

142



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTRUCTURA Y EXPRESION DEL GENE DE LA TIMIDINA CINASA DE MAIZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO-BIOLOGO

P R E S E N T A

LUIS JIRO SUZURI HERNANDEZ



300212

MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

Jurado asignado:

Presidente	Dr Homero Hernández Montes
Vocal	Dr Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dr Javier Plasencia de la Parra
1er suplente	M. en C. Samuel Canizales Quinteros
2do suplente	Dr Francisco Ruíz Terán

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Conjunto "E", Depto. de Bioquímica,  
Facultad de Química, UNAM.



Asesor

Dr. Javier Plasencia de la Parra



Sustentante

Luis Jiro Suzuri Hernández

---

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Javier Plasencia de la Parra en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM

El trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT 3407-PN y PAIP 6290-08.

Luis Jiro Suzuri Hernández recibió beca para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) de julio de 2000 a diciembre de 2000 y de marzo de 2001 a agosto de 2001.

---

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>10</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>1. La semilla</b> .....	<b>16</b>
1.1 Estructura de la semilla .....	16
1.2. Reservas alimenticias de la semilla .....	17
<b>2. Germinación</b> .....	<b>19</b>
2.1. Imbibición de la semilla .....	20
2.2. Fuga de gases y solutos .....	21
2.3. Elongación radicular .....	21
2.4. Respiración durante la imbibición y la germinación .....	22
2.5. Síntesis de ATP y nucleótidos de piridina durante la germinación .....	23
2.6. Síntesis de proteínas durante la germinación .....	24
2.7. Síntesis de ARN y ribonucleósidos trifosfato durante la germinación .....	24
2.8. Síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y división celular durante la germinación .....	25
<b>3. Hormonas vegetales y su influencia sobre la germinación</b> .....	<b>27</b>
3.1. Auxinas .....	27
3.2 Citocininas .....	28
3.3. Giberelinas .....	30
3.4. Ácido abscísico .....	32
<b>4. Biosíntesis de nucleótidos trifosfato</b> .....	<b>35</b>
<b>5. Replicación del ADN</b> .....	<b>40</b>
5.1 Orígenes de replicación .....	40
5.2. Efectos de las pozas de nucleótidos sobre la replicación .....	42
5.3 Mecanismo de la replicación y proteínas participantes .....	44
5.4. Proteínas de replicación del ADN en plantas .....	47
<b>6. Regulación de la replicación del ADN</b> .....	<b>50</b>

<b>7. Timidina cinasa</b> .....	<b>51</b>
7.1. Propiedades de la timidina cinasa .....	52
7.2. Caracterización de la secuencia del gene de la timidina cinasa .....	54
7.3. Regulación transcripcional de la timidina cinasa.....	57
7.4. Regulación post-transcripcional de la timidina cinasa.....	59
7.5. Función biológica de la timidina cinasa .....	59
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>61</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>64</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>65</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>65</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>66</b>
<b>1. Preparación de ADN de plásmidos (MINIPREP)</b> .....	<b>66</b>
<b>2. Secuenciación del ADN plasmídico</b> .....	<b>67</b>
<b>3. Digestión del plásmido</b> .....	<b>67</b>
<b>4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa</b> .....	<b>67</b>
<b>5. Marcaje de la sonda de ADNc con [<sup>32</sup>P]-dCTP por la técnica de alineamiento de cebadores al azar</b> .....	<b>68</b>
<b>6. Estudios de expresión genética</b> .....	<b>68</b>
6.1. Desinfección y sembrado de ejes embrionarios. ....	68
6.2. Extracción de ARN total .....	69
6.3. Northern blot .....	70
6.4. Densitometría de las bandas.....	73
<b>7. Estudios del número de genes de la timidina cinasa en el genoma de maíz</b> .....	<b>73</b>
7.1. Extracción de ADN genómico.....	73
7.2. Cuantificación del ADN genómico .....	74
7.3. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción.....	74
7.4. Southern blot .....	75
<b>8. Escrutinio del banco genómico</b> .....	<b>76</b>
8.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> XL1-Blue MRA(P2) con OD <sub>600</sub> =0.5 .....	77
8.2. Titulación del banco genómico .....	78
8.3. Escrutinio del banco genómico.....	78

8.4. Transferencia del ADN a membranas de nylon .....	78
8.5. Hibridación .....	79
8.6. Lavados .....	80
8.7. Exposición y revelado de la película.....	80
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>81</b>
1. Secuenciación del ADNc correspondiente a la timidina cinasa.....	81
2. Análisis de la secuencia del ADNc de la timidina cinasa.....	83
3. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a la fitohormona ácido giberélico .....	91
4. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a la fitohormona benciladenina.....	93
5. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....	95
6. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de embriones de maíz expuestos a las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....	97
7. Análisis de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz.....	99
8. Análisis del número de copias del gene de la timidina cinasa presentes en el genoma de maíz.....	101
9. Escrutinio del banco genómico .....	102
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>104</b>
1. Análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la timidina cinasa de maíz..	104
2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la timidina cinasa de maíz.....	105
4. Análisis de la expresión de la timidina cinasa durante la germinación de ejes y embriones de maíz bajo la influencia de fitohormonas exógenas .....	111
5. Análisis de la expresión de la timidina cinasa en diferentes tejidos de una planta madura de maíz.....	114

6. Determinación del número de copias de la timidina cinasa en el genoma de maíz	115
7. Escrutinio de un banco genómico de maíz con el fin de aislar una clona de la timidina cinasa de maíz.....	115
PERSPECTIVAS.....	116
RESUMEN DE RESULTADOS.....	119
CONCLUSIONES.....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	121
APÉNDICE A.....	128
1. Medios.....	128
2. Soluciones.....	128
APÉNDICE B.....	130
1. Especificaciones de las enzimas de restricción.....	130
2. Genotipo de la cepa de <i>E.coli</i> XL1-Blue MRA (P2).....	131



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Estructura de la semilla de maíz .....	17
<b>Figura 2.</b> Patrón de absorción de agua durante la germinación.....	20
<b>Figura 3.</b> Patrón del consumo de O <sub>2</sub> durante la germinación. ....	23
<b>Figura 4.</b> Estructura química del ácido indolacético.....	27
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la adenina, la zeatina y la 6-bencilaminopurina .....	29
<b>Figura 6.</b> Estructura química de las giberelinas. ....	30
<b>Figura 7.</b> Estructura química del ácido abscísico.....	33
<b>Figura 8.</b> Estructura química de los nucleótidos.....	35
<b>Figura 9.</b> Ruta sintética del ADN.....	36
<b>Figura 10.</b> Síntesis de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos .....	37
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de la replicación y maduración de los cromosomas	42
<b>Figura 12.</b> Replicación del ADN.....	46
<b>Figura 13.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de TK1 de ratón, humano, hámster y pollo.....	53
<b>Figura 14.</b> Secuencias de los promotores de cuatro genes de TK.....	55
<b>Figura 15.</b> Estructura del gene de TK1 de humano. ....	56
<b>Figura 16.</b> Secuencia de la clona $\delta$ 42 obtenida por métodos manuales.....	62
<b>Figura 17.</b> Mapa de restricción del plásmido pUC19.. ....	63
<b>Figura 18.</b> Dispositivo de transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon. ....	71
<b>Figura 19.</b> Mapa de restricción del vector de reemplazo Lambda FIX® II.....	77
<b>Figura 20.</b> Secuencia del ADNc de la timidina cinasa contenido en la clona de <i>E. coli</i> $\delta$ 42 ....	81
<b>Figura 21.</b> Comparación de la secuencia de ADN de la clona $\delta$ 42 secuenciada por métodos manuales y por métodos automatizados .....	83
<b>Figura 22.</b> Secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia del ADNc de la clona $\delta$ 42.....	84
<b>Figura 23.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de la timidina cinasa reportadas para diferentes organismos .....	88
<b>Figura 24.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de la timidina cinasa reportadas para arroz, <i>A. thaliana</i> y maíz.....	90
<b>Figura 25.</b> Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios bajo la influencia del ácido giberélico .....	92
<b>Figura 26.</b> Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios bajo la influencia de benciladenina .....	94

---

<b>Figura 27.</b> Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios bajo la influencia de benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....	96
<b>Figura 28.</b> Expresión del transcrito de la timidina cinasa en embriones bajo la influencia de benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético .....	98
<b>Figura 29.</b> Expresión del transcrito de la timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz .....	100
<b>Figura 30.</b> Análisis del número de copias del gene de TK por Southern blot .....	102
<b>Figura 31.</b> Autorradiografía del cuarto escrutinio del banco genómico Lambda FIX@II .....	103

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Composición porcentual de los compuestos de reserva almacenados en los diferentes tejidos de la semilla de maíz (cv. Iowa 939).....	18
<b>Tabla 2.</b> Contenido endógeno de IAA en diferentes tejidos de algunas especies vegetales ..	28
<b>Tabla 3.</b> Contenido endógeno de citocininas en diferentes tejidos de algunas especies vegetales.....	30
<b>Tabla 4.</b> Contenido endógeno de giberelinas en diferentes tejidos de algunas especies vegetales .....	32
<b>Tabla 5.</b> Contenido endógeno de ácido abscísico en diferentes tejidos de algunas especies vegetales.....	34
<b>Tabla 6.</b> Proteínas involucradas en el control del ciclo celular en plantas .....	48
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de desnaturalización para muestras de ARN .....	71
<b>Tabla 8.</b> Composición de los amortiguadores de reacción para las enzimas de restricción empleadas.....	75
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de identidad de la timidina cinasa de maíz con respecto a las timidina cinasas de otras especies según el análisis por BLAST .....	89

---

**ABREVIATURAS**

A	Adenina (para el caso de ADN y/o ARN)
aa	Aminoácido
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Adenosina monofosfato
Ap <sup>r</sup>	Resistencia a la ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Benciladenina
bp	Pares de bases
C	Citosina (para el caso de ADN y/o ARN)
°C	Grado Celsius
2C	Contenido de ADN sin duplicar
4C	Contenido de ADN duplicado
CCRU	Unidad Reguladora dependiente del Ciclo Celular
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cod.	Codifica para
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citidina trifosfato
Cyc	Ciclina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Da	Dalton
dADP	Desoxiadenosina difosfato
dAMP	Desoxiadenosina monofosfato
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCDP	Desoxicitidina difosfato

---

dCMP	Desoxicitosina monofosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGDP	Desoxiguanosina difosfato
dGMP	Desoxiguanosina monofosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido
dTDP	Desoxitimidina difosfato
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUDP	Desoxiuridina difosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUrd	2'-desoxiuridina
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
E2F	Factor de transcripción E2F
EST	Secuencias expresadas ("Expressed Sequence Tags")
FEN-1	Nucleasa FEN-1
g	Gramos
G	Guanina (en el caso de ADN y/o ARN)
G <sub>0</sub>	Fase quiescente del ciclo celular
G <sub>1</sub>	Fase G <sub>1</sub> ("Gap 1") del ciclo celular
G <sub>2</sub>	Fase G <sub>2</sub> ("Gap 2") del ciclo celular
GA	Giberelina
GA <sub>1</sub>	Giberelina A <sub>1</sub>
GA <sub>3</sub>	Giberelina A <sub>3</sub> o ácido giberélico
GA <sub>4</sub>	Giberelina A <sub>4</sub>
GA <sub>5</sub>	Giberelina A <sub>5</sub>
GA <sub>8</sub>	Giberelina A <sub>8</sub>
GA <sub>9</sub>	Giberelina A <sub>9</sub>
GA <sub>19</sub>	Giberelina A <sub>19</sub>
GA <sub>20</sub>	Giberelina A <sub>20</sub>
GMP	Guanosina monofosfato
GTE	Amortiguador de glucosa, Tris-HCl, EDTA
GTP	Guanosina trifosfato

---

H2A	Histona H2A
HCl	Ácido clorhídrico
HDAC	Histona desacetilasa
IAA	Ácido indolacético
IMP	Inosina 5'-monofosfato
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
$K_m$	Constante de Michaelis y Menten
LB	Caldo Luria
Ltk	Fibroblastos de ratón sin actividad de timidina cinasa
M	Concentración molar
mg	Miligramo
Mg	Magnesio
$Mg^{2+}$	Ion magnesio
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propansulfónico
MS	Murashige y Skoog
n	Nucleótido
N	Concentración normal
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina
NF-Y	Factor de transcripción NF-Y
ng	Nanogramo
NaI	Yoduro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
NZYDT	Amortiguador NaCl, peptona, extracto de levadura, NaOH
$O_2$	Oxígeno molecular
$OD_{600}$	Densidad óptica a 600 nm
ORF	Marco abierto de lectura
1-P	1-fosfato

---

p16	Proteína supresora de tumores p16
p21	Proteína supresora de tumores p21
p107	Proteína de la familia pRb
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Nuclear
[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Desoxicitosina marcada con fósforo 32
pfu	Unidades formadoras de placas
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Fosfato inorgánico
PP1	Fosfatasa de proteínas tipo 1
PPi	Pirofosfato inorgánico
pRb	Proteína de Retinoblastoma
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
p/v	Peso en volumen
RFC	Factor de replicación C
rNDP	Ribonucleótido difosfato
rNMP	Ribonucleótido monofosfato
RPA	Proteína de replicación A
rpm	Revoluciones por minuto
S	Fase de síntesis de ADN del ciclo celular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SM	Amortiguador Tris-HCl, NaCl, MgSO <sub>4</sub> , gelatina
Sp1	Factor de transcripción Sp1
SSC	Citrato de sodio salino
T	Timina (en el caso de ADN y/o ARN)
TAE	Amortiguador Tris-HCl, ácido acético, EDTA
TE	Amortiguador Tris-HCl, EDTA
TK	Timidina cinasa
TK1	Timidina cinasa citosólica
TK2	Timidina cinasa mitocondrial
Thd	Timidina
TTP	Timidina trifosfato
U	Uracilo
UTP	Uridina trifosfato
3' UTR	Región 3' no traducida
5' UTR	Región 5' no traducida

---

UV	Radiación ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen en volumen
X	Veces concentrada
Yi1	Factor de transcripción Yi1
Yi2	Factor de transcripción Yi2
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
~	Aproximadamente
$\psi$	Potencial acuoso
$\psi_c$	Potencial de matrices
$\psi_p$	Potencial de presión
$\psi_\pi$	Potencial osmótico
<	Menor que
>	Mayor que



## INTRODUCCIÓN

### 1. La semilla

#### 1.1. Estructura de la semilla

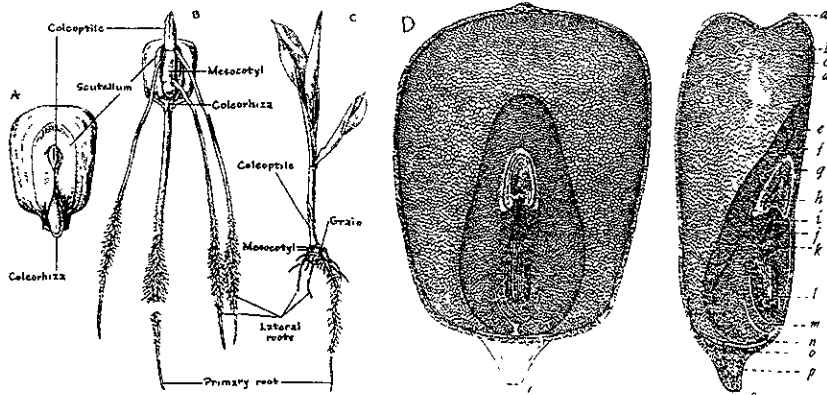
La semilla es una estructura vegetal donde ocurre el desarrollo parcial del embrión (Flores, 1999) y deriva de la doble fertilización del óvulo dentro del saco embrionario por núcleos masculinos provenientes del grano de polen (Street & Öpik, 1986). La semilla madura de las angiospermas consta de: **(1)** el *embrión*, **(2)** el *endospermo*; **(3)** el *perispermo* (remanente de la nucela) y; **(4)** la *cubierta seminal* o *testa* (Figura 1; Bewley & Black, 1994). La gran diversidad de tamaño, forma y estructura de las semillas responde al modo de dispersión particular de cada planta y a las condiciones que encontrará la semilla en el medio ambiente (Street & Öpik, 1986).

Los embriones de las diferentes especies vegetales son variables tanto en tamaño como en apariencia, pero de manera general, están formados por el *eje embrionario* y uno o más *cotiledones* (Meyer *et al.*, 1973). En el eje se distinguen tres estructuras, la *raíz embrionaria* (o radícula), el *hipocotilo*, estructura a la cual se une(n) el(los) cotiledón(es) y la *plúmula*, que contiene a las primeras hojas verdaderas. En el caso específico de las gramíneas, el único cotiledón presenta modificaciones estructurales y una reducción de tamaño para formar el *escutelo*, una estructura larga y vascularizada en el eje embrionario. Por su parte, el extremo basal del cotiledón forma el *coleoptilo* que cubre a la plúmula y, específicamente en el maíz (*Zea mays* L.) el hipocotilo forma el *mesocotilo* (tejido entre la base del coleoptilo y el punto de origen del escutelo; Bewley & Black, 1994 y Flores, 1999). Las semillas maduras casi siempre contienen un embrión metabólicamente inactivo, capaz de resistir condiciones ambientales adversas (Street & Öpik, 1986).

En la mayoría de las especies vegetales, el perispermo no logra desarrollarse y se absorbe durante la maduración del embrión, sin embargo, existen especies dentro de los géneros *Yucca* y *Coffea* (Street & Öpik, 1986 y Flores, 1999) en las que el perispermo representa el principal tejido de almacenamiento de reservas alimenticias. Por su parte, el endospermo (tejido resultante de la fusión entre una célula espermática y los núcleos polares de la célula central del saco embrionario) es un tejido formado por células atrofiadas debido al almacenamiento masivo de nutrientes durante el desarrollo de la planta; en las gramíneas constituye el principal tejido de almacenamiento. En su parte exterior se encuentra localizada

la *capa de aleurona*, formada por células que participan en la movilización de las reservas durante la germinación (Bewley & Black, 1994 y Flores, 1999)

La cubierta seminal (producto de uno o ambos tegumentos del rudimento seminal) tiene la función de proteger al embrión del medio ambiente, y se encuentra compuesta por una cutícula interna y una externa, impregnadas de ceras y grasas. En algunos casos, la cubierta seminal presenta grupos de células que contienen cristales de oxalato y/o carbonato de calcio, sílica y taninos, con el propósito de evitar el ataque por insectos; así como células secretoras de mucílago que permiten la adherencia al suelo. De manera importante, la testa participa en la entrada de agua a la semilla y en el intercambio de gases  $-O_2$  y  $CO_2$  durante la germinación (Bewley & Black, 1994 y Flores, 1999).



**Figura 1. Estructura de la semilla de maíz** (Neuffer *et al*, 1997 y Foster & Gifford, 1959) **1A, 1B y 1C.** Estructuras principales durante la germinación de una semilla de maíz y su transformación a planta. En la Figura **1D** se ilustra un corte longitudinal y lateral de una semilla de maíz, con las siguientes estructuras identificadas: **(a)** cicatriz; **(b)** pericarpo; **(c)** aleurona; **(d)** endospermo; **(e)** escutelo, **(f)** capa glandular del escutelo; **(g)** coleoptilo; **(h)** plúmula con tallo y hojas; **(i)** primer internodo; **(j)** raíz lateral seminal; **(k)** nodo escutelar; **(l)** raíz primaria; **(m)** coleoriza, **(n)** células basales conductoras del endospermo; **(o)** capa café de abscisión; **(p)** pedicelo.

## 1.2. Reservas alimenticias de la semilla

Las reservas nutritivas almacenadas pueden llegar a constituir el 85-90% del peso de la semilla, y su propósito es mantener el crecimiento de la plántula durante las primeras horas de la germinación. Los principales nutrientes almacenados en forma de compuestos insolubles durante la maduración de la semilla son carbohidratos, grasas, aceites, proteínas y, en menor

grado, vitaminas, coenzimas y minerales. Cabe destacar que generalmente las semillas carecen de clorofila (Street & Öpik, 1986 y Bewley & Black, 1994)

La localización de los diferentes nutrientes no es aleatoria, ya que se ha observado la distribución no uniforme de cierto tipo de compuestos en zonas específicas de la semilla e incluso dentro de un mismo tejido de reserva. Como ya se mencionó, los principales tejidos de almacenamiento son los cotiledones en el embrión y/o tejidos fuera del embrión como el endospermo y en menor grado el perispermo. En el caso del maíz, las reservas que se almacenan mayoritariamente en el endospermo, se componen de proteínas (10%), aceites (5%) y carbohidratos (80%; Bewley & Black, 1994). El almacenamiento diferencial de las reservas en la semilla de maíz se muestra en la tabla 1:

**Tabla 1. Composición porcentual de los compuestos de reserva almacenados en los diferentes tejidos de la semilla de maíz (cv. Iowa 939) <sup>a</sup>.**

<i>Tipo de reserva</i>	<i>Grano completo</i>	<i>Endospermo (Almidonoso y capa de aleurona)</i>	<i>Embrión</i>
Almidón	74	88	9
Aceite	4	<1	31
Proteína	8	7	19

<sup>a</sup> Bewley & Black (1994).

Las reservas de carbohidratos se encuentran en forma de almidón, hemicelulosas, amiloides y oligosacáridos de la serie de la rafinosa, principalmente. El almidón se encuentra en forma de amilosa y amilopectina dentro de corpúsculos subcelulares (llamados granos de almidón) de hasta 50  $\mu\text{m}$  de diámetro con una composición de 50-75% de amilopectina y 20-25% de amilosa. Asimismo, disacáridos como la sacarosa y los oligosacáridos de la serie de la rafinosa se encuentran presentes de manera importante tanto en el embrión como en los tejidos extraembrionarios de reserva (Street & Öpik, 1986 y Bewley & Black, 1994).

Los lípidos contenidos en la semilla son principalmente triacilgliceroles (los ácidos oleico y linoleico pueden llegar a constituir el 60% en peso del contenido total de lípidos de una semilla), y en menor proporción fosfolípidos, glicolípidos y esteroides. Los triacilgliceroles se almacenan en organelos subcelulares de 0.2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, pudiendo llegar a ocupar un volumen considerable de la célula (Street & Öpik, 1986 y Bewley & Black, 1994). En el caso particular de la semilla de maíz, la composición de lípidos comprende los ácidos grasos palmítico (12%), esteárico (2%), oleico (24%), linoleico (61%) y linolénico (<1%; Bewley & Black, 1994).

Las proteínas de reserva de las semillas se han agrupado en las siguientes categorías de acuerdo con su solubilidad: **(a) albúminas** (4% de la composición total de proteínas en semillas de maíz), solubles en agua y soluciones amortiguadoras diluidas con pH neutro; **(b) globulinas** (2% en maíz), insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas, **(c) glutelinas** (39% en semillas de maíz), solubles en soluciones de carácter ácido o alcalino diluidas y, **(d) prolaminas** (55% en semillas de maíz), solubles en soluciones de alcohol al 70-90% (v/v). Dichas proteínas se encuentran encerradas en cuerpos proteicos (con diámetros desde 0.1 hasta 25  $\mu\text{m}$ ) y en raras ocasiones se encuentran en forma de cristales o globoides – estructuras globulares dentro de los cuerpos proteicos- (Bewley & Black, 1994 y Street & Opik, 1986).

Además de las proteínas de reserva, en los globoides se concentra la fitina –sales de potasio, magnesio y calcio del ácido fítico (ácido *myo*-inositol hexafosfónico)- y enzimas proteolíticas que participan en la autodegradación de estos corpúsculos. Otros elementos traza que pueden detectarse en las semillas son hierro, cobre, manganeso y sodio (Bewley & Black, 1994).

Por último, en muy pequeñas cantidades se encuentran presentes en la semilla compuestos alcaloides, fitoesteroides, aminoácidos no proteicos que sirven como fuente de nitrógeno durante y después de la germinación, glucósidos y compuestos fenólicos (Bewley & Black 1994, Street & Opik, 1986).

## 2. Germinación

La germinación es un proceso que comienza con la introducción de agua a la semilla, involucra cambios estructurales a nivel subcelular así como activación del metabolismo (respiración celular, síntesis de macromoléculas y actividad enzimática) y culmina con la elongación del eje embrionario (Bewley & Black, 1994, Street & Opik, 1986 y Milthorpe & Moorby, 1974), transformando al embrión heterotrófico en un complejo organismo autotrófico (Georgieva *et al.*, 1994). En el proceso germinativo del maíz, la elongación de la radícula del eje embrionario atraviesa la coleoriza y la testa, para formar la raíz primaria. El escutelo permanece dentro de la semilla y media el transporte de nutrientes entre el endospermo y el eje embrionario en desarrollo. Después de la protrusión de la radícula, la plúmula y el coleoptilo atraviesan la testa estimulados por la elongación de los tejidos adyacentes a la plúmula; una vez que el coleoptilo sale a la superficie, comienza el crecimiento de la primera hoja verdadera (Meyer *et al.*, 1973).

## 2.1. Imbibición de la semilla

La entrada de agua a la semilla ocurre de manera trifásica y los factores que intervienen directamente en este fenómeno son: el potencial acuoso de la semilla y el del medio de germinación ( $\psi$ ). Este último comprende a los potenciales osmótico (debido a la concentración de solutos dentro de la célula,  $\psi_s$ ), el de matrices (debido a la capacidad de unión de agua a la pared celular, al almidón y a los cuerpos proteicos,  $\psi_c$ ) y de presión (debido a la presión interna ejercida sobre la pared celular por la entrada de agua a la célula,  $\psi_p$ ). También intervienen la conductividad hidráulica del medio, el contacto entre la semilla y el medio circundante, y la permeabilidad de la semilla al agua (Bewley & Black, 1994).

En la primera fase de la imbibición, la velocidad de toma de agua exhibe un comportamiento logarítmico y marca el reinicio del metabolismo del embrión. Por su parte, durante la fase II comienzan los procesos bioquímicos que conducen a la penetración del endospermo por la radícula y culmina en el instante en que se detectan los primeros signos de la emergencia de la radícula. A diferencia de la fase I, la fase II presenta un comportamiento estacionario debido a una disminución en la velocidad de entrada de líquido. La transición entre las fases II y III marca el fin de la germinación. Durante la última fase se observa un incremento logarítmico en la velocidad de introducción de agua a la semilla debido a los cambios que sufren las células de la radícula mientras se expanden. La duración de cada fase depende de las propiedades de la semilla (permeabilidad de la testa, tamaño de la semilla y consumo de oxígeno, entre otras), y de las condiciones de hidratación (temperatura, humedad y composición del medio; Bewley & Black, 1994).

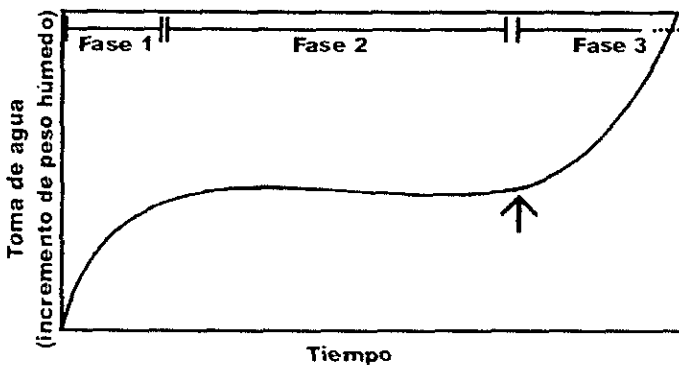


Figura 2. Patrón de absorción de agua durante la germinación. La flecha indica el momento de la protrusión de la radícula (Bewley & Black, 1994)

Una de las principales limitantes a la entrada de agua es la permeabilidad de la cubierta seminal, cuando el agua comienza a entrar a la semilla, la fuerza de imbibición puede romper la testa, eliminando la restricción a la entrada de agua. Por otro lado, también es frecuente que la presión de turgencia de la expansión de los tejidos y/o la elongación de la radícula sean los responsables de la ruptura de la testa (Meyer *et al.*, 1973). Cabe mencionar que así como la testa restringe la entrada de agua, también protege a las células de la posible ruptura de membranas por la súbita entrada de agua y de la fuga de solutos (Street & Öpik, 1986).

## 2.2. Fuga de gases y solutos

Dos eventos que ocurren de manera simultánea a la introducción de agua son la liberación de gases adsorbidos y la fuga de solutos (azúcares, ácidos orgánicos, electrolitos y proteínas) al medio circundante. La pérdida de líquidos que experimenta la semilla durante su maduración hace que los fosfolípidos de la membrana celular adquieran una conformación de gel rígido, por lo que al momento de iniciarse la hidratación, sufren una transición entre el estado semejante a un gel y un estado cristalino líquido; es durante esta transición de fase que se produce la salida de solutos. Para disminuir la fuga de sustancias, la semilla posee sacarosa, oligosacáridos de la serie de la rafinosa y proteínas en la membrana, que reducen en cierta medida la formación del estado de gel (Bewley & Black, 1994 y Street & Öpik, 1986).

## 2.3. Elongación radicular

La penetración de la delgada capa de endospermo por parte de la radícula se produce por la expansión de las paredes celulares conforme se hidratan y no se debe a procesos de división celular. La extensión radicular ocurre en dos fases al término de las cuales se observa mitosis y el consecuente incremento en el número de células en la zona apical de la radícula. Se han propuesto tres fenómenos que soportan el inicio del crecimiento radicular: (a) acumulación intracelular de solutos que aumenta la entrada de agua y conduce a un incremento en la presión de turgencia que a su vez expande las paredes celulares; (b) relajación de las paredes celulares de la radícula que facilita la expansión de ésta y/o; (c) debilitamiento de los tejidos que rodean el extremo radicular. Este debilitamiento puede deberse al incremento mediado por giberelinas en la actividad de enzimas hidrolíticas de galacto-(gluco)-mananas (e.g. endo- $\beta$ -mananasa, manohidrolasa y  $\alpha$ -galactosidasa) que

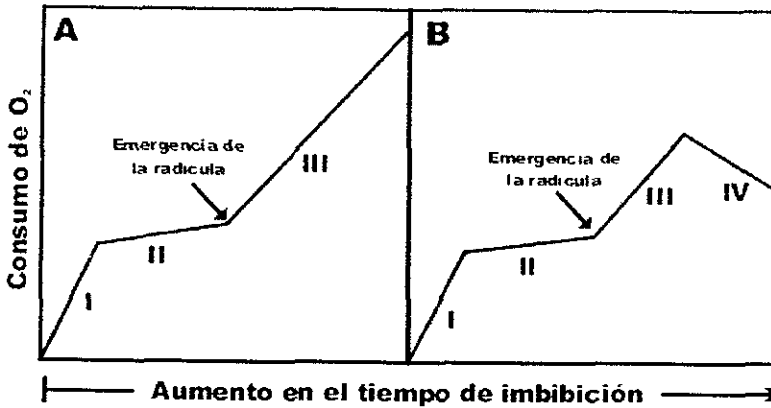
conforman parte importante de la pared celular del endospermo (Bewley & Black, 1994 y Karssen, 1995)

#### 2.4. Respiración durante la imbibición y la germinación

Durante la imbibición, son tres las rutas catabólicas activas la *glicólisis*, la *vía de las pentosas-fosfato* y *el ciclo del ácido cítrico*. Como ya se mencionó con anterioridad, un embrión seco se encuentra en un estado metabólicamente inactivo, pero al entrar en contacto con el agua y comenzar la imbibición de los tejidos, también da principio la respiración celular (Bewley & Black, 1994)

La respiración celular durante la imbibición y la germinación se ha clasificado en cuatro fases (Figura 3): la primera fase se caracteriza por un notable aumento en el consumo de  $O_2$ , asociado a la activación e hidratación de las enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo del ácido cítrico y en la fosforilación oxidativa (Bewley & Black, 1994). Es en esta etapa inicial que las mitocondrias aumentan su número de crestas, incrementando así su eficiencia respiratoria (Street & Öpik, 1986); durante la etapa II, la restricción que impone la testa a la entrada de  $O_2$  y el nulo aumento en el número de mitocondrias estabiliza su consumo por el embrión. Asimismo, se ha propuesto que la activación de la vía glicolítica antes de que las mitocondrias alcancen su completo desarrollo conduce a la acumulación de piruvato que, al no ser catabolizado por las mitocondrias inmaduras, se convierte en lactato, etanol y  $CO_2$  vía fermentación, disminuyendo el consumo de  $O_2$  con respecto a la fase I (Bewley & Black, 1994 y Meyer *et al.*, 1973); en la fase III, se vuelve a registrar un aumento en el consumo de  $O_2$  ocasionado por el aumento en el número de mitocondrias y, la última fase, ocurre en los tejidos de almacenamiento y coincide con su senescencia (Bewley & Black, 1994).

Los sustratos para la respiración celular derivan de la hidrólisis de las reservas nutritivas, principalmente triacilgliceroles y almidón (Bewley & Black, 1994).



**Figura 3. Patrón del consumo de  $O_2$  durante la germinación.** (A) Consumo de  $O_2$  en el embrión; (B) consumo de  $O_2$  en los tejidos de reserva (Bewley & Black, 1994)

### 2.5. Síntesis de ATP y nucleótidos de piridina durante la germinación

A pesar de las deficiencias estructurales y funcionales de las mitocondrias en los embriones, la fosforilación oxidativa es la principal fuente de ATP. Consecuentemente, conforme transcurre la germinación, la fosforilación oxidativa aumenta, producto del incremento en la eficiencia de las mitocondrias existentes y de la síntesis de nuevas mitocondrias; este aumento en la oxidación de sustratos se refleja en el aumento en la concentración de ATP en la semilla inmediatamente después de comenzar la entrada de agua. De manera paralela al consumo de  $O_2$ , la síntesis de ATP se mantiene constante durante la fase II de la respiración. A pesar de que no es posible registrar un aumento en la cantidad de ATP, esto no significa que no se sintetice ATP, sino más bien que se establece un equilibrio entre la síntesis y el consumo de esta molécula (Bewley & Black, 1994 y Castroviejo *et al.*, 1979)

Simultáneamente a la activación de las mitocondrias y de la fosforilación oxidativa, aumenta la síntesis de nucleótidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) -necesarios para la oxidación de la glucosa, las reacciones de aminación, la síntesis de desoxinucleótidos y el catabolismo de lípidos- mediante la vía de las pentosas fosfato (Bewley & Black, 1994)



## 2.6. Síntesis de proteínas durante la germinación

A partir de semillas secas ha sido posible aislar ribosomas, ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), factores de inicio y elongación, aminoácidos, aminoacil ARNt sintetetas y ARN polimerasas I, II y III en cantidades suficientes y en estados apropiados para efectuar la síntesis de proteínas. No es de extrañar entonces que la síntesis de proteínas comience de manera casi simultánea a la imbibición de la semilla. En embriones de trigo, se ha reportado la activación de la maquinaria de síntesis de proteínas a los 30 minutos de iniciada la imbibición (Castroviejo *et al.*, 1979). Algunos ARNm se conservan íntegros en el embrión con el propósito de iniciar la síntesis de proteínas de manera inmediata, sin que sea necesario esperar que de principio la transcripción de nuevo ARNm. A pesar de la existencia de ribosomas intactos en semillas secas, los polisomas se encuentran ausentes y su número se incrementa (acompañado de la consecuente disminución del número de ribosomas libres) en cuanto la célula se hidrata (Bewley & Black, 1994 y Street & Ôpik, 1986).

