapros and D. Dudits (1993). Active cdc2 genes and cell cycle phase-specific cdc2-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant Journal* 4: 151-161. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.04010151.x

Mariani T. S., Miyake H., Esyanti R. R. and Takeoka Y. (1998). Changes in Surface Structure during Direct Somatic Embryogenesis in rice scutellum Observed by Scanning Electron Microscopy. *Plant Prod. Sci.* 1 (3): 223-231

Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B, Matzke AJ. (2009), RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol.* 21:367–376. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.025

Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimaneli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP. (2010), Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*. Mar 25;464(7288):628-32. doi:10.1038/nature08828

Pikaard CS, Tucker S. (2009), RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V in maize: more than one flavor? *PLoS Genet.* Nov;5(11). doi:10.1371/journal.pgen.1000736

Pikaard CS, Haag JR, Ream T, Wierzbicki AT. (2008), Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 13:390–397. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.008

Pontes O, Li CF, Nunes PC, Haag J, Ream T, Vitins A, Jacobsen SE, Pikaard CS. (2006), The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*. Jul 14;126(1):79-92. doi:10.1016/j.cell.2006.05.031

Pontes O, Costa-Nunes P, Vithayathil P, Pikaard CS. (2009), RNA polymerase V functions in *Arabidopsis* interphase heterochromatin organization independently of the 24-nt siRNA-directed DNA methylation pathway. *Mol Plant*. Jul;2(4):700-10. doi: 10.1093/mp/ssp006

Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT.(1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971 Dec;33(6):988-91. doi: 10.1210/jcem-33-6-988

Valadez-González, Juan G. Colli-Mull, Ligia Brito-Argáez, J. Armando Muñoz-Sánchez, José J. Zúñiga Aguilar, Enrique Castaño and S. M. Teresa Hernández-Sotomayor (2007) Differential Effect of Aluminum on DNA

Synthesis and CDKA Activity in Two *Coffea arabica* Cell Lines. *J. Plant Growth Regul.* 26:69–77. DOI: 10.1007/s00344-006-0039-0

Wierzbicki AT, Haag JR, Pikaard CS. (2008), Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell.*;135:635–648. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.035

Wierzbicki AT, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS. (2009), RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet.* 2009;41:630–634. doi: 10.1038/ng.365

