



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM**  
**POSGRADO**  
DGEF

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

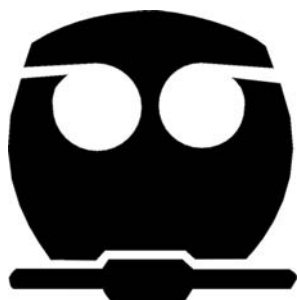
**ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA TIMIDINA CINASA  
DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN  
DE MAÍZ**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**LUIS JIRO SUZURI HERNÁNDEZ**



**Tutor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra**

**México, D.F.**

**Septiembre 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente:	Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Vocal:	Dr. Marco A. Villanueva Méndez
Secretario(a):	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Suplente:	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
Suplente:	Dra. Adela Rodríguez Romero

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM

Asesor del Tema: \_\_\_\_\_  
Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

Sustentante: \_\_\_\_\_  
Q.F.B. Luis Jiro Suzuri Hernández

Comité Tutorial:

Dr. Federico Sánchez Rodríguez  
Dr. Diego González Halphen

## RECONOCIMIENTOS

Luis Jiro Suzuri Hernández recibió becas de CONACYT (No. 167248), de DGEP, y del proyecto DGAPA-PAPIIT IN225405, durante sus estudios de Maestría.

El trabajo de tesis fue financiado por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN225405 (*Caracterización bioquímica y funcional de la timidina cinasa de plantas*).

Se agradece al M.V.Z. Atonatiu Gómez Martínez del Bioterio de la Facultad de Química por su ayuda en la inmunización y mantenimiento de los conejos para la obtención de los anticuerpos.

Se agradece la asistencia de la M.C. Manuela Nájera Martínez en la implementación de las técnicas de Biología Molecular y de la Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo en la implementación de las técnicas radiométricas.

Se agradece el apoyo técnico de la Q. Laurel Fabila Ibarra

- I. Índice de contenido
- II. Resumen
- III. Introducción
  - Estructura de la semilla
  - Germinación
  - Biosíntesis de nucleótidos trifosfato en plantas
  - Timidina cinasa 1 o citosólica
- IV. Antecedentes experimentales
- V. Hipótesis
- VI. Objetivo general
- VII. Objetivos particulares
- VIII. Materiales y métodos
  - Material biológico y tratamiento
  - Análisis de la síntesis de ADN durante la germinación
  - Determinación de la actividad enzimática de la timidina cinasa
  - Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-TK1
  - Detección de la proteína TK1 por inmunoblot
  - Sobreexpresión del ADNc parcial de la TK1 de maíz en Escherichia coli
  - Técnicas generales de proteínas
  - Técnicas generales de ácidos nucleicos
- IX. Resultados experimentales
  - Búsqueda y aislamiento de una clona de la TK1 de maíz en un banco de ADNc
  - Análisis del ADNc completo de la TK1 de maíz obtenido de un banco de secuencias est y su comparación con el ADNc de la clona delta42
  - Búsqueda del ADNc de la TK1 de Arabidopsis thaliana y comparación con la TK1 de maíz
  - Síntesis de ADN en ejes embrionarios y embriones durante la germinación medida por incorporación de [3H]-timidina
  - Efecto de la hidroximetilurea en la incorporación de [3H]-timidina en embriones de maíz
  - Incorporación de [3H]-timidina al ADN durante la germinación en presencia de HU
  - Actividad de timidina cinasa durante la germinación
  - Obtención de anticuerpos anti-TK1 de maíz
  - Determinación de los niveles de la TK1 de maíz durante la germinación de embriones
- X. Discusión
  - Análisis de la secuencia de nucleótidos de la TK1 de maíz
  - Análisis de la secuencia de aminoácidos de la TK1 de maíz
  - Incorporación de [3H]-timidina al ADN durante la germinación de embriones de maíz
  - Actividad de la TK1 durante la germinación de embriones de maíz
  - Perfil de los niveles de proteína de la TK1 durante la germinación de embriones de maíz
  - Efecto de la HU en la incorporación de [3H]-timidina y en la actividad de la TK1 durante la imbibición de embriones de maíz
  - Conclusiones y perspectivas
  - Referencias bibliográficas
  - Apéndice a
  - Apéndice b

Palabras clave: germinación, maíz, timidina cinasa, metabolismo de nucleótidos, síntesis de ADN, timidina, plantas, bioquímica.

---

---

## RESUMEN

La timidina cinasa 1 (TK1) fosforila al nucleósido timidina en una reacción dependiente de ATP y participa en la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina. La TK1 está conservada en la mayoría de los organismos, desde virus hasta procariontes y eucariontes, y se ha demostrado que en células de mamífero los niveles de transcrito, proteína y actividad enzimática aumentan en la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular. A pesar de que existe conservación en las rutas biosintéticas y de salvamento de nucleótidos entre eucariontes, las características y función de la timidina cinasa de plantas no se han estudiado.

En este trabajo se hizo un estudio molecular y bioquímico de la timidina cinasa de maíz a partir de la secuencia de una clona de ADNc parcial que se había aislado previamente. Se ensambló una secuencia, probablemente completa, de ADNc a partir de clonas EST (*Expressed Sequence Tags*) de maíz que predijo un marco de lectura de 279 aminoácidos que posee los sitios canónicos de unión a ATP, Mg<sup>2+</sup> y timidina. Además, se identificó una posible secuencia de tránsito al cloroplasto en el extremo amino terminal de la proteína, que localizaría a la timidina cinasa en los plastidios y cloroplastos.

Se establecieron las condiciones para determinar la actividad enzimática y ésta se estudió en extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz durante la germinación. La actividad de fosforilación de timidina dependiente de ATP se asoció directamente a la síntesis de ADN nuclear medida por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. También se prepararon y caracterizaron anticuerpos dirigidos contra la proteína que detectaron una banda inmunorreactiva de 37 kDa cuyos niveles se mantuvieron sin cambio. Nuestros resultados sugieren que la actividad enzimática está regulada por un mecanismo post-traduccional, probablemente similar a la TK1 de mamíferos, que sufre una transición de homodímero a homotetrámero dependiente de ATP y que se asocia a una afinidad más alta por la timidina en el estado tetramérico.

La aplicación de hidroxurea (HU) 200 mM, un inhibidor de la vía de síntesis *de novo* de nucleótidos, a los embriones embebidos abatió la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Thd y la actividad de timidina cinasa. El principal efecto de la HU es la detención de la apertura de las horquillas de replicación tempranas en respuesta a la falta de aporte de nucleótidos, interrupción que no fue compensada por la actividad de la timidina cinasa. Bajo estas condiciones, los niveles de TK1 tampoco variaron, lo que apoya la existencia de un mecanismo post-traduccional de regulación de la actividad enzimática.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Estructura de la semilla

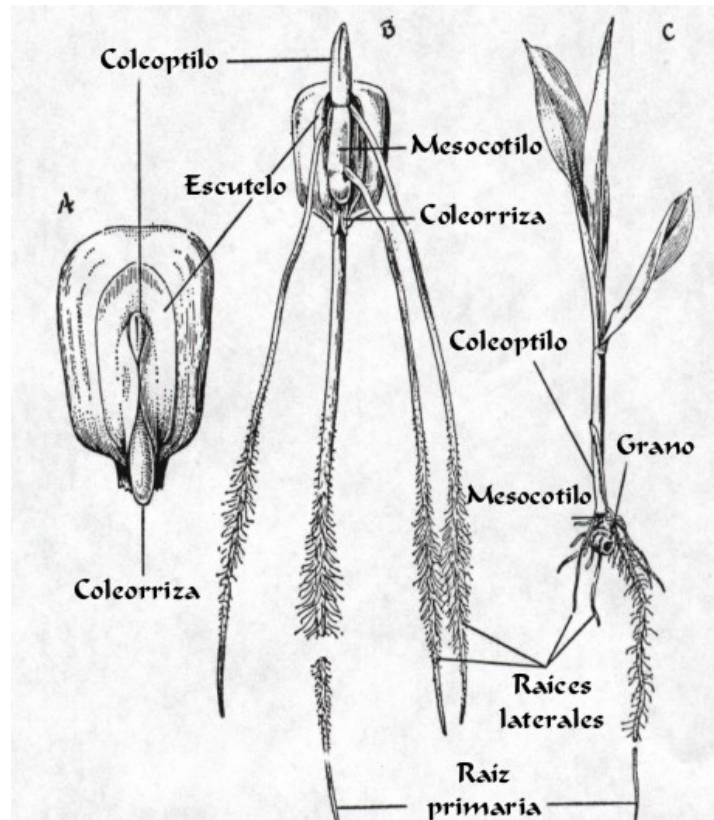
La semilla es la estructura vegetal donde ocurre el desarrollo parcial del embrión (Flores, 1999) y deriva de la doble fertilización del óvulo dentro del saco embrionario por núcleos masculinos provenientes del grano de polen (Street & Öpik, 1986). La semilla madura de las angiospermas consta del embrión, el endospermo, el perispermo y la cubierta seminal o testa (Figura 1; Bewley & Black, 1994).

Los embriones de las diferentes especies vegetales son variables en tamaño y apariencia, pero generalmente están formados por el eje embrionario y uno o más cotiledones (Meyer *et al.*, 1973). En el eje se distinguen tres estructuras: la radícula, el hipocotilo (estructura a la cual se unen los cotiledones) y la plúmula con las primeras hojas verdaderas. El eje es la estructura que dará origen a la plántula después de la germinación. En las gramíneas, el cotiledón es muy pequeño, se le conoce como escutelo y forma una estructura larga y vascularizada que rodea al eje embrionario. Por su parte, el extremo basal del cotiledón forma el coleóptilo que cubre a la plúmula. En el maíz el hipocotilo da origen al mesocotilo, tejido entre la base del coleóptilo y el punto de origen del escutelo (Bewley & Black, 1994; Flores, 1999).

En la mayoría de las especies vegetales, el perispermo no logra desarrollarse y se absorbe durante la maduración del embrión. El endospermo (tejido resultante de la fusión entre una célula espermática y los núcleos polares de la célula central del saco embrionario) está formado por células atrofiadas debido al almacenamiento masivo de nutrientes y en las gramíneas constituye el principal tejido de almacenamiento. En su parte exterior se encuentra localizada la capa de aleurona, formada por células que participan en la movilización de las reservas durante la germinación (Bewley & Black, 1994; Flores, 1999).

La testa tiene la función de proteger al embrión del medio ambiente, y se encuentra compuesta por una cutícula interna y una externa, impregnadas de ceras y grasas. La testa participa en la entrada de agua a la semilla y en el intercambio de gases  $-O_2$  y  $CO_2-$  durante la germinación (Bewley & Black, 1994; Flores, 1999).





**Figura 1.** Estructura de la semilla de maíz (tomado de Neuffer *et al.*, 1997; Foster & Gifford, 1959). A, B y C, estructuras principales durante la germinación de una semilla de maíz y su desarrollo a plántula.

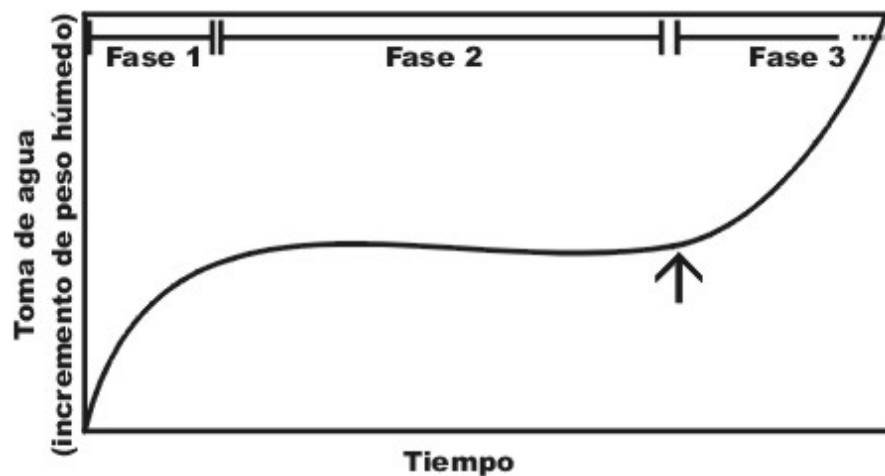
## 2. Germinación

La germinación es un proceso que comienza con la penetración de agua a la semilla, involucra cambios estructurales a nivel subcelular así como la activación del metabolismo (respiración celular, síntesis de macromoléculas y actividad enzimática) y culmina con la protrusión del eje embrionario (Bewley & Black, 1994; Street & Öpik, 1986; Milthorpe & Moorby, 1974), transformando al embrión heterotrófico en un organismo autotrófico (Georgieva *et al.*, 1994).

Durante este proceso en maíz, la radícula se elonga y atraviesa la testa, para formar la raíz primaria. El escutelo permanece dentro de la semilla mediando el transporte de nutrientes entre el endospermo y el eje en desarrollo. Después de la protrusión de la radícula, la plúmula y el coleóptilo atraviesan la testa impulsados por la elongación de los tejidos adyacentes a la plúmula; una vez que el coleóptilo sale a la superficie, comienza el crecimiento de la primera hoja verdadera (Meyer *et al.*, 1973).

### a. Imbibición de la semilla

La entrada de agua a la semilla ocurre de manera trifásica (Figura 2). En la primera fase de la imbibición, la velocidad de toma de agua exhibe un comportamiento logarítmico y marca el reinicio del metabolismo del embrión. Durante la fase II comienzan los procesos bioquímicos que conducen a la penetración del endospermo por la radícula, y culmina en el instante en que se detectan los primeros signos de la emergencia de ésta; a diferencia de la fase I, esta etapa presenta un comportamiento estacionario debido a una disminución en la velocidad de entrada de líquido. La transición entre las fases II y III marca el fin de la germinación y se observa un aumento logarítmico en la velocidad de introducción de agua a la semilla debido a los cambios que sufren las células de la radícula al expandirse. La duración de cada fase depende de las propiedades de la semilla (permeabilidad de la testa, tamaño de la semilla y consumo de oxígeno, entre otras), y de las condiciones de hidratación (temperatura, humedad y composición del medio; Bewley & Black, 1994).



