



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DE LA TIMIDINA CINASA DE *Arabidopsis thaliana* EN LA
RESPUESTA DE DAÑO AL DNA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. LUIS FERNANDO DE LA ROSA ORTEGA

COMITÉ TUTORAL:

DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. ROCÍO CRUZ ORTEGA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México Enero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Vocal: Dra. Claudia Díaz Camino

Vocal: Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez

Vocal: Dra. Patricia León Mejía

Secretario: Dra. Aurora Lara Núñez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM.

Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

Asesor

Q.A. Luis Fernando de la Rosa Ortega

Sustentante

Comité Tutorial:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dra. Rocío Cruz Ortega



i. Agradecimientos

Se agradece al Dr. José Antonio Pedroza García y a la Dra. Cécile Raynaud del Institute of Plant Sciences, Université Paris-Sud por las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que se emplearon en este trabajo.

Se agradece la supervisión técnica de la M.C. Manuela Nájera Martínez.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) de la Facultad de Química, UNAM (5000-9121).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios de Maestría (738363).



ii. Índice de contenido

i. Agradecimientos	3
ii. Índice de contenido	4
v. Índice de abreviaturas.	9
I. Resumen	13
II. Introducción.....	14
1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio de la biosíntesis de nucleótidos.	14
2. Biosíntesis de nucleótidos en plantas.....	15
2.1 Biosíntesis <i>de novo</i> de pirimidinas	15
2.2 Ruta de salvamento.....	18
2.2.1 Timidina Cinasa y su papel en la ruta de salvamento de nucleótidos	19
2.2.1.2 Timidina Cinasa de plantas.....	21
3. Mecanismos de reparación de DNA.	23
3.1 Reparación Directa de DNA. Fotoliasas.....	23
3.2 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)	25
3.4 Respuesta de daño al DNA (DDR).....	28
3.5.1 Vía ATM	29
3.5.2 Vía ATR	31
3.5.3 SOG1 y su función en la respuesta de daño al DNA.....	32
4. Antecedentes. Función de la TK en reparación de DNA en plantas.	32
III. Hipótesis	35
IV. Objetivos.....	35
1. Objetivo General:	35
2. Objetivos Particulares:	35
V. Materiales y Métodos	36
Material biológico	36
Soluciones Amortiguadoras	37
1. Procedimientos generales	37
1.1 Desinfección y siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.2 Propagación de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.3 Ensayos de germinación.....	38



2. Evaluación fenotípica de mutantes KO para TK1a en respuesta a agentes genotóxicos	38
2.1 Ensayo de sensibilidad a UV-C en el crecimiento de la raíz y desarrollo de hojas verdaderas.....	38
2.2 Ensayo de sensibilidad a hidroxihurea y zeocina en el crecimiento de la raíz y desarrollo de hojas verdaderas.....	39
3. Ensayos de RT-PCR punto final para determinar niveles de RNAm.	39
3.1 Extracción de RNA	40
3.2 Calibración del RNA total.	41
3.3 Reacción de transcripción reversa	41
3.4 Reacción de RT-PCR y electroforesis.....	42
4. Selección y evaluación genotípica y fenotípica de la cruce de plantas sesquimutantes <i>bx</i> a-1+ y <i>bx</i> a-3+.....	43
4.1 Genotipificación de las plantas <i>bx</i> a-1+ y <i>bx</i> a-3+.....	43
4.2 Evaluación del fenotipo de respuesta a agentes genotóxicos en las plantas sesquimutantes <i>bx</i> a-1+ y <i>bx</i> a-3+	45
5. Evaluación de la actividad del promotor TK1a en respuesta a estrés genotóxico.	46
5.1 Transformación y selección de semillas.....	46
5.2 Determinación histoquímica de la actividad de β -glucuronidasa (GUS)	46
6. Determinación de la actividad enzimática total de Timidina Cinasa.....	47
6.1 Extracción de proteína total.....	47
6.2 Determinación de la actividad enzimática de Timidina Cinasa.....	47
VI. Resultados.	49
1. Niveles de expresión de los genes de la vía de novo de nucleótidos en las líneas mutantes KO TK1a.	49
2. Actividad de Timidina Cinasa en mutantes TK1a.....	50
3. Respuesta de las líneas mutantes TK1a (<i>tk</i> 1a-1 y <i>tk</i> 1a-3) a estrés genotóxico.....	51
4. Sensibilidad a la radiación UV-C.....	52
5. Sensibilidad a hidroxihurea.....	55
6. Sensibilidad a zeocina.	58
7. Selección de plantas sesquimutantes.....	60
8. Genotipificación de las líneas sesquimutantes.....	61
9. Respuesta de las líneas sesquimutantes a agentes genotóxicos.....	64



10. Actividad del promotor del gen TK1a en fondos mutantes atm y atr	66
VII. Discusión.....	73
La carencia del TK1a en <i>A. thaliana</i> no es compensada por la inducción TK1b ni de genes de la vía de síntesis de novo de nucleótidos	73
La sacarosa en el medio de crecimiento de <i>A. thaliana</i> enmascara la sensibilidad de las mutantes tk1a a agentes genotóxicos	75
Mediante la medición del crecimiento de la raíz de <i>A. thaliana</i> se estableció la sensibilidad a agentes genotóxicos en la mutante tk1a	76
La sobreexpresión de TK1a no necesariamente resulta en resistencia al daño al DNA... 77	
Un solo gen funcional de la TK no es suficiente para la reparación de daño al DNA provocado por agentes genotóxicos.....	78
AtTK1a tiene una regulación transcripcional dependiente de diversos factores.....	79
VIII. Conclusiones y perspectivas.....	82
1. Conclusiones	82
2. Perspectivas	82
IX. Referencias	83
X. Anexos	89
Materiales y Métodos.....	93
Amortiguadores y reactivos.....	93
Composición del medio Hoagland	93
Macronutrientes	93
Micronutrientes	93
Amortiguador de fosfatos/Ferricianuro-Ferrocianuro/X-Gluc.....	93
Amortiguador de extracción de proteínas.....	94
Amortiguador de reacción para determinar la actividad enzimática de TK	94
Mezcla de ensayos	94
Solución de precipitación	95
Líquido de Bray.....	95



iii. Índice de Tablas

Tabla 1. Líneas transgénicas y mutantes de <i>Arabidopsis</i> empleadas en este trabajo ...	36
Tabla 2. Mezcla de reacción de RT.....	41
Tabla 3. Mezcla de reacción para RT-PCR.	42
Tabla 4. Cebadores utilizados en la RT-PCR.	42
Tabla 5. Condiciones de síntesis por RT-PCR de los amplicones derivados de cDNA de los genes estudiados.	43
Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR para la genotipificación de plantas sesquimutantes.	44
Tabla 7. Cebadores utilizados en la genotipificación de las líneas sesquimutantes.	44
Tabla 8. Cuadro de Punnett de segregación genotípica de la autocruza sesquimutante. Plantas heterocigotas mutantes (<i>TK1a;tk1a</i>) en fondo mutante <i>tk1b;tk1b</i>	60

iv. Índice de Figuras

Figura 1. Transporte de intermediarios en la ruta biosintética de novo de nucleótidos de pirimidina en plantas y localización de las enzimas.....	17
Figura 2. Ruta biosintética de novo, la síntesis de desoxirribonucleótidos en plantas. ..	18
Figura 3. Rutas del salvamento de nucleótidos.	19
Figura 4. Metabolismo y ruta de salvamento de timidina.	20
Figura 5. A) Diagrama de la estructura de los genes <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , B) Diagrama de la estructura de las proteínas TK1a y TK1b.	23
Figura 6. Foto-productos en el DNA por radiación ultravioleta (UV) formados a partir de timinas adyacentes.	24
Figura 7. Representación esquemática de GG-NER y TC-NER en eucariontes	27
Figura 8. Vías de respuesta de daño al DNA, ATM y ATR, en plantas.....	30
Figura 9. Respuesta diferencial de los genes <i>AtTK1a</i> y <i>AtTK1b</i> a radiación con luz UV-C.....	33
Figura 10. Estructura del gen <i>AtTK1a</i> y posición de las inserciones de T-DNA en las líneas SALK_094632 y SALK_097767.....	34
Figura 11. Niveles de los transcritos <i>AtTK1a</i> y <i>TUB</i> por RT-PCR punto final en plantas silvestres Col-0 y mutantes <i>tk1a-1</i> y <i>tk1a-3</i>	34
Figura 12. Localización de los cebadores utilizados para la amplificación por RT-PCR de los cDNAs de los genes <i>TK1a</i> , <i>TK1b</i> y <i>APT</i>	45
Figura 13. Reacción de fosforilación de timidina, catalizada por la TK y precipitación de dTMP con cloruro de lantano	48



Figura 14. Niveles de transcrito de genes de las vías de salvamento y la biosíntesis de novo de nucleótidos, determinados por RT-PCR punto final.....	50
Figura 15. Actividad específica total de Timidina Cinasa en plántulas de las líneas KO y sobreexpresora de <i>TK1a</i>	51
Figura 16. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas a 4 días post-irradiación con luz UV-C; B. Fenotipo de plántulas de 10 días expuestas a luz UV-C por 3 y 6 min C. Desarrollo de la raíz de plántulas 5 días post irradiación con luz UV-C.....	54
Figura 17. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas crecidas durante 9 días en medio GB5 suplementado con hidroxiiurea; B. Fenotipo de plántulas de 10 días de desarrollo en medio GB5 suplementado con hidroxiiurea; C. Longitud de la raíz en respuesta a hidroxiiurea	57
Figura 18. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas crecidas durante 9 días en medio GB5 suplementado con zeocina; B. Fenotipo de plántulas de 10 días de desarrollo en medio GB5 suplementado con zeocina; C. Longitud de la raíz en respuesta a zeocina.....	59
Figura 19 Selección fenotípica de plántulas progenie de la autocruza sesquimutante. .	61
Figura 20. Selección fenotípica de plántulas sesquimutantes y doble mutantes.....	62
Figura 21. Selección genotípica de plantas sesquimutantes y doble mutantes.....	64
Figura 22. Fenotipo de respuesta a luz UV-C, hidroxiiurea y zeocina de plántulas sesquimutantes.....	65
Figura 23. Localización histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de <i>AtTK1a</i> en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes <i>atm</i> y <i>atr</i> de 5 días en respuesta a luz UV-C.....	68
Figura 24. Localización histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de <i>AtTK1a</i> en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes <i>atm</i> y <i>atr</i> de 5 días en respuesta a hidroxiiurea	70
Figura 25. Localización histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de <i>AtTK1a</i> en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes <i>atm</i> y <i>atr</i> de 5 días en respuesta a zeocina.....	72



v. Índice de abreviaturas.

[6,4] PPs	Fotoproductos 6-4	<i>bx</i> a-3+	Planta con fondo mutante <i>tk1b/tk1b</i> y mutante heterocigota <i>TK1a/tk1a (Tk1a-3)</i>
°C	grados centígrados		
µg	microgramos		
µL	microlitros		
µM	micromolar	CAD	Carbamoilfosfato sintetasa, Aspartato transcarbamilasa y Dihidroorotasa
3'UTR	extremo 3' no traducido	CAK	Cinasa activadora de CdK
5'UTR	extremo 5' no traducido	CDC25A	Proteína de división del ciclo celular 25A
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center	CdK	Cinasa dependiente de cilcina
AK	Adenosina Cinasa	cDNA	DNA complementario de RNA
AMP	Adenosina mono fosfato	Chk1-2	cinasas transductoras de señales DDR
ANOVA	Análisis de varianzas	Col-0	Ecotipo Columbia
ATIC	Aminoimidazol carboxamida ribonucleótido formiltransferasa	CPDs	Dímeros de pirimidina ciclo butano
ATM	Ataxia telangiectasia mutada	cpm	centelleos por minuto
ATP	adenosín trifosfato,	CSA/B	Proteínas Cockayne Syndrome A/B
ATR	ataxia telangiectasia relacionada a Rad3	CtIP	Endonucleasa, Proteína de unión a RB
ATRIP	proteína de interacción con ATR	CTP	Citidina trifosfato
AtTK1a	Timidina Cinasa 1a de Arabidopsis thaliana	dADP	desoxi-adenosin di fosfato
AtTK1b	Timidina Cinasa 1b de Arabidopsis thaliana	dCDP	desoxi-citidina di fosfato
BLM	Bleomicina	dCTP	desoxi-citidina tri fosfato
BRCA1	Proteína de susceptibilidad al cáncer de pecho 1	DDB	Proteína de unión específica al daño al DNA
BSA	Albúmina sérica bovina	DDR	Respuesta de daño al DNA
<i>bx</i> a-1+	Planta con fondo mutante <i>tk1b/tk1b</i> y mutante heterocigota <i>TK1a/tk1a (Tk1a-1)</i>	DEPC	Dietil Pirocarbonato
		dGDP	desoxiguanosin difosfato
		dGTP	desoxiguanosin trifosfato
		DHO	Dihidroorotato



DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa	γH2AX	Histona X de la familia H2A fosforilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico	HDR	Recombinación homologa dirigida
DNA-PKcs	Proteína cinasa dependiente de DNA	HU	Hidroxiurea
DNApol	DNA polimerasa	IGK	Inosina/Guanosina cinasa
dNTPs	desoxinucleótido trifosfatos	IMP	Inosina monofosfato
DSBs	Rupturas de doble cadena de DNA	KDa	Kilo Dalton
dT	desoxitimidina	Km	Constante de Michaelis-Menten
dTDP	desoxitimidina difosfato	m	mutante
dTMP	desoxitimidina monofosfato	MDC1	Mediador de daño al DNA Checkpoint 1
dTTP	desoxitimidina trifosfato	MDM2	Regulador de p53
dU	desoxiuridina	mL	mililitros
dUDP	desoxiuridina difosfato	MMC	Mitomomicina C
dUTP	desoxiuridina trifosfato	MRE11	Nucleasa de reparación de doble cadena de DNA
dUMP	desoxiuridina monofosfato	MRN	Complejo (MRE11/Rad50/Nbs1)
E2F	Grupo de genes que codifican a la familia de factores de transcripción en eucariontes	MSRB7	Metionina sulfoxido reductasa B7
ERCC1	proteína de reparación por escisión	MTHF	metilentetrahidrofolato
FADH	Dinucleótido de flavin adenina	mV	miliVolts
GB5	Medio Gamborg's B-5	NDP	ribonucleótidos difosfatos
GG-NER	Reparación global del genoma por NER	NER	Reparación por escisión de nucleótidos
GMP	Guanosina monofosfato	NFκB	nuclear factor kappa B subunidad1
GUS	β-glucuronidasa	NHEJ	Recombinación no homologa
h	horas	NBS1	Proteína de recombinación meiótica y reparación de DNA componente del complejo MRN
H2AX	Histona X de la familia H2A	oeTK1a	Línea sobreexpresora de TK1a
		p35S	promotor 35S de expresión fuerte



p53	proteína que responde al estrés celular y regula genes de respuesta, controla el paro del ciclo celular, apoptosis, senescencia, y reparación del DNA	RT-PCR	Reacción de cadena de polimerasa de la transcripción reversa
		<i>tk1a-3</i>	SALK_094632
		<i>tk1a-1</i>	SALK_097767
		seg	segundos
		siRNA	RNA pequeño de interferencia
PAICS	Enzima bifuncional de la biosíntesis de nucleótidos	SOG1	gen que codifica al supresor de respuesta a rayos gamma
PBS	Buffer de fosfato salino	ssDNA	DNA de cadena sencilla
PCR	Reacción en cadena de polimerasa	TC-NER	reparación acoplada a la transcripción
PHR1	Proteína de respuesta a inanición Fosfato	T-DNA	DNA de transferencia
PIKs	Familia de proteínas Fosfatidilinositol 3 - Cinasa Cinasa	TFIIH	Factor de transcripción II H
PRPP	Fosforribosil pirofosfato	TK	Gen Timidina Cinasa
		TK1	Gen Timidina Cinasa 1
		TK2	Gen Timidina Cinasa 2
RAD (familia de genes)	Codifican a proteínas de reparación del DNA	ToPBP1	Topoisomerasa 1 de union a DNA
RFC	factor de replicación RAD17	TPD	Síndrome "tapping panel dryness"
RI	Radiación ionizante	TSO2	Gen Ferritin/ribonucleótido reductasa
RNA	Ácido ribonucleico		
RNA _m	RNA mensajero	TTP	Timidina trifosfato
RNA _{pol}	RNA polimerasa	UDP	Uridina difosfato
RNA _r 28S	RNA ribosomal 28s	UK	Uridina Cinasa
RNR	Ribonucleótido reductasa	UMP	Uridina monofosfato
RNR1	Gen Ribonucleótido reductasa 1	UTP	Uridina trifosfato
RNR2A	Gen Ribonucleótido reductasa 2A	UV-A/B/C	Luz Ultravioleta a/B/C
RNR2B	Gen Ribonucleótido reductasa 2B	UVH1	Endonucleasa de restricción tipo II
rNTPs	ribonucleótidos trifosfatos	UVH6	Helicasa de union a DNA tipo RAD
RPA	Proteína de replicación A	UVR2	Fotoliasa 1
		UVR3	Familia de proteínas de fotoliasa
rpm	revoluciones por minuto	XAB2	Proteína XPA de union



X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido
XPA	Factor de reconocimiento y reparación del daño al DNA
XPB	ERCC3, helicasa subunidad del complejo TFIIH
XPC	Factor de reparación y reconocimiento del daño al DNA
XPD	ERCC2, helicasa subunidad del complejo TFIIH
XPF	ERCC4, subunidad endonucleasa catalítica
XPG	ERCC5, endonucleasa
XRCC1	Proteína complemento de la reparación cruzada por rayos X
XRI1	Gen inducido por rayos x



I. Resumen

Las células de las plantas están expuestas a agentes que afectan la integridad del DNA, por lo que han desarrollado mecanismos de respuesta a este tipo de daño. Los primeros pasos en la respuesta de daño al DNA inducen una o más vías de reparación de DNA y la mayoría de estas rutas requieren de un paso en el que se sintetiza el DNA, por lo tanto, durante el proceso de reparación, las pozas de nucleótidos deben mantenerse balanceadas. Además de la vía *de novo* de biosíntesis de nucleótidos, los nucleósidos se reciclan a través de la vía de salvamento. La Timidina Cinasa (TK) fosforila al nucleósido de timidina para producir dTMP y forma parte de la vía de salvamento de pirimidinas. Aunque la TK se conserva filogenéticamente entre los organismos, aún se desconoce su papel en plantas. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica dos genes de la Timidina Cinasa (*TK1a* y *TK1b*), y reportes previos de nuestro laboratorio sugieren la participación de la TK en la respuesta de daño al DNA aportando dTTPs para los pasos de síntesis de DNA en las vías de reparación. Para profundizar en el estudio de la función del gen *TK1a* en la reparación de DNA, en este trabajo se caracterizó la respuesta de las mutantes *knock-out* (KO) (*tk1a-1* y *tk1a-3*) de *Arabidopsis* a tres agentes genotóxicos (luz UV-C, hidroxurea y zeocina) con distintos modos de acción. Bajo las condiciones evaluadas se encontró que las mutantes *tk1a* mostraron hipersensibilidad –determinado por el crecimiento de la raíz– a los tres agentes genotóxicos probados. Asimismo, plántulas sesquimutantes (*tk1b/tk1b*; *TK1a/tk1a*) mostraron hipersensibilidad a las genotoxinas y se desarrollaron pobremente, lo que apoya el papel de la actividad de TK durante el desarrollo temprano de las plántulas. Por otra parte para determinar la vía o vías que regulan la expresión e inducción de *TK1a* en respuesta al daño genotóxico, se utilizaron fusiones transcripcionales *promTK1a::GUS*, y se determinó que la expresión de *TK1a* está regulada por los transductores ATM, y ATR. Estos datos sugieren que el gen *TK1a* participa en la respuesta de daño al DNA inducido por ruptura de doble cadena y contribuye en el aporte de nucleótidos requeridos para los mecanismos de reparación de DNA por escisión de nucleótidos.



II. Introducción

1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio de la biosíntesis de nucleótidos.

El genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (familia *Brassicaceae*) está distribuido en cinco cromosomas y su secuencia se completó a principios de este siglo. El genoma es de aproximadamente 135 megabases, y su anotación predice alrededor de 27,400 genes (<https://www.arabidopsis.org>, 2016). El conocimiento de su genoma, su ciclo de vida corto (de 6 a 8 semanas) y la facilidad de ser transformada por ejemplo por *Agrobacterium tumefaciens*, ha facilitado los estudios de genética directa y genética reversa para definir la función de sus genes. Estas características han hecho de esta planta un modelo de estudio en Biología Vegetal con muchas ventajas, que ha permitido dilucidar programas de desarrollo y vías metabólicas complejas. Una de estas rutas metabólicas es la síntesis de novo de nucleótidos de purinas y de pirimidinas, y en la que se han identificado elementos conservados entre los genes de plantas, animales y microorganismos (Kafer, et al., 2004). En mamíferos se han caracterizado 19 genes involucrados en la síntesis de novo de nucleótidos, de los cuales 13 genes codifican para enzimas de la vía de síntesis de purinas y seis de pirimidinas (Tabla suplementaria 1). En mamíferos, la vía de síntesis de purinas contiene tres enzimas multifuncionales (codificadas por los genes *GART*, *PAICS* y *ATIC*), y una en la biosíntesis de pirimidinas; la proteína CAD, (Carbamoil-fosfato sintetasa, Aspartato trans-carbamilasa y Di-hidroorotasa) que cataliza las primeras tres reacciones (Figura Suplementaria 1 y 2) (Lane & Fan, 2015; Evans & Guy, 2004). En contraste, en plantas, cada una de las reacciones es catalizada por una enzima, producto de un gen distinto (Zrenner, et al., 2006; Schröder, et al., 2005; van der Graaff, et al., 2004).

Además de la ruta biosintética *de novo*, muchas células poseen vías de salvamento de nucleótidos que permiten reciclar bases nitrogenadas y nucleósidos para su reutilización en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estas vías son específicas para purinas y pirimidinas; las enzimas cuya función es la de reciclar



nucleósidos de purina son la Adenosina Cinasa (AK), la Inosina/Guanosina Cinasa (IGK) y la nucleósido fosfo-transferasa inespecífica. Los nucleósidos de pirimidina son reciclados por la Uridina/Citidina Cinasa (UK) y la Timidina Cinasa (TK). El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene los cuatro genes de las cinasas que participan en la vía de salvamento de purinas y pirimidinas (Moffatt & Ashihara, 2002).

2. Biosíntesis de nucleótidos en plantas

El ácido desoxiribonucleico (DNA) constituye el material genético heredable, forma parte de los cromosomas y su duplicación ocurre por el mecanismo semiconservativo durante la fase S del ciclo celular en donde se generan dos copias idénticas del genoma. Por su función de almacenar la información genética, es esencial el mantenimiento de su integridad durante la duplicación y a lo largo de la vida de la célula. Los organismos eucariontes y procariontes han evolucionado múltiples mecanismos que participan en la reparación del DNA cuando éste es dañado. Un requisito esencial para muchos mecanismos de reparación es el abastecimiento de los precursores necesarios, los desoxiribonucleótidos trifosfato, por lo que su disponibilidad y balance es indispensable para la supervivencia celular (Stasolla, et al., 2003; Zrenner, et al., 2006).

La síntesis *de novo* de los dNTPs inicia con la formación de las bases nitrogenadas a partir de precursores como los aminoácidos glicina, glutamina, aspartato, así como formil tetrahidrofolato y CO₂. Las rutas biosintéticas varían entre las bases púricas y pirimídicas, e involucran doce pasos enzimáticos en el caso de las purinas, nueve para la citidina trifosfato y diez para la desoxitimidina trifosfato.

2.1 Biosíntesis *de novo* de pirimidinas

En plantas superiores, algunos detalles de esta ruta biosintética se desconocen, pero los estudios bioquímicos de algunas especies se han complementado con la información genómica y funcional obtenida en *A. thaliana*



(Stasolla, et al., 2003). En plantas, las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina se localizan en el citosol, los plastídios y la mitocondria, por lo que el transporte entre organelos se requiere para completar la biosíntesis de estos compuestos (Kafer, et al., 2004).

La síntesis de pirimidinas comienza en el cloroplasto a partir de carbamoil fosfato y aspartato para la formación de di-hidroorotato (DHO). Éste es transportado a la mitocondria donde la Di-hidroorotato Deshidrogenasa (DHODH) forma orotato, que regresa al cloroplasto y la Orotato Fosforibosil-transferasa incorpora la ribosa a partir de 5' fosforribosil pirofosfato (PRPP) para formar uridina monofosfato (UMP). La UMP se fosforila dos veces en reacciones dependientes de ATP para la biosíntesis de uridina trifosfato (UTP). La aminación del uracilo del UTP genera citidina trifosfato (CTP) (Stasolla, et al., 2003) (Figura 1).

La síntesis *de novo* de desoxitimidina-trifosfato (dTTP) requiere del intermediario uridina-difosfato (UDP), que al igual que el resto de los ribonucleótidos-difosfato, es reducido por la Ribonucleótido-Reductasa (RNR) para la formación de desoxiuridina-difosfato (dUDP), que es desfosforilada y posteriormente metilada por la Timidilato Sintasa para generar desoxitimidina monofosfato (dTMP). Finalmente, la dTMP es fosforilada en dos ocasiones para generar dTTP, el precursor directo del DNA (Figura 2).

La RNR es una enzima heterotetramérica que reduce específicamente el grupo 2'-OH de la ribosa de los ribonucleótidos difosfato (NDP). El complejo RNR es el responsable de la reacción de reducción de los cuatro ribonucleótidos, por lo que su actividad y especificidad está regulada para asegurar un balance en las pozas de dNTPs requeridos para la replicación y reparación del DNA (Berg, et al., 2002). El complejo funcional RNR está compuesto por dos subunidades catalíticas (RNR1) que contienen el sitio catalítico y dos sitios de unión a efectores alostericos, y dos subunidades (RNR2-like) que contienen un centro de unión a hierro requerido para la catálisis enzimática. *A. thaliana* contiene un gen que codifica a RNR1 (AT2G21790) y tres genes (*TSO2*, *RNR2A* y *RNR2B*) que codifican a RNR2-like (Wang & Liu, 2006). Los genes RNR se inducen en respuesta al daño al DNA y se

requieren para la progresión del ciclo celular (Wang & Liu, 2006; Roa, et al., 2009). *RNR2B* es un pseudogen que codifica una subunidad no funcional (Roa, et al., 2009).

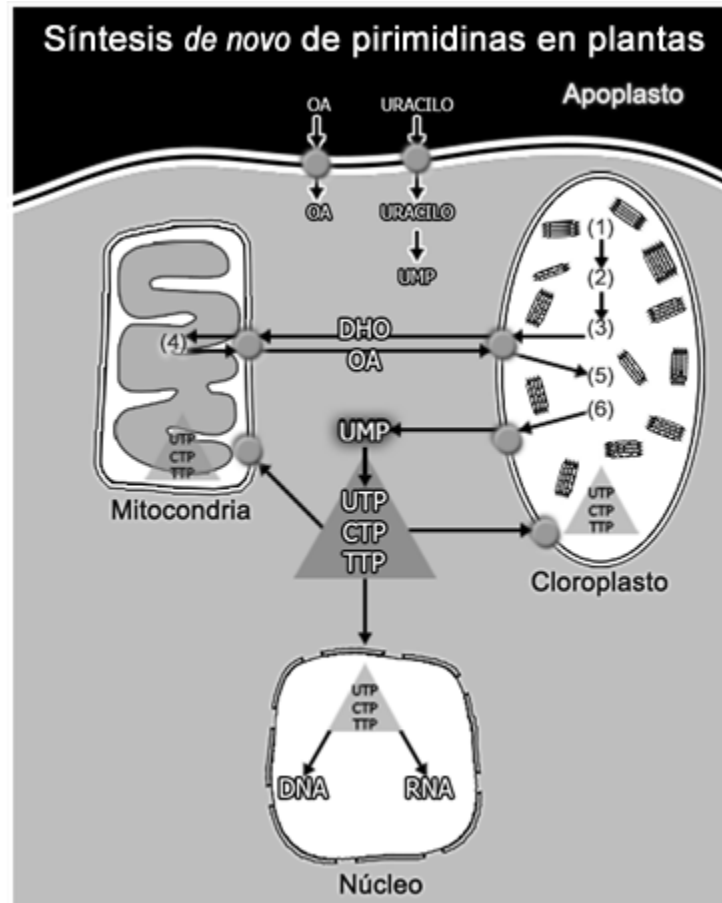


Figura 1. Transporte de intermediarios en la ruta biosintética *de novo* de nucleótidos de pirimidina en plantas y localización de las enzimas que participan en este proceso. Metabolitos: OA, Orotato; DHO, Dihidroorotato; UMP, Uridina monofosfato; UTP, Uridina trifosfato; CTP, citidina trifosfato; TTP, timidina trifosfato. Las enzimas de la vía: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarbamoilasa, (3) dihidroorotasa, (4) dihidroorotato deshidrogenasa, (5)-(6) UMP sintasa (orotato fosforibosiltransferasa más orotidina-5´-fosfato descarboxilasa) (Modificada de Kafer et al., 2004).

