



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN DE LOS GENES DE TIMIDINA CINASA
(TK1a y TK1b) EN *Arabidopsis thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ ANTONIO PEDROZA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2011.



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. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Vocal: Q.F.B. Bertha Resendiz Vázquez

Secretario: Dr. Javier Plasencia de la Parra

1er. Suplente: Dra. Deyanira Maldonado Jiménez

2do. Suplente: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 101, del Departamento de Bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

Asesor

M.C. Manuela Nájera Martínez

Supervisor Técnico

José Antonio Pedroza García

Sustentante



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la asesoría del Dr. F. Javier Plasencia de la Parra y la supervisión técnica de la M.C. Ma. Manuela Nájera Martínez en el Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo de tesis forma parte del proyecto *Análisis funcional de la timidina cinasa en los eventos de reparación del DNA en plantas*, PAPIIT IN220010, financiado por DGAPA.

José Antonio Pedroza García recibió beca-tesis de licenciatura para realizar este trabajo del proyecto DGAPA-PAPIIT IN220010.

Se agradece la asesoría de la Dra. Maria de la Paz Sánchez Jiménez del Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la UNAM en el estudio de la arquitectura de la raíz de las plántulas de *Arabidopsis*.

Se agradece al QFB Carlos Everardo Bravo del Laboratorio 114 por su asesoría técnica en la clonación empleando la Tecnología Gateway®.

Se agradece la ayuda técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra durante la realización de este trabajo de tesis.





DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis a mis padres y a todos mis seres queridos que siempre me han dado su apoyo y comprensión durante todos estos años.

A mis amigos que han sido importantes en cada etapa de mi vida. Gracias por todos los momentos compartidos, por todas las vivencias y buenos ratos que hemos pasado. En especial a Sandy, Ivan, Tania y Fernando, a quienes conocí en la carrera.

Agradezco particularmente a mi amigo Fernando por su compañía y amistad durante todo este tiempo de conocernos, pero en especial por la ayuda que recibí de su parte para este trabajo, gracias por esas cientos de fotografías tomadas, así como todo tu tiempo dedicado en regar las plantas, pasar bacterias y plántulas a las incubadoras en fines de semana y cuando no podía hacerlo. Gracias eres un gran amigo.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio, a Dianita por toda su ayuda en todas las ocasiones que la necesitaba tanto emocionalmente como en los experimentos, a Myr y a Lupita por hacer siempre más amena la estancia en el Laboratorio, a Manu por su ayuda en la realización de las técnicas y por las buenas conversaciones que se presentaron. Así como a la Dra. Marina, a Chelo y a su equipo de trabajo por la buena convivencia que siempre esta presente.

Agradezco a la Dra. Sobeida Sánchez por proporcionarme material y/o reactivos siempre que los necesitaba de manera incondicional, así como los consejos personales que siempre sabe dar.

Gracias al Dr. Javier por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

Pero sobre todo gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de formarme como profesionista, por lo cual les estaré eternamente agradecido por permitirme lograr este objetivo.



ABREVIATURAS

a.a	aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
Abs	Absorbancia
ATP	Adenosin trifosfato
BER	Reparación por escisión de bases
c.b.p.	Cuanto baste para
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
CK	Citidina cinasa
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAm_t	DNA mitocondrial
dNK	Desoxirribonucleósido cinasa
DSB	Rompimiento de la doble hebra
E2F	Factor de transcripción E2F
G₀	Fase quiescente del ciclo celular
G₁	Fase G1 ("Gap1") del ciclo celular
G₂	Fase G2 ("Gap2") del ciclo celular
GFP	Proteína verde fluorescente
GGR	Reparación global del genoma
HDAC	Histona desacetilasa
HR	Recombinación Homóloga
IPTG	Isopropiltiogalactósido
KO	Knockout
LB	Caldo Luria
M	Fase M del ciclo celular





MTHF	N ⁵ , N ¹⁰ -metilentetrahidrofolato
mTK1a	mutante de inserción de DNA-T de la TK1a
mTK1b	mutante de inserción de DNA-T de la TK1b
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NDC	Nucleósido difosfato cinasa
NF-Y	Factor de transcripción NF-Y
NMC	Nucleósido monofosfato cinasa
nt	nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierto
pb	pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
6-4PPs	Dímero de pirimidona
pRb	Proteína de retinoblastoma
pTK1a	Región promotora de la TK1a
pTK1b	Región promotora de la TK1b
QC	Centro quiescente
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNR	Ribonucleótido reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
S	Fase S del ciclo celular
Sp1	Factor de transcripción sp1
UV	Luz ultravioleta
TCR	Reparación acoplada a la transcripción



TK	Timidina cinasa
TK1	Timidina cinasa citosólica
TK1a	Timidina cinasa 1a de <i>A. thaliana</i>
TK1b	Timidina cinasa 1b de <i>A. thaliana</i>
TK2	Timidina cinasa mitocondrial
TMP	Timidina monofosfato
TMPK	Timidilato cinasa
TS	Timidilato sintasa
UMP	Uridina monofosfato
UK	Uridina cinasa
μL	Microlitro
UPRT	Uracil fosforribosil transferasa
3'UTR	Región 3' no traducida
5'UTR	Región 5' no traducida
wt	línea de <i>A. thaliana</i> silvestre



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
1.- Rutas de Biosíntesis de nucleótidos	2
1.1 Vía <i>de novo</i> de síntesis de nucleótidos	2
1.2 Vía de salvamento de nucleótidos	5
2. Timidina cinasa 1 o citosólica	8
2.1 Clasificación y función de las <i>dNKs</i>	9
2.2 Estructura del gen <i>tk1</i> de humano	10
2.3 Estructura terciaria de la TK1 humana	10
2.4 Importancia biológica de la TK1	12
2.5 Regiones promotoras de la TK1 en mamíferos	15
2.6 Regulación de la TK1 durante el ciclo celular	17
2.7 Timidina cinasa en plantas	19
2.8 Timidina cinasa en <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3. Arabidopsis thaliana.....	21
3.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	21
3.2 Arquitectura del meristemo de raíz	22
4. Daño genotóxico a DNA.....	24
4.1 Estrés genotóxico en plantas por luz ultravioleta	25
4.2 Mecanismos de respuesta a estrés genotóxico	27
4.3 Vías de reparación del daño a DNA por UV.....	29
4.3.1 Fotoreactivación	30
4.3.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)	32
4.3.3 Reparación del rompimiento de la doble hélice	34
4.4 Control del Ciclo celular	36
HIPÓTESIS	38
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS PARTICULARES	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Material biológico.....	40
1.1 Desinfección y sembrado de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
1.2 Resiembra de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
2. Aislamiento de las regiones promotoras de los genes de la timidina cinasa	
2.1 Búsqueda y análisis de la secuencia de los promotores de los genes TK1 de <i>A. thaliana</i>	41
2.2 Diseño de oligos para el aislamiento de los promotores de los genes TK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
2.3 Extracción de DNA genómico	42
2.4 Amplificación de las secuencias promotoras de la timidina cinasa 1 por la técnica de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	42
2.5 Ensayo de ligación de los promotores de la TK1 en el plásmido pGEM	43



2.6 Selección de las colonias transformantes	44
3. Clonación de los promotores de la TK1 por la Tecnología Gateway®	44
3.1 Fundamento	44
3.2 Obtención de los productos de PCR flanqueados por los sitios attB.....	46
3.3 Clonación de los promotores de los genes TK1 en el vector donador.....	48
3.4 Recombinación en el vector binario pBGWFS7,0.....	49
3.5 Transformación por choque térmico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
3.6 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
4. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK1 en respuesta a luz UV-C.....	51
4.1 Ensayo de sensibilidad en el crecimiento de la raíz.....	51
4.1.1 Establecimiento del tiempo de irradiación.....	51
4.1.2 Inhibición del crecimiento de raíz	52
4.2 Efecto en el meristemo apical de raíz	53
4.2.1 Microscopia óptica.....	53
4.2.2 Microscopia confocal	54
4.3 Ensayo de sensibilidad en plantas de 21días	54
5. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK1 en respuesta a UV-C.....	55
5.1 Tratamiento.....	55
5.2 Extracción de RNA	55
5.3 Cuantificación y calibración del RNA total	56
5.4 Reacción de RT-PCR	57
RESULTADOS.....	61
1. Análisis bioinformático de los genes de la timidina cinasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de sus regiones promotoras	61
2. Aislamiento y clonación en el vector pGEM de las secuencias promotoras de los genes de la timidina cinasa 1 de <i>A. thaliana</i>	67
3. Clonación de los promotores de la TK1 por la Tecnología Gateway®	68
4. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK1 de <i>A. thaliana</i> en respuesta a luz UV-C	70
4.1 Establecimiento del tiempo de irradiación para evaluar la inhibición del crecimiento de la raíz	71
4.2 Ensayo de sensibilidad a UV-C en raíz.....	72
4.3 Efecto en el meristemo apical de raíz	75
4.4. Ensayo de sensibilidad en plantas mutantes de 21días	79
5. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK1 en respuesta a UV-C.81	81
5.1 Cuantificación de los niveles de transcrito TK1a de plántulas de 7 días de las líneas de <i>Arabidopsis</i> wt y mTK1a	81
5.2 Cuantificación de los niveles de transcrito TK1b de plántulas de 7 días de las líneas de <i>Arabidopsis</i> wt y mTK1B	82
5.3 Niveles de expresión de los transcritos TK1a y TK1b en plantas wt de 2 meses .84	84



DISCUSIÓN	85
1. Análisis <i>in silico</i> de los genes de la timidina cinasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de sus regiones promotoras	85
2. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK1 de <i>A. thaliana</i> en respuesta a luz UV-C	87
3. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK1 en respuesta a UV-C	92
CONCLUSIONES	97
PERSPECTIVAS	98
REFERENCIAS	99
APÉNDICES	106
Apéndice 1: Anexo de materiales y métodos	106
Apéndice 2: Anexo de resultados	111
Apéndice 3: Preparación de reactivos y medios de cultivo	113





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de síntesis y degradación de nucleótidos de pirimidinas en tabaco	4
Figura 2. Metabolismo de la timidina.....	7
Figura 3. Relación filogenética de las desoxirribonucleósido cinasas (dNKs)	10
Figura 4. Estructura tridimensional de la TK1 humana.....	12
Figura 5. Representación de la regulación de la enzima TK1 durante el ciclo celular	18
Figura 6. Arquitectura de la raíz	24
Figura 7. Productos del daño a UV y las diferentes vías de reparación que participan en diferentes tipos de tejido	28
Figura 8. Factores que dañan el DNA de plantas y vías de reparación que responden al daño	29
Figura 9. Fotoreactivación	31
Figura 10. Reparación por escisión de nucleótidos	33
Figura 11. Reacciones de recombinación del sistema Gateway.....	45
Figura 12. Estructura de los genes TK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los genes de la timidina cinasa	62
Figura 14. Secuencias tomadas como potenciales promotores de los genes de la TK1	63
Figura 15. Elementos regulatorios Cis de los potenciales promotores de los genes de la TK1	64
Figura 16. Clonación de las regiones promotoras de los genes de la TK1 en el vector pGEM	67
Figura 17. Clonación de los promotores de la TK1 mediante la Tecnología Gateway®	69
Figura 18. Líneas de inserción de DNA-T en los genes de la TK1 de <i>A. thaliana</i>	70
Figura 19. Estandarización del tiempo de irradiación con luz UV-C (254nm)	71
Figura 20. Efecto de la irradiación con UV-C en el crecimiento de la raíz primaria	73
Figura 21. Taza relativa de crecimiento de la raíz después de la irradiación con UV-C.....	74
Figura 22. Longitud de la zona meristemática	76
Figura 23. Microscopia confocal de ápices de raíces teñidas con yoduro de propidio.....	77
Figura 24. Alteración en la organización estructural del nicho de las células del centro quiescente.....	78
Figura 25. Fenotipos de las líneas wild type, mTK1a y mTK1b después de la irradiación con UV-C	80
Figura 26. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm del gen TK1a en plántulas.....	82
Figura 27. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm del gen TK1b en plántulas.....	83
Figura 28. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm de los genes TK1a y TK1b en hojas.....	84
Figura 29. Modelo propuesto	96
Figura 30. Datos de expresión de los genes de la timidina cinasa 1 de <i>A. thaliana</i>	112



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligos para la amplificación del promotor de los genes TK1	42
Tabla 2. Condiciones de PCR óptimas para la amplificación de cada promotoR	43
Tabla 3. Oligos empleados en el PCR 1	46
Tabla 4. Oligos adaptadores empleados en el PCR 2	47
Tabla 5. Condiciones óptimas de temperatura y ciclos, para ambos PCRs	47
Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción de la RT	58
Tabla 7. Preparación de la mezcla para PCR con moldes de cDNA	59
Tabla 8. Ciclos y temperaturas de alineamiento empleadas en las PCR con cDNA	59
Tabla.9 Oligos empleados para la cuantificación de los transcritos de la TK1	60
Tabla 10. Motivos Cis encontrados en las regiones promotoras de los genes TK1	65
Tabla 11. Preparación de la mezcla de reacción en la amplificación de ambos promotores a partir de DNA genómico	106
Tabla 12. Preparación de las mezclas de reacción en los 2 PCR utilizados para obtener las secuencias flanqueadas con los sitios attB de recombinación	106



RESUMEN

La timidina cinasa 1 (TK1) es una enzima clave en la vía de salvamento de nucleótidos de pirimidina pues fosforila al nucleósido timidina en una reacción dependiente de ATP, aportando este nucleótido para la síntesis de DNA. La TK1 está conservada en la mayoría de los organismos, desde virus hasta eucariontes, y se ha demostrado que en células de mamífero los niveles de transcrito, proteína y actividad enzimática aumentan en la transición G₁/S del ciclo celular y en respuesta a daño genotóxico. Sin embargo, en plantas se conoce poco sobre las características de esta enzima, sus genes y sobre todo su función, por lo que se hizo un estudio de la expresión y función de los genes de esta enzima en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El genoma de esta especie contiene dos genes que codifican para la timidina cinasa 1 (TK1a y TK1b). Para conocer más acerca de la regulación de estos genes parálogos a nivel del promotor se realizó el aislamiento de esta región de cada gen, abarcando alrededor de 1100 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. Estas secuencias se clonaron frente al gen reportero β -glucuronidasa en un vector binario, con estas construcciones se transformaron plantas de *Arabidopsis*, lo que nos permitirá conocer la expresión de las dos TK1 durante el desarrollo de la planta y en respuesta a estrés genotóxico en las generaciones T2 y T3 de las plantas transformantes, con lo cual se aportará información sobre la función de los genes de la TK1 en plantas.

Por otra parte se evaluó la participación de los genes TK1a y TK1b en respuesta a estrés genotóxico por luz UV-C, empleando mutantes de inserción de T-DNA de *A. thaliana* de cada gen. La longitud de la raíz primaria, así como la región del meristemo del ápice fueron mucho menos afectadas en la mutante de la TK1a, la cual es una línea de sobreexpresión de este transcrito, mientras que la mutante TK1b que tiene menor nivel de este transcrito y las plantas silvestres no presentaron diferencias en estos parámetros. Asimismo, los niveles de RNAm de la TK1a incrementaron en respuesta a luz UV alrededor de 3 veces después de 3h de la irradiación y se mantuvieron en el nivel hasta el último tiempo evaluado que fue de 14h, mientras que el transcrito TK1b no presentó cambios en sus niveles. Esta respuesta se observó tanto en plántulas como en tejido no proliferativo (hojas senescentes). Los resultados indican que la enzima TK1a, al estar aportando nucleótidos para la síntesis de DNA tiene un papel fundamental en los mecanismos de reparación de NER al daño a DNA inducido por luz UV tanto en tejido meristemático como en tejido diferenciado.



INTRODUCCIÓN

1. Biosíntesis de nucleótidos

Dentro de la célula hay dos clases de bases nucleotídicas, purinas y pirimidinas. Cada clase de nucleótidos es sintetizado por vías independientes. Las pozas de estas moléculas están finamente reguladas de tal manera que se mantiene una proporción estricta en plantas (Kafer *et al.*, 2004). Estas deben estar disponibles para la síntesis de ácidos nucleicos para los procesos de reparación de DNA, replicación y transcripción (Zrenner *et al.*, 2006). El metabolismo de nucleótidos en general se divide en 4 procesos: la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, las respectivas rutas de salvamento, las reacciones de fosfotransferencia (entre nucleótidos de purina y pirimidinas), así como las reacciones de degradación. En plantas, los procesos del metabolismo de nucleótidos son pobremente comprendidos (Boldt & Zrenner., 2003). El análisis del genoma de *Arabidopsis* sugiere que la biosíntesis de nucleótidos es muy similar a otros organismos eucariontes con pocas excepciones (Kafer *et al.*, 2004). La vía biosintética *de novo* produce nucleótidos a partir de compuestos sencillos como aminoácidos y CO₂, consumiendo grandes cantidades de energía, por otra parte, la vía de salvamento recicla nucleósidos y bases libres provenientes de la degradación de los ácidos nucleicos, convirtiéndolos a los respectivos nucleótidos a un costo mucho menor que la vía *de novo* (Zrenner *et al.*, 2006).

1.1 Vía *de novo* de síntesis de nucleótidos

La síntesis *de novo* de nucleótidos de purina se realiza a partir de moléculas pequeñas como los aminoácidos glicina, glutamina y aspartato, el precursor de la ribosa 5 fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), 10-formil tetrahidrofolato y dióxido de carbono. Las plantas sintetizan inosina monofosfato (IMP), adenosina monofosfato (AMP) y guanosina monofosfato (GMP) usando reacciones similares a las encontradas en animales y microorganismos. La vía *de novo* de purinas está constituida por 14 reacciones enzimáticas, comenzando con la formación de fosforribosil amina a partir de PRPP y glutamina, luego de varias reacciones se forma el ribonucleótido 5-aminoimidazol que es el primer anillo.



Para la construcción del segundo anillo de la estructura se emplea CO_2 , aspartato y una segunda molécula de tetrahidrofolato. La primera molécula de purina completa que se obtiene es IMP. Después de la formación de IMP, la biosíntesis de purinas se divide en dos vertientes. La adenosina monofosfato es sintetizada al reemplazar el grupo carboxilo en el C6 por un grupo amino, el cual es proporcionado por el aspartato y GTP es el donador de fosfato para formar adenilsuccinato, posteriormente se remueve el fumarato para formar AMP. La segunda vertiente es para formar GMP y se inicia por la oxidación de IMP seguida por la inserción de un grupo amino que es proporcionado por la glutamina, así se permite la formación de xantosina monofosfato que posteriormente dará origen a GMP (Boldt & Zrenner., 2003; Zrenner et al., 2006).

Todas las enzimas involucradas en los primeros 10 pasos de la biosíntesis *de novo* de purinas que conducen a IMP se predice que están localizadas en cloroplastos, mientras que las enzimas para las siguientes reacciones de la vía que participan en la formación de AMP y GMP están presumiblemente localizados en el citosol (Boldt & Zrenner., 2003).

La biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina está evolutivamente conservada en todas las especies estudiadas y es definida como la formación de uridina monofosfato (UMP) a partir de carbamoilfosfato (CP), aspartato y PRPP; esta ruta también es conocida como la vía de orotato. La biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina consiste en 6 pasos enzimáticos: en el primer paso se produce CP de una combinación de carbonato, ATP y un grupo amino; en el siguiente paso se forma carbamoilaspartato (CA); en seguida se da la ciclización del CA para producir el anillo de pirimidina, este compuesto es nombrado como dihidroorotato, el cual subsecuentemente es oxidado para producir orotato; posteriormente el orotato es condensado con PRPP para obtener oritidina 5'-monofosfato (OMP), la cual es descarboxilada para formar uridina-5'-monofosfato (UMP). En reacciones sucesivas, el UMP se fosforila hasta generar UTP, que sufre transaminación para formar la citidina trifosfato (CTP; Stasolla *et al.*, 2003; Kafer et al., 2004; Zrenner *et al.*, 2006; Loukanina *et al.*, 2008).

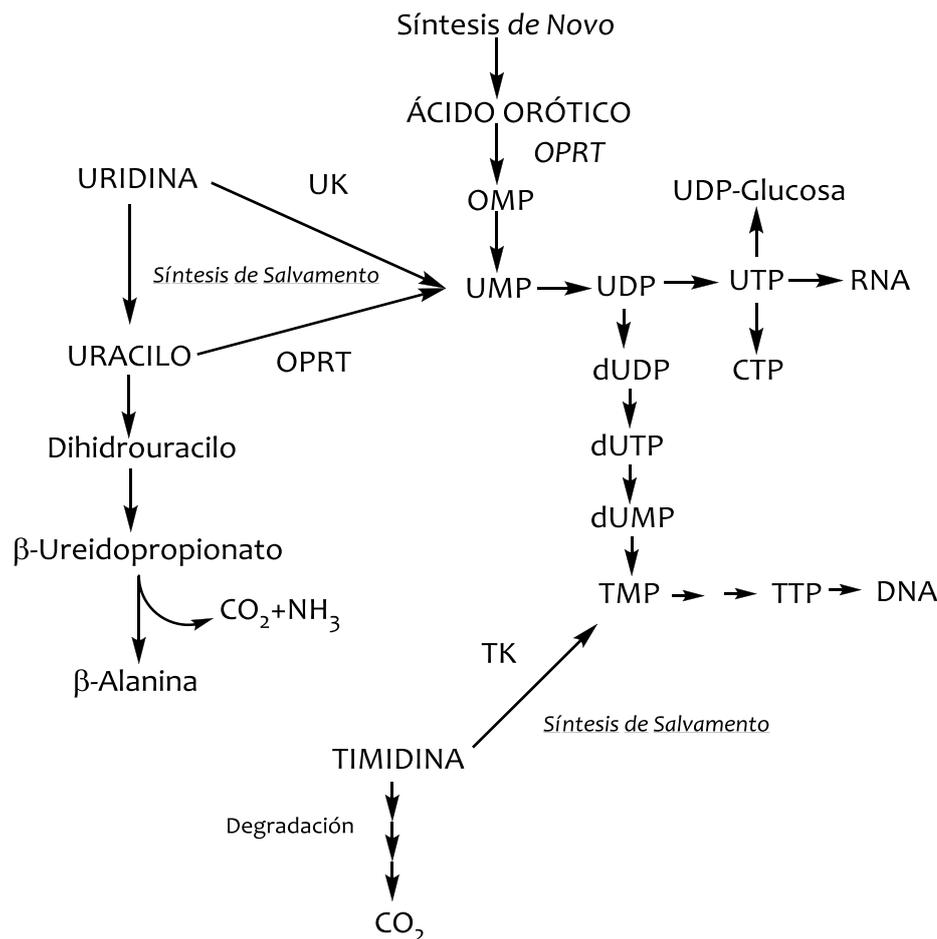


Figura 1. Vías de síntesis y degradación de nucleótidos de pirimidinas en tabaco. Orotato fosforribosiltransferasa (OPRT), Timidina cinasa (TK), Uridina cinasa (UK), uracil fosforribosil transferasa (UPRT; Adaptada de Loukanina *et al.*, 2008)

Una enzima esencial en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina y pirimidina es la ribonucleótido reductasa (RNR; Roa *et al.*, 2009). Esta enzima cataliza la reducción de la ribosa de los cuatro ribonucleótidos difosfato (NDPs) para formar los correspondientes desoxirribonucleótidos (dNDPs; Wang & Liu., 2006). Con la excepción de dUDP, los dNDPs son posteriormente fosforilados y los resultantes dCTP, dATP y dGTP son utilizados como precursores directos para la síntesis de DNA. En plantas para convertir dUTP al nucleótido de timina primero se desfosforila a dUMP y enseguida se metila (Stasolla *et al.*, 2003). En esta última reacción la enzima timidilato sintasa cataliza la transferencia del grupo metilo de N⁵, N¹⁰- metiltetrahidrofolato (MTHF) al carbono 5' de dUMP para formar dTMP. La molécula MTHF es producida por la dihidrofolato reductasa, molécula que además de participar como donador del grupo metilo

tiene función de agente reductor. Una proteína bifuncional que consiste de timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa ha sido detectada en plantas. La conversión de dTMP a dTTP ocurre por reacciones secuenciales catalizadas por nucleósido monofosfato cinasa y nucleósido difosfato cinasa (Stasolla *et al.*, 2003).

En plantas, todas las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina se localizan en los plastidios, donde se lleva a cabo este proceso, mientras que la síntesis de nucleótidos de purina ocurre en el citosol (Kafer *et al.*, 2004).

1.2 Vía de salvamento de nucleótidos

Como la síntesis *de novo* de nucleótidos tiene un alto costo energético, las células han desarrollado vías de salvamento para reusar nucleósidos y bases libres, producto de la degradación intracelular del DNA, RNA y nucleótidos. Estas vías de salvamento consumen menos energía que la síntesis *de novo* de nucleótidos pues generalmente consisten en la refosforilación de nucleósidos preformados (Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006).

Mientras que la vía *de novo* requiere de la hidrólisis de 5 nucleótidos trifosfato para producir AMP o de 7 para sintetizar GMP, la vía de salvamento de purinas solamente requiere una molécula de ATP (Zrenner *et al.*, 2006). Las bases púricas adenina y guanina pueden ser convertidas a sus respectivos nucleótidos monofosfato por adenina e hipoxantina/guanina fosforribosil transferasas usando PRPP como la fuente de ribosa fosfato. Otra ruta para reciclar bases de purina es catalizada por adenina o inosina/guanosina fosforilasas, las cuales unen a las bases libres con la desoxirribosa. La conversión de adenosina, inosina y guanosina a sus respectivos monofosfatos puede ser catalizada por adenosina e inosina/guanosina cinasas (emplean ATP como donador de fosfato) o bien por nucleósido fosfotransferasas que incorporan el fosfato de un nucleótido monofosfato al desoxinucleósido. En algunas plantas, inosina y guanosina son principalmente recicladas por nucleósido fosfotranferasas inespecíficas (Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006).



Por su parte los nucleósidos uridina/citidina y timidina son convertidos a sus respectivos nucleótidos por nucleósido cinasas específicas [uridina cinasa (UK) y timidina cinasa (TK)] y el uracilo es la única base de pirimidina que es directamente salvada a UMP, en una reacción dependiente de PRPP y catalizada por UPRT (Kafer *et al.*, 2004; Zrenner *et al.*, 2006). Una única enzima, uridina/citidina cinasa que está presente en todas las plantas investigadas, fosforila uridina y citidina. La dexocitidina cinasa y la timidina cinasa están presentes en plantas pero aún no se han elucidado detalles de sus propiedades (Stasolla *et al.*, 2003). Hasta ahora no hay mutantes en plantas para la vía de salvamento de pirimidinas, por lo que su estudio es de gran relevancia (Zrenner *et al.*, 2006).

El metabolismo de la timidina es el más complicado de todos los precursores de los ácidos nucleicos porque se requieren más pasos para generar TTP que otros nucleótidos trifosfato de pirimidina. Como resultado, la función de salvamento de la timidina puede ser especialmente importante para la célula (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

La vía de salvamento también participa en la regulación de los niveles de nucleótidos, debido a que la degradación de los nucleótidos por múltiples fosfatasas, nucleotidasas y nucleosidasas, en conjunto con las vías de síntesis regulan el tamaño de estas pozas (Dobrovolsky *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006). Por lo tanto la expresión de algunos genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos son dependientes del ciclo celular. Durante las distintas fases del ciclo celular hay variaciones en las pozas de nucleótidos, pues se incrementan durante las fases S y G2 (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

Se ha caracterizado la expresión de las isoformas de la enzima uracil fosforribosil transferasa (UPRT) que participa en la vía de salvamento de pirimidinas pasando el nucleósido uridina a uridina monofosfato. Los resultados indicaron que son expresadas diferencialmente. De este hallazgo se ha concluido que el salvamento de pirimidinas puede ocurrir en el citosol y en los plastidios (Zrenner *et al.*, 2006).

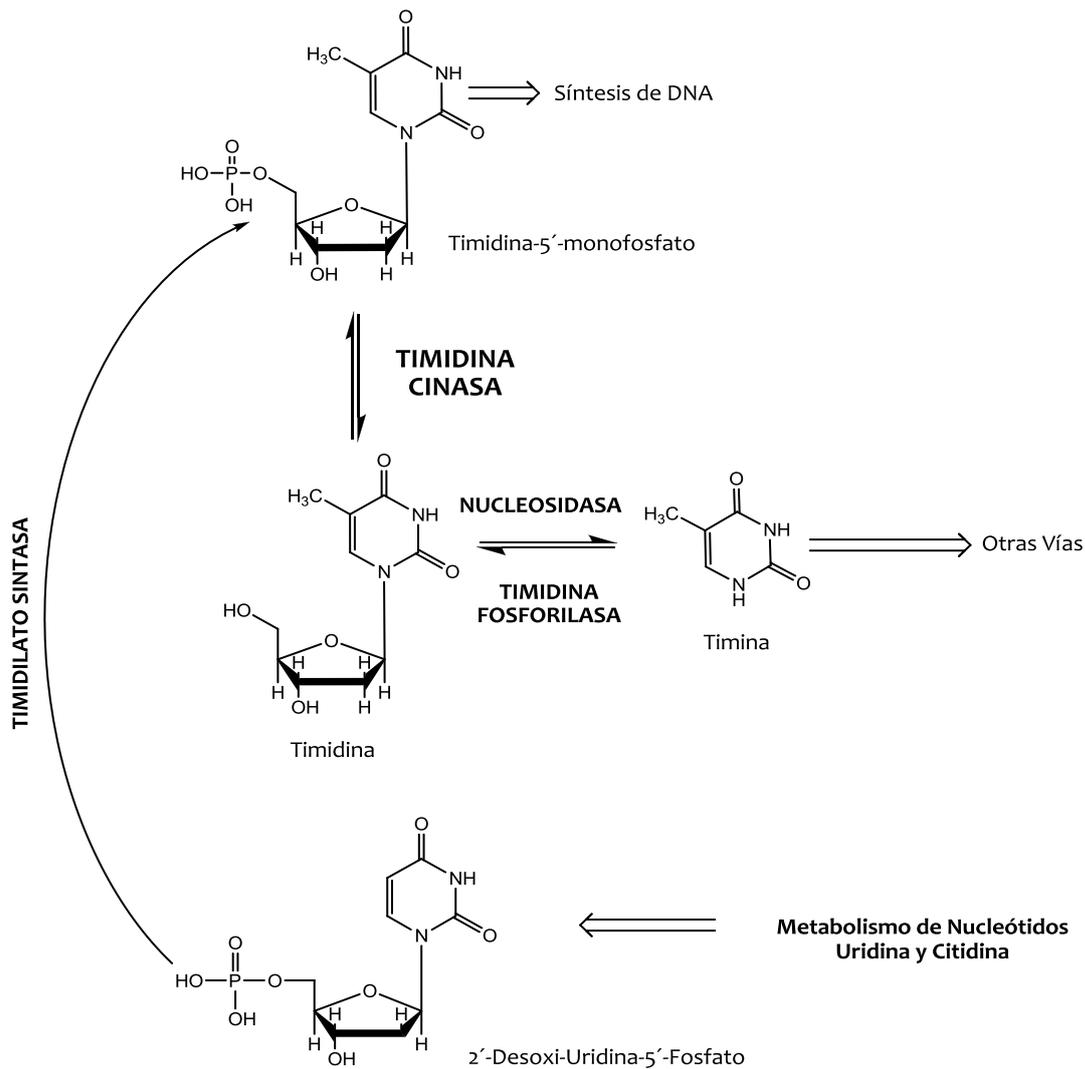


Figura 2. Metabolismo de la timidina La actividad de la timidina cinasa (vía de salvamento) y de la timidilato sintasa (TS; vía *de novo*), se incrementa en la fase S, incrementando la concentración de Timidina monofosfato (TMP). La TS cataliza la transformación de 2`Desoxi-uridina-5`-fosfato (dUMP) a TMP, mediante la transferencia dependiente de folato de un grupo metilo al C5 del anillo pirimidínico. Reacciones clave del metabolismo de uridina y citidina, permiten la formación de dUMP. La TMP se fosforila dos veces más antes de incorporarse al DNA (Tomada de Dobrovolsky *et al.*, 2003).

Se asume frecuentemente que la gran demanda de nucleótidos en células en crecimiento y división se satisface por la síntesis *de novo*, mientras que células que no están en crecimiento pueden ser capaces de mantener sus pozas de nucleótidos por el salvamento de nucleósidos, tal vez suplementado en un cierto grado con los nuevos nucleótidos sintetizados para mantener el balance con los procesos de degradación (Zrenner *et al.*, 2006; Zrenner *et al.*, 2009).

2. Timidina cinasa

La timidina cinasa (TK) es una enzima que participa en la ruta de salvamento de la biosíntesis de nucleótidos de timina, dicha enzima se encuentra involucrada en la síntesis de timidina trifosfato, precursor para la replicación del DNA y para procesos de reparación (Gasparri *et al*, 2009). Su importancia radica en que provee los precursores de timidina para la síntesis del DNA a un menor costo energético para la célula, comparada con la obtención de TMP mediante la vía *de novo* que involucra un elevado gasto de ATP. Por lo tanto, esta enzima resulta clave para producir un balance en la concentración de nucleótidos, para así mantener una adecuada función celular (Jarchow-Choy *et al*, 2009).

La timidina cinasa 1 o citosólica (ATP: timidina 5`-fosfotransferasa, EC 2.7.1.21; TK) es una enzima crucial en la vía de salvamento de pirimidinas (Flemington *et al*, 1987), cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al grupo 5`hidroxilo de la timidina para formar TMP, la reacción es dependiente de Mg^{2+} (Johansson & Karlsson, 1997). Asimismo, fosforila desoxiuridina a su correspondiente monofosfato (Gasparri *et al*, 2009). Se requieren dos pasos adicionales de fosforilación para obtener timidina trifosfato (dTTP), primero por la timidilato cinasa seguido de la nucleósido difosfato cinasa (Pérez – Pérez *et al*, 2008).

En células de mamíferos existe otra isoforma de la TK designada como TK2, la cual esta localizada en la mitocondria. La TK2 se expresa constitutivamente, mientras que la expresión de TK1 citosólica es regulada durante el ciclo celular (Hazra *et al*, 2009).

2.1 Clasificación y función de las *dNKs*

La refosforilación de nucleósidos usando ATP como donador de fosfato es la principal reacción en la vía de salvamento de nucleótidos y es catalizada por desoxirribonucleósido cinasas (*dNKs*; Eriksson *et al.*, 2002). En mamíferos, hay cuatro desoxirribonucleósido cinasas: (i) la timidina cinasa citosólica (TK1) que fosforila timidina y desoxiuridina; (ii) la TK2 mitocondrial que fosforila timidina y desoxicitidina (dC); (iii) la desoxicitidina cinasa (dCK) que fosforila dC, desoxiadenosina (dA) y desoxiguanosina (dG); (iv) y la desoxiguanosina cinasa (dGK) fosforila dA y dG (Sandrini & Piskur., 2005).