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

### b. Elongación radicular

La penetración de la capa de endospermo por parte de la radícula se produce por la expansión de las paredes celulares al hidratarse, y no a procesos de división celular. Al término de la extensión radicular por efecto de la hidratación sucede la mitosis y el consecuente incremento en el número de células en la zona apical de la radícula. Se han propuesto tres causas del crecimiento radicular: (a) la acumulación intracelular de solutos que, por ósmosis, conduce a un incremento en la presión de turgencia responsable de la expansión de las paredes celulares; (b) la relajación de las paredes de la radícula, facilitando la expansión de ésta, o (c) el

debilitamiento de los tejidos que rodean el extremo radicular. Este debilitamiento puede deberse al aumento, mediado por giberelinas, en la actividad de enzimas hidrolíticas de galacto-(gluco)-mananas que conforman parte importante de la pared celular del endospermo (Bewley & Black, 1994; Karssen, 1995).

### **c. Síntesis de ARN y ribonucleósidos trifosfato durante la germinación**

La síntesis *de novo* del ARNm comienza en un periodo de 30 a 90 minutos después de la entrada de agua, y suple al ARNm –previamente almacenado– consumido por la síntesis acelerada de proteínas durante los primeros minutos de la germinación. Estudios previos han determinado que muchos ARN mensajeros almacenados durante la maduración de la semilla son diferentes a los sintetizados *de novo* durante la germinación (Bewley & Black, 1994; Street & Öpik, 1986; Castroviejo *et al.*, 1979; Sánchez-Martínez *et al.*, 1986).

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

La síntesis *de novo* de las proteínas ribosomales (*Ribosomal Proteins* o RPs) y su incorporación a los ribosomas se ha detectado a partir de las 6 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz. La síntesis de estas proteínas también ocurrió bajo inhibición de la transcripción, lo que sugirió que existen transcritos de RPs almacenados en el eje embrionario (Beltran-Pena *et al.*, 1995). Los transcritos de las proteínas ácidas ribosomales P1 y P2 (*Acidic Ribosomal Proteins* o ARPs), fosfoproteínas que participan en la traducción interactuando con los factores de elongación eEF-2, se encuentran almacenados en los ejes embrionarios de maíz, y la síntesis de dichas proteínas inicia en etapas tempranas de la germinación (Montoya-García *et al.*, 2002).

A pesar de que se ha observado un aumento en la actividad de ARN polimerasas durante la germinación, los estudios en embriones de trigo, centeno y soya parecen indicar que los embriones poseen una cantidad suficiente de ARN polimerasas para mantener la transcripción durante todo el tiempo que dure la germinación, y no se requiere de un aumento en la síntesis *de novo* de éstas para mantener la transcripción (Bewley & Black, 1994).

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

#### **d. Síntesis de proteínas durante la germinación**

A partir de semillas secas ha sido posible aislar ribosomas, ácido ribonucleico mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), factores de inicio y elongación, aminoácidos, aminoacil ARNt sintetasas y ARN polimerasas I, II y III en cantidades suficientes y en estados apropiados para efectuar la síntesis de proteínas. De esta manera la síntesis de proteínas comienza de manera casi simultánea a la imbibición de la semilla. En embriones de trigo, se ha reportado la activación de la maquinaria de síntesis de proteínas a los 30 minutos de iniciada la imbibición (Castroviejo *et al.*, 1979). Ciertos ARNm se conservan íntegros en el embrión con el propósito de promover la síntesis de proteínas de manera inmediata. A pesar de la existencia de ribosomas intactos en semillas secas, los polirribosomas se encuentran ausentes y su número se incrementa (acompañado de la consecuente disminución del número de ribosomas libres) en cuanto la célula se hidrata (Bewley & Black, 1994; Street & Öpik, 1986).

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

#### **e. Síntesis de ADN y su regulación en el ciclo celular durante la germinación**

Durante la maduración de la semilla, la mayor parte de las células embrionarias sufren un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (denominada fase G<sub>0</sub>), fenómeno que también se ha reportado en células de mamífero previo al inicio de la diferenciación y que mantiene viables a las células por largos periodos de tiempo (Georgieva *et al.*, 1994). Este estadio no varía con la entrada de agua pues el crecimiento de la radícula se debe, en las primeras horas de la germinación, a la elongación de las células radiculares, mientras que durante o después de la protrusión se debe a la división celular (Bewley & Black, 1994; Vázquez-Ramos & Sánchez,

2003). La población celular en el embrión es muy heterogénea pues hay células cuyo contenido de ADN ya se ha duplicado (estado 4C o fase  $G_2$  del ciclo celular), mientras que otras aún no (estado 2C o fase  $G_1$  del ciclo celular). Las células que componen el meristemo radicular son las primeras en iniciar el ciclo celular (Baíza *et al.*, 1989; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Aunque la división celular no es indispensable para la germinación (definida hasta el momento de la protrusión), sí lo es para el establecimiento y desarrollo de la plántula (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

En las primeras horas de la germinación del maíz, la mayoría de las células del embrión (~75%) se encuentran en la fase  $G_1$ , y no es sino hasta las 12 a 15 horas de iniciada la germinación que comienza la replicación del ADN cromosómico (Coello *et al.*, 1992). Las primeras 4 horas de la germinación se caracterizan por un notable incremento en el número de células en  $G_1$  y una disminución equivalente en la proporción de células en la fase S, por lo que se cree que este intervalo de tiempo constituye un periodo de sincronización en  $G_1$ .

Durante la germinación de maíz, la síntesis de ADN, medida por incorporación de timidina, ocurre en dos etapas. La primera se observa 3 a 6 horas después de iniciada la entrada de agua, y tiene el propósito de reparar daños en el ADN cromosomal durante la maduración, secado, almacenamiento y rehidratación de la semilla. Esta incorporación de timidina también corresponde a la síntesis de ADN mitocondrial (Bewley & Black, 1994; Georgieva *et al.*, 1994; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). En semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), cebada (*Hordeum spp.*), centeno (*Secale cereale*) y maíz (*Zea mays*) se ha demostrado que la reparación del ADN es vital durante las primeras horas de la germinación (Baíza *et al.*, 1989; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). En semillas envejecidas se acumulan más alteraciones en el ADN que prolongan el periodo de reparación y por ende retrasan el curso normal de la germinación (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). La segunda etapa –y la de mayor magnitud– corresponde a la duplicación del ADN cromosómico. En la germinación del maíz, las poblaciones celulares empiezan la fase S de manera discreta y no gradual, lo que sugiere un cierto grado de sincronización (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Esta sincronización parcial se ha podido correlacionar con los niveles de algunas proteínas reguladoras del ciclo celular, como la ciclina D2 cuyos niveles se incrementan durante las primeras 6 horas para luego disminuir drásticamente a niveles muy bajos a las 24 horas. Este patrón concuerda con el papel de la CycD como mediadora de la transición  $G_1/S$ , que ocurre entre las 12 y las 15 horas de imbibición. También se demostró que el inmunoprecipitado obtenido con anticuerpos anti-CycD posee una actividad de cinasa que desaparece después de las 15 horas, de manera paralela a los niveles de CycD (Gutiérrez *et al.*, 2005). Un posible

sustrato de este complejo ciclina-cinasa es la proteína de retinoblastoma, pues es fosforilada por un complejo CycD/ Cdk-A/ PCNA, cuya actividad disminuye conforme bajan los niveles de la CycD. Este complejo parece análogo al complejo CycD/ Cdk4(6)/ PCNA de mamíferos y muy probablemente regula el inicio del ciclo celular (Sánchez *et al.*, 2002).

Los niveles del factor transcripcional E2F no varían durante las primeras 24 horas de germinación, aunque este resultado pudiera deberse a la detección de distintos miembros de la familia de proteínas con un anticuerpo heterólogo, lo que complica el análisis pues hay miembros E2F tanto inductores como represores de la transcripción (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Otro marcador del avance del ciclo celular son las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4, y en maíz, estas proteínas no se encuentran en semilla seca pero su acumulación inicia entre las 12 y las 24 horas, al mismo tiempo que inicia la duplicación del ADN (Bewley & Black, 1994; Georgieva *et al.*, 1994; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Varias proteínas relacionadas con la síntesis del ADN aumentan sus niveles de manera paralela a la incorporación de timidina observada. En la germinación de trigo, la replicación del ADN empieza a las 7-8 horas de imbibición, alcanzando su máximo a las 12-13 horas. De manera paralela, la actividad de la ADN polimerasa A (con una actividad semejante a la ADN polimerasa  $\alpha$  de mamíferos), de la ADN polimerasa B (semejante a la  $\delta$  de mamíferos), y de una primasa, alcanzan su máximo a las 12 horas (Benedetto *et al.*, 1996). En maíz, la replicación del ADN inicia a las 12 horas de imbibición con un máximo a las 24 horas. La actividad de la ADN pol 1 (tipo  $\delta$ ) se mantiene constante en este periodo, pero la actividad de la ADN pol 2 (tipo  $\alpha$ ) se incrementa paulatinamente hasta las 24 horas, sin un aumento correspondiente de los niveles de la proteína. Ambas polimerasas están presentes en semillas secas (Coello & Vázquez-Ramos, 1995). Los niveles de PCNA, factor indispensable para la procesividad de las ADN polimerasas, se incrementan gradualmente hasta alcanzar un máximo a las 24 horas (Herrera *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, la división celular ocurre generalmente después de la protrusión radicular. La regulación de la transición  $G_2/M$  depende del complejo CycB/ Cdk-A. En los meristemos del mesocotilo de maíz, la presencia de [ $^3H$ ]-timidina en cromosomas mitóticos se detectó después de las 28 horas de imbibición. En el caso de los meristemos seminales y radiculares, la actividad mitótica apareció a las 32 y 36 horas respectivamente. Sin embargo, en los tres tejidos la actividad mitótica máxima se registró a las 36 horas, cuando más del 80% de las semillas ya habían protruído. Este resultado demuestra que la división celular ocurre después de terminada la germinación (Baíza *et al.* 1989). En general, la mayoría de las células

empiezan y concluyen un ciclo celular durante las primeras 72 horas de germinación (Bewley & Black, 1994; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

### **3. Biosíntesis de nucleótidos trifosfato en plantas**

La disponibilidad de nucleótidos para la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) es indispensable para la supervivencia celular. La horquilla de replicación es incapaz de regular por sí misma el aporte de los componentes del ADN, y la duplicación de esta molécula es sensible tanto a la escasez como al exceso de desoxinucleótidos. El metabolismo de nucleótidos se compone de dos rutas alternativas cuyo fin común es la incorporación al ADN o ARN. La vía biosintética *de novo* produce nucleótidos a partir de compuestos sencillos. Este proceso consume cantidades considerables de energía en forma de ATP, por lo que la segunda vía –llamada de salvamento– se encarga de reciclar los nucleótidos que por diversos motivos llegan a convertirse en nucleósidos o en bases nitrogenadas libres.

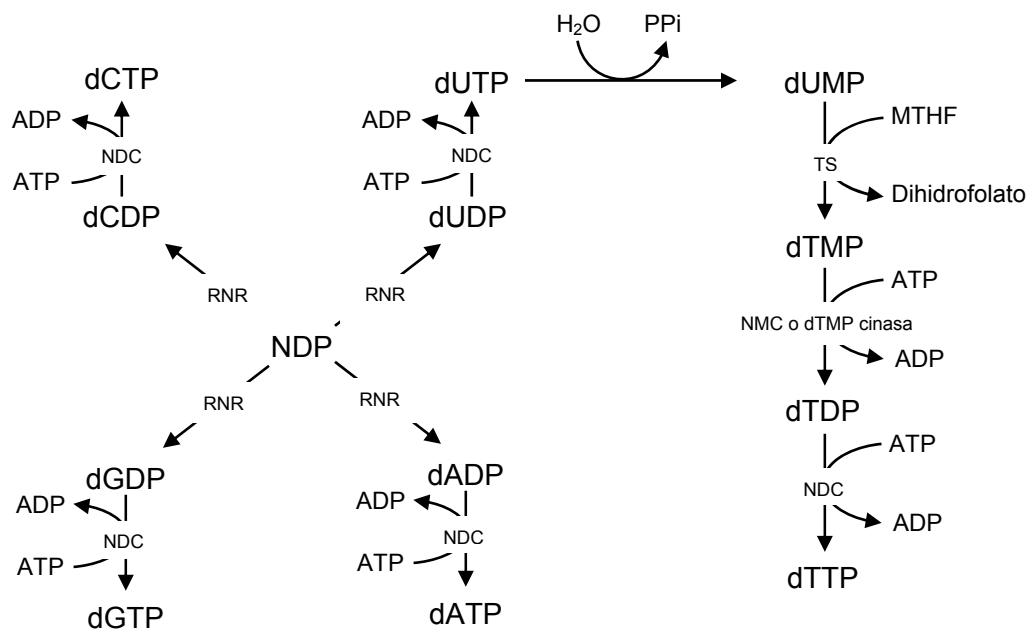
#### **a. Vía *de novo* de síntesis de nucleótidos**

Mediante estudios con marcadores radiactivos e inhibidores específicos de la síntesis de nucleótidos, así como la purificación y caracterización cinética de enzimas, se ha determinado que las vías biosintéticas de nucleótidos propias de animales y microorganismos se conservan en plantas (Moffatt & Ashihara, 2002).

La síntesis *de novo* de nucleótidos parte de moléculas precursoras sencillas. En el caso de nucleótidos de pirimidina, inicia a partir de CO<sub>2</sub>, aspartato y el grupo amida de la glutamina. Mediante seis reacciones consecutivas, que componen la ruta del ácido orótico, se forma el orotato de pirimidina (el primer compuesto que posee un anillo pirimidínico completo), que sucesivamente se une al 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) para constituir una molécula compuesta por una base nitrogenada y una ribopentosa. Este compuesto sufre modificaciones posteriores hasta formar la uridina monofosfato (UMP). En reacciones sucesivas, el UMP se fosforila hasta generar UTP, que sufre una transaminación para formar la citidina trifosfato (CTP; Reichard, 1988; Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Katahira & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). En plantas superiores, muchos detalles de esta vía biosintética se desconocen, pero en algunas especies vegetales como *Triticum aestivum*, *Lycopersicon esculentum* y *Arabidopsis thaliana*, entre otras, se han encontrado, purificado y estudiado algunas de las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina (Stasolla *et al.*, 2003).

La síntesis *de novo* de nucleótidos de purina comienza con la unión secuencial al PRPP de glicina, CO<sub>2</sub>, los grupos amida del aspartato y de la glutamina. Esta serie de reacciones genera la inosina 5'-monofosfato (primer compuesto con un anillo purínico completo, IMP) que a su vez deriva en los ribonucleótidos adenosina monofosfato (AMP) y guanosina monofosfato (GMP; Sugiura & Takeda, 2000; Katahira & Ashihara, 2002; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). En especies vegetales como *T. aestivum*, *Z. mays* y *A. thaliana* se han identificado y estudiado las propiedades de muchas de las enzimas participantes en la vía de síntesis *de novo* de purinas (Moffett & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003).