El ARNm presente en la semilla seca puede clasificarse en dos categorías: ARNm residual que no se utiliza para la síntesis de proteínas durante la germinación y que se degrada en cuanto comienza la imbibición, y el ARNm almacenado y conservado en óptimas condiciones, que por ende puede ser traducido en cuanto comience la germinación; este tipo de ARNm puede subcategorizarse en ARNm que codifica para enzimas del metabolismo intermediario y ARNm que codifica para proteínas esenciales para la germinación *per se*. Para su conservación, los transcritos en óptimo estado se almacenan en su forma poliadenilada dentro del núcleo durante la maduración de la semilla o se acumulan en ribonucleoproteínas mensajeras, en donde el ARNm se asocia fuertemente a proteínas que lo protegen de la degradación (Bewley & Black, 1994).

A pesar de la independencia de la síntesis de proteínas con respecto a la síntesis de ARNm durante los primeros minutos de la germinación, la conclusión con éxito de la germinación sí depende de la síntesis de nuevos transcritos (Bewley & Black, 1994).

## 2.7. Síntesis de ARN y ribonucleósidos trifosfato durante la germinación

La síntesis *de novo* de ARNm comienza en un periodo de 30 a 90 minutos después de la entrada de agua y suple al ARNm, previamente almacenado, consumido por la síntesis acelerada de proteínas durante los primeros minutos de la germinación. Estudios previos han detectado diferencias cualitativas entre el ARNm almacenado durante la maduración de la

semilla y el ARNm sintetizado *de novo* durante la germinación (Bewley & Black, 1994, Street & Opik, 1986, Castroviejo *et al.*, 1979 y Sánchez-Martínez *et al.*, 1986)

En lo que respecta al ARNr y al ARNt, su síntesis se ha detectado en tiempos tan tempranos como los registrados para el ARNm. Inmediatamente después de su síntesis, el ARNr se incorpora a los ribosomas (Bewley & Black, 1994)

A pesar de que se ha observado un aumento en la actividad de ARN polimerasas durante la germinación, estudios en embriones de trigo, centeno y soya parecen indicar que los embriones poseen una cantidad suficiente de ARN polimerasas para mantener la transcripción durante todo el tiempo que dure la germinación (Bewley & Black, 1994).

Los precursores del ARN (adenosina trifosfato, ATP, citidina trifosfato, CTP, guanosina trifosfato, GTP y uridina trifosfato, UTP) se encuentran en muy pequeñas cantidades en el embrión de trigo, pero se incrementan rápidamente al comenzar la germinación, aunque la síntesis de los ribonucleósidos trifosfato UTP y CTP es más lenta y su aumento se registra a las 3 y 5.5 horas, respectivamente (Bewley & Black, 1994)

## **2.8. Síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y división celular durante la germinación**

Durante la maduración de la semilla, la mayor parte de las células embrionarias sufren un bloqueo en la fase  $G_1$  del ciclo celular (denominada fase  $G_0$ ); este fenómeno se ha reportado también en células de mamífero previo al inicio del programa de diferenciación y se ha demostrado que las células en el estadio  $G_1/G_0$  son capaces de mantenerse viables por largos periodos de tiempo (Georgieva *et al.*, 1994).

El crecimiento de la radícula dentro de la semilla se debe a la elongación de las células radiculares, mientras que la protrusión de ésta puede deberse además a la división celular (Bewley & Black, 1994). A pesar de que en el embrión seco de maíz se ha reportado la existencia de células cuyo contenido de ADN ya se ha duplicado (estado 4C o fase  $G_2$  del ciclo celular), la replicación del ADN es un requisito indispensable previo a la primera división celular debido a la presencia de células que aún no han duplicado su material genético (estado 2C o fase  $G_1$  del ciclo celular). Hasta el momento no existe ningún reporte de plantas cuya población celular embrionaria haya duplicado su ADN antes de la germinación (Bewley & Black, 1994 y Flores, 1999).

Durante las primeras horas de la germinación, la mayoría de las células del embrión (75%) se encuentran en la fase  $G_1$  y, no es sino hasta las 12 a 15 horas de iniciada la germinación, que comienza la replicación del ADN (fase S del ciclo celular, Coello *et al.*,

1992). Las primeras 4 horas de la germinación se caracterizan por un notable incremento en el número de células en G<sub>1</sub> y una disminución equivalente en la proporción de células en la fase S, por lo que se cree que este intervalo de tiempo constituye un periodo de sincronización en G<sub>1</sub>. Una posible función de este fenómeno es proteger al embrión, ya que se ha demostrado que la prolongación la fase G<sub>1</sub> confiere al embrión resistencia al estrés (Georgieva *et al.*, 1994 y Fransolet *et al.*, 1979)

La síntesis de ADN se lleva a cabo en dos etapas; en la primera, que ocurre unas cuantas horas después de iniciada la entrada de agua, se observa incorporación de timidina marcada al ADN, pero no se incrementa la cantidad neta de éste. Esta etapa tiene como propósito reparar cualquier daño que presente el ADN debido al secado y la rehidratación de la semilla, además de que la mayor parte de la timidina incorporada en este etapa se destina a la síntesis de ADN mitocondrial. Inmediatamente después de concluida la germinación, se vuelve a incorporar timidina y aumenta el contenido de ADN. Esta segunda fase se asocia a la mitosis de las células de la zona apical de la radícula (Bewley & Black, 1994 y Georgieva *et al.*, 1994).

La entrada de timidina al embrión no es un fenómeno pasivo, sino que depende de un sistema de transporte de timidina que se establece durante las primeras horas de la germinación (Castroviejo *et al.*, 1979)

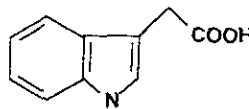
Se ha demostrado la presencia de la enzima timidina cinasa (enzima que cataliza la fosforilación dependiente de ATP de la timidina para convertirla en timidina 5'-monofosfato, TK) en semilla seca, asimismo, la presencia de esta enzima en la semilla seca sería justificada por la necesidad de incorporación de timidina monofosfato al ADN para su reparación en las primeras horas de la germinación y de manera independiente del inicio de la síntesis de proteínas. El aumento en la actividad de la TK entre las 12 y las 30 horas de la germinación resulta un marcador del inicio y el fin de la fase S de la mayoría de las células. Cabe mencionar que entre las 12 y las 24 horas de germinación se observa un aumento dramático en la síntesis de histonas (proteína indispensable para el empaquetamiento del ADN en nucleosomas) y que el máximo en la actividad de la TK coincide con un máximo en la cantidad de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular), una proteína asociada a la replicación del ADN. Este conjunto de evidencias sugiere que la mayoría de las células empiezan y concluyen el ciclo celular durante las primeras 72 horas de germinación (Bewley & Black, 1994 y Georgieva *et al.*, 1994)

### 3. Hormonas vegetales y su influencia sobre la germinación

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos que en muy bajas concentraciones participan en la regulación de procesos fisiológicos como la división y la elongación celular, la acumulación de reservas nutritivas y el desarrollo de tejidos extraseminales, entre otros (Flores, 1999, Hopkins, 1995 y Crozier *et al.*, 2000). En los siguientes apartados se presenta una descripción de cuatro de estas fitohormonas y su función en la germinación de semillas.

#### 3.1. Auxinas

Las auxinas son compuestos sintetizados por la planta a partir del aminoácido triptofano, la principal auxina a nivel fisiológico es el ácido indolacético (IAA), que se produce principalmente en los *primordia* de las hojas, hojas jóvenes y semillas en desarrollo (Raven *et al.*, 1992 y Bewley & Black, 1994).



**Figura 4. Estructura química del ácido indolacético (Raven *et al.*, 1992)**

La forma activa de esta hormona es el IAA libre, pero también se puede encontrar en forma conjugada como en el arabinósido de IAA, *myo*-inositol IAA, arabinósido de *myo*-inositol IAA, que se especula sean precursores del IAA transportados al extremo del coleoptilo del embrión en crecimiento durante la germinación (Bewley & Black, 1994 y Crozier *et al.*, 2000).

Entre los muchos efectos biológicos atribuidos a las auxinas, se ha reportado la inducción de la diferenciación de tejido vascularizado en el escutelo, coleoptilo y la primera hoja foliosa durante la germinación, sobre este tema, se ha observado que, en algunas especies como frijol (*Phaseolus vulgaris*), la diferenciación viene precedida por la división celular, mientras que en otras especies (e.g. *Zinnia elegans*) no se registra proliferación antes de la diferenciación (Flores, 1999 y Raven *et al.*, 1992) Por otro lado, la aplicación de un exceso de auxinas a raíces en crecimiento inhibe dicho proceso (Raven *et al.*, 1992). Cabe destacar que no se ha demostrado que el IAA participe directamente en la germinación o en la protrusión radicular (Bewley & Black, 1994, Hopkins, 1995 y Crozier *et al.*, 2000).

Recientemente, se encontró que la concentración fisiológica de IAA es indispensable para mantener los niveles normales de otro grupo de fitohormonas como las giberelinas. La

acción conjunta de las auxinas y las giberelinas estimula la elongación de los tallos (Ross, 2001). Estudios en varias especies vegetales demuestran que los niveles de auxinas pueden variar en casi dos órdenes de magnitud dependiendo del tejido (Tabla 2)

**Tabla 2. Contenido endógeno de IAA en diferentes tejidos de algunas especies vegetales<sup>b</sup>.**

<i>Especie vegetal</i>	<i>Tejido</i>	<i>Auxina</i>	<i>Concentración (ng/g de tejido fresco)</i>
<i>Zea mays</i> (maíz) (en condiciones no estériles)	Estelo* de la raíz	IAA	53
	Corteza de la raíz	IAA	5
	Extremos radiculares (5-7 mm)	IAA	29
	0-0.5 mm del extremo radicular	IAA	350
	0.5-1.0 mm del extremo radicular	IAA	180
	1.0-4.0 mm del extremo radicular	IAA	80
	4.0-10.0 mm del extremo radicular	IAA	115
	Tallos jóvenes crecidos en la oscuridad por 5 días	Ésteres de IAA	< 24 330
<i>Zea mays</i> (maíz) (en condiciones estériles)	5-15 cm de raíz primaria	IAA	94
<i>Ricinus communis</i>	Savia del xilema radicular	IAA	3.3
	Savia del floema	IAA	40
<i>Avena</i> sp	Tallos jóvenes crecidos en la oscuridad por 5 días	IAA	< 16
		Ésteres de IAA	Muy poco
<i>Pinus radiata</i>	Extremo de tallos jóvenes	IAA	---
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Tallos jóvenes sin hojas	IAA	720

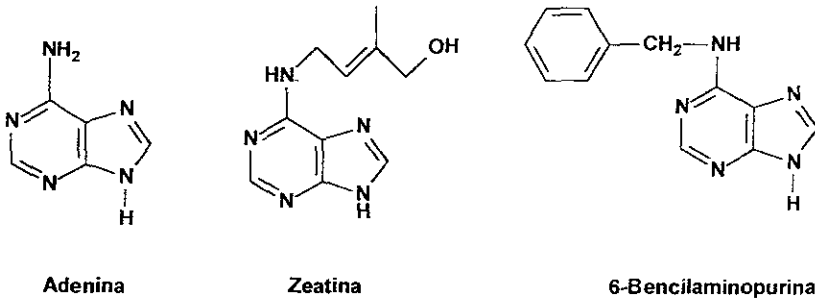
<sup>a</sup> Modificado de Goodwin (1978)

\* Tejido central de la raíz rodeado por la corteza radicular que comprende el periciclo, el tejido no vascular entre el floema y la corteza, y los tejidos vasculares (Fahn, 1975).

### 3.2. Citocininas

La primer citocinina identificada como tal fue la zeatina, que se aisló a partir de semillas de maíz. Las citocininas son compuestos derivados de la N<sup>6</sup>-adenina y se encuentran,

principalmente, en tejidos mitóticamente activos semillas, frutos, hojas y raíces. En la planta madura, estas hormonas se sintetizan en las puntas de las raíces y se transportan al resto de los tejidos de la planta. La citocininas que se han caracterizado en semillas inmaduras son adeninas sustituidas como la isopentenil-adenina, derivados glicosilados con ribosa (e.g. ribosil zeatina e isopentenil adenosina), glucosa (glucósido de zeatina) o ambos azúcares (glucósido de ribosil zeatina; Raven *et al.*, 1992 y Bewley & Black, 1994)



**Figura 5. Estructura química de la adenina, la zeatina y la 6-bencilaminopurina (citocinina sintética; Raven *et al.*, 1992)**

La estimulación de la división celular y de la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) son dos de los efectos biológicos de las citocininas. Estudios de Reyes y colaboradores (1991) demostraron que la adición de una citocinina sintética, la benciladenina (BA) tiene los siguientes efectos: **(a)** adelanta el inicio de la replicación del ADN durante la germinación de semillas de maíz, en comparación con semillas control que inician la síntesis de ADN a las 15 horas de germinación, **(b)** estimula la actividad enzimática de la ADN polimerasa nuclear durante la germinación y; **(c)** aumenta el número de cuerpos mitóticos a las 15 y principalmente a las 24 horas de la germinación, lo que indica que se adelanta la división celular (Reyes *et al.*, 1991 y Bewley & Black, 1994)

Los niveles endógenos de citocininas (Tabla 3) que se encuentran en los tejidos vegetales son por lo general menores a los correspondientes a las auxinas

**Tabla 3. Contenido endógeno de citocininas en diferentes tejidos de algunas especies vegetales<sup>c</sup>.**

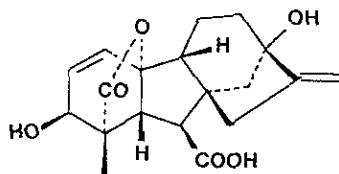
<i>Especie vegetal</i>	<i>Tejido</i>	<i>Citocinina</i>	<i>Concentración (ng/g de tejido fresco)</i>
<i>Chicorium intybus</i> (achicoria)	---	Ribósido de zeatina	8
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Savia de la raíz	Ribósido de zeatina	0.1
		Zeatina	0.3
		Dihidrozeatina	0.5
<i>Helianthus annuus</i>	Hojas	Zeatina	5-9
<i>Populus robusta</i>	Hojas	Ribósido de hidroxibenziladenina	100
<i>Picea sitchensis</i>	Hojas jóvenes	Ribósido de zeatina	9

<sup>c</sup> Modificado de Goodwin (1978)

\* BA, Benziladenina

### 3.3. Giberelinas

Las giberelinas son compuestos sintetizados a partir del ácido mevalónico en tejidos jóvenes de la plántula y semillas en desarrollo. La giberelina más importante en plantas es GA<sub>1</sub>, ya que ha demostrado la mayor actividad biológica, sin embargo, hasta el momento se han aislado e identificado más de 78 giberelinas, además de formas conjugadas – glucopiranosídeos y ésteres glucopiranosílicos- (Raven *et al.*, 1992, Hopkins, 1995 y Bewley & Black, 1994)



**Figura 6. Estructura química de las giberelinas.** GA<sub>3</sub> (ácido giberélico; giberelina producida por el hongo *Gibberella fujikuroi*, la giberelina más activa en ensayos biológicos, Crozier *et al.*, 2000)

En semillas inmaduras se ha detectado una alta concentración de giberelinas, aunque pareciera ser que esta concentración es irrelevante para el desarrollo posterior de la semilla (Karssen, 1995). Por otra parte, en el embrión de maíz el contenido de GA<sub>1</sub> es 40 veces más alto que en el endospermo, mientras que en chícharo, se han registrado diferentes concentraciones en la testa, los cotiledones y el eje embrionario, esto sugiere que las giberelinas se distribuyen de manera no uniforme en la semilla (Bewley & Black, 1994)

La síntesis de giberelinas es indispensable para la transducción de las señales que culminan con la germinación de la semilla (Karssen, 1995 y Raven *et al.*, 1992) Durante la germinación, las giberelinas estimulan tanto la elongación celular como la división celular del eje embrionario que conduce a la protrusión de la radícula. Asimismo, debilitan la resistencia mecánica que ofrecen las células del endospermo a la extensión radicular, mediante la activación de enzimas hidrolíticas de galacto-(gluco)-mananas que conforman la pared del endospermo (Bewley & Black, 1994 y Karssen, 1995). También durante la germinación, el embrión secreta giberelinas que difunden a la capa de aleurona donde se estimula la síntesis de enzimas hidrolíticas (e.g.  $\alpha$ -amilasa) que degradan las reservas alimenticias. Los aminoácidos, ácidos nucleicos y azúcares son absorbidos por el escutelo y trasladados al embrión, que utilizará para mantener su crecimiento en óptimas condiciones (Raven *et al.*, 1992)



**Tabla 4. Contenido endógeno de giberelinas en diferentes tejidos de algunas especies vegetales<sup>d</sup>.**

<i>Especie vegetal</i>	<i>Tejido</i>	<i>Giberelina</i>	<i>Concentración (ng/g de tejido fresco)</i>
<i>Citrus unshiu</i>	Brotos acuáticos	GA <sub>1</sub>	1700
<i>Phyllostachys edulis</i>	Tallos jóvenes	GA <sub>19</sub>	0.3
<i>Althaea rosea</i>	Puntas de tallos jóvenes	GA <sub>1</sub>	170
		GA <sub>3</sub>	170
		GA <sub>9</sub>	80
		Glúcósido de GA <sub>8</sub>	1700 (1g de tejido seco)
<i>Bryophyllum daigremontianum</i>	Puntas de tallos jóvenes y hojas superiores	GA <sub>20</sub>	0.8
<i>Phaseolus coccineus</i>	Plántulas ligeramente crecidas	GA <sub>1</sub>	80
		GA <sub>4</sub> /GA <sub>20</sub>	200
		GA <sub>5</sub>	60
<i>Avena sativa</i>	Inflorescencia	GA <sub>3</sub>	1850 (ng/inflorescencia)
	Nodo	GA <sub>3</sub>	46 (ng/nodo)
<i>Picea sitchensis</i>	Agujas	Éster glucosídico GA <sub>9</sub>	16

<sup>d</sup>Modificado de Goodwin (1978).

### 3.4. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA, Figura 7) se sintetiza en la hojas maduras y en semillas a partir de ácido mevalónico (Raven *et al.*, 1992). Además del ABA libre, se han encontrado formas conjugadas como el éster glucosídico y el glucósido. Las tres formas del ABA se localizan en el endospermo y tejidos adyacentes, y en el embrión de la semilla (Raven *et al.*, 1992 y Hopkins, 1995).

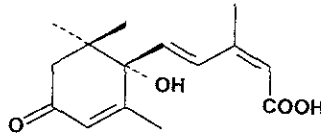


Figura 7. Estructura química del ácido abscísico (Crozier *et al.*, 2000)

Durante el desarrollo de la semilla, el ABA alcanza un máximo de concentración, lo que concuerda con la evidencia que señala que éste estimula la síntesis de las proteínas de almacenamiento y triacilglicérols, y previene la germinación prematura (Raven *et al.*, 1992 y Karssen, 1995). Existe evidencia de que el ABA permite el desarrollo embrionario, pero detiene la germinación y el crecimiento del embrión (Bewley & Black, 1994). Mientras que las giberelinas facilitan la salida de la radícula en la germinación, el ABA inhibe el aumento en la actividad de las mananases y disminuye la relajación de las paredes celulares de la radícula; ambas acciones contribuyen a disminuir la capacidad de extensión de la radícula. Actualmente se desconoce si las GAs y el ABA comparten un mismo sitio de acción en la célula vegetal y si existe antagonismo entre sus actividades (Karssen, 1995). Los niveles endógenos de ABA varían en distintos órganos vegetales, como se muestra en la Tabla 5.

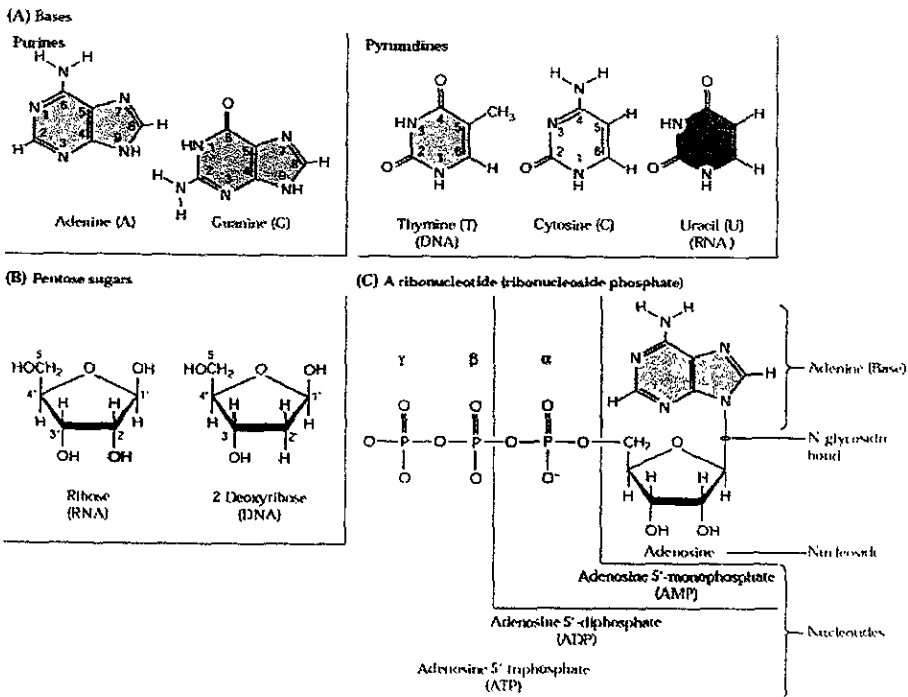
Tabla 5. Contenido endógeno de ácido abscísico en diferentes tejidos de algunas especies vegetales<sup>a</sup>.

<i>Especie vegetal</i>	<i>Tejido</i>	<i>Ácido abscísico</i>	<i>Concentración (ng/g de tejido fresco)</i>
<i>Zea mays</i> (maíz)	0-0.5 mm del extremo radicular	ABA	36
(en condiciones no estériles)	0.5-1.0 mm del extremo radicular	ABA	66
	1.0-4.0 mm del extremo radicular	ABA	33
	4.0-10.0 mm del extremo radicular	ABA	25
<i>Persea americana</i> (aguacate)	---	ABA	27
<i>Helianthus annuus</i>	---	ABA	13
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tallos jóvenes	ABA	78
<i>Rosa canina</i>	Tallos	ABA	4100
<i>Pisum sativum</i>	Tallos jóvenes	ABA	25
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Brotos	ABA	30
	Hojas otoñales	ABA	No se detectó
<i>Prunus</i> spp	Tallos jóvenes	ABA	100-150 (ng/g tejido seco)
<i>Triticum</i> sp. (trigo)	Hojas	ABA	7
<i>Triticum</i> sp. (trigo) túrgido	Tallos jóvenes	ABA	15
<i>Triticum</i> sp. (trigo) marchito después de 4 h	Tallos jóvenes	ABA	168
<i>Betula pubescens</i>	Hojas otoñales	ABA	42
<i>Brassica oleracea</i>	Hojas del corazón	ABA	240
<i>Rosa arvensis</i>	Hojas otoñales	+ABA	594
		-ABA	20
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hojas primarias	ABA	0-100

<sup>a</sup> Modificado de Goodwin (1978).

#### 4. Biosíntesis de nucleótidos trifosfato

Los nucleótidos son las unidades que conforman a los polímeros de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico); cada nucleótido está conformado a su vez por una base púrica o pirimidínica, una pentosa y un grupo fosfato. En el caso de los ribonucleótidos, la pentosa es la ribosa, mientras que en los desoxirribonucleótidos la pentosa es 2-desoxirribosa (es decir, una ribosa sin el grupo hidroxilo en el carbono 2, Sugiyura & Takeda, 2000 y Voet & Voet, 1995. Figura 8).



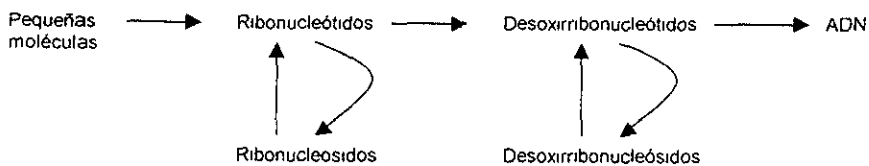
**Figura 8. Estructura química de los nucleótidos.** (A) Estructuras químicas de las bases púricas y pirimidínicas: adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U) (B) Estructuras químicas de las pentosas en los nucleótidos: ribosa y 2-desoxirribosa (C) Estructura química de un ribonucleótido (ribonucleósido fosfato; Sugiyura & Takeda, 2000).

La síntesis *de novo* de los nucleótidos comienza a partir de moléculas precursoras pequeñas; en el caso de nucleótidos de pirimidina, la síntesis inicia a partir de  $\text{CO}_2$ , aspartato, y el grupo amida del aminoácido glutamina. Mediante una serie de seis reacciones

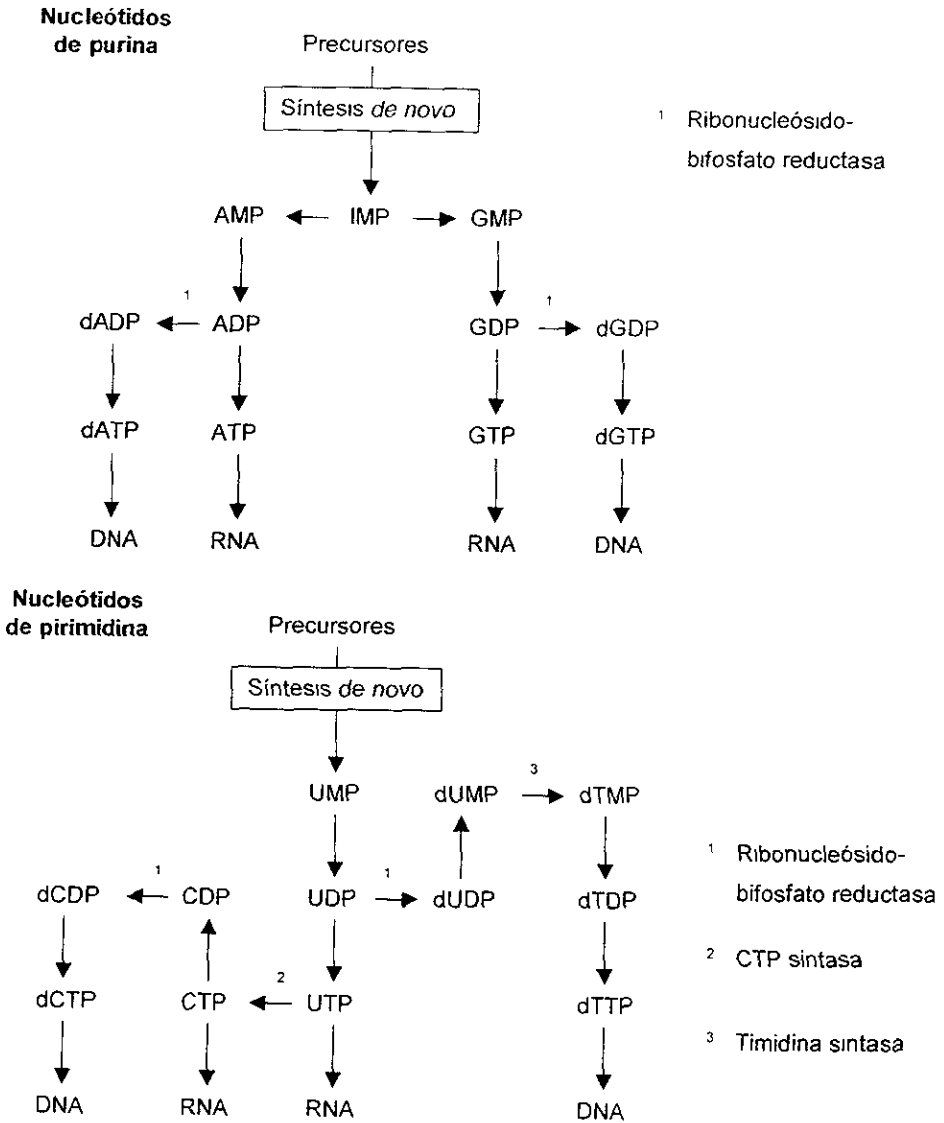
consecutivas que componen la ruta del ácido orótico, se forma el orotato de pirimidina (primer compuesto que posee un anillo pirimidínico completo), que sucesivamente se une al 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) para constituir la molécula precursora compuesta por la base nitrogenada y la pentosa; este compuesto sufre modificaciones posteriores hasta formar los ribonucleótidos undina monofosfato (UMP) y citidina monofosfato (CMP, Sugiura & Takeda, 2000, Reichard, 1988 y Voet & Voet, 1995)

La síntesis de nucleótidos de purina, comienza directamente a partir de la unión sucesiva del PRPP con glicina,  $\text{CO}_2$ , los grupos amida del aspartato y de la glutamina y por último con metenil y formil tetrahidrofolatos. Esta secuencia de reacciones da como resultado la inosina 5'-monofosfato (primer compuesto con un anillo purínico completo, IMP) que a su vez deriva en los ribonucleótidos adenosina monofosfato (AMP) y guanosina monofosfato (GMP; Sugiura & Takeda, 2000 y Voet & Voet, 1995).

Es entonces a partir de los ribonucleótidos difosfato (rNDP) -derivados de los correspondientes rNMP por fosforilación- que, mediante una reacción de reducción catalizada por la enzima ribonucleótido reductasa, se forman los desoxirribonucleótidos (Figura 9) desoxiadenosina difosfato (dADP), desoxicitidina difosfato (dCDP), desoxiguanosina difosfato (dGDP) y desoxiundina difosfato (dUDP). Por otro lado, la enzima timidilato sintasa cataliza la transferencia de un grupo metilo (perteneciente al metenil tetrahidrofolato) al carbono 5' de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) para formar desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP). Esta reacción es la única fuente conocida de dTMP intracelular *de novo*, por lo que la timidilato sintasa mantiene baja la concentración de los nucleótidos de desoxiuridina (ya que esta enzima es la única que cataliza la conversión de dUMP a dTMP, y su ausencia o inactividad conduce a la acumulación de dUMP) para evitar su incorporación errónea al ADN. En mamíferos existen cuatro diferentes monofosfato cinasas que se encargan de fosforilar dAMP, dGMP, dCMP y dTMP respectivamente; las tres primeras pueden utilizar como sustratos ribo o desoxirribonucleótidos monofosfato, mientras que la dTMP cinasa solamente fosforila dTMP y dUMP. Por otra parte, la fosforilación de los nucleótidos difosfato corresponde a una nucleótido difosfato cinasa que utiliza como sustratos tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos (Sugiura & Takeda, 2000 y Reichard, 1988; Figura 10)



**Figura 9. Esquema general de la ruta sintética del ADN.** Para una explicación más completa referirse Reichard (1988)



**Figura 10. Síntesis de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.** (1) La ribonucleótido reductasa reduce los cuatro ribonucleótidos ADP, GDP, CDP y UDP, y presenta regulación alostérica de su actividad y su especificidad por el sustrato; (2) CTP sintasa; (3) timidilato sintasa. (Koolman & Röhm, 1996).

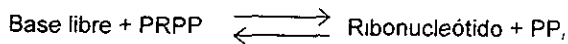
La actividad de la ribonucleótido reductasa varía según la etapa del ciclo celular, alcanzando un máximo durante la fase S y disminuyendo considerablemente en células en G<sub>0</sub>. Este patrón de regulación de la actividad también se ha observado para otras enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos (Reichard, 1998 y Bianchi *et al.*, 1997)

En las plantas, todas las enzimas que participan en la síntesis de nucleótidos de pirimidina se localizan en los plastidios, donde se lleva a cabo este proceso principalmente. En lo que se refiere a la síntesis de nucleótidos de purina en plantas, aún no se tienen suficientes evidencias, pero se sabe que ocurre en el citosol y se propone que el proceso es similar al descrito anteriormente para mamíferos (Sugiura & Takeda, 2000).

Además de la síntesis *de novo* de nucleótidos, en todos los organismos existen rutas de salvamento que reutilizan los nucleósidos y bases libres, producto de la degradación de ADN, ARN y nucleótidos. A diferencia de la semejanza reportada entre las rutas biosintéticas de purinas y pirimidinas entre plantas y animales, las rutas de salvamento han resultado más diversas entre estos organismos. Hasta el momento se carece de suficiente información para establecer los pasos que componen la ruta de salvamento de nucleótidos en plantas (Sugiura & Takeda, 2000 y Castroviejo *et al.*, 1979).

Las rutas de salvamento de nucleótidos se han clasificado en dos categorías:

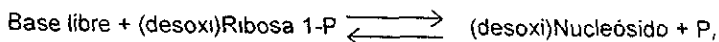
(a) Reacciones de un paso catalizadas por la enzima fosforribosilfosfotransferasa (Sugiura & Takeda, 2000 y Reichard, 1988):



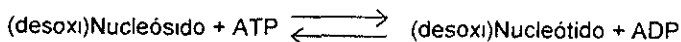
Esta reacción es reversible en presencia de pirofosfatasa

(b) reacciones de dos pasos catalizadas por la enzima nucleósido fosforilasa y nucleósido cinasa, respectivamente

1) Reacción catalizada por la nucleósido fosforilasa (reacción reversible).