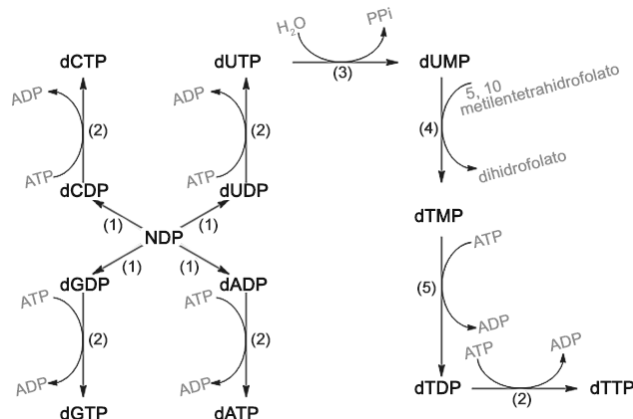


Figura 2. Ruta biosintética *de novo*, la síntesis de desoxirribonucleótidos en plantas. Las reacciones catalizadas por: (1) Ribonucleótido reductasa, (2) Nucleósido difosfato cinasa, (3) dUTP pirofosfatasa, (4) Timidilato sintasa, (5) Nucleósido monofosfato cinasa y/o dTMP cinasa (Stasolla, et al., 2003).

Una vez sintetizados, los ribonucleótidos de purinas y pirimidinas pueden ser utilizados para la síntesis de RNA o ser reducidos por la RNR para ser incorporados al DNA. En células de plantas los niveles de nucleótidos de adenina son los más altos seguidos de los de uracilo, guanina y citosina (Stasolla, et al., 2003), y ribonucleótidos trifosfato (rNTPs) son de 100 a 200 veces más altos que los de dNTPs. En raíces de jitomate, los niveles de dTTP, dCTP, dATP y dGTP son de 2.8, 4.3, 5.4 y 8.4 nmol/mg de tejido fresco, respectivamente (Dutta, et al., 1991). Durante la fase S del ciclo celular, las células requieren mayores niveles de dNTPs para la replicación de sus genomas que las células no proliferativas. Este proceso se lleva a cabo por la reducción de ribonucleótidos difosfato (rNDPs), seguida de una fosforilación catalizada por la nucleósido difosfato cinasa que fosforila tanto a los ribonucleótidos-difosfato como a los desoxirribonucleótidos-difosfato, utilizando al ATP como donador del fosfato.

2.2 Ruta de salvamento

En la vía de salvamento, los nucleósidos son fosforilados para formar nucleótidos, o bien a las bases libres se incorpora PRPP para generar el nucleótido monofosfato (Stasolla, et al., 2003; Zrenner, et al., 2006) (Figura 3, Reacción 1).



Otra ruta para reciclar bases púricas es catalizada por la Adenosina o Inosina/Guanosina Fosforilasa, formando nucleósidos (Figura 3, Reacción 2) que luego se fosforilan para generar AMP, IMP y GMP en reacciones catalizadas por Nucleósido Fosfotransferasas inespecíficas (Figura 3, Reacción 4) o por Adenosina, Inosina/Guanosina Cinasas (Figura 3, Reacción 3). Para el salvamento de los nucleósidos de uridina, citidina y timidina participan enzimas específicas, la Uridina Cinasa (UK) que fosforila a los dos primeros, y la Timidina Cinasa (TK) que fosforila al último (Kafer, et al., 2004; Zrenner, et al., 2006).

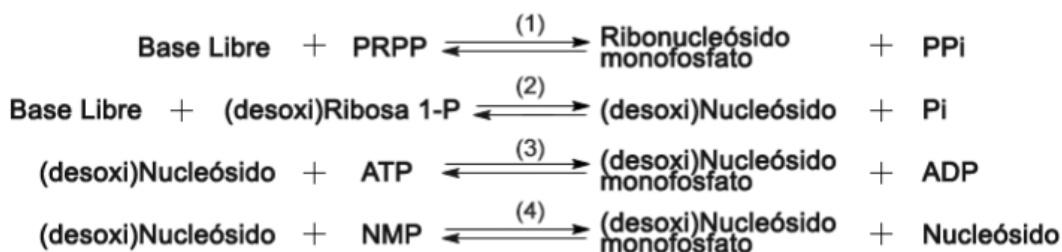


Figura 3. Rutas del salvamento de nucleótidos. Reacciones catalizadas por: 1) Adenina Fosforribosil Transferasa, Hipoxantina/Guanina Fosforribosil Transferasa, Orotato Fosforribosil Transferasa o Uracilo Fosforribosil Transferasa. 2) Adenosina Fosforilasa e Inosina/Guanosina Fosforilasa 3) Adenosina Cinasa e Inosina/Guanosina Cinasa 4) Nucleósido Transferasa.

2.2.1 Timidina Cinasa y su papel en la ruta de salvamento de nucleótidos

El metabolismo de la timidina engloba las reacciones catabólicas como la hidrólisis de timidina en presencia de fosfato para generar timina y desoxi-ribosa 1'-fosfato. Esta reacción es catalizada por la timidina fosforilasa que cataliza la ruptura de la timidina para generar timina y 2'-deoxi-ribosa-1-fosfato. Esta enzima tiene actividad reversible (Figura 4, Reacciones 1 y 4). También, la timidina puede ser fosforilada por la Timidina Cinasa (TK) para formar dTMP (Figura 4, Reacción 2). Este último también se puede generar a partir de dUMP, por la transferencia de un grupo metilo mediada por la timidilato sintasa en una reacción dependiente de metilentetrahidrofolato (Figura 4, Reacción 5).

La TK es una enzima que forma parte de la vía de salvamento de pirimidinas y está conservada en animales, plantas, bacterias, arqueas y virus. La función de la TK es la de fosforilar a la timidina, usando ATP como donador, para producir timidina-5-fosfato (dTMP) (Figura 4), que es precursor de la timidina-5-trifosfato (TTP), nucleótido requerido en la síntesis de DNA.

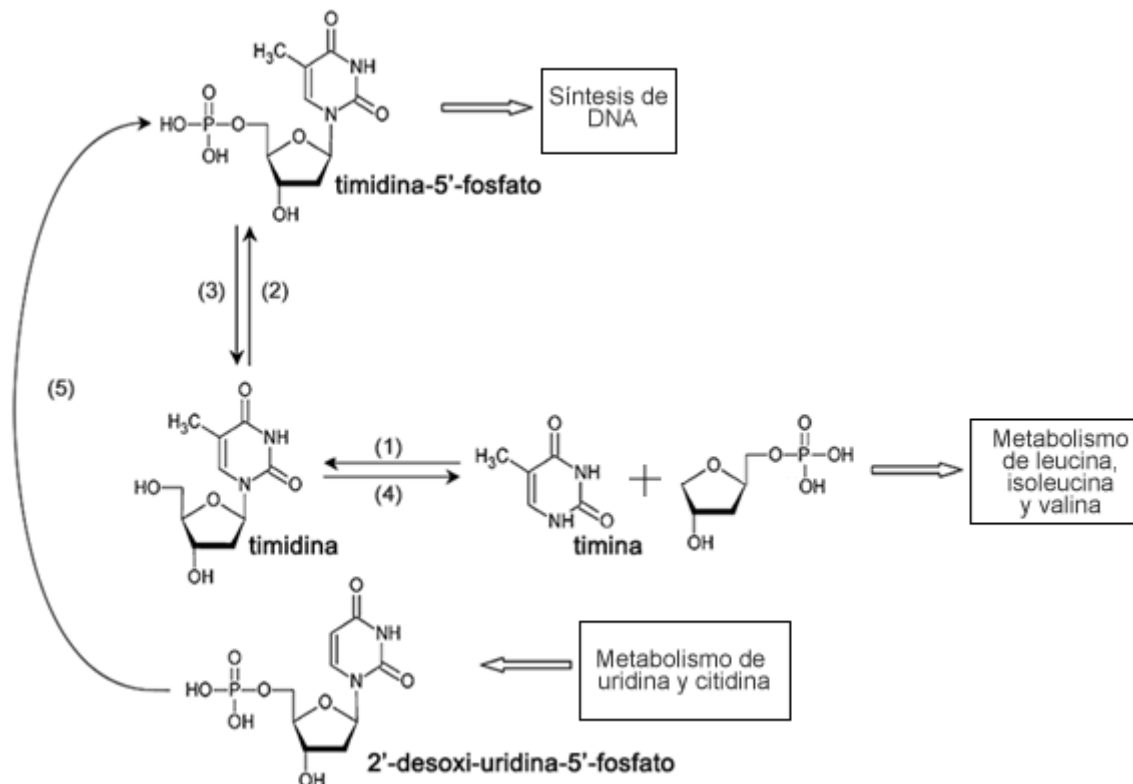


Figura 4. Metabolismo y ruta de salvamento de timidina. Reacciones catalizadas por: (1) y (4) Timidina fosforilasa, (2) Timidina Cinasa, (3) 5'-Nucleotidasa, (5) Timidilato sintasa (dependiente de metilen-tetrahidrofolato). (Dobrovolsky, et al., 2003).

2.2.1.1 Timidina Cinasa de mamíferos.

En mamíferos hay dos isoenzimas, TK1 y TK2. La TK1 se localiza en el citoplasma y los niveles de su transcrito, proteína y actividad enzimática se incrementan durante la fase S del ciclo celular. La TK2 se localiza en la mitocondria y sus niveles son constantes e independientes de la fase del ciclo celular. Las pozas



de dNTPs mitocondriales se encuentran separadas de las citosólicas debido a que la membrana interna mitocondrial es impermeable a las moléculas cargadas. Las pozas mitocondriales se mantienen, ya sea por el importe de dNTPs citosólicos mediante transportadores específicos o por salvamento de nucleótidos dentro de las mitocondrias, pues las enzimas de la vía de síntesis *de novo* están ausentes en la mitocondria (Pontarin, et al., 2003).

La importancia de la función de la TK en mamíferos se refleja por los fenotipos observados como consecuencia de la pérdida de su función. En humanos, mutaciones en el gen *TK2* provocan miopatías de distintos grados y la disminución de la cantidad de DNA mitocondrial durante la infancia. La actividad enzimática de TK2 en las mitocondrias de músculo de los pacientes disminuye del 14 a 45% del valor medio con respecto a los individuos sanos (Saada, et al., 2001).

Por otro lado, ratones *knock-out* en el gen *TK1* presentan un desarrollo normal en etapas tempranas, pero su periodo de vida disminuye a menos de la mitad en comparación a los ratones silvestres. Algunos de estos animales presentan neumonía crónica, esclerosis glomerular, anormalidades en el bazo, páncreas, y riñones. Este fenotipo indica que la inactivación del gen *TK1* modifica el metabolismo de los nucleótidos de timidina, lo que provoca un desbalance en las pozas de dNTPs. Lo anterior sugiere que la vía biosintética *de novo* no es suficiente para corregir esta perturbación en las pozas celulares de nucleótidos (Dobrovolsky, et al., 2003).

También hay evidencias que TK1 participa en la reparación de DNA pues en células tumorales HTC-116 tratadas con distintos agentes genotóxicos (doxorubicina, radiación- γ e hidroxiaurea), aumentan los niveles del transcrito y de la proteína desde las 8 h posteriores al tratamiento (Chen, et al., 2010).

2.2.1.2 Timidina Cinasa de plantas.

El gen para *TK1* está presente en todos los genomas de plantas. Su secuencia se ha anotado (plants.ensembl.org/index.html) y para algunas especies, como *A. thaliana* y maíz, hay datos amplios sobre su expresión transcripcional



durante el desarrollo (<http://bar.utoronto.ca/>). Sin embargo, es aún escasa la información sobre la función celular de esta enzima en plantas.

En el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), se observó una asociación entre los niveles de expresión del gen *TK*, y el síndrome “*tapping panel dryness*” (TPD), condición que afecta la producción de caucho. En tejido no proliferativo sano hay niveles de transcrito *HbTK* que son siete veces más altos que en árboles que presentan TPD, y se especula que el incremento en la expresión de *TK* está involucrado en los mecanismos de reparación de DNA (Venkatachalam, et al., 2010).

El genoma de *A. thaliana* contiene dos genes que codifican Timidina Cinasa, uno en el cromosoma 3 (*TK1a; At3G07800*) y el otro en el cromosoma 5 (*TK1b; At5G23070*) (Figura 5). La enzima *AtTK1a* se encuentra en el citosol, mientras que *AtTK1b* tiene un péptido de tránsito que la localiza en la mitocondria (Xu, et al., 2015) y en cloroplastos (Pedroza-García, et al., 2019). El porcentaje de identidad entre ambas proteínas a nivel de aminoácidos es del 62% y comparten el sitio de unión a Mg^{2+} , el sitio de unión a ATP y el *motif LID*, que forma una “tapa” en el sitio de transferencia del fosfato y que se cierra al unirse ATP (Xu, et al., 2015). El peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de las proteínas codificadas son de 26 kDa y 6.52, para *AtTK1a*, y de 26.4kDa y 6.88 para la *AtTK1b* (Clausen, et al., 2012).

Ambas proteínas se han expresado de forma recombinante en bacteria, lo que ha permitido conocer algunos parámetros cinéticos: *TK1a* tiene una K_m de 0.62 μM para dT y de 15 μM para dU, mientras que la K_m en *TK1b* es de 1.4 μM para dT y de 6.6 μM para dU (Clausen, et al., 2012). El gen *TK1a* se expresa en todos los órganos de planta durante el desarrollo (Figura Suplementaria 3) (The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, 2005), pero su máxima expresión se observa en hojas de la roseta, y la mayor expresión de la *TK1b* ocurre en inflorescencias y silicuas, lo que indica que existe una regulación diferenciada entre los tejidos a lo largo del desarrollo de la planta (Pedroza-García, 2013; Xu, et al., 2015).

Aunque mutaciones en cada uno de los genes no afectan el crecimiento de las plantas, las plántulas doble mutantes tienen un fenotipo albino (que puede

deberse a la localización de la TK1b), crecen lentamente y mueren en etapas tempranas del desarrollo (Clausen, et al., 2012). Esto indica que la actividad de TK1 es esencial para el crecimiento y el desarrollo vegetal.

A)



B)



Figura 5. A) Diagrama de la estructura de los genes *TK1a* y *TK1b* de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra en gris oscuro las secuencias 5' y 3' UTR, en gris claro los exones y en negro los intrones, **B) Diagrama de la estructura de las proteínas TK1a y TK1b.** Se muestran las posiciones de los motivos de unión a ATP, magnesio (Mg^{2+}) y a timidina (T) conservados en ambas enzimas.

3. Mecanismos de reparación de DNA.

3.1 Reparación Directa de DNA. Fotoliasas.

Las plantas están expuestas a varios agentes que dañan el DNA, entre los cuales la luz ultravioleta (UV) de la radiación solar es la más relevante. La fracción UV-B (290-320 nm) y la fracción UV-C (180-290 nm) generan uniones covalentes entre pirimidinas adyacentes en el DNA conocidos como dímeros de pirimidina ciclo butano (CPDs) y/o los foto-productos de 6,4 pirimidina-pirimidona ([6,4] PPs) (Figura 6). La presencia de este tipo de daño bloquea el avance de la horquilla de replicación durante la síntesis de DNA, y si no son reparados puede ocurrir una mutación, pues

las DNA polimerasas son susceptibles a cometer errores (Al Khateeb & Schroeder, 2009). Un mecanismo de reparación directa de estos daños es la fotoreactivación, mediada por fotoliasas, que rompen los enlaces covalentes formados entre las pirimidinas para reparar al DNA. *A. thaliana* posee dos genes que codifican fotoliasas, el gen de la fotoliasa 1 (Photolyase 1: PHR1 conocido también como UV Resistance 2: UVR2), que responde específicamente a CPDs y el gen que codifica a la 6-4 fotoliasa (UV Repair-defective 3: UVR3). En reacciones dependientes de luz, las fotoliasas se unen a las lesiones de pirimidina y su cofactor, metilentetrahidrofolato (MTHF), y absorbe un fotón en la región del espectro de la luz azul (UV-A; 320-400 nm). Este cromóforo transfiere la energía al otro cofactor (FADH), que actúa como centro de reacción fotoquímica donando un electrón al ciclo butano para romper los enlaces covalentes (Weaver, 2002).

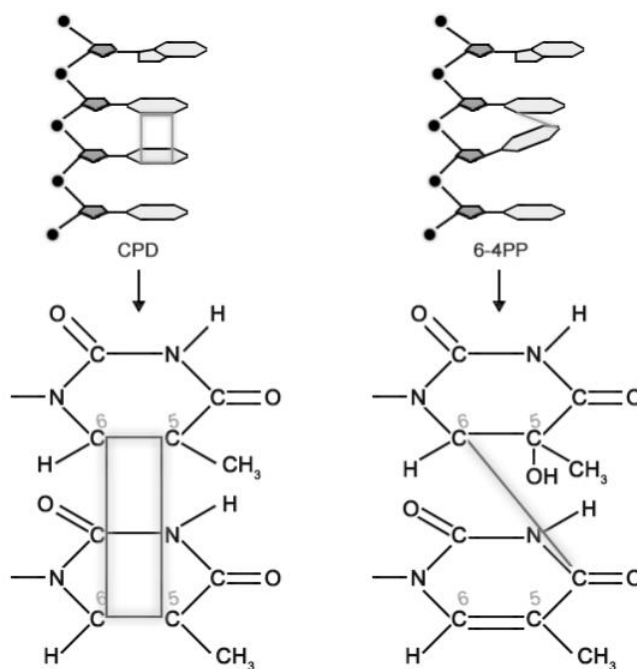


Figura 6. Foto-productos en el DNA por radiación ultravioleta (UV) formados a partir de timinas adyacentes. CPD, dímeros de pirimidina ciclo butano; [6,4] PPs, foto-productos de pirimidina pirimidona.



3.2 Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

Si bien la fotoreactivación es un mecanismo muy eficiente de reparación del DNA, ésta es exclusiva para revertir directamente la formación de dímeros de timina. Hay otras vías de reparación que implican la remoción de un fragmento de la cadena de DNA dañada, seguida por la síntesis *de novo* de DNA en la que se emplea a la cadena intacta como molde. Estos mecanismos de reparación, conocidos como escisión de nucleótidos (NER), requieren la síntesis activa de DNA (Al Khateeb & Schroeder, 2009) y, a diferencia de la fotoreactivación, esta es independiente de luz, y es capaz de reparar varios tipos de daño. Dentro de NER, se distinguen dos sistemas, la reparación global del genoma (GG-NER) y la reparación acoplada a la transcripción (TC-NER). Esta última actúa sobre genes que se expresan, y en ella participan cerca de 30 proteínas que reconocen la región dañada y contribuyen a su reparación (Figura 7). La GG-NER actúa sobre las lesiones en diversas partes del genoma.

En general, los pasos que se siguen para la detección del daño y reparación incluyen: 1) El reconocimiento del daño en el DNA. En GG-NER el DNA dañado es reconocido por el complejo XPC- RAD23B, B (DDB1-DDB2) (Sugasawa, et al., 2005). En TC-NER, es el complejo formado por la RNA polimerasa (I, II o III) y los factores CSA/CSB (Proteínas *Cockayne Syndrome A/B*) y XAB2 (*XPA-binding protein 2*), el que reconoce la lesión en el DNA. Una vez que el daño es detectado el mecanismo de reparación, este se comparte por ambas vías, y se describe a continuación (Nakatsu, et al., 2000).

2) Formación de complejos de reparación: El factor de transcripción II H (TFIIH) es reclutado al sitio de la lesión. TFIIH está conformado por las helicasas XPB y XPD, además de la Cinasa Activadora de CdK (CAK) y otras proteínas. TFIIH y XPD contribuyen a desenrollar el DNA en el sitio de la lesión (Kuper, et al., 2014), lo que conduce al reclutamiento de las proteínas XPA, XPC-HR23B, RPA, XPG y, ERCC1-XPF (Fousteri & Mullenders, 2008).



3) Escisión del segmento de DNA dañado. XPG tiene actividad de endonucleasa y realiza el mellado en el extremo 3' de la cadena dañada, mientras que ERCC1-XPF corta del lado 5'. El oligonucleótido generado es de 24 a 36 nucleótidos de cadena sencilla que contiene el sitio dañado (Fousteri & Mullenders, 2008).

4) Síntesis reparativa de DNA y ligación. La síntesis de reparación es realizada por las DNA polimerasas δ , ϵ y κ , dependiendo la accesibilidad de la cromatina en el sitio del daño. La reparación la completa la DNA ligasa I o DNA ligasa III α que sella el enlace fosfodiéster (Fousteri & Mullenders, 2008).

El genoma de Arabidopsis codifica los homólogos de XPB (AtXPB1 y 2), XPD (AtXPD o UVH6: Ultraviolet hypersensitive 6), XPF (AtRAD1 o UVH1: Ultraviolet hypersensitive 6), el de CSA (AtCSA1), y el de XRCC1: que forman parte de la vía de NER.

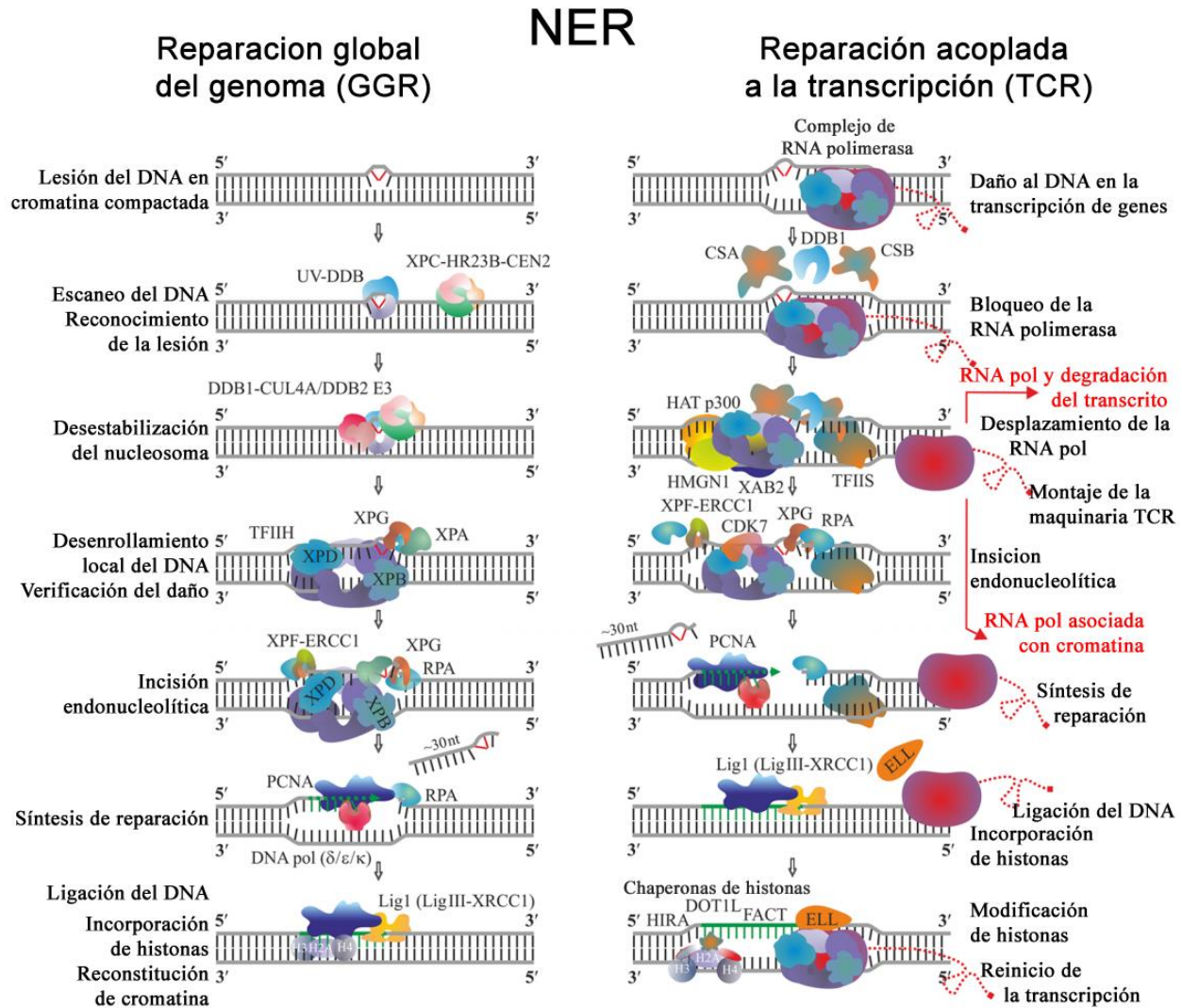


Figura 7. Representación esquemática de GG-NER y TC-NER en eucariontes.

Proteínas que participan: CDK7: Ciclina dependiente de cinasa 7; CEN2: *Centrin2*; CSA/CSB: Proteína *Cockayne Syndrome A/B*; CUL4A: *Cullin4A*; DDB1/2: Proteína de unión a DNA dañado 1/2; DOTIL: Metiltransferasa de histona H3K79 tipo DOT1; ELL: *Eleven-nineteen lysine-rich leukemia* (Factor de elongación de la RNA polimerasa II); ERCC1: Grupo de reparación por escisión de complementación cruzada; FACT: Facilitador de la transcripción de la cromatina; HAT p300: Acetil-transferasa de histona; HIRA: Histona reguladora del ciclo celular; HMG1: Grupo 1 de alta movilidad de unión al nucleosoma; HR23B: Homólogo B de la proteína RAD23 de reparación de UV por escisión; Lig1 (LigIII-XRCC1): Ligasa 1; PCNA: Antígeno de proliferación celular nuclear; RPA: Proteína de replicación A; TFIIH: Factor de transcripción II humano; TFIIIS: Factor de elongación de la transcripción IIS; UV DDB: Hetero-dímero compuesto por DDB1 y DDB2; XAB2: Proteína de unión a XPA; XPA/G: Grupo de complementación *Xeroderma pigmentosum A/G*; XRCC1: Proteína complemento de la reparación cruzada por rayos X. Modificado de Manova & Gruszka, 2015.



La reparación de DSB por recombinación homóloga comienza por el reconocimiento de la lesión por el complejo MRN (MRE11/Rad50/Nbs1), MRE11 posee la actividad de nucleasa que genera DNA de cadena sencilla (ssDNA) en los extremos de la DSB. La proteína RAD52 se une al ssDNA promoviendo su alineación y estimulando la actividad de RAD51 (Brouwer, et al., 2017), que forma filamentos de nucleoproteínas esenciales para la búsqueda de la homología entre las cadenas y, en asociación con RAD54, cataliza la formación de moléculas de unión (asa D) (Jaskelioff, et al., 2003). Cuando la asa D está alineada, los extremos 3' del ssDNA son extendidos por la DNA polimerasa empleando la secuencia homóloga como molde para reparar las secuencias perdidas de DSBs. Posteriormente, el segundo extremo del ADN roto se une y es ligado, paso que puede realizarse con la formación de estructuras Holliday, que se resuelven para dar productos cruzados o no cruzados (Pardo, et al., 2009).

3.4 Respuesta de daño al DNA (DDR)

Un requisito fundamental para que ocurra la reparación del DNA es la detección del daño. Dado que el genoma está expuesto a factores tanto endógenos como exógenos que ocasionan distintos tipos de daño en el DNA, las células eucariontes han evolucionado mecanismos de percepción del daño genómico acoplado a una reacción, conocida como respuesta de daño al DNA (DDR; DNA Damage Response). Su función es coordinar las actividades de reparación y de replicación del DNA con la progresión del ciclo celular y en su caso, la muerte celular (Lazzaro, et al., 2009). Los sistemas DDR se encargan de detectar el tipo de daño en el DNA, detener el ciclo celular, activar la expresión de genes de proteínas que participan en la reparación de las lesiones del DNA y, si es necesario, por la magnitud del daño, inducir la muerte celular programada (Yoshiyama, et al., 2013 A).



A nivel molecular las proteínas de la vía DDR se conocen como: sensores, transductores, mediadores y efectores (Figura 8) (Yoshiyama, et al., 2013 A). Los sensores reconocen diferentes formas de daño al DNA, se unen a estas regiones y reclutan a los transductores a estos sitios. La señal de los sensores es amplificada por los transductores para reclutar efectores en el sitio del daño y finalmente realizar la reparación del DNA. Los mediadores tienen como función la regulación de los factores antes mencionados para respuestas específicas.

Los dos transductores que definen las vías de DDR son las proteínas cinasas: Ataxia telangiectasia mutada (ATM) y ataxia telangiectasia relacionada a Rad3 (ATR), ambos transductores están conservados en células de plantas y animales. Estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas relacionadas a fosfatidilinositol 3-cinasa (PIKKs). ATM y ATR fosforilan proteínas para iniciar la cascada de señalización que incluye como sustratos comunes a las cinasas Chk1 y Chk2 que se encargan de un segundo evento de fosforilación que amplifica la señal (figura suplementaria 4). La mayoría de los componentes de la DDR están conservados en mamíferos y plantas. A continuación, se describen las características de estas proteínas de *Arabidopsis*.