Una enzima clave en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina y pirimidina es la ribonucleótido reductasa (RNR) que reduce el hidroxilo en el carbono 2' de la ribosa de los ribonucleótidos difosfato (NDP) para formar los desoxirribonucleótidos correspondientes (Figura 3; Reichard, 1988; Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). Los niveles y actividad de la ribonucleótido reductasa están estrictamente regulados durante el ciclo celular, pues alcanzan un máximo durante la fase S y disminuyen considerablemente en células en G<sub>0</sub>. Este patrón de regulación de la actividad también se ha observado para otras enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos (Reichard, 1988; Bianchi *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Síntesis *de novo* de desoxirribonucleótidos a partir de la reducción de nucleótidos. NDP, nucleótido difosfato. RNR, ribonucleótido reductasa. NDC, nucleósido difosfato cinasa. TS, timidilato sintasa. MTHF, N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilentetrahidrofolato. NMC, nucleósido monofosfato cinasa (tomado de Stasolla, *et al.*, 2003).



---

---

En plantas, parece que una sola RNR se encarga de la reducción de todos los ribonucleótidos, que posteriormente se fosforilan hasta dUTP, dCTP, dATP y dGTP. Para convertir la dUTP al nucleótido de timina, primero se desfosforila a dUMP y en seguida se metila (Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). En mamíferos y en plantas la enzima timidilato sintasa cataliza la transferencia de un grupo metilo del  $N^5$ ,  $N^{10}$ -meteniltetrahidrofolato (MTHF) al carbono 5' del dUMP para formar dTMP (Figura 3). Esta reacción es la única fuente conocida de dTMP intracelular *de novo*. La timidilato sintasa se encarga de mantener baja la concentración de los nucleótidos de desoxiuridina para evitar su incorporación errónea al ADN (Sugiura & Takeda, 2000; Reichard, 1988). La fosforilación del dTMP a dTTP se lleva a cabo en reacciones sucesivas catalizadas por una nucleósido monofosfato cinasa (o la timidilato cinasa) y una nucleósido difosfato cinasa (Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003).

En plantas, todas las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina se localizan en los plastidios, donde se lleva a cabo este proceso, mientras que la síntesis de nucleótidos de purina ocurre en el citosol (Sugiura & Takeda, 2000). Por ejemplo, las dos subunidades de la enzima carbamoilfosfato sintetasa de Arabidopsis (que cataliza la primera reacción de la vía *de novo* de nucleótidos de pirimidina) poseen secuencias de tránsito al cloroplasto, y la actividad enzimática se ubica en este organelo. Los ADNc de dos isoformas de chícharo de la aspartato transcarbamilasa (que cataliza la segunda reacción de la vía) poseen también secuencias de tránsito al cloroplasto (Stasolla *et al.*, 2003).

### **b. Vía de salvamento de nucleótidos**

Además de la síntesis *de novo* de nucleótidos, en todos los organismos existen rutas de salvamento que reutilizan los nucleósidos y bases libres, producto de la degradación del ADN, el ARN y los nucleótidos (Sugiura & Takeda, 2000; Castroviejo *et al.*, 1979). Este reciclaje permite mantener el aporte de nucleótidos con un requerimiento energético menor que la biosíntesis *de novo* (Moffatt & Ashihara, 2002). Hasta el momento se carece de suficiente información para establecer la ruta completa de salvamento de nucleótidos en plantas, pero muchas de las enzimas características ya se han encontrado y caracterizado (Castroviejo *et al.*, 1979; Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003). Esto sugiere que las dos rutas de salvamento de nucleótidos caracterizadas en mamíferos se conservan en plantas superiores. Estas rutas son:

**(A)** Reacciones de un paso catalizadas por la enzima fosforribosil transferasa. En este tipo de reacciones, la base libre se une al PRPP generando directamente un nucleótido

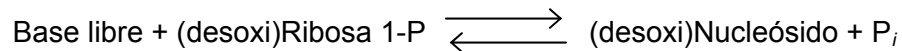
monofosfato (Reichard, 1988; Sugiura & Takeda, 2000; Moffatt & Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003):



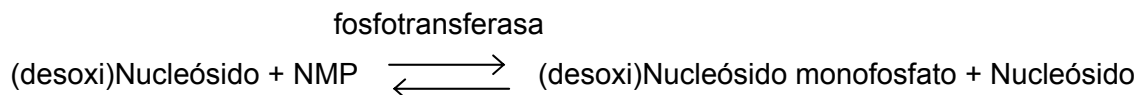
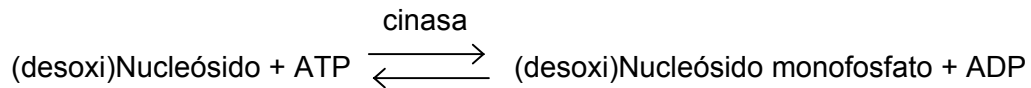
En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado cinco secuencias que codifican la adeninafosforribosil transferasa, la primera de las cuales se activa en etapas de crecimiento y desarrollo intenso (Stasolla *et al.*, 2003).

**(B)** Reacciones de dos pasos catalizadas primero por la enzima nucleósido fosforilasa seguida de una nucleósido cinasa o una nucleósido fosfotransferasa (para la Thd, ver Figura 4):

**(B.1)** Nucleósido fosforilasa. Cataliza reversiblemente la fosforólisis de ribo y desoxirribonucleósidos para generar la base libre y la 2'-desoxirribosa-1-fosfato. En plantas, la actividad de este tipo de enzimas en el salvamento de adenosina e inosina-guanina es muy baja, por lo que se cree que el salvamento de nucleótidos por esta vía desempeña un papel marginal (Sugiura & Takeda, 2000; Stasolla *et al.*, 2003).



**(B.2)** Nucleósido cinasa o fosfotransferasa. En esta reacción el nucleósido es fosforilado por una cinasa que emplea ATP como donador de fosfato o bien por una fosfotransferasa inespecífica que puede incorporar el fosfato de un nucleótido monofosfato, como el AMP (Sugiura & Takeda, 2000; Stasolla *et al.*, 2003).

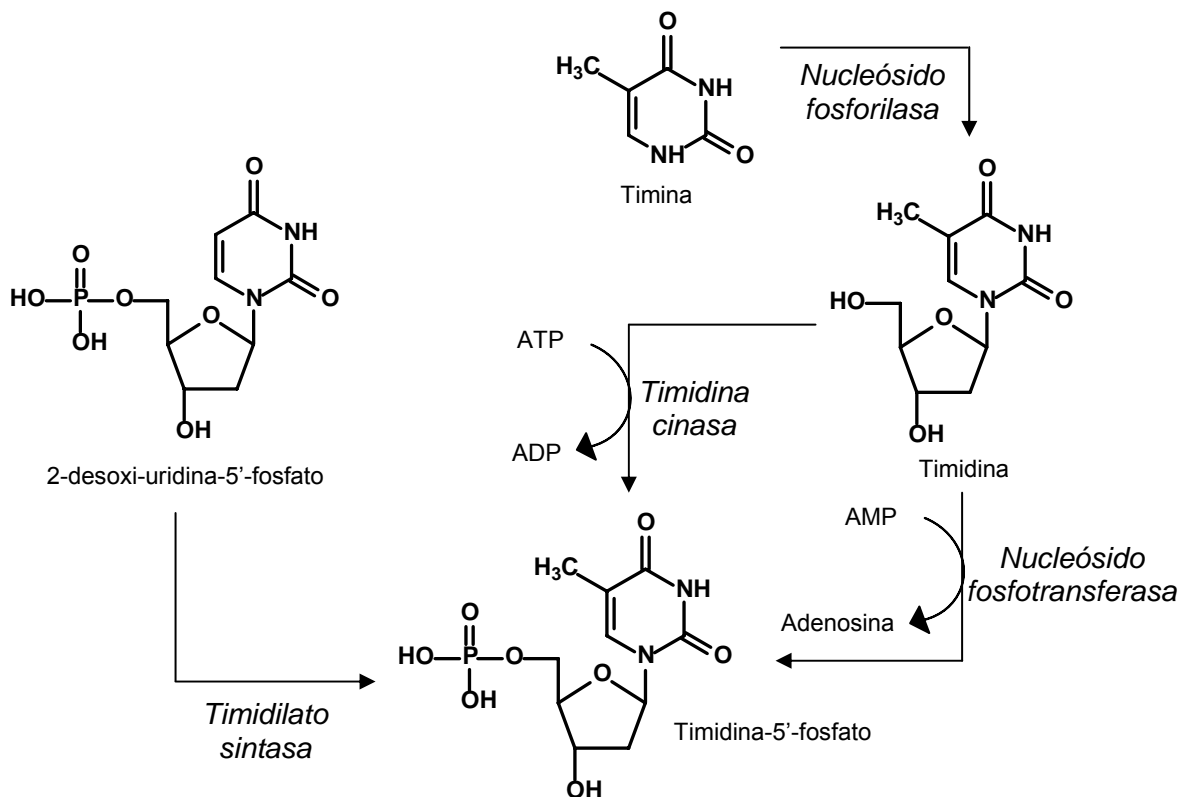


Entre las nucleósido cinasas de plantas, la adenosina cinasa es la mejor caracterizada. En *Arabidopsis* los transcritos de las dos isoformas de la adenosina cinasa se encuentran en todos los órganos y en general tiene una actividad enzimática muy elevada (Stasolla *et al.*, 2003; Moffatt & Ashihara, 2002). Por su parte, la inosina-guanosina cinasa solamente se ha encontrado en unas cuantas especies de plantas, y en algunas de éstas el salvamento de estos

nucleósidos es llevado a cabo por una fosfotransferasa inespecífica. La uridina/ citidina cinasa se ha encontrado en todas las plantas en las que se la ha buscado y se encarga del salvamento de UMP y CMP. Tanto la desoxicitidina cinasa como la timidina cinasa existen en plantas, aunque se desconocen sus propiedades (Stasolla *et al.*, 2003).

Además de contribuir a la reutilización de nucleótidos, la vía de salvamento participa en la regulación de los niveles de nucleótidos y por ende de la síntesis de ADN y ARN (Reichard, 1988; Castroviejo *et al.*, 1979). Durante las distintas fases del ciclo celular hay variaciones en las pozas de nucleótidos, pues se incrementan durante las fases S y G<sub>2</sub>, y disminuyen en las fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> (Reichard, 1988; Spyrou & Reichard, 1988).

La conversión de nucleótidos a nucleósidos y viceversa, catalizados por cinasas y fosfatasa, regulan el tamaño de estas pozas. El aporte de timidilato (TMP) debido a la timidina cinasa 1 (TK1) se mantiene bajo control gracias a la acción de la enzima timidilato 5'-nucleotidasa (dTMPasa), que cataliza la desfosforilación del TMP a timidina (He & Skog, 2002).



**Figura 4.** Metabolismo *de novo* y de salvamento de TMP (adaptado de Dobrovolsky *et al.*, 2003). La actividad de la timidina cinasa y de la timidilato sintasa (TS) se incrementa en la fase S, con el consecuente aumento de la concentración de timidina-5'-fosfato. La TS se encarga de catalizar la transformación de desoxiuridina monofosfato (2-desoxi-uridina-5'-fosfato, dUMP) a timidina monofosfato (timidina-5'-fosfato; TMP), a través de la transferencia dependiente de folato de un grupo metilo al C5 del anillo pirimidínico. Esta enzima es la responsable de la síntesis de nucleótidos de timidina por la vía *de novo*. La vía de salvamento parte de la fosforribosilación de la timina. La TMP se fosforila dos veces más antes de incorporarse al ADN.

### c. Síntesis de nucleótidos en la germinación de semillas

Durante la germinación de semillas la disponibilidad de nucleótidos es fundamental, ya que participan tanto en el metabolismo bioenergético y biosintético del embrión como en la síntesis de ácidos nucleicos. Este hecho supone una estricta coordinación entre las vías de síntesis *de novo* y de salvamento para fijar las concentraciones de las pozas de ribo y desoxirribonucleótidos durante la imbibición de la semilla (Stasolla *et al.*, 2003) pues por ejemplo, en los embriones secos de trigo no se detecta la presencia de dNTPs (Castroviejo *et al.*, 1979). En la germinación, las bases y nucleósidos liberados desde los tejidos de almacenamiento se convierten en nucleótidos por reacciones de salvamento (Moffatt & Ashihara, 2002). Por ejemplo, en el metabolismo de nucleótidos de pirimidina el aporte de nucleótidos se debe inicialmente a la vía de salvamento, y en una segunda etapa es la vía *de novo* la responsable del aporte (Stasolla *et al.*, 2003).

En los cotiledones de *Phaseolus mungo* y *P. glauca* los requerimientos de uracilo y uridina para la síntesis de nucleótidos y ARN son altos durante las primeras 24 horas de la germinación. La conversión de uridina a un nucleótido la realizan actividades de uridina cinasa (UK) y de otras fosfotransferasas inespecíficas. Las actividades de estas enzimas también se han detectado en semillas de maíz y de trigo (Stasolla *et al.*, 2003).

La transición del metabolismo de salvamento al *de novo* parece ser consecuencia de la disminución de la actividad de las enzimas de salvamento (como por ejemplo la UK, cuya actividad disminuye conforme decae la síntesis de salvamento en *P. glauca*) o a la saturación de la reacción de conversión de UMP a UDP, que parece funcionar como un paso limitante en la actividad de la vía (Stasolla *et al.*, 2003).

La actividad de la vía *de novo* que reemplaza a la de salvamento aporta los sustratos para el mantenimiento de la síntesis de ácidos nucleicos de manera continua, necesarios para el establecimiento, crecimiento y desarrollo de la plántula (Stasolla *et al.*, 2003).

Durante la germinación tanto la vía *de novo*, vía RNR, como de salvamento de desoxirribonucleótidos también se activan. La citidina cinasa (CK) y las fosfotransferasas inespecíficas de embriones de semillas de *P. glauca* y de maíz catalizan la conversión del desoxinucleósido a CMP. Lo mismo sucede en el caso de la desoxicitidina, cuya conversión a dCMP es llevada a cabo por la desoxicitidina cinasa (Stasolla *et al.*, 2003). En la germinación de semillas de trigo, se observa un aumento rápido de la concentración de dATP al principio de la imbibición, pero para los otros dNTPs el aumento es lento y discreto, alcanzándose un máximo para dCTP y dTTP a las 20 horas de la germinación (Castroviejo *et al.*, 1979).