2) Reacción catalizada por la nucleósido cinasa (reacción irreversible).



Se ha sugerido que las enzimas de la vía de salvamento pueden tener una función en el establecimiento de los niveles de las pozas de nucleótidos, mediante su participación en ciclos fútiles que regulen el flujo de desoxirribonucleósidos hacia dentro y fuera de la célula (Reichard, 1988)

Actualmente, no existe evidencia que asegure que ambos tipos de reacciones ocurren *in vivo* en todos los organismos (Sugiura & Takeda, 2000). La desfosforilación de nucleótidos y la fosforilación de nucleósidos dan lugar a ciclos fútiles que pueden regular el flujo de desoxirribonucleótidos hacia el interior y el exterior de la célula, lo que representa un nivel más de control de los niveles de nucleótidos y por ende de la síntesis de ADN y ARN (Reichard, 1988 y Castroviejo *et al.*, 1979).

La presencia de las nucleósido cinasas en diferentes organismos es muy variable: mientras que los mamíferos poseen cinasas para todos los desoxirribonucleósidos comunes, *E.coli* sólo tiene timidina cinasa y las levaduras parecen no tener ninguna. Asimismo, las células de mamífero poseen dos tipos de desoxirribonucleósido cinasas que se encuentran en compartimientos diferentes: una citosólica y otra mitocondrial (Reichard, 1988).

Previo a la replicación y a la reparación del ADN se detecta un aumento en la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis de dNTPs. Este aumento en la actividad se acompaña de una elevación en la transcripción de los ARNm correspondientes y en la cantidad de enzima. En unos pocos casos se ha determinado que el aumento en la cantidad de proteína se debe a la estabilización del ARNm. Cabe mencionar que no todas las enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos exhiben cambios en su actividad según la etapa del ciclo celular, ya que hay reportes de que las enzimas citidina cinasa y CMP cinasa no presentan este comportamiento (Bianchi *et al.*, 1997)

En lo referente a las variaciones de las pozas de nucleótidos a lo largo del ciclo celular, se han reportado valores máximos durante la fase S (correspondiente a la replicación del ADN) y G<sub>2</sub>, y mínimos en G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> (Reichard, 1988 y Spyrou & Reichard, 1988). Asimismo, el recambio de la poza de dNTPs es 200 veces más rápido en células de fase S (según datos reportados para linfoblastos T humanos CEM CCL 119). Experimentos con cultivos celulares sincronizados en la fase S demuestran que el recambio en la poza de dTTP se debe casi exclusivamente a su incorporación al ADN. Por el contrario, cuando las células se encuentran en fase G<sub>0</sub> o G<sub>1</sub>, el recambio de dTTP se debe a la síntesis de ADN mitocondrial, reparación de ADN nuclear o degradación y excreción de timidina al medio. Asimismo, se ha observado en células de mamífero que están en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> o en fase S que la mitad de la poza de dTTP proviene de síntesis *de novo*, mientras que el resto deriva de la ruta de salvamento, a pesar de que la actividad de las distintas enzimas que participan en la síntesis *de novo* y de



salvamento cambia según la etapa del ciclo celular (Spyrou & Reichard, 1988 y Bianchi *et al.*, 1997) En cultivos de tejidos vegetales se demostró que la poza de desoxirribonucleótidos trifosfato es menor en comparación con la correspondiente de ribonucleótidos (Castroviejo *et al.*, 1979)

La síntesis de dNTPs se lleva a cabo en el citoplasma y éstos deben introducirse al núcleo antes de la replicación del ADN. Se desconoce si la membrana nuclear es permeable a los dNTPs, pero es posible que existan proteínas que unan dNTPs con una alta afinidad (Reichard, 1988).

En la germinación de semillas de trigo, se observa un aumento rápido de la concentración de ATP al dar principio la imbibición, pero para los otros dNTPs el aumento es lento y discreto, alcanzándose un máximo para dCTP y dTTP a las 20 horas de la germinación. En los embriones secos de trigo no se detectó la presencia de dNTPs (Castroviejo *et al.*, 1979)

El transporte de nucleósidos a través de la membrana se lleva a cabo por difusión facilitada. En algunos tipos celulares se ha reportado la presencia de una permeasa con una amplia especificidad que incluye varios nucleósidos. Esta enzima es capaz de catalizar tanto la entrada como la salida de nucleósidos (Reichard, 1988).

## 5. Replicación del ADN

### 5.1. Orígenes de replicación

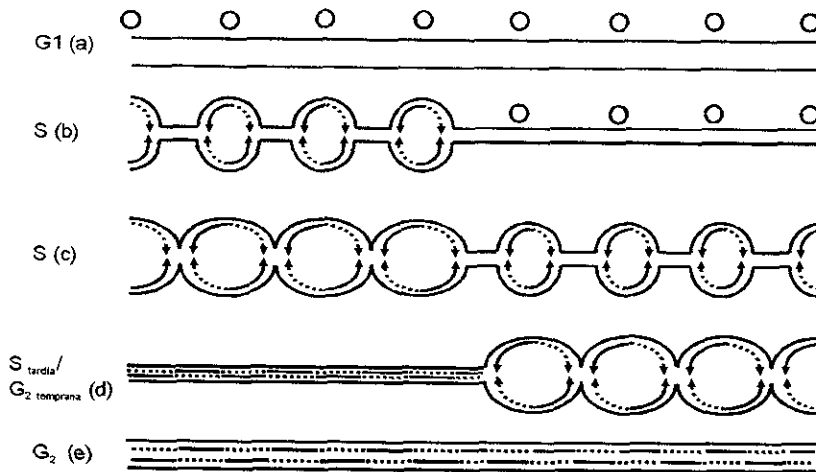
En todos los organismos la replicación del ADN tiene lugar durante la fase S del ciclo celular y se compone de tres etapas *inicio*, *elongación* y *término*. El inicio de la replicación ocurre en sitios específicos de la molécula de ADN llamados orígenes de replicación. En *S. cerevisiae* se han identificado secuencias de 200 pares de bases (bp) (denominadas secuencias autónomas de replicación) que son necesarias para dar comienzo a la replicación. En el caso de las células de mamíferos, el tamaño del replicón (distancia que separa a dos orígenes de replicación) es de 10 kb y se desconoce la secuencia de bases del origen de replicación (Sugiura & Takeda, 2000 y Lewin, 1994) En plantas, el tamaño del replicón de las monocotiledóneas en promedio es de  $47.4 \pm 13.2$  kb, mientras que para las dicotiledóneas es de  $66 \pm 10.6$  kb. El motivo de estas diferencias se desconoce ya que no se ha observado asociación alguna entre el tamaño del genoma y el tamaño del replicón (Van't Hof, 1996) Hasta el momento, no se han reportado las secuencias de los orígenes de replicación en plantas (Sugiura & Takeda, 2000).

Un mismo cromosoma posee muchos orígenes de replicación posibles, sin embargo, dependiendo del tipo celular ciertos orígenes se activan (orígenes funcionales) mientras que otros permanecen quiescentes. Asimismo durante la replicación los orígenes que se activan no lo hacen al mismo tiempo, sino que siguen una secuencia temporal reproducible (Sugiura & Takeda, 2000, Lewin, 1994 y Van't Hof, 1996) Cabe mencionar que los orígenes de replicación quiescentes pueden reactivarse dependiendo de las circunstancias (e.g. estimulación luminosa u hormonal) (Van't Hof, 1996)

En las plantas, la frecuencia de los orígenes de replicación en los cromosomas está sujeta a factores hormonales, de desarrollo, ambientales y de estrés, lo que sugiere que los sitios donde inicia la replicación no sólo dependen de una secuencia específica de bases sino también de condiciones ambientales y extracelulares ajenas al ADN (Van't Hof, 1996).

Durante la replicación de los cromosomas (fase de elongación), un conjunto de replicones se activa simultáneamente (centro de replicación). Las moléculas de ADN recién sintetizadas se ligan de forma secuencial cuando se alcanza la etapa tardía de la fase S o la fase G<sub>2</sub>. En primer término, la unión de moléculas de ADN da lugar a moléculas del tamaño del grupo y en un segundo paso estas últimas moléculas se ligan dan lugar a una estructura de tamaño cromosomal (Van't Hof, 1996, Lewin, 1994 y Sugiura & Takeda, 2000, Figura 11).

La maduración de los cromosomas depende directamente de la concentración intracelular de nucleótidos y de timidina en particular; si se suplementa a la célula con timidina exógena, la velocidad de la reacción de ligación de las secuencias de ADN replicadas se acelera considerablemente y se vuelve independiente de la fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula (es decir, la unión del ADN ya no depende del incremento en la síntesis de nucleótidos que tiene lugar al comienzo de la fase S; Van't Hof, 1996).



**Figura 11. Representación esquemática de la replicación y maduración de los cromosomas.** (a) Cromosoma en la fase G<sub>1</sub> (los círculos representan orígenes de replicación); (b) replicación bidireccional simultánea de cuatro orígenes de replicación. Las flechas representan las hebras de ADN en síntesis; (c) convergencia de las horquillas de replicación, y activación de un segundo grupo de replicones; (d) ligación de las moléculas de ADN sintetizadas en el primer grupo de replicones y convergencia del segundo grupo de replicones, (e) ligación de la hebra de ADN sintetizada por el segundo grupo y finalmente ligación entre las dos moléculas de ADN en una misma molécula del mismo tamaño que el cromosoma original (Van't Hof, 1996)

## 5.2. Efectos de las pozas de nucleótidos sobre la replicación

Los niveles de las pozas de nucleótidos influyen directamente en la replicación y reparación del ADN; existen reportes de la inhibición de estos procesos cuando se presentan deficiencias de algún(os) nucleótido(s); en linfocitos quiescentes que sufren alteraciones en los niveles de las pozas de nucleótidos, se afecta tanto la replicación del ADN en la fase S como los mecanismos de reparación del ADN, produciéndose la muerte celular (Reichard, 1988).

En células de ratón y hámster, la disminución de la concentración de dTTP acarrea la disminución de los niveles de dGTP, un aumento de dATP y la acumulación de dUTP. Se ha comprobado que la privación extrema de dTTP se acompaña de cortes monocatenarios y bicatenarios que pueden ocurrir en sitios específicos de la molécula de ADN, probablemente catalizados por una endonucleasa; cuya existencia se ha sugerido porque el tratamiento con cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas, evita la degradación del ADN en estos

casos. Este proceso conduce en última instancia a la muerte celular. Como apoyo a esta hipótesis, se detectó en lisados de células FM3A la aparición de una endonucleasa que corta ambas cadenas de ADN cuando dichas células se tratan con fluorodeoxiuridina (un inhibidor de la timidilato sintasa). También se ha sugerido que la acumulación de dUTP (derivada de la incapacidad de convertir dUTP a dTTP) conduce a un aumento en la incorporación de uracilo al ADN y, por ende, produce la fragmentación de éste por una activación masiva de los mecanismos de reparación por escisión (Reichard, 1988).

En células en fase S privadas de dNTPs purínicos se ha detectado la presencia de pequeños fragmentos de ADN (similares a los fragmentos de Okazaki) que no se completan durante la replicación. En células FM3A, la disminución en la poza de dGTP y en menor grado de dCTP producen cortes en las cadenas de ADN por una supuesta endonucleasa y la consecuente muerte celular (Reichard, 1988).

*In vitro*, la fidelidad de la replicación del ADN por distintas ADN polimerasas es afectada por las concentraciones relativas de dNTPs en la mezcla de incubación. Particularmente se ha observado un aumento en las incorporaciones erróneas de aquellos dNTPs en exceso. Asimismo, bajo estas condiciones la eficiencia del mecanismo de reparación 3' → 5' disminuyó, observándose que el nucleótido incorporado erróneamente (por estar presente en exceso en la mezcla de reacción) favorecía la subsecuente incorporación incorrecta del nucleótido vecino en la dirección 5' (Reichard, 1988).

*In vivo*, los desequilibrios en las pozas de nucleótidos (tanto púricos como pirimidínicos) aumentaron el número de mutaciones. Además, mutaciones en genes de enzimas de la síntesis de nucleótidos (ribonucleótido reductasa, dCMP desaminasa y CTP sintasa) promovieron un aumento de dos órdenes de magnitud en el índice de mutación. Como en los experimentos *in vitro* se observaron mutaciones debidas a la incorporación de aquellos nucleótidos en exceso y la incorporación del nucleótido en exceso en la dirección 3' con respecto al sitio donde ocurre la mutación. Con base en estos experimentos se concluyó que la concentración de nucleótidos en la horquilla de replicación refleja las concentraciones totales de las pozas de éstos, es decir, la horquilla por sí misma no es capaz de asegurar niveles adecuados de nucleótidos para la replicación (Reichard, 1988)

La importancia del tamaño de las pozas de nucleótidos en la replicación del ADN puede explicar el porque de la estricta regulación de las enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos (Reichard, 1988)

### 5.3. Mecanismo de la replicación y proteínas participantes

A nivel molecular, la replicación comienza con el desdoblamiento de la doble hélice de la molécula de ADN e involucra un conjunto de proteínas con distintas funciones que se unen específicamente a una región rica en A-T. La estabilidad termodinámica de la doble hélice hace necesaria la participación de enzimas llamadas ADN helicasas que catalizan la separación de las dos hebras de ADN al comienzo de la replicación y en la horquilla de replicación a lo largo de todo el proceso. Debido al desdoblamiento de la doble hélice, se produce un superenrollamiento de las hebras en las regiones inmediatas delantera y trasera de la horquilla de replicación. Detrás de la helicasa, la proteína de replicación A (RP-A) se une a las hebras de ADN, estabilizando la conformación monocatenaria (Figura 12; Sugiura & Takeda, 2000 y Lewin, 1994).

Con el fin de evitar el aumento en la tensión de torsión debida al superenrollamiento y mantener una topología adecuada del ADN para continuar con la replicación, las ADN topoisomerasas se unen covalentemente delante de la horquilla. Existen dos tipos de ADN topoisomerasas que se han identificado tanto en procariotes como en eucariotes. La topoisomerasa I rompe el enlace fosfodiéster de una de las cadenas, permitiendo el giro libre de la otra cadena. Por su parte, la topoisomerasa II produce una ruptura de los enlaces fosfodiéster de ambas cadenas de ADN, lo que le permite eliminar o aumentar el superenrollamiento y encadenar o desencadenar dobles hélices circulares de ADN (Figura 12; Sugiura & Takeda, 2000, Lewin, 1994 y Watson *et al.*, 1987).

Durante la replicación, cada una de las dos cadenas de ADN es empleada como un molde para el copiado de las cadenas hijas. Se dice que la replicación es de naturaleza *semiconservativa* porque cada una de las dos dobles cadenas finales está compuesta por una cadena madre y una cadena hija. La síntesis de las nuevas cadenas procede en la dirección 5'→3' (las cadenas molde se leen en la dirección 3'→5'), pero a causa de la conformación antiparalela de la doble hélice, se siguen dos estrategias distintas para copiar cada cadena, como se detalla más adelante (Figura 12, Sugiura & Takeda, 2000)

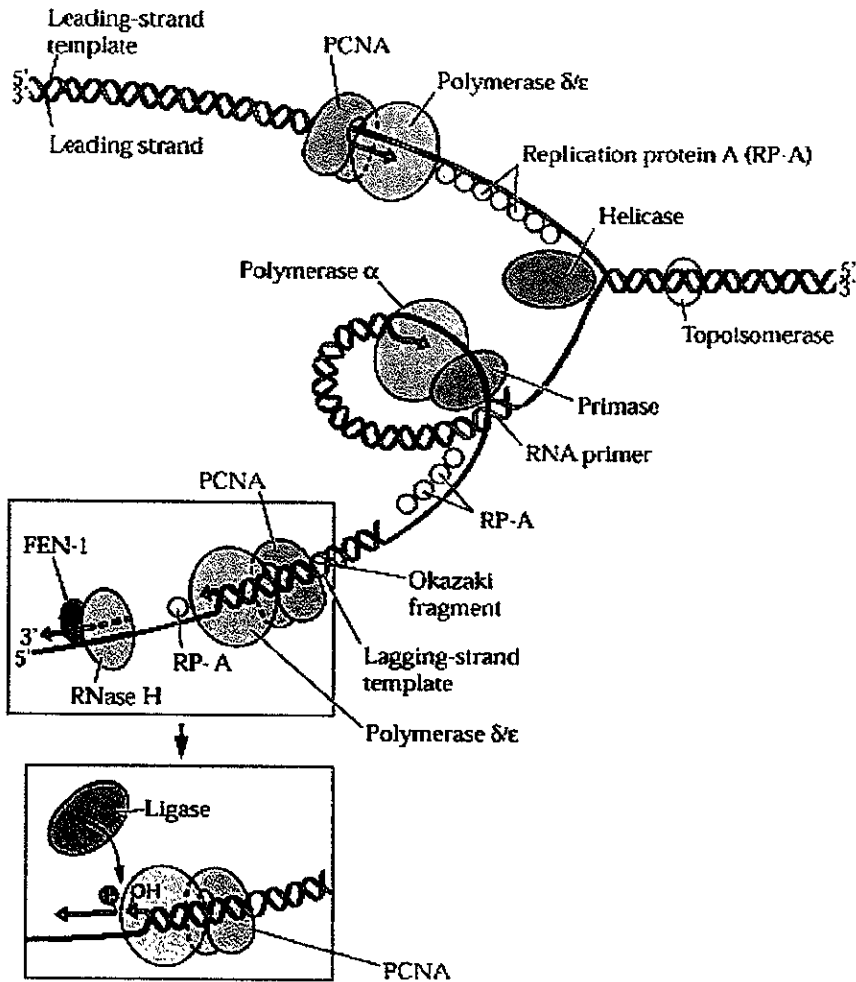
Las ADN polimerasas son incapaces de iniciar la síntesis de ADN por su propia cuenta y únicamente pueden adicionar nucleótidos al hidroxilo 3' libre de una cadena preexistente de ARN llamada cebador, que se encuentre unida por puentes de hidrógeno a la cadena molde. Estos cebadores son sintetizados por ADN primasas que pueden iniciar la síntesis de ADN con ribonucleótidos de purina (Figura 12; Sugiura & Takeda, 2000 y Lewin, 1994)

La adición de nucleótidos sobre la cadena molde 3'→5' se realiza de manera continua e inicia a partir de un único cebador. La otra cadena sintetizada sobre la cadena molde 5'→3'

se sintetiza de manera discontinua en pequeños fragmentos de ADN (llamados fragmentos de Okazaki) cada uno con su propio cebador. Previo a la unión de los múltiples fragmentos de la cadena discontinua, la nucleasa FEN-1 rompe el enlace fosfodiéster entre el cebador de ARN y el fragmento nuevo de ADN, para que después la ribonucleasa ARNasa H degrade el cebador de ARN y lo reemplace con desoxirribonucleótidos. La ligasa se encarga de unir los extremos 3' de un fragmento de ADN con el extremo 5' del fragmento adyacente río abajo (Sugiura & Takeda, 2000, Lewin, 1994 y Watson *et al.*, 1987).

En eucariotes se han identificado tres ADN polimerasas replicativas:  $\alpha$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  (además de una ADN polimerasa  $\beta$  que participa en la reparación de ADN y una ADN polimerasa  $\gamma$  involucrada en la replicación del ADN mitocondrial). La ADN polimerasa  $\alpha$  exhibe una baja procesividad (no es capaz de sintetizar fragmentos largos de ADN) y tiene actividad de ADN primasa; dichas propiedades sugieren que esta enzima sintetiza los cebadores para la síntesis de la cadena discontinua. Una vez que la polimerasa  $\alpha$  termina de sintetizar el cebador se disocia de la cadena molde y un complejo formado por la ADN polimerasa  $\delta$ ,  $\epsilon$  y PCNA -una proteína en forma de anillo que ancla al complejo de polimerasas a la molécula de ADN y aumenta su procesividad-, concluyen la síntesis del fragmento de Okazaki. Este complejo enzimático de replicación también se encarga de la síntesis de la cadena continua. (Sugiura & Takeda, 2000 y Lewin, 1994).

La alta fidelidad observada en la replicación del ADN (un error por cada  $10^9$  pares de bases replicados) se debe a la actividad exonucleasa 3'→5' -que permite a las eliminar nucleótidos incorporados por error al extremo 3' de una hebra de ADN- de las ADN polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ . (Sugiura & Takeda, 2000, Lewin, 1994 y Watson *et al.*, 1987).



**Figura 12. Replicación del ADN.** En la figura se ilustran las principales proteínas que participan en la replicación del ADN en la horquilla de replicación (para la explicación de la figura, refiérase al texto) (Sugiura & Takeda, 2000)

Además de los factores anteriormente mencionados, la replicación del ADN depende de la estructura particular de la cromatina. Las regiones donde la cromatina se encuentra altamente condensada durante la interfase (denominada heterocromatina) se replican en las etapas tardías de la fase S, por el contrario, segmentos de cromatina que se transcriben constantemente durante el ciclo celular y que se encuentran extendidos (denominados

euromatina) se replican al comienzo de la fase S (Sugiura & Takeda, 2000 y Lewin, 1994). Existen reportes de que el estado extendido o condensado de la cromatina varía según el estado de acetilación de las histonas (proteínas que junto con la molécula de ADN conforman la unidad fundamental de la cromatina el nucleosoma). En frijol silvestre y en maíz la acetilación de las histonas aumenta durante la fase S del ciclo celular, lo que correlaciona con el estado no condensado de la cromatina (que permitiría el acceso de la maquinaria de replicación al ADN) y con la replicación del ADN (Georgieva *et al.*, 1991 y Jasencakova *et al.*, 2000)

#### 5.4. Proteínas de replicación del ADN en plantas

A pesar de la conservación de los mecanismos de regulación temporal y espacial del ciclo celular en organismos eucariotes, las plantas poseen ciertas propiedades únicas que justifican el estudio de los elementos involucrados en dicha regulación, como son. **(1)** la dependencia entre la organogénesis y los procesos de división celular y expresión de genes particulares en el sitio mismo donde habrá de ubicarse el nuevo órgano (debido a las restricciones impuestas al desplazamiento celular por la pared celular), **(2)** la restricción de la división celular a las zonas meristemáticas, **(3)** el desarrollo mayoritariamente post-embriionario de la planta y, **(4)** la influencia ejercida por factores ambientales (luz, gravedad, heridas, disponibilidad de nutrientes y estrés) sobre el desarrollo y la división celular (De Veylder *et al.*, 1998).

Las estrategias empleadas para el estudio del ciclo celular en plantas incluyen la caracterización molecular de genes, ADNs y proteínas homólogas a proteínas animales y de levaduras, el estudio funcional y estructural de dichas proteínas, el estudio de la expresión de genes y la caracterización de las interacciones entre las distintas proteínas durante eventos de desarrollo específicos. Las evidencias actuales derivadas a partir de los estudios anteriores demuestran una alta conservación estructural de las proteínas participantes en la regulación del ciclo celular de plantas (James, 2000).

En la Tabla 6 se resumen los avances en la identificación y caracterización de diversas proteínas relacionadas con la replicación del ADN en plantas.



Tabla 6. Proteínas involucradas en el control del ciclo celular en plantas<sup>1</sup>.

Proteína identificada	Especie	Tipo de clona	% de identidad
PCNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Secuencias genómicas en los cromosomas 1 y 5	-----
	<i>Brassica napus</i>	ADNc (1004 n <sup>1</sup> ; cod. <sup>3</sup> 263 aa <sup>2</sup> )	81.6% con respecto a PCNA humano a nivel de nucleótidos
	<i>Zea mays</i> (maiz)	ADNc #1	62% con respecto a PCNA humano a nivel de nucleótidos 95% con respecto a PCNA arroz a nivel de nucleótidos
		ADNc #2	94% con respecto a la región codificante de ADNc #1 (difiere en un 40% en las regiones no traducibles 3' y 5')
	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	Genómica (789 n, cod. 263 aa)	64% con respecto a PCNA ratón a nivel de nucleótidos 62% con respecto a PCNA ratón a nivel de proteína
		ADNc (789 n; cod 263 aa)	64% con respecto a PCNA ratón a nivel de nucleótidos 62% con respecto a PCNA ratón a nivel de proteína
			64% con respecto a PCNA ratón a nivel de nucleótidos 62% con respecto a PCNA ratón a nivel de proteína
	<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	Genómica	88% con respecto a PCNA humano a nivel de nucleótidos
	<i>Cathanthus roseus</i> (vincapervinca)	ADNc (cod 804 aa)	85% con respecto a PCNA humano a nivel de nucleótidos
	<i>Pisum sativum</i> (chicharo)	ADNc (cod 266 aa)	-----
	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	ADNc (cod 264 aa)	-----

ADN polimerasa $\alpha$ (subunidad catalítica)	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	ADNc (cod. 1245 aa)	38% con respecto a ADN pol. $\alpha$ humano a nivel de nucleótidos 55% homóloga con respecto a ADN pol. $\alpha$ humano a nivel de nucleótidos
ADN polimerasa $\delta$ (subunidad catalítica)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Secuencias genómicas en los cromosomas 1 y 5 (cod. 1081 aa)	54% con respecto a ADN pol. $\delta$ humano a nivel de nucleótidos 70% similar a ADN pol. $\delta$ humano a nivel de nucleótidos
	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	ADNc	53% con respecto a ADN pol. $\delta$ humano a nivel de nucleótidos 70% similitud con respecto a ADN pol. $\delta$ humano a nivel de nucleótidos
RPA-1	<i>Oryza sativa</i> (arroz)	ADNc (cod. una proteína de 69.6 kDa)	-----
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Seis secuencias genómicas, 76 secuencias parciales y pseudogenes en los cromosomas 1, 2, 3, 4 y 5	-----
	<i>Zea mays</i> (maíz)	ADNc (ORF <sup>4</sup> de 1854 pb)	85% con respecto a RPA-1 arroz a nivel de nucleótidos 75% con respecto a RPA-1 arroz a nivel de proteína

<sup>1</sup> Jaimes (2000)

<sup>1</sup> Nucleótidos <sup>2</sup> Aminoácidos <sup>3</sup> "Codifica para" <sup>4</sup> Marco abierto de lectura.

Hasta el momento no se tienen evidencias del Factor de replicación C (RFC) ni FEN1 en plantas (Jaimes, 2000).

Las topoisomerasas encontradas en plantas son muy similares a las correspondientes de levaduras y animales, sin embargo, una topoisomerasa I aislada en cloroplastos presenta semejanzas con las de tipo procariota, debido probablemente al origen procariótico de este organelo. En las mitocondrias de plantas todavía no se han encontrado topoisomerasas I o II (Sugiura & Takeda, 2000).

## 6. Regulación de la replicación del ADN

El ciclo celular de todos los organismos se compone de dos eventos separados temporalmente: la *división celular* y el *crecimiento celular*. La división celular implica la duplicación del material genético y su consecuente reparto entre las dos células hijas; su propósito es perpetuar la información genética para aumentar la probabilidad de éxito y supervivencia de la especie. Por su parte, es durante el crecimiento celular que se sintetizan los componentes macromoleculares y organelares –proteínas, lípidos, ribosomas, entre otros muchos- de la célula, necesarios tanto para la replicación del ADN como para la supervivencia de la célula como unidad (Doerner, 2000 y Nasmyth, 1996). En los organismos eucariotes, los mecanismos que coordinan la división y el crecimiento parecen situarse temporalmente en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Actualmente, se posee una cantidad considerable de evidencias experimentales que parecen indicar que dichos mecanismos son comunes a plantas y animales, e involucran proteínas con alta homología entre ambos grupos de organismos como son las proteínas inhibitoras de tumores (e.g. proteína de retinoblastoma, pRb), los factores de transcripción del tipo E2F, cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y las ciclinas mismas (Huntley & Murray 1999). Cabe mencionar que la conservación evolutiva de las moléculas regulatorias no excluye la posibilidad de que existan diferencias importantes entre los mecanismos de regulación en plantas y animales (Doerner, 2000).

La estrecha regulación del ciclo celular –especialmente en las transiciones G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/mitosis- inhibe la replicación del ADN en las fases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y mitosis, con el propósito de evitar cambios en la ploidia (contenido de ADN y número de copias de cada gene) de las células y acoplar la división celular con el crecimiento (Doerner, 2000). De hecho, tanto en levaduras como en mamíferos se ha demostrado la dependencia de la replicación del ADN con el estado de crecimiento de la célula: únicamente cuando la célula ha sintetizado los componentes necesarios para la replicación del ADN en cantidades suficientes, es que ésta inicia (Nasmyth, 1996).

A grandes rasgos, dos mecanismos regulatorios determinan el inicio de la fase S, el establecimiento del estado prerreplicativo en los orígenes de replicación y la expresión de genes específicos de fase S mediada por la actividad de cinasas dependientes de ciclinas

## 7. Timidina cinasa

La *timidina cinasa* (ATP:timidina 5'-fosfotransferasa, EC 2.7.1.21, TK) participa en la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina, catalizando la fosforilación dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  de la timidina (Thd) para producir timidina 5'-monofosfato, que a su vez sufre fosforilaciones posteriores hasta llegar a la timidina 5'-trifosfato, que en última instancia se emplea para la síntesis de ADN (Bradshaw & Deininger, 1984 y Wang & Eriksson, 2000). También es capaz de fosforilar el sustrato 2'-desoxiuridina (dUrd; Wang & Eriksson, 2000; Evans *et al.*, 1998). La mayoría de los organismos, desde virus, procariotes hasta eucariotes, poseen por lo menos una enzima con esta actividad específica, aunque las TKs virales tienen la capacidad para fosforilar una amplia variedad de análogos de nucleósidos, realizar múltiples fosforilaciones sobre la Thd y emplear otros nucleótidos trifosfato además del ATP como fuentes de fosfato (Evans *et al.*, 1998). Una excepción notable es *S. cerevisiae* que carece de dicha enzima (Wintersberger, 1996).

En mamíferos, se han identificado dos timidina cinasas diferentes, la *timidina cinasa 1* (TK1) de localización citosólica y la *timidina cinasa 2* (TK2) de localización mitocondrial y expresada preferencialmente en hígado, pulmón y bazo. El origen genético de ambas enzimas es distinto, ya que en humanos, el gene de la TK1 se localiza en el cromosoma 17, mientras que el gene correspondiente a la TK2 se encuentra en el cromosoma 16. Además de fosforilar los sustratos Thd y dUrd, la TK2 es capaz de fosforilar un tercer sustrato, la desoxicitidina (dCyd, Wang & Eriksson, 2000, Wettin, *et al.*, 1999 y Balzarini, *et al.*, 2000).

La actividad de la TK1 es máxima en la fase S del ciclo celular en células en proliferación y en células en cultivo inducidas por tratamiento con suero, en estas situaciones, la actividad de TK2 corresponde a un 1-5% del total de la actividad. Por el contrario, en células quiescentes o diferenciadas, la única actividad de timidina cinasa detectable se debe a TK2 (Munch-Petersen *et al.*, 1995 y Lipson & Baserga, 1989).

## 7.1. Propiedades de la timidina cinasa

La TK1 de humano es una proteína con un peso molecular de 24 000 Da con una composición enzimáticamente activa de homotetrámero (con un peso molecular de alrededor de 96 000 Da; Sherley & Kelly, 1988). Cabe mencionar que las unidades monoméricas también pueden formar un dímero, que exhibe una menor actividad a la reportada para el tetrámero. La exposición al cosustrato ATP induce un cambio conformacional dependiente de la concentración de enzima- de un dímero de 50 000 Da con una baja afinidad por la Thd ( $K_m = 15 \mu\text{M}$ ) al tetrámero que presenta una elevada afinidad por el mismo sustrato ( $K_m = 0.7 \mu\text{M}$ ; Berenstein *et al.*, 2000 y Britton, *et al.*, 1998). Esta diferencia de afinidades significa que en concentraciones fisiológicas de Thd en la célula, la conformación tetramérica será 3 a 5 veces más activa que el correspondiente dímero (Munch-Petersen *et al.*, 1995). A diferencia de la afinidad de TK por la Thd, la unión del ATP y consecuente polimerización no modifica la velocidad máxima de la enzima (Munch-Petersen *et al.*, 1993). Determinaciones de la concentración de TK a nivel intracelular sugieren que la forma predominante en células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (células no replicativas) es el dímero, mientras que en células en fase S predomina el tetrámero. Este hecho podría constituir un mecanismo de regulación fina de la actividad de TK a nivel post-transcripcional (Munch-Petersen *et al.*, 1995). A diferencia de la TK de humano y de mamíferos en general, la TK activa del virus del *Herpes Simplex* tipo 1 presenta una conformación dimerica (Evans *et al.*, 1998).

Hasta el momento únicamente se ha determinado por Cristalografía de Rayos X la estructura de la TK del virus del *Herpes Simplex* tipo (Evans *et al.*, 1998 y Berenstein *et al.*, 2000).

Cuando se han comparado las secuencias de aminoácidos de la TK de varias especies de mamíferos se ha encontrado un elevado porcentaje de homología y se han identificado los dominios de unión a ATP (secuencia consenso GPMFSGKSTEL), de unión a Mg<sup>2+</sup> (secuencia consenso VIGIDEGQ) y de unión a Thd (FQRKAFGS); Figura 13) El extremo carboxilo terminal de la proteína es la zona que exhibe la mayor variabilidad entre las distintas especies, lo que concuerda con reportes que indican que este extremo no es importante para la actividad enzimática pero sí para la regulación (Wintersberger, 1997).