3.5.1 Vía ATM

El gen *ATM* se localiza en el cromosoma 3 (AT3G48190.1) del genoma de *A. thaliana* y se expresa a niveles bajos en todos los tejidos (García, et al., 2000). La expresión de *AtATM* es inducida en respuesta a DSBs, con agentes como zeocina o radiaciones ionizantes (García, et al., 2003), en mamíferos ATM es el transductor primario de respuesta celular ante DSBs, además de actuar como sensor del daño al DNA. (Auclair & Richard, 2013). El otro sensor es el complejo MRE11/RAD50/NBS1 (MRN), que se une a un sitio DSBs. Los sustratos de ATM en mamíferos incluyen los factores de transcripción p53 y E2F1, las proteínas *checkpoint*: CHK2, RAD17 y RAD9, así como las proteínas de reparación del DNA: XPA, BRCA1, NSB1 y CDC25A (figura suplementaria 4) (Kim, et al., 2007; Helton & Chen, 2007; Auclair & Richard, 2013).

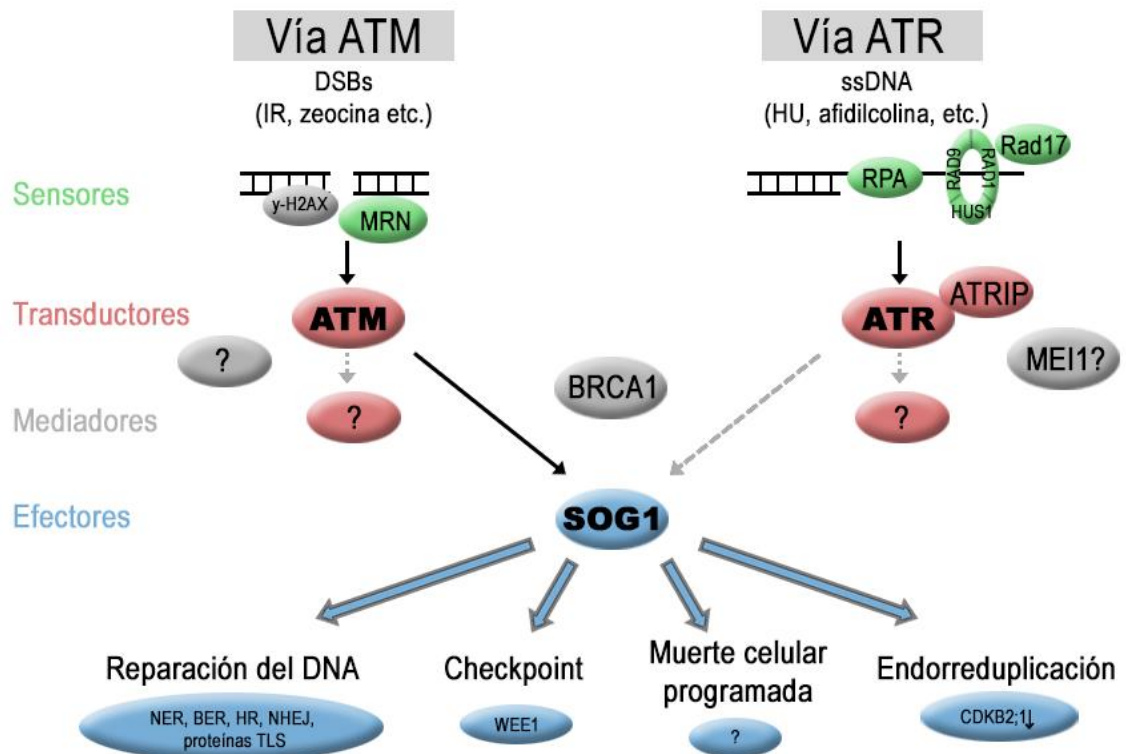


Figura 8. Vías de respuesta de daño al DNA, ATM y ATR, en plantas. La señal del daño al DNA comienza en los sensores mostrados en verde, la señal es transducida por cinasas mostradas en rojo, los mediadores se muestran en gris, y los efectores se muestran en azul, resolviendo en la reparación del DNA, el punto de control de ciclo celular, muerte celular programada y endorreduplicación (Yoshiyama, et al., 2013 B).

En mamíferos, una mutación en ATM resulta en defectos pleiotrópicos (defectos de crecimiento, disfunción neurológica e infertilidad) (Xu, et al., 1996), mientras que en *A. thaliana* las mutantes *atm* son hipersensibles a agentes genotóxicos que inducen DSB y muestran una expresión reducida de genes como *BRCA1* (*Breast Cancer Susceptibility 1*), *XRI1* (*x-ray induced transcript 1*), *MSRB7* (*methionine sulfoxide reductase B7*), *TSO2* y *TK1a* (Culligan, et al., 2006), entre otros. *A. thaliana* tiene homólogos del complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBS1) y en mutantes en *rad50* o *mre11* no ocurre la fosforilación de H2AX en respuesta a radiación ionizante, lo que sugiere que el complejo MRN actúa como sensor de DDR para este tipo de lesión (Yoshiyama, et al., 2013 A). En *A. thaliana* no hay ortólogos



de CHK1 y CHK2, pero sí de los sustratos de estas cinasas de mamíferos, como BRCA1 y E2F, lo que sugiere que otras cinasas pueden funcionar como ortólogos funcionales de CHK1 y CHK2 en plantas.

3.5.2 Vía ATR

ATR transduce las señales en la respuesta de daño al DNA, como lo son DSBs, aductos, DNA entrecruzado y estrés replicativo, y en una vía que puede detener la progresión del ciclo celular. Cuando hay estrés replicativo y se genera ssDNA, la proteína de replicación A (RPA) funge como sensor y se une al monofilamento de DNA (Fanning, et al., 2006). En *Arabidopsis*, el gen ATR se encuentra en el cromosoma 5 (AT5G40820) y se expresa durante todas las etapas del desarrollo de la planta. Es fuertemente inducido por agentes bloqueadores de la replicación (luz UV, afidicolina e hidroxiurea), y ligeramente inducido por agentes que causan rupturas en el DNA, como la radiación gamma (Culligan, et al., 2004). Las plantas mutantes *atr* son fenotípicamente normales en ausencia de agentes genotóxicos, pero son hipersensibles a agentes que inducen estrés por replicación como hidroxiurea y afidicolina (Culligan, et al., 2004).

La vía de ATR en plantas es similar a la de humanos pues la inactivación de RPA70a de *A. thaliana*, causa un aumento en la sensibilidad al estrés replicativo causado por hidroxiurea (HU), lo que sugiere que RPA tiene un papel importante en la percepción de ssDNA (Takashi, et al., 2009). *Arabidopsis* también contiene genes homólogos del complejo 9-1-1 (RAD9/RAD1/HUS1) y RAD17, que conservan dominios con su contraparte humana. Las mutantes en *rad17* y *rad9* en *A. thaliana* son sensibles a bleomicina (BLM) y mitomicina C (MMC) con fenotipos similares a las mutantes correspondientes en genes humanos (Heitzeberg, et al., 2004).

La mayoría de los componentes de las vías de ATM y ATR están conservados entre plantas y animales, con la excepción notable del factor transcripcional p53 que está ausente en plantas. Sin embargo, esta paradoja parece resolverse con el descubrimiento y caracterización de SOG1.



3.5.3 SOG1 y su función en la respuesta de daño al DNA

El gen *SOG1* (Suppressor of Gamma Response) fue descubierto en *Arabidopsis* a través de la caracterización de mutantes que presentan defectos en la reparación por la endonucleasa XPF (Yoshiyama, et al., 2009). *SOG1* de *A. thaliana* es expresada en meristemas apicales, primordios de raíz laterales y en la estela de raíz (Yoshiyama, et al., 2013 A). Funciona como un factor transcripcional en la vía DDR de plantas y controla la expresión de cientos de genes que son inducidos en respuesta a RI, y cuya expresión disminuye en mutantes *sog1* (Furukawa, et al., 2010).

SOG1 es fosforilada por ATM durante la DDR, en mutantes que son incapaces de fosforilar a *SOG1* se pierden las funciones de transactivación. Aunque no hay similitud entre las estructuras primarias de p53 y *SOG1*, parecen ser ortólogos funcionales por su actividad durante la DDR (Figura 8) (Yoshiyama, et al., 2013 A).

4. Antecedentes. Función de la TK en reparación de DNA en plantas.

Como se describió anteriormente, *TK1a* y *TK1b* de *Arabidopsis* tienen un patrón de expresión similar a lo largo del desarrollo (Pedroza-Garcia, et al., 2015). Sin embargo, cuando plántulas de 7 días son irradiadas con luz UV-C, se induce la transcripción del gen *TK1a* durante las primeras horas post-irradiación, mientras que los niveles de transcrito del gen *TK1b* permanecen inalterados (Pedroza-Garcia, et al., 2015); (Figura 9). Asimismo, el gen *TK1a* es fuertemente inducido por zeocina, y por mitomicina, un agente entrecruzador del DNA. Estos datos asociativos apoyan una función de la *TK1a* en la reparación de DNA y esto se confirmó por la caracterización de una línea mutante (*oeTK1a*) que contiene una inserción de T-DNA en el promotor del gen *TK1a*. Esta inserción causa una mayor expresión del gen que en las plantas silvestres, y además estas mutantes son más tolerantes a luz UV-C, mitomicina C y zeocina. (Pedroza-Garcia, et al., 2015). Asimismo, la línea

oeTK1a es más eficiente en reparar los dímeros de timina que se generan, lo que apoya que el gen *TK1a* participa en los mecanismos de reparación del DNA, posiblemente al aportar dTTPs requeridos en las vías de reparación NER (Pedroza-García, et al., 2015).

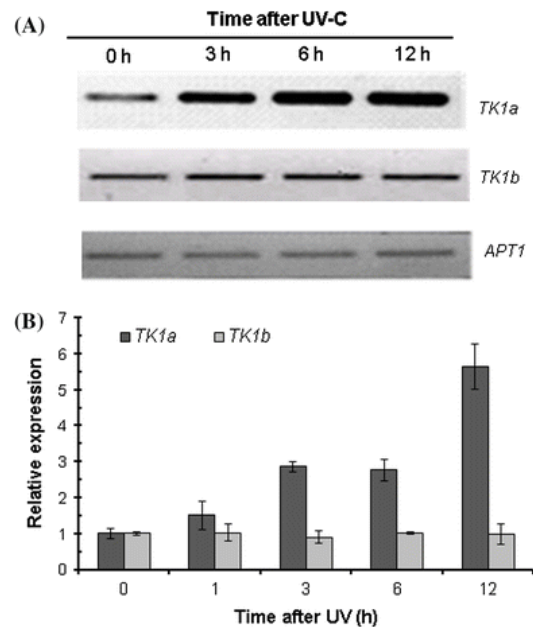


Figura 9. Respuesta diferencial de los genes *AtTK1a* y *AtTK1b* a radiación con luz UV-C. A) Niveles de transcritos de *TK1a* y *TK1b* evaluados por RT-PCR punto final en plántulas después de 3, 6 y 12 horas de irradiación con luz UV-C. B) Niveles de transcrito de *TK1a* y *TK1b* evaluados por qRT-PCR tiempo real en plántulas de *Arabidopsis* antes y después de la irradiación con luz UV-C (Pedroza-García, et al., 2015).

Para profundizar en el estudio de la función del gen *TK1a* se genotipificaron dos líneas mutantes con una inserción de T-DNA en el intrón 3 (SALK_094632; *tk1a-3*) y en el exón 4 (SALK_097767; *tk1a-1*) del gen (Figura 10). Las líneas mutantes homocigotas resultaron *knock-out* para *TK1a* pues no se detecta la presencia del transcrito (Figura 11 (de la Rosa-Ortega, 2016)).

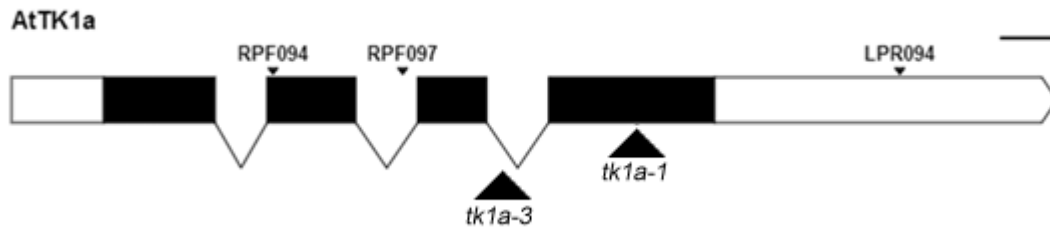


Figura 10. Estructura del gen *AtTK1a* y posición de las inserciones de T-DNA en las líneas SALK_094632 (*tk1a-3*) y SALK_097767 (*tk1a-1*). Se muestran en cajas negras los exones y con líneas intermedias los intrones; se indican las posiciones de los cebadores utilizados en el mapeo en la parte superior y los sitios en los cuales se encuentran los insertos de T-DNA en cada línea mutante en la parte inferior. En la esquina superior derecha se puede ver la escala con una línea que representa 100 pb.

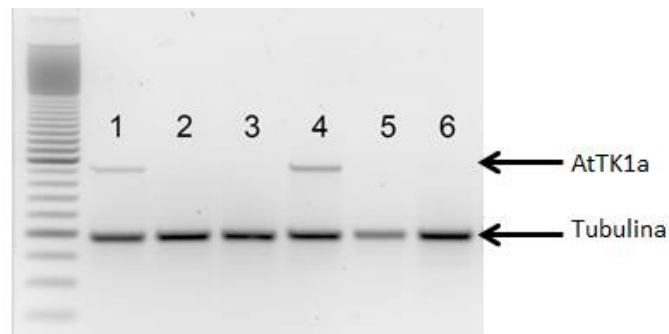


Figura 11. Niveles de los transcritos *AtTK1a* y *TUB* por RT-PCR punto final en plantas silvestres Col-0 y mutantes SALK_094632 (*tk1a-3*) y SALK_097767 (*tk1a-1*). Orden de cargado: Marcador 100 pares de bases, cDNA planta silvestre (1, 4), cDNA mutante SALK_09767 (2, 5), cDNA mutante SALK_094632 (3,6). Se indica la posición donde migran los amplicones de *AtTK1a* (869 pb) y de *AtTub* (483 pb) en el gel de agarosa (2.5%).

Aunque estas dos líneas mutantes homocigotas de *TK1a* tienen un fenotipo de desarrollo similar a las plantas silvestres (Col-0), no se conoce su respuesta a agentes genotóxicos. Para estudiar la función de este gen en la respuesta a estrés genotóxico este estudio se concentró en la caracterización del efecto de tres agentes genotóxicos en las mutantes *tk1a*, así como en la regulación de la expresión de este gen por las vías ATM y ATR durante la DDR.



III. Hipótesis

Dado que el gen *TK1a* de *Arabidopsis thaliana* se induce en presencia de distintos agentes genotóxicos, este gen participa en una o más vías de respuesta de daño al DNA.

IV. Objetivos

1. Objetivo General:

Determinar la participación de *TK1a* en la respuesta de daño al DNA.

2. Objetivos Particulares:

- Determinar los niveles de expresión transcripcional de los genes de la vía de síntesis *de novo* y de salvamento de nucleótidos en las líneas Knock out (KO) para *TK1a*.
- Caracterizar la respuesta de las líneas KO y sobreexpresora para *TK1a* ante estrés genotóxico (luz UV-C, zeocina e hidroxiurea).
- Caracterizar la respuesta de las líneas heterocigotas (*TK1a/tk1a*) a estrés genotóxico (luz UV-C, zeocina e hidroxiurea) en la ausencia de *TK1b*.
- Evaluar el patrón de expresión del gen *TK1a* en el fondo silvestre y en las mutantes *atm* y *atr*.
- Evaluar el patrón de expresión del gen *TK1a* en el fondo silvestre y en las mutantes *atm* y *atr* en respuesta a estrés genotóxico (luz UV-C, hidroxiurea y zeocina).



V. Materiales y Métodos

Material biológico

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (ecotipo Columbia, Col-0) obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC; www.arabidopsis.org). El resto de los genotipos y líneas transgénicas usadas en este trabajo se obtuvieron del Institute of Plant Sciences, Université Paris-Sud, (IPS-UPS) como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Líneas transgénicas y mutantes de *Arabidopsis* empleadas en este trabajo

Nombre de línea o mutante	Característica	Origen
Col-0	Línea silvestre	ABRC
SALK_097767: tk1a-1	Mutante <i>KO</i> en el gen <i>TK1a</i> (Exón 4)	ABRC
SALK_094632: tk1a-3	Mutante <i>KO</i> en el gen <i>TK1a</i> (Intrón 3)	ABRC
<i>p35S-TK1a::HA</i>	Sobre expresa <i>TK1a</i> bajo el control del promotor 35S	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; Institute Plant Sci. U. Paris
SALK_07256: tk1b	Mutante <i>Knock-down</i> en el gen <i>TK1b</i>	ABRC
bx1-1+	Fondo mutante <i>tk1b/tk1b</i> y mutante heterocigota <i>TK1a/tk1a (tk1a-1)</i>	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; IPS-UPS
bx1-3+	Fondo mutante <i>tk1b/tk1b</i> y mutante heterocigota <i>TK1a/tk1a (tk1a-3)</i>	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; IPS-UPS
SALK_006953: <i>atm-2 atm</i>	Mutante <i>KO</i> en el gen <i>ATM</i>	ABRC
SALK_032841: <i>atr-2 atr</i>	Mutante <i>KO</i> en el gen <i>ATR</i>	ABRC
<i>Col-0 pTK1a::GUS</i>	Línea silvestre con la fusión quimérica del promotor de <i>TK1a</i> fusionada a <i>GUS</i>	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; IPS-UPS



<i>atm pTK1a::GUS</i>	Línea <i>atm-2</i> con la fusión quimérica del promotor de <i>TK1a</i> fusionada a <i>GUS</i>	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; IPS-UPS
<i>atr pTK1a::GUS</i>	Línea <i>atr-2</i> con la fusión quimérica del promotor de <i>TK1a</i> fusionada a <i>GUS</i>	Generada por el Dr. J.A. Pedroza-García; IPS-UPS

Las mutantes se propagaron hasta la generación F3/F4 y se confirmaron como homocigotas y *knock-out* (KO) para el gen *TK1a* (de la Rosa-Ortega, 2016).

Soluciones Amortiguadoras

La preparación de todas las soluciones empleadas en este trabajo se describe detalladamente en el Anexo de Amortiguadores y reactivos

1. Procedimientos generales

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

Previo a todos los ensayos, las semillas se desinfectaron en agitación constante con hipoclorito de sodio (1%) y Tween-20 (0.05%) durante 15 minutos, a continuación, se centrifugaron en la nanofuga, el líquido se decantó y las semillas se lavaron con agua desionizada estéril en cuatro ocasiones.

1.2 Propagación de las líneas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri con medio Gamborg's B-5 (Sigma) (GB5), suplementado con agar (1 %), se vernalizaron a 4°C durante 48 horas en oscuridad, y se incubaron a 22°C con un fotoperiodo de 8 horas de luz por 16 horas de oscuridad (día corto) en una cámara de crecimiento Lab-line Biotronette (Weigel & Glazebrook, 2002). Cuando las plántulas desarrollaron hojas verdaderas se trasplantaron a macetas que contenían una mezcla de SunGroMix#3: agrolita: vermiculita en una proporción de 2:2:1. Las plantas se mantuvieron en condiciones de día corto a 22°C y se regaron periódicamente con agua y una vez a la semana con solución de Hoagland (Anexo de Amortiguadores y reactivos). Se indujo la floración por modificación del fotoperiodo a luz continua y se colectaron



semillas de las silicuas en maduración. Éstas se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente una semana y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

1.3 Ensayos de germinación.

Para cada lote de semillas se evaluó el % de germinación en medio GB5 (1 % de agar). Para todos los experimentos se emplearon lotes con un porcentaje de germinación mayor al 90%.

2. Evaluación fenotípica de mutantes KO para TK1a en respuesta a agentes genotóxicos

Se evaluó la respuesta de las líneas mutantes *tk1a-1*, *tk1a-3*, Col-0 y p35S:TK1a::HA a luz UV-C, zeocina e hidroxurea. Se emplearon como controles positivos las líneas mutantes *atm* o *atr* pues son hipersensibles a distintos agentes (García, et al., 2000, Culligan, et al., 2004, Culligan, et al., 2006). Se utilizaron los parámetros de porcentaje de hojas verdaderas y longitud de raíz para evaluar la sensibilidad al estrés genotóxico de las líneas mutantes a los diferentes tipos de daño (Pedroza-García, et al., 2016). Estos experimentos se realizaron en medio Gamborg, con presencia de sacarosa (1%) en una primera aproximación y en ausencia de sacarosa en experimentos posteriores debido a las observaciones detalladas en la subsección de Resultados: *Respuesta de las líneas mutantes TK1a a estrés genotóxico*.

2.1 Ensayo de sensibilidad a UV-C en el crecimiento de la raíz y desarrollo de hojas verdaderas

Se desinfectaron y se sembraron semillas de las líneas evaluadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro para crecimiento vertical en medio GB5 (0.8% de agar) y se vernalizaron a 4°C durante 48 horas. Las cajas se incubaron en posición vertical a 22°C en fotoperiodo de día corto, terminado el cuarto día de incubación, se marcó la longitud de la raíz y las plántulas se irradiaron con luz UV-C utilizando una lámpara Compact UV Lamp UVGL-25 (254 nm; 10 J/m²/s) durante 6 minutos en el



cuarto oscuro. Las cajas se cubrieron con papel aluminio para evitar la activación de las fotoliasas por la luz visible. Las cajas se incubaron en oscuridad a 22°C durante 24 horas, posteriormente, las cajas se descubrieron y se incubaron a 22°C con fotoperiodo de día corto por 4 días más. Al quinto día post-irradiación se determinó el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas y en el sexto día post-irradiación se midió la longitud de la raíz primaria.

2.2 Ensayo de sensibilidad a hidroxiurea y zeocina en el crecimiento de la raíz y desarrollo de hojas verdaderas

Se prepararon medios GB5 (0.8 % de agar) suplementados con soluciones acuosas de hidroxiurea (concentraciones finales: 0.2 mM y 0.3 mM) o zeocina (concentraciones finales de 5 μ M y 10). En los medios se sembraron semillas de las líneas a evaluar, se vernalizaron por 48 horas a 4°C y se incubaron a 22°C con fotoperiodo de día corto. En el noveno día post-incubación se determinó el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas. Al décimo día, las plántulas se sumergieron individualmente en una solución de montaje (1:1 vol/vol de PBS y glicerol 50%). Esto permite la manipulación de las plántulas para alinearlas sobre una hoja de acetato con la raíz primaria extendida para su medición.

3. Ensayos de RT-PCR punto final para determinar niveles de RNAm.

En la caracterización de las mutantes *tk1a*, se evaluaron los niveles de transcrito de los genes *TK1b*, y de las subunidades *RNR1* y *TSO2* de la ribonucleótido reductasa. Se empleó el gen de la adenosina-fosforibosiltransferasa (*APT*) como referencia para la normalización de la reacción de RT-PCR pues este gen no es inducido por estrés genotóxico (Pedroza-Garcia, et al., 2015).



3.1 Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de plántulas de 10 días de desarrollo de las líneas Col-0, *tk1a-3*, *tk1a-1*, *p35S:TK1a::HA* cultivadas en medio GB5 y en ausencia de agentes genotóxicos. El tejido se pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero estéril hasta obtener un polvo fino, se agregó Trizol (Invitrogen) en una relación 3:1 (masa/ vol). Se homogeneizó la mezcla en frío y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. La muestra se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 13,000 rpm (11357 g) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (FCI, 25:24:1), se agitó la mezcla por inversión durante 15 segundos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 1.5 mL y se añadieron 400 µL de CHCl₃. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron nuevamente 400 µL de CHCl₃ y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se le agregó un volumen de isopropanol, se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó, el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% en dos ocasiones centrifugando entre los lavados a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 500 µL de H₂O-DEPC y se le añadieron 167 µL de LiCl 8 M, la mezcla se incubó a 4°C durante toda una noche. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C, el botón obtenido se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC y se agregaron 500 µL de etanol absoluto y 25 µL de acetato de sodio 3 M, se incubó la muestra durante toda la noche a -70°C. Posterior a la incubación la muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con 1 mL de etanol absoluto en dos ocasiones. Se eliminó el etanol y el botón se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el botón se disolvió en 40 µL de H₂O-DEPC y la concentración de RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 Thermo Scientific. Las muestras de RNA se almacenaron a -70°C hasta su uso.



3.2 Calibración del RNA total.

Además de la cuantificación espectrofotométrica, el RNA se calibró mediante el corrimiento electroforético de 1 µg de RNA total en geles de agarosa (3 %) teñidos con bromuro de etidio. El gel se corrió a 100 mV por 30 minutos y se visualizó en el ChemiDoc™ MP Imaging System con Software Image Lab™ de Bio-Rad. La imagen capturada se analizó con el programa ImageJ y se hizo el análisis densitométrico de la banda correspondiente al RNAr 28S. Este análisis permitió homogenizar las cantidades de RNA total entre las muestras con el criterio que estas diferencias fueran menores al 10%.

3.3 Reacción de transcripción reversa

Para la síntesis de cDNA se mezcló 1 µg de RNA total (previamente calibrado) con 10 µL de H₂O-DEPC y 1 µL de Oligo dT (5'-T₂₅VN-3'; 61µM) y se incubó por 5 minutos a 70°C (desnaturalización). Los tubos se enfriaron en hielo (4°C) por 5 minutos y a cada uno se agregaron 15 µL de mezcla de reacción de RT (Tabla 2) y se incubó a 25°C (alineamiento) durante 5 minutos, y a 42°C (síntesis de cDNA) por 60 minutos. Finalmente se inactivó la enzima RT por calentamiento a 70°C por 15 minutos, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

El cDNA, producto de la RT, se utilizó como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de una secuencia específica en los RNA mensajeros y así evaluar los niveles de éstos para cada uno de los genes.

Tabla 2. Mezcla de reacción de RT.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer ImProm-II 5X ¹	4.0	0.8 X
MgCl ₂ 25mM.	2.4	2.4 mM
dNTP's 10mM	1.0	0.4 mM
RT (Transcriptasa reversa) ¹	1.0	10 U/µL
H ₂ O-DEPC	cbp 15 µL	-----

¹ Promega



3.4 Reacción de RT-PCR y electroforesis

Para las reacciones de amplificación se usó la mezcla que se muestra en la Tabla 3. Se utilizaron diferentes cebadores cuyos nombres y secuencias se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de las RT-PCR para todos los genes fueron: desnaturalización (94°C; 60 seg) y extensión (72°C; 60 seg), mientras que las variables particulares para cada uno se muestran en la Tabla 5. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1.5% (p/v) con buffer TAE 1X corridos a 80mV por 40 min y bromuro de etidio (0.05%).

Tabla 3. Mezcla de reacción para RT-PCR.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Go Taq Buffer 5X + Mg ²⁺ (1.5mM) ¹	4.0 µL	0.3 mM
dNTPs 10mM	0.4 µL	0.2 mM
Cebador Forward 10µM	2.0 µL	1 µM
Cebador Reverse 10µM	2.0 µL	1 µM
Go Taq Polimerasa (5 U/µL) ¹	0.2 µL	0.05 U/µL
Molde de cDNA	2.0 µL	
H ₂ O	cbp 20 µL	

Tabla 4. Cebadores utilizados en la RT-PCR.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Amplión
<i>TK1a</i>	AT3TK (F)	TTGGAAGATTCTGACAAGGCTA	153 pb
	AT3TK (R)	CAACATTAAGGATAAACCAGACCA	
<i>TK1b</i>	TK1b (F)	CCCACAAATTCACCTCCTTCC	610 pb
	TK1b (R)	CAGCACCACCGATCAACTC	
<i>RNR1</i>	RNR1 (F)	GCTTAGCAGTGACCATTGTG	102 pb
	RNR1 (R)	CTTGATGAGTTGGCTGCTGA	
<i>TSO2</i>	TSO2 (F)	TCGCTTGTCTACTCTACACG	75 pb
	TSO2 (R)	TCAATCGTCTGCGACGCGG	
<i>APT</i>	APT (F)	TTCGGAGGAGTATTCGTTGG	176 pb
	APT (R)	CGCAAGCACATTCAACAATC	



Tabla 5. Condiciones de síntesis por RT-PCR de los amplicones derivados de cDNA de los genes estudiados.

Gen	Concentración de cebadores (μM)	Temperatura alineamiento ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo alineamiento (seg)	# de ciclos
<i>TK1a</i>	1	60	70	28
<i>TK1b</i>	1	60	70	30
<i>RNR1</i>	1	55	70	32
<i>TSO2</i>	1	60	70	30
<i>APT</i>	1	55	70	28

4. Selección y evaluación genotípica y fenotípica de la cruce de plantas sesquimutantes *bxa-1+* y *bxa-3+*.

Para estudiar la función del gen *TK1a* en ausencia de *TK1b*, se utilizaron plantas sesquimutantes, -mutante heterocigota *TK1a* en un fondo mutante homocigoto *tk1b-*, cuyo genotipo es: *tk1b/tk1b TK1a/tk1a*. La nomenclatura utilizada es *bxa-1+* y *bxa-3+* diferenciadas por el sitio de la inserción de T-DNA de las mutantes *tk1a-1* y *tk1a-3* (Figura 10). Las semillas de la autocruza de estas plantas se sembraron en medio GB5 (0.8% de agar), se vernalizaron a 4°C durante 48 horas en oscuridad y se incubaron a 22°C en fotoperiodo de día corto. Se realizó una selección fenotípica de plántulas, que se propagaron y autofecundaron para la obtención de semillas. Estas semillas se germinaron y su genotipo se confirmó como se describe a continuación.