En humanos la dCK citosólica y la TK2 se expresan constitutivamente, mientras que la expresión de la TK1 citosólica está limitada a la fase S del ciclo celular. Esta diferencia en expresión es consistente con la continua necesidad de adenosina, guanosina y citosina trifosfatos en el citosol para diversas funciones biológicas, mientras que la TTP es sólo requerida para la replicación del DNA. Así, en células no proliferativas no hay necesidad de nucleótidos de timidina en el citosol y la expresión constitutiva de TK2 permite la replicación del DNA mitocondrial (Hazra *et al.*, 2009).

Las desoxirribonucleósido cinasas dCK, dGK y TK2 muestran una alta identidad en la secuencia de aminoácidos. Desde un punto de vista filogenético estas proteínas pertenecen a la misma familia, mientras que la TK1 pertenece a otro grupo que prácticamente sólo está representado por esta enzima en mamíferos y sus homólogos TKs de otros organismos (Segura-Peña *et al.*, 2007). En el primer grupo también se incluye la desoxinucleósido cinasa (dNK) de *Drosophila melanogaster* (la cual fosforila los 4 desoxirribonucleótidos) y las desoxirribonucleósido cinasas virales (figura 3; Sandrini & Piskur., 2005)

Secuencias parecidas a la TK1 son encontradas en una amplia variedad de organismos de plantas a humanos, así como en virus y varias bacterias (Weling *et al.*, 2004). Sin embargo, las levaduras carecen de la TK1 (Eriksson *et al.*, 2002).



Figura 3. Relación filogenética de las desoxirribonucleósido cinasas (dNKs). Nótese que la TK1 de humano y sus ortólogos en otras especies pertenece a un grupo independiente de las demás dNKs. (Tomada de Sandrini & Piskur., 2005).

2.2 Estructura del gen TK1 humano

El gen de la TK1 humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (Eriksson *et al.*, 2002) abarcando una región de aproximadamente 13kb, la cual contiene 7 exones que se ensamblan en un RNAm maduro de aproximadamente 1430pb. Dentro de los intrones se encuentran 13 secuencias repetidas de la familia Alu, lo que hace que los intrones sean mucho más largos que en el gen de pollo, produciendo la discrepancia en el tamaño de los genes de la *tk* entre humano y pollo, debido a que los tamaños son de 12,9kb y de 3kb respectivamente (Flemington *et al.*, 1987).

El cDNA es de 1241 pb con un marco de lectura abierto (Open Reading frame, ORF) de 702 pb, mostrando que el RNAm tiene una región no traducida 5' (5'UTR) de 57 pb y una región no traducida 3' (3'UTR) de 662 pb, codificando una proteína de 234 aa con un tamaño de 25.5 kDa (Eriksson *et al.*, 2002).

2.3 Estructura terciaria de la TK1 humana

La estructura terciaria de la TK1 humana se resolvió por la difracción de cristales de la proteína recombinante que carece de los últimos 41 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal. Este estudio reveló que se trata de un tetrámero que tiene una estructura monomérica completamente diferente a la de las otras dNKs porque está compuesta de dos dominios. Como se muestra en la figura 4, uno de ellos, el dominio α/β tiene un centro de seis cadenas β



plegadas en paralelo que están rodeadas por una larga α hélice y una asa flexible en uno de los lados y tres α hélices más cortas del otro lado (Weling *et al.*, 2004). El dominio completo α/β se asemeja más, por sus doblamientos al dominio de unión a ATP, de las ATPasas RecA-F1 (factores de intercambio de las cadenas de DNA dependientes de ATP). Estos dominios son encontrados en varias enzimas como helicasas y proteínas de reparación de DNA. Estas enzimas participan en el ciclo celular y están involucradas directa o indirectamente en replicación y reparación del DNA. Sin embargo, las reacciones catalizadas por la helicasa y TK1 son completamente diferentes (Sandrini & Piskur., 2005).

De los dos dominios presentes en esta enzima, el extremo amino se encuentra en el dominio más largo que es el α/β (Segura-Peña *et al.*, 2007), mientras que el dominio más pequeño formado por 70-80 aminoácidos contiene el extremo carboxilo (Weling *et al.*, 2004). El dominio pequeño comienza con un asa de 15 residuos que contiene dos residuos de cisteína que participan en la unión del Zn^{2+} , este ión se encuentra tetraédricamente coordinado. El asa de unión al Zn^{2+} está seguido por la cadena $\beta 7$, la cual está conectada a la cadena $\beta 8$ por la llamada asa "lasso" que está involucrado en la unión a la timidina (figura 4). Una α -hélice corta al final del extremo carboxilo contiene los residuos de Cys en los que se une el Zn^{2+} (Segura-Peña *et al.*, 2007).

El sitio activo de la TK1 se encuentra entre sus 2 dominios (Sandrini & Piskur., 2005), mientras que el donador del grupo fosfato se une a un sitio expuesto formado por el asa P ubicado en el dominio α/β . La alta especificidad de la TK1 por su sustrato es debida a las dimensiones de este sitio catalítico (Weling *et al.*, 2004),

El ión Mg^{2+} se encuentra coordinado octaédricamente, está unido por 2 grupos fosfatos de la molécula de ATP, el grupo hidroxilo de la Thr17 y tres moléculas de agua. Los residuos conservados de ácidos carboxílicos en la posición Asp83 y Glu84 interactúan vía moléculas de agua con el Mg^{2+} (Segura-Peña *et al.*, 2007).

La regulación por retroalimentación vía producto final de la TK1 es similar a la de otras dNKs. El producto final timidina trifosfato (dTTP) inhibe a la enzima uniéndose como si fuera el sustrato. La base nitrogenada ocupa el lugar de la timidina, mientras que el grupo trifosfato se une al revés de cómo lo hace el ATP en el asa P (Sandrini & Piskur, 2005). La TK1 contiene extensiones de 17 y 40 aa en los extremos N- y C- respectivamente aunque estas regiones no son requeridas para la función catalítica de la enzima.

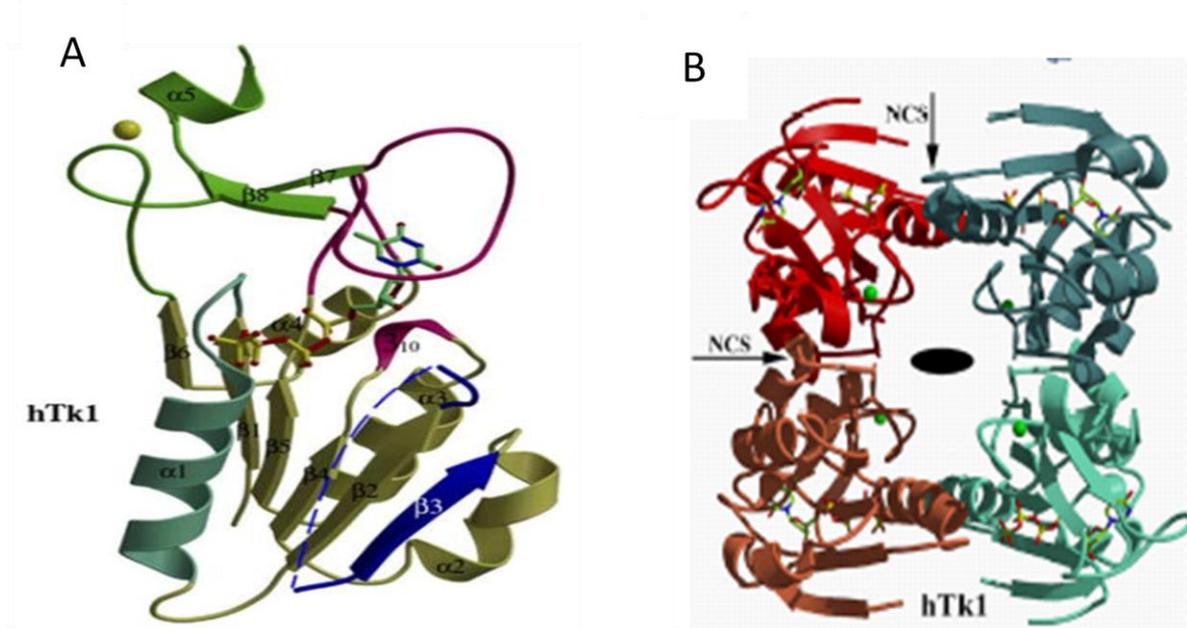


Figura 4. Estructura tridimensional de la TK1 A. estructura terciaria de un monómero de la TK1 de humano (hTK1), ver detalles en el texto. B Estructura cuaternaria de hTK1 con conformación tetramérica (Tomada de Segura-Peña *et al.*, 2007).

2.4 Importancia Biológica de la Timidina cinasa

La función de la timidina cinasa en mamíferos aún no se ha establecido con certeza. Mientras que en células normales la enzima es ubicua y se regula por un estricto control, en algunas líneas de células immortalizadas la enzima puede estar ausente y éstas son capaces de crecer y proliferar indefinidamente (Wakazono *et al.*, 1994). Sin embargo, varios estudios han mostrado que el decremento en los niveles de dTTP debido a la deficiencia de TK en líneas celulares se correlaciona con el incremento en el daño a DNA induciendo muerte celular y mutagénesis (Wakazono *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2010).



Datos publicados indican que la expresión de la TK1 se da en varios tipos de tejidos, incluyendo tejidos diferenciados, en respuesta a reparación del daño al DNA (Al-Nabulsi *et al.*, 1994).

En un estudio reciente se trataron células deficientes en p53 con varios agentes causantes de daño a DNA incluyendo: etopósido, radiación γ , afidicolina, inhibidores de la DNA polimerasa α e hidroxiurea; después de 24h del tratamiento los niveles de estado estacionario de TK1 se incrementaron en respuesta a los diferentes tratamientos, indicando que la regulación positiva de la TK1 es un evento general asociado al daño a DNA, mientras que la expresión de la timidilato sintasa (TS) en ninguno de los casos se incremento por daño a DNA (Chen *et al.*, 2010). También se encontró que la TK1 se transloca al núcleo después de un determinado tiempo del tratamiento. La expresión de la TK1 es inducida por daño a DNA en diferentes líneas celulares y la prolongación de la inducción de la TK1 está relacionada con el contexto celular de p53. Es decir que la regulación positiva alta de la TK1 en células tumorales deficientes en p53, expande la poza de dTTP durante la recuperación del daño causado al DNA en la fase G2 mejorando la reparación y sobrevivencia. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la inhibición del ciclo celular es mediada por la proteína p21 afectando los niveles de TK1 en respuesta al daño a DNA en presencia de la proteína p53 funcional, ya que el arresto del ciclo celular ocurre en la transición G1/S. En cambio, en ausencia de p53 se bloquea el ciclo celular en la fase G2, permitiendo una mayor acumulación de TK1 (Chen *et al.*, 2010).

Además, la timidina cinasa debe tener un papel importante en el balance de la concentración intracelular de dTTP y precursores de otros nucleótidos trifosfatos, ya que el dTTP actúa como un efector alósterico de la ribonucleótido reductasa, estimulando la conversión de GDP a dGDP e inhibiendo la conversión de CDP a dCDP (Segura-Peña *et al.*, 2007). Este mismo efecto se ha observado cuando se adicionan elevadas concentraciones de timidina al medio de cultivo de células de fibroblastos humanos; este tratamiento detiene el avance de las horquillas de replicación debido a una falta de dCTP (Ke *et al.*, 2004). Este desequilibrio en las pozas produce un aumento en el índice de

mutaciones espontáneas. Este hecho sugiere que el aporte excesivo de TTP y la consecuente disminución en los niveles de dCTP comprometen la fidelidad de la síntesis del DNA, debido a la acumulación de errores durante el prolongado retraso de la mitosis. El estudio demostró la importancia de la regulación post-traducciona l de la timidina cinasa en el mantenimiento de la integridad del genoma (Ke et al., 2004). Por lo tanto, una fina regulación de los niveles de dTTP es necesaria para producir el balance deseado de la poza de nucleótidos intracelulares, lo cual es esencial para la estabilidad genética (Segura-Peña *et al.*, 2007).

Por otra parte, estudios basados en el marcaje isotópico de dT han proporcionado una idea del papel de TK1 y TK2 para las pozas de dTTP en el citosol y en la mitocondria. Se demostró que existe un rápido intercambio entre los dos compartimentos. Se propone que en células en proliferación los dNTPs de DNAm t son importados a partir de nucleótidos del citosol, mientras el salvamento de los desoxiribonucleósidos intra-mitocondriales provee dNTPs en células diferenciadas. Sin embargo, también hay una alta dependencia de la síntesis *de novo* de dTTP. Esto sugiere que el salvamento por la TK2 es importante solo en células diferenciadas, debido a la ausencia de la síntesis *de novo*, por lo que el citosol no tiene suficientes dNTPs para importar dentro de la mitocondria para la replicación y reparación del DNAm t (Pontarin et al., 2003). Es así que la mutación de TK2 llega a ser más prominente y puede tener un efecto devastador en el mantenimiento del DNA organelar. La deficiencia de TK2 tiene consecuencias preferentemente en músculo y otros tejidos que no se encuentran en replicación constante como hígado, cerebro, corazón o piel (Pérez – Pérez et al., 2008). Igualmente resulta en la reducción de la función respiratoria de la mitocondria y en una devastadora miopatía en humanos (Dobrovolsky et al., 2003). En contraste, la deficiencia de la TK1 no se ha asociado con algún síndrome en humanos (Birringer et al., 2006).

La función *in vivo* de la TK1 se ha estudiado durante el desarrollo de ratones knockout (KO) homocigotos ($tk^{-/-}$). La inactivación del gen TK1, con lo cual presumiblemente se elimina la vía de salvamento de la timidina, tiene un profundo efecto en el desarrollo post-embriionario, a pesar del hecho que los

genes involucrados en la síntesis *de novo* de TMP permanecen intactos. Los ratones KO tienen un desarrollo embrionario normal pero a partir del destete, o más tarde, adquieren una postura jorobada, después arrastran sus patas traseras al caminar y eventualmente quedan inmóviles. Asimismo, su periodo de vida se reduce a menos de la mitad que en los ratones silvestres. Además, presentan un bajo índice reproductivo y los niveles de timidina en sangre son el doble que en los ratones silvestres. Esto permite suponer que la ruta biosintética *de novo* no es suficiente para mantener la poza de TMP en muchas células, o que la actividad degradativa de las nucleotidasas es alta y por ende se requiere la vía de salvamento para el mantenimiento de la poza (Dobrovolsky *et al.*, 2003). Todos los ratones KO de la TK1 desarrollan esclerosis del glomérulo del riñón y alteraciones histológicas en la estructura linfoide del bazo, además los animales exhiben espontáneamente inflamación de las arterias, lo cual junto con las anomalías de linfocitos y bazo sugiere un sistema inmune anormal (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

2.5 Regiones promotoras de la TK1 en mamíferos

La expresión de la TK1 es fuertemente regulada en el ciclo celular a nivel transcripcional (Mikulits *et al.*, 1996). Muchos genes que codifican enzimas involucradas en la replicación de DNA y producción de precursores de ácidos nucleicos son regulados similarmente. No sorprende que los promotores de cada uno de estos genes exhiban alto grado de homología en la secuencia entre los organismos. Sin embargo, esto no es igual para los genes de la TK donde las diferentes especies muestran marcadas divergencias en las secuencias de la región promotora, mientras que la parte que se expresa de los genes es altamente homóloga. Esto sugiere que hay alta variación en los mecanismos de regulación transcripcional de este gen (Wintersberger, 1996; Sorensen *et al.*, 1999).

La regulación transcripcional de un promotor determinado está dada por la cooperación entre los componentes de la maquinaria basal de la transcripción y los factores de transcripción que se unen al promotor en una secuencia específica. Los promotores de genes regulados por el ciclo celular

frecuentemente tienen sitios de unión para factores de transcripción como los de la familia E2F y Sp1 (Rotheneder *et al.*, 1999).

Los primeros estudios que se realizaron para caracterizar la región promotora del gen de la TK1 humana los realizaron Kreidberg *et al.* (1986) y Flemington *et al.* (1987) de forma separada. Por una parte se usaron mutantes con deleciones en la región 5' del gen de la TK1 y se introdujeron dentro de células TK- para definir los elementos involucrados en la expresión del gen, entre estos se probaron: una secuencia de hexanucleótidos rica en AT, una secuencia canónica para la caja CAAT en orientación invertida, y una secuencia rica en GC. La ausencia de estas secuencias del promotor reduce la expresión del gen y al eliminar más de una de estas secuencias se suprime por completo la expresión (Kreidberg *et al.*, 1986). Además, se fusionó la región promotora de aproximadamente 500 pb al gen reportero cloramfenicol acetil transferasa para determinar la actividad del promotor. En esta secuencia se identificó adicionalmente una señal de transcripción tipo caja TATAA, aparte de los elementos ya mencionados (Flemington *et al.*, 1987). Estudios posteriores demostraron que el promotor de la TK1 humano tiene varios sitios de unión para Sp1 y E2F, dos cajas CCAAT reversas y un elemento TATA (Sorensen *et al.*, 1999)

Por otra parte, el promotor de la TK1 murina contiene un sitio de unión a Sp1, un motivo de unión para E2F y no presenta caja TATA. En cuanto al promotor de la TK1 de hámster, éste contiene una caja TATA, sitios de unión a Sp1, una caja CCAAT en la cual se une el factor de transcripción NF-Y y no contiene una secuencia E2F funcional, es por ello que el par de factores de transcripción Sp1/NF-Y está activo en este promotor y sustituye al par E2F/Sp1 que está activo en el promotor murino. Así, aunque los genes de la TK de hámster y murino son regulados muy similarmente durante el crecimiento, los mecanismos de esta regulación son claramente distintos (Sorensen *et al.*, 1999).

La región promotora de la TK1 de ratón contiene tres regiones de unión a proteína: MT1, MT2 y MT3, estas tres secuencias se unen específicamente a

distintos complejos de proteínas. MT1 contiene una caja perfecta GC a la que se une la proteína Sp1, este complejo está presente constitutivamente durante el ciclo celular. La unión a MT3 es regulada por el ciclo celular, y ahí se une un complejo Yi1 específicamente en la fase G1, lo cual se convierte en el complejo Yi2 después de que las células entraron a fase S. Este cambio involucra interacciones con una proteína relacionada a pRB y una cinasa cdk. El motivo MT2 del promotor de TK de ratón es un sitio de unión a E2F, pues mutaciones en el sitio MT2 resultan en baja actividad de unión del complejo que forma E2F con otras proteínas como p107 (Dou *et al*, 1994).

Conjuntamente se tiene demostrado que proteínas de la familia E2F se unen directamente a Sp1, lo cual resulta en la activación del promotor de la TK murino. Se sabe que el represor transcripcional desacetilasa de histonas (HDAC) puede unirse a Sp1, por ello se reprime la actividad del promotor de la TK1. Proteínas de la familia E2F mostraron restaurar la actividad del promotor por competencia con HDAC en la unión a Sp1. La interacción entre E2F y proteínas Sp evita la represión mediada por HDAC (Rotheneder *et al.*, 1999). Es por lo tanto posible que en la estrategia común para la regulación de los promotores de la TK de hámster, murino y de otras especies estén involucrados cambios en la estructura de la cromatina a través de la modificación local de las histonas (Sorensen *et al.*, 1999).

2.6 Regulación de la TK1 durante el ciclo celular

La actividad de la TK1 está estrechamente correlacionada con la proliferación celular y sus niveles de RNAm y proteína, son regulados por múltiples mecanismos durante el ciclo celular. Los niveles de RNAm y la actividad de la proteína incrementan cuando las células entran en fase S (Gasparri *et al*, 2009). Es por ello que las células diferenciadas o en un estado quiescente poseen niveles muy bajos de RNAm de la TK1 que se refleja en los niveles de actividad de la proteína (Mikulits *et al.*, 1996).

La expresión de la TK1 aparece en células que se encuentran en fase G1 tardía, incrementa en fase S, coincidiendo con el incremento en la síntesis de DNA, en fase G2 declina y desaparece durante la mitosis (ver figura 5; Mikulits

et al., 1996). De un gran número de estudios está claro que la regulación positiva durante la fase S de la TK1 correlaciona con la proliferación celular. Además de esta regulación a nivel transcripcional, los mecanismos post traduccionales parecen tener un papel importante en el nivel de la proteína TK1 funcional. Un mecanismo regulatorio post-traduccional de significancia para los niveles de expresión de TK1 fue asociado con una secuencia dentro de la región carboxilo terminal del polipéptido de la TK1, señalización específica para la degradación de la enzima en la fase G2/M del ciclo celular entre la metafase y la citocinesis (Eriksson *et al.*, 2002). Un proceso de degradación mitótico es iniciado por ubiquitinación de la secuencia del motivo (KEN) en el extremo carboxilo de la TK1 (Gasparri *et al.*, 2009). La eliminación de esta secuencia de aa en el extremo carboxilo terminal suprime la degradación específica G2/M y deja la expresión de la enzima en células quiescentes (Eriksson *et al.*, 2002). Así mismo, células transfectadas con una mutante de la TK1 que no puede ser reconocida para la degradación proteosomal, exhiben un incremento anormal en la concentración de dTTP, lo cual permite una alta frecuencia de mutaciones y bajo crecimiento celular (Segura-Peña *et al.*, 2007).

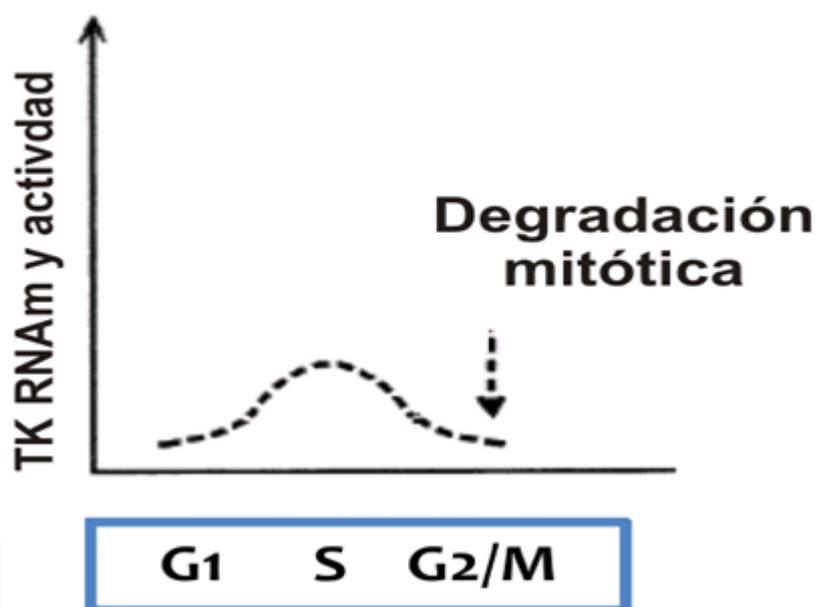


Figura 5. Representación de la regulación de la enzima TK1 durante el ciclo celular El pico de la actividad de la enzima se presenta en la fase S, declinando en la fase G2 y desaparece durante la mitosis (M; Tomada y adaptada de Mikulits *et al.*, 1996)

2.7 Timidina cinasa en plantas

Hasta ahora, pocas secuencias de los genes de la TK han sido reportadas en plantas, entre los que se encuentran: *Oryza*, *Medicago*, *Lycopersicon* y *Arabidopsis*, pero no hay información detallada disponible. Aunque hay reportes sobre la actividad de potenciales TKs, la purificación de la enzima no se ha sido realizado (Zrenner *et al.*, 2006) y hasta el momento no se ha caracterizado la regulación de su expresión ni la estructura de los promotores de estos genes en plantas.

Se ha reportado la actividad de timidina cinasa en plántulas de maíz, sin embargo se ha indicado que la timidina cinasa medida en extractos crudos pudiera ser debida a la combinación de actividades de la nucleósido fosfotransferasa y fosfohidrolasa de ATP. La actividad de la timidina cinasa no fue detectada en embriones en germinación, sin embargo, se observó una alta actividad de timidina cinasa en embriones somáticos y zigóticos en germinación de abeto blanco (Stasolla *et al.*, 2003).

Recientemente se reportó la clonación y caracterización del gen de la TK de *Hevea brasiliensis* (árbol del hule) y su expresión se asoció estrechamente con el síndrome “*tapping panel dryness*” (TPD) que es una condición fisiológica de etiología desconocida en la que se deja de producir látex. Se encontró que en tejidos no proliferativos de árboles afectados por TPD hay niveles 7 veces menores del transcrito de HbTK que en plantas que no muestran este síndrome. Estos resultados sugieren que la regulación positiva de la expresión de este gen puede estar involucrada en mecanismos de reparación de daño a DNA en la activación de la división celular y el metabolismo (Venkatachalam *et al.*, 2010).

Por otra parte la sobreexpresión de la TK1 de tomate (LeTK1), en células de glioma humanas incrementó unas 500 veces la sensibilidad de éstas al fármaco AZT. Esta enzima transforma el pro-fármaco a un análogo nucleósido, que resulta citotóxico, por lo tanto se suprime el crecimiento del tumor (Khan *et al.*, 2010). Estos resultados muestran que tanto la TK de mamíferos como de plantas tienen actividad catalítica sobre los mismos análogos de timidina.

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio se aisló una clona parcial de cDNA de maíz y se estudio la expresión del gen TK1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Se observó un máximo en la cantidad de transcrito a las 12h de la germinación. Además el nivel de RNAm se estímulo notablemente al adicionar las hormonas vegetales auxina y citocinina a una concentración 1 μ M (Suzuri, 2001). Además se encontró una estrecha relación entre la actividad de la enzima y la replicación del DNA en embriones de maíz, lo que sugiere una función relevante en la vía de salvamento de nucleótidos en esta etapa del desarrollo (Suzuri, 2006).

2.8 Timidina cinasa en *Arabidopsis thaliana*

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se identificaron dos genes que codifican potenciales TKs y que se transcriben. (Zrenner *et al.*, 2006): la primera (TK1a) se localiza en el cromosoma 3 (AT3G07800) y la segunda (TK1b) en el cromosoma 5 (AT5G23070). Esta última tiene una posible secuencia de tránsito al cloroplasto en su extremo amino. El peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la TK1 de *Arabidopsis* son 26kDa y 6.52 para AtTK1a, y 26.4kDa y 6,88 para AtTK1b, sin incluir el péptido de tránsito al cloroplasto. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias a nivel de nucleótidos es del 52% y a nivel aminoácidos es del 53% (Suzuri, 2006). Asimismo, los genes presenta distintas estructuras en cuanto a la cantidad de exones e intrones lo que sugiere que pueden tener una función y patrón de expresión diferenciales.

Los datos de expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en el atlas de expresión AtGenExpress (Schmid *et al*, 2005), muestran que los niveles de transcrito para el gen TK1a son más abundantes y ubicuos que de los del gen TK1b durante el desarrollo de la planta. Además, un estudio del perfil del transcriptoma de *Arabidopsis* muestra una inducción de alrededor de 30 veces de los transcritos de la TK1a después del tratamiento con agentes genotóxicos como bleomicina y mitomicina C, que causan ruptura en el DNA, sugiriendo que el drástico incremento en la transcripción de este gen bajo estrés genotóxico podría reflejar una alta demanda para la síntesis de DNA durante la

reparación (Chen *et al*, 2003). Sin embargo, no se reporta la inducción del gen TK1b con estos compuestos.

3. *Arabidopsis thaliana*

El género de *Arabidopsis* pertenece a la tribu *Sisymbriae*, un miembro de la familia *Brassicaceae*. Varias especies pertenecen al género *Arabidopsis*, el miembro mejor conocido y el más extensamente utilizado como modelo de investigación en biología de plantas es *Arabidopsis thaliana*. Esta especie es nativa de regiones de clima templado de Europa. Entre los ecotipos comúnmente empleados se encuentran Landsberg erecta y Columbia, debido a que su ciclo de vida puede ser completado entre 6 y 8 semanas (Wilson, 2000).

3.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Por varias décadas, investigadores han estudiado la genética y la bioquímica del mantenimiento del genoma usando mayormente varios organismos modelo: en procariontes se ha establecido *Escherichia coli* y en eucariontes, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y células de mamíferos. Cada uno ha servido para revelar aspectos bioquímicos y genéticos fundamentales que participan en el desarrollo y la fisiología. Un organismo modelo adicional que ha sido muy valioso para descubrir la regulación del desarrollo y la respuesta al medio ambiente en plantas es *A. thaliana* (Hays, 2002). Además de su ciclo de vida corto, esta especie representa muchas ventajas en términos del tamaño y estructura de su genoma que facilitaron su secuenciación. En comparación a otras angiospermas, tiene relativamente un genoma pequeño con un estimado de 125Mb. La principal razón de que su genoma sea tan pequeño es porque tiene poco DNA repetitivo, alrededor del 60% del DNA nuclear es codificante (Wilson, 2000). Una ventaja adicional es que se trata de una planta diploide (número de cromosomas haploide $n=5$), por lo tanto no se parece a modelos experimentales como el maíz y otras plantas de cultivo, las cuales son poliploides, lo que dificulta la identificación de características recesivas. Una característica más que ha permitido la adopción de esta planta como una especie modelo para estudios genético-moleculares se debe al hecho de que

es manejable para ambos tipos de transformación: estable y transitoria. Asimismo, es fácilmente transformada por *Agrobacterium tumefaciens* (Wilson, 2000). De esta manera se simplifican los experimentos que requieren el uso de plantas transgénicas y obtención de mutantes (mediante T-DNA y transposones) que permiten hacer estudios funcionales. Aunque la estricta diploidia de *Arabidopsis* significa que la mayoría de las mutaciones sentidas serían recesivas, la auto fertilización automática produce mutantes homocigotas. Mutaciones de inserciones DNA-T en la primera generación (T1) son recesivas y no tienen fenotipo, pero debido a la segregación mendeliana los fenotipos de las mutaciones pueden ser observados en la progenie (T2), en donde una cuarta parte de la progenie produce semillas homocigotas (Hays, 2002).

3.2 Arquitectura del meristemo de raíz

Después de la germinación de una semilla, la raíz se desarrolla a partir de un órgano embrionario que se llama radícula. Cuando la radícula sale de la semilla y crece se le llama raíz primaria. En la punta o el ápice de la raíz se encuentra el meristemo apical en donde hay constante división celular debido a que la mitosis se mantiene permanentemente (Dolan et al., 1993). Entre mayor sea el número de células que se dividen en el meristemo, la raíz crecerá más rápidamente (Curtis & Hays., 2007).

En el ápice de la raíz, se encuentran células madres también llamadas iniciales y se localizan alrededor de las células del centro quiescente (QC; Terpstra & Heidstra., 2009; Flucher & Sablowski., 2009). Las células madre, continuamente producen células hijas por divisiones asimétricas. Dos pozas de células madre pueden ser distinguidas. Las hijas proximales de las células madre forman el meristemo, por su rápida tasa de división sirven como fuente de la mayoría de las nuevas células en la raíz en crecimiento, por ejemplo células de la epidermis y tipos de células vasculares. Las hijas de las células madres distales no se dividen de nuevo, pero ellas se diferencian a células de la columela (Jiang & Feldmand., 2005; Scheres., 2007). A pesar de la aparente restricción de linajes, las cuales son debido al preciso control de las divisiones

celulares, las hijas de las células madres pueden adoptar diferentes destinos dependiendo de su posición (Van den Berg et al., 1997; Scheres., 2007).

En la raíz de *Arabidopsis*, las filas de los diferentes tipos de células que se originan del meristemo se muestran en la figura 6A. Cada fila de células comienza en una célula inicial (Van den Berg et al., 1997; Flucher & Sablowski., 2009). Por su parte la columella (cofia), sirve para proteger al meristemo a medida que avanza la raíz a través del suelo (Jiang & Feldmand., 2005).

Las células del QC se dividen con una frecuencia 10 a 15 veces menor que las otras células del meristemo. Cuando una célula del QC se divide y da origen a dos células hijas, una de ellas se queda en el centro quiescente y la otra se convierte en una célula inicial del cortex. Después de que una célula inicial se divide n veces en el meristemo, se forma una hilera de $2n$ células nuevas, que se van alejando del centro quiescente y acercando a la zona de elongación (Terpstra & Heidstra., 2009). Al QC se le ha atribuido la función de reservorio de células madre para poder reemplazar las células dañadas, o como un organizador de patrones celulares (Van den Berg et al., 1997). Otra función importante del QC es reprimir la diferenciación de las células del meristemo. Cuando las células del QC de *Arabidopsis* se eliminan usando rayos láser, las células meristemáticas adyacentes no se dividen y en lugar de esto se diferencian (Van den Berg et al., 1997).

Un poco más arriba del meristemo se encuentra la zona de elongación; en esta zona las células ya no se dividen, sino que se alargan hasta alcanzar su tamaño final, posteriormente entran a otra zona de la raíz que se llama de diferenciación o maduración (ver figura 6B). Ahí las células adquieren las características que les permiten llevar a cabo diversas funciones (Curtis & Hays., 2007; Terpstra & Heidstra., 2009).

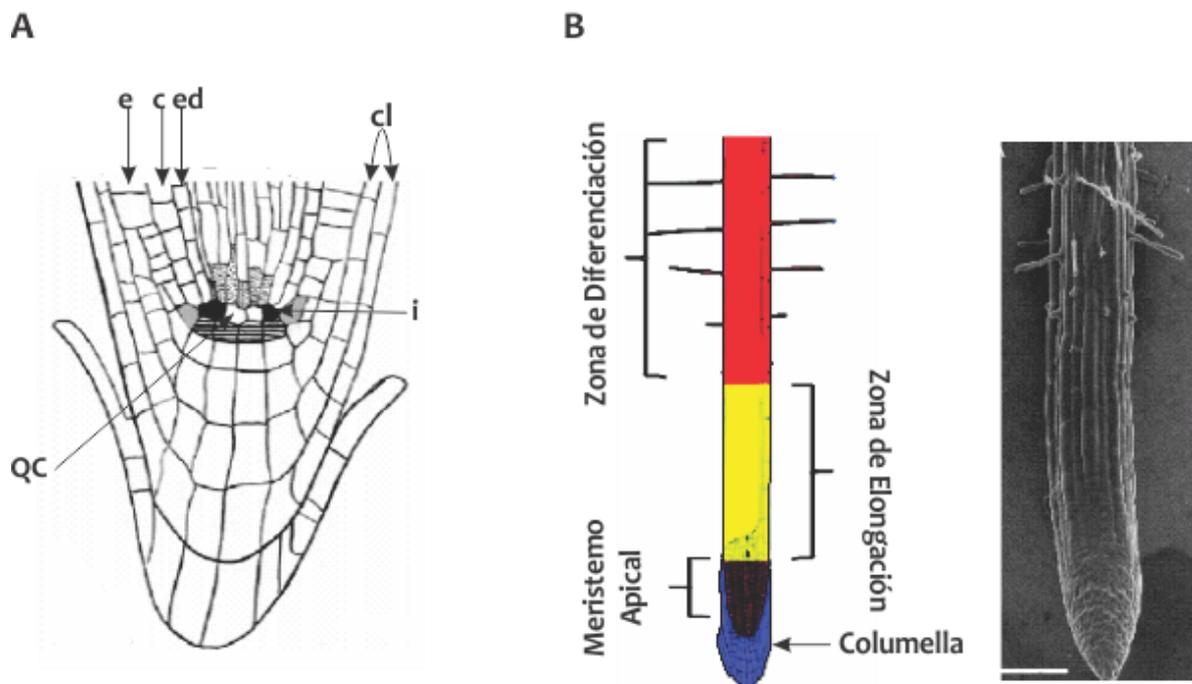


Figura 6. Arquitectura de la raíz. En (A) se muestran las diferentes filas de los tipos de células que se encuentran en la zona del meristemo: Centro quiescente (QC), epidermis (e), cortex (c), endodermis (ed), células iniciales (i), cofia lateral (cl) e inicio de cortex. (B) Las diferentes zonas de la raíz (Adaptada de Terpstra & Heidstra, 2009).