Ratón	MSYINLPTVLPSSPSKTRGQIQVIL <u>GPMFSGKSTEL</u> MRRVRRFQIAQYKC	50
Humano	MSCINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL <u>GPMFSGKSTEL</u> MRRVRRFQIAQYKC	50
Hámster	MNYINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL <u>GPMFSGKSTEL</u> MRRVRRFQINQYKC	50
Pollo	MDCLTVPGVHPGSPGRPRGNINLIF <u>GPMFSGKSTEL</u> MRRVRRFNLANYRC	50
Ratón	LVIKYAKDTRYSNS FSTHDRNTMDALPACMLRDVTQESLGVA <u>VI</u> GI <u>DE</u> GQ	100
Humano	LVIKYAKDTRYSSS FCTHDRNTMEALPACLLRDVAQEALGVA <u>VI</u> GI <u>DE</u> GQ	100
Hámster	LVIKYAKDTRYSSS FSTHDRNTMDALPACLLRDVAQEALGAA <u>VI</u> GI <u>DE</u> GQ	100
Pollo	LLVKYAKDTRYCTTGVSFTHDRDTMEARVACALQDVYEEALGSA <u>VI</u> GI <u>DE</u> GQ	101
Ratón	FFPDIVDFCEMMANEGKTVIVAALDGT <u>FORKAFGSI</u> LNLVPLAESVVKLT	150
Humano	FFPDIMEFCCAMANAGKTVIVAALDGT <u>FORKPFGAI</u> LNLVPLAESVVKLT	150
Hámster	FFPDIVDFCEVMANAGKTVIVAALDGT <u>FORKAFGSI</u> LNLVPLAESVVKLT	150
Pollo	FFPDIVEFCEKMADTGKTVIVAALDGT <u>FORKAFGSI</u> LNLVPLAESVVKLD	151
Ratón	AVCMECFREAAAYTKRLGLEKEVEVIGGADKYHSVCRLKAFKSSAQTAGS	200
Humano	AVCMECFREAAAYTKRLGTLKEVEVIGGADKYHSVCRLCAFKASGQPAGP	200
Hámster	AVCMECFREAAAYTKRLGLEKEVEVIGGADKYHSVCRCYFKKSSVQPAGP	200
Pollo	AVCMECYREASYTKRLGAEREVEVIGGADKYHSVCRCYFKRPEEELGSE	201
Ratón	DNK NCLVLGPPGEALVVRKLFASQQVLQYNSAN	233
Humano	DNKENCVPVGKPGEAVAARKLFAPQQILQCSPAN	234
Hámster	DNKENCVPLGQPGEASAVRKLFAVQQVLQHNSTN	234
Pollo	NKENVEMGVKQLDMPASRKIFAS	224

**Figura 13. Comparación de las secuencias de aminoácidos de TK1 de ratón, humano, hámster y pollo.** Se muestran las regiones involucradas en la unión a ATP (subrayado y negritas),  $Mg^{2+}$  (negritas), y Thd (subrayado discontinuo y negritas). El ácido aspártico 97 fundamental para la unión del  $Mg^{2+}$  se encuentra subrayado (Wintersberger, 1997)

En el caso de la TK2 de ratón, su secuencia de aminoácidos contiene las secuencias catalíticas además de una secuencia de 40 aminoácidos en el amino terminal que dirige la importación a la mitocondria y regula su estabilidad (las proteínas de TK2 que poseen esta secuencia son menos estables que la forma trunca) El peso molecular de la TK2 de ratón reportado es de 28 000 Da y la forma activa enzimáticamente es un homodimero, con un valor de  $K_m$  para la Thd de 3.4  $\mu M$  (Wang & Eriksson, 2000).

## 7.2. Caracterización de la secuencia del gene de la timidina cinasa

La comparación de la secuencia de nucleótidos del gene de la TK1 de diferentes especies muestra una gran variabilidad en la región promotora, pero un elevado grado de homología en la secuencia que codifica para la proteína, lo que hace suponer la existencia de diferentes mecanismos de regulación a nivel transcripcional para el mismo gene en diferentes organismos (Sorensen & Wintersberger, 1999)

La región promotora del gene de TK1 de ratón (que comprende 170 bp corriente arriba del sitio de inicio de la traducción) se ha dividido en tres regiones diferentes denominadas MT1, MT2 y MT3, y se ha demostrado que cada región une diferentes complejos proteicos que regulan la transcripción del gene. La región MT1 contiene una caja GC (-96 CCCGCCCCC -88) a la cual se une la proteína Sp1 constitutivamente a lo largo del ciclo celular y es indispensable para la actividad del promotor. La región MT2 posee un motivo de unión para el factor de transcripción E2F (-112 GTTCGCGGGCAAA -81) que interacciona con complejos formados por las proteínas E2F, p107, CDK2, CycA y CycE siguiendo un patrón dependiente del estadio del ciclo celular. Por último, la región MT3 presenta un motivo de unión para el complejo Y11 (-41 CCCACGGACT -32) en la fase G<sub>1</sub> y al complejo Y12 en la fase S (Dou *et al.*, 1994 y Wintersberger, 1997). En contraste, este promotor no tiene cajas TATA ni elementos CCAAT (Sorensen & Wintersberger, 1999 y Mudrak *et al.*, 1994).

Los estudios de "footprinting" revelaron una región promotora que parece conferir la regulación dependiente del ciclo celular al gene de TK1 de humano y que se limitó a la secuencia comprendida entre los nucleótidos -133 y -64 con respecto al sitio de inicio de la traducción, denominada *Unidad Reguladora dependiente del Ciclo Celular* ("Cell Cycle Regulatory Unit" o CCRU). Esta región incluye un par de secuencias semejantes a las secuencias de unión del factor de transcripción Y11 en el promotor de ratón (-97 CCCGCCAGGT -88 y -90 GCCGCTGACC -81), tres sitios putativos de unión para el factor de transcripción E2F, una secuencia CCAAT (-107 GGCCAAATC -99), un elemento CCAAT invertido entre las posiciones -66 y -73, y un motivo rico en GC (-93 GGCGGG -97), parecido a un sitio de unión para el factor transcripcional Sp1 (Li *et al.*, 1993 y Tommasi & Pfeifer, 1997). Además de las secuencias anteriores, el promotor de TK1 de humano presenta una caja TATA alterna (TTTAAA) en la posición -80 con respecto al inicio de la traducción (Flemington *et al.*, 1987).

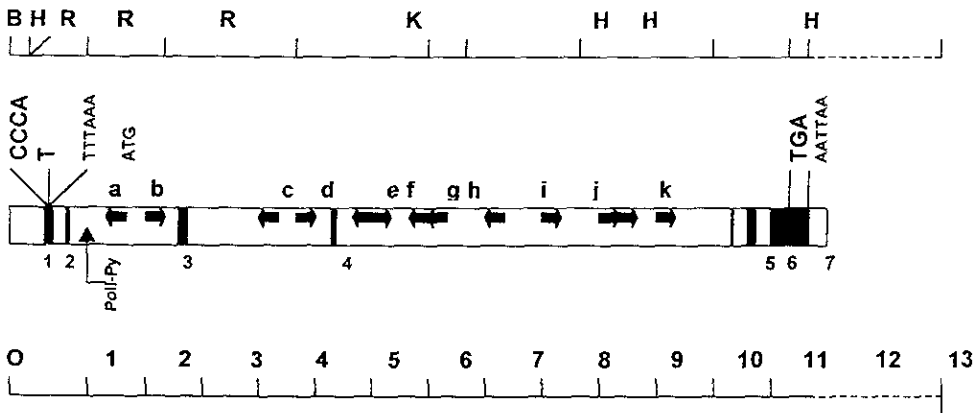
En el caso del promotor de la TK de hámster, se ha identificado una caja TATA, un elemento CCAAT, varios motivos ricos en GC y un sitio putativo de unión para el factor de transcripción E2F (Sorensen & Wintersberger, 1999)

	-165	
Humano	CGGATTCCTCCCACGAGGGGGCGGGCTGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTC	
Hámster	AGGGGGAGAGGGGCGGGGCCACATGCGCCCTGGCTTTGG	
Ratón	CAGATCCGGAGGGGATGGTCGAGCTCCAGGCTTTTCACGTAGCTGAGAGG	
Rata	AGTCCAGGGTTTTACTGGACTGAGAGGGGAGCGGGTCTCACCAGGCTC	
Pollo	CGCCTGCGTCCG <sup>a</sup> ATT <sup>b</sup> TCGCGCTGCGGGGATAACTCCGCTCGGATTG	
	-115	
Humano	AGCGCCCCGGCTCTGATTGGCCCCATGGCGGGGGGGCCGGCTCGT <sup>c</sup> GATTG	
Hámster	CACGCCTGCGTCTTCGGCTGCGATT <sup>b</sup> TCGGTGAGCTTTTAAAGGAAAGC	
Ratón	TGGGACGAGTCTTGTCTTCGTCCCGCCCCCTTTTGAGTTCGCGGGCAAAT	
Rata	CGCCCTGCCGGGCGATTG <sup>d</sup> TCCGTGC	GGGGCACTGTGG
Pollo	GCCGGCGCGCCGGTCCGTGGGCGGAGGCTGTCGCGGATT <sup>e</sup> GCCGGCCG	
	-65	
Humano	GCCAGCACCCGTGGTTTAAAGCGGTCGGCGCGGGAACCAGGGGCTTACT	
Hámster	GCGAACCTGAGGACGCTTCCCACTCACCACCCCGGACCTTGGCGCTCAG	
Ratón	GCGAGCAGTAAGTCGAAATTTTCCACCCACGGACTCGGTGCTAACTAAG	
Rata	GAGGCGTTGTGTGACTAACGTACTCCACTCAAGACCCGGGTGCTAGG	
Pollo	GGCGGCGCGCGCGGGCGGTTGAATCAGTCGGTCCGGTCCGTGAGTGTG	
	-15	1
Humano	GCGGGACGGCCTTGAAGA más 32 bp hasta el codón de inicio ATG	
Hámster	GCTCGCACAGCCGCCATG	
Ratón	GTTTGACACAGCCCATG	
Rata	ATTTACCCCATCGCCATG	
Pollo	AGGAGCGGCGGAACATG	

**Figura 14. Secuencias de los promotores de cuatro genes de TK.** Se ha demostrado que estas secuencias son suficientes para conferir regulación dependiente del ciclo celular a un gene reportero. La numeración es con respecto al codón de inicio (excepto en la secuencia del gene humano) (a) Caja TATA (rojo); (b) motivos ricos en GC (sitios de unión para Sp1, azul), (c) elementos CCAAT invertidos (GATTGG, verde); (d) sitio de unión de E2F (morado) y; (e) sitios putativos de unión de E2F ( ) (Wintersberger, 1997).



El gene de la TK1 de humano tiene una longitud de 12.9 kb (tomando en cuenta 500 bp corriente arriba y 100 bp corriente abajo) y contiene siete exones que codifican para un ARNm de 1430 pb de longitud. El tamaño de los exones es respectivamente 130, 32, 111, 94, 90, 120 y 851 bp. El análisis de la secuencia de los intrones del gene humano y de pollo muestra una baja homología entre éstas, excepto en los sitios consenso de procesamiento. El tamaño de los intrones del gene humano varía desde 1 kb hasta aproximadamente 7 kb, el tamaño de los tres intrones más extensos puede explicarse por la presencia de secuencias repetitivas de ADN de la familia *Alu*. En total se han encontrado 13 secuencias de esta familia dentro del gene de TK1 de humano que comprende un 25% de la secuencia total del gene (Flemington *et al.*, 1987)



**Figura 15. Estructura del gene de TK1 de humano.** La parte superior muestra un mapa de restricción del gene, donde B, *Bam*HI, H, *Hind*III, R, *Eco*RI, K, *Kpn*I. El gene se encuentra representado por la barra intermedia, las zonas de color negro representan los siete exones, mientras que las zonas blancas indican los seis intrones y las secuencias flanqueantes. Las flechas representan las secuencias de las familias *Alu*, y la dirección señala las orientaciones de transcripción. Asimismo se indican la secuencia de poly(Py) (TCCCC)<sub>n</sub> y señales transcripcionales como elementos CCAAT, TTTAAA y ATA (Flemington *et al.*, 1987).

El análisis de la secuencia del ADNc de la TK1 de humano indica que el ARNm posee una región no traducida 5' (5'-UTR) de 57 bp, un marco abierto de lectura ("Open Reading Frame", ORF) de 702 bp y una región no traducida 3' (3'-UTR) de 662 bp (Bradshaw & Deininger, 1984).

A partir del análisis del recientemente aislado ADNc de TK2 de ratón, se determinó que el tamaño del transcrito es de 2387 bp, con un ORF de 813 bp que codifica para una proteína

de 270 aminoácidos con una secuencia putativa de importación mitocondrial (Wang & Eriksson, 2000)

### 7.3. Regulación transcripcional de la timidina cinasa

Las células diferenciadas o que se encuentran en un estado quiescente poseen niveles muy bajos de proteína, actividad enzimática y ARNm de TK1. Por ende, la elevación de la cantidad de proteína y actividad que se registra cuando el crecimiento de las células se estimula con suero requiere de la inducción de la transcripción. A pesar del patrón de expresión de TK1 característico y conservado en prácticamente todas las especies, las diferencias evidentes en los promotores entre especies sugieren la existencia de distintos mecanismos de regulación transcripcional (Wintersberger, 1997)

Durante la regulación transcripcional de TK1 de ratón, E2F forma por lo menos tres complejos con las proteínas pRb, p107, CycE, CycA y CDK2. Durante la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, se forma el primer complejo sobre la región MT2 del promotor, constituido por E2F y p107 (complejo E2F•G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>); esta interacción inhibe la función activadora de E2F sobre la transcripción, contribuyendo a mantener el gene de TK1 "apagado". En la fase G<sub>1</sub>/S el complejo activado CycE/CDK2 interactúa con el complejo E2F•G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, formando un nuevo complejo E2F, p107, CycE y CDK2 (complejo E2F•G<sub>1</sub>/S), donde CDK2 fosforila a p107 y disocia a E2F de p107 para que active la transcripción. Ya entrada la fase S, se forma un tercer complejo entre E2F, p107, CycA y CDK2 (complejo E2F•S) donde nuevamente CDK2 fosforila a p107 con la consecuente liberación de más E2F (Dou *et al.*, 1994).

Además de la actividad inherente a E2F, la transcripción del gene para TK1 de ratón requiere la unión de Sp1 a la cromatina de la región MP1 y la interacción entre ambos factores de transcripción. Esta interacción se realiza mediante el extremo amino terminal de E2F que incluye 122 aminoácidos y el extremo carboxilo terminal de Sp1 (Wintersberger, 1997 y Rotheneder *et al.*, 1999). El factor Sp1 también puede unirse con el represor transcripcional histona desacetilasa (HDAC) evitándose así la expresión génica. E2F compete con HDAC por Sp1, por lo que se especula que la función de la interacción E2F-Sp1 sea eliminar la represión debida al estado hipocetilado de la cromatina (Rotheneder *et al.*, 1999)

La unión del complejo Y11 a la región MP3 del promotor de TK de ratón y el descubrimiento de que este factor transcripcional está compuesto por pRb y una CDK (p34<sup>cdc2</sup>) apoya la hipótesis de que E2F la regula la transcripción de este gene (Li *et al.*, 1993)

La fosforilación de DP-1 y de residuos en el extremo amino terminal de E2F-1 por acción del complejo CycA/CDK2 durante la fase S podría desestabilizar la unión E2F-Sp1, lo que traería como consecuencia la represión de la expresión de TK (Wintersberger, 1997).

Investigaciones con la línea celular tumoral humana HeLa han demostrado que la unión del factor de transcripción NF-Y a dos secuencias invertidas CCAAT en el promotor de TK de humano es un prerrequisito para la unión de Sp1, y que es la actividad de este factor transcripcional la responsable del aumento en la expresión de TK1 en la fase S (Chang *et al.*, 1999). Asimismo, las evidencias derivadas de estos experimentos no demuestran claramente la presencia o participación de E2F en la regulación dependiente del ciclo celular del promotor humano a pesar de la existencia de sitios putativos de unión a E2F y de evidencias previas de la ocupación *in vivo* de estos sitios en fibroblastos humanos. Cabe mencionar que la(s) proteína(s) unida(s) constitutivamente a los sitios E2F aún no han sido identificadas ni caracterizadas, pero estudios mutacionales indican que poseen una función represora de la transcripción (Tommasi & Pfeifer, 1997 y Chang *et al.*, 1999)

A pesar de que E2F parece no activar la expresión de la TK1 durante la fase S en células humanas, la actividad de CycA/CDK4 activa la transcripción de TK1 en la transición G<sub>1</sub>/S. Se sabe que p16 y p21 –ambas proteínas supresoras de tumores– inhiben directamente la actividad de los complejos CycD/CDK4 o CDK6 (aunque p21 es capaz de inhibir a la mayoría de los complejos ciclina/CDK) y que la sobre-expresión de p16 y/o p21 en células HeLa inhiben específicamente la actividad del promotor de TK1 y, en general, el inicio de la fase S (Chang *et al.*, 1999, Soucek *et al.*, 1995 y Pusch *et al.*, 1997)

Por último, estudios sobre el promotor de TK1 de hámster demostraron que su activación depende de la interacción entre los factores de transcripción Sp1 y NF-Y, y que E2F no participa en este proceso. Se especula que el par Sp1/NF-Y reemplaza funcionalmente al par E2F/Sp1. Evidencias sobre el papel que desempeña NF-Y en el reclutamiento de complejos de transcripción, la asociación de NF-Y con histona acetiltransferasas y la asociación de E2F con histona desacetilasas plantean la posibilidad de que tanto la transcripción de TK1 en ratón, humano y hámster comparten un mismo mecanismo: modificar post-traduccionalmente a las histonas de manera que se altere la estructura de la cromatina y se lleve a cabo la transcripción del gene de TK1 (Sorensen & Wintersberger, 1999).

En vista de la transcripción del gene de TK1 independiente de E2F en hámster y de los tres diferentes mecanismos de regulación transcripcionales en ratón, humano y hámster, el concepto generalizado de la regulación de los genes de fase S mediante E2F parece estar en duda (Wintersberger, 1997 y Sorensen & Wintersberger, 1999)

#### 7.4. Regulación post-transcripcional de la timidina cinasa

El análisis de los mecanismos de regulación post-transcripcional de la TK1 se ha realizado principalmente en cultivos celulares de humano (e.g. células HeLa o células 3T3) y de ratón (e.g. fibroblastos de ratón Ltk)

Además de la regulación a nivel transcripcional, la TK1 está sujeta a varios mecanismos de regulación post-transcripcional y post-traducciona que contribuyen de manera importante a mantener los niveles de enzima y actividad, así como la poza de precursores para la síntesis de ADN. En el caso de células quiescentes y en diferenciación, el control post-transcripcional contribuye a mantener el gene de TK1 inactivo (Hengstschläger *et al.*, 1994, Knofler *et al.*, 1993 e Ito & Conrad, 1990). Incluso en ausencia absoluta de controles transcripcionales, la regulación post-transcripcional mantiene la regulación adecuada tanto en células en proliferación como en células estimuladas por factores de crecimiento (Mikulits & Müllner, 1994 y Mikulits *et al.*, 1996).

Las células en proliferación experimentan un aumento en los niveles de proteína TK1 durante la fase S del ciclo celular, pero no es proporcional al incremento correspondiente en el ARNm de TK1. Mientras que la enzima aumenta 15 veces con respecto a los niveles observados en G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, los niveles de transcrito se elevan menos de 3 veces con respecto a dichas etapas del ciclo celular. Este comportamiento dispar entre la cantidad de proteína y de ARNm se debe a un aumento de 10 veces en la síntesis de TK1 durante la fase S, debido a su vez al incremento en la eficiencia de la traducción (Sherley & Kelly, 1988)

#### 7.5. Función biológica de la timidina cinasa

La función biológica de la timidina cinasa aún no es bien comprendida; mientras que en células normales la enzima es ubicua y se encuentra sujeta a un estricto control, en algunos tipos de células inmortalizadas en cultivo, la enzima parece estar ausente, y aún así, éstas son capaces de crecer y proliferar indefinidamente. Para los organismos multicelulares la TK1 parece ser importante, como lo indica la conservación a lo largo de la evolución y su presencia en una gran variedad de organismos dispares. Una posible explicación a esta paradoja podría radicar en el hecho de que la pérdida de la regulación fina de los niveles de la poza de timidina, produce un aumento en el número de mutaciones en el genoma y por ende en la frecuencia de tumorigénesis; el primer evento puede resultar letal para la célula, mientras que el segundo conduce a la transformación celular. Por su parte, las células inmortalizadas presentan alteraciones cromosómicas (e.g. aneuploidia y rearrreglos cromosomales) que

disminuyen la sensibilidad de este tipo de células a los incrementos en el número de mutaciones lo cual fue comprobado con estudios de sobreexpresión y pérdida total de la enzima timidina cinasa; Wintersberger, 1997)

En lo que respecta a la utilidad de la TK como un marcador de proliferación y comparándola con otros genes que se expresan en la transición G<sub>1</sub>/S, parece tener propiedades idóneas como: **(1)** el tiempo de vida media de la TK es lo suficientemente corto como para reflejar las variaciones en su expresión durante el ciclo celular y facilitar la detección de éstas; **(2)** según aseveraciones de Hengstschläger (1998), el paso enzimático catalizado por la TK constituye un paso limitante de la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina y; **(3)** su actividad enzimática es relativamente fácil de detectar (Hengstschlager *et al.*, 1998).

---

## ANTECEDENTES

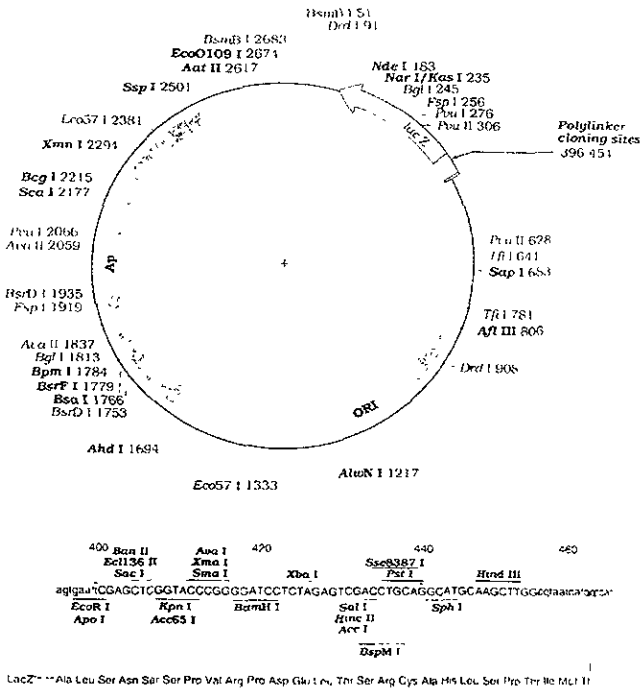
La caracterización de la vía del retinoblastoma en el maíz como un mecanismo de control de la transición entre las fases G<sub>1</sub>/S sugiere que la regulación del ciclo celular en las plantas puede compartir elementos propios del ciclo celular de los mamíferos. Por este motivo, el estudio del ciclo celular en las plantas se realiza a través del aislamiento y la caracterización de genes y clonas de ADNc de plantas, correspondientes a proteínas que, en mamíferos, se ha comprobado que se encuentran involucradas en la regulación mediada por la proteína pRb y el factor de transcripción E2F. El interés particular de los proyectos emprendidos en el laboratorio se centra en aquellas proteínas que participen en el control de la transición G<sub>1</sub>/S, incluyendo las enzimas encargadas de la replicación del ADN antes de la mitosis (Plasencia & Romero, 2000)

En 1999, Hemayet Ullah y colaboradores, reportaron la secuencia de una clona de ADNc del arroz (*Oryza sativa*) aislada a partir de un banco de EST ("Expressed Sequence Tags") y que muestra una similitud del 50% con otros genes reportados en mamíferos, correspondientes a la timidina cinasa. La secuencia de aminoácidos traducida a partir del ADNc del arroz posee una secuencia consenso (entre los residuos 173 a 186) para la timidina cinasa de tipo celular, que permitió caracterizar a dicha secuencia como una TK. Asimismo, en la secuencia de aminoácidos se localizó un motivo de unión a ATP/GTP entre los residuos 16 a 23, lo que parece indicar que el ADNc corresponde a una TK funcional (Hemayet Ullah *et al.*, 1999).

Estudios previos en el laboratorio consistieron en llevar a cabo el escrutinio de un banco de ADNc fabricado a partir del ARN de raíz y tallos de plántulas de maíz, que fueron clonados en el ADN del bacteriófago  $\lambda$ ; buscando en este banco de ADNc una ADN polimerasa  $\delta$  de maíz, se aisló una clona de ADNc (denominada clona  $\delta$ 42) que parecía corresponder a la enzima timidina cinasa. Después de la secuenciación no automatizada (Figura 16) y la comparación con otras secuencias de nucleótidos correspondientes a todos los genes identificados hasta el momento actual en otras especies, tanto procariotas como eucariotas, almacenadas en bases de datos electrónicas y utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), se determinó que la clona correspondía en realidad a la enzima timidina cinasa de maíz. Una vez purificado el ADN y cortado el inserto, éste se clonó en el plásmido pUC19 (Figura 17) en el sitio *EcoRI* mediante una reacción de ligación. Con el plásmido que contenía al inserto, se transformaron células competentes *E. coli* cepa DH5<sup>+</sup> y se hizo la selección azul-blanco de colonias positivas (Plasencia & Romero, 2000).

```
1   CCGCTGCGGCTCAGTCCGGCGAGATCCATGTCATCGTGGGCCCATGTTGCGCCGGCAAGA
61  CCACCGCGCTCCTCCGCCGGTCCAGGCCGAGGCCGGCAACGGAGGAGCGTGGCACTAAT
121 AAAGTCGACAAAGACAACCGCTATGGATTGGATTCTGTTGTGACTCATGACGGTACAAAG
181 ATGGCGTGCTGGGCTGTCAGACTGTCAGTTTTCATGACAAATTAGGAATTGAGGCCTATA
241 ATAAGGTAGATGTTATAGGTATCGATGAGGCCCAATTCTTCCGACGACTTTTATGATTG
301 CTGCTTGCAAAGCTGCAGATCGTGATGGcaCTGTGAGCATGTGGTCCGCCGACGTCTTAC
361 ACTGAGAAGACGCAGGAAACCAAGACTGAACTAATTGGAGGAGCAGATGTGTATATGCCT
421 GTGTGCAGGCAGCACTACATGGATGGGCAGATTGTTATTGAGGCACACAAGGATTGTGTT
481 GGACCTTGACAAGCGAGCCCGAATT
```

**Figura 16. Secuencia de la clona  $\delta 42$  obtenida por métodos no automatizados.** El tamaño de la secuencia es de 506 nucleótidos (Plasencia y Romero, 2000. *Resultados no publicados*). Comparando esta secuencia con la reportada en la Figura 20, se observa que sus longitudes son diferentes (Ver Figura 21 para la comparación directa entre ambas secuencias).



**Figura 17. Mapa de restricción del plásmido pUC19.** pUC19 es un plásmido de *E. coli* con una longitud de 2686 pb y un peso molecular de  $1.8 \times 10^6$  daltons (2.7 kb). Posee un sitio de clonación múltiple de 54 pb, y fue construido por Yanisch-Perron, *et al.* (1985). pUC19 se construyó a partir de: (a) el fragmento *Pvu* III/*Eco* R I del plásmido pBR322 que incluye el gene de la  $\beta$ -lactamasa (lo que le confiere resistencia a la ampicilina, Ap<sup>r</sup>) y el origen de replicación, (b) un fragmento *Hae* II (posición 239-684) que contiene el péptido- $\alpha$  del gene *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) y (c) un sitio múltiple de clonación de uno de los vectores de secuenciación M13mp. De manera similar a lo observado para los plásmidos M13mp, la inserción de una secuencia de ADN en el sitio de clonación múltiple interrumpe la secuencia del péptido- $\alpha$ , evitando la expresión del gene de la  $\beta$ -galactosidasa, y produciendo colonias de color blanco en lugar de azules en medio suplementado con ampicilina y X-gal o Bluogal (Sofer, 1991 y Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

La búsqueda del gene de la timidina cinasa que se detalla más adelante (ver Apartado "Materiales y Métodos" y "Resultados Experimentales") se realizó en el banco genómico Lambda FIX® II de Stratagene.



### **HIPÓTESIS**

Dado que la biosíntesis de ADN es un proceso fundamental durante la germinación de las semillas, el estudio de la expresión y actividad de la timidina cinasa, así como su regulación, será un marcador de la progresión del ciclo celular durante la germinación de maíz

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la estructura primaria y expresión del gene de la timidina cinasa de maíz durante el desarrollo de la planta.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Analizar la secuencia del ADNc correspondiente a la timidina cinasa del maíz contenida en la clona δ42
2. Estudiar la expresión genética del gene de la timidina cinasa del maíz durante la germinación.
3. Estudiar los efectos de fitohormonas sobre la expresión del gene de la timidina cinasa de maíz durante la germinación.
4. Comparar los niveles de expresión del gene de la timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz
5. Determinar el número de copias del gene mediante un ensayo de Southern blot con ADN genómico de maíz
6. Aislar una clona genómica del gene de la timidina cinasa de maíz

## 2. Secuenciación del ADN plasmídico

Para secuenciar el ADN plasmídico, se procedió a un paso adicional de purificación. El botón de ADN se disolvió en 32  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, se adicionaron 8  $\mu\text{L}$  de NaCl 4 M y 32  $\mu\text{L}$  de polietilén glicol al 13% (p/v). El ADN se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para después centrifugarse a 14 000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el botón de ADN se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% helado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Se permitió secar el botón y éste se disolvió en 20  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril. La concentración del ADN plasmídico se determinó espectrofotométricamente en celdas de cuarzo a 260 y 280 nm.

La secuenciación del ADN fue hecha en el laboratorio comercial ACGT Inc (Northbrook, IL., E.U.A.) en un secuenciador automático AbiPrism, modelo 3100. Los electroforegramas fueron editados posteriormente por examinación visual.

## 3. Digestión del plásmido

El ADNc de la timidina cinasa se encuentra clonado en el plásmido pUC19 y flanqueado por dos sitios de corte para *EcoRI*. Una mezcla de 17  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 3 (RE<sub>ACT</sub> 3, ver Tabla 2 para su composición) 10X (GIBCO) se incubó a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, para relajar el plásmido. Inmediatamente después de concluido el calentamiento, la mezcla se colocó en hielo por 3 minutos y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  (10 unidades) de la enzima de restricción *EcoRI* (GIBCO). Para permitir que la enzima cortara el plásmido, la mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 2 horas, concluido el cual, se purificó el inserto liberado mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v).

## 4. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

El ADN plasmídico sometido a la acción de la enzima de restricción *EcoRI* se corrió en un gel de agarosa al 1% preparado con amortiguador TAE 1X (Apéndice A). La banda correspondiente al inserto (aproximadamente 500 bp) se cortó y depositó en un tubo eppendorf previamente pesado. Por diferencia de peso se calculó el peso del gel cortado y el volumen equivalente (0.1 g equivalen a 100  $\mu\text{L}$ ). La purificación del ADN se llevó a cabo con el kit GENECLEAN III de BIO 101. Al gel que contenía el ADN se le adicionaron 2 a 3 volúmenes de NaI y el tubo se colocó en un baño maría a una temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos,

con el fin de disolver el gel de agarosa. Concluida la incubación, se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de la resina GLASS-MILK que une fuertemente al ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos agitando el tubo cada minuto. Después de centrifugar la mezcla a 12 000 rpm por 5 segundos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se realizaron 3 lavados con 700  $\mu\text{L}$  de NEW-WASH helado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Una vez completados los lavados, se permitió que el sobrenadante se evaporara completamente, se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y se incubó el tubo a  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos. Por último, el ADN se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril

### **5. Marcaje de la sonda de ADNc con [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP por la técnica de alineamiento de cebadores al azar**

Para el marcaje radiactivo de la sonda se utilizó el kit "Random Primers ADN Labeling System" (GIBCO BRL). En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 12  $\mu\text{L}$  de ADN purificado a partir de geles de agarosa y 9  $\mu\text{L}$  de agua destilada, la mezcla se incubó a  $100^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente después se colocó en hielo. Posteriormente se adicionaron 3  $\mu\text{L}$  de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP (500  $\mu\text{M}$  cada uno), 20  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora con los cebadores (2.5X), 1  $\mu\text{L}$  de fragmento Klenow de la ADN polimerasa y 5  $\mu\text{L}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP. La mezcla se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, terminados los cuales se adicionó a la mezcla 5  $\mu\text{L}$  de Stop Buffer y 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (Apéndice A)

La purificación de la sonda marcada se realizó mediante una columna de Sephadex 50. Un volumen de 75  $\mu\text{L}$  de sonda marcada se colocó en la columna de Sephadex, que fue centrifugada 5 minutos a 2000 rpm en una centrifuga de mesa Sorvall RT 6000D

## **6. Estudios de expresión genética**

### **6.1. Desinfección y sembrado de ejes embrionarios**

Para los experimentos de expresión genética se emplearon ejes embrionarios o embriones, obtenidos manualmente de semillas de maíz (*Zea mays* L.) de la raza Chalqueño, adquiridas en Chalco, Estado de México

Para la desinfección de los ejes embrionarios y los embriones se preparó una dilución 1:10 de hipoclorito de sodio (blanqueador Cloralex®) en agua destilada estéril, resultando en una concentración final aproximada de 0.5%. Los ejes embrionarios o los embriones (60 a 65 por cada experimento) se sumergieron en 50 mL de la solución desinfectante y se agitaron

durante 2 minutos, transcurridos los cuales, dicha solución se sustituyó por 100 mL de agua estéril y los ejes embrionarios o embriones se agitaron durante un minuto. Se realizaron un total de 4 lavados con agua estéril. Los ejes embrionarios o embriones se dejaron secar sobre papel filtro estéril al mechero por 5 minutos y se sembraron en agar Murashige y Skoog (MS) (GIBCO BRL), colocándolos sobre la superficie del medio. Para el sembrado de ejes embrionarios, al medio MS sólido se le adicionó sacarosa en una concentración final del 2% (p/v). Los embriones, en contraposición, se sembraron en medio carente de sacarosa exógena.

Los ejes embrionarios o los embriones germinaron durante 12, 24 y 48 horas antes de proceder con la extracción del ARN total de la región meristemática (aproximadamente 2 mm) de los ejes embrionarios correspondientes a cada tiempo de germinación.