4.1 Genotipificación de las plantas *bxa-1+* y *bxa-3+*

Se extrajo DNA genómico del tejido de plántulas sesquimutantes. El tejido se congeló con nitrógeno líquido, se pulverizó y las células se lisaron con una solución de Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5% a un pH de 6.8. El DNA se precipitó con isopropanol y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón se disolvió en agua estéril (Edwards, et al., 1991).



Se realizaron las reacciones de amplificación con la mezcla mostrada en la Tabla 6, para la genotipificación de las líneas mutantes. Se utilizaron diferentes cebadores cuyos nombres y secuencias se muestran en la Tabla 7. En la Figura 12 se muestra la posición de los cebadores utilizados para cada gen. Las condiciones de las PCR para ambos genes fueron: desnaturalización a 94°C por 60 seg, extensión a 72°C por 60 seg, alineamiento 55°C por 60 seg y 30 ciclos de amplificación. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.5% (p/v) con buffer TAE 1X y bromuro de etidio 0.05% a 80mV por 40 min.

Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR para la genotipificación de plantas sesquimutantes.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Go Taq Buffer 5X + Mg^{2+} (1.5mM)	4.0 μL	0.3 mM
dNTPs 10mM	0.4 μL	0.2 mM
Cebador Forward 10 μM	2.0 μL	1 μM
Cebador Reverse 10 μM	2.0 μL	1 μM
Go Taq Polimerasa (5 U/ μL)	0.2 μL	0.05 U/ μL
Molde (~1 ng/ μL)	1.0 μL	0.05 ng/ μL
H ₂ O	cbp 20 μL	

Tabla 7. Cebadores utilizados en la genotipificación de las líneas sesquimutantes.

Gen	Cebador	Secuencia (5' \rightarrow 3')	Amplicón
<i>TK1a</i>	RPF097 (sentido)	AAAATGATTGGCAGCTTGATG	830 pb
	LPR094 (antisentido)	AATGCAACAATGGAAGAATGC	
<i>TK1b</i>	TK1b F (sentido)	CCCACAAATTCACCTCCTTCC	610 pb
	TK1b R (antisentido)	CAGCACCCACCGATCAACTC	

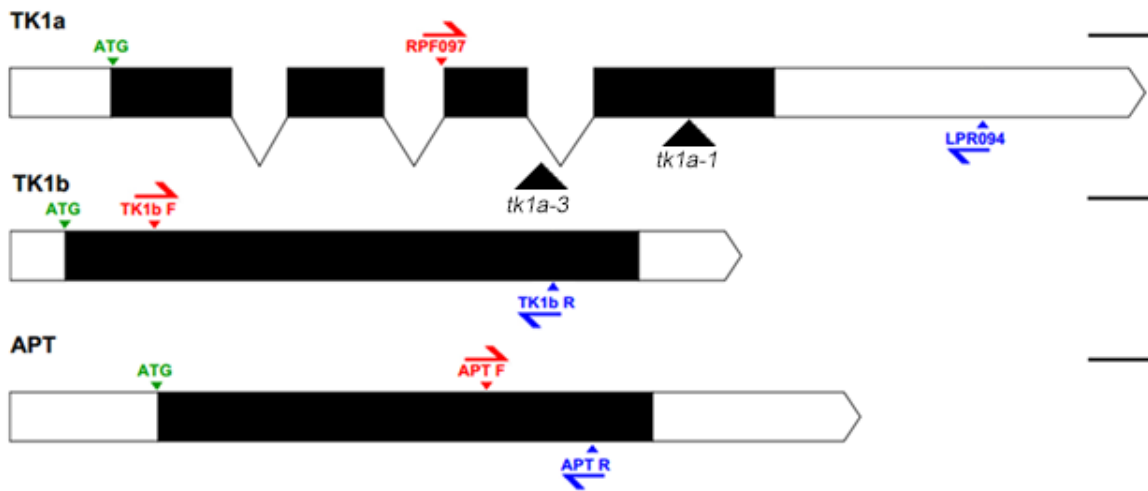


Figura 12. Localización de los cebadores utilizados para la amplificación por RT-PCR de los cDNAs de los genes *TK1a*, *TK1b* y *APT*. Se muestran en cajas blancas las regiones 5'UTR y 3'UTR, en cajas negras los exones, con líneas intermedias los intrones, con flechas verdes se muestra la ubicación del codón inicio, con flechas rojas la localización de la región de apareamiento de los cebadores *forward* y en flechas azules se muestra la región de apareamiento de los cebadores *reverse*.

4.2 Evaluación del fenotipo de respuesta a agentes genotóxicos en las plantas sesquimutantes *bxa-1+* y *bxa-3+*

Para estudiar la función de un solo alelo funcional del gen *TK1a* en ausencia del gen *TK1b*, se expusieron estas plántulas sesquimutantes a los agentes genotóxicos empleados (luz UV-C, hidroxurea y zeocina) para compararlo con la línea Col-0. Se sembraron semillas en medio GB5 (0.8 % de agar), se vernalizaron por 48 horas a 4°C y se incubaron durante 5 días. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a cajas con medio GB5 (0.8% de agar) suplementado con hidroxurea (1 mM), o zeocina (10 µM) y sin agente genotóxico para la irradiación con luz UV-C (6 minutos). Las plántulas de los ensayos con hidroxurea y zeocina se incubaron durante 4 días en fotoperiodo de día corto. Las plántulas que se irradiaron se mantuvieron 24 horas en oscuridad y se incubaron durante 3 días post-irradiación con fotoperiodo corto. El fenotipo de estas plantas en respuesta a los agentes



genotóxicos se documentó fotográficamente, pues el bajo número de individuos no permitió realizar una evaluación cuantitativa de parámetros de crecimiento.

5. Evaluación de la actividad del promotor *TK1a* en respuesta a estrés genotóxico.

5.1 Transformación y selección de semillas.

Se emplearon las clonas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción de la fusión transcripcional *promTK1a::GUS* (Pedroza-Garcia, et al., 2015) insertada en el vector pMDC163 que contiene los genes de resistencia a higromicina y kanamicina (Figura Suplementaria 5). Se transformaron plantas de *A. thaliana* de las líneas Col-0, y mutantes *atm* y *atr* mediante la técnica de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). Las semillas que se obtuvieron de las líneas *atm*, *atr* y Col-0 transformadas (T1) se sembraron en medio GB5 (1% de agar y 2% de sacarosa) suplementado con 15 µg/mL de higromicina para la selección de las plántulas transformadas (Figura Suplementaria 6). Las cajas se incubaron en condiciones de día corto y las plántulas seleccionadas después de cinco días en el medio con higromicina se transfirieron a un medio GB5 (1% de agar y 2% de sacarosa). Las plántulas seleccionadas se trasplantaron a macetas para su propagación hasta obtener las generaciones T2 y T3.

5.2 Determinación histoquímica de la actividad de β-glucuronidasa (GUS)

Las líneas Col-0 pTK1a::GUS, *atm* pTK1a::GUS y *atr* pTK1a::GUS T3 se emplearon para analizar la actividad del promotor del gen *AtTK1a* sobre la expresión del gen *GUS* mediante la determinación histoquímica de la actividad enzimática. Plántulas de 5 días se expusieron por 6 minutos a radiación de luz UV-C y se determinó la actividad 3 h, 6 h y 12 h post-irradiación. Para los agentes genotóxicos se transfirieron plántulas de 5 días a medio con hidroxiurea (1 mM) o zeocina (10 µM) por 3 h, 6 h, y 12 h. Las plántulas fueron sumergidas en solución amortiguadora ferricianuro/-ferrocianuro que contiene el sustrato X-gluc (Anexo de Amortiguadores y reactivos), para determinar la actividad de GUS controlada por el promotor del gen



TK1a. Las plántulas se incubaron a 37° C durante 90 minutos en esta solución. El amortiguador se eliminó y se decoloraron las plántulas en lavados con etanol absoluto. Las plántulas se montaron en un portaobjetos utilizando un marco de película plástica (Parafilm) en el cual se suspendieron en amortiguador de PBS 0.5 X y glicerol al 50% y se cubrió con un cubreobjetos, las muestras se observaron en un microscopio óptico Olympus BX60 equipado con una cámara Excelis 600-HD para documentar histoquímicamente la actividad de GUS.

6. Determinación de la actividad enzimática total de Timidina Cinasa.

6.1 Extracción de proteína total

Se realizó la extracción de proteína total a partir de plántulas completas de 9 días de desarrollo. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino, se añadió el amortiguador de extracción de proteínas (Anexo de Amortiguadores y reactivos), se homogenizó y se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó (4° C y 13000 rpm) durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Se cuantificó la concentración de proteína en los extractos utilizando el método de Bradford con el reactivo Bio-Rad Protein Assay. Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de concentraciones de 3 a 21 µg/µL (Bradford, 1976).

6.2 Determinación de la actividad enzimática de Timidina Cinasa.

Se siguió el protocolo para la detección de actividad de Timidina Cinasa que se basa en la precipitación de fosfatos de lantano que son insolubles en agua (Wolcott & Colacino, 1989). El dTMP formado por la TK a partir de timidina tritiada [metil-³H]-Timidina precipita al adicionar LaCl₃ y se cuantifica por centelleo (Figura 13).

La mezcla de reacción para los ensayos se preparó como sigue: 500 µL de amortiguador de reacción (Anexo de Amortiguadores y reactivos), 37.5 µL de [metil-³H]-timidina (6.7 Ci/mmol), 1.25 µL de timidina (1 mM), un volumen de extracto proteico equivalente a 300 µg de proteína total de las muestras Col-0, *tk1a-1*, *tk1a-*



3 y p35S:TK1a::HA y agua desionizada cbp 1 mL. La concentración de timidina total fue de 2 μM (0.75 μM de [metil- ^3H]-timidina suplementada con 1.25 μM de timidina no marcada), suficiente para alcanzar la saturación. En el blanco de reacción se sustituyó la proteína total con el mismo volumen de amortiguador Tris-HCl (50 mM pH 7.4). Las muestras se mezclaron con amortiguador de reacción y se incubaron a 37° C por 2 horas. Se transfirieron 200 μL de la mezcla a un 1 mL de solución de precipitación (LaCl_3 100 mM; trietanolamina 5 mM). La mezcla se agitó en vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 1600 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y al precipitado se le adicionó 1 mL de la solución de precipitación, se agitó y centrifugó repitiendo el procedimiento antes mencionado. Finalmente, el sobrenadante se decantó y el precipitado se disolvió en 300 μL de HCl 0.05 N y 3 mL de líquido de Bray (Anexo de Amortiguadores y reactivos). Las cpm se determinaron en un contador de centelleo automático Marca Tri-Carb Perkin Elmer modelo 48/10 XR. Para calcular la actividad específica de la enzima se elaboró una curva de calibración de [metil- ^3H]-timidina en el rango de 0.02 a 2 μM .

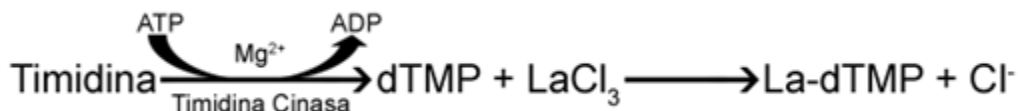


Figura 13. Reacción de fosforilación de timidina, catalizada por la TK y precipitación de dTMP con cloruro de lantano.



VI. Resultados.

1. Niveles de expresión de los genes de la vía *de novo* de nucleótidos en las líneas mutantes KO *TK1a*.

Dado que las plantas mutantes *tk1a* no muestran ningún fenotipo durante el desarrollo (de la Rosa Ortega, 2016), determinamos si la interrupción de este gen es compensada por una mayor expresión del gen *TK1b* o de genes de la ruta de biosíntesis *de novo*. Para esto, evaluamos los niveles de los transcritos del gen *TK1b*, así como de los genes *RNR1* y *TSO2* (ribonucleótido reductasa) y del gen *APT* como control. Se extrajo RNA de plántulas de 10 días de edad de las dos líneas mutantes *tk1a* (*tk1a-1* y *tk1a-3*), Col-0 y de la línea transgénica *p35S::TK1a::HA*. La Figura Suplementaria 7 muestra la integridad y calibración de los RNAs usados para la síntesis de cDNA y las Figuras Suplementarias 8-12 muestran curvas generadas para establecer el número óptimo de ciclos de PCR para cada uno de los genes estudiados. La Figura 14 presenta los amplicones correspondientes a los transcritos de cada gen y la Figura 14B, el análisis densitométrico con respecto al gen *APT* de expresión constitutiva. En el experimento que consiste de una sola réplica biológica, y a reserva de confirmación posterior, se observa que la línea sobreexpresora *p35S::TK1a*, mostró un aumento de cerca del 60% el nivel de *TK1a* en comparación a plántulas Col-0. En las líneas mutantes *tk1a-1* y *tk1a-3* no se detectó el amplicón correspondiente a *TK1a*, resultado que confirma que son mutantes KO para este gen. La ausencia de la expresión de *TK1a* no provocó una expresión mayor ni del gen *TK1b* ni de los genes *RNR1* y *TSO2*, pues en las mutantes *tk1a-1* y *tk1a-3*, los niveles de estos transcritos fueron similares a los de Col-0. Estos resultados indican que la ausencia del gen *TK1a* no es compensada por sobre expresión del gen *TK1b* y posiblemente tampoco por genes de la ruta de síntesis *de novo*.

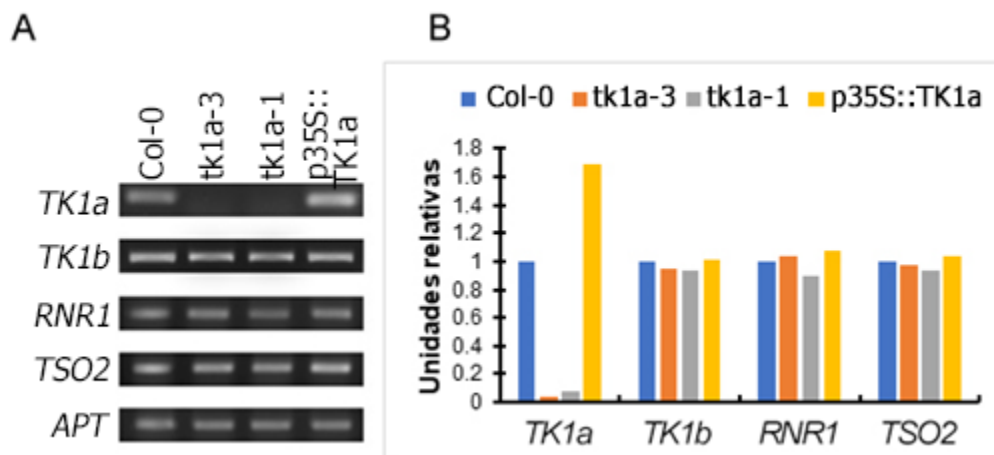


Figura 14. Niveles de transcrito de genes de las vías de salvamento y la biosíntesis de novo de nucleótidos, determinados por RT-PCR punto final. A) Geles representativos de amplicones de cada uno de los genes, (n=1). **B)** Análisis densitométrico de los amplicones normalizados utilizando el gen *APT* y con relación a los obtenidos en la línea Col-0 (n=1). El RNA total se obtuvo de plántulas de diez días de edad de las líneas Col-0, *tk1a-3*, *tk1a-1* y sobreexpresora *p35S::TK1a::HA*.

2. Actividad de Timidina Cinasa en mutantes *TK1a*

Debido a que la interrupción del gen *TK1a* no provocó una mayor expresión del gen *TK1b*, evaluamos los niveles de actividad enzimática total de Timidina Cinasa en plántulas mutantes *tk1a* de 10 días y se comparó con la de plántulas silvestres Col-0 y plántulas *p35:TK1a::HA*. No observamos diferencias significativas en la actividad específica total entre la línea silvestre y las mutantes *tk1a* (Figura 15), mientras que sí se observó un aumento de por lo menos 25% en la actividad de TK en la línea sobreexpresora. Estos resultados sugieren que en ausencia de *TK1a*, la actividad enzimática atribuida a *TK1b* aumenta, sin que ocurra una mayor expresión de este gen. Este incremento en la actividad enzimática podría explicar por qué las mutantes *tk1a* no muestran un fenotipo distinto a las plantas silvestres Col-0.

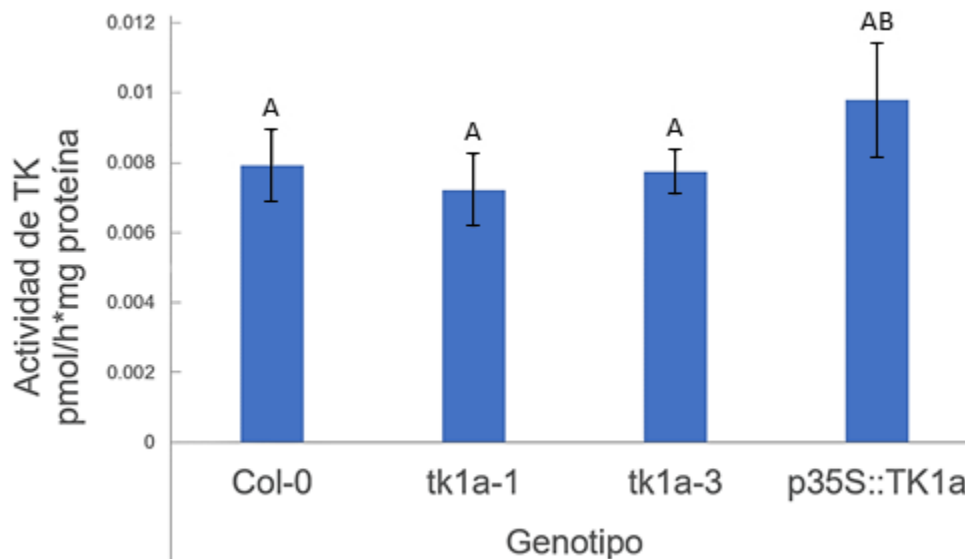


Figura 15. Actividad específica total de Timidina Cinasa en plántulas de las líneas KO y sobreexpresora de *TK1a*. Se extrajo proteína soluble de plántulas de diez días cultivadas en medio sin sacarosa. Se muestra la media de tres replicas biológicas \pm D.S. ($n=3$). Los datos se analizaron utilizando ANOVA y las medias se compararon mediante una prueba de Tukey, (Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$).

3. Respuesta de las líneas mutantes *TK1a* (*tk1a-1* y *tk1a-3*) a estrés genotóxico

En los ensayos preliminares con plántulas mutantes *tk1a* utilizamos medio GB-5 suplementado con 2% de sacarosa, y bajo estas condiciones no observamos diferencias en el desarrollo de la raíz en las mutantes *tk1a* al compararlas con las plántulas Col-0. Para continuar el estudio de la función del gen *TK1a* en la respuesta a estrés genotóxico, se expusieron las líneas Col-0, *tk1a-1* y *tk1a-3* a luz UV-C –por 3 y 6 minutos– en ausencia y presencia de sacarosa (1 % y 2 %), debido a observaciones realizadas por un colaborador que más adelante se detallan. La Figura suplementaria 13 muestra imágenes representativas de plántulas a los 5 días post-irradiación; debido a que se incubaron en oscuridad, presentan un fenotipo etiolado. En condiciones control, a distintas concentraciones de sacarosa las tres líneas tuvieron un desarrollo similar y se observó un mayor desarrollo de la raíz en el medio suplementado con sacarosa en todas ellas. La irradiación con luz UV-C por 3 minutos provocó una reducción drástica en el crecimiento de la raíz post-irradiación en los tres genotipos cultivados en ausencia de sacarosa, mientras que



este efecto no se observó en presencia de sacarosa. Al incrementar el tiempo de exposición a luz UV-C a 6 min, el efecto fue más acentuado sobre el crecimiento de la raíz en los tres genotipos. Sin embargo, en ausencia de sacarosa la raíz principal de las mutantes *tk1a-1* y *tk1a-3* tuvo un menor desarrollo que las plantas silvestres cuando fueron irradiadas. Estos resultados preliminares permitieron la implementación del resto de los ensayos, que se realizaron en ausencia de sacarosa, pues fue claro que la presencia de este carbohidrato puede enmascarar el fenotipo de las mutantes. Este mismo efecto de la sacarosa se observó en la evaluación del fenotipo de mutantes *tk1b* por este mismo grupo de trabajo (Pedroza-García et al., 2019) y se discutirá más adelante.

4. Sensibilidad a la radiación UV-C.

Para evaluar la respuesta de plantas mutantes *tk1a* a estrés genotóxico, éstas se expusieron a tres agentes con distintos mecanismos de acción: 1) **luz UV-C** que induce la formación de dímeros de timina, 2) **hidroxiurea** que provoca detención de las horquillas de replicación y 3) **zeocina** que provoca ruptura en la doble cadena de DNA. En todos los casos se compararon con la línea silvestre Col-0 y la línea sobre-expresora *p35S::TK1a::HA*. Asimismo, se incluyeron como controles positivos las líneas mutantes *atm* y *atr*, que son hipersensibles a distintos tipos de estrés genotóxico y en todos los casos se omitió sacarosa en el medio. Como parámetro de susceptibilidad/tolerancia se determinó el porcentaje de plántulas que muestran hojas verdaderas, que indica la proliferación del meristemo apical, y la longitud de la raíz primaria, que constituye un índice de la proliferación del meristemo radical que refleja la integridad del genoma (Rosa et al., 2013).

Las plántulas de 5 días se irradiaron por 6 minutos con luz UV-C y el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas se evaluó a los cuatro días post-irradiación. El efecto en este parámetro de crecimiento fue marginal en la línea Col-0 se observó una disminución del 6 % en el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas, mientras que en el resto de los genotipos también se observó una



reducción que no fue significativamente distinta entre ellos, con respecto al control (Col-0) (ANOVA seguido de prueba de Tukey $p < 0.05$) (Figura 16B).

El segundo parámetro analizado fue la longitud de la raíz primaria a los 5 días post-irradiación. En todas las líneas la luz UV-C provocó una reducción en el crecimiento de la raíz, pero en distintos grados, lo que permitió evaluar la sensibilidad relativa de cada genotipo (Figura 16 A y C). En la línea Col-0 la reducción fue del 42% con respecto a las plántulas no irradiadas, mientras que en las mutantes *tk1a* esta disminución fue entre el 57% al 67%. Las mutantes *atm* y *atr* mostraron hipersensibilidad a este tratamiento pues la inhibición del crecimiento fue superior al 85%. Las líneas Col-0 y *p35S:TK1a:HA*, se comportaron de manera similar entre sí en respuesta del daño genotóxico.

Los resultados de estos ensayos sugieren que la ruta de salvamento mediada por *TK1a* es requerida para la reparación del daño causado por la luz UV-C en la raíz de las plántulas, sin embargo, la sobre expresión de *TK1a* no previene este daño genotóxico.

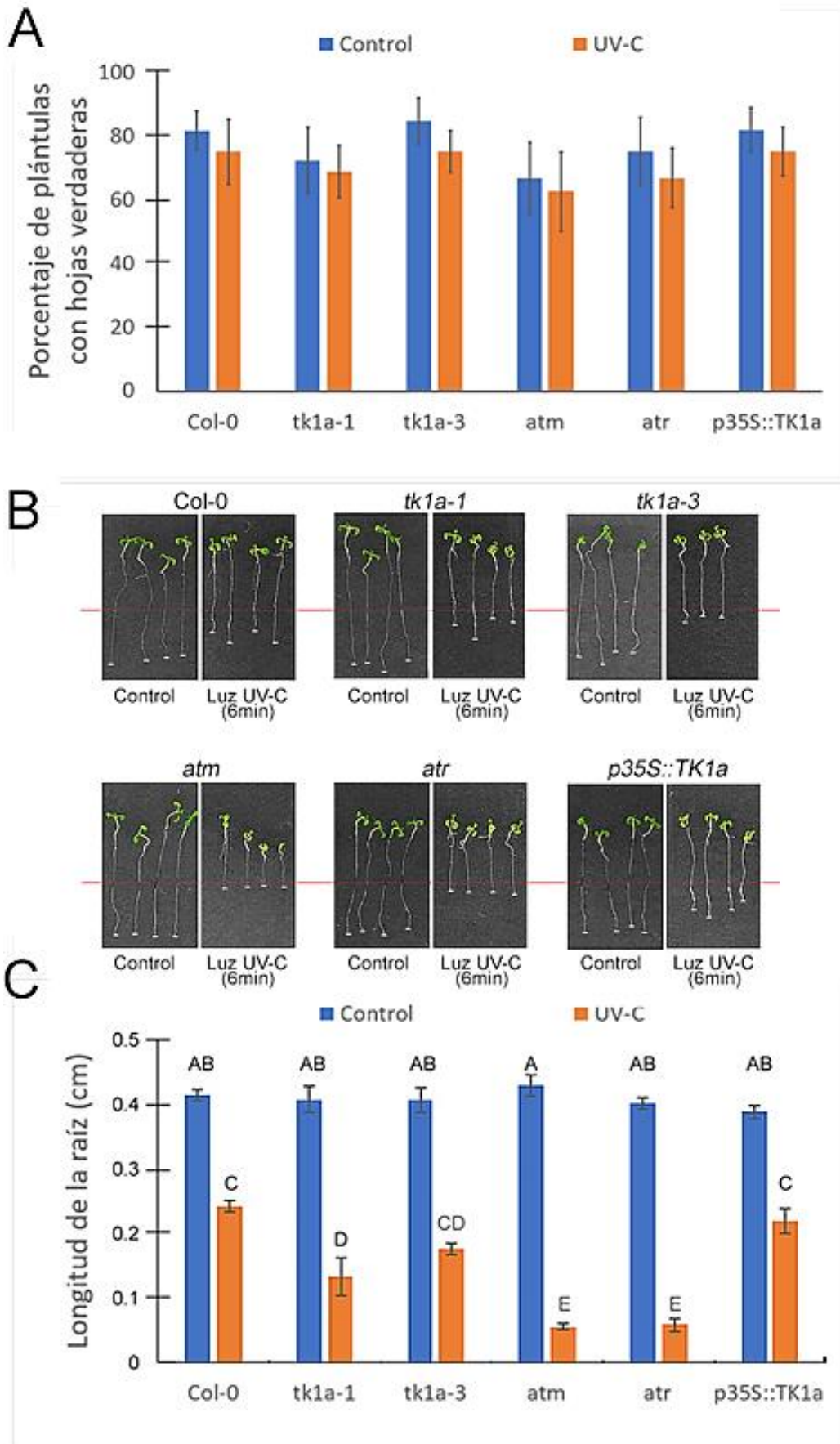




Figura 16. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas a 4 días post- irradiación con luz UV-C. Las plántulas se crecieron en medio GB5 hasta el quinto día y se irradiaron con luz UV-C durante 6 minutos y se incubaron por 1 día en oscuridad y 3 días extras con fotoperiodo de día corto. El cuarto día post-irradiación se determinó el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas, no se observaron diferencias entre las líneas mutantes evaluadas con respecto al control (ANOVA y prueba de Tukey $p < 0.05$, $n = 3$; cada grupo constituido por 30 plántulas). **B. Desarrollo de la raíz de plántulas 5 días post irradiación con luz UV-C.** Se muestran plántulas representativas cultivadas en medio GB5 e irradiadas con luz UV-C por 6 minutos al quinto día de desarrollo, se incubaron por 1 día en oscuridad y 4 días extras con fotoperiodo de día corto. Las líneas rojas indican la longitud de la raíz al día de la irradiación, el crecimiento de la raíz se determinó a partir de ese punto hasta la punta de la raíz. **C. Longitud de la raíz posterior a la irradiación con luz UV-C.** Después de la irradiación, las plántulas se incubaron durante 1 día en oscuridad y 4 días con fotoperiodo de día corto. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. (Letras distintas indican diferencia significativa; $p < 0.05$; $n = 30$).

5. Sensibilidad a hidroxiiurea.

La hidroxiiurea inhibe la actividad enzimática de la Ribonucleótido Reductasa, lo que provoca detención del avance de las horquillas de replicación por falta de dNTPs, lo que genera ssDNA. En estos ensayos se compararon las mutantes *tk1a* con las líneas Col-0, *atr* (hipersensible a hidroxiiurea) y la línea sobreexpresora de *TK1a: p35S:TK1a:HA*. La hidroxiiurea (0.2 y 0.3 mM) provocó una disminución del 15% a 16% en el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas en la línea Col-0. En el resto de los genotipos evaluados la reducción varió entre 8% y 18%, y no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos (ANOVA, seguida de prueba de Tukey; $p < 0.05$) (Figura 17B), estos datos sugieren que en estas condiciones la hidroxiiurea no afecta el desarrollo de hojas verdaderas, por lo que tampoco se espera observar diferencia entre los fenotipos de las plántulas mutantes *tk1a* y las Col-0.