4. Daño genotóxico a DNA

Aunque el genoma de las plantas es muy estable, su DNA está expuesto a múltiples agentes genotóxicos, tanto endógenos como del ambiente (Bray & West., 2005; Tuteja *et al.*, 2009). Todos los componentes primarios del DNA: residuos de azúcares, enlaces fosfodiéster, las bases de púricas y pirimidicas que contribuyen al contenido de información del genoma, pueden sufrir daños. Las consecuencias biológicas que surgen del daño al genoma dependerán de la naturaleza química de la alteración a la estructura del DNA y puede variar de inocuo a ser altamente mutagénico (Bray & West., 2005). El DNA dañado puede incluir delección de bases, formación de dímeros de pirimidinas, entrecruzamientos, rompimientos de la hebra y modificación de bases; como son alquilación y oxidación. La acumulación de tantos daños provoca inestabilidad genómica y se asocia con una alta tasa de mutaciones (Tuteja *et al.*, 2009). Entre los agentes del medio ambiente que dañan el DNA se encuentran la luz ultravioleta (UV), las radiaciones ionizantes (rayos X, radiación γ), los mutágenos químicos que producen rupturas en el DNA (mitomicina C, cisplatino), los agentes alquilantes que modifican las bases, los

compuestos aromáticos y toxinas producidas por hongos y bacterias (Tuteja *et al.*, 2009). Además se incluye el estrés del ambiente como sequía, alta y baja temperatura e incremento de UV-B debido al deterioro de la capa de ozono, resultando en reducciones significativas en la calidad y productividad de cultivos, debido al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). En células de plantas, los ROS son la principal causa del rompimiento de cadena simple (SSBs) en el DNA directamente a través de la destrucción de desoxirribosas o por modificación covalente de las bases (Bray & West., 2005).

Para prevenir que el DNA dañado sea fuente de mutaciones, las células deben responder de manera rápida y eficaz de tal manera que el daño sea reconocido para activar cascadas de señalización que activen los sistemas de reparación. Es por ello que estas vías de señalización afectan procesos como son la transcripción de genes y la progresión del ciclo celular (Ulm *et al.*, 2001; Bray & West., 2005; Kalbina *et al.*, 2006; Tuteja *et al.*, 2009).

4.1 Estrés genotóxico en plantas por luz ultravioleta

El mayor agente genotóxico natural es la luz UV proveniente de la radiación solar y comprende principalmente tres tipos: UV-A (320-400nm), UV-B (290-320nm) y un tercer componente que pertenece al espectro electromagnético, UV-C (180-290nm), aunque este último no penetra a la biosfera porque es fuertemente absorbido por el oxígeno y el ozono de la atmósfera (Tuteja *et al.*, 2009). La luz UV-A es necesaria para la fotosíntesis y la activación de fotoliasas, mientras que la fracción UV-B tiene propiedades mutagénicas y puede ser letal en la exposición a altos niveles. Por su parte, UV-C es la fracción más dañina y resulta ser germicida en ensayos de laboratorio (Kimura & Sakaguchi., 2006). El efecto genotóxico de la radiación solar surge de una combinación de luz UV-A/visible que induce reacciones de fotosensibilización y UV-B que induce la producción de dímeros entre residuos de pirimidinas adyacentes en una cadena del DNA. Las reacciones de fotosensibilización causan daño oxidativo a bases del DNA, en una menor medida sitios abásicos, y rompimientos de la hebra (Bray & West., 2005).



El mayor tipo de daño a DNA causado por la exposición a UV-B es la formación de dímeros entre pirimidinas adyacentes (figura 7), por ejemplo; fotoproductos que consisten primariamente de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y dímeros 6-4PPs (dímero de pirimidona). Los CPDs son mucho más frecuentes que los otros fotoproductos. Los 6-4PPs pueden ser formados entre nucleótidos adyacentes TT TC y CC dependiendo de la longitud de onda y secuencia adyacente. Los CPDs y 6-4PPs producen diferentes tipos de distorsiones estructurales dentro del DNA, los primeros inducen una leve flexión en la hélice del DNA, mientras que los segundos producen una flexión más pronunciada y desenrollamiento (Tuteja *et al.*, 2009). Desde el punto de vista de la formación de fotoproductos inducidos por radiaciones UV-B y UV-C, presentan un patrón similar en la distribución de fotoproductos y en el daño a DNA, en exposición a dosis bajas de cualquiera de estas radiaciones (Tuteja *et al.*, 2009). La formación de estos dímeros puede bloquear el avance de la horquilla de replicación y afectar la transcripción (Al Khateeb & Schroeder., 2009). Los efectos de radiación UV son especialmente perjudiciales en plantas, aunque la luz del sol tiene papeles antagónicos, por un lado es una fuente de daño y por el otro es un requerimiento para la fotosíntesis (Tuteja *et al.*, 2009).

La radiación UV-B tiene muchos efectos directos e indirectos en plantas, incluyendo daño a DNA, proteínas y membranas (Al Khateeb & Schroeder., 2009), alteraciones en la transcripción y fotosíntesis, cambios en el crecimiento, desarrollo, morfología e inestabilidad genética. La luz UV-B puede producir un decremento en los niveles de pigmentos fotosintéticos, afectando la integridad tilacoidal, incrementando la difusión estomatal y reduciendo la fotosíntesis (Kimura & Sakaguchi., 2006; Tuteja *et al.*, 2009). Entre los cambios morfológicos que la UV-B induce en plantas se incluyen: inhibición de la elongación del hipocólito, altura de la planta, engrosamiento de la hoja, deformación del cotiledón, elongación del tallo, expansión de la hoja, ramificación axilar y relación raíz/retoño. Además de los cambios asociados con la protección a UV-B como el incremento de ceras epicuticulares (Al Khateeb & Schroeder., 2009; Leasure *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha incrementado la radiación UV (especialmente UV-B) en la superficie de la tierra a causa del deterioro de la capa de ozono, esto llega a ser un problema serio, ya que el llamado agujero del ozono se expande en el Antártico desde los años 80. La cantidad total de ozono atmosférico ha continuado en decremento, haciendo que la reparación del DNA en cultivos para alimento sea aún más importante en el futuro, para evitar efectos indeseables en el crecimiento y producción de las plantas (Kimura & Sakaguchi., 2006).

4.2 Mecanismos de respuesta a estrés genotóxico

El daño a DNA causado por estrés genotóxico debe ser reparado para mantener la integridad del genoma de la planta y evitar mutaciones que afecten el crecimiento y en productividad. Como las plantas están expuestas de forma obligada a luz UV, sus células deben ser muy eficientes en reparar este tipo de daños (Tuteja *et al.*, 2009). En plantas las vías de reparación del daño a DNA incluye fotoreactivación (reparación directa), la cual utiliza UV-A o luz azul para revertir el daño al DNA a una configuración normal a través de la acción de una enzima llamada fotoliasa. La segunda vía es un mecanismo independiente de luz, el cual no revierte directamente el daño a DNA, pero en su lugar reemplaza el daño con nuevos nucleótidos. Este proceso es conocido como reparación por escisión de nucleótidos (Figura 7; Al Khateeb & Schroeder., 2009).

La importancia de estos sistemas de reparación se ha deducido del estudio de mutantes PHR1 de *Arabidopsis* o plantas defectuosas en NER, que exhiben hipersensibilidad a UV pero también potencian la frecuencia de recombinación homóloga (HR) somática. Lo que indica que al menos tres diferentes vías; reparación directa, NER y HR, contribuyen cooperativamente a mantener la integridad del genoma en diferentes tejidos en exposición prolongada a UV-B (Bray & West., 2005; Molinier *et al.*, 2008).

Se cree que en tejidos verdes y en presencia de luz la reparación directa es la vía predominante, mientras que en ausencia de luz la vía de NER es preferentemente utilizada (Kimura & Sakaguchi., 2006).

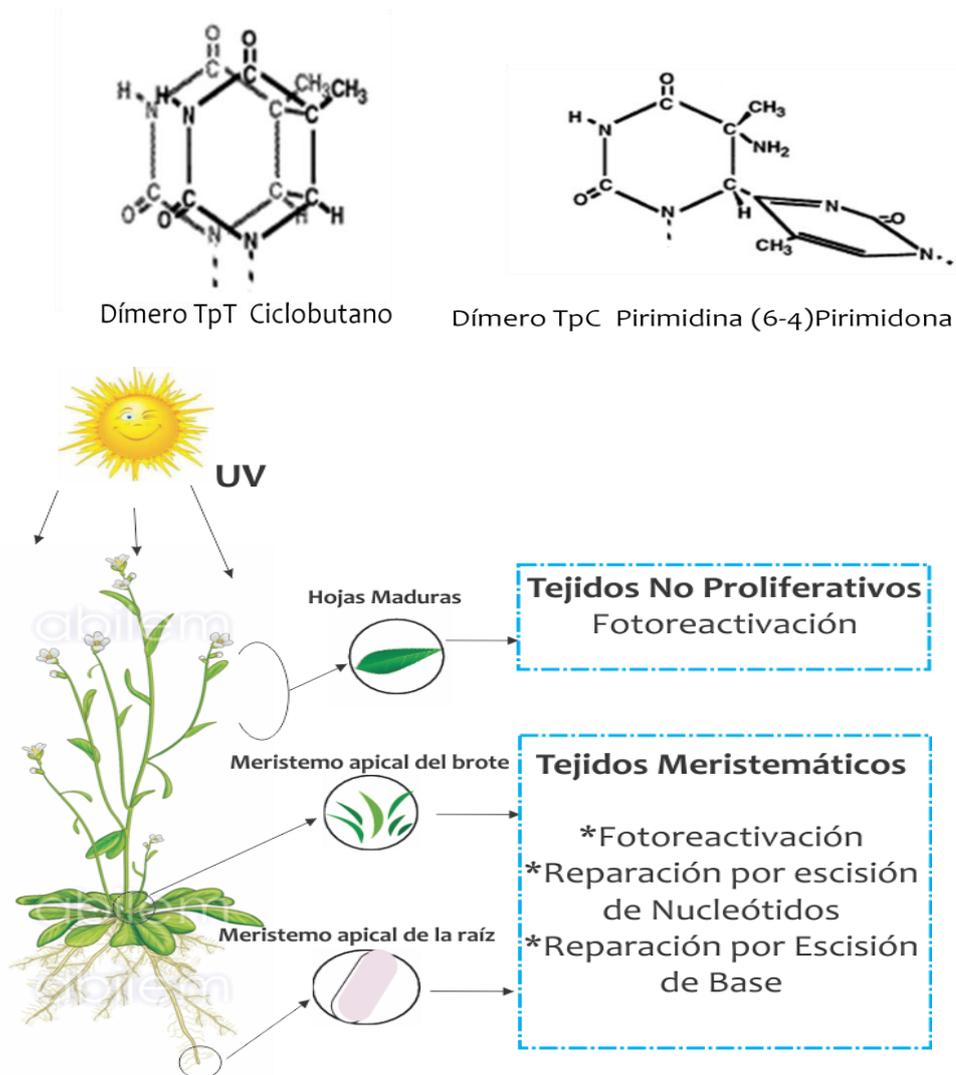


Figura 7. Productos de daño a UV y las diferentes vías de reparación que participan en diferentes tipos de tejido. En la parte superior de la imagen se muestran los 2 principales fotoproductos, formados del daño ocasionado por UV sobre el DNA. En la parte inferior se aprecia un modelo de las vías que actúan preferentemente en diferente tejido en respuesta para reparar el daño inducido por luz UV (Tomada y adaptada de Jiang et al., 1997 y Kimura & Sakaguchi., 2006).

Estudios realizados de patrones de expresión de genes de reparación del DNA, conjuntamente con ensayos de reparación *In vivo* de la fotoreactivación y vías de reparación por escisión (BER y NER) en tejidos no proliferativos (hojas maduras) y tejidos proliferativos (ápices de raíz y meristemo apical de la raíz), mostraron que la fotoreactivación es la principal vía de reparación del DNA en tejidos no proliferativos, mientras que la fotoreactivación así como la reparación por escisión son activadas en tejidos proliferativos, siendo estas últimas las preferentes (Kimura & Sakaguchi., 2006; Molinier *et al.*, 2008; Tuteja *et al.*, 2009).

4.3 Vías de reparación del daño al DNA

La reparación del DNA es esencial para asegurar la fiel transmisión de información genética de una generación a otra. Los genomas de *Arabidopsis* y arroz revelaron la presencia de muchas proteínas de reparación similares a las de mamíferos con algunas diferencias importantes. Sin embargo, como en animales, las células de las plantas cuentan con varios mecanismos de reparación para el DNA dañado (figura 8; Hays, 2002; Kimura & Sakaguchi., 2006; Tuteja *et al.*, 2009).

En general las plantas contienen más múltiples de copias de genes que en animales. Es posible que la presencia de múltiples alelos de genes participantes en los mecanismos de reparación incrementan la tolerancia de las plantas a luz UV (Kimura & Sakaguchi., 2006).

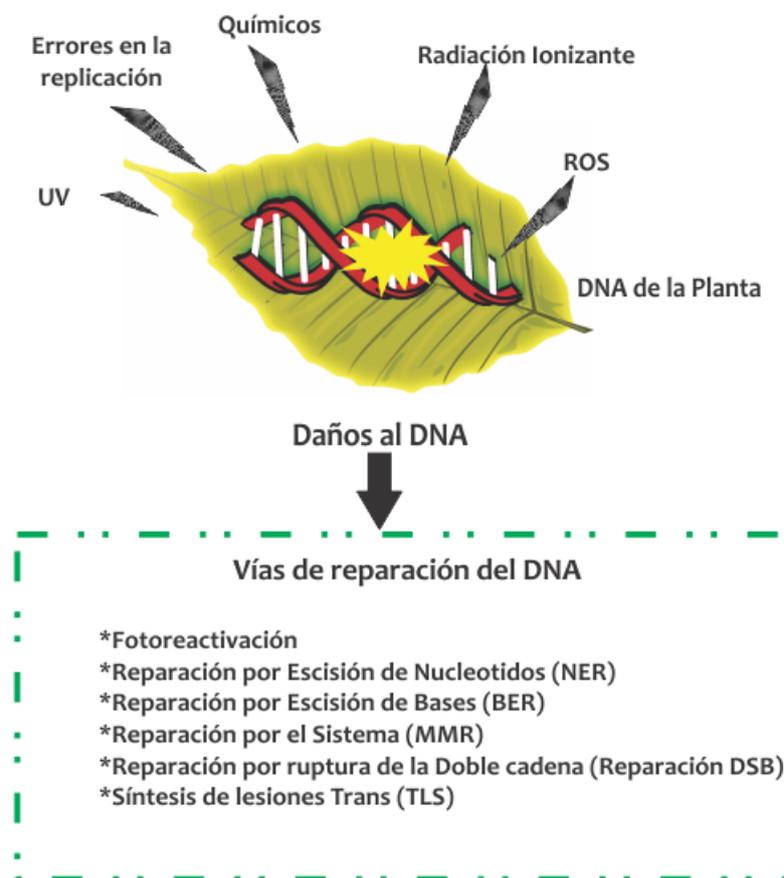


Figura 8. Factores que dañan el DNA de plantas y vías de reparación que responden al daño (Tomada de Kimura & Sakaguchi., 2006).

4.3.1 FOTOREACTIVACIÓN

La reacción de fotoreactivación es catalizada por la enzima fotoliasa que se une a DNA dañado por luz UV. Esta enzima usa fotones de luz azul (350-450nm) para transferir electrones, y de esta forma escinde la estructura de anillo del dímero de pirimidina y restaura a las bases a su forma normal sin daño. Las fotoliasas contienen dos cofactores, uno de los cuales es siempre la forma reducida de FAD (FADH), el fotocatalizador universal de todas las fotoliasas (Bray & West., 2005). El segundo cromóforo es cualquiera de los siguientes: 5,10 metiltetrahidrofolato (MTHF) o 8-hidroxi-7,8-dimetil-5-deazariboflavina (8-HDF). Estos dos últimos no son esenciales para la actividad, sin embargo, son mucho más eficientes que FADH como fotoantena, a través de la cual se absorben fotones de la luz azul. En una reacción independiente de la luz, la fotoliasa se une a la lesión del dímero de pirimidina, la cual tiene una distorsión en la estructura del DNA y forma un complejo estable sustrato-enzima. El cromóforo folato de la fotoliasa absorbe un fotón de la luz azul y transfiere la energía de excitación del fotón a FADH-, promoviendo la transferencia de un electrón de FADH- al complejo de dímero de pirimidina unido a la enzima. El enlace covalente entre las pirimidinas adyacentes del CPD es escindido y las dos bases de las pirimidinas retornan a su estado original en el DNA, con la simultánea transferencia de un electrón de regreso a FADH y la regeneración de la forma activa FADH-. Así la reacción global no involucra la ganancia o pérdida de un electrón (ver figura 9). Se sugiere un mecanismo similar para las fotoliasas 6-4, pero con la inclusión de un paso, en el cual involucra una conversión térmica de los 6-4PP a un oxetano inestable intermedio antes de los pasos de reversión fotoquímica (Bray & West., 2005). En ecosistemas naturales, la luz de la región visible del espectro del sol siempre se acompaña de irradiación UV-B, así la reacción catalizada por la fotoliasa es un mecanismo libre de errores para reparar el daño sin la necesidad de un paso de escisión de nucleótidos o de bases. Casi todos los organismos con excepción de los mamíferos producen una fotoliasa CPD, pero la presencia de una fotoliasa 6-4 ha sido detectada solo en un

número selecto de especies, incluyendo insectos y plantas (Jiang *et al.*, 1997; Bray & West., 2005).

En *Arabidopsis thaliana* el gen UVR2 codifica una fotoliasa (PHR1) que actúa solo con CPDs, mientras que el gen UVR3 codifica una fotoliasa específica para los fotoproductos 6-4 (Molinier *et al.*, 2008). La inactivación selectiva de las fotoliasas de *Arabidopsis* ha dado la oportunidad, no disponible en otro modelo, de analizar consecuencias mutagénicas y genotóxicas de cada fotoproducto y así elucidar su papel específico en el mantenimiento del genoma (Hays., 2002).

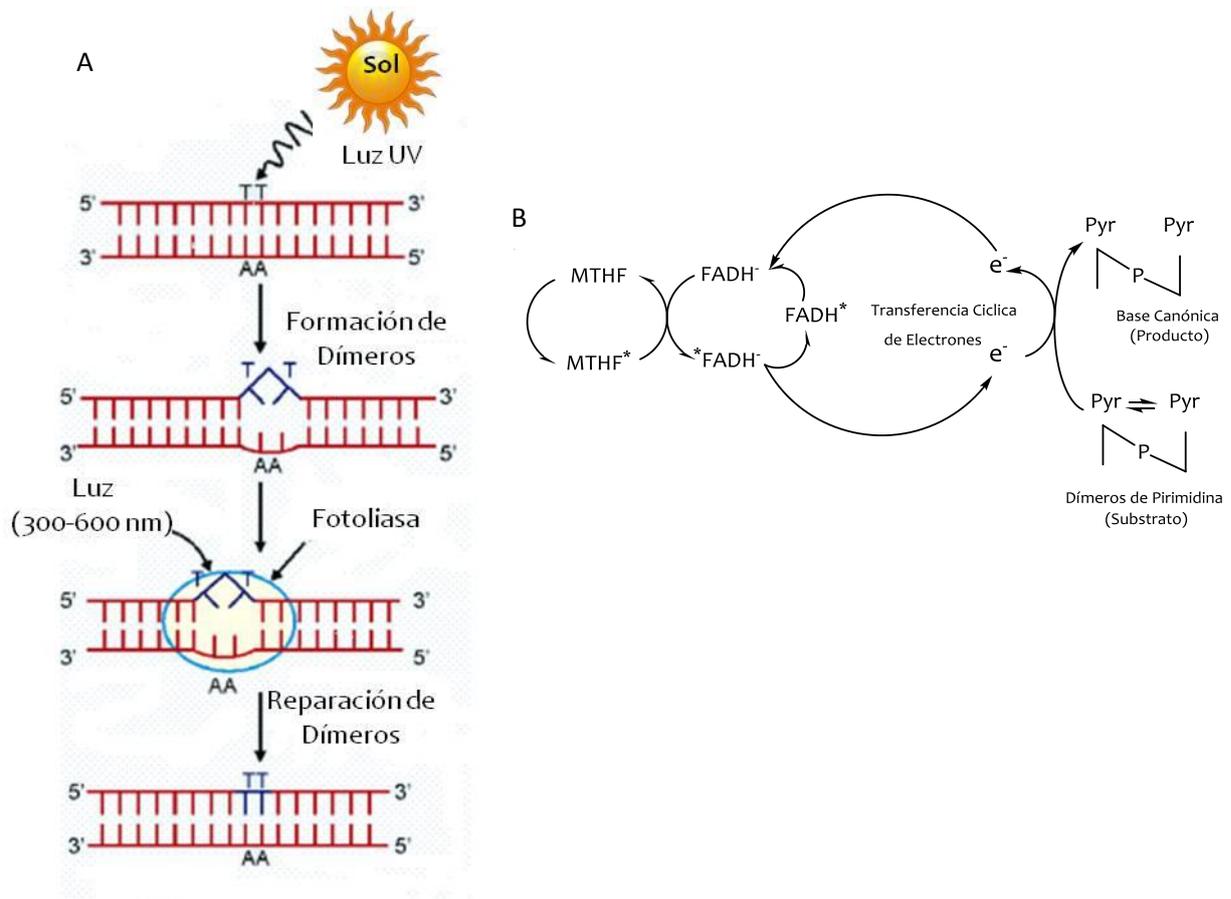


Figura 9. Fotoreactivación (A) Esquema general del mecanismo, la fotoliasa se une al dímero de pirimidina formado por la exposición a luz UV y rompe directamente los dímeros utilizando la energía de la luz visible. (B) Se muestra la reacción catalizada por la fotoliasa CPD, para más detalles ver texto (Adaptada de Tuteja *et al.*, 2009; y Bray & West 2005).

4.3.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

A diferencia de las fotoliasas que reparan solamente un tipo de daño al DNA, el mecanismo de NER reconoce y repara DNA dañado por distintos agentes como la irradiación UV, cisplatino y otros agentes genotóxicos. Las vías de NER pueden ser clasificadas como reparación global del genoma (GGR), la cual repara el daño a DNA en el lugar que sea en el genoma, o la reparación acoplada a la transcripción (TCR), la cual específicamente restaura las hebras de DNA que están siendo transcritas (Kimura & Sakaguchi., 2006). El mecanismo de NER consiste en una serie de 5 reacciones: reconocimiento del daño a DNA, el desenrollamiento de la doble hebra de DNA en los alrededores del daño (apertura del complejo de pre-escisión), escisión dual de la lesión, síntesis del DNA seguida por la ligación de la nueva hebra de DNA sintetizada (Kimura & Sakaguchi., 2006; Molinier *et al.*, 2008).

En la GGR, el daño a DNA es reconocido por XPC/Rad23 (Xeroderma pigmentosum, grupo de complementación C/Rad 23) o UV-DDB (proteína de unión a DNA dañado por UV). La función de DDB es alterar la estructura de la cromatina y reclutar factores de NER a los sitios de daño a DNA. En contraste durante TCR, el contacto de la RNA polimerasa durante la transcripción con los nucleótidos dañados desencadena el reconocimiento del daño a DNA por la CSA (Síndrome de Cockayne, tipo A) o CSB (síndrome de Cockayne, tipo B). La región del DNA que ha sido reconocida con el daño es desenrollada por TFIIH (factor de transcripción basal IIH), las proteínas XPB, XPD, XPA (Xeroderma pigmentosum, respectivo grupo de complementación B, D y A) y RPA (proteína de replicación A), de esta manera hacen más espacio para reclutar a las otras proteínas de reparación. Luego las endonucleasas específicas XPF/ERCC1 y XPG cortan la cadena dañada en los extremos 3' y 5' respectivamente con lo que se escinden oligonucleótidos de alrededor de 20 a 30 nucleótidos que contienen la parte dañada del DNA. El hueco formado por la escisión es rellenado mediante un complejo que contiene a PCNA (antígeno nuclear celular de proliferación) y RFC (factor de replicación C) y las DNA polimerasas δ/ϵ , en donde la cadena sin daño ahora tiene la función de templado para síntesis de la nueva hebra. NER es completado por la ligación

de la nueva cadena de DNA sintetizada con la participación de la ligasa de DNA I (ver figura 10; Bray & West., 2005; Kimura & Sakaguchi., 2006; Molinier *et al.*, 2008; Al Khateeb & Schroeder., 2009; Tuteja *et al.*, 2009).

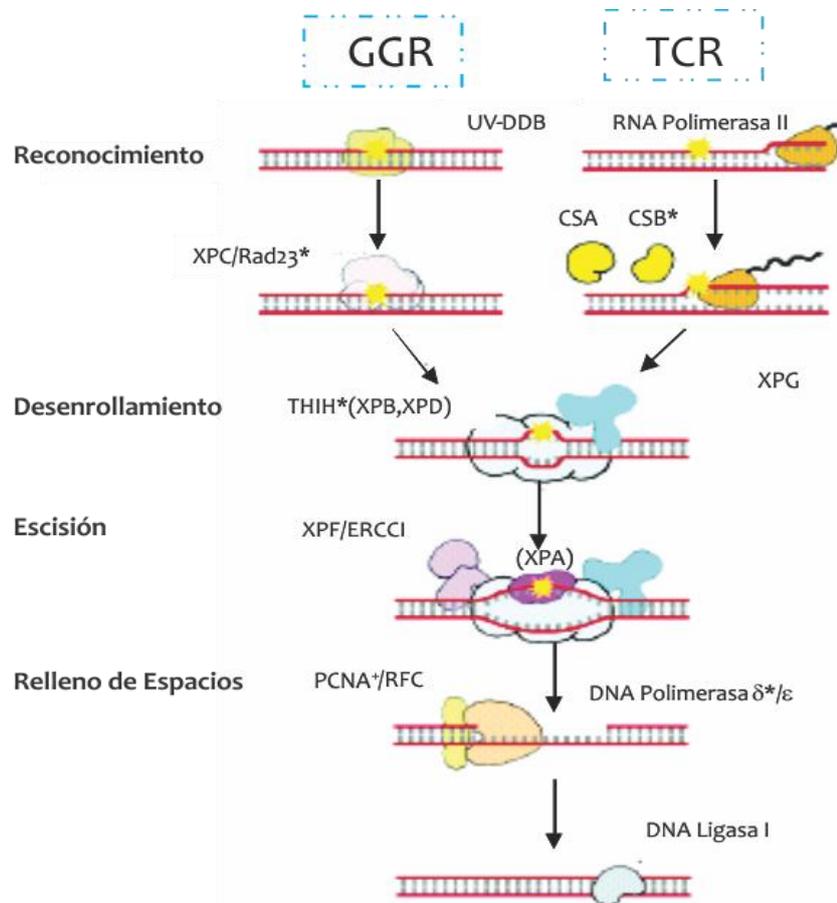


Figura 10. Reparación por escisión de nucleótidos. Las vías de NER pueden clasificarse dentro de 2 grupos, reparación global del genoma (GGR) y reparación acoplada a la transcripción (TCR). En la figura se muestra la serie de reacciones en las que consisten estos mecanismos. Las proteínas marcadas en asteriscos están presentes en múltiples copias. Solo la proteína XPA mostrada no se ha encontrado en plantas (Tomada de Kimura & Sakaguchi., 2006).

El análisis de la secuencia del genoma de *Arabidopsis* reveló que la mayoría de los genes involucrados en NER son encontrados en esta planta, indicando que esta vía de reparación está conservada filogenéticamente (Tuteja *et al.*, 2009). Mutantes de *Arabidopsis* en genes relacionados con NER son sensibles a UV, entre estos se encuentran XPF (AtRad1), XPG (AtRad2) y XPD (AtRad3). Otros genes de NER que han sido aislados en *Arabidopsis* son XPB, DDB1, DDB2 y ERCC1 (AtRad10). Además se han obtenido mutantes de inserción de T-DNA en XPB que muestran crecimiento retardado. Por su parte, mutantes de T-DNA

y RNA de interferencia (RNAi) de DDB2 presentan fenotipos de desarrollo pequeño. Estos resultados resaltan el papel importante de la reparación del DNA durante el crecimiento y el desarrollo (Hays, 2002., Bray & West., 2005; Kimura & Sakaguchi., 2006).

Las mutantes en ERCC1 de *Arabidopsis* son sensibles a irradiación γ , una mutante en XPB presenta sensibilidad a peróxido de hidrógeno y MMS (metilmetanosulfonato), así como mutantes en XPG son sensibles a peróxido de hidrógeno e irradiación ionizante. Además XPF y ERCC1 tienen papeles claves en la recombinación homóloga. Por todo lo mencionado anteriormente se concluyó que NER puede estar involucrado en la reparación de diferentes tipos de daño a DNA en plantas (Kimura & Sakaguchi., 2006). Algunos genes relacionados con NER, como son DDB, PCNA, DNA polimerasa δ , RPA y CSB han sido aislados de arroz (Kimura & Sakaguchi., 2006; Tuteja *et al.*, 2009). *Arabidopsis* sorprendentemente tiene una proteína homóloga a Mfd de *E. coli*, la cual media la vía de NER acoplada a la transcripción y de la proteínas UvrD/MutU/RecL. Estas últimas proteínas tienen un papel esencial en los pasos de post-reconocimiento e incisión en bacterias para los mecanismos de reparación de NER y MMR, y parecen estar involucrados en algunos procesos de recombinación (Hays, 2002).

4.3.3 Reparación del rompimiento de la doble hélice

Otra posibilidad de daño directo al DNA es el rompimiento físico de la doble hélice (DSB), que puede ocurrir por exposición a radiación ionizante, a químicos genotóxicos y a la presencia de algunos productos metabólicos celulares, como los que se producen durante el estrés oxidativo. Este último puede ser ocasionado por la exposición a luz UV (Bray & West., 2005). Hay dos vías para reparar los rompimientos de este tipo, la unión de extremos no homólogos (NHEJ; non-homologous end joining) y la recombinación entre homólogos (Beas *et al.*, 2009). Estas vías son responsables del balance de la estabilidad genómica contra la generación de diversidad genética (Bray & West., 2005).



La NHEJ o también conocida como recombinación ilegítima incluye la reunión directa de los extremos rotos del DNA, con un mínimo de procesamiento de las secuencias de los extremos, lo que sugiere que este mecanismo se activa cuando hay pérdida de nucleótidos en los extremos. En este caso, la secuencia del suceso inicia con el reconocimiento del rompimiento por el dímero Ku70-Ku80 y cinasas de proteínas dependientes de DNA (DNA-PKs) que interaccionan entre sí para mantener los extremos muy cercanos uno del otro. La unión de una tercera proteína, Artemisa, y la consiguiente fosforilación de todos los componentes induce el procesamiento final de los extremos por un complejo formado por XLF, XRCC4 y ligasa IV, que une los dos extremos para completar la reparación (Kimura & Sakaguchi *et al.*, 2005; Beas *et al.*, 2009). Esta vía recombina DNA en gran medida independiente de la secuencia (Bray & West., 2005).

Por su parte, durante la reparación por HR, uno de los extremos del sitio del rompimiento es reconocido por un complejo compuesto por varias proteínas. Luego los extremos del DNA son recortados, permitiendo la unión de RPA, RAD51 y RAD52 al extremo de DNA de cadena simple. El complejo RPA-RAD51-RAD52 rastrea una región homóloga en un DNA intacto (cromosoma homólogo) e inicia el emparejamiento, que se facilita mediante la acción de RAD54. La síntesis de DNA ocurre desde el extremo del DNA invasor, extendiendo la región reparada y formando una unión de Holliday. Esta unión se transloca a lo largo del DNA en un proceso mediado por un complejo de migración. Por último, los extremos son reunidos para terminar con dos secciones de DNA intactas (Beas *et al.*, 2009).

4.4 Control del ciclo celular

El ciclo celular está constituido por 4 fases ordenadas secuencialmente y en las que participan diversas proteínas que controlan el progreso del ciclo. La fase G1 se intercala entre la mitosis previa y la entrada a la próxima fase S, mientras que la fase G2 separa la fase S de la subsecuente fase M. Por lo tanto, las células en G2 se distinguen de las células en G1 por poseer un doble contenido de DNA. Las fases G permiten la operación de controles que aseguren que la fase previa ha sido adecuadamente completada, por lo que no es sorprendente que los mayores puntos de regulación en el ciclo celular operen en las uniones G1/S y G2/M, los cuales corresponden a los puntos de potencial arresto como una consecuencia de las condiciones externas (Dewitte & Murray, 2003).

En general, la progresión del ciclo celular es mediada a través de la activación temporal de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales dependen de la asociación con alguna de los diferentes tipos de ciclinas. Cuando ocurre el daño a DNA la actividad de las CDKs necesita ser inhibida para arrestar la progresión del ciclo celular y para proporcionar a las células tiempo suficiente para reparar el daño antes de entrar a mitosis. Además de las CDKs participan en la regulación del ciclo celular otras proteínas como las ciclinas, Retinoblastoma y E2F (Huntley & Murray, 1999).

Los mecanismos para coordinar la división celular son similares en mamíferos y en plantas, sin embargo, existen mecanismos que no son conservados (Huntley & Murray, 1999). Una de las diferencias más notables entre plantas y animales es que los genes de “checkpoint” en plantas no son esenciales durante el crecimiento normal. Además los “checkpoint” en plantas parecen menos sensibles a estrés a DNA que sus contrapartes en animales. Aunque en células de raíz de cebolla tratadas con agentes genotóxicos se provoca un arresto transitorio del ciclo celular en G2, las células entran en mitosis antes de que la reparación del DNA sea completada. Este proceso llamado adaptación “checkpoint”, fue recientemente observado en animales, pero en contraste con



las plantas, las células adaptadas liberadas del “checkpoint” eventualmente mueren (Cools & De Veylder, 2009).

En plantas, la detención del ciclo celular no necesariamente se asocia con la muerte del organismo, sino que el arresto en el meristemo correlaciona con un crecimiento re-direccionado para la iniciación de nuevos meristemos, y eventualmente permite el escape al estrés al DNA. Por ejemplo, en plantas sin un “checkpoint” funcional tratadas con un compuesto inhibidor de la replicación, la raíz principal detiene su crecimiento y se inducen raíces laterales. Esta plasticidad en la respuesta se facilita por el desarrollo post-embrionario en plantas que permite el sacrificio de células que sufren daño a DNA para favorecer la inducción de nuevos órganos sin que ocurra apoptosis masiva como en animales (Cools & De Veylder, 2009).