## 6.2. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total a partir de ejes embrionarios y embriones se utilizó el reactivo TRIzol® (GIBCO BRL) siguiendo el protocolo del fabricante modificado para tejidos vegetales (Sanjuan, 1997). Se congelaron 100-150 mg de material vegetal con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero al cual se le adicionó 1 mL de TRIzol® y 10 µL de dietil pirocarbonato (DEPC). Después de homogenizar la mezcla, ésta se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. Para la extracción de ARN total de hoja, se empleó una relación de 2.5 g de tejido por 3 mL de TRIzol® repartidos en 4 tubos eppendorf de 1.5 mL. En el caso de raíz, espiga y pistilo, la relación utilizada fue de 3.5 a 4 g de cada tejido por 4 mL de TRIzol® repartidos en 5 tubos eppendorf (Greaves, 2001).

La suspensión homogenizada se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 minutos, transcurridos los cuales, se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4°C en una centrifuga Jouan MR1812. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le adicionaron 200 µL de una mezcla cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 (v/v). Las muestras se agitaron manualmente durante 15 segundos y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf, se le agregaron 500 µL de isopropanol helado (-20°C), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó por decantación y el botón de ARN se resuspendió en 1 mL de etanol al 70-75% helado (-20°C) por agitación manual. La suspensión se centrifugó a 6400 rpm por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se eliminó completamente por decantación y aspiración, el botón se dejó secar al mechero por 4 minutos.

Para el ARN de ejes embrionarios, el botón se disolvió en 100  $\mu$ L de agua desionizada tratada con DEPC (Apéndice A), para el ARN de hoja, el botón se disolvió en 25  $\mu$ L de agua tratada con DEPC y para raíz, tallo, espiga y pistilo, el botón se disolvió en 20  $\mu$ L de agua-DEPC (Greaves, 2001) Para facilitar la disolución del botón, la muestra se incubó en hielo durante 15 minutos antes de almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **6.3. Northern blot**

#### **6.3.1. Calibración de las muestras de ARN**

La calibración de las distintas muestras de ARN se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) incorporado, utilizando como amortiguador TAE 1X. Las bandas de ARN se visualizaron en un transiluminador de luz UV Hoefer Scientific Instruments modelo UVTM-10 y se fotografiaron con una cámara Electrophoresis Systems Photo-Documentation Camera FB-PDC-34 de FisherBiotech.

#### **6.3.2. Elaboración de un gel desnaturizante**

##### **6.3.2.1. Preparación del gel de agarosa**

Para preparar el gel de agarosa al 1.2% (p/v), se pesaron 1.82 g de agarosa libre de ARNasas, que subsecuentemente fueron disueltos en 150 mL de MOPS 1X. Después de fundir la agarosa, se le adicionaron 112.5  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.5 mg/mL)

##### **6.3.2.2. Desnaturalización de las muestras**

Para la desnaturalización de las muestras, en tubos eppendorf estériles se preparó la siguiente mezcla (Sanjuan, 2001, Sambrook *et al*, 1989 y Ausubel *et al.*, 1992)

**Tabla 7. Mezcla de desnaturalización para muestras de ARN.**

Reactivo	Cantidad
Dimetilsulfóxido (DMSO)	22.5 $\mu$ L
MOPS 1x	5.0 $\mu$ L
Glioxal 6 M desionizado	6.6 $\mu$ L
Muestra de ARN	10.0-20.0 $\mu$ g
Agua tratada con DEPC	Completar a 45.0 $\mu$ L totales

Las mezclas se incubaron a 50°C durante 1 hora, se enfriaron en hielo y se les adicionó a cada una un volumen de 6  $\mu$ L de amortiguador de carga para geles desnaturalizantes de glioxal (Apéndice A).

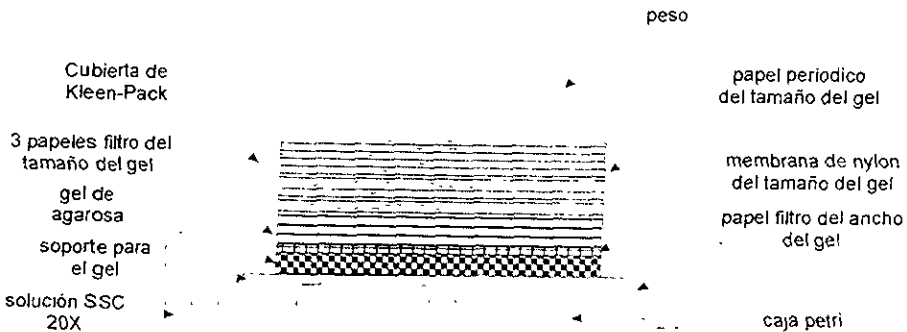
Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron a 100 V durante 3.5 horas a 4°C. Una vez transcurridas 1.75 horas, se reemplazó el amortiguador de corrida por amortiguador fresco.

### 6.3.3. Transferencia del ARN a membranas de nylon

La transferencia tiene como objetivo inmovilizar a los ácidos nucleicos en una membrana de nylon.

Previo a la transferencia del ARN a membranas de nylon, se eliminó el exceso de bromuro de etidio contenido en el gel sometiéndolo a un lavado con agua tratada con DEPC y agitación constante durante 1 hora.

Para llevar a cabo la transferencia se montó el dispositivo que se muestra en la figura



**Figura 18. Dispositivo de transferencia de ácidos nucleicos a membranas de nylon (Greaves, 2000)**

Después de 18 horas de transferencia, la membrana se lavó con SSC 20X y agitación durante 5 minutos, se permitió secar junto al mechero y el ARN se entrecruzó aplicando dos ciclos de entrecruzamiento óptimo en un equipo UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1. Para almacenar las membranas, se colocaron entre dos hojas de papel filtro Whatman 3MM humedecido con agua tratada con DEPC y se guardaron a 4°C.

#### 6.3.4. Hibridación con la sonda de ADNc con [<sup>32</sup>P]-dCTP

##### 6.3.4.1. Prehibridación

La(s) membrana(s) de nylon se introdujeron en tubos de hibridación, a cada tubo se le adicionaron 20 mL de solución de prehibridación (Apéndice A). El periodo de prehibridación fue de 2 horas a una temperatura de 62°C en un horno Stuart Scientific modelo SI20H.

##### 6.3.4.2. Hibridación

A cada tubo de hibridación se le adicionaron 75 µL de sonda marcada con <sup>32</sup>P previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos y 10 mL de solución de hibridación (Apéndice A). El periodo de hibridación fue de 12 horas a una temperatura de 68°C, también en un horno Stuart Scientific modelo SI20H.

##### 6.3.5. Lavados

Las condiciones de los lavados realizados se presentan a continuación:

- 1 Lavado #1. Solución SSC 2X/SDS 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente con rotación en el mismo tubo de hibridación
- 2 Lavado #2. Solución SSC 1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C con agitación constante.
- 3 Lavado #3 Solución SSC 0.5X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C con agitación constante
- 4 Lavado #4. Solución SSC 0.1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a 55°C con agitación constante



Después de cada lavado se revisó el nivel de emisión  $\beta$  de cada membrana con un contador Geiger Technical Associates modelo PUG 1AB, cuidando que la radiación emitida fuera menor a 100 cpm con excepción de una zona específica y delimitada de la membrana.

### **6.3.6. Exposición y revelado de la película**

La membrana de nylon ya lavada y aun húmeda se fijó a un soporte sólido y se cubrió completamente con Kleen Pack®, cuidando de eliminar todas las burbujas de aire entre la membrana y el recubrimiento plástico. La membrana se introdujo en un cassette Spectronics® Monotec (Spectronics Corporation) en contacto con una película Hyperfilm™MMP (Amersham Pharmacia). El cassette se almacenó a -70°C durante 15 días.

El revelado de la película se realizó sumergiendo la película en revelador y fijador Kodak GBX durante 4 y 2 minutos, respectivamente. Todo el proceso de revelado se llevó a cabo en el cuarto oscuro.

### **6.4. Densitometría de las bandas**

La densitometría de las bandas de la autorradiografía correspondiente se realizó con el equipo FLUOR-S de BioRad, localizado en el laboratorio 106 del Edificio E de la Facultad de Química.

## **7. Estudios del número de genes de la timidina cinasa en el genoma de maíz**

### **7.1 Extracción de ADN genómico**

El protocolo de extracción de ADN genómico sigue lo propuesto por De la Porta (1983), con algunas modificaciones.

Para la extracción de ADN genómico se partió de 150 mg de ejes embrionarios secos, que fueron congelados con nitrógeno líquido y molidos hasta polvo fino en un mortero. El polvo resultante se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de amortiguador de extracción (Apéndice A), 1.5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 60  $\mu$ L de SDS 20%. La muestra se agitó hasta resuspender el polvo en el amortiguador y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente se adicionaron 400  $\mu$ L de acetato de potasio 3 M (pH 5.0), se incubó por 30 minutos en hielo y se centrifugó a 14 000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se centrifugó nuevamente por 10

minutos a 14 000 g y 4°C. Concluida la segunda centrifugación, el sobrenadante se decantó en un tubo eppendorf, se le adicionó un volumen igual de isopropanol helado (-20°C) y se mezcló por inversión. La muestra se incubó a -20°C por lo menos media hora para precipitar el ADN.

Con una pipeta pasteur (modificada en forma de gancho) se recolectó el precipitado de color blanco y se lavó tres veces en etanol al 70% helado (-20°C). Por último, el precipitado se disolvió en un tubo eppendorf que contenía NaOH 10 mM. La solución se neutralizó adicionando un volumen de Tris 1 M equivalente a la vigésima parte del volumen total de muestra.

## 7.2. Cuantificación del ADN genómico

Para evaluar la calidad y cantidad del ADN genómico extraído se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% al que se le incorporaron 15 µL de ARNasa (15 mg/mL) y bromuro de etidio (15 µL de una solución stock de concentración 0.5 mg/mL) en amortiguador TAE 1X, utilizando una alícuota del ADN obtenido con anterioridad. Simultáneamente, se corrieron diluciones seriadas de marcadores de pares de bases  $\lambda$ HindIII, con una concentración inicial de 50 ng/µL.

La cuantificación se realizó comparando la intensidad de la fluorescencia de la banda correspondiente a la alícuota de ADN con la fluorescencia emitida por las bandas de marcadores de pares de bases  $\lambda$ HindIII, para posteriormente hacer una estimación de la concentración de la alícuota de ADN a partir de la concentración conocida de los marcadores de pares de bases.

## 7.3. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción

Una vez estimada la concentración de la muestra de ADN genómico, en un tubo eppendorf (por cada enzima de restricción que se desee utilizar) se depositó un volumen de muestra equivalente a 20 µg de ADN genómico y 20 µL del buffer de restricción correspondiente (la descripción de las propiedades de las enzimas de restricción se encuentra en el Apéndice A). La mezcla se incubó a 45°C (para evitar problemas de precipitación de sales) y se enfrió a temperatura ambiente. En seguida se le adicionaron a cada muestra 5 µL de la enzima de restricción elegida y se incubó durante 12 horas a una temperatura de 37°C.

**Tabla 8. Composición de los amortiguadores de reacción para las enzimas de restricción empleadas.**

Amortiguador	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl <sub>2</sub> (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	Tris- acetato (mM)	Acetato Mg (mM)	Acetato K (mM)	Ditiotreitol (mM)
RE <sub>ACT</sub> 2 <sup>a</sup>	50	8.0	10	50	---	---	---	---	---
RE <sub>ACT</sub> 3 <sup>a</sup>	50	8.0	10	100	---	---	---	---	---
Buffer B <sup>b</sup>	---	7.9	---	---	---	33	10	66	0.5

<sup>a</sup> GIBCO BRL

<sup>b</sup> Boehringer Mannheim

Para volver a precipitar el ADN, al volumen de muestra se le adicionaron 250  $\mu$ L de isopropanol helado (-20°C) y se incubó a -20°C durante por lo menos 30 minutos, después de los cuales se centrifugó 10 minutos a 14 000 g a 4°C. El sobrenadante se decantó y se realizó un lavado con etanol al 70% helado (-20°C). El botón se dejó secar al mechero y finalmente se disolvió en 60  $\mu$ L de NaOH 10 mM. La solución se neutralizó con 2  $\mu$ L de Tris 1 M.

Para confirmar la digestión, una alícuota de 4  $\mu$ L de ADN digerido se corrió en una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en amortiguador TAE 1X

## 7.4. Southern blot

### 7.4.1. Electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membranas de nylon

La electroforesis en gel de agarosa y la transferencia a membranas de nylon se realizó según el protocolo de Ausubel *et al* (1992)

Un volumen de aproximadamente 60  $\mu$ L de ADN digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% (p/v) incorporado con ARNasa (15 mg/mL) y bromuro de etidio (0.5 mg/mL) en amortiguador TAE 1X durante 5 horas a 125 V en refrigeración (4°C). Una vez terminada la corrida, el gel se incubó en una solución de HCl 0.2 N durante 10 minutos, con el propósito de depurificar el ADN y facilitar la transferencia. Posteriormente, el gel se lavó tres veces con agua desionizada (cada lavado con una duración de 5 minutos) y se incubó en solución desnaturalizante (Apéndice A) por 30 minutos. Para eliminar y neutralizar el exceso de solución de desnaturalización, el gel se lavó con agua desionizada y se incubó en solución de neutralización (Apéndice A) durante 30 minutos.

La transferencia se realizó con el dispositivo de transferencia esquematizado en la Figura 18 de la Sección 6.3.3, durante 18 horas.

#### 7.4.2. Hibridación, lavados, exposición y revelado de la película

Los procesos de hibridación, lavados, exposición y revelado de la película se realizó como se explicó en las Secciones 6.3.4, 6.3.5 y 6.3.6

### 8. Escrutinio del banco genómico

La búsqueda del gene de la timidina cinasa de maíz se fundamentó en los escrutinios sucesivos del banco genómico Lambda FIX® II de Stratagene

Este banco fue preparado con ADN genómico de plántulas de maíz etioladas de la línea endogámica Missouri 17. El ADN fue clonado en un vector lambda de reemplazo genómico diseñado para facilitar el mapeo de alta resolución por restricción y caminatas cromosomales ("chromosomal walking") sin necesidad de subclonación. El vector es capaz de aceptar insertos de 9 hasta 23 kb de longitud.

Los fagos  $\lambda$  que contienen los genes *red* y *gam* en forma activa son incapaces de crecer en cepas hospederas de *E. coli* que sean lisogénicas para el bacteriófago P2. Por el contrario, los fagos  $\lambda$  que carecen de estos genes sí pueden crecer en cepas lisogénicas para P2 como *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) (cepa lisogénica derivada de XL1-Blue MRA). Los genes *red* y *gam* en el ADN del vector de reemplazo  $\lambda$  se localizan en el sitio de inserción, por lo que los fagos  $\lambda$  silvestres no proliferan cuando infectan a la cepa XL1-Blue MRA (P2). Cuando el fragmento de inserción se reemplaza con un inserto, el fago  $\lambda$  recombinante se convierte en *red/gam* y es incapaz de crecer en la cepa lisogénica P2, es decir, la infección de la cepa XL1-Blue MRA (P2) con fagos de la biblioteca, únicamente permite el crecimiento de los fagos recombinantes.

Las regiones de clonación del vector están flanqueadas por los promotores T3 y T7 del bacteriófago (Figura 19). Los transcritos generados a partir de los promotores T3 y T7 facilitan la caminata cromosomal y la obtención de mapas de restricción. Los sitios de restricción para *Not* I que flanquean a los promotores permiten el aislamiento de un cassette que contenga el inserto de interés y ambos promotores. Mapas de alta resolución pueden obtenerse realizando una digestión parcial del cassette y un Southern blot con una sonda de ADN complementaria a los promotores T3 y T7

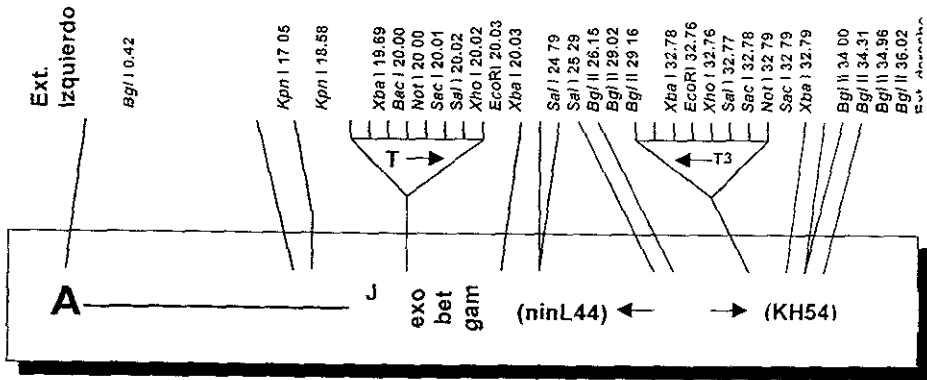


Figura 19. Mapa de restricción del vector de reemplazo Lambda FIX® II (Stratagene)

### 8.1. Preparación de células de *E. coli* XL1-Blue MRA(P2) con $OD_{600}=0.5$

Para hacer susceptibles las células de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) a la infección por el bacteriófago  $\lambda$ FIX® II, es necesario crecerlas en un medio líquido que contenga maltosa (Stratagene).

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad. A partir de un stock de células de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) almacenadas en glicerol-LB (82%.18% (v/v)) a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se tomó una asada (sin descongelar el stock de células) que se depositó a su vez en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 3 mL de caldo luria (apéndice A). El tubo se incubó 12 a 14 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación (150 a 200 rpm) en una incubadora Orbit Environ-Shaker (Lab-Line) para aumentar la densidad celular. Concluido el periodo de incubación, la suspensión de bacterias se transfirió a un tubo Falcon® estéril con capacidad para 15 mL y se centrifugó a 2400 rpm durante 5 minutos en una centrifuga de canastillas Sorvall RT 6000D (DuPont) para posteriormente eliminar el sobrenadante por decantación. Se realizó un lavado con una solución de  $\text{MgSO}_4$  10 mM y, finalmente, se resuspendió el botón celular en 5 mL de la misma solución. La absorbancia a 600 nm de la suspensión de células se determinó en un espectrofotómetro UV160U (Shimadzu) contra un blanco de agua desionizada. Cuando la medición de absorbancia fue superior a 0.5, se realizó la dilución correspondiente.

## 8.2. Titulación del banco genómico

Todo el ensayo se realizó en condiciones de esterilidad. Se prepararon diluciones senadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ ) del fago  $\lambda$ FIX@ II en buffer SM (Apéndice A). En un tubo eppendorf se mezclaron 10  $\mu$ L de cada dilución con 190  $\mu$ L de la suspensión de células de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) con una OD<sub>600</sub> de 0.5 y la mezcla se incubó durante 20 minutos a 37°C en una incubadora LC Incubator modelo No 203 (Lab-Line). Los 200  $\mu$ L totales de mezcla se depositaron en el centro de una caja petri que contenía agar bacteriológico suave (1.5% (p/v)) y se distribuyeron homogéneamente en la caja, mediante la adición de 3.5 mL de agar bacteriológico suave (0.75% (p/v)) fundido (~ 45°C). Una vez que se solidificó el agar, la caja se incubó a 37°C durante un periodo de 6 a 8 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se contó el número de placas de lisis en cada caja y se calculó el título del banco genómico tomando en consideración la dilución realizada.

## 8.3. Escrutinio del banco genómico

Una vez conocido el título del banco genómico, se calculó el volumen (de una dilución de fagos en particular) que se requiere para realizar el escrutinio de 500 000 unidades formadoras de placas (pfu) repartidas en 10 cajas petri de 15 cm de diámetro, es decir, 50 000 pfu/caja. Considerando que el tamaño promedio de los insertos de ADN genómico del banco es de 16 000 bp y que el tamaño del genoma de maíz es de  $4 \times 10^9$  bp, entonces al realizar el escrutinio de 500 000 pfu se estará buscando la clona genómica de la timidina cinasa en el equivalente a dos genomas de maíz. En cajas petri con 20 mL de medio NZYDT (1.5% de agar (p/v)) (Apéndice A) se depositaron 600  $\mu$ L de células de *E. coli* XL1-Blue MRA(P2) con OD<sub>600</sub> de 0.5, el volumen calculado de la dilución de fagos y 6.5 mL de agar suave fundido (0.75% de agar (p/v) a ~ 45°C) (Apéndice A), que fueron repartidos uniformemente sobre la superficie del medio. Las cajas se incubaron a 37°C durante 8 horas y después se refrigeraron a 4°C por 2 horas, para evitar que el agar se adheriera a las membranas de nylon que se utilizarán para la transferencia del ADN, que se describe a continuación.

## 8.4. Transferencia del ADN a membranas de nylon

Se cortaron círculos de membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) con un diámetro de 12.7 cm que fueron humedecidos con agua desionizada estéril y dejados secar sobre un papel filtro. Una vez secas, cada membrana de nylon se colocó cuidadosamente sobre la

superficie de las cajas petri refrigeradas, teniendo cuidado de eliminar las burbujas de aire para tenerlas en estrecho contacto. Las membranas estuvieron en contacto con el agar durante 4 minutos, con el propósito de transferir el ADN de las placas de lisis a la membrana, realizándose asimismo marcas asimétricas en cada membrana y su respectiva caja para la orientación posterior del ADN de las placas. Una vez concluida la transferencia, cada membrana se sumergió en las siguientes soluciones sucesivamente.

1. NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M durante 4 minutos, con el propósito de desnaturalizar al ADN.
2. NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0) durante 4 minutos, para neutralizar la membrana
3. SSC 2x durante 4 minutos, con el fin de enjuagar las soluciones anteriores

Las membranas se dejaron secar sobre un papel filtro a la llama del mechero y el ADN se entrecruzó a la membrana aplicando dos ciclos de exposición óptima a luz ultravioleta (aproximadamente 2 minutos) en un equipo UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HS1.

## **8.5. Hibridación**

### **8.5.1. Prehibridación**

La(s) membrana(s) de nylon se introdujeron en tubos de hibridación, a cada tubo se le adicionaron 20 mL de solución de prehibridación (Apéndice A). El periodo de prehibridación fue de 1 hora a una temperatura de 58°C en un horno Stuart Scientific modelo S120H

### **8.5.2. Hibridación**

A cada tubo de hibridación se le adicionaron 75  $\mu$ L de sonda marcada, previamente desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos. El periodo de hibridación fue de 12 horas a una temperatura de 65°C.

## 8.6. Lavados

Los lavados se llevaron a cabo con el propósito de eliminar la sonda no específicamente unida a la membrana de nylon. La astringencia de los lavados se aumentó progresivamente. A continuación se muestran los lavados realizados.

1. Lavado #1 SSC 1X/SDS 0.1% durante 5 minutos a 55°C con rotación dentro del mismo tubo de hibridación
2. Lavado #2. SSC 1X/SDS 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante

Después de cada lavado se revisó el nivel de emisión  $\beta$  de cada membrana con un contador Geiger Technical Associates modelo PUG 1AB, cuidando que la radiación emitida fuera menor a 100 cpm.

## 8.7. Exposición y revelado de la película

La membrana de nylon ya lavada y aun húmeda se fijó a un soporte sólido y se cubrió completamente con Kleen Pack®, cuidando de eliminar todas las burbujas de aire entre la membrana y el recubrimiento plástico. La membrana se introdujo en un cassette Spectronics® Monotec (Spectronics Corporation) en contacto con una película Hyperfilm™MP (Amersham Pharmacia). El cassette se almacenó a -70°C durante 15 días.

El revelado de la película se realizó sumergiendo la película en revelador y fijador Kodak GBX durante 4 y 2 minutos, respectivamente. Todo el proceso de revelado se llevó a cabo en el cuarto oscuro



## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 1. Secuenciación del ADNc correspondiente a la timidina cinasa

El ADNc de la timidina cinasa aislado previamente en el laboratorio fue clonado en el plásmido pUC19 y secuenciado por métodos manuales. Para confirmar la identidad de cada base que conforma la secuencia de ADNc, completar la secuencia del inserto así como para corregir cualquier error que pudiera derivarse de la secuenciación manual, se encargó la secuenciación automatizada a un laboratorio comercial (ver Sección 2 de “Materiales y Métodos” para mayor información). Previo a la secuenciación del inserto, el plásmido se extrajo y se purificó según el protocolo de **Preparación de ADN de Plásmidos (MINIPREP)**, y una alícuota de éste se digirió con *EcoRI* para corroborar la presencia del inserto de ADNc. La secuencia reportada por este segundo método permitió la corrección de algunas bases cuya identidad era dudosa y la obtención de la secuencia completa del inserto. La secuencia se muestra en la figura 20 y la comparación con la secuencia obtenida manualmente en la Figura 21

```

1      CGGCCGCTGCGGCTCAGTCCGGCGAGATCCATGTCATCGTGGGCCCCATGTTCCGCCGCA
61     AGACCACCGCGCTCCTCCGCCGGTCCAGGCCGAGGCCGGCAACGGGAGGAGCGTGCCAC
121    TAATAAAGTCCGACAAAGACAACCGCTATGGATTGGATTCTGTTGTGACTCATGACGGTA
241    CAAAGATGGCGTGCTGGGCCTTGTCAGAACGTCAAGTTTTTCATGACAAATTAGGAATTG
301    AGGCCTATAATAAGGTAGATGTTATAGGTATCGATGAGGCCCAATCTTCGACGATCTTT
361    ATGATTTCTGCTGCAAAGCTGCAGATCGTGATGGAAAAATTGTAGTTGTGTGCTGGCCTAG
421    ATGGTGACTACAAACGGAGAAAGTTCCGGTTCAATTCTTGATATTGTTCCCTCTGGCTGACT
481    CGGTCACCAAGCTAACAGCACGCTGTGAGCTATGTGGTCGCCGGGCGTTCTTTACACTGA
541    GGAAGACGCAGAAACCAAGACTGAACTAATTGGAGGAGCAGATGTGTATATGCCCTGTGT
601    GCAGGCAGCACTACATGGATGGGCAGATTGTTATTGAGGCCACAAGGATTGTGTTGGACC
661    TTGACAAGCGGCCCGCAATTC

```

**Figura 20. Secuencia del ADNc de la timidina cinasa contenido en la clona de *E. coli* 842.** Subrayada se encuentra indicado el sitio de corte para *EcoRI* contenida en el plásmido de clonación. Esta secuencia es más larga en comparación con la secuencia de la Figura 16

Resultados Experimentales

	1	15 16	30 31	45 46	60
Clona δ42 no auto	- - - - -	AGTCCGGCCGACATCC	ATGTCATCGTGGGCC	CCATGTTGCCCGCA	
Clona δ42 auto	CGGCCGCTGCGGCTC	AGTCCGGCCGAGATCC	ATGTCATCGTGGGCC	CCATGTTGCCCGCA	
	61	75 76	90 91	105 106	120
Clona δ42 no auto	AGACCCACCGCGCTCC	TCCGCCGGGTCCAGG	CCGAGGCCGGCAACG	GGAGGAGCGTGGCAC	
Clona δ42 auto	AGACCCACCGCGCTCC	TCCGCCGGGTCCAGG	CCGAGGCCGGCAACG	GGAGGAGCGTGGCAC	
	121	135 136	150 151	165 166	180
Clona δ42 no auto	TAATAAAGTCCGACA	AAGACAACCGCTATG	GATTGGATTCTGTTG	TGACTCATGACGGTA	
Clona δ42 auto	TAATAAAGTCCGACA	AAGACAACCGCTATG	GATTGGATTCTGTTG	TGACTCATGACGGTA	
	181	195 196	210 211	225 226	240
Clona δ42 no auto	CAAAGATGGCGTGCT	GGGC--TGTCAGA-C	TGTCAG-TTTTTCATG	ACAAATTAGGAATTG	
Clona δ42 auto	CAAAGATGGCGTGCT	GGGCCTTGTCAGAAC	TGTCAGTTTTCATG	ACAAATTAGGAATTG	
	241	255 256	270 271	285 286	300
Clona δ42 no auto	AGGCCTATAATAAAGG	TAGATGTTATAGGTA	TCGATGAGGCCCAAT	TCTTC-GACGATCTT	
Clona δ42 auto	AGGCCTATAATAAAGG	TAGATGTTATAGGTA	TCGATGAGGCCCAAT	TCTTC-GACGATCTT	
	301	315 316	330 331	345 346	360
Clona δ42 no auto	TATGATTTCGCTGCTT	GCAAAGCTGCAGATC	GTGATGGA AAAATTG	TAGTTGTTGCTGGCC	
Clona δ42 auto	TATGATTT-CTGCT-	GCAAAGCTGCAGATC	GTGATGGA AAAATTG	TAGTTGTTGCTGGCC	
	361	375 376	390 391	405 406	420
Clona δ42 no auto	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
Clona δ42 auto	TAGATGGTGACTACA	AACGGAGAAAGTTCG	GTTCAATTCTTGATA	TTGTTCTCTGGGCTG	
	421	435 436	450 451	465 466	480
Clona δ42 no auto	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
Clona δ42 auto	ACTCGGTGACCAAGC	TAACAGCAGGCTGTG	AGCTATGFGGTGGCC	GGGCGTCTTTTACAC	
	481	495 496	510 511	525 526	540
Clona δ42 no auto	TGAGGAAGACGCAGG	AAACCAAGACTGAAAC	TAATTGGAGGACAC	AGTGTATATGCGCTG	
Clona δ42 auto	TGAGGAAGACGCAGG	AAACCAAGACTGAAAC	TAATTGGAGGACAC	AGTGTATATGCGCTG	
	541	555 556	570 571	585 586	600
Clona d42 no auto	TGAGGAAGACGCAGG	AAACCAAGACTGAAAC	TAATTGGAGGACAC	AGTGTATATGCGCTG	
Clona d42 auto	TGAGGAAGACGCAGG	AAACCAAGACTGAAAC	TAATTGGAGGACAC	AGTGTATATGCGCTG	

	601	615 616	630
Clona d42 no auto	GCCTTCATAGCGA GCGCGAATC		---
Clona d42 auto	GACCTTGACAACCG- GCGCGAATTCGAGC		

**Figura 21. Comparación de la secuencia de ADN de la clona  $\delta 42$  secuenciada por métodos no automatizados y por métodos automatizados.** En color rojo se indica la secuencia obtenida en el laboratorio por los trabajos de Plasencia y Romero (2000, ver Antecedentes). Los tamaños de las secuencias obtenidas por métodos no automatizados y automatizados son 506 y 631 pb respectivamente. Subrayadas se muestran las secuencias correspondientes al sitio de corte para Eco RI, contenida en el plásmido donde se clonó este ADNc.

La comparación de ambas secuencias de la clona  $\delta 42$  reveló que no se había secuenciado totalmente el inserto de la clona  $\delta 42$  pues únicamente se reportaban 506 pb. El tamaño de la secuencia completa de la clona  $\delta 42$  es de 631 pb, que se encuentran en marco abierto de lectura y codifican completamente para una proteína (Ver Apartado 2).

Si se considera que el tamaño promedio reportado para diferentes ARNm de la TK es de 1500 pb, es claro que el ADNc contenido en la clona  $\delta 42$  está truncado y que carece de aproximadamente 869 pb que seguramente incluirán los extremos 5' y 3' UTR.

## 2. Análisis de la secuencia del ADNc de la timidina cinasa

Una vez confirmada la secuencia del inserto, la secuencia de bases se tradujo a la secuencia de aminoácidos correspondiente considerando seis diferentes marcos de lectura, eligiéndose el único marco de lectura que generó una secuencia de aminoácidos sin interrupciones por codones de término (Figura 21). El resultado de la traducción fue una proteína de 204 residuos con un peso molecular aproximado de 23 000 Da.

Se localizaron e identificaron en la secuencia, los dominios de unión putativos para la timidina, el  $Mg^{2+}$  y el ATP (sustratos y cofactor de la reacción enzimática), que poseen las secuencias consenso -FQRKAFGSI-, -VIGIDEGQ- y -GPMFSGKSTEL- respectivamente (Posch *et al.*, 2000)

Se ha postulado la presencia de un sitio de fosforilación en la Ser 13 de TK de humano por CDKs y otros sitios posibles de fosforilación como son la Ser 231 (por acción de CDKs), la Ser 194 (por acción de proteína cinasas de Ser/Thr) y la Ser 30 (por acción de una proteína cinasa C, Chang *et al.*, 1998) Ninguno de estos tres residuos están presentes ni en la secuencia de TK de maíz, ni en TK de arroz. Los sitios putativos de fosforilación en TK de humano se muestran en la Figura 23. Asimismo, la Val 106 que se ha demostrado es importante para la oligomerización de la proteína (la mutación de Val 106 por Met conduce a la

formación permanente del tetrámero de TK de humano, independientemente de la exposición a ATP, Berenstein *et al.*, 2000)

```

1   AAAAQSGEIHVIVGPMFAGKTTALLRRVQAEAGNGRSVALIKSDKDNRYG
51  LDSVVTHDGTKMACWALSELSSFHDKLGI EAYNKVDVIGIDEAQFFDDL
101 DFCCKAARDRGKIVVAVGLDGDYKRRKFGSILDIVPLADSVTKLTARCEL
151 CGRRAFFTTLRKTQETKTELIGGADVMPVCRQHYMDGQIVIEATRIVLDL
201 DKRP

```

**Figura 22. Secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia del ADNc de la clona δ42.** Para realizar la traducción de la secuencia de aminoácidos, se realizó utilizando el programa BCM Search Launcher (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu>) Las secuencias consenso de unión a ATP, Mg<sup>2+</sup> y timidina respectivamente, están subrayadas

Para confirmar la identidad de la secuencia del ADNc clonado en δ42 y determinar las diferencias y homologías de ésta entre diferentes especies, se comparó la secuencia de aminoácidos con las reportadas en la base de datos del **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para el bacteriófago T4 (clave de acceso NP\_049719), el virus de la fiebre porcina africana (clave de acceso NP\_042744), el virus de la viruela ovina (clave de acceso P16600), el virus de la viruela porcina cepa Kasza (clave de acceso KIVZSK), el virus *Vaccinia* (clave de acceso AB96503), la bacteria *Escherichia coli* (clave de acceso P23331), el hongo *Dictyostelium discoideum* (clave de acceso AAB03673), los parásitos *Caenorhabditis elegans* (clave de acceso T26823) y *Leishmania major*. (clave de acceso CAB89611), las plantas *Oryza sativa* (clave de acceso 081263) y *Arabidopsis thaliana* (clave de acceso AAK44159) y los vertebrados *Gallus gallus* (clave de acceso P04047), *Mus musculus*. (clave de acceso IS8005), *Rattus norvegicus* (clave de acceso P27158) y *Homo sapiens* (clave de acceso 225602) (Figura 23)

Con base en los resultados, se observa el alto grado de conservación de las secuencias de los dominios de unión a ATP y Mg<sup>2+</sup> entre todas las diferentes especies comparadas. En contraste, resulta notable la baja homología entre la secuencia consenso del dominio de unión a la timidina entre las especies comparadas.