#### 4. Timidina cinasa 1 o citosólica

La timidina cinasa es una enzima clave en la vía de salvamento de nucleótidos de timina, ya que regula el aporte de éstos para la síntesis de ADN. Los distintos niveles de regulación de la actividad de la TK1 aseguran que durante la replicación no exista ni un exceso ni una carencia en la cantidad de nucleótidos, en vista de que ambos desequilibrios pueden ocasionar mutaciones en el ADN o la detención en el avance de las horquillas de replicación. En vista del mayor consumo de energía necesario para la síntesis de TMP por la vía *de novo* a partir de precursores sencillos, la TK1 provee la materia prima para la duplicación de los cromosomas a un menor costo para la célula.

La timidina cinasa (ATP:timidina 5'-fosfotransferasa; EC 2.7.1.21; TK) es una desoxirribonucleósido cinasa que participa en la vía de salvamento de nucleótidos de pirimidina, pues cataliza la fosforilación dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  de la timidina (Thd) para producir timidina 5'-monofosfato. Esta sufre dos fosforilaciones posteriores, primero por la timidilato cinasa seguida de la nucleósido difosfato cinasa para generar timidina 5'-trifosfato, precursor de la síntesis del ADN (Figura 4; Bradshaw & Deininger, 1984; Wang & Eriksson, 2000).

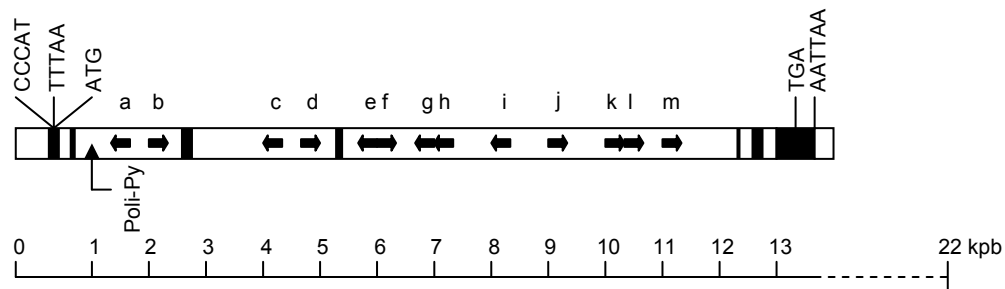
En mamíferos se han identificado dos timidina cinasas diferentes: la timidina cinasa 1 (TK1) de localización citosólica y la timidina cinasa 2 (TK2) de localización mitocondrial y expresada preferentemente en hígado, pulmón y bazo. En humanos, el gen de la TK1 se localiza en el cromosoma 17, mientras que el gen correspondiente a la TK2 se encuentra en el cromosoma 16 (Wettin *et al.*, 1999; Wang & Eriksson, 2000; Balzarini *et al.*, 2000).

La actividad de la TK1 es regulada durante el ciclo celular y alcanza su máximo en la fase S en células en proliferación y en células en cultivo expuestas a suero; en estas condiciones, el 1-5% del total de la actividad corresponde a la TK2. Por el contrario, en células quiescentes o diferenciadas, la única actividad de timidina cinasa detectable se debe a TK2. (Munch-Petersen *et al.*, 1995; Lipson & Baserga, 1989).

##### a. Estructura del gen de la TK1 humana

El gen de la TK1 de humano (Figura 5) abarca casi 13 kpb del genoma y contiene siete exones que codifican para un ARNm de 1430 pb de longitud, excluyendo la señal de poliadenilación (considerando esta señal, la longitud es de aproximadamente 1500 pb). El tamaño de los exones es respectivamente 130, 32, 111, 94, 90, 120 y 851 pb. El tamaño de los intrones del gen humano varía desde 1 kpb hasta aproximadamente 7 kpb; el tamaño de los tres intrones más extensos se debe a la presencia de secuencias repetitivas de ADN de la familia *Alu* (Flemington *et al.*, 1987).

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



**Figura 5.** Estructura del gen de TK1 de humano. Las barras de color negro representan los siete exones, mientras que las regiones blancas indican los seis intrones y las secuencias flanqueantes. Las flechas (a—m) representan las secuencias de las familias *Alu*, y la dirección señala las orientaciones de transcripción. Asimismo se indican la secuencia de poli(Py) (TCCC)<sub>n</sub> y señales transcripcionales como elementos CCAAT, TTATAA y ATA (adaptado de Flemington *et al.*, 1987).

### b. Estructura primaria de la TK citosólica

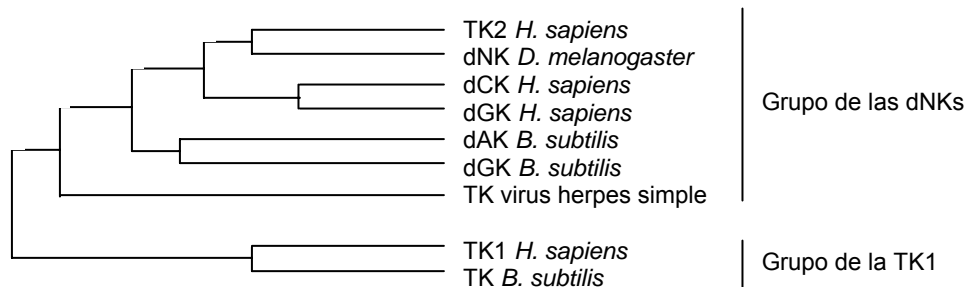
La comparación de las secuencias de aminoácidos de la TK de varias especies de vertebrados ha revelado un elevado porcentaje de identidad y se han identificado dominios altamente conservados como son el de unión a ATP (secuencia consenso GPMFSGKSTEL), el de unión a Mg<sup>2+</sup> (secuencia consenso VIGIDEGQ) y el de unión a Thd (FQRKAFGSI; Figura 6). El extremo carboxilo terminal de la proteína es la zona que exhibe la mayor variabilidad entre las distintas especies, lo que concuerda con reportes que indican que este extremo no es necesario para la actividad enzimática pero sí para la regulación (Wintersberger, 1997).

Ratón	MSYINLPTVLPSSPSKTRGQIQVIL <u><b>GPMFSGKSTEL</b></u> MRRVRRFQIAQYKC	50
Humano	MSCINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL <u><b>GPMFSGKSTEL</b></u> MRRVRRFQIAQYKC	50
Hámster	MNYINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL <u><b>GPMFSGKSTEL</b></u> MRRVRRFQINQYKC	50
Pollo	MDCLTVPGVHPGSPGRPRGNINLIF <u><b>GPMFSGKSTEL</b></u> MRRVRRFNLANYRC	50
Ratón	LVIKYAKDTRYSNS FSTHDRNTMDALPACMLRDVTQESLGVAV <u><b>IGID</b></u> EQ	100
Humano	LVIKYAKDTRYSSS FCTHDRNTMEALPACLLRDVAQEALGVAV <u><b>IGID</b></u> EQ	100
Hámster	LVIKYAKDTRYSSS FSTHDRNTMDALPACMLRDVAQEALGAAV <u><b>IGID</b></u> EQ	100
Pollo	LLVKYAKDTRYCTTGVSTHDRDTMEARVACALQDVYEEALGSAV <u><b>IGID</b></u> EQ	101
Ratón	FFPDIVDFCEMMANEGKTVIVAALDGT <u><b>FOR</b></u> KAF <u><b>GS</b></u> ILNVLVPLAESVVKLT	150
Humano	FFPDIMEFCCAMANAGKTVIVAALDGT <u><b>FOR</b></u> KPF <u><b>GAI</b></u> LNVLVPLAESVVKLT	150
Hámster	FFPDIVDFCEVMANAGKTVIVAALDGT <u><b>FOR</b></u> KAF <u><b>GS</b></u> ILNVLVPLAESVVKLT	150
Pollo	FFPDIVDFCEKMAADTGT <u><b>FOR</b></u> KAF <u><b>GS</b></u> ILNVLVPLAESVVKLD	151
Ratón	AVCMECFREAAAYTKRLGLEKEVEVIGGADKYHSVCRLKAFKKSSAQTAGS	200
Humano	AVCMECFREAAAYTKRLGLTKEVEVIGGADKYHSVCRLCAFKKASGQPAGP	200
Hámster	AVCMECFREAAAYTKRLGLEKEVEVIGGADKYHSVCRCYFKKSSVQPAGP	200
Pollo	AVCMECYREASYTKRLGAEREVEVIGGADKYHSVCRCACYFKRPEEELGSE	201
Ratón	DNK NCLVLGPPGEALVVRKLFASQQVLQYNSAN	233
Humano	DNKENCVPVGPGEAVALRKLFAFQQILQCSPAN	234
Hámster	DNKENCVPLGQPGEASAVRKLFAFQQVLQHNSTN	234
Pollo	NKENVEMGVKQLDMPASRKIFAS	224

**Figura 6.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de TK1 de ratón, humano, hámster y pollo. Se muestran las regiones involucradas en la unión a ATP (subrayado y negritas),  $Mg^{2+}$  (negritas), y Thd (subrayado discontinuo y negritas). El ácido aspártico fundamental para la unión del  $Mg^{2+}$  se encuentra subrayado (Wintersberger, 1997).

### c. Clasificación y estructura de las desoxirribonucleósido cinasas

La TK1 forma parte de una familia de cinasas que se divide en dos grupos: el grupo de la TK1, representado prácticamente por solamente esta enzima, y el grupo de las desoxirribonucleósido cinasas (dNKs) que incluye a la desoxicitidina cinasa (dCK), la desoxiguanosina cinasa (dGK), la timidina cinasa 2 (TK2), la desoxinucleósido cinasa multifuncional de *Drosophila melanogaster* (dNK) y las desoxirribonucleósido cinasas virales (Figura 7).



**Figura 7.** Relación filogenética entre las dNKs (tomado de Sandrini & Piškur, 2005).

En comparación con los miembros de la familia dNK, la estructura primaria de la TK1 de humano sólo exhibe una identidad significativa con respecto al asa P (ubicada en el extremo N-terminal) que une al donador de fosfato. El plegamiento de las proteínas pertenecientes a la familia de las dNKs es semejante entre sí, y es más parecido al plegamiento de la timidilato cinasa (la enzima que lleva a cabo la segunda fosforilación sobre la timidina después de la TK1) que a la TK1 del virus del herpes. La estructura activa de todas las dNKs es dimérica, y la unidad monomérica tiene de 8 a 10  $\alpha$ -hélices que rodean a una lámina- $\beta$  de 5 cadenas paralelas (Sandrini & Piškur, 2005).

A partir del análisis de las estructuras cristalográficas de miembros de las dNKs como la dCK, la dGK, la TK2 y la TK1 del virus del herpes, se han identificado los aminoácidos que participan en la catálisis: una glutamina, un par ácido glutámico/ tirosina y un par ácido glutámico/ arginina interactúan mediante puentes de hidrógeno con la base nitrogenada y la desoxirribosa mientras un ácido glutámico actúa como una base para desprotonar el hidroxilo (ver *Mecanismo catalítico de las dNKs* más adelante). Por su parte, una arginina aproxima el fosfato- $\gamma$  del ATP al hidroxilo 5'. La dNK de *Drosophila* posee un sitio catalítico más holgado que explica el porqué de su amplia especificidad por el sustrato, en contraste con la limitada especificidad de las enzimas humanas (Sandrini & Piškur, 2005).

La mayoría de los organismos, incluidos virus, bacterias, hongos, plantas y mamíferos poseen por lo menos una enzima con actividad específica de cinasa de timidina, aunque las TKs 1 virales tienen la capacidad para fosforilar una amplia variedad de análogos de nucleósidos, realizar múltiples fosforilaciones sobre la timidina y emplear otros nucleótidos trifosfato, además del ATP, como fuente de fosfato (Evans *et al.*, 1998). Un par de excepciones son los insectos (*Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*) que poseen una única dNK multifuncional y *S. cerevisiae* que carece de TK1 (Wintersberger, 1996; Eriksson *et al.*, 2002).

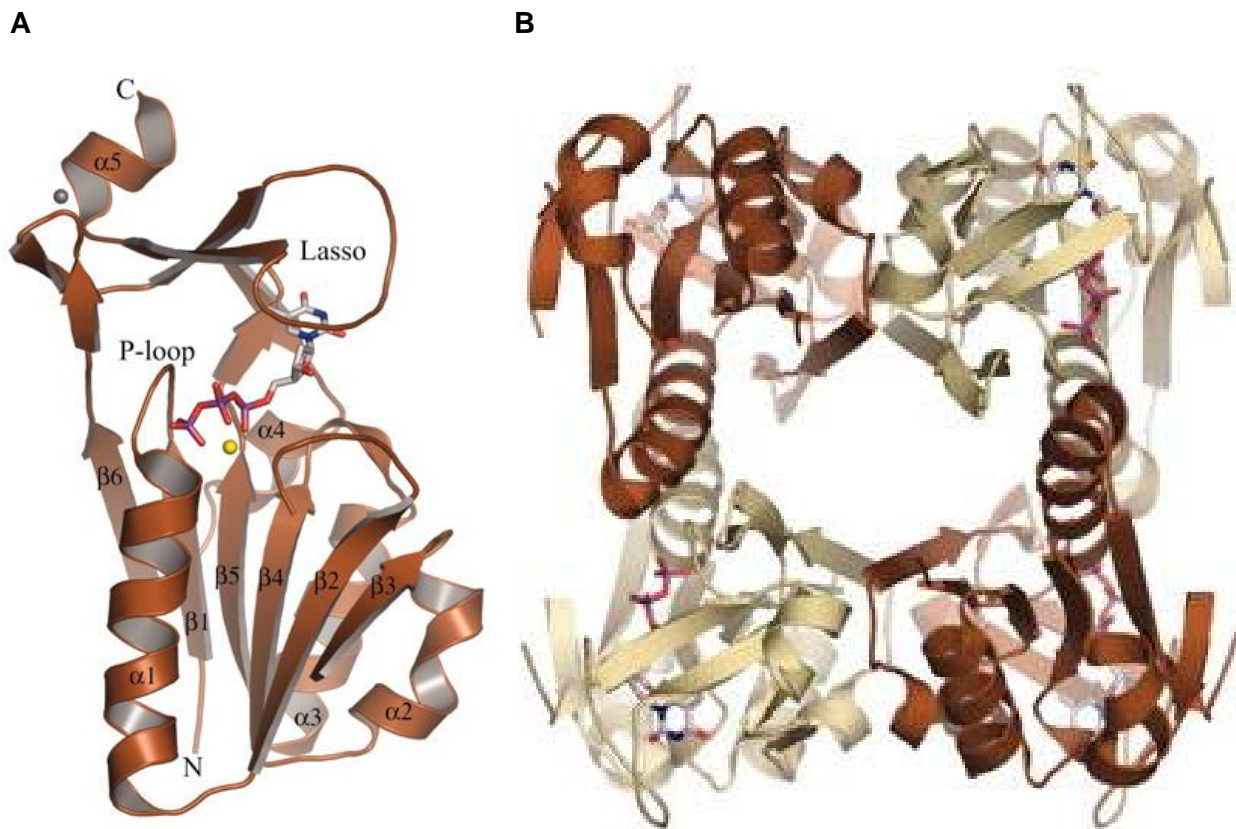
Otra característica distintiva de las TKs tipo 1 es la especificidad por el sustrato pues exclusivamente fosforila timidina y desoxiuridina. En contraste, la TK2 fosforila la timidina, la desoxiuridina y la desoxicitidina; la dCK fosforila la desoxicitidina, desoxiadenosina y desoxiguanosina, y la dGK fosforila la desoxiadenosina y la desoxiguanosina. El restringido espectro de sustratos fosforilables de la TK1 se debe a que su sitio activo es más estrecho en comparación con el de las dNKs y a que todos los grupos polares del sustrato pueden formar puentes de hidrógeno con grupos de la proteína (Sandrini & Piškur, 2005).