También se determinó la longitud de la raíz de las plántulas incubadas durante 10 días en medios con hidroxiiurea; en plántulas Col-0 hubo una reducción en la longitud de la raíz del 9 y 29% en concentraciones de 0.2 mM y 0.3 mM de



hidroxiurea, respectivamente. En la línea *tk1a-1* esta disminución fue de 31% y 52%, mientras que en la línea *tk1a-3* la reducción fue de 34% y 68% en las concentraciones de 0.2 mM y 0.3 mM de hidroxiurea, respectivamente. En la mutante *atr* decreció el desarrollo de la raíz un 46% y 84% para las concentraciones de 0.2 mM y 0.3 mM de hidroxiurea, respectivamente. Mientras que la línea *p35S::TK1a* no mostró fenotipo diferente al silvestre en respuesta a este agente genotóxico pues la reducción fue de 18% y 30% para las dos concentraciones de hidroxiurea (Figura 17 A y C).

A diferencia del ensayo con hojas verdaderas, el fenotipo mostrado por las mutantes *tk1a* en comparación a los controles Col-0 indica que en respuesta a hidroxiurea la vía de salvamento mediada por TK1a es importante en el desarrollo de la raíz. Además, la sobreexpresión de TK1a no protege a las plántulas del daño genotóxico.

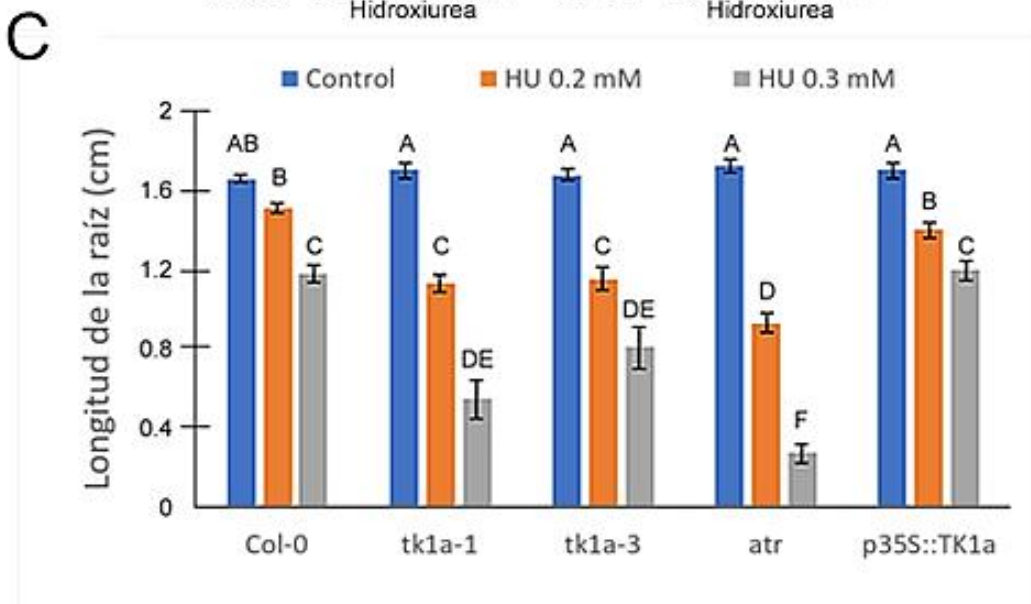
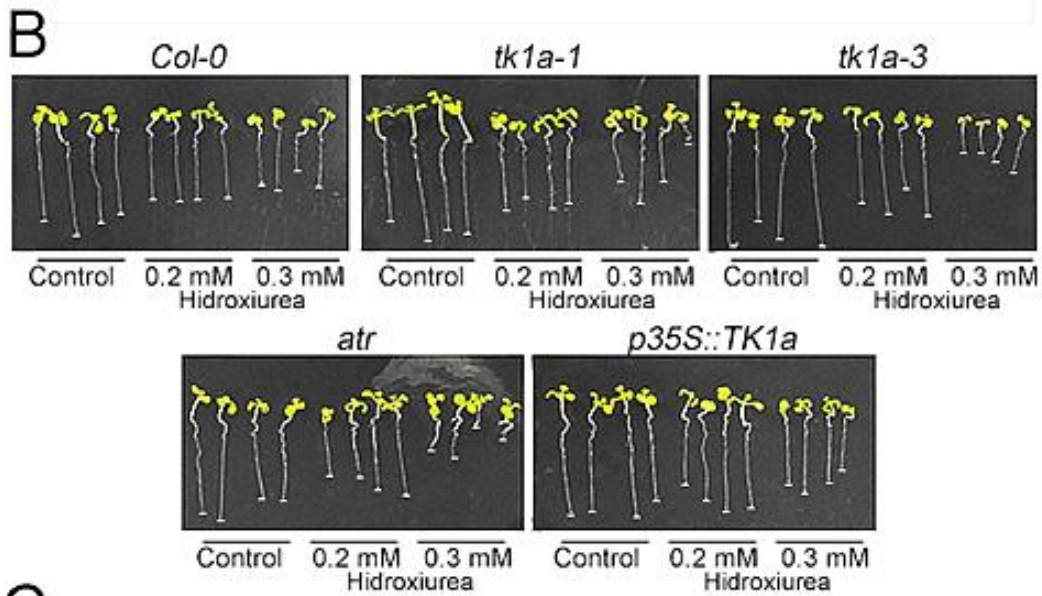
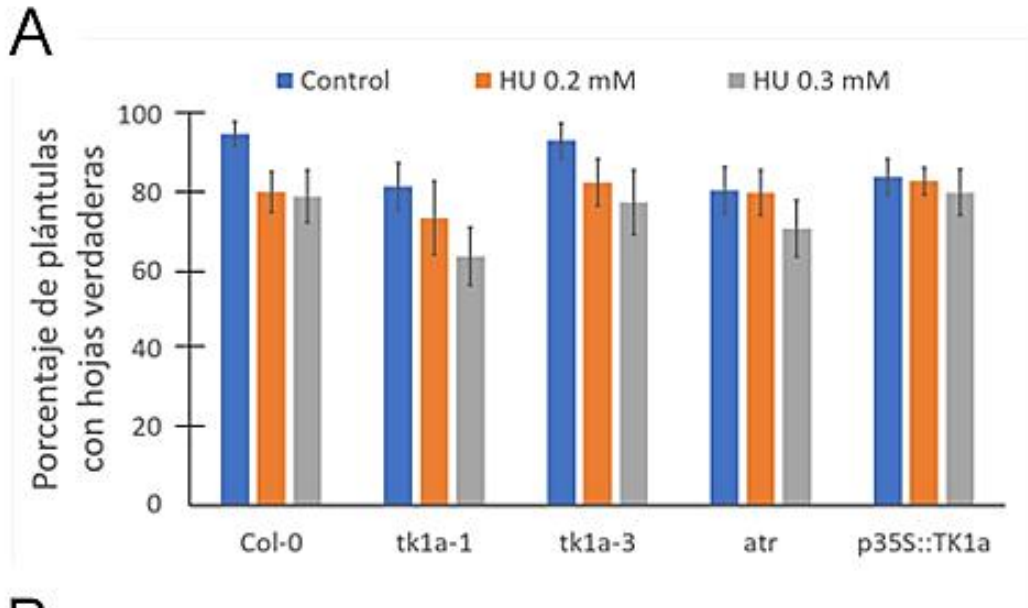




Figura 17. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas cultivadas durante 9 días en medio GB5 suplementado con hidroxiiurea. Las plántulas se crecieron en medio GB5 en ausencia y presencia de hidroxiiurea (0.2 mM y 0.3 mM) durante 9 días, no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos (ANOVA y prueba de Tukey; $p < 0.05$, $n = 3$; cada grupo consistió de 30 plántulas). **B. Plántulas de 10 días de desarrollo en medio GB5 suplementado con hidroxiiurea.** Se muestran plántulas representativas cultivadas en medio GB5 en ausencia y presencia de hidroxiiurea (0.2 mM y 0.3 mM) durante 10 días a 22°C con fotoperiodo de día corto. **C. Longitud de la raíz en respuesta a hidroxiiurea.** Se determinó la longitud de la raíz de plántulas cultivadas en medio GB5 en ausencia y presencia de hidroxiiurea (0.2 mM y 0.3 mM) durante 10 días. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA y las medias se compararon mediante una prueba de Tukey (Letras distintas indican diferencia significativa; $p < 0.05$; $n = 30$).

6. Sensibilidad a zeocina.

La zeocina es un agente genotóxico que provoca la ruptura de doble cadena de DNA. Al igual que con los otros tratamientos anteriormente descritos, la determinación del número de plantas con hojas verdaderas no permitió diferenciar a los genotipos en términos de sensibilidad a este compuesto (Figura 18B).

En contraste, la determinación de la longitud de la raíz sí permitió distinguir diferencias entre los genotipos; en la línea Col-0 hubo una reducción del 16% y 26% (con desviación estándar de 15% y de 11%) en presencia de 5 μM y 10 μM de zeocina (concentraciones en las que se detectó diferencia en la longitud de raíz en Col-0). Las dos líneas mutantes *tk1a* (*tk1a-1* y *tk1a-3*) resultaron más sensibles a este agente pues la disminución fue del 47% y 23 % para ambas líneas en respuesta a 5 μM y 10 μM de zeocina. La reducción de longitud de la raíz en la línea *atm* fue de 42% y 84%, mientras que la línea p35S::TK1a mostró fenotipo similar a la línea Col-0 pues la reducción fue de 21% y 31% (Figura 18 A y C).

La respuesta de las líneas mutantes evaluadas con zeocina, refuerza nuestra hipótesis acerca de la importancia de la ruta de salvamento de timidina en el desarrollo de la raíz durante el estrés genotóxico.

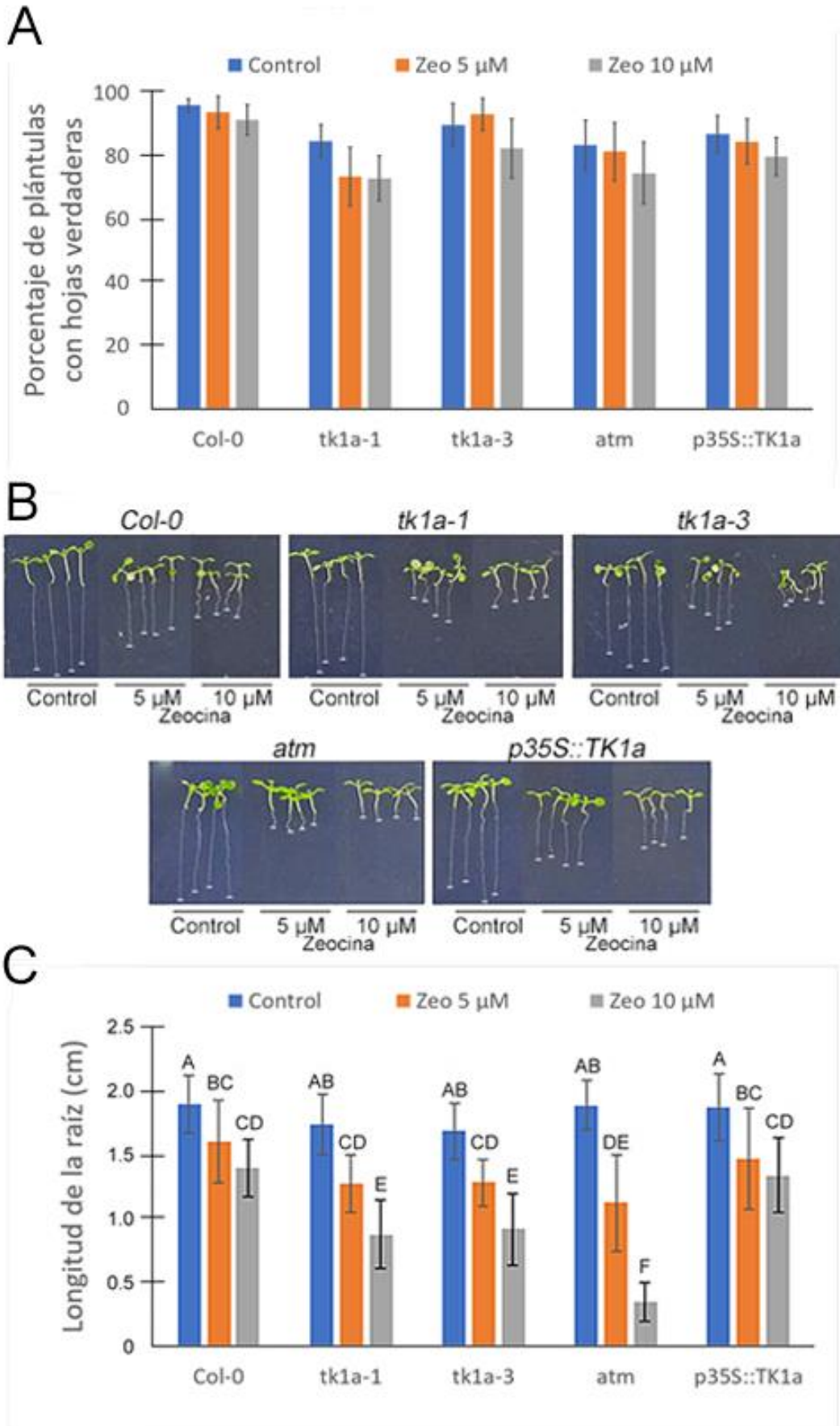




Figura 18. A. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas cultivadas durante 9 días en medio GB5 suplementado con zeocina. Las plántulas se crecieron en medio GB5 en ausencia y presencia de zeocina (5 μM y 10 μM) durante 9 días, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos (ANOVA y prueba de tukey $p < 0.05$, $n = 3$; cada grupo consistió de 30 plántulas). **B. Plántulas de 10 días de desarrollo en medio GB5 suplementado con zeocina.** Se muestran plántulas representativas cultivadas en medio GB5 en ausencia y presencia de zeocina (5 μM y 10 μM) durante 10 días a 22°C con fotoperiodo de día corto. **C. Longitud de la raíz en respuesta a zeocina.** Se determinó la longitud de la raíz de plántulas cultivadas en medio GB5 en ausencia y presencia de zeocina (5 y 10 μM) durante 10 días. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA y las medias se compararon mediante una prueba de Tukey. (Letras distintas indican diferencia significativa; $p < 0.05$; $n = 30$).

7. Selección de plantas sesquimutantes

Para evaluar la función de *TK1a* en ausencia de la actividad del gen *TK1b*, se utilizaron plántulas sesquimutantes (*tk1b;tk1b / TK1a;tk1a*) provenientes de la autocruza de plantas del mismo genotipo (Tabla 1). La relación genotípica esperada de la autocruza de plantas sesquimutantes es: 25% de plantas con fondo mutante *tk1b* y *TK1a silvestre*, 25% de dobles mutantes *tk1b; tk1a* y 50% de plantas sesquimutantes (Tabla 8).

Tabla 8. Cuadro de Punnett de segregación genotípica de la autocruza sesquimutante. Cruza de plantas heterocigotas mutantes (*TK1a;tk1a*) en fondo mutante *tk1b;tk1b*.

<i>bb Aa X bb Aa</i>		
	<i>b A</i>	<i>b a</i>
<i>b A</i>	<i>bb AA</i>	<i>bb Aa</i>
<i>b a</i>	<i>bb Aa</i>	<i>bb aa</i>

8. Genotipificación de las líneas sesquimutantes

En cada generación de este ensayo se realizó la genotipificación de las plantas para propagar la heterocigosis de las mutantes *TK1a* (*tka-1* y *tka-3*) en fondo *tk1b*, al mismo tiempo se buscó asociar los fenotipos observados durante el desarrollo con los genotipos esperados por la autocruza sesquimutante, procedimiento que se detalla enseguida.

El desarrollo de la autocruza sesquimutante mostró tres fenotipos que se diferenciaban desde etapas tempranas del desarrollo, por lo que se asumió que se debían a los tres genotipos esperados (Tabla 8).

En la Figura 19 se muestran plántulas de la primera generación a los 5 días de edad con los tres fenotipos representativos de la autocruza:

- 1) Plántulas con fenotipo similar al genotipo silvestre, con cotiledones de color verde y que corresponden para una mutante simple para *tk1b*.
- 2) Plántulas de tamaño reducido, con cotiledones verdes, que asumimos como plántulas sesquimutantes.
- 3) Plántulas de menor tamaño con cotiledones albinos que previsiblemente son dobles mutantes.

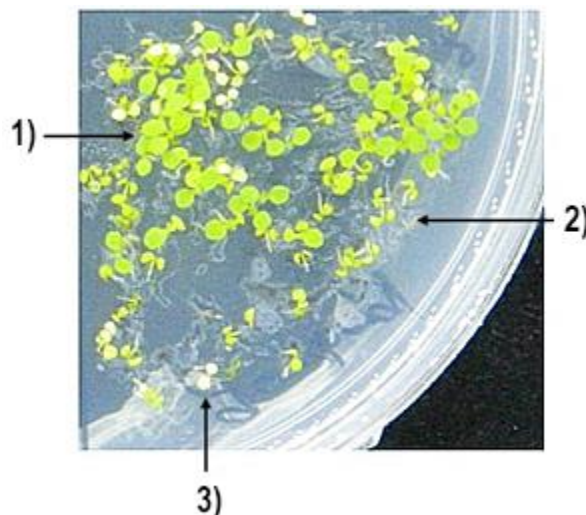


Figura 19. Selección fenotípica de plántulas progenie de la autocruza sesquimutante. Se muestran plántulas de 5 días y se indican plántulas que se asumen como: 1) mutante simple (*tk1b / tk1b; TK1a / TK1a*); 2) plántula sesquimutante (*tk1b / tk1b; TK1a / tk1a*); 3) doble mutante (*tk1b / tk1b; tk1a / tk1a*).

Se seleccionaron plántulas de los diferentes fenotipos y se transfirieron a maceta para continuar su desarrollo. Cada uno de estos genotipos mostró un fenotipo característico que se presentan en la Figura 20 y que son:

1) Plantas con roseta de tamaño esperado para una mutante *tk1b* con hojas de color verde.

2) Plantas de tamaño intermedio con variegación (áreas con variación de color) en las hojas de roseta, fenotipo que puede asociarse a plántulas sesquimutantes.

3) Plantas de menor tamaño con un fenotipo albino, fenotipo esperado para plántulas dobles mutantes (Clausen, et al., 2012).

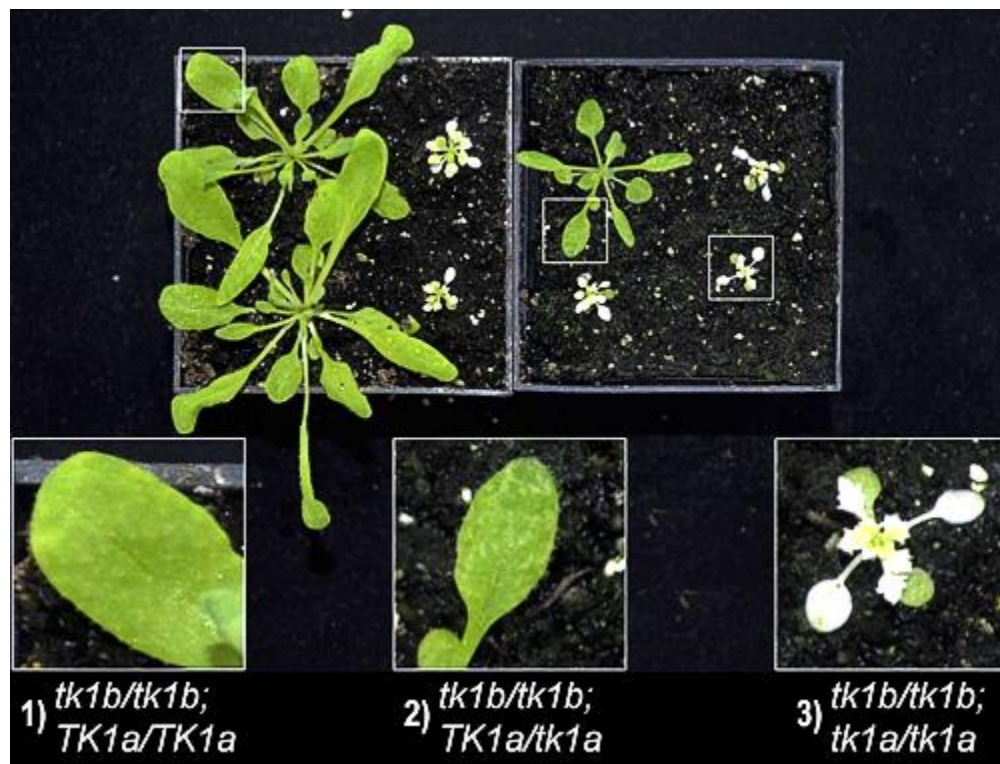


Figura 20. Selección fenotípica de plantas sesquimutantes y doble mutantes. Se muestran plantas de 40 días y en los recuadros se muestra un acercamiento en los que se observan las diferencias tanto de tamaño de hoja como de color. Se indican: 1) mutante simple (*tk1b / tk1b*; *TK1a / TK1a*); 2) plántula sesquimutante (*tk1b / tk1b*; *TK1a / tk1a*) que presenta variegación en sus hojas; 3) doble mutante (*tk1b / tk1b*; *tk1a / tk1a*).



Seleccionamos plantas correspondientes a los fenotipos 1) y 2) para su genotipificación a través de la detección, por PCR de DNA genómico, del T-DNA insertado en el gen *TK1a*. La figura 21 muestra el resultado del análisis electroforético en un gel de agarosa que revela el tamaño de los amplicones de DNA obtenidos mediante PCR. En la figura se muestra un carril WT (con cebadores para detectar el gen *TK1a* silvestre) y uno mutante “m” (con cebadores para detectar el gen *TK1a* con el inserto de T-DNA) para cada planta estudiada. La presencia de las bandas de 1044 pb (para *bx-3+*) y 830 pb (para *bx-1+*) sólo en el carril WT indica que en estas plantas, además del genotipo del fondo mutante (mutación en ambos alelos del gen *TK1b*), ambos alelos contienen genes *TK1a* silvestres (mutantes simples: *tk1b/tk1b*), mientras que la presencia de las bandas de 655 pb (para *bx-3+*) y 800 pb (para *bx-1+*) sólo en el carril mutante (“m”) indica que estas plantas además del fondo mutante *tk1b*, ambos alelos contienen genes *TK1a* con T-DNA (doble mutantes *tk1b/tk1b; tk1a/tk1a*). Finalmente, la presencia de bandas de 1044 pb y 655 pb (para *bx-3+*), y de 830 pb y 800 pb (para *bx-1+*) en ambos carriles WT y mutante (“m”) indican que estas plantas además del fondo mutante *tk1b*, tienen un alelo con el gen *TK1a* silvestre y el otro alelo con el inserto de T-DNA en el gen *TK1a* (sesquimutantes *tk1b/tk1b; TK1a/tk1a*). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla Suplementaria 2.

Las plantas de los fenotipos 1) y 2) mostraron que la selección fenotípica se ajusta al genotipo resultando el fenotipo 1) como plantas *tk1b* y el fenotipo 2) como sesquimutante (*bx-1+* y *bx-3+* por su tipo de mutación), se colectaron las semillas para continuar con los ensayos. El fenotipo 3) no fue genotipificado debido a que se buscó poner a prueba la letalidad de las supuestas dobles mutantes. La selección fenotípica debida al color y tamaño de los cotiledones de plántulas parece ser acertada para la detección de plántulas sesquimutantes, por lo que en se utilizó la estrategia de selección fenotípica para su identificación.

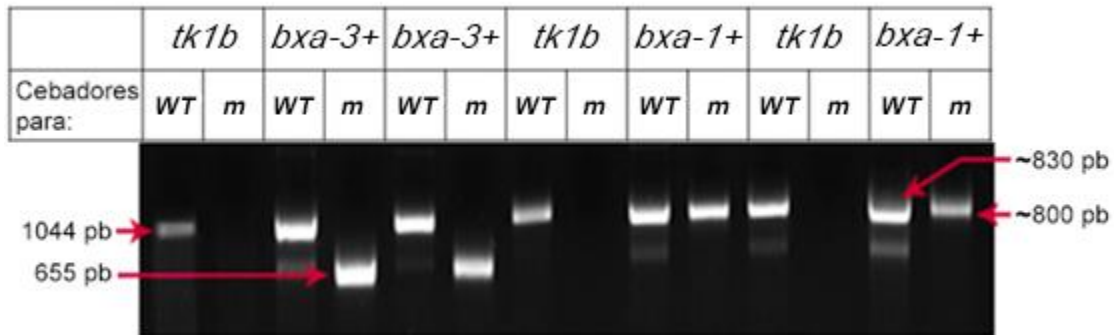


Figura 21. Selección genotípica de plantas sesquimutantes y doble mutantes.

Se muestra la electroforesis en un gel de agarosa en el que se revelan los productos de PCR, los cebadores utilizados en las reacciones son: WT; cebadores flanqueantes de la secuencia de nucleótidos del gen *TK1a* silvestre, y, m; cebadores flanqueantes de la secuencia de nucleótidos del gen mutante *TK1a* que contiene un inserto de T-DNA.

9. Respuesta de las líneas sesquimutantes a agentes genotóxicos

Para analizar la función de un único alelo funcional de *TK1a* en respuesta a estrés genotóxico, se expusieron plántulas seleccionadas como sesquimutantes a luz UV-C (6 minutos), hidroxurea (1mM) y zeocina (10 μ M) tal y como se ha descrito previamente para las líneas Col-0 y mutantes de este trabajo. En este caso el número de plántulas analizadas no fue suficiente para llevar a cabo análisis cuantitativos, sólo cualitativos. En la Figura 22 se presentan los fenotipos de plántulas sesquimutantes de 10 días de edad al ser expuestas a los distintos agentes genotóxicos durante 5 días. En el panel A se muestra el ensayo con luz UV-C y en el panel B los ensayos con hidroxurea y zeocina. En los segmentos de la cruz sesquimutante se observan plántulas que presentan los diferentes fenotipos: de lado izquierdo la plántula de mayor tamaño de las sembradas con cotiledones de color verde intenso, en el centro dos plántulas sesquimutantes, y a la derecha plántulas dobles mutantes. La línea roja señala el extremo de la raíz previa al tratamiento, buscando comparar el desarrollo posterior a la exposición a los agentes genotóxicos.

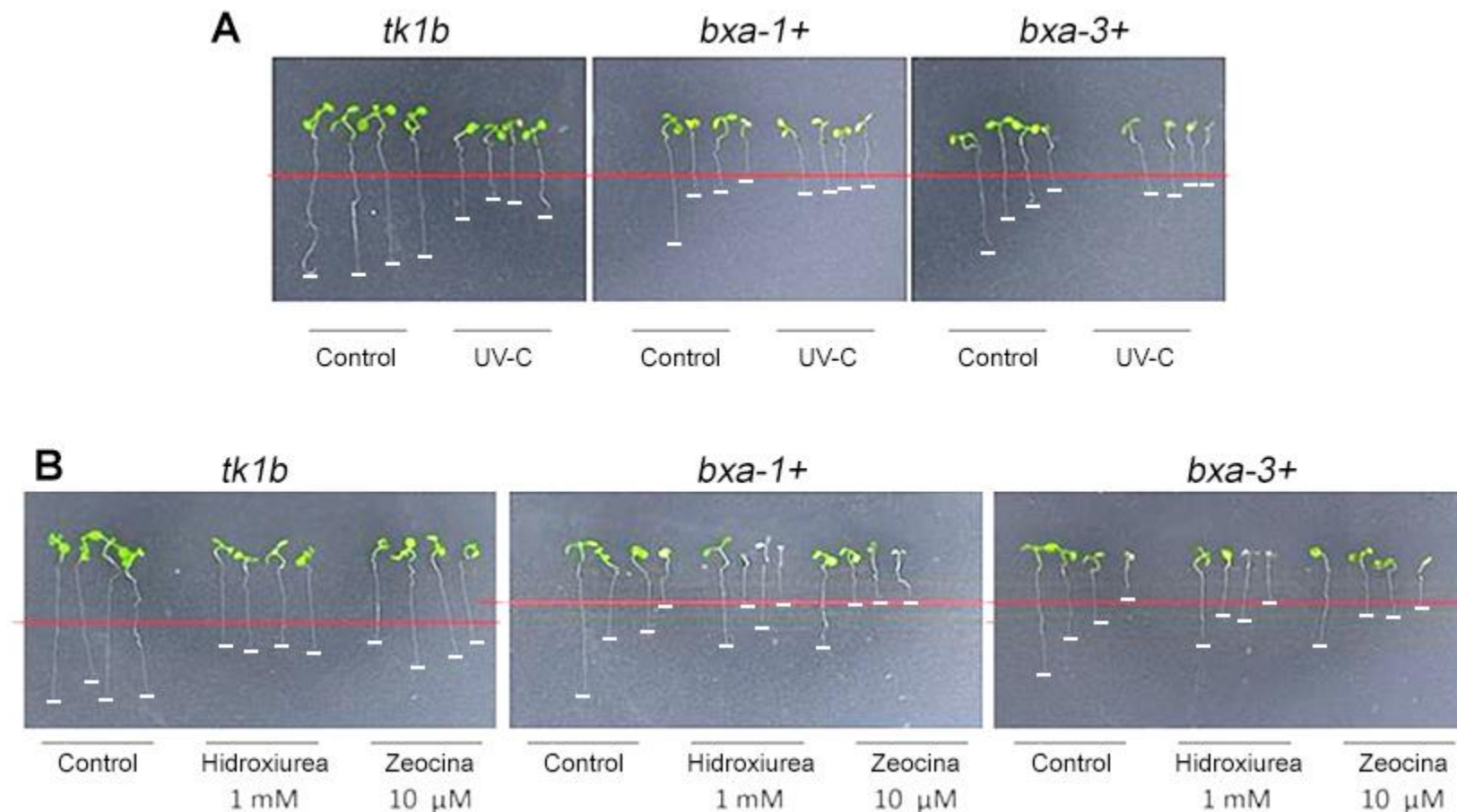


Figura 22. Fenotipo de respuesta a luz UV-C, hidroxiurea y zeocina de plántulas sesquimutantes. **A)** Plántulas de 5 días se irradiaron con luz UV-C por 6 minutos, se incubaron por 1 día en oscuridad y posteriormente por 5 días en fotoperiodo de día corto. **B)** Plántulas cultivadas en medio GB5 en ausencia de agentes genotóxicos durante 5 días fueron trasplantadas a medios suplementados con hidroxiurea (1 mM) y zeocina (10 μ M) por separado y se incubaron hasta el 5^{to} día post trasplante. Las líneas rojas señalan el extremo de la raíz previa al tratamiento, $n \approx 10$.