## Resultados Experimentales

	10	20	30	40	50	60
1) Bacteriófago T4						
2) Fiebre porcina						
3) Viruela ovina						
4) Viruela porcina						
5) Virus Vaccinia						
6) <i>E. coli</i>						
7) <i>D. discoideum</i>						
8) <i>C. elegans</i>						
9) <i>L. major</i>						
10) <i>G. gallus</i>						
11) <i>M. musculus</i>						
12) <i>R. norvegicus</i>						
13) <i>H. sapiens</i>						
14) <i>O. sativa</i>						
15) <i>A. thaliana</i>						
16) <i>Z. mays</i>						

	70	80	90	100	110	120
1) Bacteriófago T4						
2) Fiebre porcina						
3) Viruela ovina						
4) Viruela porcina						
5) Virus Vaccinia						
6) <i>E. coli</i>						
7) <i>D. discoideum</i>						
8) <i>C. elegans</i>						
9) <i>L. major</i>						
10) <i>G. gallus</i>						
11) <i>M. musculus</i>						
12) <i>R. norvegicus</i>						
13) <i>H. sapiens</i>						
14) <i>O. sativa</i>						
15) <i>A. thaliana</i>						
16) <i>Z. mays</i>						

## Resultados Experimentales

	130	140	150	160	170	180
1) Bacteriófago T4	FVDEAQFLKTEQVHOLSRIVD	TYNVPMAYGLR	TDFAGNLFEGSKEL	LAIADKLI	ELKAV	
2) Fiebre porcina	VVDEAHFFD-DLIK-CRTW	AEE-EKII	LAGLNASEEQMFPPI	IVRIFPYCS	VVKYIGRT	
3) Viruela ovina	GIDEGQFFK-DIVSFS	ENMANM-GKII	IAALDSTFQPKF	FNDI	LKLIPLSEKVT	KLNAV
4) Viruela porcina	GIDEGQFFN-DI	EFLEYIANK-GKIV	VIVAALDGT	YERKPF	FNINLNL	LIPLSEKVT
5) Virus Vaccinia	GIDEGQFFP-DIVEF	CEERMANE-GKIV	VIVAALDGT	FORKPF	FNINLNL	LIPLSEMVV
6) E. coli	LVDECOFLTRQQVY	ELSEVVDQLDIP	VLCYGLR	TDFR	GLFIFGSQY	LLAWSDKL
7) D. discoideum	GIDEGQFFP-DVVQF	SEDLANQ-GKTVI	IAALDGT	FQPKPF	QSVIDL	VSKAEYIT
8) C. elegans	SIDEGQFFE-DLAET	CEELAQR-GKVV	CVAAALNGT	FERKPF	QISLLLP	YANEIKQ
9) L. major	AIDEGQFFS-DLVDF	CNTAADA-GKVM	VVSALOGDY	RKRKPF	QICEL	VPYCEAVD
10) G. gallus	GIDEGQFFP-DIVEF	CEKMANE-GKTV	VIVAALDGT	FQPKAF	GSILNL	LVPLAESV
11) M. musculus	GIDEGQFFP-DIVDF	CEEMANE-GKTV	VIVAALDGT	FQPKAF	GSILNL	LVPLAESV
12) R. norvegicus	GIDEGQFFP-DIVDF	CEEMANT-GKTV	VIV-----			
13) H. sapiens	GIDEGQFFP-DIVEF	KEAMANA-GKTV	VIVAALDGT	FQPKPF	GAILNL	LVPLAESV
14) O. sativa	GIDEAQFFD-DLHDF	CCKAADRDKIV	VVAGLDG	DYKRNK	PGSVLDI	IPLADSVTK
15) A. thaliana	GIDEAQFFG-DLYEF	CCKVADDGKIV	VAGLDG	DYLRSS	GAVL	LDIIP
16) Z. mays	GIDEAQFFD-DLYDF	CCKAADRDKIV	VVAGLDG	DYKRNK	PGSILDI	VP
	190	200	210	220	230	240
1) Bacteriófago T4	CH-CGKKAIMTARLM	EDGTPVKEGNQICIG-	DEIYVSLCPKHWNEL	TKKLG-----		
2) Fiebre porcina	CMKCNQHNACQNV----	RKNADKTLILAGGSE	LYVTCCNNL	LKNTFIKQLQPIKY---		
3) Viruela ovina	CMECYKD-AAPSK----	RITKEKEIELIGGKE	KYKSVCPKCYFLE-----			
4) Viruela porcina	CMICHRD-ASFSK----	RLSDEKEIELIGGKE	YLSVCPKCYFLE-----			
5) Virus Vaccinia	CMKLFKE-ASFSK----	PLGEETEIEIIGGND	MYQNVCPKCYFVS-----			
6) E. coli	CF-CGRKASMLRLDQ	AGPPYNEGEQVVI	GGNERYVSVCPKH	KEALQVDSLTAI	QERHR	
7) D. discoideum	CMVLYNE-AAPSK----	RIVESDDIELIGGID	KYIIVCPGANS	DQNEGNSTKPS	KSTAR	
8) C. elegans	CVECGSO-ANFSF----	PSTLDKKEVIGGSD	TYTALCP	EVOKSEEKDAE	EQMKTGC	
9) L. major	CMMEHEQBAC:TR----	PTVNVEQQELIGG	ADMYIATCP	PKYF---	SKOQLPSIEM	RFO-
10) G. gallus	CMETVRE-ASYTK----	PLGAEREVEVIGG	ADKYHVP	PAIYFQKRP-Q	QLSENKENV	
11) M. musculus	CMETVRE-ASYTK----	PLGLKEVHVIGG	ADKYHVP	PAIYFQKSSA	QTAGSDNK-NC	
12) R. norvegicus	-----					
13) H. sapiens	CMETVRE-ASYTK----	PLGLTKEVEVIGG	ADKYHVP	PAIYFQKSSA	QTPAGDPNKENC	
14) O. sativa	CEIAGRR-AFPTL----	IKTRFTKTLIGG	ADVMP	PKHPOH	LDGQIVIEAT	RIVL-DI
15) A. thaliana	CEVCGHK-AFPTL----	RKNCDFTELI	GGADVMP	PKHPTNH	VIKASKK	VLEDS
16) Z. mays	CEIAGRR-AFPTL----	KTQFTKTELI	GGADVMP	PKHPOH	YMDGQIVIEAT	RIVL-DI

## Resultados Experimentales

	250	260	270	280	290	300
1) Bacteriófago T4						
2) Fiebre porcina	-----					
3) Viruela ovina	-----					
4) Viruela porcina	-----					
5) Virus <i>Vaccinia</i>	-----					
6) <i>E. coli</i>	RD-----					
7) <i>D. discoideum</i>	HSHSQSAPSVAPLAVNINPDDHLNNDY-----					
8) <i>C. elegans</i>	DKNENDITGIFLAKKEQRS DGSVSPRRKKIGLSKSMAL EATART-----					
9) <i>L. major</i>	RMAI KEVEKRYLGLSDKRATAS PQTPEK PAGGWCTKAGVATLPTM VKEGAASSGASAGMK-----					
10) <i>G. gallus</i>	PMGVKQLDMPASRKIFAS-----					
11) <i>M. musculus</i>	LVLGQPGEALVVRKLFASQQVLQYNSAN-----					
12) <i>R. norvegicus</i>	-----					
13) <i>H. sapiens</i>	FVPGKPGEA VAAARKLFAPQQI LQCS PAN-----					
14) <i>O. sativa</i>	EKSKVIHAFK-----					
15) <i>A. thaliana</i>	DKARAESCVAATI-----					
16) <i>Z. mays</i>	DKRP-----					

	310	320	330
1) Bacteriófago T4			
2) Fiebre porcina	-----	-----	-----
3) Viruela ovina	-----	-----	-----
4) Viruela porcina	-----	-----	-----
5) Virus Vaccinia	-----	-----	-----
6) <i>E. coli</i>	-----	-----	-----
7) <i>D. discoideum</i>	-----	-----	-----
8) <i>C. elegans</i>	-----	-----	-----
9) <i>L. major</i>	SGRGLCEMQAFTTETPKYQRVFACATAASSE	-----	-----
10) <i>G. gallus</i>	-----	-----	-----
11) <i>M. musculus</i>	-----	-----	-----
12) <i>R. norvegicus</i>	-----	-----	-----
13) <i>H. sapiens</i>	-----	-----	-----
14) <i>O. sativa</i>	-----	-----	-----
15) <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----
16) <i>Z. mays</i>	-----	-----	-----

**Figura 23. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la timidina cinasa reportadas para diferentes organismos.** Para seleccionar las especies a comparar, se realizó un análisis por BLAST de la secuencia de aminoácidos traducida a partir del ADNc de la clona  $\delta 42$ . A partir de los resultados del BLAST, se pudo determinar cuales secuencias almacenadas en la base de datos eran similares a la correspondiente de la clona  $\delta 42$ , así como la identidad de los organismos a quienes pertenecen dichas secuencias de proteínas. (1) Bacteriófago T4; (2) virus de la fiebre porcina africana; (3) virus de la viruela ovina; (4) virus de la viruela porcina, (5) virus Vaccinia; (6) *Escherichia coli*; (7) *Dictyostelium discoideum*; (8) *Caenorhabditis elegans*, (9) *Leishmania major*, (10) *Gallus gallus* (pollo); (11) *Mus musculus* (ratón); (12) *Rattus norvegicus* (rata), (13) *Homo sapiens* (hombre); (14) *Oryza sativa* (arroz); (15) *Arabidopsis thaliana*; (16) *Zea mays* (maíz) La comparación de las secuencias de aminoácidos se realizó con el programa MULTALIN multiple alignment. Subrayadas se indican las regiones de unión a ATP,  $Mg^{2+}$  y timidina respectivamente. En color morado, negritas y subrayado se indican los sitios putativos de fosforilación en la TK de humano y la Val 106 importante para la oligomerización de la proteína de humano



**Tabla 9. Porcentaje de identidad de la timidina cinasa de maíz con respecto a las timidina cinasas de otras especies según el análisis por BLAST.**

<i>Especie</i>	<i>Porcentaje de identidad con respecto a TK de maíz</i>
Bacteriófago T4	19%
Virus de la fiebre porcina africana	30%
Virus de la viruela ovina	41%
Virus de la viruela porcina	45%
Virus <i>Vaccinia</i>	42%
<i>Escherchia coli</i>	40%
<i>Dictyostelium discoideum</i>	41%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	40%
<i>Leishmania major</i>	47%
<i>Gallus gallus</i> (pollo)	47%
<i>Mus</i> sp. (ratón)	47%
<i>Rattus norvegicus</i> (rata)	39%
<i>Homo sapiens</i> (humano)	46%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	69%
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	90%

## Resultados Experimentales

	10	20	30	40	50	60
1) <i>O. sativa</i>						
2) <i>A. thaliana</i>	-----MEAQPSYPGEIHVI <u>VGPMFAGKTTALLRRVQVMKAG</u>					
3) <i>Z. mays</i>	-----AAAAQSGEIHVI <u>VGPMFAGKTTALLRRVQAEKAG</u>					
	70	80	90	100	110	120
1) <i>O. sativa</i>						
2) <i>A. thaliana</i>	TGRNVALIKSLKDNRYGLDSVVTHDGTKMPCWALPELSSFDKLGTEAYDKVDV <u>IGIDEA</u>					
3) <i>Z. mays</i>	NGRNVVALIKSKDNRYGLDSVVTHDGTKMACWALSELSSFHDKLGI EAYDKVDV <u>IGIDEA</u>					
	130	140	150	160	170	180
1) <i>O. sativa</i>						
2) <i>A. thaliana</i>	<u>QFFD-DLHDFCCKAADRDGKIVVVAGLDGDYKRNKFGSVLDIIP</u> LADSVTKLTARCEVCG					
3) <i>Z. mays</i>	<u>QFFD-DLHDFCCKAADRDGKIVVVAGLDGDYKRRKFGSIL</u> DIVPLADSVTKLTARCEVCG					
	190	200	210	220	230	240
1) <i>O. sativa</i>						
2) <i>A. thaliana</i>	RPAFFTLRKRTRSTKTELIGGADVMPVCRQHYLDGCVIIEATRIVL-DLEKSKVIHAFK-					
3) <i>Z. mays</i>	RPAFFTLRKRTRSTKTELIGGADVMPVCRQHYMDGQIVIEATPILVL-DLDRP-----					
	250					
1) <i>O. sativa</i>	-----					
2) <i>A. thaliana</i>	TI-----					
3) <i>Z. mays</i>	-----					

**Figura 24. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la timidina cinasa reportadas para arroz, *A. thaliana* y maíz.** Subrayadas se muestran las secuencias de unión a ATP, Mg<sup>2+</sup> y Thd (Hemayet Ullah *et al.*, 1999)

A partir de la comparación entre las secuencias de la TK de arroz, de *A. thaliana* y de maíz, se observa en el extremo amino terminal que la secuencia de AtTK es 21 aminoácidos más larga que la de arroz. En estas dos secuencias se identifica la metionina inicial, que está ausente en la secuencia de maíz ya que el ADNc está incompleto. En el extremo carboxilo terminal, la secuencia de TK traducida a partir del ADNc de la clona δ42 es 6 aminoácidos

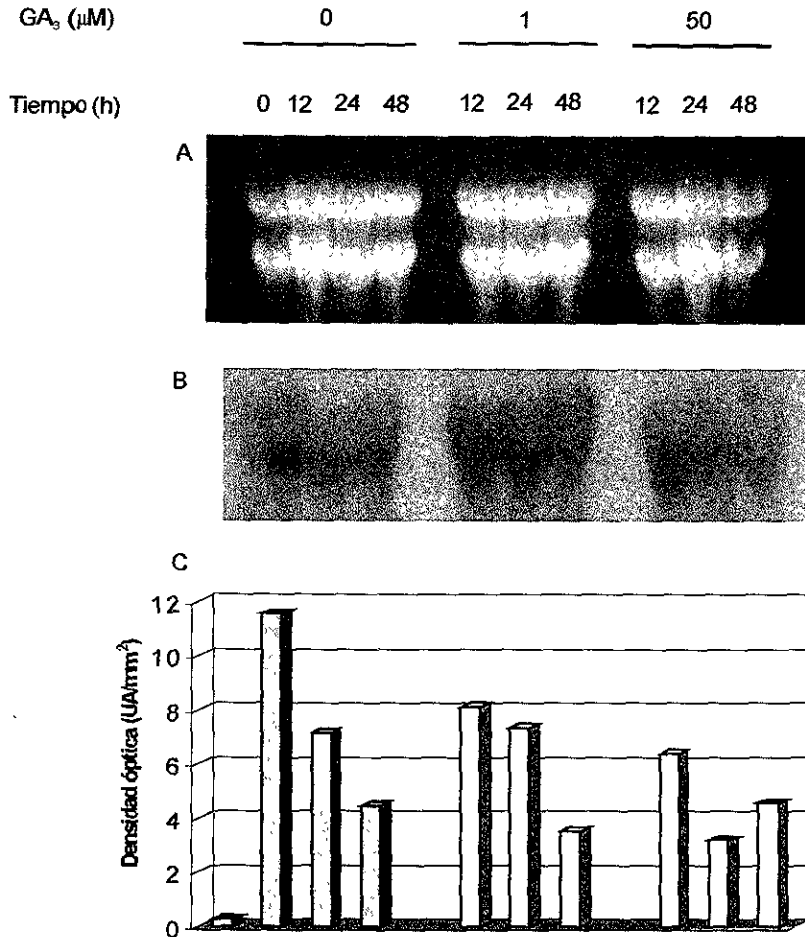
más corta que la TK de arroz, probablemente debido a que la secuencia del ADNc está incompleta.

### **3. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a la fitohormona ácido giberélico**

Estudios previos han demostrado que la síntesis de ADN comienza aproximadamente a las 15 horas después de iniciado el proceso de germinación (Reyes *et al.*, 1991). Con base en esto, se decidió determinar la cantidad de ARNm de la timidina cinasa transcrito a diferentes tiempos durante las etapas tempranas de la germinación. Se seleccionaron los tiempos de 0, 12, 24 y 48 horas de germinación para dicho fin. El ARNm total fue calibrado en geles de agarosa antes de realizar la transferencia (Figura 25A)

La autorradiografía se muestra en la Figura 25B en la cual se observa claramente que el transcrito está ausente en la semilla seca, pero a las 12 horas alcanza su máxima expresión, para después disminuir a las 24 y las 48 horas en ausencia de la fitohormona.

Cuando los ejes embrionarios fueron germinados en presencia de ácido giberélico 1  $\mu\text{M}$  también se observa un máximo de expresión a las 12 horas, que se mantiene a las 24 horas y disminuye a las 48 horas de germinación. Los ejes germinados bajo una concentración 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico exhiben un patrón de expresión similar al observado con la dosis menor de la hormona aún cuando ésta es 50 veces mayor a la de los niveles fisiológicos y, sin embargo, no modifica de manera extrema la regulación de la transcripción del gene de la TK. Cabe mencionar que ni siquiera se aprecia un aumento considerable en la cantidad de transcrito expresado en los controles, ya que en ningún caso de estimulación con ácido giberélico, se observa una cantidad de ARNm superior al registrado a las 12 horas en el control. El análisis densitométrico de estas autorradiografías se muestra en la Figura 25C. Este comportamiento parece estar de acuerdo con la hipótesis de que el control de la expresión de la enzima TK se encuentra estrictamente regulado a nivel transcripcional (Hengstschlager *et al.*, 1994)



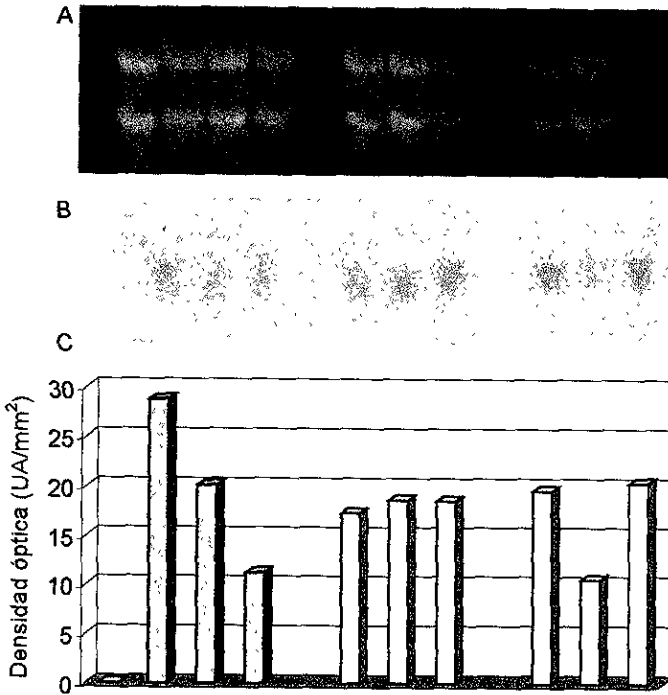
**Figura 25. Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios control y bajo la influencia del ácido giberélico. (A)** Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento de las muestras de ARN de los diferentes tiempos y condiciones de germinación. **(B)** Autorradiografía que muestra las distintas cantidades de transcrito en los diferentes tiempos y condiciones de germinación medidas por la técnica de Northern blot. **(C)** Comparación de la cantidad de transcrito de cada muestra a partir de la información proporcionada por el análisis de densitometría. Los ejes embrionarios se sembraron en medio MS con sacarosa al 2% (p/v).

#### **4. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a la fitohormona benciladenina**

Al igual que en el apartado anterior, se germinaron ejes embrionarios durante 12, 24 y 48 horas sin fitohormonas y en presencia de benciladenina 1  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ . Se incluyó un control de ejes embrionarios de semillas secas. Con base en reportes previos, se sabe que la benciladenina (una citocinina) estimula la replicación del ADN, por lo que cabría esperar una estimulación de este fenómeno en los ejes embrionarios. La cantidad de ARN cargada en cada carril se calibró en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Figura 26A).

La expresión del gene de la TK durante la germinación en ausencia de la hormona presentó el mismo patrón observado anteriormente; un aumento considerable durante las primeras 12 horas de germinación y una disminución subsecuente (Figura 26B). En presencia de la benciladenina no se observó un efecto inductor a las 12 horas pero sí se mantuvieron los niveles de expresión del transcrito a las 24 y 48 horas. Tampoco se observó un efecto de dosis entre las concentraciones de 1 y 50  $\mu\text{M}$  (Figura 26B). El análisis cuantitativo de la expresión del gene se muestra en la Figura 26C.

BA ( $\mu\text{M}$ )	0				1			50		
Tiempo (h)	0	12	24	48	12	24	48	12	24	48



**Figura 26.** Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios control y bajo la influencia de benciladenina. (A) Gel desnaturante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento de las muestras de ARN de los diferentes tiempos y condiciones de germinación. (B) Autorradiografía que muestra las distintas cantidades de transcrito en los diferentes tiempos y condiciones de germinación medidas por la técnica de Northern blot. (C) Comparación de la cantidad de transcrito de cada muestra a partir de la información proporcionada por el análisis de densitometría. Los ejes embrionarios se sembraron en medio MS con sacarosa al 2% (p/v).

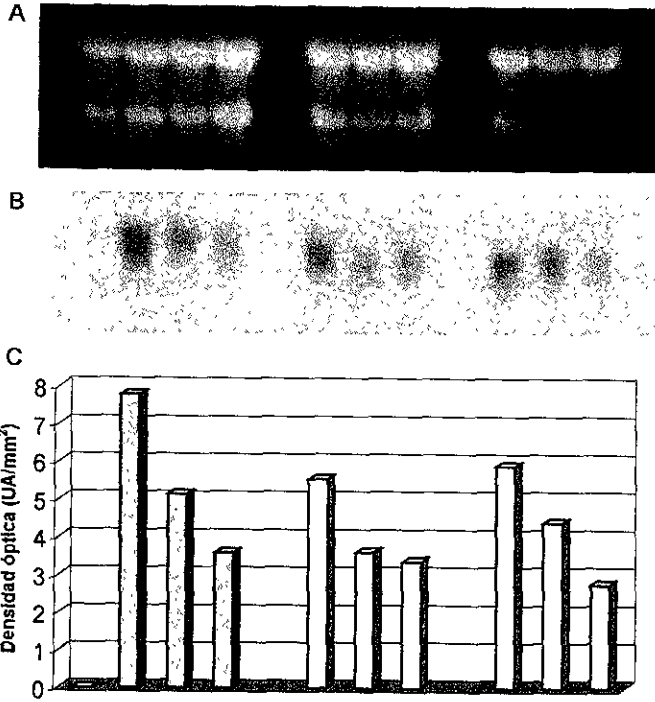
**5. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz expuestos a las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

Debido a que la acción hormonal se ve potenciada por la participación conjunta de dos o más fitohormonas se estudió la expresión del gene de la TK en presencia de auxinas y citocininas.

En la Figura 27A se presenta el gel desnaturizante de calibración que muestra la equivalencia en la cantidad de ARN en cada muestra a comparar.

Nuevamente se observó la expresión máxima a las 12 horas con una reducción gradual de la cantidad de transcrito, que está ausente en la semilla seca (Figura 27B). La expresión del gene en presencia de ambas hormonas a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de cada una, se observó también un máximo en la expresión a las 12 horas y una discreta reducción en los tiempos posteriores (Figura 27B y C)

BA/2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	0			1			50			
Tiempo (h)	0	12	24	48	12	24	48	12	24	48



**Figura 27. Expresión del transcrito de la timidina cinasa en ejes embrionarios control y bajo la influencia de benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (A) Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento de las muestras de ARN de los diferentes tiempos y condiciones de germinación. (B) Autorradiografía que muestra las distintas cantidades de transcrito en los diferentes tiempos y condiciones de germinación medidas por la técnica de Northern blot. (C) Comparación de la cantidad de transcrito de cada muestra a partir de la información proporcionada por el análisis de densitometría. Los ejes embrionarios se sembraron en medio MS con sacarosa al 2% (p/v).**



## 6. Análisis temporal de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa durante la germinación de embriones de maíz expuestos a las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Una vez observado el comportamiento de la expresión del gene de la timidina cinasa durante la germinación y bajo la estimulación hormonal en ejes embrionarios de maíz, se decidió cambiar el sistema experimental para determinar si el comportamiento ya observado previamente se mantenía durante la germinación de embriones completos de maíz. La diferencia entre los ejes embrionarios y los embriones de maíz radica en la presencia de escutelo en éstos últimos. Para este experimento se decidió utilizar nuevamente las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4 diclorofenoxiacético en conjunción.

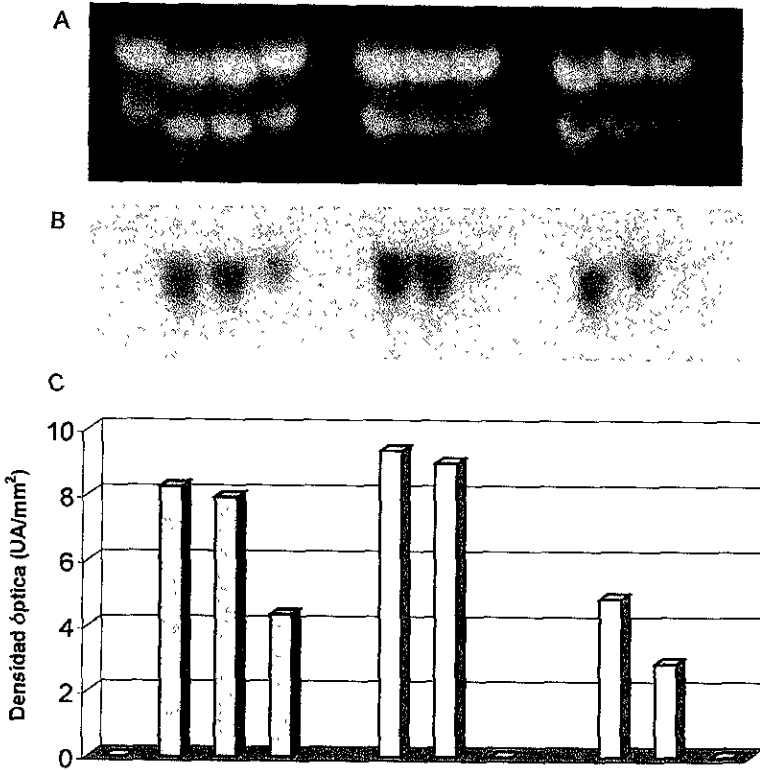
En la Figura 28A se muestra el gel desnaturalizante de calibración de la cantidad de ARN de cada muestra

Al igual que en todos los casos previos, la cantidad de transcrito en ejes y embriones secos es indetectable (Figura 28B). En lo que se refiere al control, el máximo de expresión del transcrito aparece a las 12 horas de germinación y se mantiene hasta las 24 horas, para finalmente disminuir dramáticamente a las 48 horas de iniciada la germinación.

En el caso de los embriones expuestos a una concentración 1  $\mu\text{M}$  de las hormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el patrón de expresión también difiere marcadamente con el observado para la germinación de los ejes embrionarios pues desde las 12 horas se observó inducción y los niveles del transcrito son más altos que en el control. Asimismo, los niveles elevados del transcrito se mantuvieron a las 24 horas, para decrecer notablemente a las 48 horas, lo que sugiere que la transcripción de dicho gene se detiene y la degradación del ARN mensajero elimina todas las copias remanentes de tiempos previos de la germinación (Figura 28B).

Por último, en el caso de la germinación de embriones bajo una concentración 50  $\mu\text{M}$  de las mismas dos hormonas, se aprecia claramente una disminución notable en la cantidad de transcrito del gene en todos los tiempos muestreados (12, 24 y 48 horas) en comparación con el control y la estimulación por benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 1  $\mu\text{M}$ . Asimismo, se observa un ligero máximo de expresión que aparece a las 12 horas y continúa hasta las 24 horas para después desaparecer casi por completo

BA/2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	0				1			50		
Tiempo (h)	0	12	24	48	12	24	48	12	24	48



**Figura 28.** Expresión del transcrito de la timidina cinasa en embriones control y bajo la influencia de benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (A) Gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento de las muestras de ARN de los diferentes tiempos y condiciones de germinación. (B) Autorradiografía que muestra las distintas cantidades de transcrito en los diferentes tiempos y condiciones de germinación medidas por la técnica de Northern blot. (C) Comparación de la cantidad de transcrito de cada muestra a partir de la información proporcionada por el análisis de densitometría. Los embriones se sembraron en medio MS sin sacarosa.

## **7. Análisis de los niveles de expresión del transcrito de la timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz**

Con el propósito de determinar la expresión de este gene tanto en tejidos diferenciados como no diferenciados del maíz, se extrajo el ARN total de: tallo, raíz, hoja, espiga, pistilo, inflorescencia femenina (3 días después de la polinización), embrión germinado durante 72 horas y eje embrionario germinado durante 12 horas. Todos los tejidos, a excepción del eje embrionario y el embrión germinado 72 horas fueron obtenidos a partir de una planta de 15 semanas de edad con 3 días de polinización, recolectada en el INIFAP de Zacatepec, Morelos.

En la Figura 29A se muestra el gel desnaturalizante de calibración de las muestras de ARN extraídas a partir de diferentes tejidos de la planta de maíz.

En la autorradiografía, se observó que los tejidos con los niveles más elevados del transcrito fueron el pistilo y el embrión inmaduro. Asimismo, se observaron muy bajos niveles del transcrito de TK en hoja y espiga, y no se detectó ni en raíz ni en tallo (Figura 29B y C).

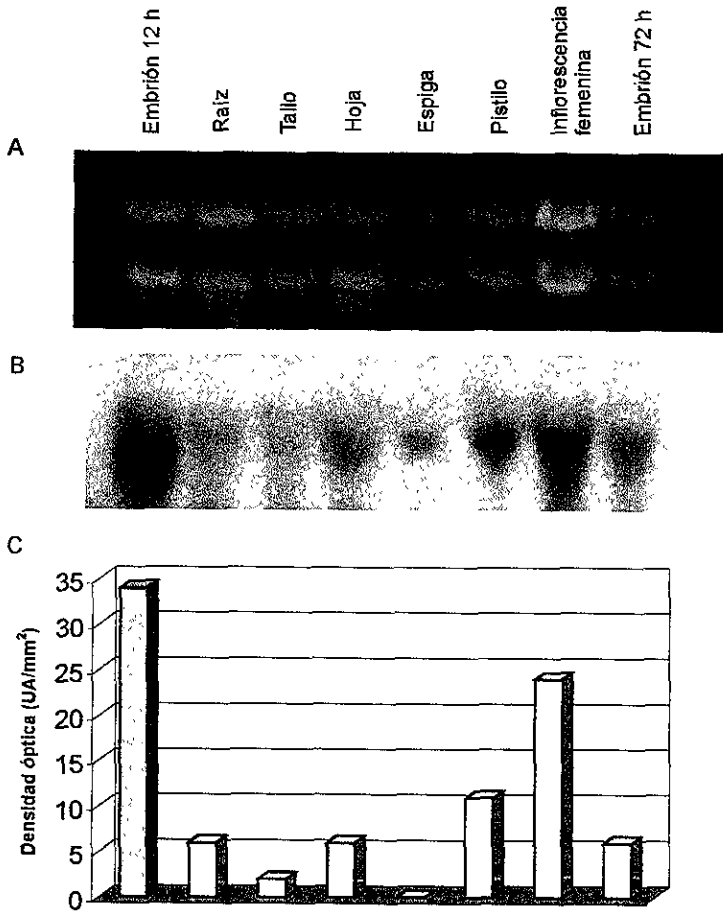


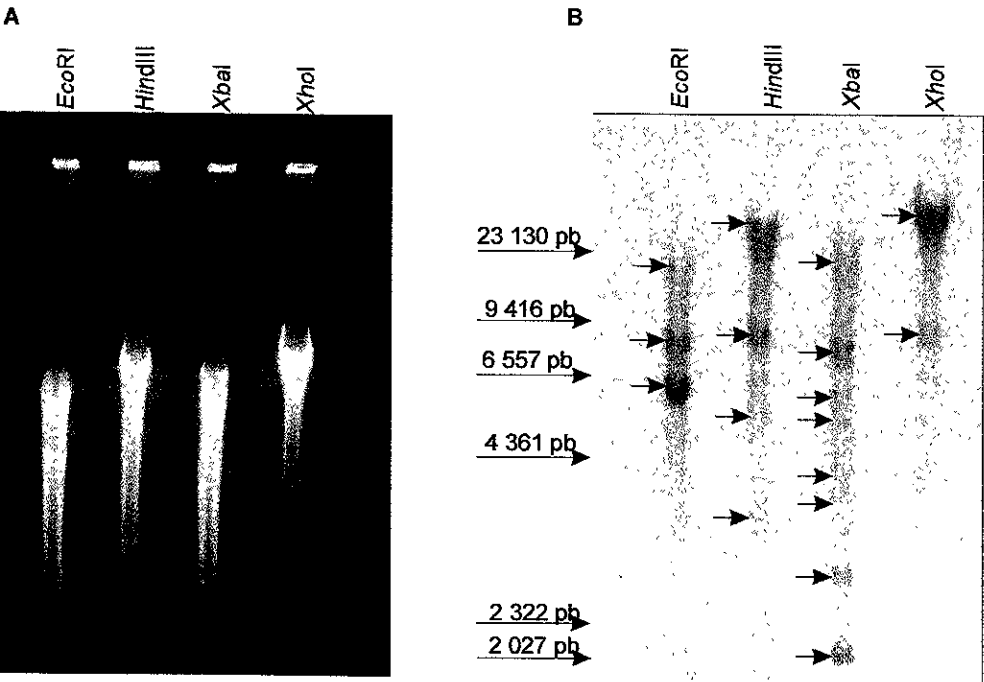
Figura 29. Expresión del transcrito de la timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz. (A) Gel desnaturante teñido con bromuro de etidio donde se muestra el corrimiento de las muestras de ARN de los diferentes tejidos de una planta de maíz. (B) Autorradiografía que muestra las distintas cantidades de transcrito en los diferentes tejidos de una planta de maíz medidas por la técnica de Northern blot. (C) Comparación de la cantidad de transcrito de cada muestra a partir de la información proporcionada por el análisis de densitometría.