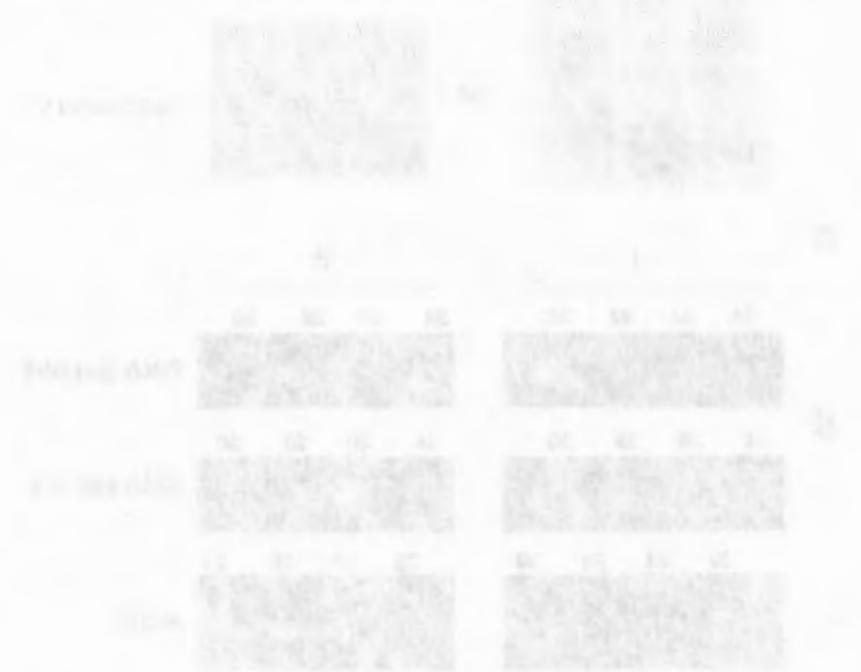
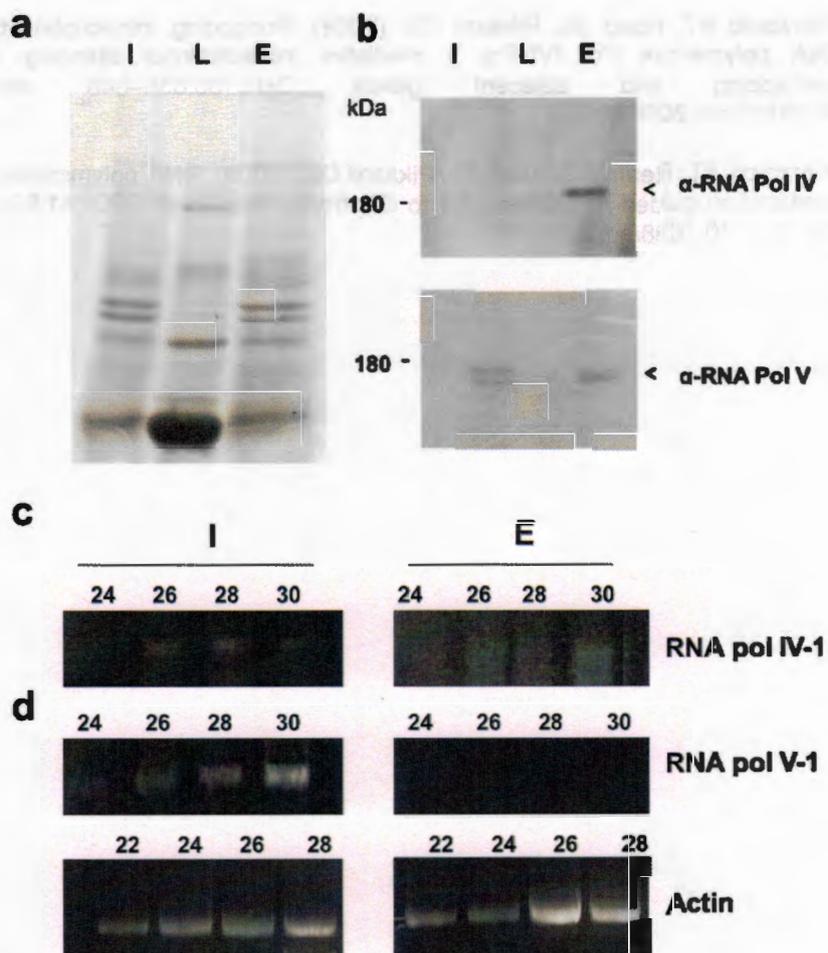
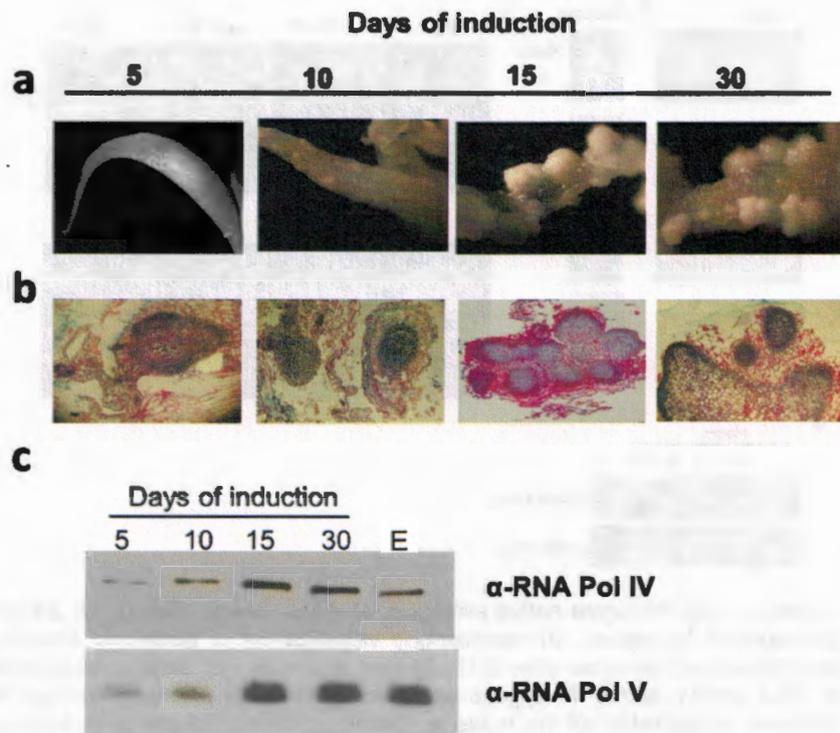


Figure 1. RNA levels of PINK1 and PINK2 in Arabidopsis thaliana. The figure shows a grid of 12 gel electrophoresis images. The top two rows show faint bands, while the bottom four rows show more prominent bands. Labels for genes like 'PINK1' and 'PINK2' are visible on the left side of the grid.