La molécula donadora de fosfato también varía dependiendo de la enzima; mientras que la TK1 utiliza casi exclusivamente ATP como donador, la dCK puede utilizar indistintamente UTP o ATP y la TK2 ATP o CTP (Sandrini & Piškur, 2005; Eriksson *et al.*, 2002).



#### d. Estructura terciaria de la TK1

Hasta el año 2004, la resolución de una estructura cristalográfica de una TK1 había resultado imposible, y sólo se habían obtenido estructuras de la TK del virus del herpes, de la dNK de *D. melanogaster* y la dGK de humano. Welin y colaboradores (2004) reportaron la primera estructura de la TK1 de humano (Figura 8A), y especularon que la dificultad en la obtención de los cristales estribó en la presencia de regiones flexibles en la estructura. Para la cristalización se utilizó una proteína truncada más estable, que carece de los últimos 41 aminoácidos en el extremo C-terminal, pero que conserva la actividad enzimática (Welin *et al.*, 2004).



**Figura 8.** Estructura tridimensional de la TK1. A. Estructura terciaria de un monómero de la TK1 de humano (tomado de Welin *et al.*, 2004). El monómero está formado por 4  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) alrededor de 6 cadenas de  $\beta$ -plegada ( $\beta 1$ - $\beta 6$ ). Esta región constituye el dominio  $\alpha/\beta$  en la parte central de la figura. El átomo de  $Mg^{2+}$  (color amarillo) que estabiliza el fosfato- $\gamma$  del ATP se une al dominio  $\alpha/\beta$ . El asa P (P-loop) ubicado en el dominio  $\alpha/\beta$  une al donador de fosfatos. El dominio lazo, en la parte superior de la figura, cubre el sitio catalítico. La timidina interactúa con ambos dominios. EL dominio lazo está estabilizado por un átomo de  $Zn^{2+}$  coordinado con cisteínas de la cadena de aminoácidos. B. Conformación tetramérica de la TK1 de humano (tomado de Welin *et al.*, 2004).

---

---

La estructura cuaternaria de la TK1 es un homotetrámero y los datos cristalográficos permitieron determinar que cada subunidad tiene dos dominios, el  $\alpha/\beta$  y un dominio más pequeño que contiene un átomo de zinc, con el sitio activo ubicado entre ambos dominios. El núcleo del dominio  $\alpha/\beta$  está formado por 6 láminas- $\beta$  paralelas, flanqueadas por una  $\alpha$ -hélice y un asa flexible de un lado y 3 hélices más cortas del otro lado. El dominio  $\alpha/\beta$  se parece al dominio de unión de ATP de enzimas de la familia RecA-F<sub>1</sub>ATPasa (factores de intercambio de hebras de ADN dependientes de ATP), así como de helicasas y de proteínas de reparación de ADN (Welin *et al.*, 2004; Sandrini & Piškur, 2005).

El dominio pequeño, de 70-80 aminoácidos, tiene una estructura con forma de lazo que cubre el sitio de unión de desoxirribonucleósidos, que no tiene semejanza con ninguna otra estructura conocida. El sitio de unión del sustrato de las dNKs dCK, dGK y DmdNK – conformado por dos pares de hélices y una estructura helicoidal en forma de tapa– es inexistente como tal en la TK1 (Sandrini & Piškur, 2005). Este dominio pequeño está formado por dos lazos- $\beta$  unidos entre sí por un átomo de zinc. Uno de los lazos- $\beta$  se abre y se cierra para formar un asa en forma de lazo que se une, a través de puentes de hidrógeno, con la base nitrogenada del desoxirribonucleósido. El lazo se mantiene fijo gracias a una tirosina y una arginina de la cadena principal que se unen por puentes de hidrógeno al lazo. El zinc está coordinado tetrahédricamente con cuatro cisteínas (Welin *et al.*, 2004).

El orden de las cadenas y las posiciones de las hélices del dominio  $\alpha/\beta$  de la TK1 son diferentes a los de este dominio del resto de la dNKs, pues en éstas el sitio activo no se forma en la transición entre el dominio  $\alpha/\beta$  y el dominio con el Zn, sino entre dos pares de hélices y una estructura helical en forma de tapa, de la cual carece la TK1. Estas diferencias estructurales suponen un origen evolutivo diferente de la TK1 con respecto al resto de la dNKs (Welin *et al.*, 2004; Eriksson *et al.* 2002).

#### **e. Formación de la estructura cuaternaria de la TK1**

La unión de los cuatro monómeros forma un canal en la parte central del tetrámero (Figura 8B), cuya superficie contiene principalmente residuos polares y cargados. Existen dos tipos de interacciones entre los monómeros: (1) dos  $\alpha$ -hélices (una de cada monómero) interaccionan de manera antiparalela; (2) una lámina- $\beta$  de cada monómero se conecta de manera antiparalela con la de otro monómero a través de puentes de hidrógeno con moléculas de agua entre ambas. Por comparación con la estructura de la TK1 de *Ureaplasma urealyticum*, se ha sugerido que el extremo C-terminal de la TK1 forma un asa y una hélice que interactúan con una hélice del monómero adyacente (Welin *et al.*, 2004).

#### **f. Unión de los sustratos a la TK1**

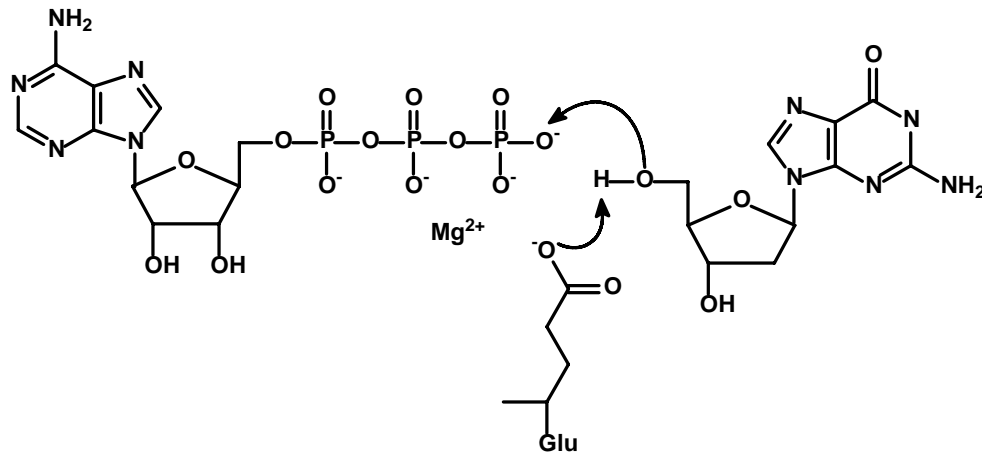
El donador de fosfato se une en una región expuesta formada por el asa P (P loop) ubicada en el dominio  $\alpha/\beta$ , mientras que el desoxinucleósido se une a una hendidura entre el dominio  $\alpha/\beta$  y el dominio lazo (que contiene el átomo de Zn). Como se mencionó arriba, la base se apoya en una tirosina (Y181) y una arginina (R165) que además, estabilizan la estructura del lazo. El anillo de la tirosina se ubica paralelo al anillo de la base pirimidínica. Del otro lado, la base se apoya en dos fenilalaninas orientadas de manera perpendicular con respecto al anillo de la base. Tanto el donador como el receptor de fosfatos forman puentes de hidrógeno con átomos de la cadena de aminoácidos: el O2 y el N3 de la timina forman puentes de hidrógeno con átomos del dominio lazo, mientras el O4 forma un enlace con un nitrógeno del dominio  $\alpha/\beta$ . El metilo de la timina se acomoda en un bolsillo hidrofóbico, en dirección a una leucina, y rodeado por una metionina, una leucina y una tirosina. El O3' de la desoxirribosa forma un puente de hidrógeno con el grupo amino de una glicina en el dominio lazo y con la cadena lateral de un ácido aspártico perteneciente al asa flexible del dominio  $\alpha/\beta$ . El O5' está próximo a un ácido glutámico (Glu98) del dominio  $\alpha/\beta$ , que parece funcionar como un residuo catalítico ácido-base (Welin *et al.*, 2004).

La alta especificidad de la TK1 para sus sustratos se explica por un menor tamaño de su sitio catalítico con respecto al resto de las dNKs y por los numerosos puentes de hidrógeno que se establecen entre todos los grupos polares de la base y la enzima. La especificidad para 2'-desoxirribonucleósidos se debe al impedimento estérico que impondría el OH 2' de un ribonucleósido con el carbonilo de una glicina y el anillo de una tirosina ubicadas en el dominio lazo, ya que los radios de van der Waals de ambos grupos estorbarían al OH. En el caso de un desoxinucleósido, tanto la tirosina como la glicina están en contacto directo con el carbono 2'. Por el contrario, el OH 3' se encuentra expuesto hacia la superficie, a pesar de interactuar con una glicina del dominio lazo. Con respecto a la posición del sustrato del resto de la dNKs, la timina se ubica de manera perpendicular en el sitio activo (Welin *et al.*, 2004).

#### **g. Mecanismo catalítico de la dNKs y las TKs tipo 1**

El mecanismo de reacción aceptado para las dNKs inicia con la activación del 5'-OH por sustracción de un protón, que ataca nucleofílicamente al fosfato  $\gamma$  del donador. En la TK del virus del herpes, el grupo carboxilo de un ácido glutámico próximo al 5'-OH actúa como una base y desprotona al 5'-OH. El carácter básico de una arginina ubicada cerca del hidroxilo facilita la extracción del protón. En la dNK de *Drosophila* y en la dGK, también un ácido glutámico y una arginina son responsables de la catálisis ácido-base (Eriksson *et al.*, 2002). En

el caso de la TK1, el ácido glutámico 98 se encuentra en la posición adecuada para actuar como una base y activar el 5'-OH para que actúe como un nucleófilo, y la arginina 60 puede estabilizar el estado de transición (Figura 9; Welin *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Mecanismo de reacción de las desoxirribonucleósido cinasas. El ácido glutámico actúa como una base y abstrae un protón del 5'-OH del desoxirribonucleósido, que a su vez ataca nucleofílicamente al fosfato  $\gamma$  del ATP (tomado de Eriksson *et al.*, 2002).

El mecanismo de reacción requiere iones  $Mg^{2+}$ , que interactúan con los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$ , estabilizando la posición del donador. Hasta el momento no hay información estructural sobre la posición del  $Mg^{2+}$  en las dNKs (Welin *et al.*, 2004).

#### h. Propiedades cinéticas de la TK1

La TK1 de humano es una proteína con un peso molecular de 24 kDa con una conformación activa enzimáticamente homotetramérica (con un peso molecular de alrededor de 96 kDa; Sherley & Kelly, 1988a). La exposición al sustrato ATP induce un cambio conformacional – dependiente de la concentración de enzima– de un dímero de 50 kDa con baja afinidad por la Thd ( $K_M = 15 \mu M$ ) al tetrámero que presenta una elevada afinidad por el mismo sustrato ( $K_M = 0.7 \mu M$ ; Berenstein *et al.*, 2000; Britton *et al.*, 1998). Esta diferencia de afinidades significa que en concentraciones fisiológicas de Thd (0.1-1.2  $\mu M$ ) en la célula, la conformación tetramérica será más activa que el correspondiente dímero (Munch-Petersen *et al.*, 1995). A diferencia de la afinidad de la TK1 por la Thd, la unión del ATP y la consecuente tetramerización no modifica la velocidad máxima de la enzima (Munch-Petersen *et al.*, 1993). La integridad de la secuencia y estructura del sitio de unión a timidina es indispensable para mantener la capacidad de tetramerización, ya que de lo contrario, la enzima adquiere preferentemente la conformación dimerica y disminuye su estabilidad (Posch *et al.*, 2000). La  $K_M$  de la TK1 para el ATP- $Mg^{2+}$  es

---

---

de 0.22 mM, y la cinética, cuando se varía la concentración de ATP-Mg<sup>2+</sup>, es sigmoideal lo que indica cooperatividad. El dATP también puede utilizarse como donador de grupos fosfato, pero la velocidad máxima que se alcanza es alrededor del 65% de la que se obtiene cuando se usa ATP como donador (Lee & Cheng, 1976b).

El coeficiente de Hill de la conformación tetramérica de la TK1 de humano es de 1, lo que indica ausencia de cooperatividad. Sin embargo, el coeficiente de Hill del dímero es menor a la unidad lo que sugiere cooperatividad negativa (Li *et al.*, 2004).

El pH óptimo de la TK1 de humano purificada de células blásticas de leucemia mielocítica aguda comprende el intervalo de 7.6 a 7.8, es estable entre 25 y 40°C y su energía de activación es de 15.17 kcal mol<sup>-1</sup> (Lee & Cheng, 1976).