## 8. Análisis del número de copias del gene de la timidina cinasa presentes en el genoma de maíz

En el genoma del maíz es común encontrar duplicaciones de genes y familias de genes, por lo que se realizó un experimento para estimar el número de copias del gene.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de ejes embrionarios de maíz de la raza Chalqueño. Para seleccionar las enzimas de restricción con las cuales digerir el ADN, se analizó la secuencia del ADNc de la timidina cinasa para determinar los sitios de restricción contenidos dentro de la misma (para este análisis se utilizó el programa BCM Search Launcher, <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu>). En vista de que no se contaba en el laboratorio con ninguna de las enzimas correspondientes a los sitios de restricción determinados, se eligieron las enzimas de restricción de uso común *EcoR* I, *Hind* III, *Xba* I y *Xho* I.

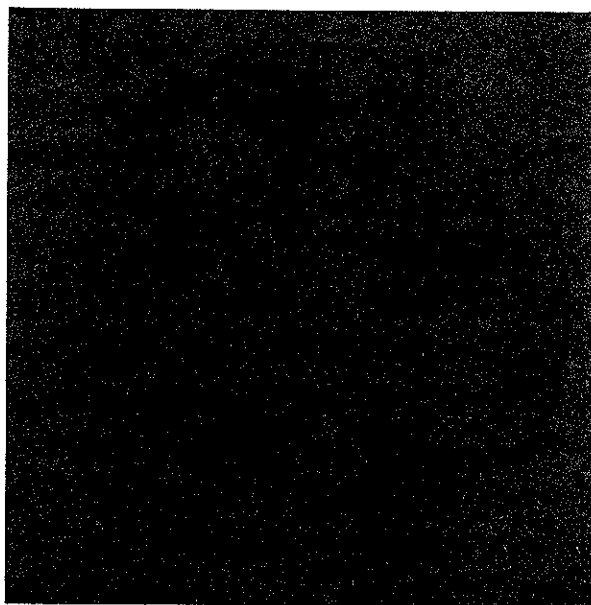
En la Figura 30B se muestra la autorradiografía correspondiente al análisis por Southern blot del ADN genómico de maíz hibridado con la sonda de TK. En el carril correspondiente a la digestión con *EcoR* I (carril 2) se observan 3 bandas, con tamaños moleculares de 7750 pb, 10 040 pb y 15 030 pb respectivamente. En el carril de la digestión con *Hind* III (carril 3) se aprecian 5 bandas, con sus respectivos tamaños moleculares de 4230 pb, 7530 pb, 8450 pb, 10 640 pb y 18 380 pb. En lo que corresponde a la digestión con *Xba* I (carril 4), el número de bandas es de 7, con tamaños moleculares de 2000 pb, 3000 pb, 4620 pb, 5330 pb, 7530 pb, 10 040 pb y 15 920 pb. Por último, la digestión con la enzima de restricción *Xho* I (carril 5) produjo 2 bandas con tamaños moleculares de 10 950 pb y 20 040 pb. El patrón de bandas resultante de las cuatro digestiones parece sugerir que el gene de la TK se encuentra presente en el genoma de maíz en un número discreto de copias, alrededor de dos o tres.



**Figura 30. Análisis del número de copias del gene de TK por Southern blot. (A)** Gel de agarosa: (1) digestión con *EcoR* I; (2) digestión con *Hind* III; (3) digestión con *Xba* I; (4) digestión con *Xho* I; **(B)** Autorradiografía del ADN transferido a una membrana de nylon e hibridado con la sonda 842 ZmTK: (1) digestión con *EcoR* I; (2) digestión con *Hind* III; (3) digestión con *Xba* I; (4) digestión con *Xho* I.

### 9. Escrutinio del banco genómico

Con el propósito de localizar y aislar la secuencia completa del gene de la timidina cinasa de maíz, se realizaron cuatro escrutinios del banco genómico Lambda FIX® II (Stratagene) que contiene secuencias de ADN genómico de maíz que van desde 9 hasta 23 kb, insertadas en el bacteriófago Lambda. A partir de la autorradiografía correspondiente al cuarto y último escrutinio (Figura 31) se seleccionaron cuatro señales de hibridación que probablemente corresponden a clones del bacteriófago lambda que contienen el gene de la timidina cinasa de maíz.



**Figura 31. Autorradiografía del cuarto escrutinio del banco genómico Lambda FIX@II. Las cuatro clonas seleccionadas se muestran encerradas en círculos y se identificaron como C3A, C3B, C3C y C3D de manera aleatoria.**

---

## DISCUSIÓN

### 1. Análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la timidina cinasa de maíz

El análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos del gene de la timidina cinasa ha demostrado que existe un importante grado de conservación en las regiones codificantes de los genes de mamíferos (ratón, hámster y humano, principalmente), pero también una gran diferencia entre las regiones 5' y 3' UTR de estos mismos genes (Flemington *et al.*, 1987 y Sorensen & Wintersberger, 1999). Además de la timidina cinasa de mamíferos, ya se han reportado las secuencias de ADNc para organismos como el bacteriófago T4, el virus del Herpes Simple, los virus de la viruela ovina y porcina (representantes virales), *E. coli* (una bacteria), *D. discoideum* (un hongo), *Leishmania major* (un parásito) y pollo (un eucariote no mamífero), entre otros. En el campo de las plantas, únicamente se ha reportado la secuencia de ADNc de la timidina cinasa de arroz (Hemayet Ullah *et al.*, 1999, No. de acceso en GenBank AF066050) y la secuencia genómica de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* genome initiative, 2000).

En este contexto, trabajos previos realizados en el laboratorio lograron aislar una clona de ADNc (clona  $\delta 42$ ) a partir de un banco de ADNc preparado a partir de ARNm de tallos y raíces de plántulas de maíz, y clonarla en un vector plasmídico (pUC19). La subsecuente secuenciación preliminar y búsqueda de secuencias homólogas en una base de datos revelaron que la clona correspondía al gene de la timidina cinasa de maíz; las secuencias con un mayor porcentaje de identidad con la clona  $\delta 42$  fueron las correspondientes a arroz y a *A thaliana* (Plasencia & Romero, 2000). La comparación de nucleótidos de las secuencias de la clona  $\delta 42$  y de la timidina cinasa de arroz produjo un 84% de identidad entre ambas secuencias. El alto grado de identidad entre ambas secuencias concuerda con el hecho de que ambas especies vegetales pertenecen a la familia de las gramíneas, lo que implica que filogenéticamente se encuentran próximas y que la preferencia en el uso de codones es similar.

Al traducir la secuencia de nucleótidos de la clona  $\delta 42$  se identificó un marco de lectura sin codones de término, hecho que no se observó con los otros 5 marcos de lectura posibles.

Según varios reportes, el tamaño promedio del ARNm de la timidina cinasa es de 1500 bp con un ORF de 702 bp (en humano y hámster; Bradshaw & Deininger, 1984, Flemington *et al.*, 1987 y Lewis, 1986). Por su parte, la secuencia contenida en la clona  $\delta 42$  tiene una longitud de 631 pb, es decir, corresponde a un ADNc incompleto que carece de las regiones 5' y 3' UTR. La caracterización de las regiones no traducidas resulta de interés porque contienen



secuencias como el sitio de unión del casquete (una molécula de 7-metilguanosina) en el extremo 5', así como el codón de inicio, cuya identificación corroboraría la elección hecha para el marco de lectura. Asimismo, es necesario determinar el codón de término de la traducción así como la señal de poliadenilación y otras secuencias que podrían estar involucradas en la regulación transcripcional en la región 3' UTR.

Para muchas enzimas, como aquellas que catalizan la ruta glicolítica, se ha comprobado, en plantas, la existencia de una isoforma citosólica e isoformas organelares. Por este motivo, resulta interesante y pertinente analizar la posible existencia de secuencias de tránsito organelar para tratar de determinar la localización de la timidina cinasa estudiada.

Mikulits *et al.* (1995) han reportado la posible existencia de un factor de naturaleza molecular desconocida que pueda unirse al ARNm probablemente en la regiones no traducidas e impedir la síntesis de la timidina cinasa en humano. Los estudios sobre la regulación post-transcripcional de la enzima timidilato sintasa demuestran que esta enzima es capaz de unirse a su propia molécula de ARNm (mediante dos secuencias localizadas en el 5' UTR y en la región codificante) y evitar su traducción (Sutterluety & Seiser, 1997, Chu & Allegra, 1996 y Lin *et al.*, 2000). Esta información justifica la búsqueda y posterior caracterización de las regiones no traducidas 5' y 3' del ARNm de la timidina cinasa de maíz, que podría contener elementos similares a los de transcritos de otras especies

## 2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la timidina cinasa de maíz

Como ya se mencionó, la traducción de la secuencia de la clona  $\delta 42$  demostró que se encuentra en marco de lectura. La secuencia de aminoácidos traducida posee 204 residuos que corresponden a un tamaño molecular teórico de 23 000 Da. Este resultado concuerda con los reportes del tamaño de la timidina cinasa, que oscila entre 24 000 y casi 26 000 Da (Lewis, 1986, Bradshaw & Deininger, 1984, Flemington *et al.*, 1987 y Sherley & Kelly, 1988) Esta evidencia refuerza las observaciones concernientes a la alta homología entre diversas especies, en lo que se refiere a la secuencia proteica de la timidina cinasa.

En la timidina cinasa de mamíferos se han identificado tres motivos indispensables para la actividad catalítica: el sitio de unión a ATP, a  $Mg^{2+}$  y a Thd (Wintersberger, 1997 y Posch *et al.*, 2000) Con base en dichos estudios, se identificaron estos motivos en la secuencia de aminoácidos de la timidina cinasa de maíz. En lo que respecta a los sitios de unión de ATP y  $Mg^{2+}$ , se aprecia un elevado grado de conservación entre maíz y organismos tan dispares como pollo, humano, ratón, *L. major*, *E. coli*, e incluso con los virus de la viruela ovina, porcina y *Vaccinia*. La conservación filogenética de estos motivos confirma su

importancia en la actividad catalítica de la enzima. A diferencia de los motivos para ATP y  $Mg^{2+}$ , el motivo de unión de Thd de la TK de maíz no presenta un grado de homología tan alto con respecto a las correspondientes enzimas de mamíferos, hongos, parásitos o virus, pero destaca su parecido con las otras TKs vegetales (arroz y *A. thaliana*). Además de confirmar la importancia de los sitios de unión en el desempeño catalítico, la homología entre éstos en prácticamente todas las especies permite determinar o confirmar la identidad de cualquier secuencia que se sospeche pertenece a una timidina cinasa.

Comparando las secuencias proteicas de las TKs de arroz y maíz se observa que ésta última carece de los dos primeros aminoácidos (en el extremo amino terminal) y los últimos seis (en el extremo carboxilo terminal), debido a que no se tiene completa la secuencia del ADNc.

En humano, la Val 106 es importante para la correcta oligomerización de la proteína (Berenstein *et al.*, 2000). Este residuo se encuentra conservado en la TK de varios virus, *E. coli*, *D. discoideum*, *L. major*, pollo, ratón, y rata, pero no en *C. elegans*. Las TKs de arroz, *A. thaliana* y maíz carecen también de este residuo. Hasta el momento no existen análisis cristalográficos de ninguna TK a excepción de la del virus del Herpes Simple. Los datos derivados del análisis cristalográfico de la proteína de este virus indican que una valina en la posición 119 participa en la unión intermonomérica (Evans *et al.*, 1998). Determinar si esta Val 119 corresponde a la Val 106 de humano requerirá de la cristalización de la proteína y su análisis por Cristalografía de Rayos X. Cabe mencionar que existen diferencias significativas entre la estructura de la timidina cinasa viral y las de procariotes y eucariotes; en el caso de la primera, se ha demostrado que su conformación activa es homodimérica, mientras que para el resto de las TKs se sabe que la conformación activa es homotetramérica (Munch-Petersen *et al.* 1995, Evans *et al.*, 1998 y Berenstein *et al.*, 2000). Adicionalmente, la TK viral es menos específica que la procarionte y eucariote (Evans *et al.*, 1998). Estas discrepancias dificultan la obtención de conclusiones sobre la función de ciertos residuos en el plegamiento y oligomerización de la proteína a partir de comparaciones de las secuencias de aminoácidos.

### **3. Análisis de la expresión de la timidina cinasa durante la germinación de ejes y embriones de maíz**

Una variedad de estudios sobre la replicación del ADN durante la germinación han permitido caracterizar temporalmente algunos sucesos importantes en dicho proceso. Reyes y colaboradores (1991) y Coello y colaboradores (1992) demostraron que en semillas de maíz, la síntesis del ADN asociado a la fase S del ciclo celular se presenta entre las 12 y las 15

horas de la germinación Existen reportes (Bewley & Black, 1992 y Flores, 1999) que indican que en embriones secos de maíz existen poblaciones celulares que ya han replicado su material genético y, por tanto, se encuentran en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular, mientras que la parte restante de la población aun no lo ha hecho (es decir, se encuentran en la fase G<sub>1</sub>). En apoyo a estas evidencias, las primeras horas de la germinación se caracterizan por un alto porcentaje de la población celular del embrión (75%) detenida en la fase G<sub>1</sub>, un notable incremento de células en G<sub>1</sub> a las 4 horas de la germinación y una concomitante disminución en la proporción de células en S (Coello *et al.*, 1992). Se ha postulado que este fenómeno sincroniza a las células en la fase G<sub>1</sub> con el fin de proteger al embrión del estrés que acompaña a la germinación (Georgieva *et al.*, 1994 y Fransolet *et al.*, 1979).

Además de la incorporación de timidina al ADN entre las 12 y 15 horas de la germinación, Castroviejo y colaboradores (1979) reportaron una previa incorporación de timidina al ADN a las 6 horas de la germinación. En experimentos con cultivos celulares de mamíferos, se ha confirmado la incorporación temprana de timidina y se ha asociado a la reparación del ADN genómico y a la síntesis del ADN mitocondrial (Spyrou & Reichard, 1988 y Bianchi *et al.*, 1997).

Estudios con cultivos celulares de mamíferos (e.g. linfoblastos T humanos CEM CCL 119, fibroblastos de ratón, células de ratón 3T6 y células leucémicas de ratón L1210) bajo dos condiciones diferentes como son: (1) proliferación exponencial después de ser sincronizados en la misma fase del ciclo celular o (2) estimulados por la adición de suero fetal bovino después de permanecer en un estado quiescente previo, demostraron que antes de la replicación del ADN, aumenta la actividad enzimática de las enzimas involucradas en la síntesis de los nucleótidos precursores del ADN. Cabe mencionar que en muchos casos dicho aumento se asocia a un incremento paralelo en los procesos de transcripción y traducción de la proteína, aunque en unos pocos casos, la mayor cantidad de proteína también se debe a la disminución de la degradación específica de la proteína (Bianchi *et al.*, 1997 y Reichard, 1988). Entre las enzimas que exhiben este comportamiento están la ribonucleótido reductasa (Reichard, 1998 y Bianchi *et al.*, 1997), la dihidrofolato reductasa y la timidina cinasa (Wintersberger, 1997) No todas las enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos exhiben cambios en su actividad según la etapa del ciclo celular, ya que hay reportes de que las enzimas citidina cinasa y CMP cinasa no presentan este comportamiento (Bianchi *et al.*, 1997).

Los ensayos por Northern blot realizados en el presente trabajo sobre la expresión del gene de la timidina cinasa demostraron un máximo de transcrito a las 12 horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz y una disminución paulatina a las 24 y 48 horas, lo

que concuerda con el conjunto de evidencias sobre el momento de la replicación antes mencionado. Resulta relevante que en ejes secos, no se detectó el transcrito de la timidina cinasa, a pesar de que se ha detectado la actividad de la enzima en embriones secos de maíz (Georgieva *et al.*, 1994). Esta discrepancia pudiera deberse a que en embriones secos se encuentra presente una timidina cinasa residual del proceso de maduración de la semilla, que probablemente habilite a la célula para incorporar timidina al ADN durante las etapas más tempranas de la germinación e independientemente de la síntesis de proteínas. Es posible también que el transcrito estuviese presente, pero en niveles muy bajos como para haberlo detectado en los ensayos de Northern blot.

Los estudios de expresión de la timidina cinasa en ejes embrionarios se realizaron en medio MS suplementado con sacarosa al 2%. Trabajos previos en el laboratorio (*resultados no publicados*) habían demostrado que la germinación de los ejes en ausencia de sacarosa se retrasaba en comparación con la correspondiente a embriones de maíz. Aunque en nuestros ensayos el propósito de adicionar sacarosa como una fuente de carbono y energía era proveer al embrión de condiciones más propicias para su germinación, se ha demostrado que los azúcares (*e.g.* glucosa y sacarosa, entre muchos otros) pueden funcionar como moléculas señalizadoras que controlan la expresión de genes así como procesos de desarrollo en las plantas (Sheen *et al.*, 1999)

La sacarosa es el carbohidrato más utilizado en los estudios de regulación de la expresión y el desarrollo en respuesta a azúcares en plantas. Sin embargo, en muchos casos los efectos atribuidos a la sacarosa pueden ser evocados por glucosa y/o fructosa. Entre los procesos fisiológicos regulados por los azúcares, se cuentan la embriogénesis, la germinación, el desarrollo de la plántula, la morfogénesis de la raíz y la hoja, la floración y las respuestas al estrés, entre otros (Sheen *et al.*, 1999).

Los azúcares pueden regular la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Algunos de los genes cuya expresión puede ser reprimida por azúcares son los de la  $\alpha$ -amilasa de arroz y la malato sintasa de pepino; por el contrario, los genes cuya expresión puede inducirse por acción de estos compuestos son los de la patatina y la  $\beta$ -amilasa (Sheen *et al.*, 1999). Con base en esta evidencia, es muy probable que la sacarosa suplementada en los ensayos haya desempeñado alguna función regulatoria sobre la expresión génica, aunque como se discute un poco más adelante, no se observó ningún efecto notable cuando no se incorporó sacarosa exógena a cultivos de embriones.

Las tres evidencias experimentales, derivadas de los trabajos de Georgieva y colaboradores (1994), que sugieren que la actividad de la timidina cinasa puede servir como un marcador de la replicación del ADN durante la germinación son: (1) el aumento de la

actividad a las 12 horas, alcanzando un máximo a las 30 horas de la germinación, (2) un segundo aumento de la actividad a las 72 horas de la germinación y, (3) el hecho de que toda la población celular del embrión ha pasado por la fase S después de las primeras 60 horas, lo que significaría que el segundo máximo de actividad a las 72 horas puede representar la fase S de un segundo ciclo de proliferación (Georgieva *et al.*, 1994). Los estudios de expresión del gene de la timidina cinasa presentados en este trabajo, concuerdan con las evidencias descritas con anterioridad, ya que en nuestro estudio se aprecia un máximo en la cantidad de transcrito a las 12 horas de la germinación, que concuerda cualitativamente con el incremento en la actividad reportado. La diferencia temporal entre los máximos de transcripción y actividad (12 y 30 horas respectivamente) podría deberse al periodo de desfase entre la transcripción y los procesos de traducción y oligomerización de la proteína. Cabe mencionar que el aumento paralelo en la transcripción del gene y en la correspondiente actividad enzimática no necesariamente están relacionados, ya que Georgieva *et al.* (1994) detectaron la actividad de la TK en ejes secos, mientras que en este trabajo no se detectó el transcrito en este tejido, por Northern blot. Técnicas más sensibles como transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) podrían emplearse para la detección de bajos niveles de este transcrito. Las evidencias concernientes a la expresión de la TK presentadas en este trabajo, resultan insuficientes para concluir si la transcripción del gene de la timidina cinasa puede ser considerado un marcador de la fase S del ciclo celular durante la germinación.

El aumento en el nivel de transcrito de la timidina cinasa a las 12 horas de la germinación que se detectó en nuestros ensayos, no es un evento aislado y existen varias evidencias, en otros sistemas biológicos vegetales, que concuerdan con dicho aumento de la transcripción del gene de la TK en la germinación: (a) la síntesis de nucleótidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) necesarios para la síntesis de desoxirribonucleótidos comienza con la imbibición de la semilla (Bewley & Black, 1992); (b) la semilla seca cuenta con todos los componentes moleculares para dar inicio a la síntesis de aquellas proteínas que participan en la replicación del ADN en cuanto comience la entrada de agua (Bewley & Black, 1992), por ejemplo en trigo la síntesis de proteínas principia a los 30 minutos de iniciada la imbibición (Castroviejo *et al.*, 1979); (c) la síntesis *de novo* de ARNm inicia en los primeros 30 a 90 minutos después de la entrada de agua, por lo que resulta posible que el ARNm de la timidina cinasa se sintetice en etapas tempranas de la germinación (Bewley & Black, 1992), (d) existe evidencia de que los embriones de trigo, centeno y soya poseen cantidades suficientes de ARN polimerasas para mantener la síntesis de ARNm durante toda la germinación (Bewley & Black, 1992).

Otro marcador fundamental de la fase S es la síntesis de histonas que está estrechamente ligada a la replicación del ADN; durante la germinación, la síntesis de estas proteínas aumenta entre las 12 y 24 horas (Bewley & Black, 1992), lo que coincide con la replicación del ADN y el aumento en la transcripción del gene de la timidina cinasa que se reporta en este estudio

Por su parte, la cantidad de la proteína PCNA de maíz que participa directamente en la replicación del ADN, aumentando la procesividad de la ADN polimerasa  $\delta$ , exhibe un máximo cuando la actividad de la timidina cinasa es mayor, a las 30 horas de la germinación (Georgieva *et al*, 1994).

Otra proteína fundamental en la replicación del ADN es la proteína de replicación A (RPA), y se ha observado que el transcrito de la subunidad RPA-1 alcanza el máximo a las 12 horas de la germinación (Jaimes, 2001), de manera concomitante al aumento en el ARNm de la timidina cinasa de maíz.

Por último, se ha sugerido que la regulación transcripcional de la timidina cinasa en algunas especies depende del factor de transcripción E2F. En este sentido se sabe que la expresión de los genes que codifican a los miembros de la familia E2F en células animales aumenta en la transición G<sub>1</sub>/S, asimismo, la proteína de retinoblastoma se hiperfosforila en dicha transición, liberando a E2F y permitiendo la transcripción mediada por dicho factor (Lavia & Jansen-Dürr, 1999).

Además de los estudios de expresión de la timidina cinasa durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, se estudió la expresión de este mismo gene bajo las mismas condiciones experimentales, pero en embriones de maíz y sin suplementar el medio con sacarosa. Los resultados del análisis por Northern blot indican un máximo de expresión a las 12 horas, que a diferencia del ensayo con ejes, se mantiene a las 24 horas y disminuye notablemente a las 48 horas. Este patrón de expresión concuerda con las evidencias de los estudios de Georgieva y colaboradores (1994) mencionados arriba. Este comportamiento debe ser consecuencia de la presencia del escutelo en los embriones, o de la ausencia de sacarosa exógena, ya que son las únicas diferencias que existen entre ambos sistemas biológicos.

El mantenimiento de la expresión de la timidina cinasa a las 24 horas podría ser consecuencia de la protección al estrés que ofrece el escutelo al eje embrionario. Es posible descartar que el patrón de expresión observado se deba al aporte de nutrientes desde el escutelo hacia el eje, ya que la movilización de lípidos en semillas de cereales se inicia a los 3 días de la germinación (es decir, es un evento post-germinativo) y las proteínas no se utilizan como fuente de energía, sino como reservorio de aminoácidos.

Como ya se mencionó, a diferencia de los ensayos con ejes embrionarios, los embriones se sembraron en medio MS sin sacarosa. A pesar de esta diferencia importante, el patrón de expresión del gene de la TK se mantuvo consistente con el observado previamente para la expresión de la TK en ejes embrionarios. Este hecho sugiere que la sacarosa aplicada a los ejes no tuvo un efecto de magnitud considerable sobre la expresión de la TK en los tiempos estudiados, aunque la evidencia no es concluyente.

#### **4. Análisis de la expresión de la timidina cinasa durante la germinación de ejes y embriones de maíz bajo la influencia de fitohormonas exógenas**

Las giberelinas participan en la transducción de las señales que inician la germinación (Karssen, 1995 y Raven *et al.*, 1992) y, ya durante este proceso, estimulan la elongación celular y la división celular del eje embrionario (Bewley & Black, 1994 y Karssen, 1995). Estos efectos en particular motivaron el estudio de la expresión de la timidina cinasa bajo los efectos del ácido giberélico. Los resultados demuestran que, con una concentración 1  $\mu\text{M}$ , el máximo de expresión ocurre a las 12 horas, se mantiene a las 24 horas y disminuye a las 48 horas; sin embargo, a pesar de los efectos reportados de estimulación sobre la división celular, los niveles de transcrito observados experimentalmente ni siquiera igualan los niveles de transcrito observados a las 12 horas en ejes germinados sin giberelinas exógenas. La explicación más probable para este comportamiento sería que el ácido giberélico aceleró la transcripción del gene de la timidina cinasa, es decir, el máximo de transcripción observado a las 12 horas en el control sucedió en tiempos previos a las 12 horas cuando se suministró la fitohormona de manera exógena; esta explicación concuerda con el efecto estimulador de la giberelinas sobre la división celular. Cabría adelantar otras posibles explicaciones para este fenómeno, que aunque menos probables, ya no se cuenta con evidencias suficientes para descartarlas completamente, como podrían ser una menor sensibilidad del eje a las giberelinas debido a una baja cantidad de receptores o la presencia de un efecto inhibitorio no reportado del ácido giberélico.

Cuando los ejes se germinaron en 50  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico, se observó un patrón de expresión similar al descrito, con un nivel máximo a las 12 horas y una consecuente disminución a las 24 y 48 horas. Las posibles explicaciones son las mismas ya mencionadas, aunque en este caso el exceso de giberelinas (muy por encima de concentraciones fisiológicas) pudiera tener una función inhibitoria más clara.

Las citocininas estimulan la división celular y la síntesis de ADN y ARN. Asimismo, existen reportes de que la benciladenina (una citocinina sintética) acelera la replicación del

ADN pues provoca un aumento en la actividad de la ADN polimerasa nuclear a las 6 horas de la germinación, en contraste con las 12 horas en ejes embrionarios sin estimulación, y se refleja en una aparición más temprana de los cuerpos mitóticos, que se observan a las 15 y 24 horas de la germinación, es decir, adelanta la división celular (Reyes *et al.*, 1991 y Bewley & Black, 1994).

En este contexto, la adición de BA exógena a ejes de maíz tuvo como consecuencia un patrón de expresión de la timidina cinasa muy similar tanto para 1  $\mu\text{M}$ , como para 50  $\mu\text{M}$  de BA, al observado en la adición de GA<sub>3</sub> exógena. De manera similar, este patrón de expresión pudiera deberse a que el máximo de expresión del gene de la TK ocurrió en tiempos previos a las 12 horas cuando se administró BA exógena, lo que estaría de acuerdo con el efecto estimulador de la síntesis de ADN y ARN y de la división celular. Otras posibles (aunque menos probables) explicaciones de este comportamiento serían una disminución en la sensibilidad a la hormona, o efectos inhibitorios asociados a la BA, aunque con las concentraciones de hormona cercanas a los niveles fisiológicos, esta última opción parece la menos probable.

En plantas superiores, las fitohormonas auxina y citocinina estimulan la proliferación celular, y se han asociado al avance de la transición G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M. El efecto que ejercen las auxinas parece ser el de activar los promotores de las CDKs (CDK-a en *A. thaliana*), y aumentar los niveles de CDKs (en cultivos de tabaco). En el caso de las citocininas, también son capaces de activar a los promotores de las CDKs (pero en menor grado comparadas con las auxinas) y activar a las CDKs. Recientemente se demostró la inducción de CycD3 por las citocininas tanto en cultivos celulares como en plantas completas (Soni, 1995 y den Boer & Murray, 2000).

Estas evidencias sugirieron probar el efecto simultáneo de las citocininas y las auxinas sobre la germinación de ejes de maíz. El patrón de expresión fue el siguiente: con 1  $\mu\text{M}$  de BA y 2,4-D, un nivel máximo a las 12 horas, seguido de la disminución a las 24 y 48 horas. Para 50  $\mu\text{M}$  de las mismas hormonas, también un máximo a las 12 horas y una disminución escalonada a las 24 y 48 horas. De nuevo, las explicaciones más plausibles son una disminución en el tiempo en el que ocurre la replicación del ADN y la división celular, una menor sensibilidad a las hormonas o la inhibición por acción de las hormonas exógenas.

Cabe mencionar que, al igual que en los ensayos con ejes embrionarios sin adición de fitohormonas, en este caso se suplementó el medio con sacarosa al 2%. Diversos estudios han demostrado que existe interrelación entre los efectos atribuidos a las fitohormonas y aquellos atribuidos a la glucosa. En nuestro caso, a partir de la comparación con el control correspondiente, resulta evidente que las fitohormonas sí tuvieron un efecto sobre la expresión



de la TK, pero no es posible elucidar si dicho efecto se debe únicamente a las fitohormonas o a alguna posible interacción entre éstas con la sacarosa (o algún producto del metabolismo de ésta).

Por último, se decidió probar el efecto de citocininas y auxinas sobre embriones de maíz. El patrón de expresión en este caso fue diferente al observado para la aplicación de fitohormonas exógenas al eje embrionario, pues a una concentración  $1 \mu\text{M}$ , se registró un máximo de expresión a las 12 horas que superó los niveles de expresión del control correspondiente a ese tiempo de germinación. A las 24 horas se mantuvieron constantes los niveles de transcrito y superiores al control correspondiente. Curiosamente, la expresión de la timidina cinasa prácticamente desapareció a las 48 horas. En este caso las fitohormonas parecen acelerar el ciclo celular (siendo uno de los efectos el aumento de la transcripción del gene de la timidina cinasa), por lo que la desaparición del ARNm de la TK a las 48 horas pudiera significar que un porcentaje mayoritario de la población celular ha concluido ya la primera división celular de la germinación.

En el caso de una concentración  $50 \mu\text{M}$  de ambas hormonas, el patrón es completamente distinto al anterior; también se observa un máximo a las 12 horas, pero comparado con el control y  $1 \mu\text{M}$ , los niveles son muy inferiores (alrededor del 50% con respecto al control y del 44% con respecto a  $1 \mu\text{M}$ ), así como la sucesiva disminución a las 24 horas y la desaparición a las 48 horas. La inhibición de la división celular es clara en este caso, si nos atenemos a lo indicado por el nivel de transcrito. La desaparición total del mensaje a las 48 horas sugiere que el transcrito de la TK es de rápido recambio.

Es poco probable que el escutelo haya proporcionado sacarosa o algún otro tipo de azúcares al eje en el tiempo que se empleó en estos experimentos, ya que las principales reservas del escutelo están conformadas por lípidos y proteínas, y la movilización de lípidos comienza tres días después del principio de la germinación. En el caso de los embriones sometidos a tratamiento con citocininas y auxinas, puede descartarse la interacción entre las fitohormonas y la sacarosa.

La diferencia en sensibilidad a las fitohormonas entre el embrión y el eje embrionario se puede explicar por la presencia del escutelo que puede contribuir en albergar un mayor número de receptores para auxinas y citocininas o bien, de componentes involucrados en la señalización disparada por las fitohormonas exógenas. Un ejemplo de expresión diferencial en ejes y embriones enteros es el transportador de sacarosa. El análisis espacial y temporal de la expresión del transportador de sacarosa demuestra que éste se encuentra presente en el embrión desde las 15 horas de germinación, mientras que en el eje embrionario se detecta a partir de las 36 horas (Greaves, 2000).

Los distintos niveles de regulación observados en la TK de otras especies sugieren que el incremento de los niveles del transcrito no son necesariamente acompañados por un aumento en los niveles de proteína y actividad, pues existe la posibilidad de que mecanismos de regulación post-transcripcional (demostrados en células animales, pero no de plantas) eviten que la replicación del ADN y la división celular se aceleren y pierdan su control intrínseco.

En el caso de que el aumento en los niveles de ARNm de la timidina cinasa sí reflejara un incremento paralelo de la actividad enzimática, entonces podría pensarse que se aceleraría y adelantaría la replicación, ya que se ha demostrado que basta la adición de timidina a células en cultivo para que se acelere la maduración de los cromosomas (Nasmyth, 1996). Cabe mencionar que un exceso de precursores del ADN y ARN puede conllevar efectos deletéreos para la células, como un aumento en el número de mutaciones y eventualmente la muerte celular (Reichard, 1988).

#### **5. Análisis de la expresión de la timidina cinasa en diferentes tejidos de una planta madura de maíz**

También se estudió la expresión del gene de la TK en varios tejidos (raíz, tallo, hoja, espiga, pistilo e inflorescencia femenina) de una planta de maíz madura (15 semanas de edad y 3 días después de la polinización), con el fin de determinar la expresión del gene de la timidina cinasa en tejidos diferenciados. Los resultados demostraron que la expresión es muy baja en raíz y tallo, un poco mayor en hoja y espiga y máxima en la inflorescencia femenina.

En el caso de la raíz, en la cual a pesar de ser un tejido proliferativo prácticamente no se encuentra expresión de TK, es pertinente aclarar que la extracción de ARN total se realizó a partir de toda la raíz, es decir, no se seleccionó la zona meristemática (1 a 2 mm de las puntas) que comprende las células que proliferan activamente. Este hecho explica entonces los bajos niveles de expresión registrados.

En el caso de tallo y espiga, su población celular ya se ha diferenciado y no prolifera de manera activa, por lo que la baja expresión resulta congruente con el estado proliferativo de los tejidos que conforman ambos órganos.