HIPÓTESIS

Dado que la timidina cinasa (TK) participa en la vía de salvamento de nucleótidos, tendrá una función esencial en los eventos de reparación del DNA inducido por daño genotóxico en plantas.



OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y función de los genes de la timidina cinasa de *Arabidopsis thaliana* en la reparación del daño al DNA causado por luz ultravioleta.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislamiento y clonación de los promotores de la TK1 de *A. thaliana*

- Identificar las regiones promotoras de los genes AtTK1a y AtTK1b del genoma de *Arabidopsis thaliana*.
- Amplificar y clonar las secuencias de los promotores de la TK1 frente a un gen reportero en un vector binario.
- Transformar plantas de *A. thaliana* con las construcciones obtenidas.

2. Evaluación fenotípica y genotípica de mutantes de inserción de DNA-T de la TK1 en respuesta a luz UV-C

- Establecer las condiciones de tiempo de irradiación con luz UV-C para inducir estrés genotóxico en plántulas de *Arabidopsis*.
- Evaluar fenotípicamente la susceptibilidad a luz UV-C de líneas mutantes de DNA-T para los genes de la TK1.
- Determinar los niveles de transcritos respectivos de cada gen por la técnica de RT-PCR, tanto en la línea silvestre como en las mutantes para evaluar su respuesta a estrés genotóxico.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (ecotipo Columbia) y las líneas de inserción de DNA-T SALK037113, que tiene integrado el DNA-T en la región promotora del gen TK1a y SALK07256 que tiene integrado el DNA-T en el exón 1 del gen. Estas líneas mutantes se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center, Universidad de Ohio, E.U.A.

1.1. Desinfección y sembrado de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Para la desinfección de las semillas, primero se colocaron en una solución de etanol al 50% durante 1 minuto con agitación constante, posteriormente se centrifugó en la nanofuga durante 5s, enseguida se decantó el etanol, para posteriormente agregar a las semillas 1.5 ml de una solución con agua estéril de hipoclorito de sodio al 2.5% con Tween-20 al 0.05%, se incubó durante 10 min con agitación constante, después de transcurrido el tiempo se centrifugó en la nanofuga y se decantó la solución. A continuación se lavaron las semillas con 1mL de solución Tween-20 al 0.05%, se agitaron e inmediatamente se centrifugaron para decantar la solución. Este último paso se repitió tres veces más.

Las semillas se sembraron en cajas Petri con medio Gamborg B5 suplementado con sacarosa al 2%, se incubaron de 48 a 72h a 4°C, en condiciones de oscuridad. Después de haber pasado este tiempo las cajas se transfirieron a una incubadora con una temperatura de 22°C y con un fotoperiodo de 8h luz/16h oscuridad.

1.2. Resiembra de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Las plántulas de *Arabidopsis* silvestres y mutantes de 8 días de crecimiento en caja Petri, se trasplantaron de 1 a 4 por maceta, en una mezcla de sustrato Sunmix 4[®], vermiculita y agrolita (en proporciones 2:1:1 respectivamente). Se pasaron a una cámara de incubación a 22°C con luz continua.

2. Aislamiento de los promotores de los genes de la timidina cinasa

2.1 Búsqueda y análisis de la secuencia de los promotores de los genes TK de *A. thaliana*

Se realizó la búsqueda de la secuencia de los genes de la timidina cinasa AtTK1a (AT3G07800) y AtTK1b (AT5G23070) de *Arabidopsis* en la base de datos TAIR *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>), con el propósito de conocer la organización estructural de ambos genes. Una vez identificados los genes se localizaron las secuencias de 1000 pares de bases (pb) río arriba de la región 5'-UTR y río abajo de la región 3'-UTR de cada uno de los genes en la página del centro nacional de información biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se tomó como potencial promotor la secuencia de aproximadamente 1100pb río arriba del inicio del marco de lectura en ambos genes. Estas secuencias se analizaron en la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) para conocer los potenciales elementos de unión a distintos factores de transcripción.

2.2 Diseño de oligos para el aislamiento de los promotores de los genes TK de *Arabidopsis thaliana*

Para aislar las secuencias de los potenciales promotores se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del software Primer3 (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>), los cuales acotaron una región aproximada de 1100 pb y que incluyó el promotor, la región 5'-no traducida y los primeros aminoácidos del marco de lectura abierto, a estas secuencias se les asignaron los nombres de pTK1a y pTK1b respectivamente. Asimismo, se incluyeron en los extremos 5' las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción: para *HindIII* en los oligos forward y para *BamHI* en los oligos reverse. Por último en lo que respecta al diseño de los oligos se analizaron sus propiedades fisicoquímicas para verificar que fueran compatibles para cada par, empleando el software OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/>). Las secuencias de estos oligonucleótidos y sus propiedades se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación del promotor de los genes AtTK1a y AtTK1b. Se indican en letras negritas los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

Promotor	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	TM (°C)	Longitud (Pb)	Contenido de GC (%)
pTK1a	Forward	5' AAGCTT AGGATGGTGCCACTAAAAGTT 3'	66.3	27	40.7
	Reverse	5' GGATCCC ATGGCAGAGACTTGAGAAG 3'	67.1	26	53.8
pTK1b	Forward	5' AAGCTT TGGAAGGAGAGGAGATTTTCA 3'	66.2	28	39.3
	Reverse	5' GGATCCT GTTCTCATCGAAACACCAAA 3'	66.3	27	44.4

2.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de hojas de la roseta de plantas de *Arabidopsis*. Se pesaron 100mg de tejido fresco que inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en un mortero estéril hasta obtener un polvo muy fino. El polvo se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5ml y se prosiguió a efectuar la extracción empleando Fast DNA[®] kit (Q-BIOgene) por lo que se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Se procesaron 6 muestras, las cuales se juntaron al final del procedimiento. La pureza de la preparación de DNA se evaluó mediante análisis espectrofotométrico (A_{260}/A_{280}) y electroforético (se visualizó en un gel de agarosa 0.8%).

2.4 Amplificación de las secuencias promotoras de los genes de timidina cinasa por la técnica de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

Al tener el DNA genómico y los oligos se procedió a la amplificación de los fragmentos de DNA por la técnica de PCR, para lo cual primero se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación de ambos promotores (tabla 2).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20µL con los componentes que se muestran en la Tabla 11 (ver apéndice 1). Dichas reacciones se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems modelo Gene Amp9700. Los productos de las reacciones de amplificación se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se purificaron empleando el Gel extraction kit QIAquick de Qiagen.

Tabla 2. Condiciones de PCR óptimas para la amplificación de cada promotor

Amplicon	Pre-desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
pTK1a (1092pb)	94°C por 5 min	Desnaturalización, 94°C por 1 minuto Alineamiento, 60°C por 1 minuto Extensión, 72°C por 1 min (30 ciclos)	72°C por 5 min
pTK1b (1100pb)	94°C por 5 min	Desnaturalización, 94°C por 1 minuto Alineamiento, 60°C por 1 minuto Extensión, 72°C por 1 min (35 ciclos)	72°C por 5 min

2.5 Clonación de los fragmentos de DNA de los promotores de la TK1 en el plásmido pGEM.

La ligación se llevó a cabo con el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), utilizando una relación aproximada de cantidad de DNA (inserto: vector) de 3:1. Para la reacción de ligación se mezclaron 5µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 1µL de plásmido, 1µL de T4 DNA ligasa (3U/µL) y para el cálculo de la cantidad de los productos de PCR se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector (50ng)} \times \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (3.0kb)}} \times \frac{3}{1}$$

Posteriormente se agitó para homogenizar la mezcla y se incubó 1 hora a 37°C.

2.6 Selección de las colonias transformantes

Concluida la reacción de ligación se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico como se describe en la sección II.2 del apéndice 1. Para la selección de colonias transformantes con las construcciones en el plásmido PGEM se plaquearon en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Las cajas se incubaron por 24 h y se seleccionaron las colonias de color blanco, que son las que contienen el plásmido con el inserto. Para comprobar las transformaciones, se resembraron las colonias en 4mL de caldo LB y se extrajeron los plásmidos, se digirieron 500 ng de plásmido con 1 unidad de *EcoRI* en un volumen final de 20 μ L y se incubó a 37°C por 2 h. Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se seleccionó una colonia de cada construcción y se secuenciaron los plásmidos para confirmar que se trataba de los insertos de interés.

3. Clonación de los promotores de la TK por la Tecnología Gateway®

3.1 Fundamento

Esta tecnología está basada en un sistema de recombinación en sitios específicos del bacteriófago λ que facilitan la integración de su genoma en el cromosoma de *E. coli* y el cambio entre las vías lisogénica y lítica. La recombinación basada en el fago lambda involucra dos componentes principales: las secuencias de recombinación de DNA (sitios att) y las proteínas que medían la reacción de recombinación (Gateway, 2004).

La recombinación Lambda ocurre entre los sitios específicos de acoplamiento (att): attB en el cromosoma de *E. coli* y attP en lambda. Los sitios att sirven como el sitio de unión para las proteínas de recombinación. En la integración de Lambda, ocurre la recombinación entre los sitios attB y attP, para generar los sitios attL y attR. El cruce real que ocurre entre las regiones homólogas centrales es de 15 pares de bases en los dos sitios, pero las secuencias circundantes se requieren ya que contienen los sitios de unión para las proteínas de recombinación (Gateway, 2004).

Las proteínas de recombinación involucradas en la reacción difieren dependiendo si lambda utiliza la vía lítica o lisogénica. La vía lisogénica es catalizada por la integrasa (Int) del bacteriófago lambda y por el factor hospedero de integración (IHF) de *E. coli* (BP Clonase™ II). Mientras que la vía lítica es catalizada por las proteínas del bacteriófago lambda Int y una Excisionasa (Xis), además de la proteína IHF de *E. coli* (LR Clonase™ II; Gateway, 2004).

La Tecnología Gateway® requiere del diseño de secuencias de DNA flanqueadas por los sitios de recombinación *att*, estos son mezclados *in vitro* con un vector que también contiene sitios de recombinación e incubados con proteínas de recombinación del bacteriófago λ que acoplan la transferencia de la secuencia de interés dentro del nuevo vector (Hartley et al., 2000). Esta tecnología proporciona una manera rápida y altamente eficiente para trasladar secuencias de DNA dentro de múltiples vectores, lo cual permite la expresión y el análisis funcional de proteínas (Earley et al., 2006). Dos reacciones de recombinación constituyen las bases de esta Tecnología (figura 11):

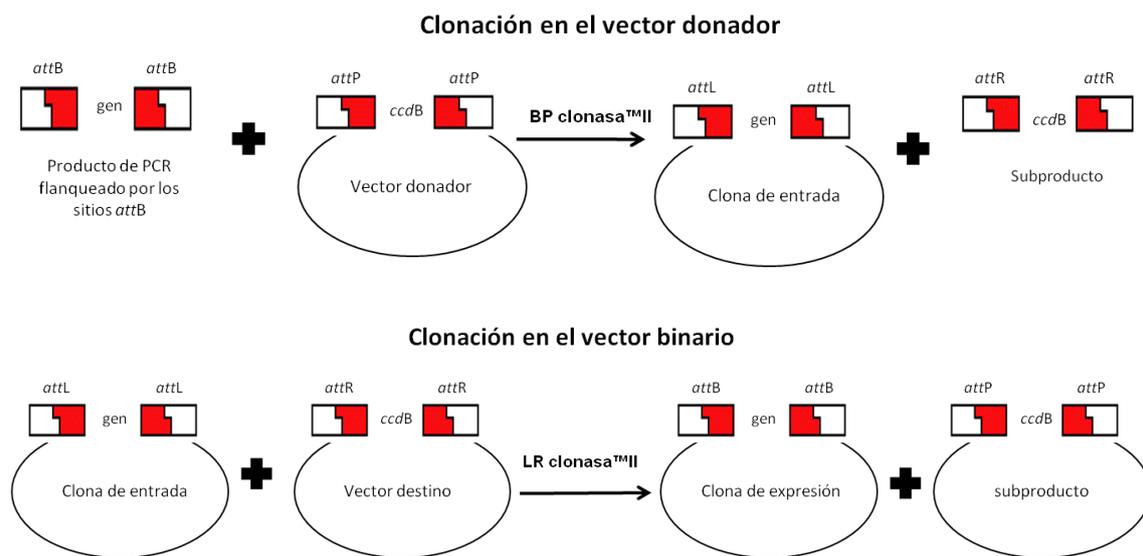


Figura 11. Reacciones de recombinación del sistema Gateway. Se muestran las 2 reacciones de recombinación requeridas en este sistema para obtener la secuencia de interés clonada en el vector binario (clona de expresión)

3.2 Obtención de los productos de PCR flanqueados por los sitios *attB*

Para crear las secuencias de DNA de interés flanqueadas por los sitios de recombinación *attB*, con el propósito de emplear la tecnología Gateway®, se requirió realizar 2 reacciones de amplificación. En la primera reacción (PCR1) se utilizó como molde las secuencias de DNA clonadas en el vector PGEM, se realizó la amplificación de los promotores empleando oligos que contienen una parte de secuencia específica del promotor y parte de la secuencia del sitio de recombinación, los oligos se presentan en la tabla 3. Se realizó la segunda amplificación (PCR2) empleando oligos adaptadores que contienen la secuencia restante del sitio de recombinación y la secuencia del sitio de recombinación ya incluida en los oligos anteriores (tabla 4). Las condiciones óptimas de temperatura y ciclos para cada reacción de amplificación se muestran en la tabla 5. Se utilizaron las mismas condiciones en la amplificación de ambas secuencias promotoras flanqueadas por los sitios de recombinación en cada PCR.

Tabla 3. Oligos empleados en el PCR 1, necesario en el primer paso para la obtención de las secuencias flanqueadas por *attB*. Estos contienen en su secuencia parte de los sitios de recombinación (letras claras) y una secuencia específica del promotor (letras en negritas).

Promotor	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	TM (°C)	Longitud (Pb)	Contenido de GC (%)
pTK1a	Forward (ATK1aF)	5' AAA AAA GCA GGC TTC AGG ATG GTG CCA CTA AAA GTT 3'	63.3	36	41.7
	Reverse (ATK1aR)	5' A GAA AGC TGG G CAT GGC AGA GAC TTG AGA AGA 3'	64.4	32	50
pTK1b	Forward (ATK1bF)	5' AAA AAA GCA GGC TTC TGG AAG GAG AGG AGA TTT TTCA 3'	63.3	37	40.5
	Reverse (ATK1bR)	5' A GAA AGC TGG G TGT TCT CAT CGA AAC ACC AAA CAT 3'	63.3	35	42.9

Tabla 4. Oligos adaptadores empleados en el PCR 2, para obtener las secuencias de interés flanqueadas con las secuencias completas de recombinación. En negritas se señalan las secuencias presentes en el primer amplicón.

Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido (adaptadores)	T _M (°C)	Longitud (Pb)	Contenido de GC (%)
attB1 Forward	5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T 3'	61.4	29	44.8
attB2 Reverse	5' GGGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG G 3'	62.8	28	53.6

Tabla 5. Condiciones óptimas de temperatura y ciclos, para ambos PCR

	Pre-desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
PCR 1 (oligos con secuencia específica)	94°C por 5 min	Desnaturalización, 94°C por 1 minuto Alineamiento, 60°C por 1 minuto Extensión, 72°C por 1 min (28 ciclos)	72°C por 5 min
PCR 2 (oligos adaptadores)	94°C por 5 min	Desnaturalización, 94°C por 30 seg Alineamiento, 50°C por 30 seg Extensión, 72°C por 2 min (35 ciclos)	72°C por 10 min

Asimismo las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen final de 20µL con los componentes que se muestran en la Tabla 12 (ver apéndice 1). Dichas reacciones se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems modelo Gene Amp9700. Los productos de las reacción de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1.5% y se purificaron con Gel extraction kit (50) QIAquick.

3.3 Clonación de los promotores de los genes TK1 en el vector donador

Las secuencias pTK1a y pTK1b flanqueadas por los sitios de recombinación *attB*, se clonaron en el plásmido pDONRTM/Zeo el cual contiene los sitios *attP*, con el objetivo de obtener las clonas de entrada necesarias para recombinarse con el vector destino (binario). La reacción de recombinación se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se mezclaron los siguientes componentes: 150 ng del vector donador, 50 fmol del producto de PCR y buffer TE (pH 8.0) cbp 8.0 μ L. Después de descongelar la mezcla de enzimas BP ClonasaTM II en hielo por 2 min, se añadió 2 μ L de esta en la mezcla de reacción, se mezcló muy bien y se incubaron las reacciones a 25°C durante 1 hora. Para determinar la cantidad de los productos de PCR se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo:

$$\text{ng producto PCR} = (50 \text{ fmol})(N) \left(\frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}} \right)$$

Donde N, es el tamaño del producto de PCR,

Después de transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 1 μ L de la solución de proteinasa K a cada reacción, se incubó por 10 min a 37°C. Finalizada esta reacción se prosiguió a realizar la transformación por choque térmico de células de *E. coli* DH5 α . Para la selección de las colonias transformantes con la construcción deseada, las células se plaquearon en medio LB/Zeosina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C durante 48h. Se tomaron 30 colonias de cada construcción las cuales se sembraron en los medios LB/Zeosina (50 μ g/mL) y LB/cloranfenicol (50 μ g/mL) y se incubaron por 24 horas. Se seleccionaron las colonias que crecieron solo en el medio LB/Zeosina (se obtuvieron 2-3 colonias) ya que los plásmidos que se recombinaron perdieron la resistencia a cloranfenicol. Para saber si efectivamente estas colonias contenían el vector recombinado se purificó el plásmido y se digirió con *Sma*I (37°C por 2 h). Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (los vectores recombinados presentaron un tamaño de aproximadamente 3.2kb). Además, se realizó PCR con los oligos adaptadores y oligos específicos utilizando las condiciones mencionadas en el apartado 3.1.

3.4 Recombinación en el vector binario pBGWFS7,0

Para lograr el análisis de la actividad de los promotores de la TK1 de *Arabidopsis thaliana* se requiere que las secuencias de estos se encuentren clonadas frente a un gen reportero en un vector binario que permita la expresión de este gen. Con este propósito se llevó a cabo la reacción de recombinación entre las clonas de entrada (vector donador recombinado con la secuencia del promotor) y el vector binario (destino) pBGWFS7,0 (sitios de recombinación *attR*), el cual contiene los genes reporteros de la proteína fluorescente verde (GFP) y la β -glucuronidasa (GUS). La reacción de recombinación se realizó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se mezclaron los siguientes componentes: 100 ng de la clona de entrada, 150ng del vector binario y buffer TE (pH 8.0) cbp 8.0 μ L. Después de descongelar la mezcla de enzimas LR Clonasa™ II en hielo por 2 min, se añadió 2 μ L de ésta en la mezcla de reacción, se mezcló brevemente en vórtex y se incubaron las reacciones a 25°C durante 2 h.

Después de transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 1 μ L de la solución de proteinasa K a cada reacción, se incubó por 10 min a 37°C. Concluida esta reacción se prosiguió a realizar la transformación por choque térmico de células de *E. coli* DH5 α . Para la selección de las colonias transformantes con las clonas de expresión, las células se plaquearon en medio LB/espectinomicina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C durante 48h. Se tomaron 10 colonias de cada construcción las cuales se sembraron en los medios LB/espectinomicina (50 μ g/mL) y LB/cloranfenicol (50 μ g/mL) y se incubaron por 24 horas a 37°C. Se seleccionaron 10 colonias de cada construcción que crecieron solo en el medio LB/espectinomicina. Para confirmar si estas clonas contenían el vector recombinado se purificó el plásmido y se digirió con *Sma*I (37°C por 2 horas), Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (1.5%). Con esta restricción, el vector sin recombinar debe presentar 2 bandas, mientras el recombinado solo 1 banda. Además se realizó PCR como en la clonación del vector donador. Asimismo, se secuenciaron los plásmidos para confirmar las secuencias en las clonas de expresión.

3.5 Transformación por choque térmico de *Agrobacterium tumefaciens*

Se descongelaron las células competentes (apéndice 1) durante 5 min en hielo. Posteriormente se añadió 1 µg de DNA plasmídico a los 100µL de células competentes, se mezclaron e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido durante 5 min. Subsecuentemente se incubaron a 37°C por 25 min. Después de transcurrido este tiempo se agregó 1 mL de caldo LB y se incubaron las células a 28°C por 3h con agitación a 225 rpm. Una vez concluida la incubación se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm en una centrifuga Jouan MR1812, se decantó el medio y el botón de células se resuspendió en 100 µL de caldo LB. Posteriormente cada 50 µL de la suspensión de células se plaquearon en una caja de medio LB suplementado con los antibióticos espectinomicina (50µg/mL) y rifampicina (100µg/mL). El cultivo se incubó a 28°C por 3 días. Para comprobar las transformaciones se seleccionaron 3 colonias para cada construcción, se purificaron los plásmidos y se realizó la técnica de PCR. Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a 28°C, con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Se tomaron 350 µL del cultivo y se le agregaron 150 µL de una mezcla de glicerol-H₂O (1:1) estéril (la concentración final del glicerol fue de 15%).

3.6. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* se realizó mediante la técnica de inmersión floral, la cual es un método para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough & Bent., 1988). Para realizar la metodología el primer paso fue la inoculación de las clonas de *Agrobacterium* transformadas con las construcciones en 20 mL de medio LB suplementado con espectinomicina y rifampicina, cada antibiótico a una concentración de 50µg/mL, los matraces se incubaron a 29°C con agitación (250rpm) hasta alcanzar una absorbancia a 600nm de aproximadamente 0.8 (alrededor de 36h de incubación). Una vez alcanzada la absorbancia requerida se tomaron 7.5mL del inoculó y se adicionaron a un matraz de 2L que contenía 750mL de caldo Luria suplementado con espectinomicina (50µg/mL) y

rifampicina a la misma concentración, se incubaron a 29°C con agitación constante (250rpm) hasta alcanzar una absorbancia a 600nm de 0.7. Una vez finalizada la incubación los medios se centrifugaron a 6000g por 15 min a 4°C. Los botones celulares se resuspendieron en un volumen final de 0,5L de un solución de sacarosa al 5%, la absorbancia a 600nm de la suspensión fue de 0.8. Además a la suspensión se le agregó 500µL de silwet de tal manera que la concentración final fue de 0.05%. Antes de realizar la inmersión en *Agrobacterium* a las plantas se les retiraron todas las flores y las yemas florales que estaban por abrirse, dejando solo las yemas florales cerradas. Una vez que las plantas estuvieron listas, se sumergieron los tallos con flores en la suspensión por 1min. Concluida la infiltración de las plantas éstas se acomodaron en una charola de manera horizontal y se cubrieron con una bolsa negra para conservar la humedad, se incubaron de esta forma a temperatura ambiente durante 3 días. Después se colocaron en la cámara de incubación con luz continua. Se transformaron 21 plantas para cada construcción.

4. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK en respuesta a luz UV-C

Las líneas mutantes (SALK037113) de la TK1a y la mutante (SALK07256) de la TK1b se nombraron mTK1a y mTK1b respectivamente, así se manejarán en el presente trabajo. Además se empleó como control la línea silvestre (wt) del ecotipo Columbia.

4.1 Ensayo de sensibilidad en el crecimiento de la raíz

En plantas las raíces son el material a elegir para medir el efecto de tolerancia a UV, porque carecen de compuestos fotoprotectores (Molinier *et al.*, 2008). En estos ensayos se sembraron 10 semillas por caja Petri con medio GB5 de cada línea de *A. thaliana*, las cajas se colocaron en posición vertical y se incubaron a 22°C.

4.1.1 Establecimiento del tiempo de irradiación

Primero se estableció el tiempo de irradiación con luz UV-C (254nm) necesario para inhibir el crecimiento de la raíz, por lo que se irradiaron plántulas de 4



días que crecieron verticalmente, con un fotoperiodo de 8h luz/16 horas de oscuridad. Para la irradiación se empleó una lámpara marca UVP modelo UVGL-25 utilizando la longitud de onda corta. La lámpara se colocó a una distancia de 12 cm de la superficie de la caja. Antes de la irradiación se marcó el crecimiento máximo de cada raíz. Los tiempos que se utilizaron de irradiación fueron 2, 5, 10 y 15 min. Inmediatamente después del estímulo las cajas se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en la misma posición vertical. Las cajas se incubaron por 3 días en condiciones de oscuridad para evitar la fotoreactivación, Después de transcurrido este tiempo se midió el nuevo crecimiento de la raíz a partir de la marca.

4.1.2 Inhibición del crecimiento de raíz

Las semillas crecieron en las mismas condiciones que ya se mencionaron. Plántulas de 4 días de las 3 líneas de *A. thaliana*, se les marcó el crecimiento máximo de la raíz, subsecuentemente fueron irradiadas con luz UV-C (254nm) por 15 min, posteriormente la mitad de las cajas se incubaron en oscuridad por 3 días y la otra parte se incubó en un fotoperiodo de 8h luz/16h oscuridad, con el objetivo de observar la contribución de la fotoreactivación en la reparación del daño al DNA inducido. Una vez irradiadas, se realizó la medición a los 3 días para determinar el nuevo crecimiento radicular (Al khateeb & Schroeder., 2009).

Por otra parte, las plantas que se incubaron en oscuridad durante 3 días después de la irradiación, se pasaron a condiciones de incubación de 8h luz/16h oscuridad y se determinó el nuevo crecimiento a los 2 y 4 días después de haber estado en las nuevas condiciones de crecimiento, con el propósito de determinar si la tasa del crecimiento de la raíz se recuperaba al dejar la incubación de oscuridad de 24 horas. Además se utilizaron como controles plántulas sin irradiar de cada línea de *Arabidopsis*.

Para determinar el nuevo crecimiento de la raíz de cada línea, se promediaron las longitudes de raíces de 3 experimentos independientes, tanto los controles de éstos como a sus tratamientos se les realizó ANOVA para asegurar que no existiera diferencia entre los 3 ensayos. Se utilizaron como controles plántulas

sin irradiar de cada línea de *Arabidopsis*. Por último se determinó el crecimiento relativo de la raíz, de cada una de las líneas empleadas, el cual se obtuvo comparando la media del crecimiento de la raíz de las plántulas tratadas con la media del crecimiento de las plántulas del mismo genotipo sin irradiar (tomando este como el 100% del crecimiento de la raíz).

4.2 Efecto en el meristemo apical de raíz

Las células en el meristemo apical de la raíz se dividen rápidamente, dando origen a nuevas células. Entre mayor sea el número de células que se dividen en el meristemo mayor es el crecimiento de la raíz (Jiang & Feldmand., 2005). Es por esto que se evaluó el efecto de la luz UV-C (254nm) en esta zona, con el propósito de determinar cómo la disminución en el crecimiento de la raíz observado se relaciona con el daño en la zona apical de la raíz.

Las raíces utilizadas en esta parte del trabajo fueron sembradas, crecidas e irradiadas con UV-C conforme se describe en las secciones 4.1 y 4.1.2

4.2.1 Microscopía óptica

Las células meristemáticas de raíz contienen gran cantidad de gránulos de almidón por lo que se pueden distinguir de las demás células al teñirlas con lugol, ya que se observan más oscuras.

Se tomaron de 2-3 plántulas y se colocaron las puntas de las raíces en 80 μ L de una solución de lugol. Se incubaron a temperatura ambiente por 2 min, transcurrido este tiempo las raíces se pasaron a un portaobjetos donde las puntas de las raíces se sumergieron en 40 μ L de una solución de cloralhidrato (con glicerol) para el aclaramiento de la raíz, se colocó el cubreobjetos y se observó la zona del meristemo de las raíces con el microscopio óptico Olympus CH30, en el objetivo 10X se capturaron las imágenes con una cámara digital conectada a la computadora. Posteriormente se utilizó el software Moticon Images Plus 2.0 para determinar la longitud de la zona meristemática de cada raíz.

4.2.2 Microscopía confocal

En la biología de plantas el fluorocromo yoduro de propidio se puede emplear para teñir las paredes celulares de la raíz para observar en un microscopio confocal (Moreno et al., 2006). Este fluorocromo incrementa la visibilidad de los contornos de las células del ápice de la raíz, ya que al ser un compuesto que posee propiedades fluorescentes, al ser excitado con luz UV emite una fluorescencia intensa de color rojo. También es utilizado para visualizar el DNA, evaluando el daño a la célula (Luque & Herráez., 2001).

Para la microscopía confocal se tomaron 2 plántulas y se colocaron en un portaobjetos donde las puntas de las raíces se sumergieron en 40 μ L de yoduro de propidio (5 μ g/mL de agua). Se colocó el cubreobjetos sobre las muestras y se observó con un microscopio Olympus BX51 equipado con filtros de UV e isotiocianato de fluoresceína, tomando las fotografías en los objetivos 10X y 40X. Este estudio se realizó en la unidad de microscopía de la Facultad de Química de la UNAM.

4.3 Ensayo de sensibilidad en plantas de 21 días

Plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas mTK1a, mTK1b y silvestre de 21 días se irradiaron durante 5 min con luz UV-C (254nm) con una lámpara marca UVP modelo UVGL-25. La lámpara se colocó a una distancia de 12 cm de la superficie de la maceta. Enseguida de la irradiación la mitad de las macetas se incubaron en oscuridad por 3 días y la otra parte se incubó con luz continua, con el objetivo de observar la contribución de la fotoreactivación en la reparación del daño al DNA. Después de transcurrido los 3 días, las plantas que se incubaron en oscuridad, se transfirieron a condiciones de luz continua durante 4 días, en este tiempo la sensibilidad a UV-C fue evaluada por la clorosis y la muerte del tejido que se observó en las plantas (Al khateeb & Schroeder., 2009).

5. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK en respuesta a UV-C

5.1 Tratamiento

Se sembraron 50 semillas por caja Petri y éstas se colocaron en posición vertical para su crecimiento. Debido a que se requieren aproximadamente 250 plántulas de 7 días para obtener entre 0.3-0.5 g de tejido, se sembraron 5 cajas por tiempo, cada caja se irradió por 15 min con luz UV-C (254nm). Después de la irradiación se cubrieron de la luz y los tiempos de muestreo después de la exposición a UV fueron 0h, 3h, 6h, 14h, Se evaluaron tanto las líneas mutantes como la línea silvestre.

Asimismo, plantas adultas de 2 meses se irradiaron por 10 min con luz UV-C. Después de irradiar se prosiguió a colocar las macetas en oscuridad. Se tomó tejido de hojas de cuatro rosetas por tiempo. Solo se evaluaron plantas silvestres. Los tiempos probados fueron 0h, 3h, 6h, 12h.

Todas las irradiaciones se realizaron con el equipo y la forma descrita en la sección 4.1.1. Las muestras recolectadas se pesaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta realizar la extracción de RNA.

5.2 Extracción de RNA

Se realizó extracción de RNA total de hojas de roseta de plantas de *A. thaliana* silvestres de 2 meses de edad y de plántulas completas de 7 días tanto de *A.thaliana* silvestre, como de las 2 líneas mutantes de DNA-T. Las muestras incluyeron los controles como sus respectivos tratamientos con luz UV (sección 5.1).

En un mortero estéril se colocaron de 0.2-0.5 gramos del tejido, posteriormente se pulverizaron con N_2 líquido hasta obtener un polvo fino. A éste se le agregó 3 veces de volumen del reactivo de Trizol (Invitrogen) por cada gramo de tejido (por cada 100 mg de tejido se agregaron 300 μL de Trizol). Se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se homogenizó la muestra y se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C en

una centrífuga Eppendorf. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 2 mL, se le agregó 200 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 15 seg, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, la fase acuosa resultante se colocó en otro tubo de 2 mL, se le añadió 400 μL de CHCl_3 y se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa se separó y se le agregaron 400 μL de CHCl_3 , se agitó y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló con vórtex, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1.0 mL de etanol al 70% golpeando suavemente el tubo (El botón no se resuspende). Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a 4°C, al finalizar el tiempo se descartó el sobrenadante y dejando destapado el tubo, el botón se secó a temperatura ambiente durante 15 min, enseguida el botón se resuspendió en 500 μL de H_2O -DEPC. Se le añadieron 167 μL de LiCl 8M y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. El botón obtenido se disolvió en 250 μL de H_2O DEPC, además se le agregaron 500 μL de etanol al 95% y 25 μL de acetato de sodio 3M, se incubó toda la noche a -70°C. Pasado el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a 13000rpm por 20 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% (se repitió 2 veces). Por último, se eliminó el etanol residual y el botón se secó a temperatura ambiente durante 10 min, el botón se resuspendió en 30-40 μL de H_2O DEPC. La muestra de RNA total se cuantificó y se almacenó a -70°C.

5.3 Cuantificación y calibración del RNA total

Para cuantificar el RNA total extraído de cada muestra se realizaron diluciones 1:50 en H_2O -DEPC, posteriormente la dilución se transfirió a una celda de cuarzo de 1.0 cm de pasó óptico, y utilizando un espectrofotómetro se leyeron las absorbancias a 260 nm y a 280nm, ya que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm mientras que las proteínas lo tienen a 280nm; por lo tanto, la relación entre ambas absorbancias ($A_{260/280}$) proporciona el grado de pureza de la preparación, valores mayores a 1.5 muestran una

preparación pura. Los datos de absorbancia a 260nm se procesaron con la siguiente fórmula:

$$1\mu\text{g RNA}_{\text{total}} = A_{260\text{nm}} \left(\frac{40\mu\text{gRNA/mL}}{1 \text{ unidad } A_{260}} \right) (\text{factor de dilución}) \left(\frac{1\text{mL}}{1000\mu\text{L}} \right)$$

Además de la cuantificación espectrofotométrica se calibró el RNA por análisis densitométrico de la banda correspondiente al RNAr 28S. Para esto se preparó un gel de agarosa al 3.0% con buffer TAE 1X (preparado con H₂O-DEPC) y bromuro de etidio 0.5 µg/ mL, en este gel se le cargaron las muestras que contenían la cantidad de RNA calculada para 1 µg, antes de cargar las muestras se les agregó 2 µL de buffer de carga y H₂O-DEPC c.b.p. 5µL para así poder correrlo en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X frío, a 90mV por 30 min. Una vez concluido el tiempo de corrida, el gel se visualizó en un transiluminador de luz UV Hoefer Scientific Instruments modelo UVTM. La captura de la imagen se realizó con el equipo KODAK Image Station, modelo 400R-PRO y la densitometría de las bandas de los RNAr 28S se realizó en el analizador de imágenes Carestream 5.0. La densitometría permitió ajustar los volúmenes de RNA cuando fuera necesario (la diferencia de las muestras no debía ser mayor del 12%), pues esto nos permitió asegurarnos de que la cantidad de RNA que se utilizó en la síntesis de cDNA fue aproximadamente la misma en todas las muestras.

5.4 Reacción de RT-PCR

La reacción de RT se realiza mediante la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una molécula de cDNA a partir de una molécula de RNA (mensajero). Una vez que se tiene el cDNA, se utiliza como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar la secuencia de DNA de interés (Rodríguez *et al.*2004), lo cual nos permitió cuantificar los niveles de transcritos de los genes TK1a y TK1b.