Para este estudio se compararon estas mutantes con la línea mutante homocigota *tk1b* que tiene los dos alelos *TK1a* intactos. Este genotipo fue sensible a la luz UV-C (Figura 22A), pues la exposición a este agente genotóxico provocó un claro acortamiento en el tamaño de la raíz, en ensayos previos el acortamiento de la raíz en mutantes *tk1a* fue del 57-67% (n=3 p<0.05). El desarrollo de las dos líneas de plantas sesquimutantes (*bx1-1+* y *bx1-3+*) fue más lento que el de la mutante *tk1b* en ausencia de agentes genotóxicos y cualitativamente se observaron plantas más pequeñas cuando fueron expuestas a luz UV-C (Figura 22A). Estos datos sugieren que un alelo de *TK1a* funcional no es suficiente para revertir el daño provocado por la luz UV-C. En las plántulas irradiadas el desarrollo de la raíz se detuvo, no se desarrollaron hojas verdaderas y se presentaron cotiledones cloróticos; este efecto puede deberse a que las plántulas se mantuvieron en oscuridad posterior a la irradiación, por lo que no realizan fotosíntesis y el desarrollo de la parte aérea se detiene.

La detención del desarrollo de la raíz y del brote de las hojas verdaderas, así como los cotiledones cloróticos, también se observaron al exponer estos genotipos a hidroxiurea y zeocina, en ensayos previos utilizando la misma concentración de zeocina, el acortamiento de la raíz en mutantes *tk1a* fue del 47% (n=3 p<0.05), mientras que la concentración utilizada en este ensayo fue diferente a los anteriores; mientras que el crecimiento de la mutante *tk1b* se comprometió por la presencia de estos agentes genotóxicos, este efecto fue más pronunciado en las plántulas sesquimutantes (Figura 22B). Estos resultados sugieren que en *A. thaliana* *TK1a* participa en la respuesta a diversos tipos de estrés genotóxico y que la magnitud de su aporte está asociada al número de alelos funcionales.

10. Actividad del promotor del gen *TK1a* en fondos mutantes *atm* y *atr*

El tipo de daño genotóxico que perciben las células eucariontes determina la vía de respuesta que activará vías específicas de reparación del DNA; la vía ATR se activa en presencia de DNA de cadena sencilla; mientras que la vía ATM



responde a la ruptura de DNA de doble cadena (Lazzaro, et al., 2009). Sin embargo, estas dos vías no son mutuamente excluyentes. Para determinar si el gen *TK1a* es blanco de la regulación transcripcional de estas vías, se utilizaron plántulas transgénicas (generación T3) que expresan la fusión transcripcional *promTK1a::GUS* en los fondos Col-0, *atm* y *atr*. Las plántulas de cinco días se irradiaron con luz UV-C por 6 minutos y se evaluó la actividad de GUS a las 3, 6 y 12 horas post-irradiación. Para los tratamientos con hidroxiurea y zeocina, plántulas de 5 días se trataron por 3, 6 y 12 horas con el agente genotóxico e inmediatamente se evaluó la actividad de GUS.

La Figura 23 muestra las raíces de plántulas de 5 días de estas líneas transgénicas a la irradiación con luz UV-C (6 minutos). En plántulas de *A. thaliana* Col-0 sin irradiar hay actividad constitutiva del promotor *AtTK1a*, y se observó un incremento discreto en la actividad de GUS en la estela de la raíz a las 3 y 6 h post-irradiación. A las 12 h también se observaron regiones puntuales de actividad de GUS en la epidermis de la raíz. Este patrón de expresión contrastó con el observado en los fondos mutantes *atm* y *atr*. En estas plántulas no se observó expresión constitutiva en condiciones control, y tampoco ocurrió inducción de la actividad del promotor a las 3 y 6 h post-irradiación. Estos datos sugieren que la expresión de *TK1a* se encuentra “corriente abajo” de ATM y ATR en la señalización durante el desarrollo de la raíz y en respuesta al daño genotóxico provocando una exposición d. A las 12 h post-irradiación se observó actividad de GUS en ambos genotipos con un patrón irregular a lo largo de la raíz (Figura 23), dato que sugiere que la inducción de *TK1a* debe estar controlada de manera independiente a ATM y ATR respectivamente, por lo que la inducción de *TK1a* por estos transductores pueden estar cruzadas entre sí, otra posibilidad es que SOG1, el efector de la vía DDR (Figura 8), induce *TK1a* directamente, y otra posibilidad es que puede existir inducción de *TK1a* independiente a las vías DDR.

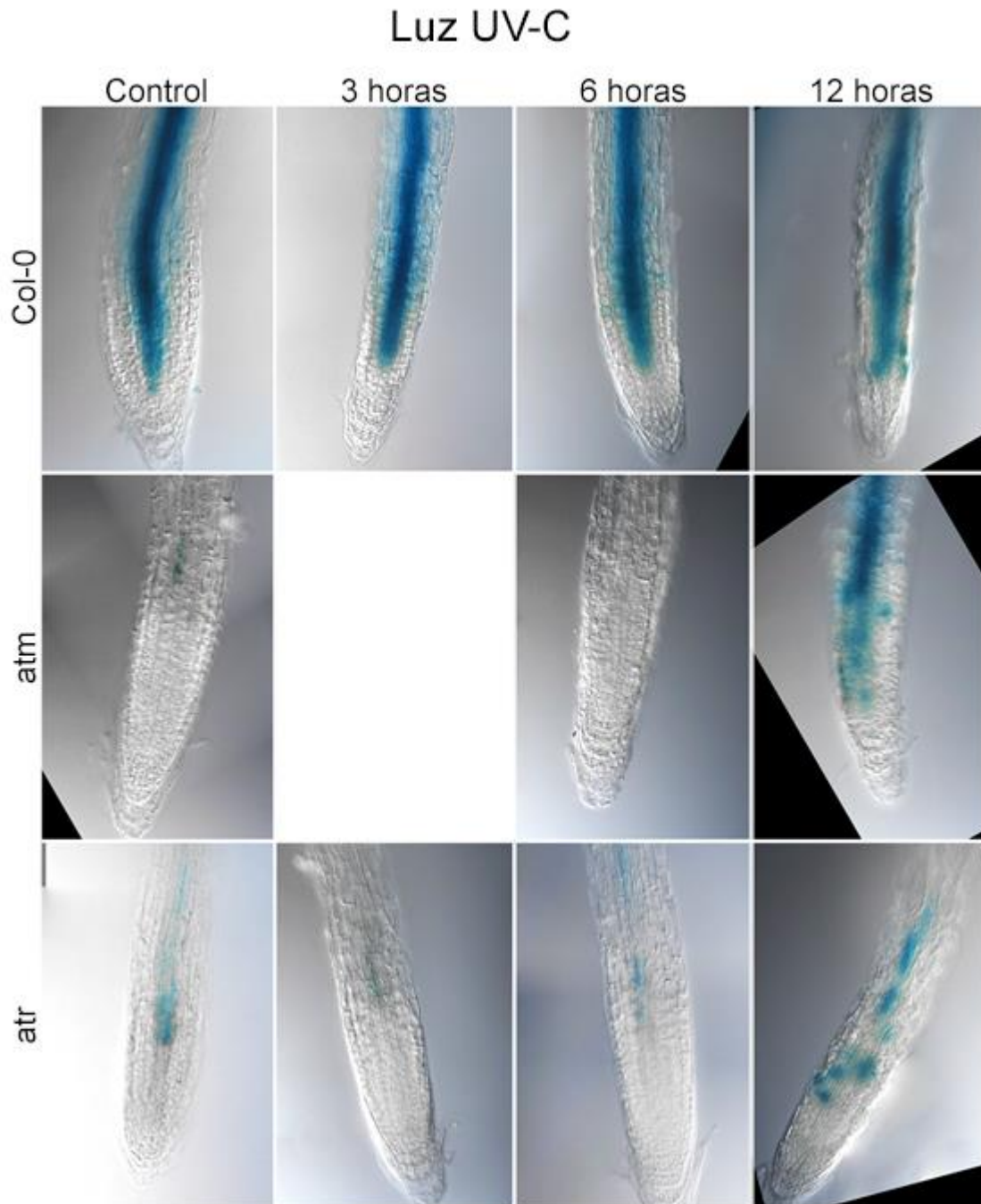


Figura 23. Tinción histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de *AtTK1a* en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes *atm* y *atr* de 5 días en respuesta a luz UV-C. Actividad de GUS en raíz de plántulas de 5 días de edad en respuesta a luz UV-C (6 min) a las 3, 6 y 12 horas post-irradiación en oscuridad. En el periodo posterior a la irradiación las plántulas se mantuvieron en oscuridad. Fotografías con aumento de 40X.



Estas mismas líneas se expusieron a 1 mM de hidroxiaurea, imágenes representativas de este experimento se muestran en la Figura 24. Dado el nivel de expresión constitutiva de *TK1a* en la raíz de *A. thaliana* (reflejado por la actividad de GUS en las plantas Col-0), fue difícil observar la inducción de la expresión de este gen por el agente genotóxico. Sin embargo, en las mutantes *atm* y *atr* la expresión en condiciones control está reprimida y no se observó inducción de *TK1a* a las 3 h, o 6 h de tratamiento, y la señal de GUS fue muy débil a las 12 h en el fondo mutante *atm*. Estos datos refuerzan que la inducción de *TK1a* está regulada “corriente abajo” de ATM y ATR, sin embargo, de manera semejante al ensayo con luz UV-C, *TK1a* parece estar regulada e inducida de manera independiente a las vías DDR.

La hidroxiaurea inhibe a la RNR, que afecta las pozas de nucleótidos y finalmente genera paro de horquillas de replicación, sin embargo, el daño no es directo al DNA por lo que de requerirse la inducción de *TK1a* sería primeramente para compensar la ausencia de nucleótidos, una vez que el daño a la RNR se revierte, los niveles de *TK1a* deberían regresar a niveles constitutivos, por lo que no necesariamente existe un daño relevante al DNA que las vías DDR perciban a tiempos cortos, no obstante a tiempos largos la Hidroxiaurea genera paro en la horquillas de replicación, que sí son percibidas por las vías DDR. La mutante *atm* induce a *TK1a* de manera fuerte a las 12 horas, a diferencia de la mutante *atr* que la inducción de *TK1a* es menor a la observada en la otra mutante en las mismas condiciones, por lo que es posible que la reparación de las ssDNA pueda encender la vía ATM, o que la inducción de *TK1a* en estas condiciones es independiente de las vías DDR.

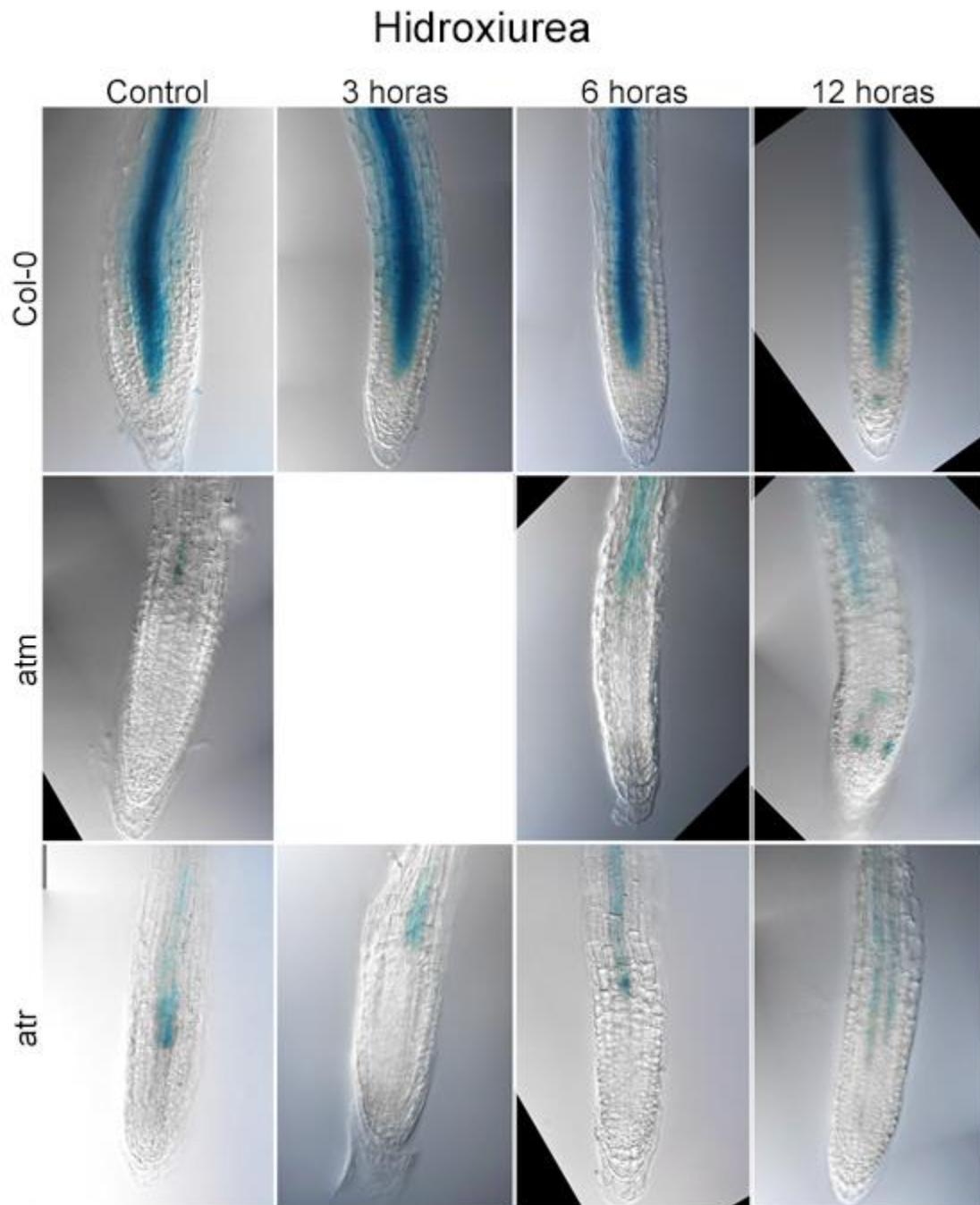


Figura 24. Tinción histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de *AtTK1a* en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes *atm* y *atr* de 5 días en respuesta a hidroxiurea. Actividad de GUS en raíz de plántulas de 5 días de edad en respuesta a hidroxiurea (1 mM) durante 3, 6 y 12 horas. Fotografías con aumento de 40X.



Por otro lado, en el fondo silvestre (Col-0) en respuesta a zeocina, se observó inducción de la actividad de GUS en las regiones del córtex de la raíz y una tinción más intensa en los haces vasculares a las 12 h de tratamiento (Figura 25). El tratamiento con este genotóxico permitió distinguir a los genotipos *atm* y *atr*, pues en el primero se abatió la inducción de la actividad de GUS y solamente se observó una señal débil a las 12 h. La mutante *atr* no muestra expresión constitutiva de *TK1a* en condiciones control, sin embargo, en presencia de zeocina ocurre inducción de *TK1a* desde las 6 h, y a las 12 h presentó un patrón similar a las plantas Col-0. Al comparar las líneas *atm* y *atr* se puede sugerir que la actividad de ATM induce primero a *TK1a*, como es esperado debido a que la vía ATM responde a DSBs, sin embargo, en ausencia de ATM existe inducción de *TK1a* a las 12 horas, indicando que en respuesta a DSBs la inducción tardía de *TK1a* puede estar mediada por la actividad de ATR, o que la reparación de DSBs en ausencia de ATM continué por una vía diferente, como la activación de SOG1, o la acción independiente de vías independientes a DDR.

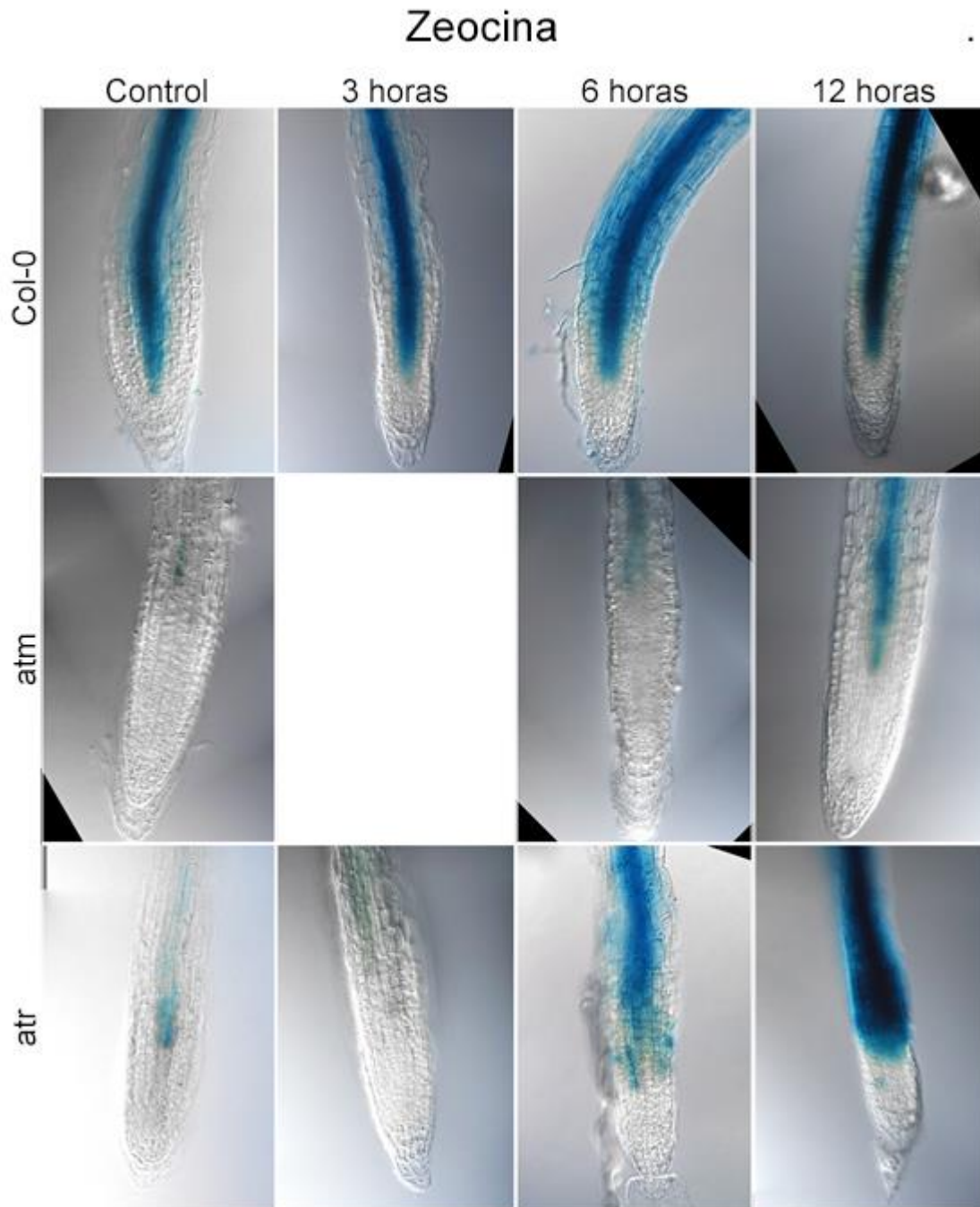


Figura 25. Tinción histoquímica de la actividad de GUS dirigida por el promotor de *AtTK1a* en plántulas silvestres Col-0, y en los fondos mutantes *atm* y *atr* de 5 días en respuesta a zeocina. Actividad de GUS en raíz de plántulas de 5 días de edad en respuesta a zeocina 10 μ M durante 3, 6 y 12 horas. Fotografías con aumento de 40X.



VII. Discusión

La carencia del TK1a en A. thaliana no es compensada por la inducción TK1b ni de genes de la vía de síntesis de novo de nucleótidos

Este trabajo aportó evidencia sobre la contribución de la TK1a citosólica en los mecanismos de reparación de DNA a través de la caracterización fenotípica de mutantes en su respuesta a agentes genotóxicos con distintos mecanismos de acción. Tanto la biosíntesis *de novo* de nucleótidos como la ruta de salvamento aportan estos precursores para la polimerización del DNA y en presencia de estrés genotóxico se resalta la importancia de la vía de salvamento de pirimidinas en mantener un correcto equilibrio en las pozas de nucleótidos. Los estudios para elucidar la función de las rutas de biosíntesis de pirimidinas en plantas se han limitado a unas cuantas especies, como *Picea glauca*. Durante la germinación de embriones de esta conífera, las enzimas de la vía de salvamento muestran una alta actividad que declina conforme la germinación progresa, y entonces la síntesis *de novo* predomina (Zrenner et al., 2006; Mainguet et al., 2009; Stasolla et al., 2002; Stasolla et al., 2003). Bajo esta premisa, concentramos la mayor parte de la caracterización fenotípica en el desarrollo temprano (8 a 10 días) de las plántulas de Arabidopsis.

Debido a que las plántulas mutantes *tk1a* no mostraron ningún defecto en el crecimiento, exploramos si esta carencia era compensada por la expresión del gen *TK1b*, así como de los genes de la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos. En el experimento preliminar encontramos que en plántulas de 10 días de ninguna de las dos mutantes analizadas (*tk1a-1* y *tk1a-3*) hubo niveles mayores de los transcritos de *TK1b*, *RNR1* y *TSO2* que en plántulas silvestres. Estos resultados sugieren que bien el aporte de dTMP por la TK1a no es indispensable durante esta etapa del desarrollo o bien, la actividad enzimática de TK1b aumenta para compensar esta carencia. Para explorar la segunda opción, analizamos la actividad específica total de TK en estas mutantes y encontramos que ésta no difería significativamente de las plantas silvestres, dado que la actividad de TK la aportan



tanto la enzima citosólica (TK1a) como la organelar (TK1b). Esta actividad fosforilante solamente se puede atribuir a TK1b pues, aunque *Arabidopsis* tiene un gen que codifica para una desoxiribonucleósido cinasa (AtdNK; AT1G72040), ésta fosforila a los nucleósidos dA, dG, dC y dU, pero no dT (Clausen et al, 2012), que fue el sustrato empleado en el ensayo.

Este resultado puede explicarse por: 1) una mayor estabilidad del RNAm *TK1b*; 2) mayor eficiencia de traducción del RNAm *TK1b*, 3) activación de TK1b por modificaciones post-traduccionales. Sobre este último mecanismo hay más estudios, en particular de la TK humana. La forma activa de la enzima HsTK es un homotetrámero cuyo valor de K_m para timidina es aproximadamente 30 veces más bajo que el del homodímero y la presencia del ATP favorece la formación del tetrámero (Munch-Petersen, et al., 1993; Munch-Petersen, et al., 1995). Otro mecanismo de regulación en la TK1 humana es la fosforilación de la serina 13 (Ser13) por una cinasa dependiente de ciclina; esta modificación causa la disociación del tetrámero para la formación del dímero con la consecuente reducción en actividad (Ke, et al., 2003; Li, et al., 2004). Aunque estos mecanismos no se conocen para la enzima de plantas dado su nivel de conservación a nivel de secuencia (Figura 5), es posible que ocurra un tipo de activación post-traducciona que explique la compensación de la carencia del gen *TK1a* en estas mutantes (Chang, et al., 1998; Li, et al., 2004; Sala, et al., 2014), o que la enzima TK1b sintetizada, cuya actividad es mayor a la necesaria, sea suficiente para abastecer la demanda de dTTPs en esta etapa del desarrollo.

La posible compensación de la carencia de TK1a por un incremento en la actividad de la enzima TK1b para aportar dTMP debe ser coordinada con la actividad de transportadores de nucleótidos organelares. El genoma de *Arabidopsis* contiene 8 genes que codifican transportadores equilibradores de nucleósidos (Equilibrative Nucleoside Transporters: ENTs 1-8), por lo que múltiples miembros de la familia ENT de *Arabidopsis* pueden funcionar en la vía de salvamento de nucleótidos. Los transportadores AtENT3, 6 y 7 tienen alta afinidad a timidina (Chen, et al., 2006). AtENT1 y 3 transportan nucleósidos y desoxinucleótidos, y ambos se



localizan en la membrana plasmática (Li, et al., 2003; Wormit, et al., 2004). En mutantes KO *ent3*, no hay compensación completa en el transporte de nucleósidos de pirimidina por los otros transportadores tipo ENT (Traub, et al., 2007), por lo que AtENT3 puede ser el transportador involucrado en su transporte.

En los organelos se localizan diversas enzimas de las vías de salvamento cuya actividad requiere de nucleósidos como sustratos. Los transportadores PLUTO son los únicos transportadores caracterizados en *Arabidopsis* por los cuales se transporta uracilo hasta los plastidios, además la mayor expresión de PLUTO está entre los días 2-10 de edad de la plántula (Girke, et al., 2014), por lo que este mismo transportador puede ser capaz de transportar timidina desde y hasta los plastidios en condiciones adversas.

La sacarosa en el medio de crecimiento de A. thaliana enmascara la sensibilidad de las mutantes *tk1a* a agentes genotóxicos

Durante el establecimiento de las condiciones para estudiar los fenotipos de susceptibilidad a agentes genotóxicos, no encontramos diferencias entre el fenotipo de plántulas mutantes *tk1a* y plántulas silvestres Col-0 expuestas a luz UV-C en presencia de sacarosa en el medio (Figura suplementaria 13). Debido a que la sacarosa no es un componente esencial, ni para la germinación de las semillas de *Arabidopsis*, ni para el desarrollo de las plántulas (Mainguet, et al., 2009), eliminamos este componente del medio para la evaluación del fenotipo en respuesta a agentes genotóxicos.

El crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* durante la transición de la fase heterotrófica a la fase foto-autotrófica (que puede inferirse por el grado de reverdecimiento en hoja), recae en la disponibilidad de fuentes de energía almacenadas en la semilla y la disponibilidad de una fuente de carbono exógena puede acelerar el crecimiento y el establecimiento del aparato fotosintético. Sin embargo, altos niveles de glucosa o sacarosa en el medio se asocian con el retraso de la transición a la fase fotoautótrofa (Rognoni, et al., 2007). Asimismo, se sabe que la cinasa Target Of Rapamycin (TOR) percibe y transduce señales derivadas



de la glucólisis y de la respiración celular a diversos efectores y factores transcripcionales que controlan la proliferación de células en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis* (Xiong & Sheen, 2013). Uno de los blancos de TOR es la cinasa ribosomal S6 (S6K1), responsable de la fosforilación post-traducciona de CAD (Carbamoil-fosfato sintetasa 2, Aspartato trans carbamoilasa, Dihidro orotatasa), enzima que cataliza los 3 primeros pasos de la síntesis *de novo* de pirimidinas. La regulación directa de CAD por S6K1 es un mecanismo de control que incrementa las pozas de nucleótidos disponibles para la síntesis de DNA y RNA que acompaña el crecimiento celular (Ben-Sahra, et al., 2013). En plántulas de *Arabidopsis*, la presencia de glucosa (30 mM) induce la expresión (150% - 200%) de los genes RNR1 y TSO2, indicativo de la activación de la síntesis *de novo* de nucleótidos (Pedroza-García et al., 2019). Es posible que la germinación de las semillas de *Arabidopsis* en presencia de sacarosa o glucosa active la ruta *de novo* de síntesis de nucleótidos, lo que pudiera enmascarar el fenotipo de hipersensibilidad observado en las mutantes *tk1a*. Otra posibilidad es que TOR active la expresión de genes de la fase S dependiente de la disponibilidad de glucosa, que puede activar el factor de transcripción E2F (Polyn, et al., 2015), muchos genes involucrados en la síntesis de novo, como RNR1 y TSO2 comparten con *TK1a* un potencial elemento de unión a E2F en sus promotores, que tiene función de regulación positiva para estos genes (Vandepoele et al., 2005), lo que sugiere que la fuente de carbono es capaz de encender y regular tanto genes de la fase S del ciclo celular como genes de síntesis de nucleótidos.