La baja pero detectable expresión de TK en hoja puede deberse a la necesidad que tienen las células de reparar constantemente su ADN debido a la exposición continua y prolongada a radiación ultravioleta, que se sabe produce la formación de dímeros de timina que resultan perjudiciales para la molécula de ADN. Esta hipótesis ya fue propuesta por

Hemayet Ullah *et al.* (1999), quienes encontraron expresión elevada de este gene en hojas de plantas de arroz

Por último, en el caso de la inflorescencia femenina, el elevado nivel de transcrito puede deberse al desarrollo continuo del óvulo fecundado por núcleos masculinos provenientes del grano de polen hasta formar un embrión multicelular. Este proceso de desarrollo involucra procesos de división celular y diferenciación, acompañados de incrementos en el peso fresco de la semilla y en el contenido de agua (Bewley & Black, 1992). Específicamente los niveles de ARNm de la TK pueden atribuirse a los procesos de proliferación celular previos a la diferenciación.

#### **6. Determinación del número de copias de la timidina cinasa en el genoma de maíz**

El análisis por Southern blot del número de copias del gene de TK en maíz produjo un patrón de restricción discreto del ADN genómico utilizando cuatro diferentes enzimas de restricción. Este hecho indica que el genoma de maíz posee un número discreto de copias de TK aunque no es posible determinar el número de copias con precisión con estos datos únicamente, pero que es consistente con la presencia de más de dos copias. En el genoma de maíz es común la duplicación de genes y la existencia de familias de varios miembros de un mismo gene. Sin embargo, también es frecuente encontrar secuencias incompletas y no funcionales que pueden explicar algunas bandas tenues de hibridación

#### **7. Escrutinio de un banco genómico de maíz con el fin de aislar una clona de la timidina cinasa de maíz**

Sabiendo la importancia de los mecanismos de regulación transcripcional en la expresión y subsecuente actividad de la timidina cinasa en eucariotes (especialmente mamíferos), se justifica la búsqueda de una clona genómica que posea el promotor completo del gene. El análisis del promotor puede proporcionar información acerca de la presencia de cajas de respuesta a giberelinas, cajas TATA, secuencias de unión para el factor de transcripción E2F, entre otras posibles secuencias de reconocimiento de factores de transcripción que puedan tener significado biológico

Los esfuerzos en este aspecto han permitido aislar cuatro clonas que hibridaron positivamente con una sonda que contiene parte del ADNc de la timidina cinasa de maíz y que en consecuencia probablemente posean la clona genómica completa del gene de la timidina cinasa, que se estudiará posteriormente

---

## PERSPECTIVAS

Con base en las evidencias presentadas con anterioridad, el sistema biológico más conveniente para posteriores estudios sobre la expresión del gene, los niveles de proteína y la actividad enzimática de la timidina cinasa sería el embrión de maíz. Este sistema tiene varias ventajas, como se ha demostrado durante la realización de este trabajo: **(1)** la presencia del escutelo podría aumentar la sensibilidad del eje embrionario a las fitohormonas benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético; **(2)** evidencias previas obtenidas en el laboratorio (*resultados no publicados*), han demostrado que en ejes embrionarios sembrados en medio carente de sacarosa se retrasa la germinación, en comparación con embriones sembrados bajo las mismas condiciones; la aparente independencia de la germinación de embriones con respecto a la presencia de sacarosa, en comparación con los ejes, elimina un factor experimental adicional que pudiera participar directamente en la aceleración de la replicación del ADN durante la germinación; **(3)** el escutelo protege al eje embrionario de diversos estímulos de estrés; y **(4)** la extracción y manipulación de los embriones es más sencilla en comparación con los ejes, por lo que se evita el daño mecánico del eje.

Siguiendo la línea de investigación que busca determinar si la timidina cinasa puede ser un buen marcador del inicio de la fase S, sería pertinente determinar los niveles de expresión de manera paralela a los correspondientes niveles y actividad de la enzima a horas tempranas de la germinación como 3, 6, 9 y 12 horas. Como se observó en los resultados, un máximo en la cantidad de transcrito se registra a las 12 horas, pero queda por determinar si el aumento de la transcripción es gradual o si se presenta específicamente durante un momento preciso de la germinación. Asimismo, futuros esfuerzos tendrán como propósito determinar si el aumento en la transcripción se acompaña de un incremento paralelo en la actividad enzimática de la timidina cinasa.

En lo que respecta a la aplicación de fitohormonas a embriones de maíz, la concentración que estimula notablemente la transcripción del gene de TK es 1  $\mu\text{M}$  de una solución de auxina y citocinina, aunque el efecto de las giberelinas y de las auxinas aplicadas individualmente a embriones no se ha determinado. Por consiguiente, para estudios posteriores de transcripción de TK sería adecuado emplear una concentración de BA y 2,4-D 1  $\mu\text{M}$ , concentración cercana a los niveles fisiológicos, y no 50  $\mu\text{M}$ , que aparentemente inhibió la transcripción de TK en los ensayos de Northern blot realizados con embriones de maíz

Las perspectivas inmediatas y a largo plazo de este proyecto son:

- 1) Aislar y secuenciar una clona de ADNc completa del gene de la TK, a partir de un banco de ADNc de plantas de maíz o por estrategias como amplificación de los extremos 5' y 3' del ADNc (RACE). Con la secuencia completa se podrían analizar regiones reguladoras localizadas en los extremos 5' y 3' no traducidas.
- 2) Completar el aislamiento de la clona genómica del gene de la TK, clonarlo y secuenciarlo para estudiar el promotor del gene e identificar secuencias reguladoras de unión a factores de transcripción específicos. Asimismo, la secuencia completa del gene permite analizar las secuencias contenidas en los intrones. La obtención de la clona se fundamentaría en escrutinios sucesivos del banco genómico con la sonda de ADNc de la clona 842.
- 3) Para profundizar sobre la regulación en la transcripción de la TK a nivel del promotor, secuencias de éste con diferentes longitudes podrían clonarse junto a un gene reportero en plásmidos de expresión y transfectarse a protoplastos (células sin pared celular) de maíz. Una vez transformados, los protoplastos pueden ser sujetos a diferentes condiciones experimentales (aplicación de hormonas exógenas, agentes mitógenos o nutrientes como la sacarosa) e indirectamente, a través del gene reportero, determinar los patrones de regulación del promotor o secuencias específicas de éste.
- 4) El estudio de los niveles de proteína requeriría de contar con anticuerpos policlonales o monoclonales contra la TK. Para obtener los anticuerpos, el ADNc completo de la TK se clonaría en un plásmido de expresión, con el cual a su vez se transformarían células de una cepa adecuada de *E. coli* para sobreproducir la proteína. Con la proteína recombinante es posible inmunizar a un conejo para obtener el suero hiperinmune. Contando con los anticuerpos específicos en contra de la TK es posible determinar los niveles de proteína mediante experimentos de Western blot a diferentes tiempos o de inmunoprecipitación.
- 5) La actividad enzimática de la TK puede determinarse según el método propuesto por Wolcott y Colacino (1989) que se basa en el uso de cloruro de lantano para separar el sustrato marcado con tritio (timidina) del producto de la catálisis enzimática (timidina monofosfato). Dado que los fosfatos de lantano son insolubles en agua, el cloruro de lantano puede precipitar selectivamente los fosfatos y compuestos fosforilados, dejando el sustrato no fosforilado (timidina) en solución. Los precipitados correspondientes a las diferentes muestras pueden separarse por filtración o centrifugación y redisolverse en HCl y líquido de centelleo, para después determinarse las cuentas por minutos en un contador de centelleo. En el caso de la TK de maíz, la

actividad enzimática provendría de un extracto citosólico obtenido a partir de embriones germinados durante distintos intervalos de tiempo.

---

**RESUMEN DE RESULTADOS**

- La clona  $\delta 42$  aislada a partir de un banco de ADNc de maíz correspondió a la enzima timidina cinasa de maíz y presentó un 84% de homología con el ADNc reportado para arroz (*Oryza sativa*)
- La secuencia de nucleótidos de la clona  $\delta 42$  estaba en marco abierto de lectura y codificó para una secuencia de 204 aminoácidos con un tamaño molecular de 23 000 Da.
- La secuencia de aminoácidos exhibe los motivos de unión a ATP,  $Mg^{2+}$  y Thd, que caracterizan a la enzima timidina cinasa. Asimismo, la comparación de las secuencias de aminoácidos de la timidina cinasa de maíz con las correspondientes de arroz y *A. thaliana* reveló una alta homología entre éstas.
- El patrón de expresión de la timidina cinasa en ejes y embriones de maíz presentó un máximo a las 12 horas, que paulatinamente disminuyó a las 24 y 48 horas.
- La aplicación de fitohormonas exógenas (giberelinas, citocininas y auxinas) a ejes embrionarios en germinación modificó ligeramente el patrón de expresión, disminuyendo los niveles máximos correspondientes a las 12 horas y manteniéndolos aproximadamente constantes y bajos a las 24 y 48 horas
- La aplicación de fitohormonas exógenas (citocininas con auxinas) en concentraciones cercanas a las fisiológicas a embriones en germinación modifica considerablemente el patrón de expresión, aumentando los niveles máximos a las 12 y 24 horas con respecto al control y eliminándolos completamente a las 48 horas; en contraposición, a concentraciones muy por encima de las fisiológicas, los niveles disminuyen con respecto al control a las 12 y 24 horas y desaparecen también a las 48 horas
- Los tejidos diferenciados presentaron niveles muy bajos del mensajero de la timidina cinasa
- El genoma de maíz tuvo más de dos copias del gene de la timidina cinasa
- Se aislaron cuatro clonas a partir de un banco genómico de maíz que probablemente contengan la secuencia completa del gene de la timidina cinasa de maíz lo que, de ser cierto, permitirá el análisis de la secuencia promotora de éste

---

## CONCLUSIONES

- La expresión del gene de la timidina cinasa está estrechamente regulado a nivel transcripcional en embriones y ejes embrionarios de maíz durante la germinación. El patron temporal de expresión del gene de la timidina cinasa de maíz es consistente con las evidencias experimentales que indican que la presencia de esta enzima está coordinada con el avance del ciclo celular y, específicamente, con la transición de la fase  $G_0$  a la fase S, por lo que parece ser un marcador útil en el estudio de este evento celular.
- La aplicación de fitohormonas con funciones estimulatorias de la división celular y la replicación del ADN a ejes embrionarios de maíz, afecta la expresión del gene de la timidina cinasa, aparentemente disminuyendo los niveles de transcrito, probablemente porque se acorta el tiempo que le toma al eje en germinación alcanzar el máximo de expresión, en comparación con un control sin fitohormonas.
- La aplicación de fitohormonas (benciladenina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético), en concentraciones cercanas a los niveles fisiológicos, a embriones de maíz en germinación, modifica los niveles de expresión del gene de la timidina cinasa, aparentemente aumentando la cantidad de transcrito. Por otro lado, la aplicación de las mismas fitohormonas en concentraciones muy superiores a los niveles fisiológicos causa un decremento en la cantidad de transcrito, aunque también existe la posibilidad de que en realidad el efecto de las fitohormonas haya sido acelerar la transcripción y el recambio subsecuente del transcrito.



## BIBLIOGRAFÍA

- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana* *Nature*. **408**: 796-815
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.M., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K.** (eds.) (1992) *Short Protocols in Molecular Biology* 2a edición. Greene Publishing Assoc & Wiley and Sons E.U.A pp 6-3 a 6-14.
- Balzarini, J., Zhu, C., De Clercq, E., Pérez-Pérez, M., Chamorro, M., Camarasa, M., y Karlsson, A.** (2000) Novel Ribofuranosylnucleoside Lead Compounds for Potent and Selective Inhibitors of Mitochondrial Thymidine Kinase-2 *Biochem. J.* **352**: 167-171.
- Berenstein, D., Christensen, J.F., Kristensen, T., Hofbauer, R., y Munch-Petersen, B.** (2000) Valine, Not Methionine, Is Amino Acid 106 in Human Cytosolic Thymidine Kinase (TK1). *J. Biol. Chem.* **275**: 32187-32192.
- Bewley, J.D., y Black, M.** (1994) *Seeds. Physiology of Development and Germination* 2a edición. Plenum Press. E U.A pp 1-33, 98-111 y 147-197.
- Bianchi, V., Borella, S., Rampazzo, C., Ferraro, P., Calderazo, F., Bianchi, L.C., Skog, S., y Reichard, P.** (1997) Cell Cycle-dependent Metabolism of Pyrimidine Deoxynucleoside Triphosphates in CEM Cells. *J. Biol Chem* **272**: 16118-16124.
- Boehringer Mannheim** (1990) Restriction Enzymes, en: *Biochemicals for Molecular Biology*. Boehringer Mannheim Biochemica Alemania pp 8 y 25.
- den Boer, B.G.W., y Murray, J.A.H.** (2000) Triggering the Cell Cycle in Plants. *Trends in Cell Biology*. **10**: 245-250
- Bradshaw, H.D., y Deininger, P.L.** (1984) Human Thymidine Kinase Gene: Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a cDNA Expressible in Mammalian Cells *Mol. Cell, Biol* **11**: 2316-2320
- Britton, F., Munch-Petersen, B., Hofbauer, R., y Barnett, Y.A.** (1998) An Investigation of Thymidine Kinase 1 from Normal and Transformed Mammary Cell Lines *Biochem Soc. Trans.* **26**: S63
- Castroviejo, M., Tharaud, D., Mocquot, B., y Litvak, S.** (1979) Factors Affecting the Onset of Deoxyribonucleic Acid Synthesis During Wheat Embryo Germination Study of the Changes in DNA Polymerases A, B and C and the Pool of DNA Precursors *Biochem. J* **181**: 193-199.
- Chang, Z., Huang, D., y Chi, L.** (1998) Serine 13 Is the Site of Mitotic Phosphorylation of Human Thymidine Kinase. *J Biol Chem* **273**: 12095-12100.

- Chang, Z., Huang, D., y Hu, S.** (1999) NF-Y-mediated *Trans*-activation of the Human Thymidine Kinase Promoter Is Closely Linked to Activation of Cyclin-dependent Kinase. *J. Cell. Biochem* **75**: 300-309.
- Chu, E., y Allegra, C.J.** (1996) The Role of Thymidylate Synthase as an RNA Binding Protein. *BioEssays* **18**: 191-198.
- Coello, P., Rodríguez, R., García, E., y Vázquez-Ramos, J.M.** (1992) A DNA Polymerase from Maize Axes: Its Purification and Possible Role. *Plant Molecular Biology*. **20**: 1159-1168
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G. y Yokota, T.** (2000) Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules, en: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. eds.). American Society of Plant Biologists. E.U.A. pp 850-884.
- De la Porta, S.L., Wood, J.A., y Hicks, J.B.** (1983) A Plant DNA Minipreparation Version II. *Plant Mol. Biol Rep.* **1**: 19-21.
- De Veylder, L., Van Montagu, M., Inzé, D.** (1998) Cell Cycle Control in *Arabidopsis*, en: *Plant Cell División* (Francis, D., Dudits, D., Inzé, D. eds.) Portland Press Eynsham. Gran Bretaña. pp 1-19.
- Doerner, P.** (2000) Cell Division Regulation, en *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. eds.). American Society of Plant Biologists. E.U.A. pp 528-565
- Dou, Q., Zhao, S., Levin, A.H., Wang, J., Helin, K., y Pardee, A.B.** (1994) G1/S-regulated E2F-containing Protein Complexes Bind to the Mouse Thymidine Kinase Gene Promoter. *J. Biol. Chem* **269**: 1306-1313
- Evans, J.S., Lock, K.P., Levine, B.A., Champness, J.N., Sanderson, M.R., Summers, W.C., McLeish, P.J., y Buchan, A.** (1998) Herpesviral Thymidine Kinases. Laxity and Resistance by Design. *Journal of General Virology*. **79**: 2083-2092.
- Fahn, A.** (1975) *Plant Anatomy*. 2a edición Pergamon Press. Gran Bretaña. pp 208-209
- Flemington, E., Bradshaw, H.D., Traina-Dorge, T., Slagel, V., y Deininger, P.L.** (1987) Sequence, Structure and Promoter Characterization of the Human Thymidine Kinase Gene. *Gene*. **52**: 267-277
- Flores, E.** (1999) *La Planta. Estructura y Función*. El Libro Universitario. Costa Rica pp 695-734, 773-789 y 790-803.
- Foster, A.S., y Gifford, E.M.** (1959) *Comparative Morphology of Vascular Plants*. W H. Freeman and Company E U A pp 536.
- Fransolet, S., Deltour, R., Bronchart, R.** (1979) Changes in Ultrastructure and Transcription Induced by Elevated Temperature in *Zea mays* Embryonic Root Cells. *Planta*. **146**: 7-18.

- Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Sendra, R., Gröbner, P., y Loidl, P.** (1991) Histone Acetylation in *Zea mays* II. Biological Significance of Post-translational Histone Acetylation During Embryo Germination. *J Biol Chem* **266**: 18751-18760
- Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G., y Loidl, P.** (1994) Maize Embryo Germination. Cell Cycle Analysis *Planta* **192**: 118-124
- GIBCO** (2001) Restriction Endonucleases, en: *GIBCO BRL Products and Reference Guide. 2000-2001* Life Technologies E.U.A pp 15-1, 15-11 y 15-28.
- Goodwin, P.B.** (1978) Phytohormones and Growth and Development of Organs of the Vegetative Plant, en: *Phytohormones and Related Compounds –A Comprehensive Treatise, Vol. II* (Letham, D.S , Goodwin, P.B., y Higgins, T.J.V , eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. E.U.A pp 34, 57, 61, 69 y 96
- Greaves, N.** (2001) Estudio de la Expresión del Transportador de Sacarosa/H<sup>+</sup> en la Germinación del Maíz. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica-Biológica. Facultad de Química UNAM
- Hemayet Ullah, M., Robertson, D., y Fites, R.C.** (1999) A Gene for Thymidine Kinase in Plants. *Plant Physiol.* **119**: s/pp.
- Hengstschläger, M., Knöfler, M., Müllner, E.W., Ogris, E., Winterberger, E., y Wawra, E.** (1994) Different Regulation of Thymidine Kinase During the Cell Cycle of Normal versus DNA Tumor Virus-transformed Cells. *J. Biol. Chem* **269**: 13836-13842.
- Hengstschläger, M., Pfeilstöcker, M., y Wawra, E.** (1998) Thymidine Kinase Expression. A Marker for Malignant Cells, en: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man IX* (Griesmacher, ed ) Plenum Press. E.U.A. pp 455-460
- Hengstschläger, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A., y Hengstschläger-Ottvad, E.** (1999) Cyclin-dependent Kinases at the G1-S Transition of the Mammalian Cell Cycle. *Mutation Research* **436**: 1-9.
- Hopkins, W.G.** (1995) *Introduction to Plant Physiology* John Wiley and Sons. E.U.A pp 285-308 y 311-337
- Huntley, R.P., y Murray, J.A.H.** (1999) The Plant Cell Cycle *Curr. Opin Plant Biol.* **2**: 440-446.
- Ito, M., y Conrad, S.E.** (1990) Independent Regulation of Thymidine Kinase mRNA and Enzyme Levels in Serum-stimulated Cells *J. Biol. Chem.* **265**: 6954-6960
- Jaimes, F.** (2001) Caracterización y Expresión del Gen de la Proteína de Replicación A-1 de Maíz Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas Facultad de Química. UNAM.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B.M., y Schubert, I.** (2000) Histone H4 Acetylation of Euchromatin and Heterochromatin is Cell Cycle Dependent and Correlated with Replication Rather Than with Transcription. *The Plant Cell* **12**: 2087-2100

- Karssen, C.M.** (1995) Hormonal Regulation of Seed Development, Dormancy, and Germination Studied by Genetic Control, en: *Seed Development and Germination* (Kigel, J., y Galili, G., eds.). Marcel Dekker Inc. E.U.A. pp 333-346
- Knofler, M., Waltner, C., Wintersberger, E., y Müllner, E.W.** (1993) Translational Repression of Endogenous Thymidine Kinase mRNA in Differentiating and Arresting Mouse Cells. *J. Biol. Chem.* **268** 11409-11416
- Koolman, J., y Röhm K.** (1996) *Color Atlas of Biochemistry* Thieme. E.U.A. pp 176.
- Lavia, P., y Jansen-Dürr, P.** (1999) E2F Target Genes and Cell-cycle Checkpoint Control. *BioEssays* **21**: 221-230.
- Lewin, B.** (1994) *Genes V.* Oxford University Press. Gran Bretaña. pp 571-578.
- Lewis, J.A.**, (1986) Structure and Characterization of the Chinese Hamster Thymidine Kinase Gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1998-2010.
- Li, L., Naeve, G.S., y Lee, A.S.** (1993) Temporal Regulation of Cyclin A-p107 and p33<sup>cdk2</sup> Complexes Binding to a Human Thymidine Kinase Promoter Element Important for G<sub>1</sub>-S Phase Transcriptional Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3554-3558.
- Lin, X., Parsels, L.A., Voeller, D.M., Allegra, C.J., Maley, G.F., Maley, F., y Chu, E.** (2000) Characterization of a *Cis*-acting Regulatory Element in the Protein Coding Region of Thymidylate Synthase mRNA. *Nucleic Acids Res.* **28(6)**: 1381-1389
- Lipson, K., y Baserga, R.** (1989) Transcriptional Activity of the Human Thymidine Kinase Gene Determined by a Method Using the Polymerase Chain Reaction and an Intron-specific Probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 9774-9777
- Meyer, B.S., Anderson, D.B. Bohning, R.H., y Fratianne, D.G.** (1973) *Introduction to Plant Physiology.* 2a edición. D. Van Nostrand Company. E.U.A. pp 530-547.
- Mikulits, W., y Müllner, E.W.** (1994) Post-translational Represión of Thymidine Kinase Expression During Cell Cycle and Growth Stimulation. *FEBS Lett* **345**: 172-176.
- Mikulits, W., Hengstschläger, M., Sauer, T., Wintersberger, E., y Müllner, E.W.** (1996) Overexpression of Thymidine Kinase mRNA Eliminates Cell Cycle Regulation of Thymidine Kinase Enzyme Activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 853-860.
- Milthorpe, F.L. y Moorby, J.** (1974) *An Introduction to Crop Physiology.* Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp 110-123.
- Mudrak, I., Ogris, E., Rotheneder, H., y Wintersberger, E.** (1994) Coordinated *trans* Activation of DNA Synthesis- and Precursor-producing Enzymes by Polyomavirus Large T Antigen through Interaction with the Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell. Biol* **14**: 1886-1892.

- Munch-Petersen, B., Tyrsted, G., y Cloos, L.** (1993) Reversible ATP-dependent Transition Between Two Forms of Human Cytosolic Thymidine Kinase with Different Enzymatic Properties. *J Biol Chem.* **268**: 15621-15625.
- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Jensen, H.K., y Tyrsted, G.** (1995) Human Thymidine Kinase 1 Regulation in Normal and Malignant Cells. *Advan. Enzyme Regul* **35**: 69-89
- Nasmyth, K.** (1996) Control of S Phase, en: *DNA Replication in Eukaryotic Cells* (DePamphilis, M.L. ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press E.U.A. pp 331-386.
- Neuffer, G.M., Coe, E.H., y Wessler, S.R.** *Mutants of Maize* Cold Spring Harbor Laboratory Press E.U.A pp 17
- Plasencia, J. y Romero, M.M.** (2000) Bioquímica, Biología Molecular y Patología de Plantas. Reporte de Servicio Social. Facultad de Química. UNAM. *Resultados no publicados.*
- Posch, M., Hauser, C., y Seiser, C.** (2000) Substrate Binding is a Prerequisite for Stabilisation of Mouse Thymidine Kinase in Proliferating Fibroblasts. *J Mol. Biol* **300**: 493-502
- Pusch, O., Soucek, T., Hengstschläger-Ottvad, E., Bernaschek, G., y Hengstschläger, M.** (1997) Cellular Targets for Activation by c-Myc Include the DNA Metabolism Enzyme Thymidine Kinase. *DNA and Cell Biology.* **16**: 737-747.
- Raven, P.H., Evert, R.F. y Eichhorn, S.E.** (1992) *Biology of Plants.* 5a edición. Worth Publishers. E.U.A. pp 441-452, 453-469 y 545-572.
- Reichard, P.** (1988) Interactions Between Deoxyribonucleotide and DNA Synthesis. *Ann. Rev. Biochem* **57**: 349-74
- Reyes, J., Jiménez-García, L.F., Gonzalez, M.A. y Vázquez-Ramos, J.M.** (1991) Benzyladenine-stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize. *Seed Science Research.* **1**: 113-117
- Ross, J.** (2001) New Interactions Between Classical Plant Hormones *Trends in Plant Science.* **6**: 2-4
- Rotheneder, H., Geymayer, S., y Haidweger, E.** (1999) Transcription Factors of the Sp1 Family: Interaction with E2F and Regulation of the Murine Thymidine Kinase Promoter. *J. Mol. Biol.* **293**: 1005-1015.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A.
- Sánchez-Martínez, D., Puigdoménech, P., y Pagés, M.** (1986) Regulation of Gene Expression in Developing *Zea mays* Embryos Protein Synthesis During Embryogenesis and Early Germination of Maize *Plant Physiol.* **82**: 543-549.

- Sanjuan, A.** (1997) La Poliadenilación Citoplásmica como un Mecanismo de Control Traduccional en Semillas de Maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM
- Sanjuan, A.** (2001) Efecto de la Micotoxina Fumonisina B1 sobre la Expresión de Genes Relacionados con la Respuesta de Hipersensibilidad en Ejes Embrionarios de Maíz durante la Germinación. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM.
- Sheen, J., Zhou, L., y Jang, J.** (1999) Sugars as Signaling Molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 410-418.
- Sherley, J.L., y Kelly, T.J.** (1988) Human Cytosolic Thymidine Kinase. Purification and Physical Characterization of the Enzyme from HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* 263: 375-382.
- Sherley, J.L., y Kelly, T.J.** (1988) Regulation of Thymidine Kinase during the Cell Cycle. *J. Biol. Chem* 263: 8350-8358.
- Sigma** (1994) *Sigma Plant Culture 1994 Catalogue*. Sigma Chemical Company. E.U.A pp 86-88.
- Sofer, W.H.** (1991) *Introduction to Genetic Engineering*. Butterworth-Heinemann. E.U.A. pp 53-55.
- Soni, R., Carmichael, J., Shah, Z.H., Murray, A.H.** (1995) A Family of Cyclin D Homologs from Plants Differentially Controlled by Growth regulators and Containing the Conserved Retinoblastoma Protein Interaction Motif *The Plant Cell*. 7: 85-103.
- Sorensen, P., y Wintersberger, E.** (1999) Sp1 and NF-Y Are Necessary and Sufficient for Growth-dependent Regulation of the Hamster Thymidine Kinase Promoter *J Biol. Chem.* 274: 30943-30949.
- Soucek, T., Pusch, O., Hengstschläger-Ottner, E., Wawra, E., Bernaschek, G., y Hengstschläger, M.** (1995) Expression of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16 during the Ongoing Cell Cycle. *FEBS Lett.* 373: 164-169.
- Spyrou, G., y Reichard, P.** Dynamics of the Thymidine Triphosphate Pool During the Cell Cycle of Synchronized 3T3 Mouse Fibroblasts. *Mutation Research.* 200: 37-43.
- Stratagene** (1993) Lambda FIX® II Library Instruction Manual. Stratagene E.U.A. pp 1-12.
- Street, H.E. y Öpik, H.** (1986) *The Physiology of Flowering Plants Their Growth and Development*. 3a edición. Edward Arnold. Gran Bretaña. pp 4-25.
- Sugiura, M. y Takeda, Y.** (2000) Nucleic Acids, en: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Grissem, W. y Jones, R. eds.) American Society of Plant Biologists E U.A. pp 260-272.
- Sutterluety, H., Bartl, S., Karlseder, J., Wintersberger, E., y Seiser, C.** (1996) Carboxy-terminal Residues of Mouse Thymidine Kinase Are Essential for Rapid Degradation in Quiescent Cells. *J Mol. Biol.* 259: 383-392.

- Sutterluety, H., y Seiser, C.** (1997) Thymidine Inhibits the Growth-arrest-specific Degradation of Thymidine Kinase Protein in Transfected L Fibroblasts. *J. Mol Biol.* **265**: 153-160
- Tommasi, E., y Pfeifer, G.P.** (1997) Constitutive Protection of E2F Recognition Sequences in the Human Thymidine Kinase Promoter During Cell Cycle Progression. *J. Biol. Chem.* **272**: 30483-30490
- Van't Hof, J.** (1996) DNA Replication in Plants, en. *DNA Replication in Eukaryotic Cells* (DePamphilis, M L. ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A. pp 1005-1013.
- Voet, D. y Voet, J.** (1995) *Biochemistry*. 2a edición John Wiley and Sons, Inc. E U A. pp 848-857.
- Wang, L., y Eriksson, S.** (2000) Cloning and Characterization of Full-length Mouse Thymidine Kinase 2. The N-terminal Sequence Directs Import of the Precursor Protein into Mitochondria. *Biochem. J.* **351**: 469-476.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. y Weiner, A.M.** (1987) *Molecular Biology of the Gene*. 4a edición. Benjamin/Cummings. E.U.A. pp 252-262, 514-523
- Wettin, K., Johansson, M., Zheng, X., Zhu, C., y Karlsson, A.** (1999) Cloning of Mouse Mitochondrial Thymidine Kinase 2 cDNA. *FEBS Lett.* **460**: 103-106.
- Wintersberger, E.** (1997) Regulation and Biological Function of Thymidine Kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **25**(1): 303-308.
- Wolcott, R.M., y Colacino, J.M.** (1989) Detection of Thymidine Kinase Activity Using an Assay Based on the Precipitation of Nucleoside Monophosphates with Lanthanum Chloride. *Analytical Biochemistry.* **178**: 38-40
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J.** (1985) Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors *Gene.* **33**: 103-119

## APÉNDICE A

## 1. Medios

**Agar NZYDT suave**

Medio NZYDT	211 g
Agar bacteriológico	7.5 g
Agua desionizada cbp	1 L

**Medio NZYDT**

NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2 g
Extracto de levadura	5 g
Amina AZ (hidrolizado de caseína)	10 g
Agua desionizada cbp	1 L

**Caldo Luria (LB) suplementado con MgSO<sub>4</sub> y maltosa**

NaCl	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaOH 2.5 N	1 mL
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Maltosa	0.2% (p/v)
Agua desionizada cbp	1 L

**Medio sólido Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa 2% (p/v)**

Mezcla de sales MS	0.43 g
Agarosa	12 g
Sacarosa	20 g
Agua desionizada cbp	100 mL

## 2. Soluciones

**Agua tratada con DEPC**

DEPC	2 mL
Agua desionizada cbp	1 L

**Solución de desnaturalización**

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

**Amortiguador de carga para ADN**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	2.0 mM

**Amortiguador de extracción de ADN**

Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 M
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O (pH 8.0)	50 mM
NaCl	0.5 M

**Amortiguador de carga para ARN**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50% (p/v)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.0)	10 mM

**Amortiguador GTE**

Tris	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	200 mM



**Solución de hibridación para ARN**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 M
SDS	7%,
EDTA	10 mM
BSA	1% (p/v)

**Amortiguador MOPS 1X**

Amortiguador MOPS 10X	15 mL
Agua desionizada cbp	150 mL

**Amortiguador MOPS 10X**

EDTA	10 mM
MOPS	0.2 M
Acetato de sodio (pH 7.0)	50 mM

**Solución de neutralización**

Tris-HCl	0.5 M,
NaCl (pH 8.0)	1.5 M

**Solución de prehibridación para ADN**

SSC	6x
SDS	0.5%
Solución Denhardt	5x
DNA de esperma de salmón	0.1 mg/mL

**Solución de prehibridación para ARN**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 M
SDS	7%
EDTA	10 mM
BSA	1% (p/v)

**Solución SSC 20X (pH 7.0)**

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Agua desionizada cbp	1 L

**Amortiguador SM**

NaCl	0.1 M
MgSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	8 mM
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
Gelatina	0.01% (p/v)

**Amortiguador TAE (Tris-acetato) 1X**

Tris-acetato	0.04 M
EDTA	0.001 M

**Amortiguador TAE 10X**

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 mL

**Amortiguador TE**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

## APÉNDICE B

## 1. Especificaciones de las enzimas de restricción

*EcoR* I (GIBCO BRL)

- **Obtenida a partir de:** Cepa de *E. coli* con el gene *EcoR* I de *E. coli* RY13 clonado
- **Amortiguador de almacenamiento:** Tris-HCl 50 mM (pH 7.2), NaCl 300 mM, EGTA 5 mM, EDTA 0.5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, BSA 0.5 mg/mL, glicerol 50% (v/v), Triton® X-100 0.2% (p/v)
- **Condiciones de reacción:** Amortiguador RE<sub>ACT</sub> 3 a 37°C.
- **Secuencia de corte:**

G↓AATT C  
C TTAA↑G

*Hind* III (Boehringer Mannheim)

- **Obtenida a partir de:** *Haemophilus influenzae* Rd com-10
- **Amortiguador de almacenamiento:** Tris-HCl 10 mM, NaCl 250 mM, EDTA 0.1 mM, DTE 1 mM, glicerol 50% (v/v), pH 7.4 a 4°C
- **Condiciones de incubación:** Amortiguador B a 37°C
- **Secuencia de corte:**

A↓AGCT T  
T TCGA↑A

*Xba* I (GIBCO BRL)

- **Obtenida a partir de:** *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonas badrii*)
- **Amortiguador de almacenamiento:** Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, BSA 0.5 mg/mL, glicerol 50% (v/v)
- **Condiciones de reacción:** Amortiguador RE<sub>ACT</sub> 2 a 37°C
- **Secuencia de corte:**

T↓CTAG A  
A GATC↑T

**Xho I (GIBCO BRL)**

- **Obtenida a partir de:** *Xanthomonas campestris* (*Xanthomonas holcicola*)
- **Amortiguador de almacenamiento:** Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), KCl 200 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, BSA 0.5 mg/mL, glicerol 50% (v/v), Triton® X-100 0.1% (p/v).
- **Condiciones de reacción:** Amortiguador RE<sub>ACT</sub> 2 a 37°C.
- **Secuencia de corte:**  
C↓TCGA G  
G AGCT↑C

**2. Genotipo de la cepa de *E.coli* XL1-Blue MRA (P2)**

- $\Delta(mcrA)183$
- $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$
- *endA1*
- *supE44*
- *thi-1*
- *gyrA96*
- *relA1*
- *lac*
- Lisógena para P2