La reacción para obtener el cDNA a partir de los transcritos de los genes de la TK1 se efectuó agregando en un tubo Eppendorf 1µL de Oligo dT (61µM), el volumen de RNA ajustado previamente (para tener aproximadamente 1µg de RNA total) y H₂O-DEPC c.b.p. 10 µL, posteriormente este tubo se colocó en un

bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo de incubación se colocó en hielo por 5 min y se le agregó 15µL de la mezcla preparada (Tabla 6). Después se calentó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento y posteriormente a 42° por 1 hora. Finalmente, para inactivar a la enzima se calentó a 70°C durante 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer ImProm-II 5X	4.0
MgCl ₂ 25mM	2.4
dNTP's 10mM	1.0
TR (Transcriptasa reversa)	1.0
H ₂ O-DEPC	6.6 (c.b.p.15µL)

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción RT

A partir de 1µL de cDNA de cada muestra, se realizó la amplificación por PCR de los cDNAs provenientes de los transcritos AtTK1a, AtTK1b y APT1, este último se utilizó como control de cargado, ya que no muestra variación en los niveles de transcrito en respuesta a luz UV. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL con los reactivos y concentraciones indicadas en la tabla 7. La amplificación se realizó en un termociclador marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp9700. Las condiciones de termociclador fueron 1 ciclo de 5 min a 94°C, seguido del número de ciclos respectivos para cada muestra (plántulas de 7 días o plantas adultas) y estos ciclos tuvieron la siguiente programación 1min a 94°C, 1min/temperatura de alineamiento específica para cada par de oligos y 1min a 72°C, para finalizar con un ciclo de 7min a 72°C. En la tabla 8 se muestran los números de ciclos empleados para cada tipo de muestra, así como las temperaturas específicas para cada par de oligos. Los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar los cDNAs de los transcritos de la timidina cinasa fueron obtenidos en un trabajo previo en el laboratorio (Nájera-Martínez, 2010), las secuencias aparecen en la Tabla 9.

Tabla 7. Preparación de la mezcla para PCR de moldes de cDNA. La concentración del stock de oligos* para el gen APT1 era 2 μ M, el stock de los demás oligos era 10 μ M

Reactivo	TK1a (μ L)	TK1b (μ L)	APT1 (μ L)
Buffer 5X Go Taq React + Mg ²⁺ (1.5mM)	4.0	4.0	4.0
dNTPs 10mM	0.3	0.3	0.3
Oligonucleótido Forward (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μ M)	0.75 (0.375 μ M)	2.0* (0.2 μ M)
Oligonucleótido Reverse (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μ M)	0.75 (0.375 μ M)	2.0* (0.2 μ M)
Taq Polimerasa 5U/ μ L	0.2	0.2	0.2
cDNA	1.0	1.0	1.0
H ₂ O esteril (c.b.p. 20 μ L)	13.0	13.0	6.5

Tabla 8. Ciclos y temperaturas de alineamientos empleadas en las reacciones de PCR a partir de cDNA.

Amplicon	Ciclos de la reacción de PCR		Talineamiento °C (Oligos)
	Para plántulas de 7 días	Para plantas de 2 meses	
TK1a (180pb)	28	26	60
TK1b (310pb)	35	31	62
APT1 (490pb)	26	26	55

Se tomaron 7 μ L de cada reacción de PCR y se corrieron en un gel de agarosa al 3% preparado con 20 mL de solución TAE 1X y con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) y usando TAE 1X como amortiguador de corrida. Las bandas de DNA se observaron en un transiluminador de luz UV UVP modelo UV15. Posteriormente se capturó la imagen con el equipo KODAK image station modelo 400R PROO y la densitometría de las bandas de los amplicones se realizó con el software Carestream 5.0



Gen	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	TM (Teórico)	Longitud (Pb)	Contenido de GC (%)
TK1a	Forward (AT3TK1F)	5' TTGGAAGATTCTGACAAGGCTA 3'	53.7	22	40.9
	Reverse (AT3TK1R)	5' CAACATTAAGGATAAACCCAGACCA 3'	53.0	24	37.5
TK1b	Forward (AT5TK1F)	5' AGCTTTGTTTACGATGAGGAAG 3'	53.0	22	40.9
	Reverse (AT5TK1R)	5' GGGTTTCTACAAGAAATTCACAAA 3'	51.9	24	33.3
APT1	Forward (ATAPT1)	5' TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC 3'	57.1	22	50
	Reverse (ATAPT2)	5' CCTTCCCTTAAGCTCTG 3'	49.8	18	50

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de los transcritos de la timidina cinasa.

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de los genes de la Timidina cinasa de *Arabidopsis thaliana* y de sus regiones promotoras

En la base de datos del genoma de *A. thaliana* The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>) se encontraron dos secuencias potenciales de genes de la TK1: la primera (ATtK1a) en el cromosoma 3 (AT3G07800) y la segunda (AtTK1b) en el cromosoma 5 (AT5G23070). En la figura 12a se presentan las características estructurales de ambos genes y de la proteína que codifican. La proteína TK1b es mayor debido a que en su extremo amino presenta una extensión que contiene una secuencia potencial de tránsito al cloroplasto. Asimismo, la estructura genómica difiere pues mientras que el gen TK1b carece de intrones, su parólogo TK1a contiene 3 intrones. La estructura de ambos genes se ilustra en la figura 12b.

A

Gen	ATK1a	ATK1b
Tamaño	1701nt	1081nt
ORF	153-1144	82-930
5`UTR	1-152	1-81
3`UTR	1145-1701	931-1081
Exones	4	1
Intrones	3	0
Aminoácidos	238	282
Cromosoma	3	5

B

AtTk1a*AtTk1b*

Figura 12. Estructura de los genes TK1 de *Arabidopsis thaliana*. A. Características estructurales de ambos genes. B. Esquema estructural de cada gen

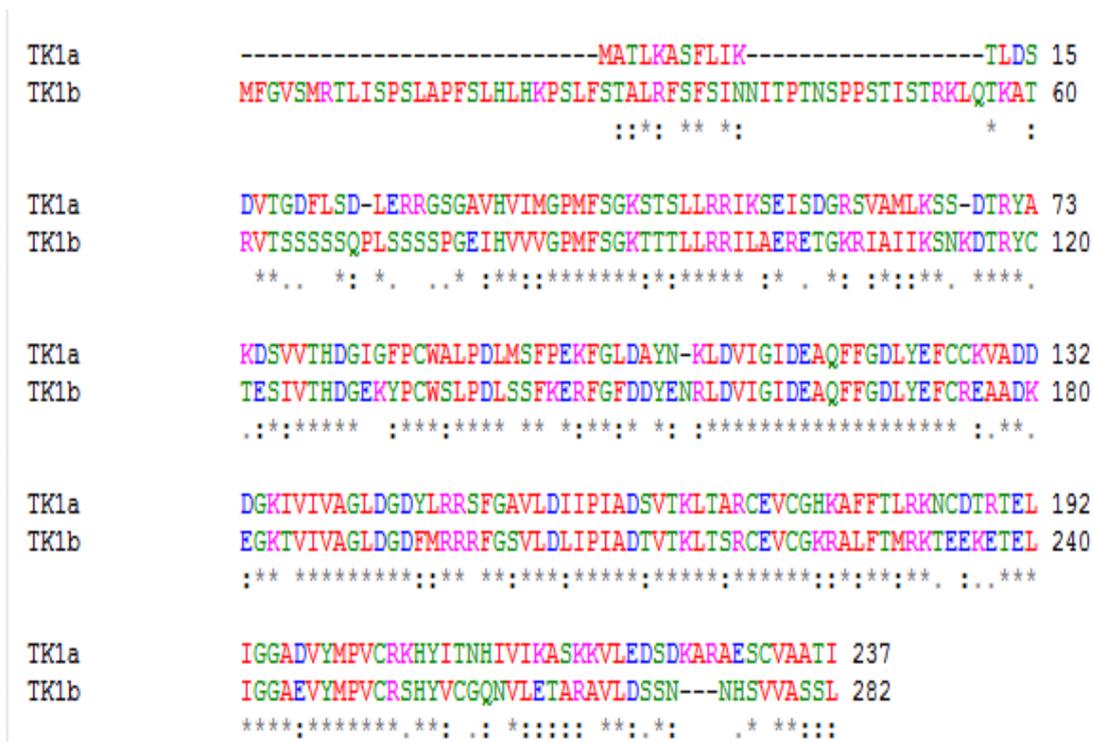


Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los genes de la timidina cinasa de *A. thaliana*. (*) Representan aminoácidos idénticos y (:) representan aminoácidos similares.

Con las secuencias de los aminoácidos de cada una de las proteínas de la timidina cinasa se realizó un alineamiento empleando el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), los aminoácidos idénticos (*) se señalan en la figura 13. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias resultó ser del 53%. Una vez identificados los genes en el genoma de *A. thaliana* se obtuvieron las secuencias de 1000 pares de bases (pb) río arriba de la región 5'-UTR y río abajo de la región 3'-UTR de cada uno de los genes en la página del centro nacional de información biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los oligos para la amplificación del potencial promotor del gen TK1a (pTK1a) abarcaron 1080 pb que incluyó la región del promotor, la región 5'-UTR y el primer aminoácido del marco de lectura. Mientras que los oligos para el potencial promotor del gen TK1b (pTK1b) abarcaron 1088 pb, que también incluyeron la región 5'-UTR y la secuencia de los 7 primeros aminoácidos del marco de lectura. Las secuencias que se tomaron como potenciales promotores de los genes de la TK1 de *A. thaliana* se encuentran en la figura 14.

pTK1a

→
AATTAGGATGGTGCCACTAAAAGTTTTTTAAAAAGAAGTAATTAATAATAAATTTGCAATTAAGGATGT
CTTATTCACAGAATTTTTAAAGCAAACTGAGAGTTGTTGTTGTTTGGATAATTTAGGCTTGTGTGTGTA
CGTTTGGTTTGTAGTTTTAACTACTGGTGACATTTTATCTATGTTTGAATTTTGATCAAATTGATTTAA
CTTGTAAATAACCTGGCGATGAAAAATGTATTCTAGTTCGGTTTTAGGAATACAACGAGCTACGATTGTAC
ATTAATTGAGGTGATCGGAAAAACATTTCAACAATTTGTAGCTTTAGACATGAAGGTGTGCAACTACA
TACGAAAAATTAATAAAAAATGCAACTACGAAAAAGCAATGAACGTGTATGTATTGGAACACTTGAAG
AAGGTTGTGAACATGTTTCATCTCAGGGCCAAAAAAGCCCTCAGGGTTTTGGGTTTAAGCCCACATTTCAA
AAGCACACACAAAAATGATGGGTTTGTAGGATAAAAAACCAAGTGAGAAAGTTGTTTTCTCGAATATT
ACGAATTTACGACTTTCTAATTTAAACAATAATTTCTAAAAACATTTAGTGGAATATATGACCAAAAACC
AGTACCATTTTATGTGGATATATTTTTTAAAAATATTTATCATTTCTCTTAAATAATGTGTTTGC AAAAC
CTAAACACACATGTTTTAAAAATTCATATGATCTATACATTAAGGAAATTAATTAAAAAATAAGCCA
ATAGAAAAATCAGTTTTTTTTTTTTTAAATTCGGTTTATAGTGTCCGCTTTATGAAAAGAGAGAGGTAA
AATAAAAAAGATTCGCTCTAAAAAACTGTTTCCCTCCAAAGATGTAATTTTTTTGAAAAACCTCCCATT
CAAAAATTTCAAACCCTTATCTTTGACAAATCTTCTCCAGCAATTTTCTTCCTTGTTC AACTTCTGGATG
TCCGCGTATATATATCTTCAACAAGCTATTCACCATCGCTACC TAAAACCACAAGCAAATGAACCCTT
CTCCCTTTTTTCATCTACAAACCATCTTTTCTTCTCAAGTCTCTGCCATG

pTK1b

→
TGCATGTGAGAAATAAGTGAAGGAGAGGAGATTTTTCAATTGGAATCAATGAAATTTGAAAAAGAGGA
ATCTGATGACTCACCGTTTACCGTACATTACATAATTTTCTCTCATCTCTGCTTTTTGTACTTTTTGG
TCAATAAAAAATCCAACCTCTATGATTGACAGTCTAATGATTCTCACTCTAGTTTTTCTCTTCTTTTCTA
CTTCTTTTTCATTTTTATATAATTTTCACTTCTTTTTGTTAAAAATTTATCAAATATCACC AAAATTTATC
AACTCTATAATTTTTCACTTTTTTTTTGTTAAAAATATCAAATATCACCAAAAATTTACCTACGCATACAAA
GATAAACAAATAGACTTTACCAAAAACCTAACTCTTTAACCATAAGCTAAAAACAAAAAAAACAAAAAAA
AAAAACAAGACTTTTTGTCAAAATAAATAACAATAAATCATATATATCTTTTTCTTCTAAAAATCATTTCT
ATTATATGGAAGTTAGAATTAATGTTAAAGTTATACAAGACTATAACCACAAAAATTTATTACATAAACAG
ATATGTGAGTCATTTTCTAAAAAAAAGTACGAAGAAACAAGATTTAACAGTAAATTTATATATTAGTGCAA
TTTTTCATCACTAAAGAAAAAAAATAAGTTAAATATTACGGTAAAAGTATTCATAACAATAAAAAATAAGAA
TCATCGAACA AAAACATCAAAAAAAAATTAATAACAAGATTACTCATCACATTGAAGCACCAAAAAAAA
ACAGCTTGAATGATTTAATCTCATCACATTCAAGATAGTGAGATTAATGTTCTCATCGAAACACTATAA
AAAAAAAATTATAATAAAAAATTTGATCTAATACTATTTCTTTGTCATGAAACTAGCTTGAATTGATA
ATCAAAAATATTTATTTTTTAAAAATAATATGTAAGAAATCTGTTCAAAAATCACTCCAAAAC TAGCTACC
CATTAATACAAAAAAAATTCAAAAGAGTCGTTCCAAATAGACCCCTTTTCCCAATAAACCCCTAATTCCTTGC
GGCTTCTTCTTCTTCTCTCTCCATTCCTCTGTAATTATCAAATGTTTGGTGTTCGATGAGAACA

Figura 14. Secuencias tomadas como potenciales promotores de los genes de la TK1 de *A. thaliana*. Las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos y la secuencia de éstos se encuentran subrayadas. La secuencia en gris indica la región 5' UTR de cada gen, asimismo se señala el inicio del marco de lectura abierto (ATG).

Estas secuencias se analizaron en la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) para conocer los posibles elementos regulatorios *Cis* que podrían contener los promotores. Una de las secuencias encontradas en el pTK1a fue la secuencia consenso de reconocimiento para el factor de transcripción E2F, la funcionalidad de esta secuencia se ha demostrado experimentalmente en algunos genes en *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Nicotiana benthamiana*, mientras que el pTK1b no presenta esta región de nucleótidos.

pTK1a

AGGATGGTGCCACTAAAAAGTTTTTTAAAAAGAAGTAATAAAAATAAATTTGCAATTAAGGATGTCTT
ATTCCAGAATTTTTAAAGCAAACACTGAGAGTTGTTGTTGTTGGATAATTTAGGCTTGTGTGTACGT
TTGGTTTAGTTTTAACCTACTGGTGTACATTTTATCTATGTTTGAATTTTGATCAAATTGATTTAACT
TGTAATAACCTGGCGATGAAAATGTATCTAGTTCGGTTTTAGGAATACAACGAGCTACGATTGTACA
TTAATTGAGGTGATCGGAAAAACATTTCAACAATTTGTAGCTTTAGACATGAAGGTGTGCAACTACA

QARBNEXTA

TACGAAAAATTAATAAAAAATTGCAACTACGAAAAAGCAATGAACCGTGTATGTAATTGGAACACTTGAA

Consenso E2F

GAAGGTGTGAACATGTTTCATCTCAAGGCCAAAATAAGCCCTCAGGGTTTTGGGTTTAAGCCCACATTC
AAAAGCACACACAAAAATGATGGGTTTGTAGGATAAAAAACCAAGTGAGAAAGTTGTTTTCTCGAAT
ATTACGAATTTACGACTTTCTAATTTAAACAATAATCTCTAAAACACATTAGTGGAATATATGACCAAA
AACCAGTACCATTTTATGTGGATATATTTTTAAAAATTTTATCATTTCTTAAATAATGTGTTTGC

MYCATERD1

AAAGCCTAAACACACATGTTTAAAAATTTTCATATGATCTATACATTAAGGAAATTAATTAAAAAAAT

MYBCOREATCYB1

AAGCCAATAGAAAAATCAGTTTTTTTTTTTTTAAATTCCTGTTTATAGTGTTCGCTTTATGAAAAGAGA
GAGGTAAAAATAAAAAAGATTCGCTCTAAAAAACTGTTTCCCTCCAAAGATGTAATTTTTTTGAAAAAC

WBOXATNPR1

CTCCCATTCAAAAATTCAAACCTTATCTTTTGACAAATCTTCTCCAGCAATTTTCTTCCTTGTTCAC
TTCTGGATGTCGCGTATATATATCTTCAACAAGCTATTCACCATCGCTACCTAAAACCACAAGCAAA
TTGAACCTTCTCCCTTTTTTCATCTACAAACCATCTTTTCTTCTCAAGTCTCTGCCATG

pTK1b

MYCATRD22

TGCATGTGAGAAATAAGTGGAAGGAGAGGAGATTTTTCAAATTGGAAATCAATGAAATTTGAAAAAGAGGAA
TCTGATGACTCACCGTTTTTACCCTACATTACATAATTTTCTCTCATCCTCGTCTTTTGTACTTTTTGGTC
AATAAAAAATCCAACCTCTATGATTGACAGTCTAATGATTCTCACTCTAGTTTTTCTCTTCTTTTCTACTT
CTTTTCATTTTTATATAATTTTCACTTCTTTTTGTTAAAAATTTATCAAATATCACCAAAATTTATCAACT
CTATAATTTTCACTTTTTTTGTTAAAAATTTATCAAATATCACCAAAATTTACCTACGCATACAAAAGATAA

MYB1AT

ACAATAGACTTTACCAAAACCTAACTCTTTAACCAATAAGCTAAAAACAAAAAAAACAAAAAAAACA
AGACTTTTTGTCAAATAAATAACAATAAATCATATATCTTTTTCTTCTCTAAAAATCATTCATTTATAT
GGAAGTTAGAATTAATGTTAAAGTTATACAAGACTATACCACAAAAATTTATACATAAACAGATATGTGA

MYBCORE

GTCATTTTCTAAAAAAGTACGAAGAAACAAGATTTAACAGTAAATTTATATATTAGTGCAATTTTCATCA
CTAAAGAAAAAATAAGTTAAATATTACGGTAAAAGTATTCATAACAATAAAAAATAAGAATCATCGAACA
AAACATCAAAAAAATTTATAATAACAAGATTACTCATCACATTGAAGCACCACAAAAAACAGCTTGAAT
GATTTAATCTCATCACATTCAAGATAGTGAGATTAATGTTCTCATCGAAACACTATAAAAAAATTTA
TAATAAAAAATTTGATCTAATACTATTTCTTTGTGATGAAACTAGCTTGAATTGATAATCAAAATATTTA
TTTTTAAAAATAATATGTAAAGAAATCTGTTCAAAAATCACTCCAAAACCTAGCTACCCATTAATACAAAA
AATTCAAAGAGTCGTTCCAATAGACCCCTTTTCCCAATAAACCTAATTCCTTGCGGCTTCTTCTTCTTC
CTCCTCCTCCATTCCTCTGTAATTATCAAATG

Figura 15. Elementos regulatorios Cis de los potenciales promotores de los genes de la TK1 de *Arabidopsis*. Secuencias en gris señalan los posibles motivos que se encuentran en genes que tienen participación en los procesos de reparación de DNA según lo publicado por Chen *et al.*, 2003. Mientras que las secuencias subrayadas en negro son motivos localizados empleando la base de datos de PLACE.

A grandes rasgos las dos potenciales secuencias promotoras analizadas con esta base de datos presentan diferentes secuencias regulatorias; algunas de estas se muestran en la figura 15 donde se puede observar el nombre del motivo así como su posición río arriba del origen de la traducción. Los motivos

del pTK1a que se reportan se han localizado en los promotores de genes involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés del medio ambiente y en genes controlados por el ciclo celular, por su parte las secuencias regulatorias del pTK1b encontradas participan en respuesta a estrés hídrico como se describe en la tabla 10.

Tabla 10. Motivos Cis encontrados en las regiones promotoras de los genes TK1 empleando la base de datos PLACE. Locus con respecto a su posición río arriba del origen de la traducción y en la cadena del DNA en la que se localiza.

Promotor	Motivo	Secuencia	Locus	Descripción
TK1a	Consenso E2F	TTTGGCCC	640 (-)	Motivo de unión para el factor E2F verificado experimentalmente en plantas
	MYBCOREATCYCB1	AACGG	292 (-)	Encontrado en el promotor de la ciclina B1
	MYCATERD1	CATGTG	383 (-)	La proteína NAC se une a este sitio, como respuesta temprana a la deshidratación
	QARBNEXTA	AACGTGT	692 (+)	Controla la activación en respuesta a estrés mecánico
	WBOXATNPR1	TTGAC	163 (+)	Respuesta a estrés del medio ambiente
TK1b	MYB1AT	TAACCA	598 (+)	Unión de activadores transcripcionales por señalización de ABA
	MYBCORE	CTGTTA	482 (-)	Involucrados en la regulación de genes que responden a estrés hídrico en <i>Arabidopsis thaliana</i>
	MYCATRD22	CACATG	1075 (-)	Encontrado en genes que responden a deshidratación



Adicionalmente en la figura 15 se muestran elementos Cis hallados en los promotores de los genes TK1 que se han encontrado en las regiones promotoras de genes inducibles por daño a DNA en *Arabidopsis thaliana*, entre los que se encontró el gen TK1a y 6 genes más que participan en diferentes mecanismos de reparación de daño a DNA (Chen *et al*, 2003). Estas secuencias de nucleótidos son idénticas en los 7 promotores además de que presentan similitudes en la posición con respecto al inicio de la traducción. Se realizó la búsqueda de estas secuencias en el pTK1b, los motivos hallados se muestran en la figura 15, sin embargo las pocas secuencias idénticas encontradas no coincidieron en la posición con respecto al inicio de la traducción.

2. Aislamiento y clonación en el vector pGEM de las secuencias promotoras de los genes de la timidina cinasa 1 de *A. thaliana*

Una vez identificadas las potenciales secuencias promotoras para ambos genes y contando con los oligonucleótidos correspondientes se realizó la amplificación de dichas secuencias a partir de DNA genómico. Las secuencias amplificadas se purificaron y se clonaron en el vector pGEM con el propósito de poder mandar a secuenciar las regiones de DNA obtenidas por PCR y así corroborar su identidad.

Por otra parte, para confirmar la clonación se llevó a cabo una reacción de restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. En la figura 16b se observa la liberación de los insertos del vector.

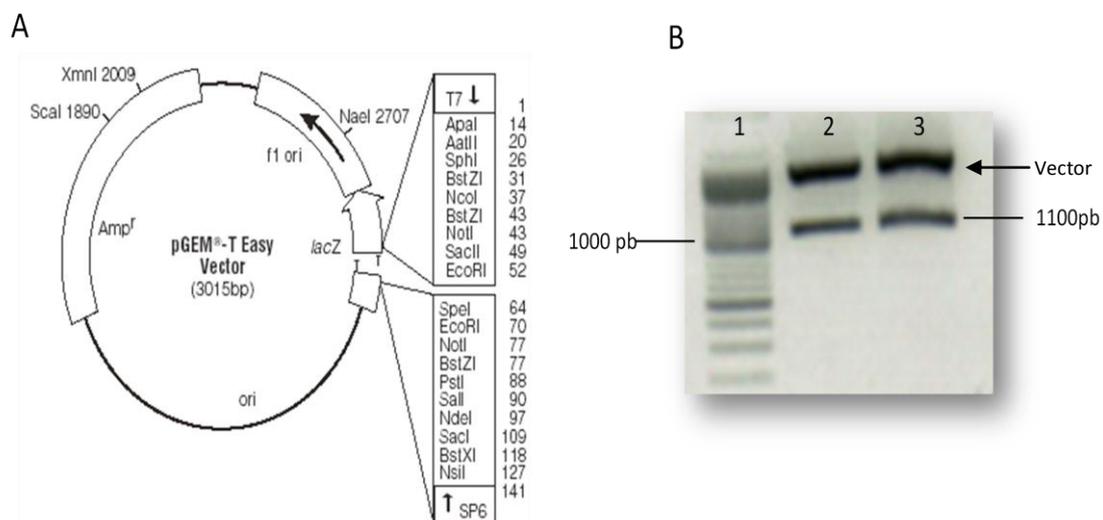


Figura 16. Clonación de las regiones promotoras de los genes de la TK1 en el vector pGEM. A. Mapa del vector pGEM empleado para la clonación. B. Digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, para liberar los insertos. Carril 1, marcador de 100pb; Carril 2, digestión de la construcción pGEM/pTK1a; Carril 3, digestión de la construcción pGEM/pTK1b.

3. Clonación de los promotores de la TK por la Tecnología Gateway®

Para lograr el análisis de las regiones promotoras de los genes de la TK1 de *A. thaliana* se requería que primero estas secuencias se encontraran clonadas frente a un gen reportero en un vector binario. Con este propósito se empleó el sistema Gateway® el cual esta basado en un sistema de recombinación en sitios específicos.

Al tener las regiones promotoras modificadas en sus extremos con las secuencias de recombinación, se realizó la primera reacción con el vector donador pDONR/Zeo (figura 17 A). El éxito de la recombinación se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción *SmaI*, debido a que el vector donador sin recombinar presenta 2 sitios de reconocimiento para esta enzima de restricción y al recombinarse pierde uno de los sitios, además de que las secuencias promotoras no contenían el sitio de reconocimiento para esta enzima. Cuando los productos de digestión se resolvieron en un gel de agarosa, se observaron las bandas de los vectores recombinados con el tamaño esperado de aproximadamente 3,100 pb y una sola banda, mientras que en el vector sin recombinar se observaron 2 bandas (figura 17 B). También se realizó la amplificación de los insertos con los oligos específicos, utilizando los plásmidos recombinados como molde para corroborar la clonación.

Una vez que se confirmó la clonación de las secuencias en el vector donador se realizó la segunda reacción de recombinación de este sistema, en la cual las regiones promotoras quedaron clonadas en el vector de expresión (binario) pBGWFS7 (figura 17 C) frente a los genes reporteros β glucuronidasa y GFP. De igual manera que el vector donador, el plásmido pBGWFS7 contiene dos sitios de restricción para *SmaI* y al recombinarse solo conserva uno. Las bandas de los productos de la restricción de los vectores binarios recombinados presentaron un tamaño mayor a 11,000pb (figura 17 D) justo lo esperado. También se confirmó la recombinación de las secuencias de las regiones promotoras por PCR y secuenciación como se describe en la parte de materiales y métodos.

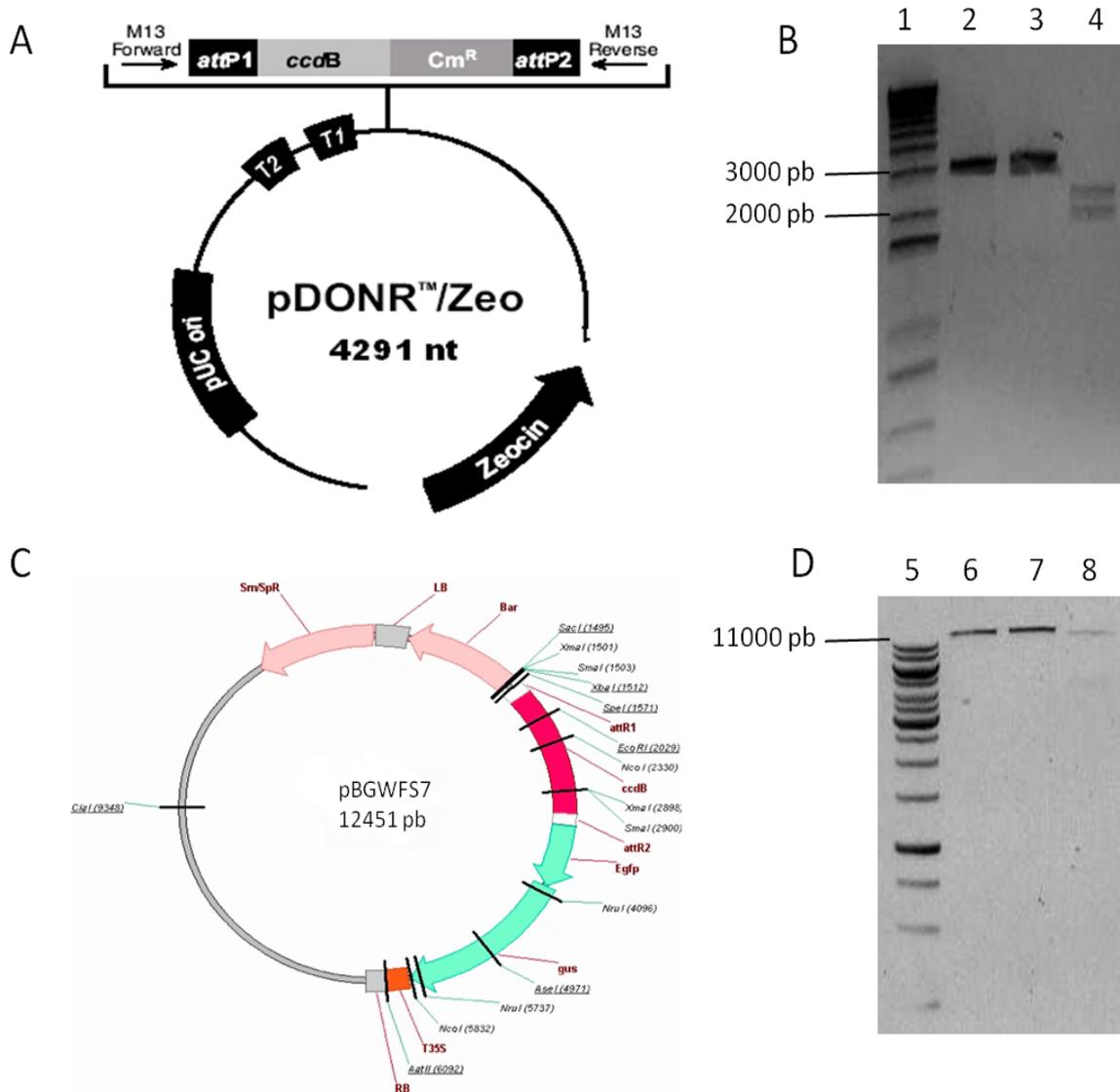


Figura 17. Clonación de los promotores de la TK1 de *A. thaliana* mediante la Tecnología Gateway®. A. Mapa del vector donador. B. carril 1, marcador de 1 Kb; carril 2, digestión de la construcción pDONR/Zeo/pTK1a; carril 3, digestión de la construcción pDONR/Zeo/pTK1b; carril 4, digestión del vector pDONR/Zeo. C. Mapa del vector binario. D. carril 5, marcador de 1Kb; carril 6, digestión de la construcción pBGWFS7/pTK1a; carril 7, digestión de la construcción pBGWFS7/pTK1b; carril 8, digestión del vector binario sin recombinar. Todas las digestiones se realizaron con la enzima *Sma*I.

4. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK en respuesta a luz UV-C

Las líneas mutantes de inserción de DNA-T se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center, Universidad de Ohio, E.U.A. Las mutantes de la timidina cinasa 1 utilizadas fueron SALK037113, que tiene integrado el DNA-T en la región promotora del gen TK1a (figura 18 A), y SALK07256 que tiene integrado el DNA-T en el exón 1 del gen TK1b (figura 18 B). En trabajos previos del laboratorio (Nájera-Martínez, 2010), se habían obtenido estas líneas mutantes en condición de homocigosis en la generación T3 y se caracterizaron cuantificando sus niveles de transcritos. Se puede apreciar en la figura 18C que la mutante del gen AtTK1a (mTK1a) presentó sobreexpresión en el nivel del transcrito del gen TK1a en comparación de la línea silvestre. Por otra parte la línea de la mutante del gen AtTK1b (mTK1b) presentó una disminución en el nivel del transcrito del gen TK1b en comparación a la línea silvestre (figura 18 D).

Durante el desarrollo en condiciones convencionales de crecimiento las mutantes no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas silvestres.

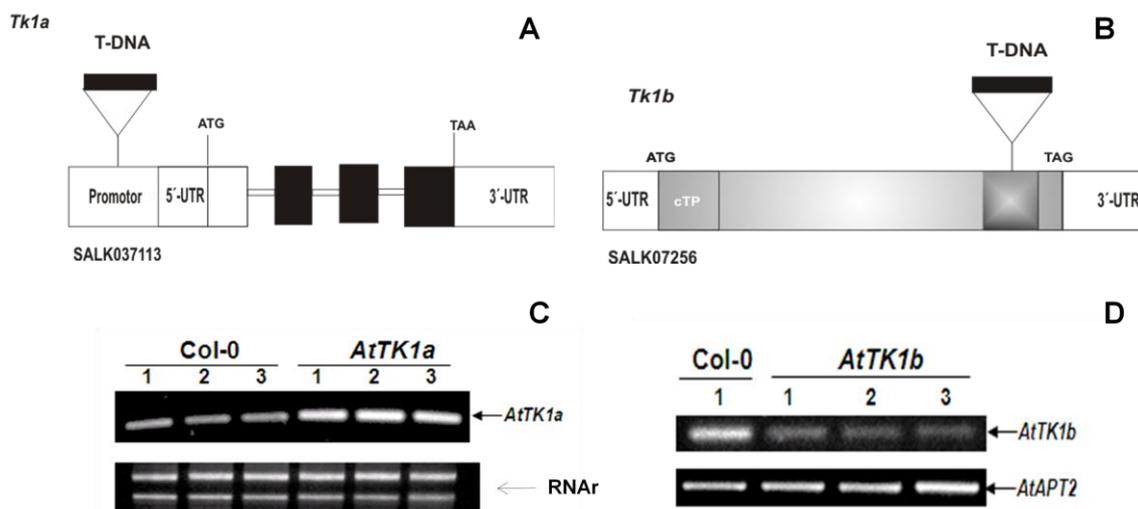


Figura 18. Líneas de inserción de DNA-T en los genes de la TK1 de *A. thaliana*. A. Línea de inserción de DNA-T en el gen TK1a. B. Línea de inserción de DNA-T en el gen TK1b. C, caracterización genotípica de la línea mTK1a. D. caracterización genotípica de la línea mTK1b (Cortesía de la M.C. M. Nájera Martínez).