### **i. Regulación transcripcional de la timidina cinasa**

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

En cultivos celulares, la expresión génica de la TK aumenta en la transición G<sub>1</sub>/S en respuesta a factores de crecimiento. El mismo patrón de expresión se observa *in vivo* en linfocitos de bazo cuando se estimulan con algún agente mitogénico (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

En la regulación durante el ciclo celular de la expresión del gen de la TK1 de ratón, el factor de transcripción E2F forma por lo menos tres complejos con las proteínas pRb, p107, CycE, CycA y Cdk2. Durante la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, se forma el primer complejo constituido por E2F y p107 (complejo E2F•G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) sobre la región MT2 del promotor; esta interacción inhibe la función activadora de E2F sobre la transcripción, contribuyendo a mantener reprimido el gen de TK1. En la fase G<sub>1</sub>/S el complejo activado CycE/Cdk2 se asocia al complejo E2F•G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (complejo E2F•G<sub>1</sub>/S), permitiendo la fosforilación de p107 por Cdk2. Esto provoca la disociación de p107 del complejo aboliendo la represión transcripcional. Durante la fase S, se forma un tercer complejo entre E2F, p107, CycA y Cdk2 (complejo E2F•S) donde nuevamente Cdk2 fosforila a p107 con la consecuente liberación de más E2F (Dou *et al.*, 1994).

Además de la actividad inherente a E2F, la transcripción del gen de la TK1 de ratón requiere la unión de Sp1 a la cromatina de la región MP1 y la interacción entre ambos factores

de transcripción. Esta interacción ocurre entre el extremo amino terminal de E2F que incluye 122 aminoácidos y el extremo carboxilo terminal de Sp1 (Wintersberger, 1997; Rotheneder *et al.*, 1999). El factor Sp1 también puede unirse con el represor transcripcional histona desacetilasa (HDAC) evitándose así la expresión génica. El factor E2F compite con HDAC por Sp1, por lo que se especula que la función de la interacción E2F-Sp1 sea eliminar la represión debida al estado hipocetilado de la cromatina (Rotheneder *et al.*, 1999).

Sin embargo, la función de E2F como elemento regulador de la expresión de este gen no se ha podido demostrar tan claramente en otras especies. En la línea celular tumoral humana HeLa el factor de transcripción NF-Y se une a dos secuencias invertidas CCAAT en el promotor del gen TK y esto es un requisito para la unión de otro factor transcripcional, Sp1, que es responsable del aumento en la expresión de TK1 en la fase S (Chang *et al.*, 1999). Aunque en el promotor del gen hay elementos de unión a E2F, no se ha demostrado su participación en la regulación dependiente del ciclo celular.

#### **j. Regulación post-transcripcional y post-traducciona de la timidina cinasa**

Además de la regulación a nivel transcripcional, la TK1 está sujeta a varios mecanismos de regulación post-transcripcional y post-traducciona que controlan los niveles de la enzima y su actividad, así como la poza de precursores para la síntesis de ADN.

Se ha observado que células en proliferación experimentan un aumento en los niveles de transcrito y proteína durante la fase S del ciclo celular. Sin embargo, mientras que los niveles de transcrito se incrementan apenas 3 veces con respecto a los niveles observados en G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, los niveles de proteína se elevan hasta 15 veces. Este comportamiento dispar entre la cantidad de proteína y de ARNm se debe a un aumento de casi 10 veces en la eficiencia traducciona durante la fase S (Sherley & Kelly, 1988b). En estudios de traducción *in vitro* de la TK1 de humano, Chou & Chang (2001) identificaron en la región 5'-UTR un sitio IRES (*Internal Ribosome Entry Segment*) atípico de 30 nucleótidos (en comparación con los 300-500 nucleótidos de los IRES virales) que permite la traducción independiente del CAP del ARNm de la TK1. Debido a que la gran mayoría de los ARNm eucariotes se traducen por mecanismos dependientes del CAP, se desconoce si la traducción mediada por el IRES tiene algún significado fisiológico (Chou & Chang, 2001). El aumento en la eficiencia de la traducción podría ser consecuencia de la traducción dependiente e independiente del CAP.

A nivel post-traducciona, el perfil temporal de oligomerización de la TK1 también contribuye a su regulación. Las determinaciones de peso molecular por cromatografía de filtración en gel han demostrado que la elución en presencia de ATP favorece la oligomerización

reversible del tetrámero. Asimismo, la tetramerización de la TK1 depende de manera lineal de la concentración de proteína: la estimación de la concentración de TK1 a nivel intracelular (en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina) a partir de la actividad enzimática específica, sugiere que la forma predominante en células en  $G_0/G_1$  (90 ng/mL de TK1) es el dímero, mientras que en células en fase S (4000 ng/mL de TK1) predomina el tetrámero. Este hecho podría constituir un mecanismo de regulación fina de la actividad de TK1 a nivel post-traducciona l pues, como ya se mencionó, el valor de  $K_M$  del tetrámero es aproximadamente 30 veces más bajo que el del dímero (Munch-Petersen *et al.*, 1993, 1995).

Otro mecanismo de control propuesto ocurre cuando la proteína alcanza su nivel máximo en la fase  $G_2/M$  y es fosforilada en la serina 13 (Ser13). Esta fosforilación ocasiona un desplazamiento del equilibrio dímero  $\leftrightarrow$  tetrámero hacia la conformación dimérica, con la consecuente disminución de su afinidad por la timidina sin afectar la unión del ATP. La cinasa dependiente de ciclina Cdc2 es la responsable de esta fosforilación, lo que demuestra que esta modificación constituye un mecanismo de regulación acorde con las etapas del ciclo celular. (Ke *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). El papel de la serina como modulador de la conformación de la TK1 se demostró mediante el análisis de un par de mutantes: cuando la serina se sustituye por alanina (aminoácido no fosforilable), la proteína adquiere preferentemente la conformación tetramérica, mientras que la sustitución por ácido aspártico (aminoácido con carga que simula el grupo fosfato) favorece la conformación dimérica (Li *et al.*, 2004).

Además de esta regulación de la actividad, se ha demostrado que los niveles de proteína de la TK1 de humano se regulan por degradación mediada por el proteasoma. La TK1 se ubiquitina en las etapas finales de la mitosis, lo que la hace blanco del complejo promotor de la anafase/ ciclosoma (APC/C), contribuyendo a la desaparición de la TK1 en la transición mitosis/ $G_1$  y la siguiente  $G_1$ . Evidentemente, esta reducción en los niveles de proteína se reflejan en la actividad y disminuye el aporte de TTP por parte de la vía de salvamento (Ke & Chang, 2004; Ke *et al.*, 2005). La interacción entre el APC/C y la TK1 depende de una secuencia KEN (Lys-Asp-Asn) ubicada en la posición 203 de la enzima. La eliminación de los últimos 40 aminoácidos de la TK1 (incluido el motivo KEN) abate este tipo de regulación y los niveles de la proteína se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular. El motivo KEN (o KEN-like) está conservado en las TK1 de pollo, hámster chino y ratón. Por el contrario, las TK1 de virus como vaccinia, a pesar de ser homólogas a las de mamíferos, carecen de este motivo en sus extremos C-terminales. Esto constituiría un mecanismo de escape que previene que la enzima viral sea degradada por el proteasoma del hospedero (Ke & Chang, 2004). En las secuencias de TK1 reportadas de plantas, no se identifica el motivo KEN.

Además, la TK1 está sujeta a inhibición por retroalimentación por el producto final de la vía de salvamento, el TTP. El desoxinucleósido trifosfato inhibe a la enzima uniéndose como si fuera el par de sustratos. La base nitrogenada ocupa el lugar de la timidina, mientras que el grupo trifosfato se une al revés de cómo lo hace el ATP en el asa P (Xu & Plunkett, 1993; Welin *et al.*, 2004).

#### **k. Función biológica de la timidina cinasa**

La función biológica de la timidina cinasa de mamíferos aún no se ha establecido con certeza. Mientras que en células normales la enzima es ubicua y se encuentra sujeta a un estricto control, en algunas líneas de células inmortalizadas la enzima puede estar ausente y éstas son capaces de crecer y proliferar indefinidamente. La conservación de esta proteína a lo largo de la evolución y su presencia en una gran variedad de organismos sugiere que juega un papel importante en el metabolismo. Una explicación posible de la resistencia de las células inmortalizadas a la ausencia de dicha enzima podría ser que la pérdida de la regulación fina de los niveles de la poza de timidina –por la ausencia de la TK1– produce un aumento en el número de mutaciones en el genoma y por ende incrementa la frecuencia de tumorigénesis, hecho que no afectaría sustancialmente a las células inmortalizadas pero resultaría letal para células normales (Wintersberger, 1997).

El desequilibrio en las pozas de desoxinucleótidos provoca un retraso en el crecimiento de las células en suspensión, específicamente en la transición  $S \rightarrow G_2/M$ . Este efecto derivado del incremento en la concentración de TTP es muy similar al observado cuando se adicionan concentraciones elevadas de Thd al medio de células en cultivo (Ke *et al.*, 2005). En este caso específico se comprobó que el tratamiento detiene el avance de las horquillas de replicación debido a una falta de dCTP. Asimismo, el desequilibrio en las pozas aumentó el índice de mutaciones espontáneas. Este hecho sugiere que el aporte excesivo de TTP y el consecuente detrimento en los niveles de dCTP comprometen la fidelidad de la síntesis del ADN, debido a la acumulación de errores durante el prolongado retraso de la mitosis. El estudio demostró la importancia de la regulación post-traducciona de la TK1 en el mantenimiento de la integridad genómica (Ke *et al.*, 2005).

La función de la TK1 *in vivo* ha podido ser estudiada durante el desarrollo por la generación de ratones *knockout* ( $tk^{-/-}$ ). Estos tienen un desarrollo embrionario normal pero a partir del destete, o más tarde, adquieren una postura jorobada, después arrastran sus patas traseras al caminar y eventualmente quedan inmóviles. Su periodo de vida promedio es de  $166 \pm 49$  días, y antes de los 298 días todos han muerto, lo que contrasta con los 2 años de vida



promedio de un ratón silvestre. Estos ratones exhiben un muy bajo índice reproductivo, y los niveles de timidina en sangre son el doble que en los ratones  $tk^{+/+}$ . Esto permite suponer que esta ruta sintética no es suficiente para mantener la poza de TMP en muchos tipos de células, o que la actividad degradativa de las nucleotidasas es alta y por ende se requiere de la vía de salvamento para el mantenimiento de la poza (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

A nivel tisular, los ratones  $tk^{-/-}$  presentan varias alteraciones como glomeruloesclerosis difusa, con un ensanchamiento irregular de la membrana capilar basal acompañado de una reducción en el número de células. Alrededor de la membrana capilar basal también se detectan depósitos granulares densos y acumulación de inmunoglobulinas IgG, lo que sugiere la presencia de complejos inmunes. En algunos animales los glomérulos desaparecen y son sustituidos por tejido escarificado (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

El bazo de los animales *knockout* también presenta anomalías inmunológicas y hematológicas, como atrofia linfóide (disminución en la capacidad de activación y proliferación) y destrucción prematura de eritrocitos. Tanto el tamaño del bazo como el rendimiento de linfocitos se reduce. Algunos ratones sufren de neumonía con infiltración de macrófagos y linfocitos. En lugar de una glándula salival sublingual con apariencia y secreción mucosa normal, los ratones  $tk^{-/-}$  tienen una membrana de apariencia cerosa, similar a una glándula parótida. El páncreas es de un tamaño menor y hay una deficiencia de islotes, así como gránulos de eosinófilos en las células acinares (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

Curiosamente, muchos de los tejidos afectados por la deficiencia de TK1 no se caracterizan por una activa proliferación y, por el contrario, tejidos con una vigorosa síntesis de ADN como son la médula ósea y las células epiteliales del tracto gastrointestinal no sufren ningún daño. En el caso de estos tejidos proliferativos, la vía de síntesis *de novo* seguramente es capaz de aportar los nucleótidos necesarios. Por otro lado, el efecto del deterioro de los tejidos puede deberse a una mayor sensibilidad o a la intoxicación con exceso de timidina extracelular. Inesperadamente, el índice de mutagénesis no aumenta significativamente en los ratones *knockout*, y no se les encontró ningún tumor (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

En humanos no se ha asociado ninguna patología con la deficiencia de la TK1, en contraste con alteraciones en la vía de salvamento de purinas que repercute en enfermedades como la gota y el síndrome de Lesch-Nyhan (Voet & Voet, 1995).

## 5. Antecedentes experimentales

En contraste con la información que hay sobre la timidina cinasa de mamíferos, en plantas son escasos los estudios sobre esta enzima. Se ha detectado una actividad fosforilante de timidina que alcanza un máximo a las 24 h de germinación en semillas de trigo (Castroviejo *et al.*, 1979) y de maíz (Georgieva *et al.*, 1994) y se ha aislado un ADNc de arroz que codifica una timidina cinasa (Ullah *et al.*, 1999). Esta sonda se empleó para estudiar la expresión del gen y se encontraron mayores niveles del transcrito en tejidos maduros que en tejidos meristemáticos. El proyecto de secuenciación del genoma de *A. thaliana* permitió la identificación de dos probables genes de la timidina cinasa ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), aunque no se ha estudiado su función. En el laboratorio se aisló una clona parcial de ADNc de maíz (clona  $\delta 42$ ) cuyo único marco de lectura codifica una secuencia de 204 aminoácidos en la que se identificaron dominios de unión para timidina, para el catión  $Mg^{2+}$  y para ATP. Este ADNc muestra un 84% de identidad con respecto al de arroz.

La sonda  $\delta 42$  se utilizó para estudiar la expresión del gen de la TK1 durante la germinación de ejes embrionarios de maíz y se encontraron niveles máximos del transcrito a las 12 horas de imbibición de los ejes y una disminución gradual a partir de las 24 y hasta las 48 horas. No se detectó la presencia del transcrito en ejes secos. Los niveles del ARNm se modificaron por la adición de fitohormonas pues la aplicación simultánea de benciladenina (una citocinina) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (una auxina) en concentraciones cercanas a las fisiológicas provocó un incremento en la cantidad del transcrito a las 12 horas (Suzuri, 2001).

Con el propósito de hacer una caracterización de la timidina cinasa y proponer una de sus funciones durante el desarrollo vegetal, en este proyecto se establecieron las condiciones para la medición de la actividad enzimática y de los niveles de la proteína en embriones de maíz durante la germinación, y se asociaron estos parámetros a la síntesis de ADN que ocurre en esta fase. Asimismo se intentó aislar el ADNc completo de la TK1 de maíz para comparar su estructura con la de otras enzimas homólogas.