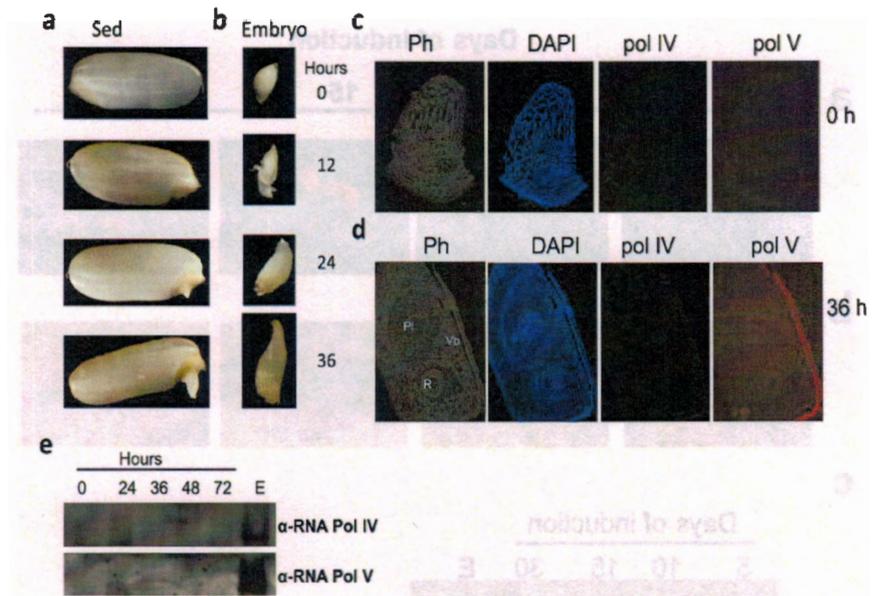
**Figure legends**



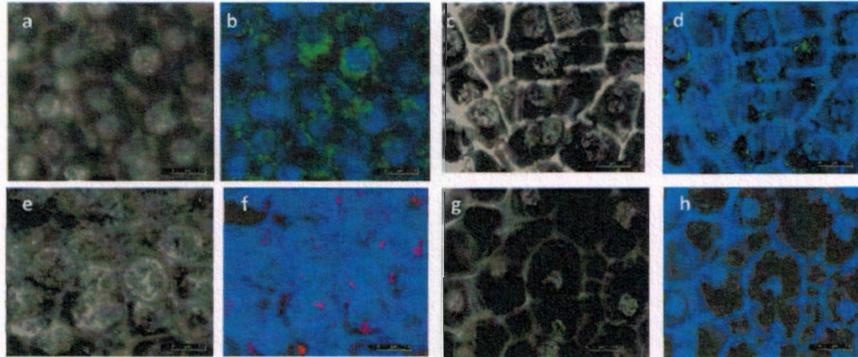
**Figure 1.** Tissue expression of RNA pol IV and V in *Oriza sativa*. a) Coomassie stain of protein extracts from adult plant tissues. Inflorescence (I), Leaf (L) and stem (E) b) Western blot from the same selected tissues. c) RT-PCR from tissues expressing (Inflorescence and esteem) RNA pol IV subunit 1 and d) for RT-PCR for RNA pol V subunit 1.



**Figure 2.** Somatic embryo induction in *Oriza sativa*. a) Stereoscopy visualization of the somatic embryos from 5, 10, 15 and 30 days respectively. b) Histological sections from somatic embryos from 5, 10, 15 and 30 days respectively. c). d) Western blot of the extracts from somatic embryos with anti RNA pol IV or anti RNA pol V for the written time period of the figure. Stem extract was used as control in lane E.



**Figure 3.** Zygotic *Oryza sativa* embryos, a) whole seeds after 0, 12, 24 and 36 hours of hydration. b) stereoscopy visualization of dissected embryos used for extract analysis after 0, 12, 24 and 36 hours. c) Immunolocalization of RNA pol IV and V in zygotic embryos of 0 hours showing contrast to enhance visualization of the nucleus. Localization of RNA pol IV in somatic embryos is shown in green and red label RNA pol V. d) Immunolocalization of RNA pol IV and V in zygotic embryos of 36 hours showing contrast to enhance visualization of the nucleus. Localization of RNA pol IV in somatic embryos is shown in green and red label RNA pol V. e) Western blot of the zygotic embryo extract from the written time period with either anti RNA pol IV or anti RNA pol V. Stem extract was used as control in lane E.



**Figure 4.** Immunolocalization of RNA pol IV and V. in somatic embryos a and c) Immunolocalization of RNA pol IV in somatic embryos showing contrast to enhance visualization of the nucleus, b and d) Localization of RNA pol IV in somatic embryos is shown in green over DAPI stain cells. Somatic nucleated cells either with visual contrast e and g or with red label RNA pol V over DAPI stain cells f and h.