Mediante la medición del crecimiento de la raíz de A. thaliana se estableció la sensibilidad a agentes genotóxicos en la mutante tk1a

La sensibilidad a agentes genotóxicos se puede estudiar a nivel de fenotipo mediante la evaluación de parámetros de crecimiento y/o registro de síntomas en cotiledones y hojas que reflejan la transición a la fase foto-autotrófica. En este trabajo se evaluó el porcentaje de plantas de *Arabidopsis* que mostraron hojas verdaderas desarrolladas y la longitud de la raíz en plántulas silvestres y mutantes



tratadas con los agentes genotóxicos. Sin embargo, el primer parámetro de referencia (% de plantas con hojas verdaderas) no resultó lo suficientemente sensible para evaluar la efectividad a la respuesta a agentes genotóxicos, pues en general los fenotipos de reducción debido a los tratamientos empleados fueron mínimos y no se pudieron distinguir diferencias fenotípicas claras. Este parámetro se ha empleado para el análisis de tratamientos más agresivos, como pulsos de radiación y de 100 Gy en plántulas de 4 días (Rosa, et al., 2013), esto sugiere que las concentraciones utilizadas en estos ensayos no tienen efectos en el desarrollo de hojas verdaderas. Por otro lado, el parámetro de longitud de la raíz permitió distinguir el fenotipo entre las mutantes *tk1a* y plantas silvestres Col-0 en ausencia de sacarosa en los medios de cultivo (Figuras 16B, 17B, y 18B). Si bien este parámetro fenotípico permite distinguir a los genotipos en términos de su susceptibilidad a los distintos agentes genotóxicos, no revelan el estado de daño del genoma. Para esto, se debe recurrir a otras técnicas dependiendo del daño causado. Por ejemplo, para determinar los niveles de CPD y [6,4]-PPs, generados por la radiación UV-C, se pueden emplear anticuerpos monoclonales específicos que reconocen estos complejos en el DNA (Pedroza-García et al., 2015). Asimismo, para evaluar la ruptura de doble cadena en el DNA dañado por la zeocina, se emplea la técnica de “colas de cometa” que refleja la magnitud del daño (Menke et al., 2001). Para complementar este estudio se sugiere la correlación de la longitud de la raíz con la proliferación celular en los meristemas, comparando el tamaño y número de células con la longitud en las raíces de las diferentes líneas utilizadas en este estudio (Koprivova et al., 2010).

La sobreexpresión de TK1a no necesariamente resulta en resistencia al daño al DNA

En las mutantes *tk1a* la actividad total de TK detectada es similar a la de Col-0 (Figura 15), además los niveles de RNAm de *TK1b* en las mutantes *tk1a* no varían en comparación a Col-0 (Figura 14), esto puede deberse a una mayor estabilidad del RNAm o eficiencia en la traducción. La línea sobreexpresora a pesar



de tener un aumento en la actividad de TK, no se refleja en un fenotipo de resistencia al daño genotóxico como el reportado en la línea *oetk1a* (Pedroza-García et al., 2015). Una de las diferencias entre estas mutantes es que en este trabajo se utilizó con una línea que contiene un gen cuya expresión es controlada por el promotor constitutivo p35S. A diferencia de la línea *oetk1a* que genera un aumento de 35% en el mRNA en condiciones normales y un aumento de 40% en la actividad que finalmente resulta en resistencia a agentes genotóxicos cuantificada por el desarrollo de la raíz (Pedroza-García et al., 2015), la línea sobreexpresora p35S tiene un aumento de cerca del 60% en el mRNA (Figura 15) y un aumento de por lo menos 25% en la actividad de TK (Figura 14) que no resulta suficiente para incrementar la tolerancia a los agentes genotóxicos.

Un solo gen funcional de la TK no es suficiente para la reparación de daño al DNA provocado por agentes genotóxicos

Las mutantes KO *tk1a* tienen dos alelos funcionales de *TK1b* que confieren suficiente actividad enzimática para un desarrollo comparable a las líneas silvestres Col-0. Estas mutantes fueron hipersensibles a luz UV-C, HU y zeocina que generan daño principalmente al DNA nuclear (Weaver, 2002), (Takashi, et al., 2009), (García, et al., 2003). Este fenotipo se revirtió mediante la suplementación con sacarosa o glucosa en el medio. Dado que la doble mutante tiene muy pobre desarrollo y un alto índice de letalidad durante etapas tempranas (Clausen et al, 2012; Pedroza-García et al., 2019), evaluamos plántulas sesquimutantes (homocigotas para *tk1b* y heterocigotas para *tk1a*). Esta estrategia permitió evaluar la función de un solo alelo funcional *TK1a*. El fenotipo observado en las plántulas sesquimutantes fue de menor tamaño, variegación en hojas e hipersensibilidad a los diferentes agentes genotóxicos, se ha reportado que plantas doble mutantes *tk1a/tk1b* tienen cotiledones blancos y son letales en etapas de desarrollo temprano (Clausen, et al., 2012), por lo que nuestros resultados de resistencia a agentes genotóxicos obtenidos en las plántulas sesquimutantes sugieren que un solo alelo es incapaz de



proveer la cantidad suficiente de actividad enzimática, lo que se refleja tanto en el fenotipo de desarrollo normal como en la respuesta de daño al DNA.

Las plantas sesquimutantes presentaron hojas de la roseta más pequeñas y con variegación. Este fenotipo lo comparte con otras mutantes en las que el gen silvestre tiene la función de mantener la integridad del genoma organelar. Por ejemplo, las mutantes *Atpol1a* y *Atpol1b*, de DNA polimerasas organelares, muestran el fenotipo de variegación y niveles reducidos de DNA organelar y de plastidios (Parent et al., 2011). En las plántulas sesquimutantes, la dosis génica parece ser insuficiente para complementar la función de TK en la reparación del DNA tanto nuclear como organelar, y a reserva de una medición detallada en los porcentajes de daño al DNA, el fenotipo de las plantas sesquimutantes se puede asociar a defectos en el desarrollo de mitocondrias y plastidios.

AtTK1a tiene una regulación transcripcional dependiente de diversos factores

En este trabajo estudiamos la regulación de la expresión del gen *TK1a* mediante fusiones transcripcionales de su promotor con el gen *GUS* en plantas silvestres Col-0 y en los fondos mutantes *atm* y *atr*. Los análisis de microarreglos muestran que la expresión de *TK1a* disminuye significativamente en mutantes *atm* en respuesta a radiación- γ , a diferencia de lo previamente observado en mutantes *atr* (Culligan, et al., 2006), lo que sugiere que *TK1a* es blanco de esta vía de respuesta de daño al DNA. En este trabajo encontramos, mediante tinción histoquímica de GUS, que el gen *TK1a* no se expresa en los fondos mutantes *atm* y *atr*, mientras que la inducción de *TK1a* se conserva en niveles bajos a las 12 horas de exposición a luz UV-C, hidroxiurea y zeocina (Figuras 23, 24 y 25). Estos resultados sugieren que la expresión de *TK1a* está controlada, tanto por ATM como ATR en respuesta a estrés genotóxico. Estas vías no son mutuamente excluyentes y ambas convergen en el factor transcripcional SOG1. En plantas mutantes *sog1*, la inducción del gen *TK1a* por radiación γ , se pierde (Yoshiyama, et al., 2009), lo que sugiere que es un blanco directo de este factor transcripcional.



Además de la regulación de la expresión del gen *TK1a* por las vías DDR, el análisis del promotor *TK1a* sugiere su control por otros factores involucrados en la progresión del ciclo celular. Contiene un sitio de unión para factor Myb (AACGG) en la posición -292 con respecto al codón de inicio de la traducción. Este elemento se encuentra también en los promotores de genes de ciclo celular, como la ciclina B1:1 de *Arabidopsis* (Planchais et al., 2002). Asimismo, el promotor del gen *AtTK1a* contiene un motivo de unión asociado al factor transcripcional E2F (-TTTGGCCC-) localizado en la posición -637 nt en orientación reversa con respecto del codón de inicio de la traducción (Pedroza-García, 2011). El grupo de genes E2F codifican una familia de factores de transcripción que controlan la progresión del ciclo celular y la síntesis de DNA, a pesar de la evolución divergente que existe entre animales y plantas ambos organismos controlan la progresión del ciclo celular con complejos de E2F con el factor de transcripción DP (E2F/DP) (Inzé & De Veylder, 2006). La actividad transcripcional de E2F se inhibe al formar un complejo con la proteína Retinoblastoma (RB) que regula negativamente la transición G1-S (Shen, 2002).

En el genoma de *A. thaliana* se identificaron 181 posibles genes blanco para E2F, en la mayoría de los casos este elemento se localiza en las 300 pb de bases contiguas al sitio de inicio de la transcripción. *TK1a* es uno de los blancos potenciales de E2F pues análisis de microarreglos revelaron que en plantas sobreexpresoras de *E2Fa/DPa*, la inducción de *TK1a* aumenta cerca de 15 veces con respecto a línea silvestre (Vandepoele, et al., 2005). Este dato aporta antecedentes sobre la regulación de *TK1a* dentro del ciclo celular. Además de su función en el control del ciclo celular, E2F también participa en la respuesta de daño al DNA pues plantas mutantes *e2Fa* son hipersensibles a la ruptura de doble cadena del DNA (Lang, et al., 2012).

La percepción del DNA dañado, la señalización molecular necesaria para generar los elementos de su separación, el acceso de estos elementos, la síntesis y el ligado de la cadena del DNA es un proceso que requiere de mecanismos de remodelación de la cromatina. El paso de reconocimiento y señalización de un daño



al DNA es crítico; las señales de una ruptura de doble cadena de DNA son focos de γ H2AX, mediados por ATM (en mayor medida) y ATR (Friesner, et al., 2005). Los complejos de remodelación de cromatina Swr1 e Ino80 interactúan con γ H2AX (Downs, et al., 2004) que flanquean regiones de nucleótidos para facilitar o inhibir el acceso de otros factores, además γ H2AX interactúa con E2F, posiblemente de manera dependiente del ciclo celular (Lang, et al., 2012). Además, existe interacción entre E2F y Retinoblastoma (E2F-Rb), que controla la transición del ciclo celular por la interacción con diferentes factores de remodelación de la cromatina, por ejemplo: SWI-SNF, HDAC, HMTase y DNMT, por lo que la relación de *TK1a-E2Fa* durante la reparación del daño al DNA así como durante el ciclo celular es un punto importante de investigación para entender la regulación transcripcional de *TK1a*.



VIII. Conclusiones y perspectivas

1. Conclusiones

La hipersensibilidad de las mutantes *tk1a* de *Arabidopsis thaliana* a agentes genotóxicos –luz UV-C, hidroxiurea y zeocina–, sugiere que esta enzima participa en la respuesta de daño al DNA, a través del aporte de dTTP, requerido en la reparación por escisión de nucleótidos. La expresión del gen *TK1a*, así como su inducción durante las vías de respuesta de daño al DNA están controladas por las vías ATM y ATR.

2. Perspectivas

Este trabajo aportó evidencias sobre la función de la TK1a en la respuesta a agentes genotóxicos, y hay otras preguntas sobre su participación y regulación, como:

- Comparar el grado de daño al DNA en plantas silvestres y mutantes *tk1a*, por ejemplo: niveles de fotoproductos causados por luz UV-C y grado de ruptura de doble cadena causado por zeocina.
- Determinar si en presencia de sacarosa, se induce la expresión de genes de la biosíntesis *de novo* de nucleótidos, que explique porqué en presencia de esta fuente de carbono, las mutantes *tk1a* toleren el estrés genotóxico.
- Estudiar la regulación transcripcional del gen *TK1a* por los factores E2F y SOG1.



IX. Referencias

- Al Khateeb W., & Schroeder D., 2009. Overexpression of Arabidopsis damaged DNA binding protein 1A (DDB1A) enhances UV tolerance. *Plant Molecular Biology*, 70: 371-383.
- Auclair Y., & Richard S., 2013. The role of arginine methylation in the DNA damage response. *DNA Repair*, 12: 459-465.
- Ben-Sahra I., Howell J. J., Asara J. M. & Manning B. D., 2013. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, 339(6125): 1323-1328.
- Berg Tymoczko J.L., & Stryer L., 2002. *Biochemistry*. 5 ed. New York: W. H. Freeman.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brouwer I., Zhang H., Candelli A., Normanno D., Peterman E.J.G., Wuite G.J.L., Modesti M., 2017. Human RAD52 Captures and Holds DNA Strands, Increases DNA Flexibility, and Prevents Melting of Duplex DNA: Implications for DNA Recombination. *Cell Reports*, 18(12): 2845-2853.
- Chang Z.F., Huang D.Y. & Chi L.M., 1998. Serine 13 is the site of mitotic phosphorylation of human thymidine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20): 12095-12100.
- Chen K.L., Xu M.X., Li G.Y., Liang H., Xia Z.L., Liu X., Zhang J.S., Zhang A.M., Wang D.W., 2006. Identification of AtENT3 as the main transporter for uridine uptake in Arabidopsis roots. *Cell Research*, 16(4): 377-388.
- Chen Y., Eriksson S. & Chang Z., 2010. Regulation and Functional Contribution of Thymidine Kinase 1 in Repair of DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 27327-27335..
- Clausen A., Girandon L., Ali A., Knecht W., Rozpedowska E., Sandirini M.P., Andreasson E., Munch-Petersen B. & Piškur J., 2012. Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in Arabidopsis thaliana. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 209: 3889–3897.
- Clough S.J., & Bent A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6): 735-743.
- Culligan K.M., Tissier A. & Britt, A.B., 2004. ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 16: 1091-1104.
- Culligan K.M., Robertson C.E., Foreman J., Doerner P., Britt A.B., 2006. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant Journal*, 48: 947-961.
- de la Rosa-Ortega, L.F., 2016. *Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes en el gen de la Timidina Cinasa en Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura. Químico de Alimentos. México, Cd. Mx. Universidad Nacional Autónoma de México.



- Dobrovolsky V., Bucci T., Heflich R., Desjardins J. & Richardson F., 2003. Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 78: 1-10.
- Downs J.A., Allard S., Jobin-Robitaille O., Javaheri A., Auger A., Bouchard N., Kron S.J., Jackson S.P., Côté J., 2004. Binding of Chromatin-Modifying Activities to Phosphorylated Histone H2A at DNA Damage Sites. *Molecular Cell*, 16(6): 979-990.
- Dutta I., Dutta K., Smith D.W. & O'Donovan G.A., 1991. High-performance liquid chromatography of deoxyribonucleoside di- and triphosphates in tomato roots. *Journal of Chromatography*, 536: 237-243.
- Edwards K., Johnstone C. & Thompson C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, 19(6): 1349.
- Evans D. & Guy H., 2004. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32): 33035-33038.
- Fanning E., Klimovich V. & Nager A., 2006. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research*, 34: 4126-4137.
- Fousteri M. & Mullenders L.H., 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Research*, 18: 73-84.
- Friesner J.D. Liu B., Culligan K. & Britt A.B., 2005. Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5): 2566-2576.
- Furukawa T., Curtis M.J., Tominey C. & Doung Y., 2010. A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair*, 9: 940-948.
- Garcia V., Salanoubat M., Choisine N. & Tissier A., 2000. An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana*: complete genomic organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Research*, 28(8): 1692-1699.
- Garcia V., Bruchet H., Comescaisse D., Granier F. & Bouchez D., Tissier, A., 2003. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant Cell*, 15: 119-132.
- Girke C., Daumman M., Niopek-Witz S. & Mölmann T., 2014. Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1-12.
- Heitzeberg F., Chen I.P., Hartung F., Orel N., Angelis K. & Puchta H., 2004. The Rad17 homologue of *Arabidopsis* is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *The Plant Journal*, 38: 954-968.
- Helton E. & Chen S., 2007. p53 Modulation of the DNA Damage Response. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100: 883-896.
- Inzé D. & De Veylder L., 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40: 77-105.



- Jaskelioff M., Van Komen S., Krebs J.E., Sung P., Peterson C.L., 2003. Rad54p Is a Chromatin Remodeling Enzyme Required for Heteroduplex DNA. Joint Formation with Chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 9212-9218.
- Kafer C., Zhou L., Santoso D., Guitguis A., Weers B., Park S. & Thornburg R., 2004. Regulation of pyrimide metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9: 1611 -165.
- Ke Y., Yang C.C., Tsai I.C. & Chang Z.F., 2003. Degradation of human thymidine kinase is dependent on serine-13 phosphorylation: Involvement of the SCF-mediated pathway. *Biochemical Journal*, 370(1): 265-273.
- Kim M.A., Kim H.J., Brown A.L., Lee M.Y., Bae Y.S., Park J.I., Kwak J.Y., Chung J.H., Yun J., 2007. Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome.wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. *Experimental and Molecular Medicine*, 39: 205-212.
- Koprivova A., Mugford S. T., Kopriva S., 2010. *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant cell* 29(10): 1157-1167
- Lane A.N. & Fan T.W.M., 2015. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43(4): 2466-2485.
- Lang J., Smetana O., Sanchez-Calderon L., Lincker F., Genestier J., Schmit A.C., Houlné G., Chabouté M.E., 2012. Plant γ H2AX foci are required for proper DNA DSB repair responses and colocalize with E2F factors. *New Phytologist*, 194(2): 353-353.
- Lazzaro F., Giannattasio M., Puddu F., Granata M., Pelliccioli A., Plevani P. & Muzi-Falconi M., 2009. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair*, 8: 1055-1067.
- Li G., Liu K., Baldwin S.A. & Wang D., 2003. Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37): 35732-357342.
- Li C.L., Lu C.Y., Ke Y. & Chang Z.F., 2004. Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3): 387-393.
- Manguet S.E., Gakière B., Majira A., Pelletier S., Bringel F., Guérard F., Caboche M., Berthomé R., Renou J.P., 2009. Uracil salvage is necessary for early *Arabidopsis* development. *Plant Journal*, 60(2): 280-291.
- Menke, M., Chen, I., Angelis, K.J., Schubert, I. 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research*. 493: 87-93.
- Moffatt, B. A., & Ashihara, H. 2002. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The arabidopsis book*, 1, e0018.
- Munch-Petersen B., Tyrsted G. & Cloos L., 1993. Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21): 15621-15625.
- Munch-Petersen B., Cloos L., Jensen H. & Tyrsted G., 1995. Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Advances in enzyme regulation*, 1(1): 69-89.



- Nakatsu Y., Asahina H., Citterio E., Rademakers S., Vermeulen W., Kamiuchi S., Yeo J.P., Khaw M.C., Saijo M., Kodo N., Matsuda T., Hoeijmakers J.H., Tanaka K., 2000. XAB2, a Novel Tetratricopeptide Repeat Protein Involved in Transcription-coupled DNA Repair and Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 34931-34937.
- Pardo B., Gómez-González B. & Aguilera A., 2009. DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6): 1039-1056.
- Parent J.S., Lepage E., Brisson N., 2011. Divergent roles for the two Pol1-like organelle DNA polymerases of Arabidopsis. *Plant Physiology* 156: 254-262.
- Pedroza-García J. A., 2011. *Expresión de los genes de Timidina Cinasa (TK1a y TK1b) en Arabidopsis thaliana. Tesis de Licenciatura.* México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pedroza-García J.A., 2013. *Caracterización de la Timidina Cinasa de Arabidopsis thaliana y su función en la reparación de DNA. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas.* México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pedroza-García J.A., Najera-Martinez M., de la Paz-Sánchez M. & Plasencia J., 2015. Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology*, 87: 303-315.
- Pedroza-García J.A., Domenichini S., Mazubert C., Bourge M., White C., Hudik E., Bounon R., Tariq Z., DElannoy E., del Olmo I., Piñero M., Jarillo J.A., Bergounioux C., Benhamed M., Raynaud C., 2016. Role of the polymerase epsilon sub-unit DPB2 in DNA replication, cell cycle regulation and DNA damage response in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 44: 7251–7266.
- Pedroza-García J.A., Nájera-Martínez M., Mazubert C., Aguilera-Alvarado P., Drouin-Wahbi J., Sánchez-Nieto S., Gualberto J.M., Raynaud C., Plasencia J. 2019. Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity. *Plant Journal* 97, 430-446
- Planchais S., Perennes C., Glab N., Mironov V., Inzé D., Bergounioux C., 2002. Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath;CycB1;1* transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Molecular Biology*, 50(1): 111-127
- Pontarin G., Gallinaro L., Ferraro P., Reichard P. & Bianchi V., 2003. Origins of mitochondrial dynamic relations to cytosolic pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 12159-12164.
- Polyn, S., Willems, A. & De Veylder, L., 2015. Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Plant Biology*, 23, pp. 1-7.
- Roa H., Lang J., Culligan K.M., Keller M., Holec S., Cognat V., Montané. M.H. & Guy Houlné M.E.C., 2009. Ribonucleotide Reductase Regulation in Response to Genotoxic Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151: 461-471.
- Rognoni S., Teng S., Arru L., Smeekens Sjef C.M., Perata P., 2007. Sugar effects on early seedling development in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 52(3): 217-228.



- Rosa M., Von Harder M., Cigliano R.A., Schlögelhofer P., Mittelsten Scheid O., 2013. The Arabidopsis SWR1 chromatin-remodeling complex is important for DNA repair, somatic recombination, and meiosis. *Plant Cell*, 25(6): 1990-2001.
- Saada A., Shaag A., Mandel H., Nevo Y., Eriksson S. & Elpeleg O., 2001. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genetics*, 29: 342-344.
- Sala R., Nguyen Q.D., Patel C.B., Mann D., Steinke J.H., Vilar R., Aboagye E.O., 2014. Phosphorylation Status of Thymidine Kinase 1 Following Antiproliferative Drug Treatment Mediates 3'-Deoxy-3'-[18F]-Fluorothymidine Cellular Retention. *PLOS ONE*, 9(7): 1-9.
- Schröder M., Giermann N. & Zrenner R., 2005. Functional Analysis of the Pyrimidine de Novo Synthesis Pathway in Solanaceous Species. *Plant Physiology*, 138: 1926-1938.
- Shen W.H., 2002. The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends in Plant Science*, 7(11): 505-511.
- Stasolla, C., Loukanina, N., Ashihara, H., Yeung, E.C. and Thorpe, T.A. (2002) Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in embryos and megagametophytes of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiol. Plant.* 115, 155–165.
- Stasolla C., Katahira R., Thorpe T. & Ashihara H., 2003. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1271-1295.
- Sugasawa K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K., Hanaoka F., 2005. UV-Induced Ubiquitylation of XPC Protein Mediated by UV-DDiubiquitin Ligase Complex. *Cell*, 121(3): 387-400.
- Takashi Y., Kobayashi Y., Tanaka K. & Tamura K., 2009. Arabidopsis replication protein a 70a is requires for DNA damage response and telomere length homeostasis. *Plant & Cell Physiology*, 50: 1965-1976.
- The Bio-Analytic Resource for Plant Biology, 2005. *Arabidopsis eFP Browser*. [En línea] Available at: <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>
- Traub M., Flörchinger M., Piecuch J., Kunz H.H., Weise-Steinmetz A., Deitmer J.W., Ekkehard Neuhaus H., Möhlmann T., 2007. The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 49(5): 855-864.
- van der Graaff E., Hooykaas P., Lein W., Lerchl J., Kunze G., Sonnewald U., Boldt R., 2004. Molecular analysis of "de novo" purine biosynthesis in Solanaceous species and in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Bioscience*, 9: 1803-1816.
- Vandepoele K., Vlieghe K., Florquin K., Hennig L., Beemster G.T., Grissem W., van de Peer Y., Inzé D., de Veylder L., 2005. Genome-Wide Identification of Potential Plant E2F Target Genes. *Plant Physiology*, 139: 316-328.
- Venkatachalam P., Geetha N., Priya P., & Thulaseedharan A., 2010. Identification of 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. *International Journal of Plant Biology*, 1: 33-39.



- Vitha S., Benes K., Philips J. & Gartland K., 1995. Histochemical GUS analysis. *Methods in Molecular Biology*, 44: 185-193.
- Wang C. & Liu Z., 2006. Arabidopsis Ribonucleotide Reductases Are Critical for Cell Cycle Progression, DNA Damage Repair, and Plant Development. *The Plant Cell*, 18(2): 350-365.
- Weaver R., 2002. *Molecular Biology*. 2nd ed. s.l.:McGraw Hill.
- Weigel D. & Glazebrook J., 2002. *A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Wolcott R. & Colacino J., 1989. Detection of thymidine kinase activity using an assay based on the precipitation of nucleoside monophosphates with lanthanum chloride.. *Analytical Biochemistry*, 178(1): 38-40.
- Wormit A., Traub M., Flörchinger M., Neuhaus H.E., Möhlmann T., 2004. Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal*, 383(1): 19-26.
- Xiong Y. & Sheen J., 2013. Moving beyond translation: glucose-TOR signaling in the transcriptional control of cell cycle. *Cell Cycle*, 12(13): 1989-1990.
- Xu J., Zhang L., Yang D.L., Li Q. & He Z., 2015. Thymidine kinases share a conserved function for nucleotide salvage and play an essential role in Arabidopsis thaliana growth and development. *New Phytologist*, 208: 1089-1103.
- Xu Y., Ashley T., Brainerd E., Bronson R., Meyn M. & Baltimore D., 1996. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes & Development*, 10: 2411-2422.
- Yoshiyama K., Conklin P.A., Huefner N.D. & Britt A.B., 2009. Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31): 12843-12848.
- Yoshiyama K., Kobayashi J., Ogita N., Ueda M., Kimura S. & Maki H., Umeda M., 2013 A. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Journal*, 14: 817-822.
- Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U. & Boldt R., 2006. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 805-836.



X. Anexos

INTRODUCCIÓN

Tabla suplementaria 1. Genes de la biosíntesis de nucleótidos por la vía *de novo* en mamíferos (Lane & Fan, 2015).

Nombre del gen		Enzima
Purinas		
PRPS		Fosforribosil pirofosfato sintetasa
PPAT		Fosforribosil pirofosfato amidotransferasa
GART	Enzima trifuncional	1. Fosforribosilglicinamida formiltransferasa
		2. Fosforribosilglicinamida sintetasa
		3. Fosforribosil aminoimidazol sintetasa
PFAS		Fosforribosil formilglicinamidina sintasa
PAICS	Enzima bifuncional	1. Fosforribosil aminoimidazol carboxilasa
		2. Fosforribosil aminoimidazol succinocarboxamida sintasa
ADSL		Adenilsuccinato liasa
ATIC	Enzima bifuncional	1. Aminoimidazol carboxamida ribonucleotido formiltransferasa
		2. Inosina monofosfato ciclohidrolasa
IMPDH1		Inosina monofosfato deshidrogenasa 1
GMPS		Guanina monofosfato sintasa
ADSS		Adenilsuccinata sintetasa
ADSL		Adenilsuccinato liasa
AK1		Adenilato cinasa 1
NME		Nucleosido difosfato cinasa 1

Nombre del gen		Enzima
Pirimidinas		
CAD	Enzima trifuncional	1. Carbamoil-fosfato sintetasa 2
		2. Aspartato transcarbamoilasa
		3. Dihidrorotasa
DHODH		Dihidrorotato deshidrogenasa
UMPS	Enzima bifuncional	1. Orotato fosforribosiltransferasa
		2. Orotato monofosfato descarboxilasa
NME		Nucleosido difosfato cinasa 1
CTPS		Citidina trifosfato sintasa

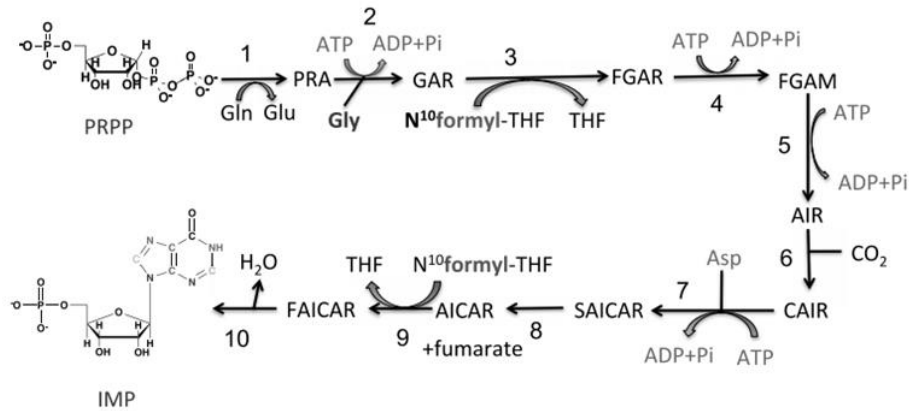


Figura Suplementaria 1. Biosíntesis de purinas: síntesis de IMP. 1) Fosforribosil pirofosfato amidotransferasa; 2) Fosforribosilglicinamida formiltransferasa, 3) Fosforribosilglicinamida sintetasa; 4) Fosforribosil formilglicinamidina sintasa; 5) Fosforribosil aminoimidazol sintetasa; 6) Fosforribosil aminoimidazol carboxylasa; 7) Fosforribosil aminoimidazol succinocarboxamida sintasa; 8) Adenilsuccinato liasa; 9) Aminoimidazol-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa; 10) Inosina monofosfato ciclohidrolasa. IMP es el precursor común de AMP y GMP (Lane & Fan, 2015).