## HIPÓTESIS

La fosforilación de timidina mediada por la timidina cinasa es un evento asociado a la síntesis de ADN nuclear en embriones de maíz durante la germinación.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles y actividad de la timidina cinasa durante la germinación de embriones de maíz y estudiar el efecto de un inhibidor de la biosíntesis *de novo* de nucleótidos sobre estos parámetros.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la secuencia completa del ADNc de la timidina cinasa 1 de maíz
- Establecer las condiciones para determinar la actividad enzimática de la timidina cinasa durante la germinación de embriones de maíz
- Detectar los niveles de la timidina cinasa 1 durante la germinación de embriones de maíz, empleando un anticuerpo específico para esta enzima
- Determinar el efecto de la hidroxurea en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN y en los niveles de proteína y actividad de la timidina cinasa durante la germinación de embriones de maíz.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material biológico y tratamiento

#### a. Desinfección y sembrado de embriones de maíz

Se emplearon embriones obtenidos manualmente de semillas de maíz (*Zea mays* L.) de la raza Chalqueño, adquiridos en Chalco, Estado de México.

Los embriones se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio de una concentración final aproximada de 0.5% (v/v). Los embriones se sumergieron en 50 mL de la solución desinfectante y se agitaron durante 2 minutos, transcurridos los cuales dicha solución se sustituyó por 50 mL de agua estéril y los embriones se agitaron durante un minuto. Se realizaron un total de 4 lavados con agua estéril. Los embriones se dejaron secar sobre papel filtro estéril dentro de una campana de flujo laminar por 5 minutos y se sembraron en agar Murashige y Skoog sin sacarosa (MS [Apéndice A]; Gibco BRL), colocándolos sobre la superficie del medio.

Se tomaron muestras de los embriones durante la germinación a las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 y 72 horas. A partir de estas muestras se extrajo y precipitó el ADN total para la cuantificación de la [metil-<sup>3</sup>H]-timidina incorporada al ADN o se extrajeron las proteínas a partir de la región apical (2-5 mm) del coleoptilo y la radícula para determinar niveles de proteína y actividad enzimática.

### 2. Análisis de la síntesis de ADN durante la germinación

#### a. Medición de la incorporación de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina al ADN de embriones en germinación

Este ensayo (adaptado de Zúñiga-Aguilar *et al.*, 1995) permite monitorear la síntesis de ADN y consiste en embeber embriones de maíz en presencia de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina, un precursor radiactivo del ADN, que es incorporado durante su síntesis a lo largo del periodo de germinación. Posteriormente, se determina la radiactividad asociada al ADN precipitado con ácido tricloroacético (TCA).

Se sembraron 30 embriones de maíz desinfectados en cajas Petri de 10 cm de diámetro con 20 mL de medio MS, sobre cuya superficie se distribuyeron 100 µL de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina (1.78 TBq/mmol, 48.0 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). Los embriones germinaron

durante 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 y 72 horas a 27°C en oscuridad. Para los tratamientos con el inhibidor se incorporó hidroxurea (HU) 200 mM al agar fundido antes de vaciarlo a la caja Petri.

A partir de los embriones germinados se extrajeron los ejes embrionarios, se pesaron para calcular el incremento de peso húmedo y se molieron en un mortero con 1 mL de amortiguador de homogenización (Apéndice A). El homogenado se transfirió desde el mortero a un tubo de ensayo de 1.5 x 15 cm. El mortero se lavó con 500 µL de amortiguador de homogenización.

A cada muestra se le adicionó un volumen de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (v/v) y se incubó por 1 hora en hielo para precipitar el ADN. Las muestras precipitadas se filtraron con filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C, 24 mm) por vacío en un dispositivo Millipore® y se lavaron tres veces con ~3 mL de solución de TCA al 10% (v/v) y una vez con ~3 mL de solución de etanol al 90% (v/v).

Los filtros con el precipitado se fijaron a un soporte y se secaron en un horno a 54-60°C por lo menos 1 hora. Los filtros secos se depositaron en viales con 2.5 mL de líquido de centelleo (Apéndice A) y se cuantificaron las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo automático (Beckman LS 6000IC).

### 3. Determinación de la actividad enzimática de la timidina cinasa

Este ensayo enzimático es una adaptación del reportado por Wolcott & Colacino (1989), que se basa en la precipitación selectiva con cloruro de lantano de la [metil-<sup>3</sup>H]-timidina fosforilada. La mezcla de reacción se preparó como sigue:

- 500 µL de amortiguador de reacción (Apéndice A)
- 37.5 µL de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina 1.78 TBq/mmol 48.0 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech)
- 1.25 µL de solución de timidina 1 mM
- Un volumen de extracto proteico equivalente a 500 µg de proteína total
- Agua desionizada c.b.p. 1 mL

La concentración de timidina total fue de 2 µM (0.75 µM de [metil-<sup>3</sup>H]-timidina y 1.25 µM de timidina fría). Esta concentración de timidina total es suficiente para saturar a la enzima durante el tiempo que dura la reacción. El blanco de reacción se preparó con los mismos componentes mencionados, pero sustituyendo el extracto proteico por amortiguador Tris-HCl (50 mM pH 7.4).

La muestra preparada se incubó a 37°C por 2 horas, y la reacción enzimática se detuvo transfiriendo 100  $\mu$ L de la mezcla a un tubo Eppendorf de 2 mL con 1 mL de solución de precipitación (LaCl<sub>3</sub> 100 mM; trietanolamina 5 mM). La mezcla se agitó en vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 4°C y 200  $\times$  g durante 10 minutos (centrífuga Jouan MR1814). El precipitado se lavó con 1 mL de solución de precipitación y se disolvió en 300  $\mu$ L de HCl 0.05 N y 3 mL de líquido de Bray (Apéndice A). Las cpm se determinaron en un contador de centelleo automático (Beckman LS 6000IC).

#### 4. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-TK1 (Harlow & Lane, 1998)

##### a. Inmunización de conejos con el péptido de la TK1

El péptido TK-KLH fue sintetizado por Global Peptide Services, Colorado, E.U.A. Consta de 16 aminoácidos (NH<sub>2</sub>-DYKRRKSGSILDIVPC-CONH<sub>2</sub>) correspondientes al dominio de unión de la timidina. El péptido conjugado con hemocianina (1 mg/mL) se inyectó intramuscularmente a un par de conejos, de acuerdo con el siguiente protocolo de inmunización:

**Tabla 1.** Calendario de inmunización por vía intramuscular para la producción de anticuerpos policlonales de conejo anti-TK1 de maíz.

Fecha	Conejo	Péptido TK-KLH	ACF*	AIF**
22-I-2004	1	250 $\mu$ g	+	--
	2	250 $\mu$ g	+	--
29-I-2004	1	250 $\mu$ g	--	+
06-II-2004	1	250 $\mu$ g	--	+
12-II-2004	1	250 $\mu$ g	--	+
	2	250 $\mu$ g	--	+
16-II-2004	1	Sangría de prueba		
04-III-2004	2	250 $\mu$ g	--	+
18-III-2004	2	250 $\mu$ g	--	+
25-III-2004	2	Sangría de prueba		

\* Adyuvante completo de Freund (Sigma)

\*\*Adyuvante incompleto de Freund (Sigma)

El péptido conjugado (1 mg) se disolvió en 1 mL de agua desionizada estéril, y se sonicó hasta disolverlo completamente. Se prepararon alícuotas de 250  $\mu$ L, que se almacenaron a -20°C. Antes de inyectar el péptido, se mezcló con ~400  $\mu$ L de adyuvante completo o incompleto de Freund y se agitó en vórtex por una hora.

**b. Obtención del suero y purificación de las inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio**

Por punción cardíaca, se obtuvieron aproximadamente 40 mL de sangre de cada conejo, la cual se transfirió a un tubo Falcon® estéril, que se incubó en hielo por 2-2.5 horas para permitir la compactación del coágulo. Con un palillo de madera se despegó el coágulo de las paredes del tubo, tratando siempre de minimizar la hemólisis. Se centrifugó en una centrifuga Beckmann GS-6R a  $1700 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, y el sobrenadante de color ámbar se dividió en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ , que se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para la precipitación de las inmunoglobulinas se adicionó a un volumen de suero 0.5 volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio (77.7% pH 7.3). La mezcla se incubó con rotación continua a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas y se centrifugó a  $3400 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Centrífuga Sorvall RT 6000D). El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon® estéril y se le adicionó el mismo volumen de la primera precipitación. La mezcla se incubó con rotación continua a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas y se centrifugó a  $3400 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Centrífuga Sorvall RT 6000D). El sobrenadante se decantó y el botón se disolvió en un volumen de PBS 1 $\times$  equivalente a un tercio del volumen inicial de suero. Un volumen equivalente del suero pre-inmune se trató de la misma manera.

**c. Desalado de las inmunoglobulinas por ultrafiltración**

Las inmunoglobulinas disueltas en PBS 1 $\times$  (1 mL) se transfirieron a un tubo Amicon Ultra (30,000 MWCO, Millipore®) y se le adicionaron 3 volúmenes de PBS 1 $\times$ . El tubo se centrifugó (Sorvall RT 6000D) a  $2600 \times g$  durante 5 minutos o hasta reducir el volumen aproximadamente a 1 mL.

## 5. Detección de la proteína TK1 por inmunoblot

### a. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

La transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  Immobilon-P (Millipore) se realizó en una cámara de electroforesis Mini-V 8•10 Vertical Gel Electrophoresis System (Gibco BRL), según las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante 1 hora a 200 V con amortiguador de transferencia (Apéndice A) enfriado previamente a 4°C.

### b. Bloqueo e incubación de la membrana con el primer y segundo anticuerpo

La membrana se incubó con un volumen de la solución de bloqueo (Apéndice A) suficiente para cubrirla completamente, durante 4 horas con agitación constante a 4°C. La solución se decantó y se sustituyó por solución de bloqueo recién preparada, a la cual se le adicionó el anticuerpo policlonal anti-TK1 de maíz (dilución 1:1000). La incubación con el primer anticuerpo se realizó toda la noche con agitación a 4°C. Se retiró la solución y la membrana se lavó tres veces con PBS 1 $\times$  por 15 minutos cada lavado, con agitación constante y a temperatura ambiente. En el segundo lavado se incluyó además NaCl 0.5 M.

Después de los lavados, se adicionó solución de bloqueo recién preparada y el anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa en una dilución 1:10 000 (Amersham Biosciences) y se incubó durante 1 hora con agitación constante a 4°C. Para eliminar el segundo anticuerpo unido inespecíficamente se llevaron a cabo tres lavados con PBS 1 $\times$ , cada uno de 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante.

### c. Detección, exposición y revelado de la película autorradiográfica

Para la detección de las proteínas inmunorreactivas, la membrana se incubó durante 2 minutos con 1 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de los reactivos 1 y 2 del kit de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia). La membrana de PVDF se fijó entre un par de acetatos, cuidando de eliminar todas las burbujas de aire entre la membrana y el soporte, y se introdujo en un casete Spectronics® Monotec (Spectronics Corporation) en contacto con una película Hyperfilm™MP (Amersham Pharmacia). La exposición se realizó por periodos entre 30 s y 20 min. El revelado de la película se realizó sumergiendo la película en revelador y fijador Kodak GBX durante 4 y 2 minutos respectivamente. Todo el proceso de revelado se llevó a cabo en el cuarto oscuro.



#### d. Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de las bandas de la autorradiografía correspondiente se realizó con el equipo FLUOR-S® de BioRad para la captura de las imágenes y el software Quantity One® para su análisis cuantitativo.

### 6. Sobreexpresión del ADNc parcial de la TK1 de maíz en *E. coli*

#### a. Ensayo de ligación del ADNc de la TK1 en el plásmido pGEM

La ligación se llevó a cabo con el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), eligiendo una relación aproximada de cantidad de ADN (inserto-vector) de 3:1 (según recomienda el fabricante) y partiendo de 50 ng del producto de la reacción de PCR. Este plásmido contiene extremos cohesivos con la base nitrogenada timina, por lo que los productos de PCR, que poseen una adenina en sus extremos, son complementarios y se pueden ligar al vector con la ADN ligasa.

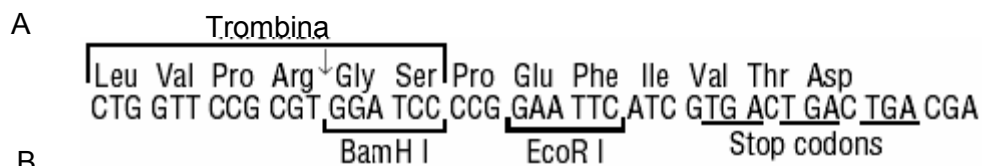
Para la reacción de ligación se mezclaron 5 µL de 2× Rapid Ligation Buffer, 1 µL del plásmido, 1 µL de T4 ADN ligasa (3 U/µL), y una cantidad del ADN recién obtenido a partir de PCR, utilizando para el cálculo de esta cantidad la siguiente fórmula:

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

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

#### b. Amplificación por PCR del ADNc de la TK1 de maíz

Para clonar el ADNc de la TK1 de maíz (clona δ42) que codifica el ORF de un péptido de 22.4 kD correspondiente a la TK1 en un plásmido de expresión, se amplificó dicha secuencia utilizando como molde el ADNc clonado en el vector pUC19 con el cebador sentido TK22FWD (5'-GGATCCGCCGCTGCGGCTCAGTCCGGC-3') y el cebador antisentido TK22REV (5'-GAATTCCGGCCGCTTGTCAAGGTCCAA-3'). Los sitios para las enzimas de restricción indicadas permitieron la clonación direccional del marco de lectura del fragmento de ADN en el vector pGEX (Figura 10).



Cebador sentido (con sitio de restricción *Bam*HI):

TK22FWD      5' -GGA TCC GCC GCT GCG GCT CAG TCC GGC-3'

Gly Ser Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly

Cebador antisentido (con sitio de restricción *Eco*RI):

TK22REV      5' -TTG GAC CTT GAC AAG CGG CCG GAA TTC-3'

Leu Asp Leu Asp Lys Arg Pro Glu Phe

**Figura 10.** Secuencias del vector pGEX. A. Secuencia de nucleótidos del sitio múltiple de clonación del vector pGEX (Amersham Pharmacia Biotech) La flecha indica el sitio de corte de la proteasa trombina que separa al péptido recombinante de la glutatión S-transferasa (GST). B. Los cebadores para amplificar el ADNc de la clona  $\delta 42$  fueron diseñados de manera que no interrumpen el marco abierto de lectura del ADNc y del sitio múltiple de clonación del vector pGEX. En la figura se muestra la traducción de los codones que conforman a ambos cebadores. En gris se señala la secuencia que corresponde al vector pGEX y que contiene sitios de corte para *Bam*HI y *Eco*RI. La secuencia de aminoácidos en el cebador sentido Ala, Ala, Ala, Ala, Gln, Ser, Gly corresponde a los primeros aminoácidos de la clona  $\delta 42$ .