4.1 Establecimiento del tiempo de irradiación para evaluar la inhibición del crecimiento de la raíz

Se irradiaron a diferentes tiempos de exposición (2min, 5min, 10min y 15min) con luz UV-C (254nm) plántulas de 4 días de las 3 líneas de *Arabidopsis thaliana* evaluadas después de someterse al tratamiento, las plántulas se incubaron en oscuridad durante 3 días para evitar la fotoreactivación, pasando este periodo de tiempo se determinó el nuevo crecimiento de la raíz. Se observó que en los 2 primeros tiempos de exposición no se afectó de manera diferencial el crecimiento de la raíz entre las 3 líneas. Mientras que a los 10 min de exposición se notó una disminución considerable en el crecimiento de la raíz de las plántulas wt y mTK1b. Sin embargo, para las plántulas mTK1a no queda claro el porcentaje de inhibición en el crecimiento de la raíz por la desviación estándar que se obtuvo. Por otra parte el tiempo de irradiación de 15 min resultó ser el idóneo para evaluar la inhibición del crecimiento nuevo de la raíz para los experimentos posteriores debido a que las diferencias en las medias de la longitud de raíz eran considerables y la desviación estándar no interferiría con los resultados obtenidos entre las 3 líneas. De manera general se puede apreciar en la figura 19 una respuesta dosis-dependiente para los 3 grupos evaluados y que la inhibición en el crecimiento de la raíz de las plántulas mTK1a es menor que en las otras 2 líneas de *A. thaliana*.

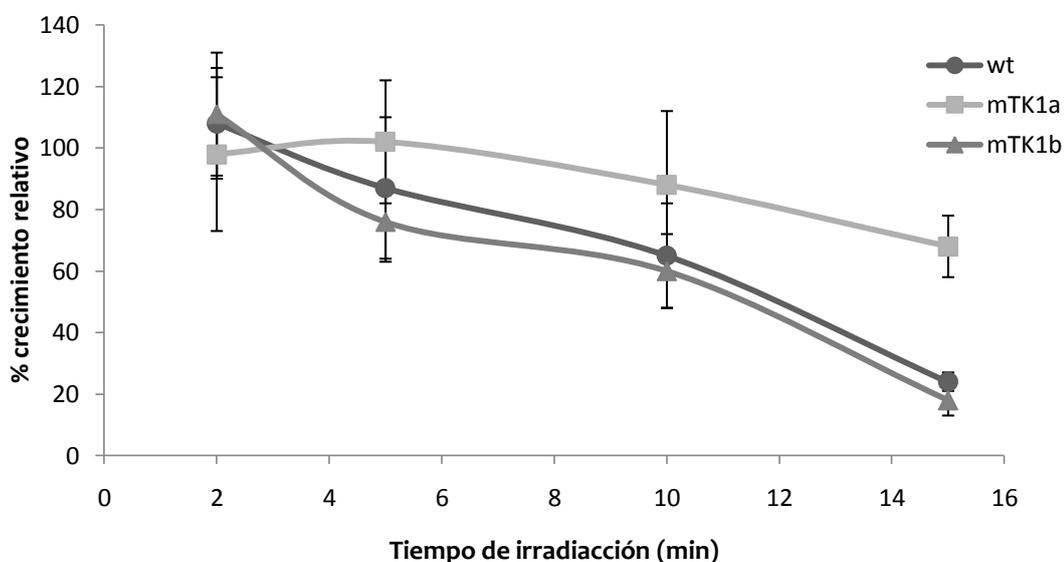


Figura 19. Estandarización del tiempo de irradiación con luz UV-C (254nm). Cada punto es la media \pm desviación estándar (n=12).

4.2 Ensayos de sensibilidad a UV-C en raíz

Al establecer que los 15 min de irradiación con luz UV-C era el tiempo de exposición adecuado para determinar el efecto del daño inducido por UV mediante la medición del crecimiento de la raíz y al contar con las líneas mutantes mTK1a y mTK1b; se procedió a evaluar el posible papel de la timidina cinasa en los procesos de reparación. En la figura 20a se observa que el crecimiento de la raíz después de la irradiación en condiciones de oscuridad se inhibió alrededor de 40% para la mTK1a, mientras que en la wt disminuyó hasta 70% y en la mTK1b hasta un 75%. En cambio, en condiciones de incubación en presencia de luz la inhibición en la longitud de la raíz para las 3 líneas de manera general fue menor que en las condiciones antes mencionadas (figura 20b). Sin embargo la mTK1a sigue presentando mayor crecimiento que la mTK1b y la wt.

Las plántulas que se incubaron en oscuridad durante 3 días después de la irradiación, se pasaron a condiciones de incubación estándar y se determinó el nuevo crecimiento a los 2 y 4 días después de haber estado en las nuevas condiciones, con el propósito de conocer si la tasa del crecimiento de la raíz se recuperaba al dejar la incubación de oscuridad de 24 horas y tener disponible 8h de luz durante el día. Sin embargo la tasa de crecimiento parece conservarse en las 3 líneas de plantas conforme pasaron los días. Aunque se observó un ligero incremento en la longitud de las raíces de mTK1b y wt en la última medición la diferencia con mTK1a sigue siendo considerable (figura 21). Estas plántulas se sembraron en tierra y se pasaron a condiciones normales de crecimiento, las plantas de las tres líneas crecieron con un fenotipo normal hasta la senescencia.

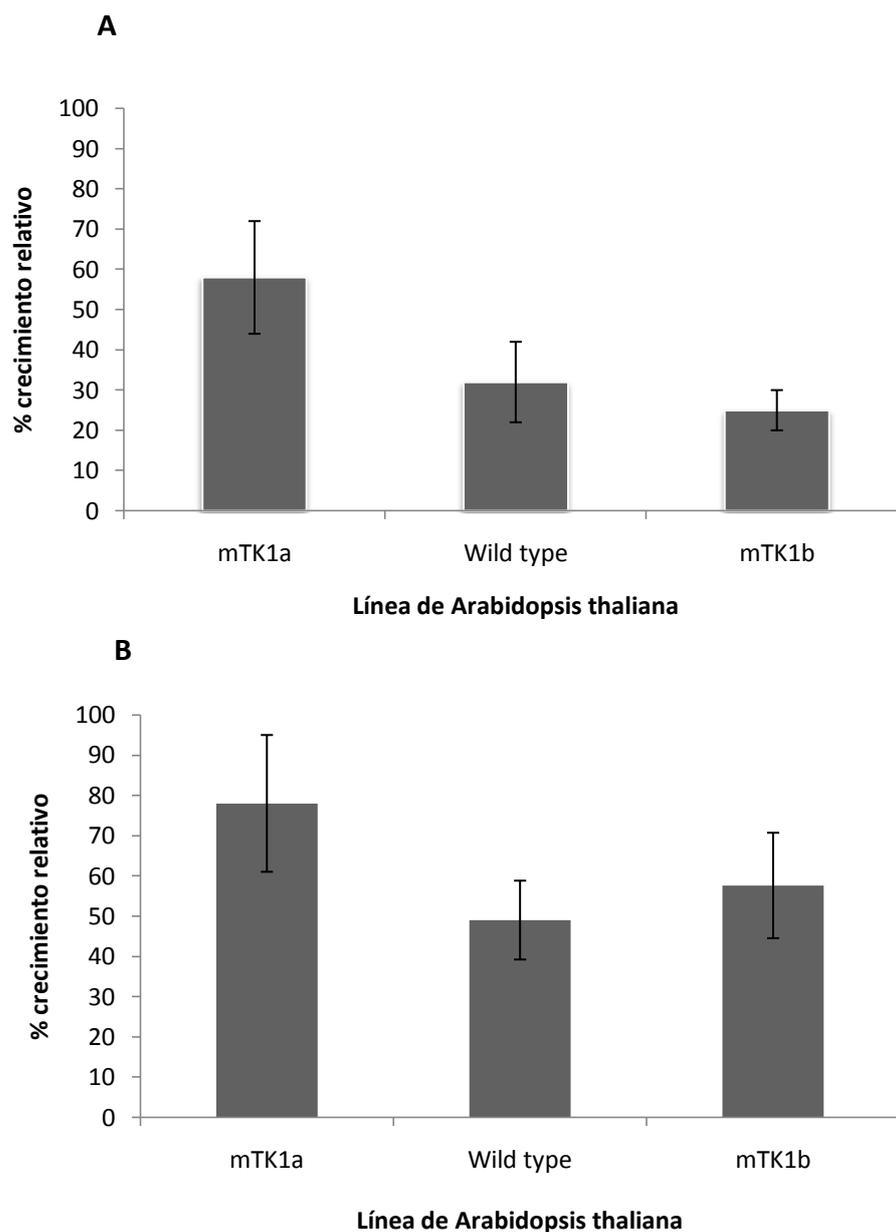


Figura 20. Efecto de la irradiación con UV-C en el crecimiento de la raíz primaria. A plántulas irradiadas y luego incubadas en condiciones de oscuridad. B. plántulas irradiadas e incubadas en condiciones estándar (8h luz/16h oscuridad). Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar ($n=18-24$). Los datos de las mutantes se compararon con los de la silvestre mediante la prueba estadística t-student; mTK1a presentó valores $P \leq 0.05$ lo que indica una diferencia significativa con los valores de la wt. Mientras que los grupos mTK1b y wt no presentan diferencia significativa. Todos estos experimentos se realizaron por triplicado.

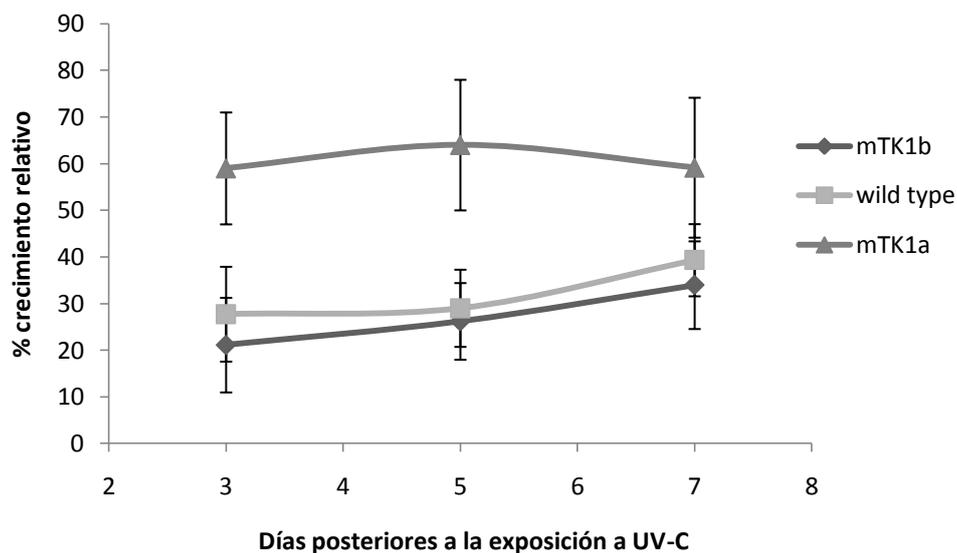


Figura 21. Taza relativa de crecimiento de la raíz después de la irradiación con UV-C. Las plántulas se irradiaron, se incubaron 3 días en oscuridad y se pasaron a condiciones estándar de crecimiento, se midió el nuevo crecimiento al quinto y séptimo día después de la exposición a UV-C.

4.3 Efecto en el meristemo apical de raíz

Se conoce que entre mayor sea el número de células que se dividen en la zona del meristemo apical de la raíz mayor es la longitud de ésta. Con el objetivo de determinar si la disminución del crecimiento de la raíz por la irradiación con UV-C que se observó está relacionada con daño en esta zona se siguieron 2 estrategias para evaluar dicho efecto. En la primera se determinó la longitud de la zona meristemática mediante una tinción con lugol de la raíz primaria de las plántulas. Los datos se reportan como longitud relativa de la zona del meristemo apical que se obtuvo comparando la longitud de meristemo de las raíces irradiadas con la longitud de las raíces del mismo genotipo sin irradiar. En la figura 22A se muestran las imágenes representativas del ápice de una raíz control y otra irradiada de cada línea, en la cual se puede observar que en la longitud del meristemo de mTK1a control y tratada no se aprecia diferencia en cambio, las raíces de mTK1b y wt irradiadas presentan un acortamiento considerable en su longitud. Los datos cuantitativos se muestran en la figura 22B en la que se observa que la disminución de la zona del meristemo para mTK1a es de solamente 10%, mientras que para las otras dos líneas es mayor al 40%.

La segunda estrategia para seguir evaluando el daño en esta zona fue mediante el empleo de la microscopía confocal de raíces teñidas con yoduro de propidio. Esta técnica permite observar la estructura de las diferentes capas de células que se encuentran en esta región a detalle y la extensión de dicha zona. En la figura 23 se presentan imágenes representativas de la microscopía confocal de las raíces teñidas con yoduro de propidio sin irradiar e irradiadas de las 3 líneas en estudio. Asimismo se aprecia que el número de células y la longitud de la zona del meristemo de mTK1a no disminuyen en comparación a su control. Mientras que en las raíces irradiadas de la línea mutante mTK1b y de la silvestre disminuye su zona del meristematica dramáticamente, por lo que se alcanza a ver la zona de diferenciación en las imágenes mostradas.

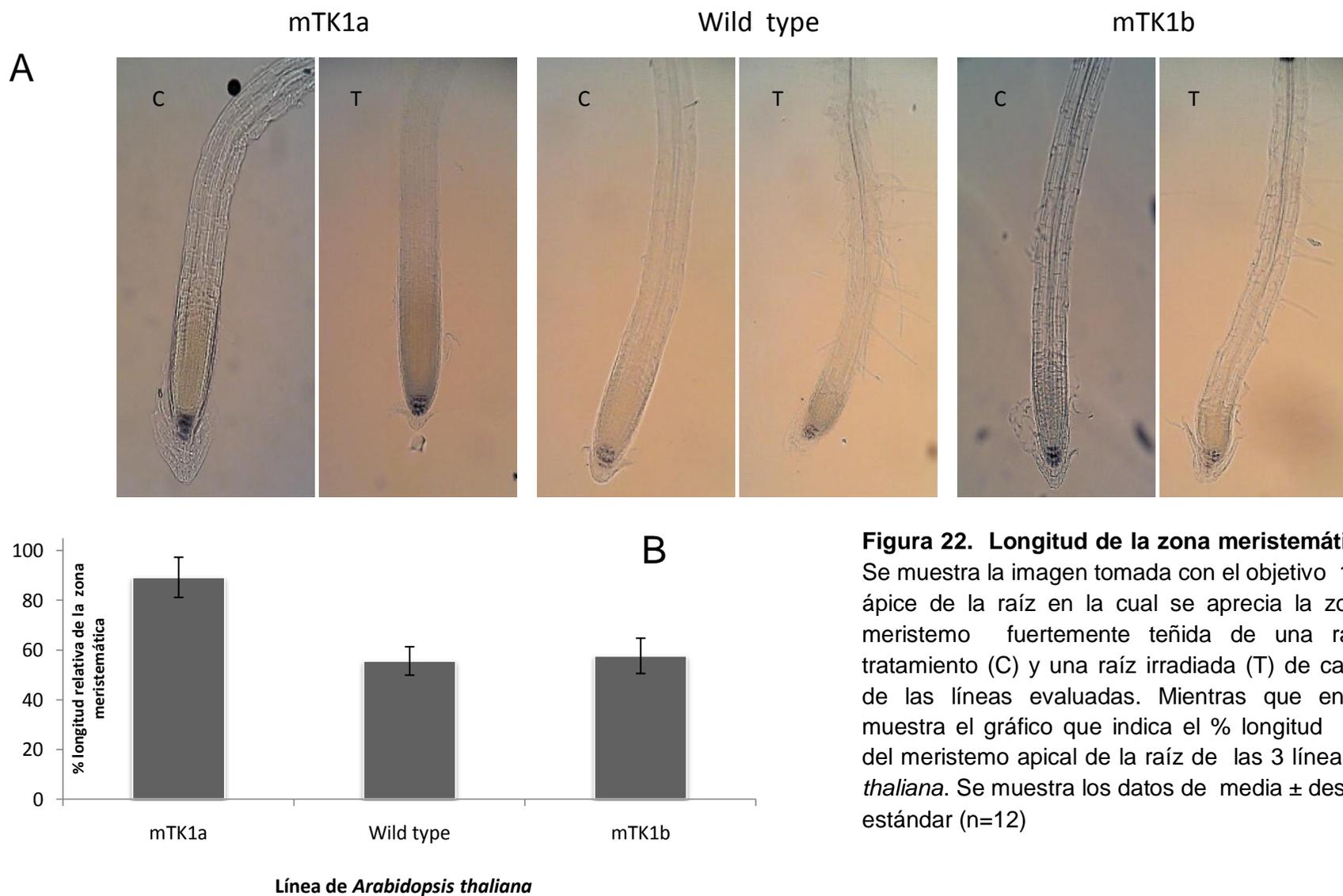


Figura 22. Longitud de la zona meristemática. A. Se muestra la imagen tomada con el objetivo 10X del ápice de la raíz en la cual se aprecia la zona del meristemo fuertemente teñida de una raíz sin tratamiento (C) y una raíz irradiada (T) de cada una de las líneas evaluadas. Mientras que en B se muestra el gráfico que indica el % longitud relativa del meristemo apical de la raíz de las 3 líneas de *A. thaliana*. Se muestra los datos de media \pm desviación estándar (n=12)

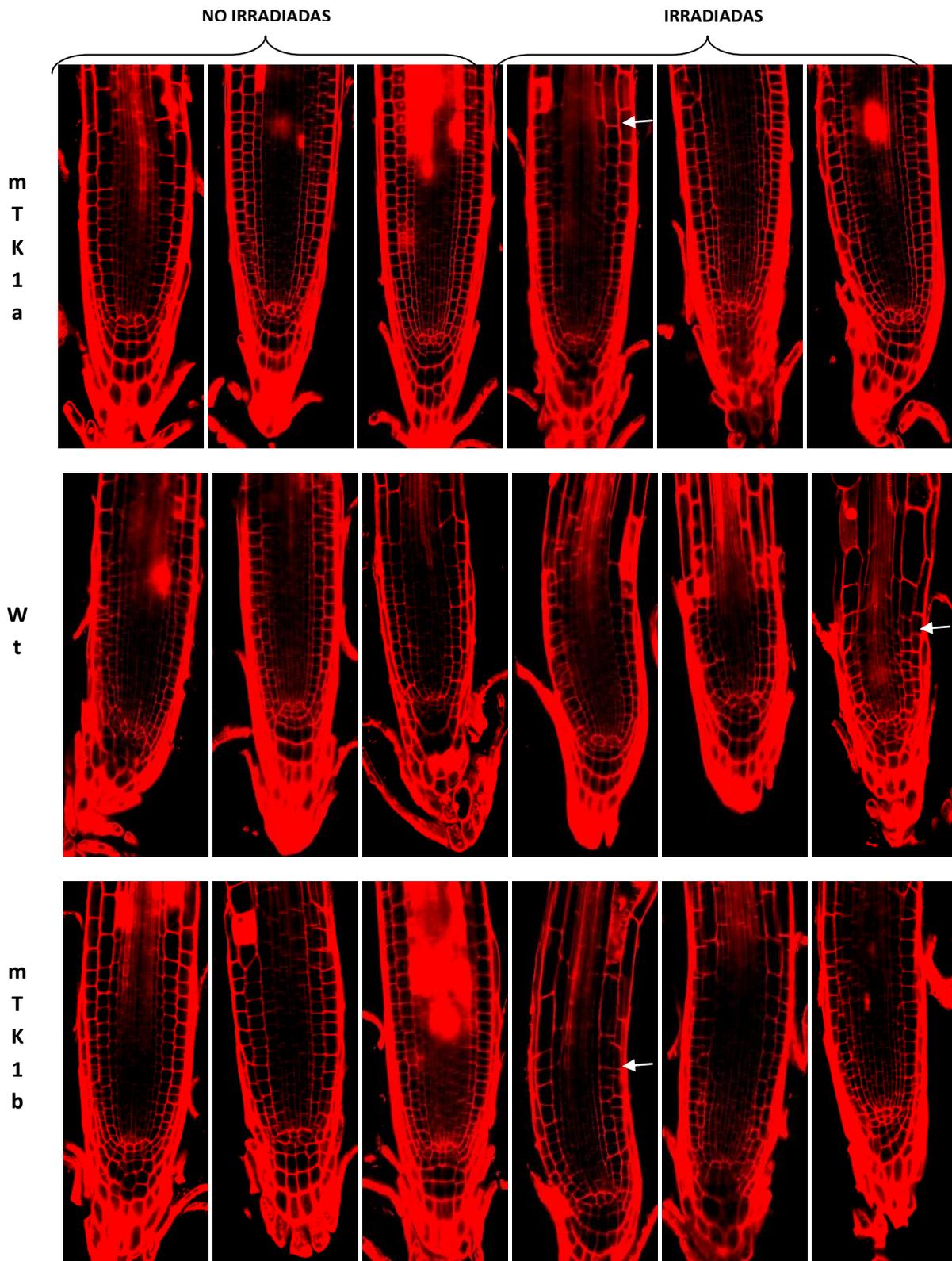


Figura 23- Microscopía confocal de ápices de raíces teñidas con yoduro de propidio. Se muestran tanto raíces controles como irradiados con UV-C de las líneas mTK1a, mTK1b y wild type. Estas imágenes son representativas de 8 raíces en cada caso (las imágenes mostradas se tomaron en el objetivo 10X). Las flechas señalan donde comienza la zona de diferenciación de la raíz.

Otro efecto que se puede observar a causa de la irradiación UV en la zona del meristemo de la raíz es la estructura de las capas de células que se encuentran abajo del centro quiescente (CQ). Típicamente hay 5 filas de células que van de la punta de la raíz hasta el CQ, y estas filas se ven claramente delimitadas en las raíces sin irradiar mTK1a y wt. En contraste, en raíces irradiadas de mTK1b y wt se observaron numerosas células por encima de la fila 5, donde normalmente hay solo una capa de células quiescentes. Mientras que en raíces mTK1b sin irradiar no se delimitan claramente las 5 filas (figura 24).

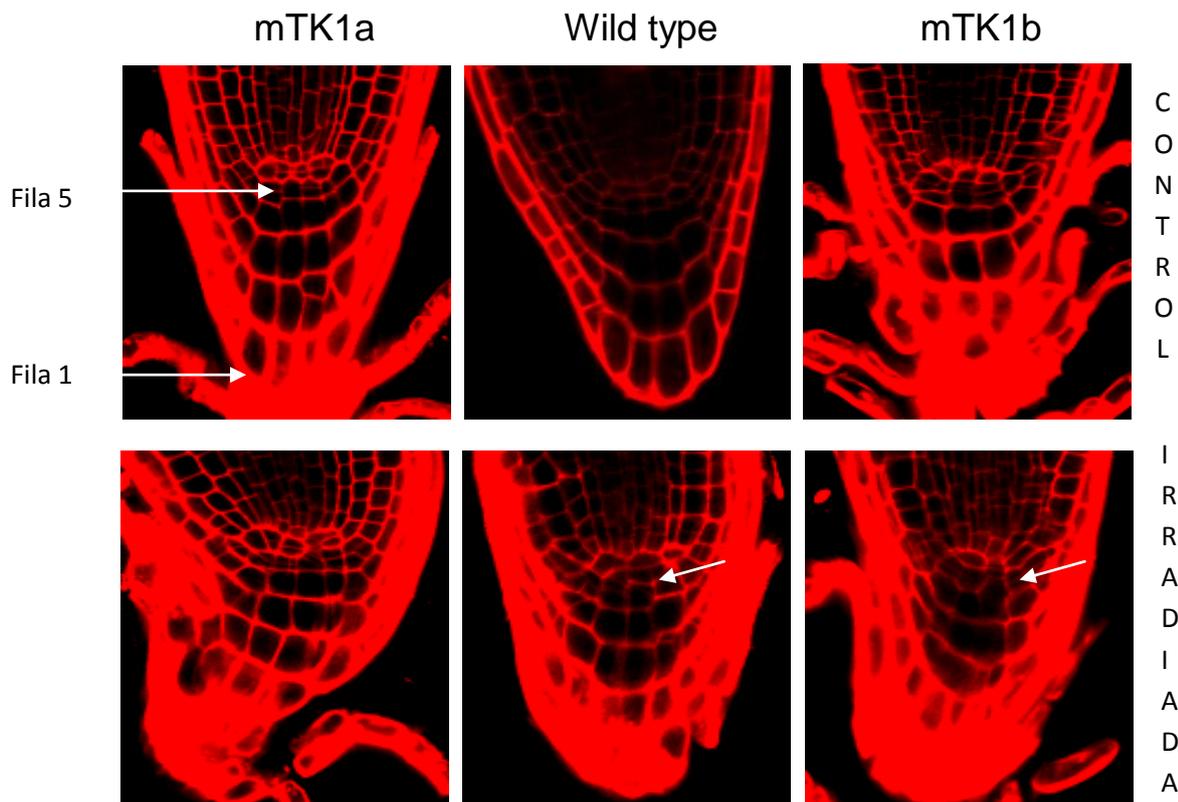


Figura 24. Alteración en la organización estructural del nicho de las células del centro quiescente. La flecha indica la fila 1 o 5 de células según sea el caso. Además que en las imágenes de la parte inferior señalan el número de células extra en esta zona (las imágenes mostradas se tomaron en el objetivo de 40X).

4.4 Ensayo de sensibilidad en plantas de 21 días

Plantas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas mTK1a, mTK1b y silvestre de 21 días se irradiaron durante 5 minutos con luz UV-C (254nm) para evaluar su sensibilidad a este agente genotóxico, la cual se determinó por la clorosis y muerte del tejido que se presentó.

En la primera parte de este experimento se determinó el papel de los mecanismos de reparación de NER y la participación de la TK1 en ellos, ya que al no permitir el paso de la luz la fotoreactivación no puede participar en la reparación del daño inducido, así que éste es reparado por los mecanismos de escisión de nucleótidos. Como se observa en la figura 25A las plántulas mTK1b son las que presentan mayor necrosis tisular y daño en general, seguida por las plantas wt y por último la mTK1a, aunque la diferencia que presentan estas últimas no es grande. Sin embargo el número de plantas sobrevivientes fue mayor para la mTK1a. Por otra parte se observó el papel que tiene la fotoreactivación en tejidos verdes; este mecanismo tiene un papel muy importante en la reparación en este tipo de tejidos, como se aprecia en la figura 25B, ya que entre las 3 líneas no se observaron fenotipos diferentes.

Cabe mencionar que durante la estandarización del tiempo de irradiación y la edad de las plantas para poder evaluar el posible efecto se observaron cosas interesantes. Se trabajó primeramente con plantas de 28 días las cuales fueron irradiadas por 15 min, todas las plantas irradiadas de la línea wt y de la mTK1b murieron bajo estas condiciones y solamente sobrevivieron 3 de 6 plantas de la línea mTK1a de las cuales solo una creció hasta la senescencia. También se probaron 10 min de irradiación en plantas de esta misma edad, en este caso sobrevivieron plántulas de las 3 líneas, sin embargo, las plantas mTK1b no llegaron a la senescencia, en cambio la mitad de las plantas mTK1a se recuperaron y lograron crecer hasta la madurez (imágenes no mostradas). En cuanto a las wt algunas también llegaron hasta esta etapa de desarrollo pero en menor proporción que las mTK1a. Sin embargo se decidió disminuir la edad de las plantas y el tiempo de irradiación para que no presentaran daño tan grave y sobrevivieran un mayor número para observar su fenotipo después del tratamiento.

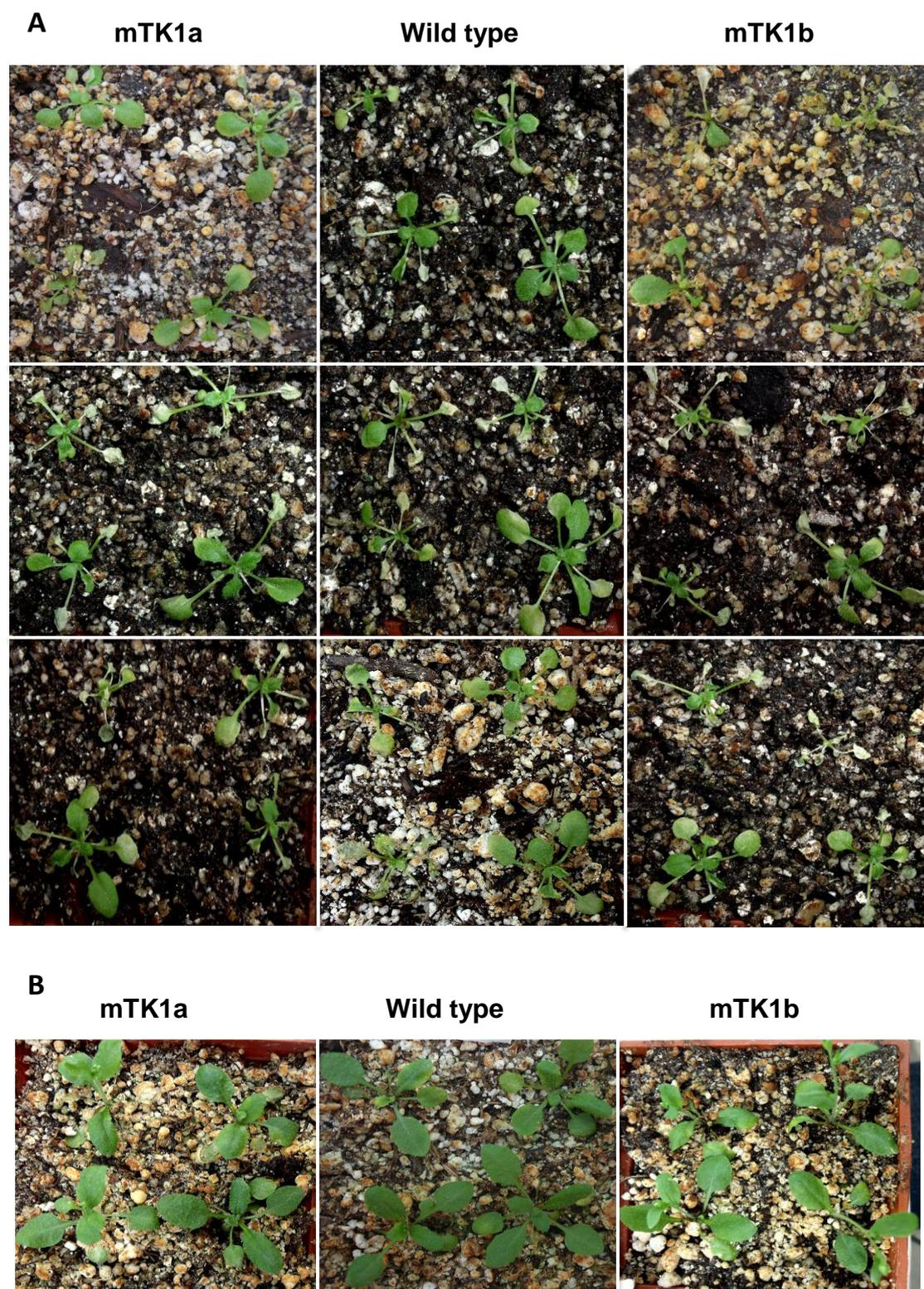


Figura 25. Fenotipos de las líneas wild type, mTK1a y mTK1b después de la irradiación con UV-C. A. plántulas de 21 días se irradiaron y se colocaron en oscuridad durante 3 días, posteriormente se transfirieron a condiciones de luz continua durante 4 días cuando se tomaron las fotografías. B. plántulas irradiadas y colocadas en condiciones de luz continúa por 7 días. Las fotos mostradas son representativas de un total de 16 plántulas para cada grupo.

5. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK en respuesta a UV-C

Los niveles de transcrito de los genes TK1a y TK1b, se cuantificaron mediante la técnica de RT-PCR con el propósito de conocer sus niveles relativos y el patrón de inducción en respuesta al tratamiento con radiación UV-C. Esta evaluación se hizo en plántulas de 7 días y en plantas adultas de 2 meses.

El gen de la adenina fosforribosil transferasa 1 (AtAPT1), el cual participa en la ruta de salvamento de adenina se utilizó como control de cargado ya que sus niveles de transcrito no se ven afectados por el tratamiento empleado. Esto se consultó en la base de datos del Atlas de expresión de *Arabidopsis* (www.weigelworld.org/resources), y se corroboró experimentalmente. Para estimar la cantidad de RNA total colocado en las reacciones de retrotranscriptasa se utilizó la banda del RNA ribosomal 28S teñido en geles de agarosa.

5.1 Cuantificación de los niveles de transcrito TK1a de plántulas de 7 días de las líneas de *Arabidopsis* wt y mTK1a

Se determinaron los niveles de transcrito del gen TK1a en plántulas silvestres y mTK1a a las 0h, 3h, 6h y 14h post-irradiación. Después de la irradiación se cubrieron las plántulas de la luz hasta la toma de la muestra.

En la figura 26 se observa que el nivel de RNAm del gen TK1a en el tiempo cero fue aproximadamente 25% más alto en las plántulas mutantes que en la línea silvestre. Al irradiar con luz UV aumentaron los niveles del RNAm desde las 3 h y se observó un incremento de éste de alrededor del 2.5 veces a las 14h post-irradiación comparándolo con los niveles de transcrito sin irradiar, esto para la línea silvestre. Este patrón de acumulación fue similar para ambas líneas pero en general en la línea mTK1a se observó mayor cantidad de transcrito en todos los tiempos evaluados que en la línea silvestre. La densitometría de las muestras se normalizó con la intensidad de su respectivo control de cargado para cada muestra.

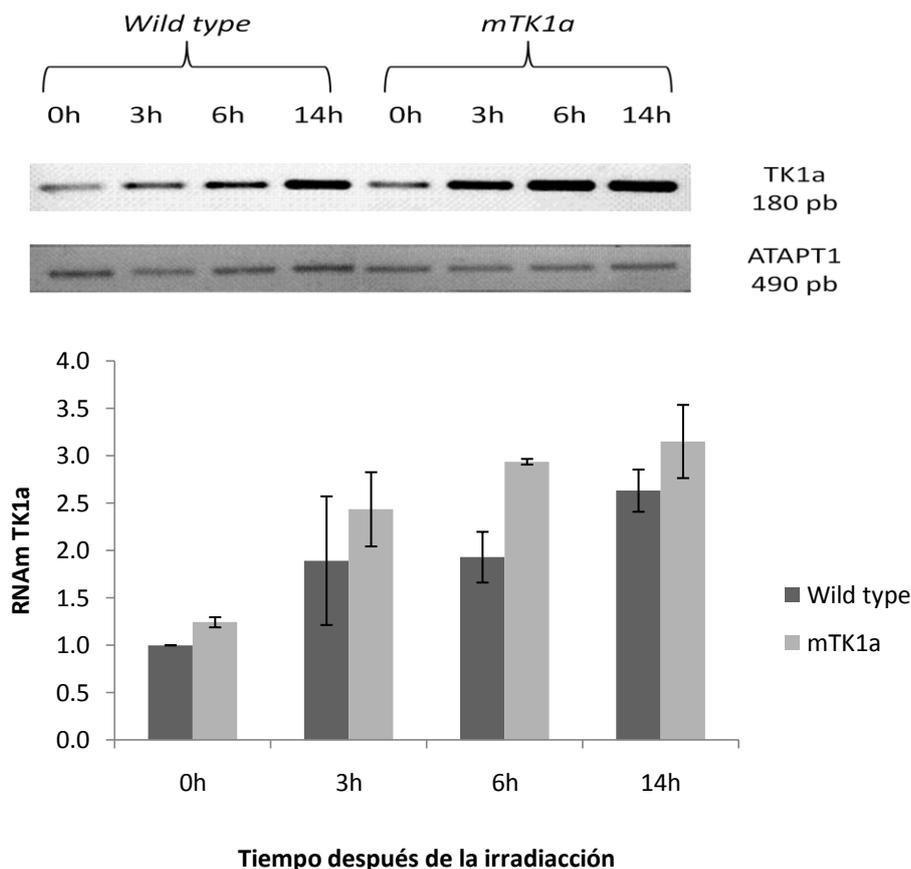


Figura 26. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm del gen TK1a en plántulas de 7 días, tanto en la línea silvestre como en mTK1a. Los datos están expresados como la media relativa de la intensidad de la banda, la cual se obtuvo normalizando los valores con la intensidad de la banda del control de cargado AtAPT1 y tomando como la unidad de expresión el nivel de transcrito del tiempo cero de la línea silvestre. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de dos experimentos ($n = 2$).