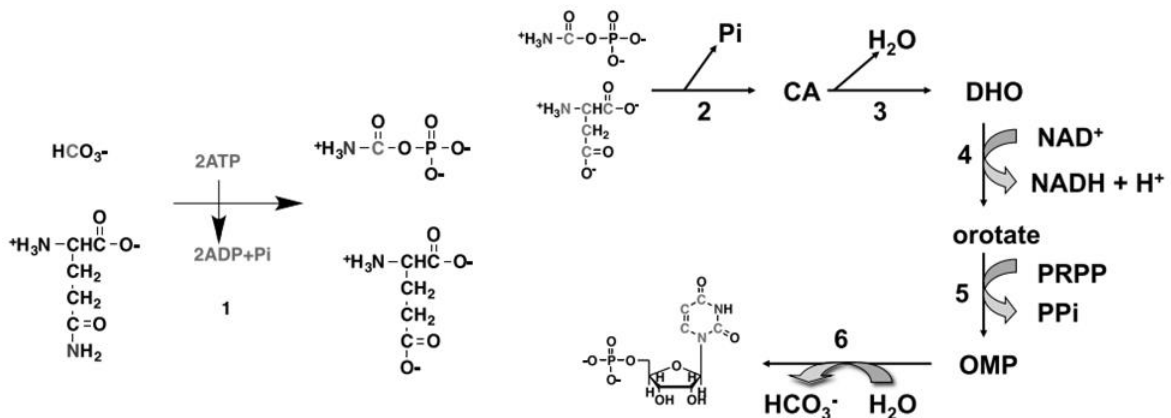


Figura Suplementaria 2. Biosíntesis de pirimidinas. CA: Carbamoil aspartato; DHO: dihidroorotato; OMP: Orotato monofosfato. 1) Carbamoil-fosfato sintetasa; 2) Aspartato transcarbamoilasa; 3) Dihidroorotasa 4) Dihidroorotato deshidrogenasa 5) Orotato fosforribosiltransferasa, 6) Orotato monofosfato descarboxilasa (Lane & Fan, 2015).

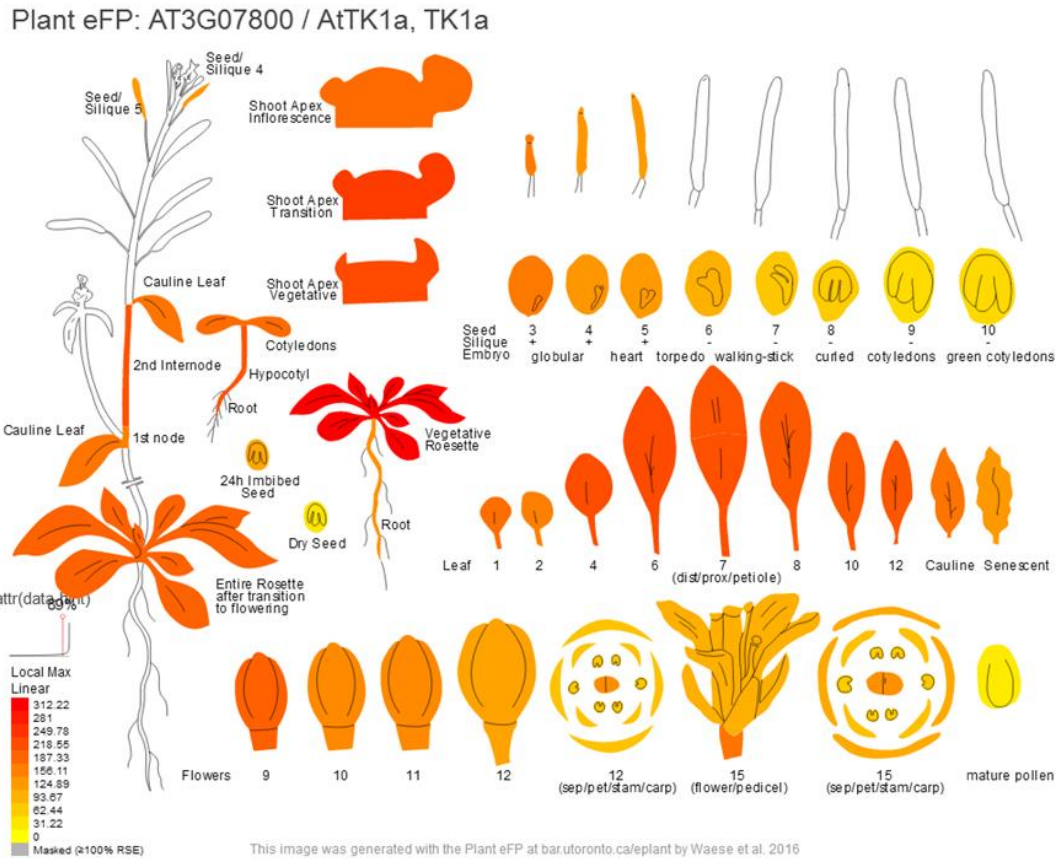


Figura Suplementaria 3. Niveles de expresión del gen *TK1a* (AT3G07800) en distintos órganos durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. La imagen fue ensamblada por el software ePlant (bar.utoronto.ca) y se muestra la escala de colores que corresponden a los niveles relativos de expresión.

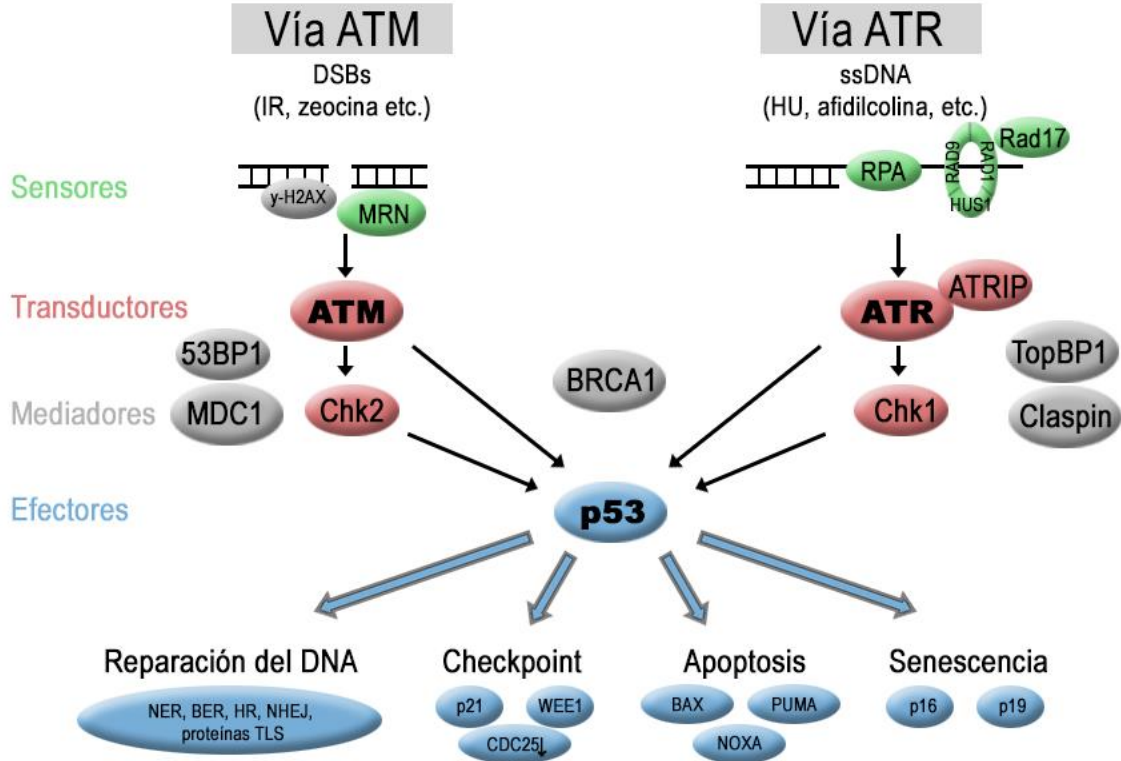


Figura Suplementaria 4. Vías de respuesta de daño al DNA, ATM y ATR, en células animales. La ruptura a la doble cadena de DNA (DSB) y la cadena sencilla de DNA comienzan la cascada de señalización. Los sensores se observan en verde, las cinasas transductoras en rojo, los mediadores en gris, y los efectores en azul resolviendo en la reparación del DNA, el paro del ciclo celular, apoptosis o senescencia (Yoshiyama, et al., 2013 B).



Materiales y Métodos

Amortiguadores y reactivos

Composición del medio Hoagland

Macronutrientes

KNO ₃	6 mM
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	4 mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 mM
MgSO ₄ •7H ₂ O	2 mM

Micronutrientes

MnCl ₂ •4H ₂ O	0.009 mM
H ₃ BO ₃	0.046 mM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.0008 mM
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.0003 mM
H ₂ MoO ₄ •H ₂ O	0.0001 mM

El medio Hoagland se compone de dos soluciones que son preparados de manera independiente y se disuelve en agua bidestilada, además de Fe-EDTA (0.00005%).

El pH del medio de Hoagland se ajusta con NaOH 3M a 5.2 – 5.5.

Amortiguador de fosfatos/Ferricianuro-Ferrocianuro/X-Gluc

Se prepararon 100 mL de amortiguador con las siguientes concentraciones finales:

NaH ₂ PO ₄	0.05 M
Na ₂ HPO ₄	0.05 M
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM

Se añadieron 10 µL de solución de Triton X-100 10% (p/v).

Al amortiguador se le agregó 1mg de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronido) previamente disuelto en 0.1 mL de metanol (Vitha, et al., 1995)



Amortiguador de extracción de proteínas.

Los componentes del amortiguador de homogenización para la extracción de proteínas se enlistan a continuación:

Acetato de sodio	0.05 M
Sacarosa	250 mM
β -mercaptoetanol	5 mM
EDTA	10 mM
Polivinil Pirrolidona (PVP)	1%
Glicerol	10%
Inhibidor de proteasa	

La preparación de 10 mL de amortiguador de reacción se realiza en el siguiente orden:

NaF 0.004 g disolverlo en 5.0 mL de H₂O

MgCl₂•6H₂O 0.02 g, disolverlo en los 5 mL de H₂O anteriores

Trizma base 0.1211 g,

Adicionarlo a los compuestos en solución anteriores y completar con 5 mL de H₂O desionizada.

Adicionar ATP 0.0551 g a la solución anterior y 1.43 μ L de β -mercaptoetanol.

Este buffer debe prepararse inmediatamente antes de realizar el ensayo

Amortiguador de reacción para determinar la actividad enzimática de TK

Trizma base	100 mM
MgCl ₂	10 mM
NaF	10 mM
ATP	10 mM
Beta-mercaptoetanol	2 mM

Mezcla de ensayos

Amortiguador de reacción	500 μ L
[Metil- ³ H]-Timidina (6.7 Ci/mmol)	37.5 μ L
Timidina (1M)	1.25 μ L
Extracto proteico	150 μ g de proteína total
Agua desionizada	cbp 1mL

Solución de precipitación

LaCl ₃	100 mM
Trietanolamina	5 mM

Líquido de Bray

2, 5-difenilidazol (PPO)	4 g
1, 4-bis[2-(4metil-S fenil oxazol)]-benceno	0.2 g
Naftaleno	60 g
Etilenglicol	20 mL
Metanol	100 mL
Dioxano cbp	1L

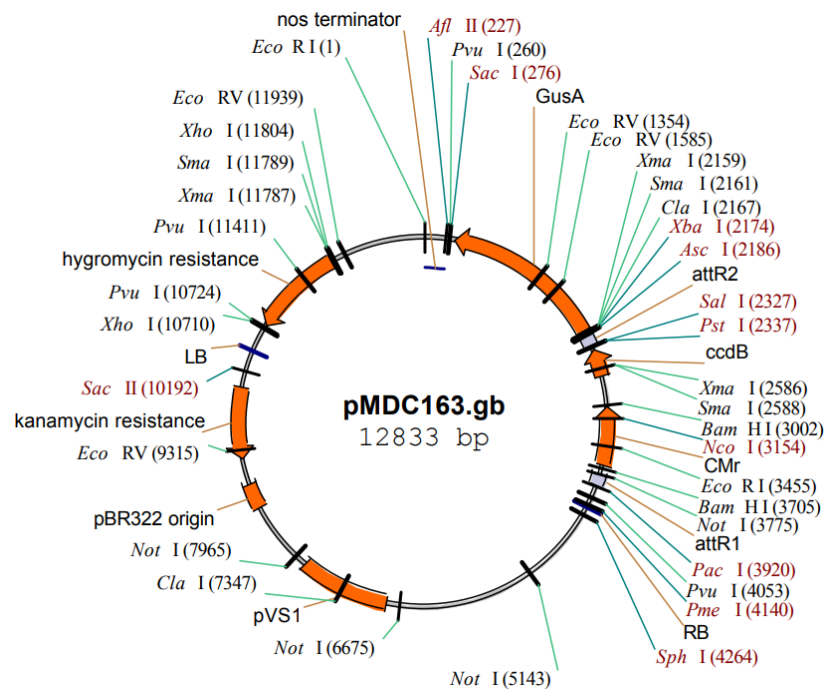


Figura Suplementaria 5. Mapa del Vector pMDC163.gb. La secuencia del vector consta de 12,833 pb. Contiene genes de resistencia a kanamicina e higromicina, y el gen de la β -glucuronidasa (*GusA*).

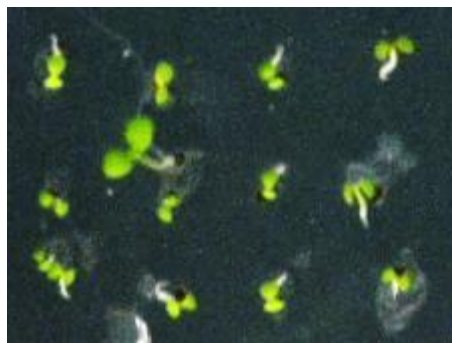


Figura Suplementaria 6. Fenotipo de plántulas resistentes a higromicina a los 5 días. Las plántulas resistentes presentan desarrollo de hipocotilo largo y cotiledones diferenciándolas así de las susceptibles a higromicina que desarrollaron solamente cotiledones.

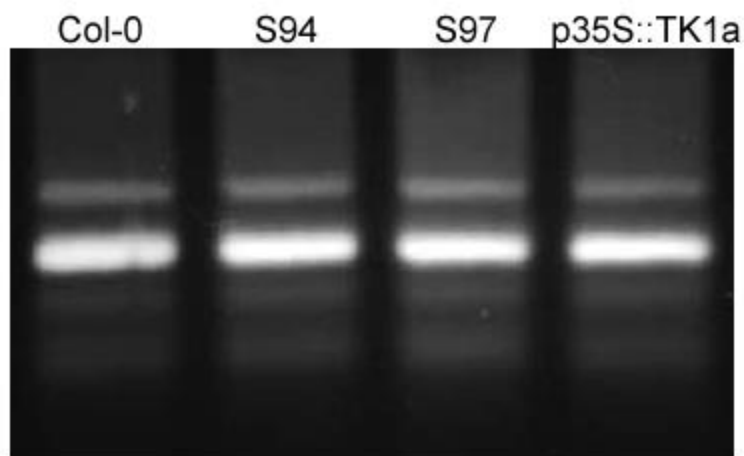


Figura Suplementaria 7. Análisis de integridad y calibración del RNA total. El RNA total se extrajo de plántulas de 10 días de edad de las líneas Col-0, *tk1a-3*, *tk1a-1* y p35S::TK1a. Se muestra una imagen representativa de una electroforesis realizada en gel de agarosa (3%) con la que se realizó la calibración de 1 µg de RNA.

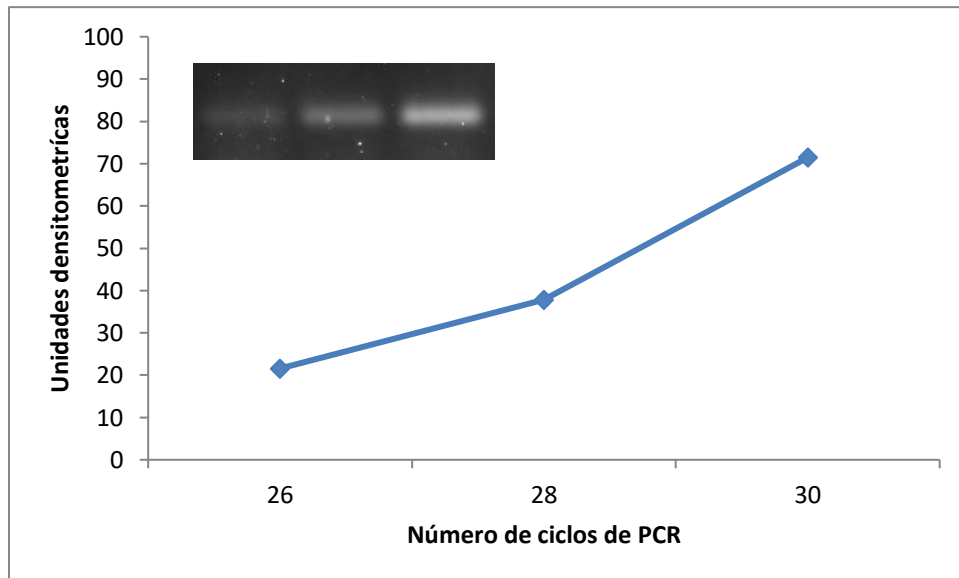


Figura Suplementaria 8. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito del gen *TK1a*. Se decidió continuar los experimentos con 28 ciclos para el gen *TK1a*.

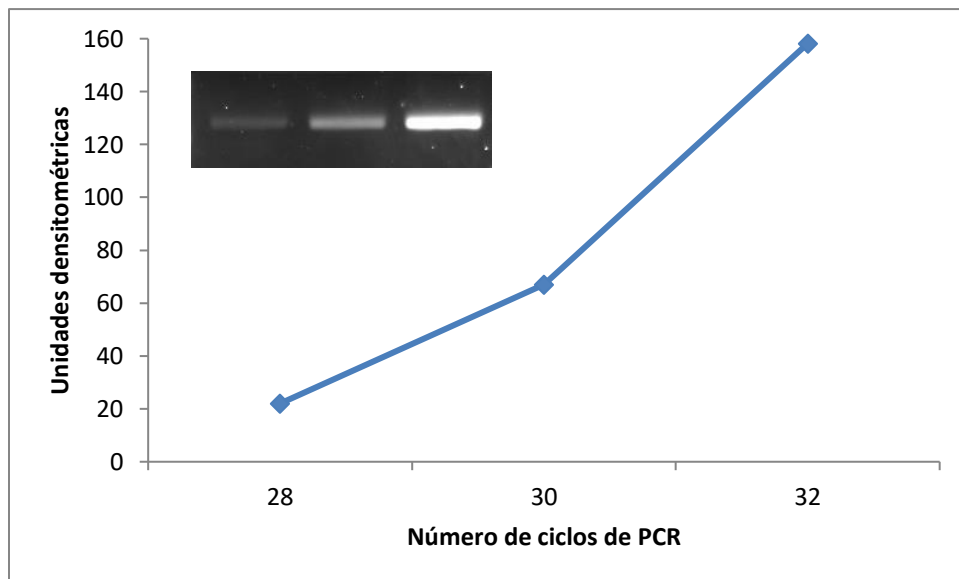


Figura Suplementaria 9. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito del gen *TK1b*. Se decidió continuar los experimentos con 30 ciclos para el gen *TK1b*.

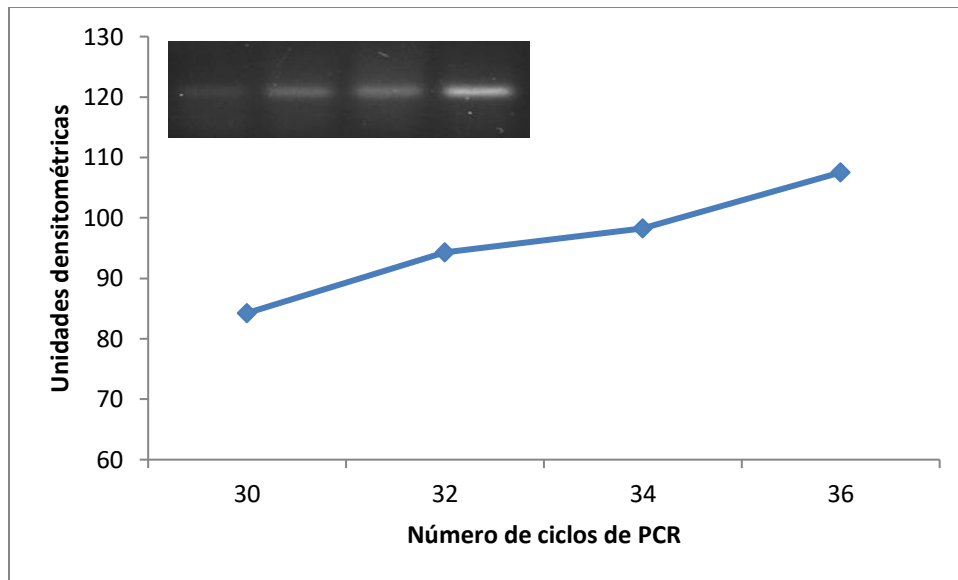


Figura Suplementaria 10. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito del gen *RNR1*. Se decidió continuar los experimentos con 32 ciclos para el gen *RNR1*.

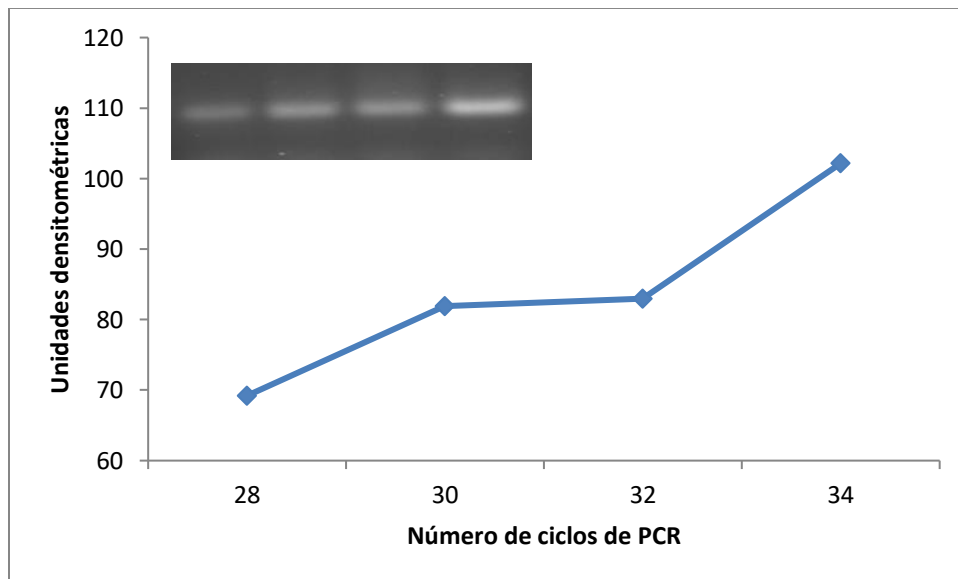


Figura Suplementaria 11. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito del gen *TSO2*. Se decidió continuar los experimentos con 30 ciclos para el gen *TSO2*.

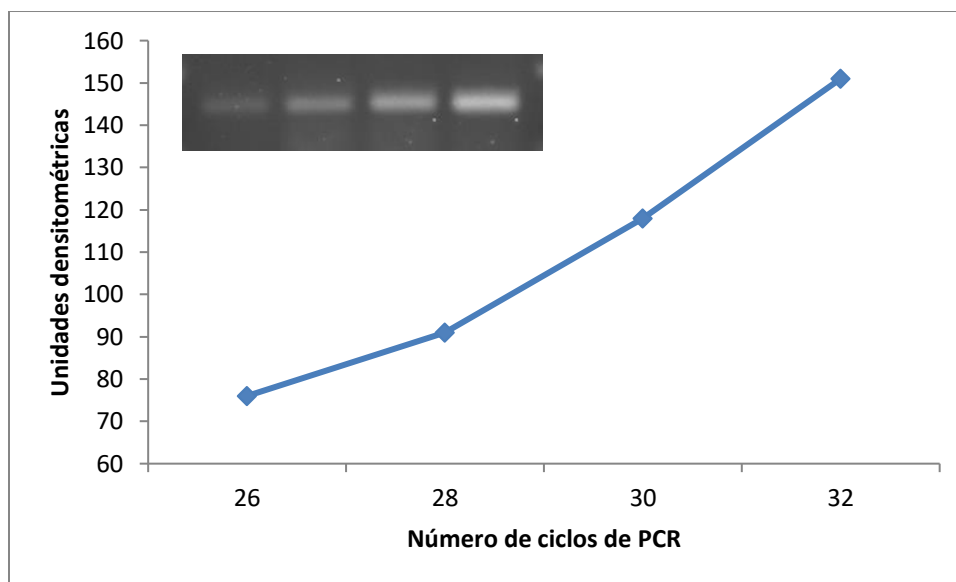


Figura Suplementaria 12. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito del gen *APT*. Se decidió continuar los experimentos con 28 ciclos para el gen *APT*

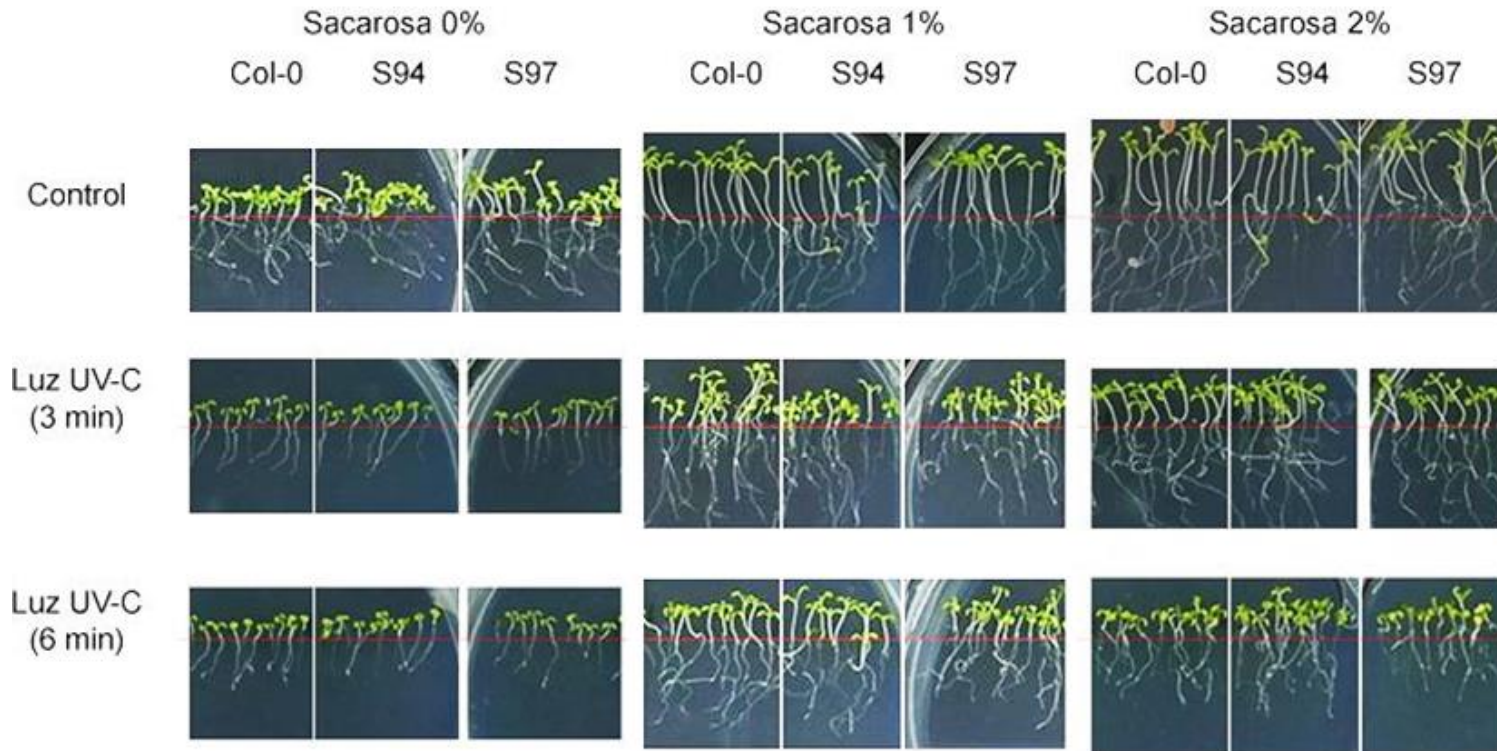


Figura suplementaria 13. Fenotipo de plántulas de 10 días expuestas a luz UV-C por 3 y 6 min. Las plántulas se cultivaron en medio GB5 en ausencia y suplementado con sacarosa (1 % o 2%) hasta el quinto día y se irradiaron con luz UV-C durante 3 o 6 minutos y se incubaron por 5 días en oscuridad.



Tabla suplementaria 2. Cebadores utilizados para la genotipificación de las líneas bxa-1+ y bxa-3+.

bx-1+			
	<i>Cebador (F)</i>	<i>Cebador (R)</i>	<i>Amplicón</i>
<i>Alelo WT</i>	RPF094	LPR094	1044 pb
<i>Alelo Mutante</i>	RPF094	LBb1.3	655 pb
bx-3+			
	<i>Cebador (F)</i>	<i>Cebador (R)</i>	<i>Amplicón</i>
<i>Alelo WT</i>	RPF097	LPR094	~830 pb
<i>Alelo Mutante</i>	RPF094	LBb1.3	~810 pb