5.2 Cuantificación de los niveles de transcrito TK1b de plántulas de 7 días de las líneas de *Arabidopsis* wt y mTK1b

Como ya se había descrito en la figura 18, la línea mTK1b presenta una disminución en el nivel de transcrito de alrededor del 40% con respecto a la línea silvestre y esto se corroboró también en este trabajo (Fig. 27). Una diferencia relevante entre los dos genes fue su patrón de expresión ya que el gen AtTK1b no mostró cambios en los niveles de transcrito después de irradiar con UV-C (figura 27). En el duplicado del ensayo no se logró la amplificación del transcrito por lo que solo se reporta el obtenido en el primer experimento. Cabe mencionar que los niveles de transcrito para el gen TK1b son alrededor de 10 veces menor que el del gen TK1a cuando se trata de plántulas pequeñas

en las que una gran parte de la planta es raíz, en cambio en hojas de planta adulta los niveles de transcritos de ambos genes no se encuentran tan alejados (Atlas de expresión de *Arabidopsis*).

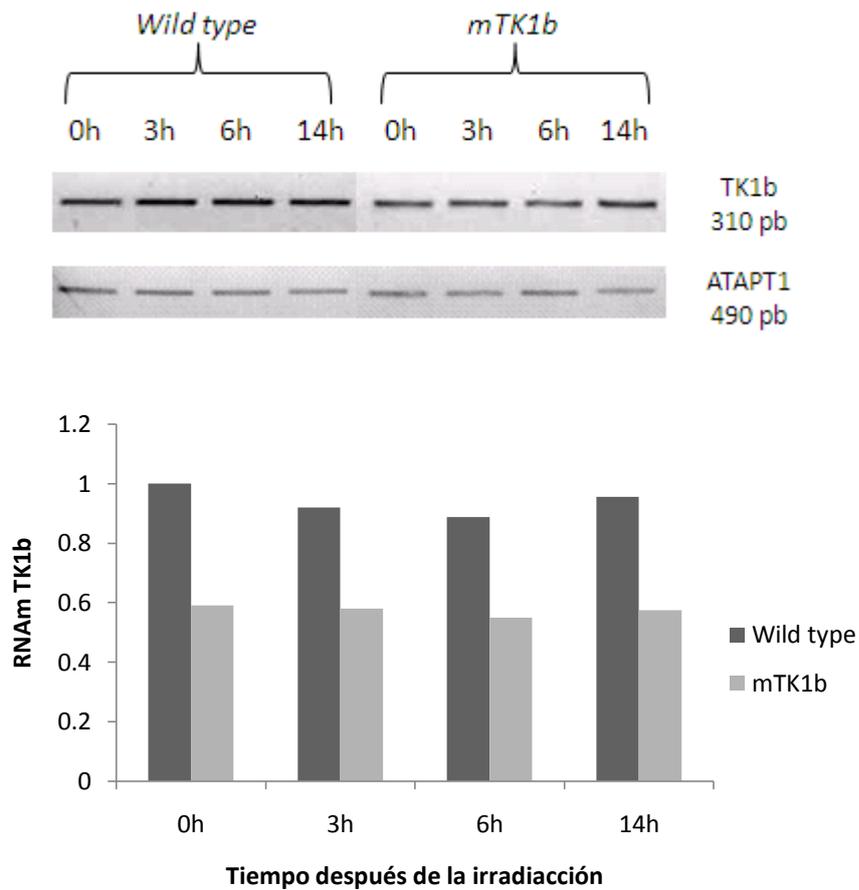


Figura 27. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm del gen TK1b en plántulas de 7 días, tanto en la línea silvestre como en mTK1b.

También se cuantificaron los niveles de transcrito del gen TK1a en la línea mTK1b y los niveles de expresión del gen TK1b en la mutante mTK1a. Los patrones de expresión de ambos genes fueron similares a los de la línea silvestre (datos no mostrados).

5.3 Niveles de los transcritos TK1a y TK1b en plantas wt de 2 meses

También se estudiaron los niveles de los transcritos de TK1a y TK1b en hojas en respuesta a irradiación de luz ultravioleta de plantas adultas ya que representa un tejido diferenciado. Como se observa en la figura 28A el nivel de RNAm del gen TK1a incrementó casi 3.5 veces que el control 3h post-irradiación y se mantuvieron niveles altos hasta las 12 h post irradiación que fue el último tiempo que se evaluó. En cambio, los niveles del RNAm de la TK1b no mostraron variación en los mismos tiempos post-irradiación que se estudiaron (figura 28B).

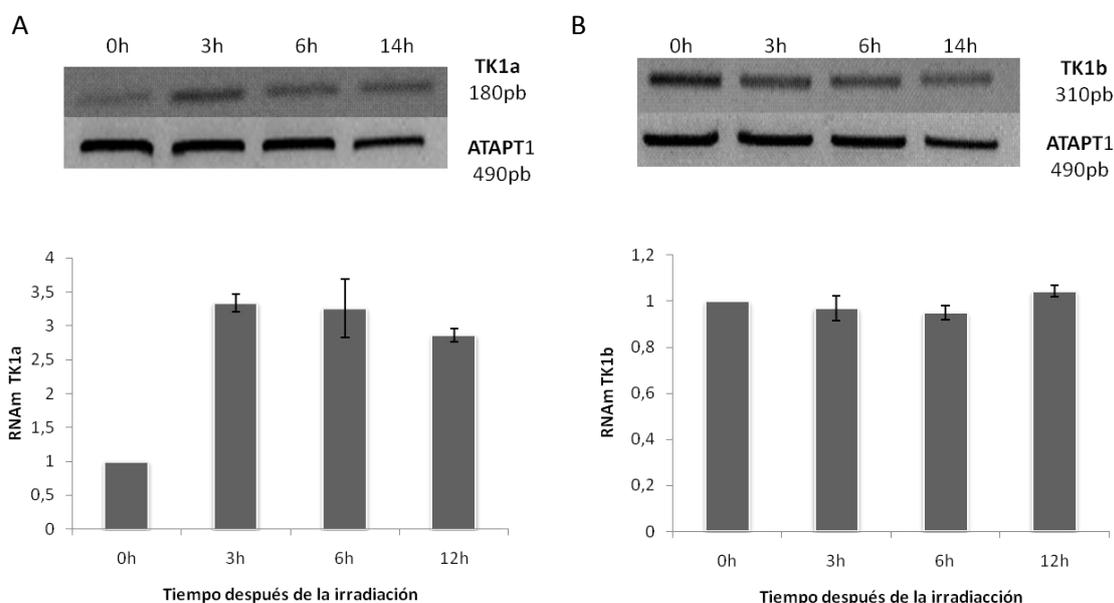


Figura 28. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de RNAm de los genes TK1a y TK1b en hojas de roseta de plantas wt de *A. thaliana* de dos meses. A. Niveles del transcrito TK1a. B. Niveles del transcrito TK1b. Los datos están expresados como la media relativa de la intensidad de la banda, la cual se obtuvo normalizando los valores con la intensidad de la banda del control de cargado AtAPT1. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar ($n = 2$).

DISCUSIÓN

1. Análisis *in silico* de los genes de la timidina cinasa de *Arabidopsis thaliana* y de sus regiones promotoras.

Se conoce que la planta modelo *A. thaliana* contiene dos secuencias para genes putativos de la timidina cinasa 1, estos se han denominado AtTK1a y AtTK1b, estudios de microarreglos reportados en el Atlas de expresión de *Arabidopsis* han comprobado que ambos genes se transcriben durante todos los estadios de desarrollo de la planta como se muestra en la figura 30 (Apéndice 2.II; Schmid *et al.*, 2005).

La estructura de los genes AtTK1a y AtTK1b difiere significativamente pues mientras el gen TK1b está formado por un exón, el parólogo TK1a presenta 4 exones y 3 intrones (figura 12). Esta falta de conservación en la estructura del gen sugiere orígenes distintos para ambos genes, o bien que la duplicación del gen precedió al evento del procesamiento de intrones. Dado que las proteínas tienen un 53% de identidad (figura 13), es muy posible que estos genes sí tengan un origen común. Alternativamente, también se puede hipotetizar que ocurrieron inserción de intrones en el gen AtTK1a o bien eliminación de éstos en el gen AtTK1b después de la duplicación (Lechary *et al.*, 2003, Betts *et al.*, 2001). Otras diferencias se detectaron en la longitud de las regiones 3'UTR y 5'UTR que podría tener un significado biológico ya que estas regiones no traducidas pudieran estar implicadas en la regulación de la expresión como se ha demostrado para otros genes de plantas (Gallie, 1993). Todas estas diferencias nos sugirieron que estos genes pueden tener una función y patrón de expresión diferencial. En general las plantas contienen más múltiplos de copias de genes de reparación de DNA que en animales; sería posible que esta tendencia permita a estos organismos incrementar su tolerancia a luz UV. Sin embargo en ocasiones los múltiplos de genes resultan no ser una variación alélica, de hecho, hay datos que indican que cada uno de los tres homólogos de RPA (proteína de replicación A) de *Arabidopsis* tiene una función diferente (Kimura & Sakaguchi., 2006). Aunque también hay genes parálogos en *Arabidopsis* como los AtXPB, los cuales presentan una redundancia parcial ya

que al silenciarse el gen AtXPB1 las plantas crecen normalmente, lo que indicaría que el gen AtXPB2 puede suplementar la función del otro gen, sin embargo mutantes de cada gen presentan susceptibilidad a diferentes agentes genotóxicos, lo que indicaría que cada gen participa en la reparación de diferentes lesiones al DNA (Hays, 2002). Por estas diferencias existentes en las funciones de proteínas parálogas, resulta importante determinar si los genes de la TK1 son redundantes o tienen una función distinta.

Otra diferencia importante de los dos genes es que la proteína TK1b presenta una potencial secuencia de tránsito al cloroplasto en su extremo amino. En el gen de la timidina cinasa de maíz también se encontró que contiene una secuencia potencial de transporte al cloroplasto (Suzuri, 2006). Se han obtenidos datos de enzimas participantes en la vía de salvamento de pirimidinas que han indicado que las reacciones de esta vía pueden ocurrir tanto en el citosol como en los plastidios (Zrenner *et al.*, 2006). Por esto se ha postulado que la TK1a se encuentra en el citosol y que la TK1b está localizada en el cloroplasto.

Conociendo la importancia de los mecanismos de regulación transcripcional en la expresión y en la subsecuente actividad de la timidina cinasa en mamíferos (Mikulits *et al.*, 1996 Rotheneder *et al.*, 1999 Sorensen *et al.*, 1999) se hizo también un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los dos genes de la TK1 de *Arabidopsis*. Al hacer un alineamiento entre estas dos secuencias, no se encontró similitud significativa entre ellas. Esto sugiere que hay alta variación en los mecanismos de regulación transcripcional de este gen (Sorensen *et al.*, 1999).

Usando la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1999) se encontró en el promotor del gen TK1a el elemento de reconocimiento para el factor de transcripción E2F el cual se encuentra en genes de *Arabidopsis* que están involucrados en la replicación del DNA, la regulación del ciclo celular, transcripción, respuesta de defensa y señalización (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). Este elemento de respuesta parece ser funcional pues en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el factor transcripcional E2F la transcripción de la TK1a se

incrementa alrededor de 15 veces con respecto a las plantas control (Vandepoele et al., 2005). Este elemento de respuesta no se encontró en la región promotora de la TK1b y tampoco se reporta que se induzcan sus niveles de transcripción por la sobreexpresión de E2F.

En general el tipo de elementos regulatorios identificados fue muy distinto en las dos secuencias promotoras analizadas con esta base de datos, lo que sugiere que estos dos genes de la TK1 se regulan de manera distinta. Con el propósito de poder estudiar la actividad de las regiones promotoras de los dos genes de la TK1 de *Arabidopsis* se aislaron las secuencias que se habían seleccionado como potenciales promotoras para clonarse frente al gen reportero β -glucuronidasa con las cuales se transformaron plantas de *Arabidopsis*, las semillas transformantes que se obtengan nos permitirán conocer los patrones de expresión de los genes de la TK1 de una manera indirecta mediante la expresión del gen reportero β -glucuronidasa debido a que la expresión de ésta proteína estará regulada por las regiones promotoras de los genes de la timidina cinasa. Así conoceremos la expresión de las dos TK1 en diferentes tejidos durante el desarrollo y en respuesta a estrés genotóxico, lo que nos permitirá obtener mayor información sobre la función de estos genes en plantas.

2. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK1 de *A. thaliana* en respuesta a luz UV-C

La gran mayoría de los estudios realizados para elucidar la función de la timidina cinasa en eucariontes superiores se han obtenido de líneas celulares, por lo que resulta de gran relevancia el estudio en un organismo completo. Es por esto que las mutantes de la TK1 de *Arabidopsis thaliana* resultan ser una poderosa herramienta para lograr este propósito. El único estudio de este tipo en mamíferos es el de ratones Knockout (-/-) de la TK, donde se demostró que la enzima es indispensable durante el desarrollo de los animales (Dobrovolsky et al., 2003). En trabajos previos de laboratorio se encontró que las plantas de las dos líneas mutantes (figura 18) no presentaron diferencias fenotípicas durante el desarrollo con respecto a las plantas silvestres bajo condiciones estándar es de crecimiento. Aún cuando las mutantes de la TK1 no mostraron

efectos en el desarrollo sí presentaron diferencias en sus niveles de transcrito ya que la línea mTK1a resultó ser una línea de sobreexpresión (Nájera-Martínez., 2010), esto se puede explicar debido a que la inserción de DNA-T se encuentra en la región promotora por lo que muy probablemente eliminó una secuencia que participa en la regulación negativa de este gen. Por otra parte la mTK1b contiene la inserción de DNA-T cerca del codón de término por lo que se esperaba obtener un RNAm truncado, los niveles de transcrito de esta mutante disminuyeron alrededor del 40% en comparación a la línea silvestre. Estas diferencias en los niveles de transcrito nos permitieron evaluar la participación de estos genes en la reparación al daño a DNA inducido por luz UV. Los principales productos del daño causado por luz UV en el DNA son dímeros de pirimidina, los cuales se reparan principalmente por dos mecanismos, la fotoreactivación la cual es dependiente de la luz y la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER, Kimura & Sakaguchi., 2006). Con el propósito de conocer la posible participación de la timidina cinasa en el mecanismo de NER, se irradiaron plántulas con luz UV y se incubaron en oscuridad para evitar la fotoreactivación. Se observó que la irradiación con luz UV-C produjo un efecto de inhibición en el crecimiento de la raíz, el cual resultó ser dosis-dependiente en las tres líneas (figura 19). Donde se apreció una inhibición considerable en cuanto a la longitud relativa de la raíz fue en el tiempo de irradiación probado de 15 minutos, por lo que los experimentos restantes en plántulas se realizaron con este tiempo de exposición. Los resultados mostraron (figuras 19 y 20A) que la línea de sobreexpresión de la TK1a (mTK1a) presenta una inhibición menor en el crecimiento de la raíz, lo que sugiere que esta enzima al estar participando en la síntesis de DNA debe tener un papel fundamental en los mecanismos de reparación de NER. Se tiene reportado que la reparación por escisión de nucleótidos depende de la síntesis *de novo* de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) que funcionan como precursores monoméricos del DNA. Esta dependencia se ha observado porque mutantes de *A. thaliana* deficientes en niveles de ribonucleótido reductasa son más susceptibles a agentes genotóxicos que las plantas silvestres (Wang & Liu., 2006; Roa *et al.*, 2009). Esto junto con nuestros resultados sugiere que tanto la vía *de novo* como la vía de salvamento

participan aportando nucleótidos para la reparación del daño a DNA. Por otra parte en la mutante de la TK1b (mTK1b), aunque presenta una discreta diferencia en cuanto a inhibición de la raíz con respecto a la línea silvestre, ésta no resultó ser significativa. Esta mutante presenta niveles menores de transcrito del gen TK1b, muy probablemente la TK1a que permanece sin cambios puede compensar la actividad de la TK1b, por lo que no presenta una diferencia notable en el crecimiento de la raíz comparándola con el genotipo silvestre.

Aún cuando se permitió la fotoreactivación (figura 20B), la mutante de sobreexpresión de la TK1a presenta mayor longitud en la raíz que las otras dos líneas. Este ensayo permitió constatar que no sólo la vía de fotoreactivación participa en la reparación del daño a DNA en presencia de luz sino que la vía de NER parece tener una contribución importante en la reparación. Estos resultados sugieren que las dos vías trabajan conjuntamente, como ya se ha demostrado con plantas que sobreexpresan proteínas participantes en alguno de los pasos de NER (Moliner *et al.*, 2008; Al Khateeb & Schroeder., 2009) aunque la proporción con la que contribuya cada una dependerá del tipo de tejido, ya que se sabe que en tejidos meristemáticos participan mayoritariamente los mecanismos NER, mientras que en tejidos no proliferativos es la fotoreactivación (Kimura & Sakaguchi., 2006).

La tasa de crecimiento de la raíz de las líneas wt y mTK1b sólo presentaron un moderado incremento en el crecimiento relativo de la raíz después de 4 días de haber cambiado las condiciones de oscuridad a luz en la incubación (figura 21). Sin embargo, al resembrar estas plántulas en tierra y teniéndolas en condiciones estándar de crecimiento, las plantas de las tres líneas crecieron con un fenotipo normal hasta la senescencia, aún cuando el crecimiento de la raíz primaria presentaba una inhibición de alrededor del 65% en las líneas mTK1b y wt antes de la resiembra. Esta recuperación en el desarrollo general de las plantas muy probablemente se deba a que estos organismos son capaces de detener el ciclo celular del meristemo dañado y redireccionar el crecimiento de nuevos meristemas (Cools & De Veylder., 2009), como lo señalan algunos reportes en los cuales plantas sin puntos de regulación

(checkpoint) funcionales son tratadas con compuestos inhibidores de la replicación del DNA provocando que la raíz primaria detenga su crecimiento y el de raíces laterales sea inducido (Ricaud *et al.*, 2007). Posiblemente en nuestro caso la inducción del crecimiento de raíces secundarias permitió eventualmente el escape del daño inducido en las 3 líneas de *Arabidopsis* evaluadas por lo que lograron desarrollarse hasta la senescencia.

Debido ha que hay publicaciones que señalan que la inhibición en el crecimiento de la raíz por exposición a luz UV depende del número de células que se encuentren en división en el meristemo del ápice de este tejido (Jiang & Feldman., 2005; Curtis & Hays., 2007; Furukawa *et al.*,2010); se estudió el efecto del daño genotóxico en esta zona de la raíz específicamente, con el objetivo de establecer de qué manera participa la TK1a en la tolerancia que se observó en la longitud de la raíz de la mutante de sobreexpresión de esta enzima. Nuestros resultados muestran claramente cómo en la línea silvestre y la mTK1b esta región de la zona meristemática se reduce dramáticamente (figura 22), así como el número de células que la conforman (figura 23), mientras que las raíces de la línea mTK1a sólo decrecen su longitud alrededor del 10% en la zona del meristemo con respecto a su control y el número de células parece no disminuir. Se ha postulado que los meristemas de raíz y brote presentan una respuesta especializada al daño ya que contienen un enriquecimiento en la expresión de genes de reparación de DNA como se determinó en un perfil de transcripción (Yadav *et al.*, 2009). Con base en esta evidencia podemos decir que la timidina cinasa (TK1a) tiene un papel fundamental en los procesos de reparación en la zona meristemática de la raíz. La participación de la TK1 en respuesta a UV también se ha observado en células de glioma de rata pues la ausencia de esta enzima provoca hipersensibilidad a la radiación UV (Al-Nabulsi *et al.*, 1994).

Aunque en las raíces de la línea mTK1a irradiadas no se presentó una diferencia amplia respecto a sus controles en la longitud del meristemo y el número de células, sí se observó inhibición del 40% en la elongación de la raíz primaria. Esto se puede explicar debido a que el daño a DNA provocado desencadena el arresto del ciclo celular en los puntos de regulación por lo que

la división celular se detiene hasta que el daño sea reparado lo que ocasionaría el retraso del crecimiento. En células de mamífero el arresto del ciclo celular en el cual participa la TK1 ocurre en la transición G1/S (Chen *et al.*, 2010). El hecho de contener niveles elevados de TK1a le permitiría realizar una reparación más eficiente del DNA dañado facilitando que las células se liberen del arresto del ciclo celular y el tejido pueda continuar su desarrollo y división.

Por otra parte la línea mTK1b no presentó diferencia con respecto a la silvestre, pues en ambas la zona del meristemo se redujo notablemente. Las puntas de raíces mostraron pelos radicales (figura 22A), que es una característica de las células de la raíz que se encuentran en la zona de diferenciación (figura 6). Este mismo efecto se ha observado en líneas de *Arabidopsis* que tienen una mutación en los genes de las DNA polimerasas η y ζ , que son enzimas que participan en la reparación del DNA, cuando se irradian con bajas intensidades de UV-B (Curtis & Hays., 2007). En nuestros experimentos, es probable que la detención en el progreso del ciclo celular por la exposición a luz UV-C causó la eliminación de la zona de las células en elongación de la raíz. Además, en los meristemos radiculares de las plantas mTK1b y la silvestre se observó una desorganización de las capas de células que se encuentran abajo del centro quiescente (figura 24). Este mismo fenotipo se observa en las mutantes de las DNA polimerasas mencionadas (Curtis & Hays., 2007). Las células del centro quiescente responden al daño genotóxico realizando un mayor número de divisiones para tratar de reemplazar a las células dañadas (Jiang & Feldman., 2005), lo que probablemente explicaría el mayor número de células presentes en esta zona. En contraste con estos fenotipos observados, la mutante de sobreexpresión TK1a no mostró estas características.

Los resultados obtenidos de la irradiación de plántulas de 21 días para observar el efecto de la irradiación con UV en hojas (figura 25A) hacen suponer que la TK1b sí tiene una localización en cloroplasto como se ha postulado (Suzuri., 2006), ya que las plántulas mTK1b con menores niveles de transcrito de esta enzima presentaron mayor clorosis y necrosis en hojas; tal vez la deficiencia de TK1b en los cloroplastos sea la responsable de este fenotipo. Por otra parte, las plantas mTK1a presentaron menor sensibilidad a la luz UV,

de hecho un mayor número de estas crecieron hasta la senescencia, además de que la fotoreactivación es la vía que tiene mayor contribución en la reparación de dímeros de pirimidina en tejidos no proliferativos como hojas, como se corroboró en este trabajo ya que plantas de las tres líneas no presentaron diferencias fenotípicas considerables cuando se permitió la activación de las fotoliasas (figura 25B).

3. Determinación de los niveles de transcritos de los genes de la TK1 en respuesta a UV-C

En la línea celular HCT-116 de colon humano los niveles de la proteína TK1 se elevan cuando son tratadas con doxorubicina, que induce la ruptura de la doble cadena de DNA (Cheng *et al.*, 2010). Asimismo, en un estudio del perfil del transcriptoma en *Arabidopsis* se detectó que se elevan hasta 30 veces los niveles de transcrito de la TK1a después del tratamiento con los agentes genotóxicos bleomicina y mitomicina C, que causan ruptura en el DNA (Chen *et al.*, 2003). Para asociar los niveles de transcrito de la TK1a con la tolerancia a luz UV-C que presentó la mutante de sobreexpresión, se estudió el perfil de expresión de este transcrito post irradiación tanto en plántulas de la línea mutante como de la silvestre. Con este estudio se observó que los niveles del transcrito TK1a alcanzados a las 14h post-irradiación en la línea silvestre son casi los mismos niveles de transcrito que alcanza la línea de sobreexpresión desde las 3h después de la irradiación además de que se continúa con el aumento del transcrito hasta el último tiempo evaluado (figura 26). Lo que sugiere que esta rápida disponibilidad del RNAm después del estrés genotóxico en las plantas mTK1a permite una mejor respuesta en los procesos de reparación del DNA dañado.

Además la TK1a de *Arabidopsis* parece tener un comportamiento parecido en respuesta al daño a DNA en general como su proteína ortóloga de humano debido a que se ha demostrado que la TK1 de *A. thaliana* incrementa su expresión con los agentes genotóxicos: bleomicina, mitomicina y luz UV-C, aunque se requerirá evaluar otros compuestos que dañen al DNA para asegurar esto, como agentes alquilantes, radiación γ , etopósido e inhibidores de las DNA polimerasas, como se ha realizado con la TK1 de mamíferos (Al-

Nabulsi *et al.*, 1994; Wakazono *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2010). Por lo que la mutante de la TK1a de *Arabidopsis* será importante para conocer la participación de la TK1a en respuesta a estos compuestos. La inducción por estrés genotóxico refleja una alta demanda para la síntesis de DNA durante la reparación, lo que se refleja claramente en el fenotipo presentado por la mTK1a después de la irradiación, al tener mayor nivel de TK1a de alguna forma permite que la síntesis del DNA sea más rápida y por lo tanto mayor capacidad reparativa de los mecanismos NER.

Además de la determinación de los niveles de transcrito en estas condiciones, resultará importante conocer la cantidad de proteína correspondiente, así como la actividad enzimática. Esto permitirá conocer si existen otros mecanismos regulatorios a nivel post-transcripcional pues, por ejemplo, en células de mamífero mientras los niveles de transcrito se incrementan apenas tres veces en la fase S del ciclo celular con respecto a la fase G1, los niveles de la proteína se elevan hasta 15 veces (Sherley & Kelly, 1988). Este estudio se podrá realizar si los anticuerpos generados contra la TK1 de maíz (Suzuri., 2006) reconocen las isoformas de *Arabidopsis*.

De la misma manera se estudió la expresión del gen TK1b en respuesta a estrés genotóxico inducido por luz UV, tanto en plántulas de mTK1b como wt. Para este gen no hubo cambios en los niveles de transcrito después de irradiar con UV-C (figura 27). Este ensayo confirmó que los dos genes de la timidina cinasa tienen un patrón de expresión diferencial en respuesta a estrés genotóxico y posiblemente diferentes funciones. Además, los datos son consistentes con los elementos de respuesta identificados en el promotor del gen TK1a y que se comparten con otros genes de reparación del DNA (figura 15).

En un estudio del perfil del transcriptoma de *Arabidopsis* se realizó una comparación de las regiones promotoras de 7 genes que fueron regulados positivamente después del tratamiento con los mutágenos bleomicina más mitomicina, entre los que se encontró el gen TK1a y 6 genes más que participan en la reparación del DNA (RNR2, GR1, LigIV, PARP-1, PARP-2 y Rad 51). Se hallaron hexámeros de nucleótidos idénticos en ciertas regiones

de los promotores los cuales además presentaron similitudes en la posición con respecto al inicio de la traducción, por lo que ellos postularon que estos motivos podrían implicar un mecanismo similar de regulación en la expresión de estos genes, aunque las secuencias que ellos proponen no se tienen reportadas como motivos de unión para factores de transcripción (Chen *et al.*, 2003).

Estudios publicados señalan que la enzima timidina cinasa de plantas puede tener una función biológica aún en la ausencia de actividad de división celular meristemática (Ullah *et al.*, 1999; Moffatt & Ashihara., 2002; Venkatachalam *et al.*, 2010), a diferencia de los mamíferos en donde su función se ha asociado con la división celular activa. Para esto se cuantificaron los niveles de transcrito de ambos genes en tejido diferenciado para conocer su expresión antes y después de ser irradiadas (figura 28). Se encontró que los niveles de transcrito de los dos genes son mayores que en plántulas coincidiendo con lo reportado en el Atlas de expresión de *Arabidopsis* (Schmid *et al.*, 2005). Al igual que en plántulas, se observó un incremento en los niveles de transcrito de la TK1a, aunque este tejido diferenciado presentó mayor RNAm a las 3h post-irradiación y se mantuvieron constantes los niveles hasta el último tiempo evaluado, acorde con lo reportado, ya que se ha encontrado que los niveles de transcrito del gen de la TK1 de arroz son más altos en tejidos diferenciados que en tejidos meristemáticos (Ullah *et al.*, 1999). Una posible explicación que se había dado de este perfil es que la TK1 participa en el aporte de nucleótidos con fines reparativos en tejidos expuestos a radiación UV (Moffatt & Ashihara., 2002). También se ha sugerido que la regulación positiva de la expresión de este gen en tejido diferenciado puede estar involucrada en la reparación del daño a DNA ocasionado por otro tipo de estrés, debido a que en tejidos no proliferativos del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) se encontraron niveles 7 mayores del transcrito HbTK en plantas resistentes a un síndrome que afecta a las células productoras del látex debido al estrés abiótico a las que se someten (Venkatachalam *et al.*, 2010). Conociendo esto parece que una función importante de la timidina cinasa en plantas se realiza en tejidos no proliferativos contribuyendo a la síntesis de DNA en respuesta a daño genotóxico, lo que difiere con lo que se conoce en células de animales en las cuales la expresión

de la TK1 está correlacionada con la actividad del ciclo celular (Mikulits *et al.*, 1996), aunque recientemente también con la reparación del DNA dañado (Chen *et al.*, 2010).

Observando la figura 28B nos damos cuenta que al igual que en plántulas los niveles de transcrito en hoja de la TK1b en *Arabidopsis* no mostraron variación post-irradiación. Por lo tanto para conocer si se regula a la alza la transcripción de este gen, se realizó una búsqueda en el Atlas de expresión de *Arabidopsis*. Lo único que se encontró que incrementa los niveles de este transcrito es el ácido abscísico (ABA), el cual es una hormona vegetal. Esta se sintetiza en cloroplastos y un aumento de su concentración en hojas se da como respuesta a un estrés hídrico (sequía), causando el cierre de estomas para evitar la transpiración; también inhibe el crecimiento de la planta, el desarrollo de las semillas y frutos (Walton *et al.*, 1970; Finkelstein *et al.*, 1985; Zhang & Davies., 1990). Regresando al análisis realizado a la secuencia promotora de este gen en la base de datos PLACE, en la primera parte del trabajo nos dimos cuenta que esta secuencia presenta algunos motivos consenso que se encuentran en genes de plantas que responden a la deshidratación (tabla 10, Higo *et al.*, 1999). ¿Pero como podría estar regulando ABA a la expresión del gen TK1b? Se pensaría que al ser una hormona que inhibe el crecimiento tendría el mismo efecto en la síntesis de DNA, sin embargo resultados publicados sugieren que la inhibición en el crecimiento no es debido a la inhibición de la síntesis de DNA, sino que ABA tiene efecto a otros niveles (Walton *et al.*, 1970; Abe *et al.*, 2003). Adicionalmente se ha demostrado que ABA permite la síntesis temprana de DNA para reparar el daño que exista en el genoma en embriones de avena secos, además se encontró que embriones dormantes embebidos mantienen la integridad de su genoma por un reemplazo continuo pero lento de DNA y que ABA tiene un papel determinante en este proceso (Elder & Osborne., 1993). Por lo que podríamos especular que la TK1b puede ser regulada por ABA, con el propósito de permitir la síntesis de DNA para reparar los daños que pudieran surgir por estrés de sequía. Sin embargo necesitaremos realizar varios experimentos para aceptar o rechazar esta hipótesis.

Por otro lado, los brasinosteroides regulan positivamente la vía de salvamento de nucleótidos al activar la transcripción de los genes de adenosina cinasa, adenina fosforibosil transferasa y uridina cinasa que son enzimas involucradas en el reciclaje de nucleósidos de purinas y pirimidinas (Belmonte et al., 2011). La participación de esta hormona vegetal en la regulación de la expresión del gen TK1a se podrá estudiar en mutantes deficientes en la síntesis de brasinosteroides o insensibles a éstos, pues se pueden determinar los niveles de transcrito en estos genotipos, así como su respuesta a luz ultravioleta.

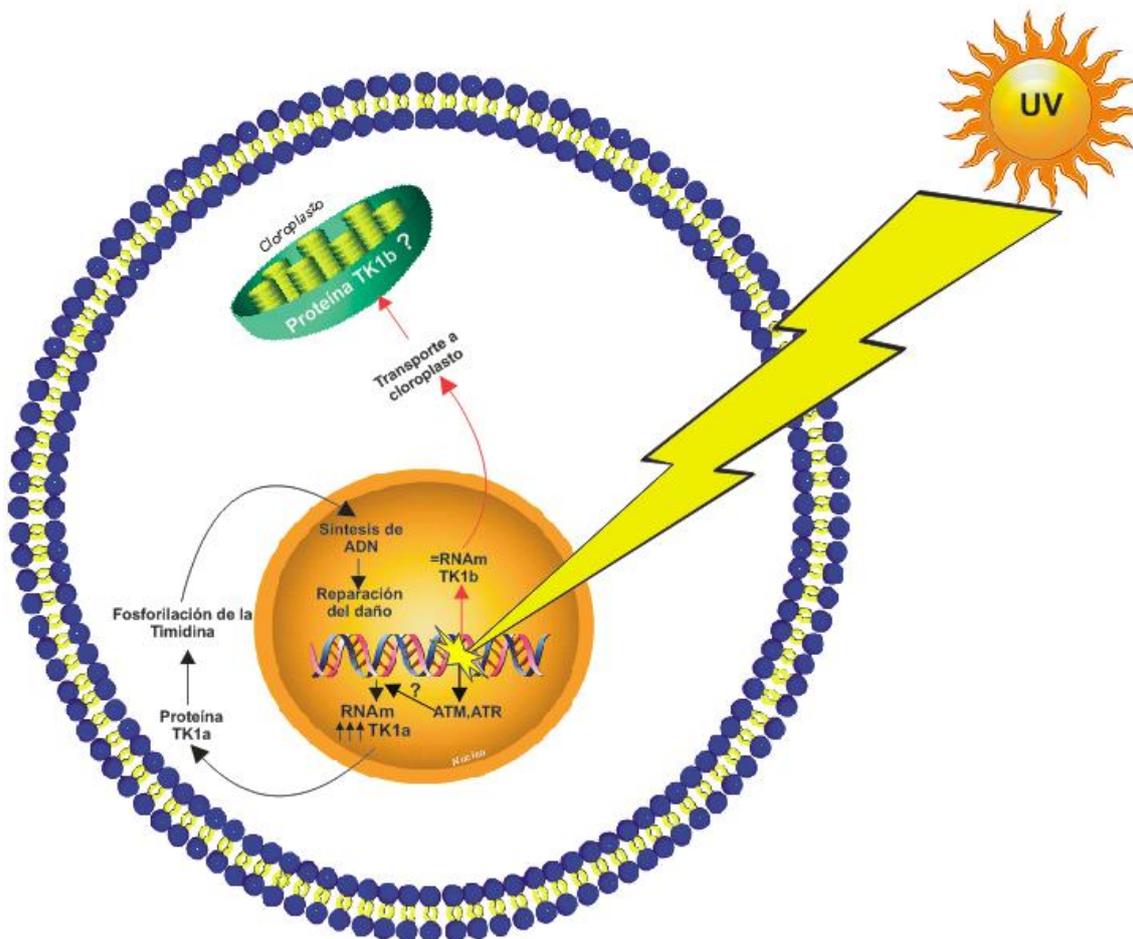


Figura 29. Modelo propuesto, Muestra la función de los genes de la timidina cinasa 1 de *A.thaliana* en respuesta a estrés por luz UV. Sólo el gen TK1a responde a daño genotóxico por UV incrementando sus niveles de transcrito, muy probablemente la señalización río abajo este orquestada por las cinasas ATR y la ATM. ↑ indica el incremento en una unidad del nivel de transcrito; = indica que el nivel de RNAm permanece sin cambios?; no se ha comprobado.

CONCLUSIONES

- La longitud de la raíz primaria y la zona meristemática del ápice de raíz, presentaron mayor tolerancia a la irradiación con luz UV en plantas mutantes de DNA-T que sobreexpresan el transcrito de la TK1a. Mientras que plantas silvestres y mutantes de la TK1b se vieron fuertemente dañadas, sin presentar diferencias entre ambas líneas.
- Al determinar el efecto de la irradiación UV en plantas de 21 y 28 días tanto en las líneas mutantes como en la silvestre, se observó que las plantas mTK1b fueron las más sensibles presentando mayor daño tisular y menor sobrevivencia, seguida por las plantas wt y por último la mTK1a. Por lo que al parecer niveles adecuados del transcrito de la TK1b son indispensables para una mejor respuesta al daño a DNA por lo menos en plantas de estas edades.
- Se encontró que los dos genes de la timidina cinasa de *Arabidopsis* presentan un patrón de expresión diferencial en respuesta a estrés por luz UV, ya que los niveles de transcrito de la TK1a incrementan alrededor de 3 veces post-irradiación y el transcrito de la TK1b se mantiene sin cambio. Además los niveles de transcrito de ambos genes fueron abundantes en tejido diferenciado (hojas), lo que contrasta con lo conocido en células de mamífero ya que la expresión de esta enzima esta altamente regulada durante el ciclo celular en específico durante la fase S.
- Todo lo anterior sugiere que la TK1a participa en los mecanismos de reparación del genoma que requieran la síntesis de DNA, tanto en tejido proliferativo (raíz y ápice de raíz) como en tejido diferenciado, Asimismo, es muy probable que al presentar estos genes una regulación diferente en su expresión, tendrán una función distinta en las células de la planta. Tal vez la TK1b sea participe en los mecanismos de reparación del cloroplasto específicamente en respuesta a sequía ya que se tiene reportado que los niveles de su transcrito se incrementan por ABA.



PERSPECTIVAS

- Continuar la evaluación fenotípica de las mutantes de DNA-T de la timidina cinasa en respuesta a diversos agentes genotóxicos incluyendo mitomicina y bleomicina.
- Evaluar una línea silenciada en ambos genes de la TK1 de *Arabidopsis* que se obtuvo recientemente en el laboratorio, para determinar la función de estas enzimas durante el crecimiento y desarrollo.
- Determinar los niveles de proteína de la TK1a y TK1b, en las líneas mutantes como en la silvestre mediante Western blot.
- Determinar la localización subcelular de las proteínas TK1a y TK1b, para lo cual primero se tendrá que aislar los cDNAs para hacer las proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP), con el propósito de comprobar la localización cloroplástica de la proteína TK1b.
- Evaluar el efecto de ABA y brasinosteroides sobre los niveles de transcrito de TK1a y TK1b.
- Evaluar la expresión de genes de reparación del daño a DNA y del ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico impuesto, para establecer la asociación de la función de la timidina cinasa con estos eventos.
- Realizar la selección de las semillas transformantes con las construcciones quiméricas que tienen la fusión del promotor de los genes TK1 con la β -glucuronidasa, para después obtener la generación T-3 con el propósito de asegurar la homocigosis, lo que nos permitirá evaluar mediante ensayos histoquímicos la actividad de los promotores de la timidina cinasa durante el desarrollo y en respuesta a estrés genotóxico. Este estudio permitirá su comparación con los datos de microarreglos reportados y definir si hay una regulación diferencial de ambos genes.



REFERENCIAS

- Abe, H; Urao, T; Ito, T; Seki, M; Shinozaki, K; and Yamaguchi-Shinozaki.** (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15: 63-78.
- Al Khateeb, W. M; and Schroeder, D. F.** (2009) Overexpression of *Arabidopsis* damaged DNA binding protein 1A (DDB1A) enhances UV tolerance. *Plant Mol. Biol*, 70: 371-383.
- Al-Nabulsi, I; Takamiya, Y; Voloshin, Y; Dritschilo, A; Martuza, R. L; and Jorgensen, T. J.** (1994) Expression of Thymidine Kinase I is essential to low dose radiation resistance of rat glioma cells. *Cancer Res*, 54: 5614-5617.
- Beas, C; Ortuño, D; and Armendáriz, J.** (2009) *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones*. 1st Edition. Mc Graw Hill, México.
- Belmonte, M; Elhiti, M; Ashihara, H; and Stasolla, C.** (2011) Brassinolide-improved development of *Brassica napus* microspore-derived embryos is associated with increased activities of purine and pyrimidine salvage pathways. *Planta* 233(1): 95-107
- Betts, M. J; Guigó, R; Agarwal, P, and Russell, B.** (2001) Exon structure conservation despite low sequence similarity: a relic of dramatic events in evolution?. *EMBO J.* 20(19): 5354-5360
- Birringer, M.S; Perozoo, R; Kut, E; Stillhart, C; Surber, W; Scapozza, L; and Folkerds, G.** (2006) High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: quaternary structure, stability, and kinetics. *Protein expression purif*, 47:506-515.
- Bolderson, E; Scorah, J; Helleday, T; Smythe, C; and Meuth, M.** (2004) ATM is required for the cellular response to thymidine induced replication fork stress. *Human Mol. Gen*, 13(23): 2937-2945.
- Bray, C. M; and West, C. E.** (2005) DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol*, 168: 511-528.
- Boldt, R; and Zrenner, R.** (2003) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant*, 117:297-304.
- Chen, I-P; Haehnel, U; Altschmied, L; Schubert, I; and Puchta; H.** (2003) The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress- a high- density colony array study (HDCA). *Plant J*, 35:771-786.
- Chen, Y-L; Eriksson, S; and Chang, Z.** (2010) Regulation and functional contribution of Thymidine kinase 1 repair of DNA damage. *J. Biol. Chem*, 285; 35: 27327-27335.



- Clough, S. J; and Bent, A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16(6):735-743.
- Cools, T; and De Veylder, L.** (2009) DNA stress checkpoint control and plant development. *Plant Biol*, 12:23-28.
- Curtis, M. J; and Hays, J. B.** (2007) Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated *Arabidopsis* roots: Requirements for DNA translesion polymerases η and ζ . *DNA Repair*, 6:1341-1358.
- Dewitte, W; and Murray, J. A.H.** (2003) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol*, 54:235-264.
- Dobrovolsky, V. N; Bucci, T; Heflich, R. H; Desjardins, J; and Richardson, F. C.** (2003) Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Mol Gen. Metabol*; 78:1-10.
- Dolan, L; Janmaat, K; Willemsen, V; Lindstead, P; Poething, S; Roberts, K; and Scheres, B.** (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119:71-84.
- Dou, Q-P; Zhao, S; Levin, A. H; Wang, J; Helin, K; and Pardee, A. B.** (1994) G1/S – regulated E2F-containing protein complexes bind to the mouse thymidine kinase gene promoter. *J. Biol. Chem*, 269:2; 1306-1313.
- Earley, K.W; Haag, J.R; Pontes, O; Opper, K; Juehne, T; Song, K; and Pikaard, C.S.** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*, 45:616-629.
- Elder, R. H; and Osborne, D. J.** (1993) Function of DNA synthesis and DNA repair in the survival of embryos during early germination and in dormancy. *Seed Sci. Res*, 3: 43-53.
- Eriksson, S; Munch-Petersen, B; Johansson, K; and Eklund, H.** (2002) Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell.Mol. Life Sci*, 59:1327-1346.
- Finkelstein, R. R; Tenbarger, K. M; Shumway, J. E; and Crouch, M. L.** (1985) Role of ABA in maturation of rapeseed embryos. *Plant Physiol*, 78: 630-636.
- Flemington, E; Bradshaw J; Harvey, D; Traina-Dorge, V; Slagel, V; and Deininger, Prescott L** (1987) Sequence, structure and promoter characterization of the human thymidine kinase gene. *Gene*, 52:267-277.
- Fulcher, Nick; and Sablowski, Robert.** (2009) Hipersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 106:20984-20988.



- Furukawa, T; Curtis, M.J; Tominey, C.M; Duong, Y.H; Wilcox, B.W.L; Aggoune, D; Hays, J.B; and Britt, A.B.** (2010) A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair*, 9(9):940-948.
- Gallie, D. R.** (1993) Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 77-105.
- Gasparri, F; Wang, N ; Skog, S; Galvani, A; and Eriksson, S.** (2009) Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan™ assays. *Eur. J. Cell Biol.*, 88: 779-785.
- Gateway.** (2004) Gateway® Technology with Clonase™ II A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Invitrogen corporation.
- Hartley, J. L; Temple, G. F; and Brasch, M. A.** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 11:1788-1795.
- Hays, J. B.** (2002) *Arabidopsis thaliana* a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair*, 1: 579-600.
- Hazra, S; Sabini, E; Ort, S; Konrad, M; and Lavie, A.** (2009) Extending thymidine kinase activity to the catalytic repertoire of human deoxycytidine kinase. *Biochemistry*, 48:1256-1263.
- Higo, K. Y; Ugawa, M. I; and Korenaga, T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.*, 27:297-300.
- Huntley, R.P; and Murray, J.A.H.** (1999) The plant cell cycle, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:440-446.
- Jarchow-Choy, S.K; Sjuvarsson, E; Sintim, H. O; Eriksson, S; and Kool, E.T.** (2009) Nonpolar nucleoside mimics as active substrates for human thymidine kinases. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:5488-5494.
- Jiang, K; and Feldman, L.J.** (2005) Regulation of root apical meristem development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21:485-509.
- Jiang, C. Z; Yee, J; Mitchell, D.L; and Britt, A. B.** (1997) Photorepair mutants of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7491-7445.
- Johansson, M; and Karlsson, A.** (1997) Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *J. Biol Chem.*, 272, 8454-8458.
- Kafer, C; Zhou, L; Santoso, D; Guirgis, A; Weers, B; Park, S; and Thornburg, R.** (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers Biosci.*, 9: 1611-1625.



- Kalvina, I; and Strid, A.** (2006) The role of NADPH oxidase and MAP kinase phosphatase in UV-B-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 29: 1783-1793.
- Khan, Z; Knecht, W; Willer, M; Rozpedowska, E; Kristoffersen, P; Clausen, A; Munch-Petersen, B; Almqvist, P. M; Gojkovic, Z; Pikur, J; and Ekstrom, Y. J.** (2010) Plant thymidine kinase 1: a novel efficient suicide gene for malignant glioma therapy. *Neuro-Oncology*, 12(6):549-558.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K.** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50, 347-363.
- Kimura, S; and Sakaguchi, K.** (2006) DNA repair in plants. *Chem. Rev*, 106: 153-766.
- Kreidberg, J. A; and Kelly, T.J.** (1986) Genetic analysis of the human thymidine kinase gene promoter. *Molecular Cell. Biol*, 6(8):2903-2909.
- Leasure, C.D; Tong, H; Yuen, G; Hou, X ;Sun, X; and He, Z.** (2009) Root UV-B sensitive2 acts with root UV-B sensitive1 in a root ultraviolet B-Sensing Pathway. *Plant Physiol*, 150:1902-1915.
- Lecharyn A., Boudet N., Gy I., Aubourg S. and Kreis M.** (2003) Introns in, introns out in plant gene families: a genomic approach of the dynamics of gene structure. *J Struct Funct Genomics*, 3:111-116
- Loukanina, N; Stasolla, C; Belmonte, M.F; Yeung, E.C; and Thorpe, T. A.** (2008) Changes in the novo, salvage, and degradation pathways of pyrimidine nucleotides during tobacco shoot organogenesis. *Plant Physiol. Biochem*, 46: 665-672.
- Luque, C. J; and Herráez, A.** (2001) *Biología molecular e ingeniería genética, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud.* Editorial Elsevier, España, 1st edition, pp.130-131.
- Mikulits, W; Hengstschlagers, M; Sauer, T; Wintersberger, E; and Mullner, E. W.** (1996) Overexpression of thymidine kinase mRNA eliminates cell cycle regulation of thymidine kinase enzyme activity. *J. Biol. Chem*, 271:2; 853-860.
- Moffatt, B; and Ashihara, H.** (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2nd edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. U.S.A.
- Molinier, J; Lechner, E; Dumbliauskas, E; and Genschik, P.** (2008) Regulation and role *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *Plos Gen*, 4:6.
- Moreno, N; Bougourd, S; Haseloff, J; and Feijó, J. A.** (2006) Imaging plant cells. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd edition, chapter 44: 769-787.



- Nájera-Martínez, M; Ramírez-Parra, E; Vázquez-Ramos, J; Gutierrez, C; and Plasencia, J.** (2008) Cloning and molecular characterisation of the maize retinoblastoma gene (ZmRBR2). *Plant Sci*, 175: 685-693.
- Nájera-Martínez, M.** (2010) "Herramientas genéticas para estudiar la función de la timidina cinasa en *Arabidopsis thaliana*" 4nd Coloquio invernal. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química de la UNAM.
- Pérez-Pérez, M; Priego, E; Hernández, A. I; Familiar, O; Camarasa, M. J; Negri, A; Gago, F; and Balzarini, J.** (2008) Structure, physiological rule, and specific inhibitors of human thymidine kinase 2 (TK2): Present and future. *Med. Res. Rev*, 28(5): 797-820.
- Pontarin, G; Gallinaro, L; Ferraro, P; Reichard, P; and Bianchi, V.** (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100: 12159-1264.
- Ramírez-Parra E; Frundt C; and Gutierrez C.** (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 33: 801–811.
- Ricaud, L; Proux, C; Renou, J-P; Pichon, O; Fochesato, S; Ortet, P; and Montané, M-H.** (2007) ATM-mediated transcriptional and developmental responses to γ -rays in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2:e4301-21.
- Rodríguez, I. P; and Barrera, H. A.** (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3): 323-335.
- Rotheneder, H; Geymayer, S; and 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.
- Roa, H; Lang, J; Culligan, K. M; Keller, M; Holec, S; Cognat, V; Montané, M-H; Houlné, G; and Chaboué, M-E.** (2009) Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151: 461-471.
- Sandrini, M.P.B; and Piskur, J.** (2005) Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction. *Trends Biochem. Sci*, 30; 5 225-228.
- Scheres, B.** (2007) Stem cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Rev*, 8: 345-354.
- Schmid, M; Davison, T.S; Henz, S.R; Pape, U. J; Demat, M; Vingron, M; Scholkopt, B; Weigel, D; and Lohmann, J. U.** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Gen*, 37: 501-506



- Segura-Peña, D; Lutz, S; Monnerjahn, C; Konrad, M; and Lavie, A.** (2007) Binding of ATP to TK1-like enzymes is associated with a conformational change in the quaternary structure. *J. Mol. Biol.*, 369:129-141.
- Sherley, J.L; and Kelly, T. J.** (1988). Regulation of thymidine kinase during the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 263:8350-8358.
- Sorensen, P; and 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.
- Stasolla, C; Katahira, R; Thorpe, T.A; and Ashihara, H.** (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.*, 160:1271-1295.
- Swarbreck, D; Wilks, C; Lamesch, P; Berardini, T.Z; García-Hernandez, M; Foerster, H; Li, D; Meyer, T; Muller, R; and PLoetz, L.** (2008) The *Arabidopsis* information resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.*, 36:D1009-1014.
- Suzuri, L.J.** (2001) Estructura y expresión del gene de la timidina cinasa de maíz. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Suzuri, L.J.** (2006) Actividad y expresión de la timidina cinasa de maíz durante la germinación de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Terpstra, I; and Heidstra, R.** (2009) Stem cells: The root of all cells. *Sem. Cell Dev. Biol.*, 20:1089-1096.
- Tuteja, N; Ahmad, P; Panda, B.B; and Tuteja, R.** (2009) Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Res. Rev.*, 681:134-149.
- Ullah, H. M; Robertson, D; and Fites, R. C.** (1999) A gene for thymidine kinase in plants. *Plant Physiol.*, 119:c/pp.
- Ulm, R; Revenkova, E; Di Sansebastiano, G-P; Bechtold, N; and Paszkowski, P.** (2001) Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 15: 699-709.
- Vandepoele, K; Vlieghe, K; Florquin, K; Henning, L; Beemster, G. T. S; Gruissem, W; Van de Peer, Y; Inze, D; and De Veylder, L.** (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.*, 139: 316-328.
- Van Den Berg, C; Willemsen, V; Henddriks, G; Weisbeek, P; and Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature.*, 390:287-289.



- Venkatachalam, P; Geetha, N; and Priya, P.** (2010) Identification of a differentially expressed thymidine kinase gene related to tapping panel dryness syndrome in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by random amplified polymorphic DNA screening. *Int. J. Plant Biol*, 1:e7: 33-39.
- Walton, D. C; Soofi, G. S; and Sondheimer, E.** (1970) The effects of abscisic acid on growth and nucleic acid synthesis in excised embryonic bean axes. *Plant Physiol*, 45: 37-40.
- Wakazono, Y; Kubota, M; Furusho, K; Liu, L; and Gerson, S. L.** (1996) Thymidine kinase deficient cells with decreased TTP pools are hypersensitive to DNA alkylating agents. *Mutation Res*, 362:119-125.
- Wakazono, Y; Kubota, M; Sano, H; Matsubara, K; Hirota, H; Kuwakado, K; and Adachi, S.** (1994). Different effect of thymidine kinase loss on TTP pools; comparison among human leukemia cell lines. *Mutation Res*, 304:295-300.
- Wang, C; and Liu, Z.** (2006) *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell*, 18: 350-365.
- Weigel, D; and Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis* a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Weling, M; Kosinska, U; Mikkelsen, N; Carnrot, C; Zhu, C; Wang, L; Eriksson, S; Munch-Petersen, B; and Eklund, H.** (2004) Structures of thymidine kinase 1 of human and micoplasmic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(52): 17970-17975.
- Wilson, Z. A.** (2000) *Arabidopsis*, A practical approach. Oxford University Press, pp 1-10.
- Wintersberger, E.** (1996) Regulation and biological function of thymidine kinase. *Biochem. Soc. Trans*, 25:303-305
- Yadav, R. K; Girke, T; Pasala, S; Xie, M; and Reddy, G. V.** (2009) Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS*, 106(12): 4941-4946.
- Zhang, J; and Davies, W. J.** (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant, Cell Environ*, 13(3): 277-285.
- Zrenner, R; Riegler, H; Marquard, C.R; Lange, P.R; Geserick, C; Bartosz, C. E; Chen, C.T; and Slocum, R.D.** (2009) A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 183:117-132.
- Zrenner, R; Stitt, M; Sonnewald, U; and Boldt, R.** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Biol*, 57: 805-836.

APÉNDICE 1

(Anexo de Materiales y métodos)

I. Preparación de Reacciones de PCR

Tabla 11. Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación de ambos promotores a partir de DNA genómico.

Reactivo	pTK1a (μL)	pTK1b (μL)
Buffer 5X Go Taq React + Mg^{2+} (1.5mM)	4.0	4.0
dNTPs 10mM	0.3	0.3
Oligonucleótido Forward 10 μM (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μM)	1.5 (0.75 μM)
Oligonucleótido Reverse 10 μM (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μM)	1.5 (0.75 μM)
Taq Polimerasa 5U/ μL	0.2	0.2
DNA	1.0	2.0
H ₂ O esteril (c.b.p. 20 μL)	13.0	10.5

Tabla 12. Preparación de las mezclas de reacción en los 2 PCR utilizados para obtener las secuencias flanqueadas con los sitios attB de recombinación, para ambos promotores

Reactivo	PCR 1 (μL)	PCR2 (μL)
Buffer 5X Go Taq React + Mg^{2+} (1.5mM)	4.0	4.0
dNTPs 10mM	0.3	0.3
Oligonucleótido Forward 10 μM (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μM)	0.6 (0.3 μM)
Oligonucleótido Reverse 10 μM (concentración en la reacción)	0.75 (0.375 μM)	0.6 (0.3 μM)
Taq Polimerasa 5U/ μL	0.2	0.2
DNA plasmídico o producto de PCR	1.0 (plasmídico 1:10)	1.0 (producto PCR)
H ₂ O esteril (c.b.p. 20 μL)	13.0	13.3

II. Técnicas Adicionales

II.1. Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

Una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa de *E. coli* DH5 α se inoculó en 10 mL de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 mL y se incubó a 37 °C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. De este cultivo se tomaron 2 mL que se transfirieron a 200 mL de caldo LB en un matraz de 1L que se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) hasta que la densidad óptica alcanzó un valor aproximado de 0.37 a 590 nm. El cultivo se repartió en 4 tubos Falcon® de 50 mL estériles que se mantuvieron en hielo durante 10 min antes de centrifugarlos a 3000 rpm a 4°C durante 7 min (centrifuga Jouan MR 1812).

Cada botón celular se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ fría y se centrifugó a 3000rpm durante 5 min a 4°C. Los botones resultantes se resuspendieron en 10mL de solución de CaCl₂ fría, se juntaron en un mismo tubo Falcon® y se dejaron reposar en hielo durante 30 min, para después centrifugar a 3000 rpm por 7 min a 4°C. Por último, el botón celular se resuspendió en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría y se repartió en alícuotas de 100 μ L en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70°C,

II.2. Transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico

Se agregaron los 10 μ L de las reacciones de ligación y de las de recombinación a 100 μ L de células competentes, se mezclaron, para posteriormente colocarlos en hielo durante 20 min. Subsecuentemente se incubaron a 42°C por 50-60s y pasado este tiempo se colocaron en hielo por 2 min. Se añadieron 900 μ L de medio LB a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C durante 2 horas con una agitación de 150 rpm en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker. Una vez concluida la incubación se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm, se decantó el medio y el botón de células se resuspendió en 100 μ L de caldo LB. Posteriormente cada 50 μ L de la suspensión de células se plaquearon en una caja con medio LB, con sus respectivos antibióticos o marcadores de selección de colonias transformantes según sea el caso. Para comprobar las transformaciones se extrajeron los plásmidos, se digirieron y se



separaron en geles de agarosa al 1.5%. Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a 37°C, con agitación de 200rpm durante 14-16 horas. Se tomaron 350 µL del cultivo y se le agregaron 150 µL de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril (la concentración final del glicerol fue de 15%).

II.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% preparado con amortiguador TAE 1X. La banda correspondiente al amplicon se cortó y depositó en un tubo Eppendorf previamente pesado, con el propósito de conocer el peso de la rebanada de gel cortado. La purificación del DNA se llevó a cabo con Gel Extraction Kit QIAquick®. Al gel que contenía el DNA se le adicionaron 3 volúmenes de buffer QG (que contiene NaI) a 1 volumen de gel (100mg de gel~100µL), por ejemplo, se adicionaron 300 µL de buffer QG por cada 100mg de gel. Posteriormente el tubo se incubó a 50°C por 10 min, para ayudar a disolver el gel, se mezcló con vórtex cada 2-3 min durante la incubación. Finalizada la incubación, la columna QIAquick se colocó en el tubo de colección de 2mL incluido en el kit, la muestra se traspasó a la columna, donde el DNA se une fuertemente, se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm (centrifuga Sorvall MC12). Después de decantar la solución que se encontraba en el tubo colector, la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo colector y se adicionó 750 µL de buffer PE para lavar, se dejó en incubación la columna por 5 min antes de centrifugar. Una vez completado este tiempo se centrifugó 1 min a 13000 rpm, enseguida se desechó la solución de lavado del tubo colector y se centrifugó la columna por un minuto más, con el propósito eliminar el etanol residual que contiene el buffer PE. Concluido el lavado, la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó 50 µL de H₂O estéril en el centro de la membrana de la columna, se incubó por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm. Por último la muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

II.4. Purificación del DNA plasmídico

Con una punta de micropipeta estéril se tomaron colonias de células de *E.coli* transformantes con las construcciones de los insertos con los vectores (pGEM, pDONR/Zeo y el vector binario pBGWFS7) y se sembraron en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 4 mL de caldo LB suplementado con los antibióticos de selección (ampicilina, zeosina, espectinomicina) según sea el caso, para tener una concentración final en el tubo de 50 µg de antibiótico por mL. El tubo se incubó con agitación (150-200 rpm) a 37°C durante toda la noche. Para la preparación del DNA se tomaron 1,5 mL del cultivo líquido que se centrifugaron por 1 minuto a máxima velocidad en una microfuga Sorvall MC12 (rotor FA-MICRO), el sobrenadante se decantó y se repitió este paso una vez más. Para la purificación de los plásmidos se empleó Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit, al botón celular se le agregó 250 µL de la solución de resuspensión y se mezcló por vórtex hasta que no quedaron aglomeraciones de células. A la resuspensión de células se le agregó 250 µL de la solución de lisis y se mezcló por inversión el tubo de 4-6 veces hasta que la solución llegó a ser clara, posteriormente se adicionó al mismo tubo 350 µL de la solución de neutralización y se mezcló inmediatamente por inversión de 4-6 veces, enseguida se centrifugó por 5 min a 13000 rpm (centrifuga Sorvall MC12). Después de la centrifugación se transfirió el sobrenadante a la columna GeneJET™, evitando la transferencia del precipitado blanco, se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm con el objetivo de que el DNA se adhiriera a la columna, se desechó la solución que pasó a través de la columna y se colocó nuevamente en el mismo tubo colector, posteriormente se añadió 500 µL de la solución de lavado a la columna, se centrifugó por 1 minuto a 13000 rpm, se desechó la solución contenida en el tubo colector, se regresó la columna al mismo tubo y se repitió el procedimiento de lavado. Finalizado el lavado se centrifugó un minuto adicional para remover la solución de lavado residual. Por último la columna se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 50 µL del buffer de elución al centro de la membrana de la columna, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 2 min a 13000rpm. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C. El DNA preparado de esta

forma se utilizó para digestión con el fin de liberar el DNA clonado en el plásmido y verificar la clonación de los insertos en los vectores del sistema Gateway.

II.5. Secuenciación del DNA plasmídico

La concentración de los DNA plasmídicos se determinaron mediante análisis espectrofotométrico en celdas de cuarzo a 260 y 280nm.

La secuenciación del DNA plasmídico se realizó por el método de terminación de cadena con didesoxinucleótidos, cuyos productos se resolvieron en un secuenciador automático AB1PRISM 310 (Perkin Elmer), ubicado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

II.6. Preparación de células quimiocompetentes de *A.tumefaciens*

Una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* se inoculó en 3 mL de caldo LB en un tubo de ensaye y se incubó a 28°C con agitación (250 rpm) durante 16 horas. De este cultivo se tomaron 2 mL que se transfirieron a 50 mL de caldo LB en un matraz de 250 mL, se incubó a 28°C con agitación a 200 rpm hasta que la densidad óptica alcanzó un valor aproximado de 0.5 a 590 nm. El cultivo se vertió en 1 tubo Falcon® de 50mL estéril que se mantuvo en hielo durante 15 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se resuspendió el botón celular en 1 mL de la solución de CaCl₂ 20 mM/glicerol 10%. Se distribuyo en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70°C.

APÉNDICE 2

(Anexo de Resultados)

I. Obtención de plantas transformantes

Una vez obtenidas las construcciones de los promotores de ambos genes de la timidina cinasa en el vector binario, se procedió a transformar a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* por choque térmico. Después de este paso las células se plaquearon en medio LB suplementado con espectinomicina (50µg/mL) para seleccionar las células transformantes de *Agrobacterium*.

Las cepas de *A. tumefaciens* se utilizaron para la transformación de plantas de *A. thaliana* mediante el procedimiento de inmersión floral como se describe en la sección de métodos. Las semillas que darán estas plantas se seleccionarán con el herbicida conocido como BASTA, ya que las plantas transformadas presentarán resistencia a éste. Una vez seleccionadas las plántulas se obtendrán las generaciones T2 y T3, con el propósito de evaluar la actividad de las regiones promotoras, la cual se obtendrá relacionando la expresión del gen reportero β glucuronidasa en la planta durante el desarrollo, en respuesta a estrés genotóxico por luz ultravioleta y otros agentes genotóxicos, debido a que la expresión de éste gen estará regulada por las regiones promotoras de los genes de la timidina cinasa 1.

II. Datos de la expresión de los genes de la TK1 de *A. thaliana*

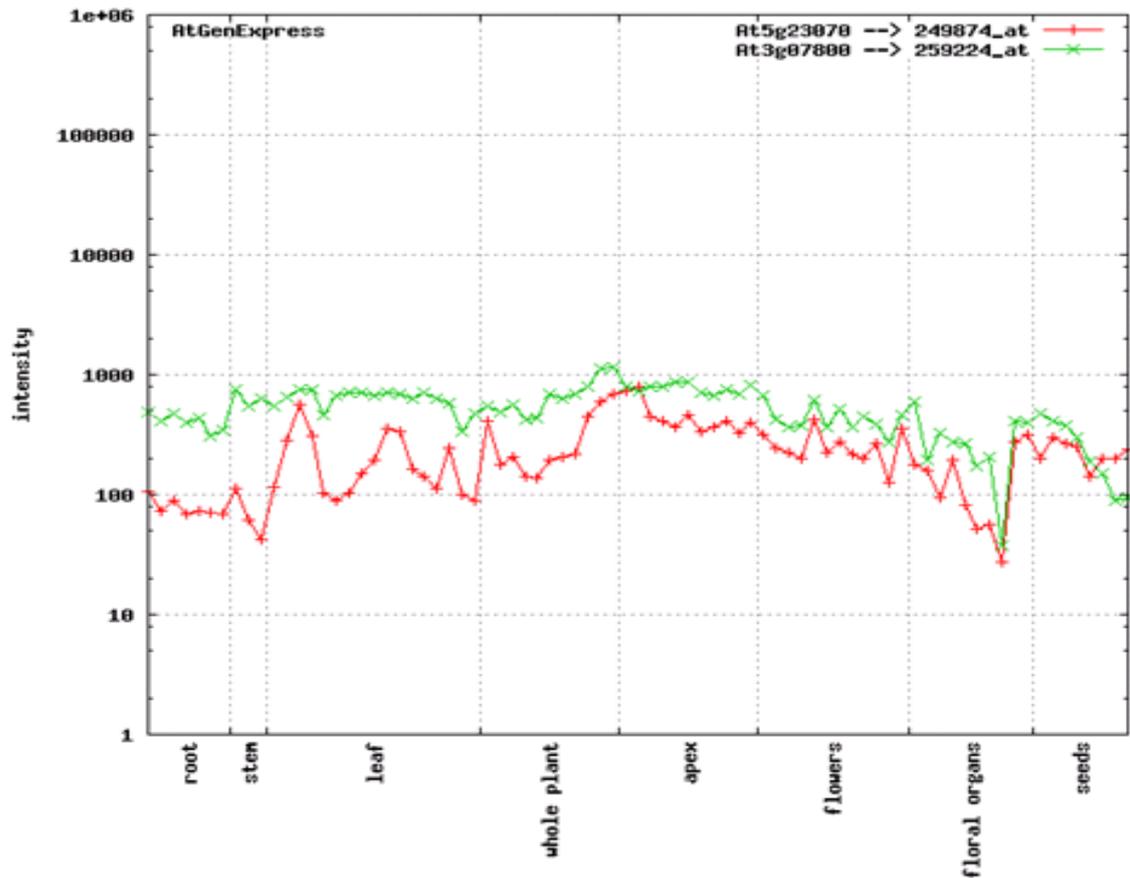


Figura 30. Datos de expresión de los genes de la timidina cinasa 1 de *A. thaliana* en diferentes tejidos durante el desarrollo de la planta. Obtenido del Atlas de expresión de *Arabidopsis*.

APÉNDICE 3. Preparación de reactivos y medios de cultivo

- **Agua tratada con DEPC**

DEPC	2 mL
Agua desionizada c.b.p.	1 L

- **Amortiguador de carga para RNA**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)	10 mM

- **Amortiguador de carga para DNA**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na ₂ EDTA (pH 8.0)	2 mM

- **Bromuro de Etidio 0.5 mg/mL**

Bromuro de Etidio 10 mg/mL	50.0 µL
Agua estéril desionizada	950.0 µL

- **CaCl₂ 60mM**

CaCl ₂ H ₂ O	0.882g
Glicerol	15 mL
agua estéril desionizada	85 mL
Ajustar el pH a 7	

- **Caldo Luria**

Medio luria	15.5g
Agua estéril	1L
Esterilizar por 20min/121°C a una presión de 15 lb/in ²	

- **Etanol 75 % para la extracción de RNA**

Etanol absoluto	75 mL
H ₂ O-DEPC	25 mL

- **Gel de Agarosa 1.5%**

Agarosa	0.375 g
H ₂ O estéril	25 mL
Fundir la mezcla	
TAE 50X	500 µL
Br etidio 0.5 mg/mL	25 µL

- **GTE**

Tris 0.5 M	50 µL
EDTA 0.5 M	20 µL
Glucosa 0.1 M	500 µL
Agua	430 µL



- **IPTG 0.1 M**
IPTG 23.83 g
Agua c.b.p. 1 L

- **Marcador de 100pb 0.05 µg/µL**
Marcador de 100pb 20 µL
TAE 50X 8 µL
Buffer 6X 67µL
Agua estéril c.b.p. 400 µL

- **Medio Gamborg**
Sales GB-5 0.8 g
H₂O estéril desionizada 200 mL
Agar 25 g
Sacarosa al 10% 50 mL

- **Medio Luria Base**
Medio Agar Luria 30.5 g
Agua destilada estéril c.b.p. 1 L

- **Medio LB/ampicilina/IPTG/X -GAL**
Media Luria base 15.5 g
Agar 15 g
Ajustar el pH a 7
Agua cbp. 1 L
Esterilizar durante 20 min. y dejar enfriar a 50° C.
Ampicilina 100 µg/mL
IPTG 5 mM
X-Gal 80 µg/µL

- **Solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8**
Acetato de potasio 29.5 g
Ajustar el pH a 4.8
Agua c.b.p. 100 mL

- **Solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (v/v)**
Cloralex 5 mL
Agua destilada estéril c.b.p. 10 mL

- **TAE 50X**
Trizma base 24.2 g
Ácido acético glacial 5.7 mL
Na₂EDTA. 2H₂O 3.72 g
HCl concentrado 5.5 mL
Agua c.b.p. 100 mL
Ajustar pH 8.0