La mezcla de reacción se preparó como sigue:

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para la amplificación del ADNc de la TK1.

	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
Amortiguador PCR (10 $\times$ )	10	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	10	2.5 mM
Mezcla de dNTPs (2.5 mM)	8	0.2 mM c/u
TK22FWD (10 $\mu$ M)	5	0.5 $\mu$ M
TK22REV (10 $\mu$ M)	5	0.5 $\mu$ M
Agua	59.5	--
Taq polimerasa (1 U/ $\mu$ L)	2.5	0.025 U/ $\mu$ L

Para la amplificación por PCR se realizaron 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineamiento a 57°C por 40 segundos y elongación a 72°C por 1.5 minutos. El producto de la reacción de amplificación se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se purificó utilizando el kit GENE CLEAN III.

Para confirmar que el ADNc de la TK1 se hubiera clonado en los vectores pGEM y pGEX, se realizó una amplificación por PCR usando como moldes los plásmidos recombinantes aislados a partir de colonias de *E. coli* transformadas con éstos y los cebadores TK22FWD y TK22REV, siguiendo las mismas condiciones descritas.

### **c. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción**

Para comprobar la presencia del ADNc de la TK1 en el vector pGEM, 500 ng de plásmido se trataron con 1 unidad de *EcoRI* en un volumen final de 20  $\mu$ L y se incubó a 37°C por 2 horas. Los productos de la reacción de digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Para clonar direccionalmente (y preservar la orientación del ORF) el ADNc de la TK1 de maíz, 1  $\mu$ g del plásmido pGEM-TK22 se digirió con 1 unidad de cada una de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, durante 2 horas a 37°C. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) y se purificaron por GENECLAN para clonarse en el plásmido de expresión pGEX (Pharmacia). Para confirmar que el plásmido se hubiera clonado en pGEX, se realizó una digestión con *EcoRI* y *BamHI* con las mismas condiciones descritas.

### **d. Clonación del ADNc de la TK1 en pGEX**

El ADNc de la TK1 de maíz (clona  $\delta$ 42) clonado en el plásmido pGEM se liberó por restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. De la misma forma se trató el plásmido pGEX (500 ng) para linearizarlo con sus extremos cohesivos. El inserto y el plásmido se separaron por electroforesis en geles de agarosa, a partir del cual se purificó el inserto de 612 pb por GENECLAN. Para la reacción de ligación en pGEX, se emplearon las mismas condiciones descritas para la ligación en pGEM (50 ng de ADN de inserto, relación 3:1 con el vector).

### **e. Transformación de células competentes por electroporación**

La electroporación con voltajes elevados es un método de transformación con una mayor eficiencia en comparación con el método del choque térmico. Las eficiencias de transformación reportadas son superiores a las  $10^9$  transformantes por microgramo de ADN.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se mezcló 1  $\mu$ L de ADN plasmídico (500 ng) con 100  $\mu$ L de células competentes *E. coli* BL21-RIL. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo antes de adicionar 100  $\mu$ L de amortiguador TE. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación

---

---

fría, que a su vez se colocó en la cámara de electroporación Cell-Porator (Gibco BRL). Se aplicó un pulso de corriente con una capacitancia de 60  $\mu$ F y un voltaje de 400 V. El control de resistencia de la fuente de poder se ajustó a 200 ohms. Inmediatamente después del pulso, se adicionó 1 mL de medio SOC y la mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf para incubarla por 1 hora a 37°C con agitación. La muestra se sembró en cajas Petri con medio LB, IPTG, X-Gal y ampicilina (100  $\mu$ g/mL) lo que permitió la selección fenotípica de colonias de color blanco.

La transformación se comprobó por digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y corrimiento en un gel de agarosa.

#### **f. Sobre-expresión de la proteína recombinante GST-TK22**

Una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de las células transformadas con el plásmido de expresión, se inoculó en 3-3.5 mL de caldo Luria con ampicilina 50-100  $\mu$ g/mL y se incubó a 30°C toda la noche, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Se adicionó entonces un volumen de IPTG 100 mM para una concentración final de 0.25 mM, y el cultivo se incubó por 2 horas más. El cultivo se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó en una microfuga (Sorvall MC12 FA-MICRO) a máxima velocidad por 15 segundos. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en 300  $\mu$ L de PBS 1 $\times$  frío.

Para la sobre-expresión a mayor escala de la proteína recombinante GST-TK22, la colonia aislada o la asada de células transformadas se inoculó en 3.5 mL de caldo Luria con ampicilina a una concentración de 50  $\mu$ g/mL, y se incubó a 30°C toda la noche. Al día siguiente, 160  $\mu$ L del cultivo se transfirieron a un matraz de 500 mL con 125 mL de caldo Luria con ampicilina a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. El caldo se incubó a 30°C por 5 horas, o hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm. Durante la incubación se tomaron muestras para monitorear la densidad óptica. La sobreexpresión se indujo adicionando el volumen de una solución de IPTG 100 mM necesario para obtener una concentración final de 0.25 mM. El cultivo se continuó incubando por 2 horas, al término de las cuales se centrifugó (centrífuga Jouan MR1814) por 10 minutos a 7600  $\times$  g. Cuando no se sonicó el paquete celular de inmediato, se almacenó a -70°C.

#### **g. Purificación de la proteína recombinante GST-TK22**

El paquete celular que se trató con IPTG se resuspendió en 8 mL de amortiguador PBS 1 $\times$  pH 7.3 y se centrifugó por 10 minutos a 2600  $\times$  g (centrífuga Jouan MR1814). El sobrenadante se decantó y el paquete se resuspendió en 8 mL de amortiguador PBS 1 $\times$  suplementado con 1

---

---

tableta de cóctel de inhibidores de proteasas (80 mg; Complete™ Boehringer-Mannheim). La suspensión se sonicó con un sonicador de punta a 15 kHz por diferentes periodos en el rango de 30 segundos a 15 minutos; la sonicación se realizó en periodos de 30 segundos con por lo menos 30 segundos de reposo en hielo hasta completar el tiempo elegido.

Al sonicado se le adicionó un volumen del detergente Tritón X-100 que resultara en una concentración final de 1% (v/v) y se incubó con agitación suave durante 15 minutos, tras los cuales se centrifugó a  $17700 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga Jouan MR1814). La centrifugación se repitió, sin decantar el sobrenadante, hasta que éste adquirió una apariencia transparente. Al sobrenadante se le adicionó 125  $\mu\text{L}$  de resina de glutatión-sefarosa 4B al 50% (p/v) y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora con agitación suave.

Para la lisis con lisozima, antes de la sonicación las células se resuspendieron en 8.9 mL de PBS 1 $\times$ , se les adicionaron 0.08 g de lisozima y una tableta de inhibidores de proteasas, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Para preparar 1 mL de resina de glutatión-sefarosa, se agitó el frasco de resina para resuspender la matriz, y 1.33 mL de resina se transfirieron a un tubo Falcon® de 15 mL. La resina se centrifugó a  $2600 \times g$  por 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Sorvall RT 6000D) y se eliminó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. La resina se lavó 6 veces con 10 mL de PBS 1 $\times$  pH 7.3, centrifugándola a  $2600 \times g$  por 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en cada ocasión. Finalmente, la resina se resuspendió en 1 mL de PBS 1 $\times$ .

Después de incubar la resina con el lisado celular, se centrifugó a  $1910 \times g$  por 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el sobrenadante y la resina se lavó 5 veces con 1 mL de PBS 1 $\times$  pH 7.3, agitándola suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente. En cada lavado se centrifugó por 3 minutos a  $1910 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . La resina se lavó 3 veces con 1 mL de Tris 50 mM pH 8, agitándola suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente. En cada lavado se centrifugó a  $2600 \times g$  por 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La proteína recombinante se eluyó con 200  $\mu\text{L}$  de una solución de glutatión reducido 15 mM disuelto en Tris 50 mM pH 8, con agitación suave por 15 minutos. La resina se separó por centrifugación a  $2600 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante que contenía la proteína recombinante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, y la resina se lavó 2 veces más con la solución de glutatión reducido. En cada ocasión, los lavados se juntaron con el primero.

---

---

## 7. Técnicas generales de proteínas (Ausubel *et al.*, 1992; Sambrook *et al.*, 1989)

### a. Extracción de proteínas de los ápices de embriones de maíz

El protocolo de extracción de proteínas a partir de meristemos de maíz se basa en el descrito por Nájera-Martínez (2000). Este protocolo se utilizó con el fin de inmunodetectar a la TK1 por ensayos de Western blot y determinar su actividad enzimática.

Para la extracción de proteínas se partió de 30 embriones de maíz germinados en cajas Petri con medio MS por distintos periodos de tiempo. Los ápices se cortaron con una navaja y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  previo a la extracción de proteínas.

Una vez que se tuvo todo el tejido de una misma muestra, se colocó en un mortero y se congeló con  $\text{N}_2$  líquido para pulverizarlo. Se añadieron 1.5 mL de amortiguador de homogenización (Apéndice A) y el homogenado se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad. El homogenado se dejó reposar durante 30 a 60 minutos en hielo.

Los homogenados se centrifugaron a  $16\ 200 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga Jouan MR 1812. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL cuidando de no tomar la capa superficial de lípidos.

### b. Cuantificación de la cantidad de proteína en los extractos

La determinación de la cantidad de proteína se realizó de acuerdo a Bradford *et al.* (1976). De cada muestra se preparó una dilución 1:600, mezclando 2.5  $\mu\text{L}$  de extracto proteico, 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.) y 1.3 mL de agua desionizada. La absorbancia de la dilución se determinó a 595 nm contra un blanco que contenía 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, 798.33  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 1.67  $\mu\text{L}$  de amortiguador de homogenización.

La cantidad de proteína se calculó interpolando los valores de absorbancia de las muestras en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de concentraciones de 3 hasta 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La solución estándar de albúmina sérica bovina se preparó disolviendo 3 mg en 1 mL de agua desionizada.

### c. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes (SDS-PAGE)

La mezcla de proteínas se resolvió en geles de poliacrilamida al 12%. Para 4 mL de gel apilador se mezclaron 1 mL de amortiguador (Tris-HCl 0.14 M, TEMED 0.11% (v/v) y SDS 0.11% (v/v), pH 6.7-6.9 [Gibco BRL]), 532  $\mu\text{L}$  de acrilamida-bisacrilamida (30%:0.938% [p/v]), 100  $\mu\text{L}$  de

---

---

persulfato de amonio al 10% (p/v), 4  $\mu$ L de TEMED y 2.36 mL de agua desionizada. Para 10 mL de gel separador se mezclaron 2.5 mL de amortiguador (Tris-HCl 1.5 M, SDS 0.4% [p/v], pH 8.8), 4 mL de acrilamida-bisacrilamida (30%:0.938% [p/v]), 100  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% (p/v), 4  $\mu$ L de TEMED y 3.4 mL de agua desionizada.

De cada muestra de extracto de proteínas se cargó en el gel un volumen equivalente a 10  $\mu$ g de proteína total, mezclado con un volumen de amortiguador de carga equivalente al 50% del extracto proteico. El gel se corrió en una cámara de electroforesis Mini-V 8•10 Vertical Gel Electrophoresis System (Gibco BRL) a 89 V durante 3.5 horas con 800 mL de amortiguador de electrodos 0.5 $\times$ . La tinción de las proteínas se llevó a cabo con la solución SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). El gel se enjuagó con aproximadamente 100 mL de agua desionizada por 5 minutos; posteriormente se adicionaron aproximadamente 20 mL de la solución de tinción y éste se mantuvo en agitación por 1 hora a T.A. Por último, el gel teñido se lavó con 100 mL de agua desionizada toda la noche con agitación a T.A.

## **8. Técnicas generales de ácidos nucleicos (Sambrook *et al.*, 1989)**

### **a. Construcción de un banco de ADNc de ejes embrionarios de maíz**

#### *Extracción de ARN total*

Para la construcción del banco de ADNc se extrajo ARNm de ejes embrionarios de maíz de la raza Chalqueño germinados durante 6, 24, 48 y 72 horas en medio MS. La elección de tiempos tempranos se basa en resultados previos de Northern blot según los cuales la expresión del gen de la TK1 aumenta a las 12 horas de la germinación de ejes embrionarios y embriones de maíz. Al elegir tiempos tempranos de germinación, aumenta la probabilidad de que el ARNm de la TK1 se encuentre representado dentro de la población de transcritos a ser clonados en los vectores del banco.

Para la extracción de ARN total a partir de ejes embrionarios se utilizó el reactivo TRIzol® (GIBCO BRL) siguiendo el protocolo del fabricante modificado para tejidos vegetales (Sanjuan-Badillo, 1997). Se congelaron 100-150 mg de material vegetal con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero al cual se le adicionó 1 mL de TRIzol® y 10  $\mu$ L de dietilpirocarbonato (DEPC). Después de homogenizar la mezcla, ésta se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.

La suspensión homogenizada se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 minutos, transcurridos los cuales, se centrifugó a  $12000 \times g$  por 10 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga Jouan MR1812. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se le adicionaron  $200 \mu\text{L}$  de una mezcla cloroformo-álcool isoamílico 24:1 (v/v). Las muestras se agitaron manualmente durante 15 segundos y se centrifugaron a  $12\ 000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf, se le agregaron  $500 \mu\text{L}$  de isopropanol helado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a  $12\ 000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se eliminó por decantación y el botón de ARN se resuspendió en 1 mL de etanol al 70-75% helado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por agitación manual. La suspensión se centrifugó a  $3400 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante se eliminó completamente por decantación y aspiración; el botón se dejó secar al mechero por 4 minutos. Para el ARN de ejes embrionarios, el botón se disolvió en  $100 \mu\text{L}$  de agua desionizada tratada con DEPC (Apéndice A). Para facilitar la disolución del botón, la muestra se incubó en hielo durante 15 minutos antes de almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Purificación y análisis del ARN mensajero*

Para la extracción del ARNm se utilizó el kit PolyAtract® mRNA Isolation System (Promega). Este sistema utiliza una sonda de oligo(dT) biotinilado que forma un híbrido con la secuencia 3' poli(A) que caracteriza a los ARNm. Las moléculas híbridas se aíslan gracias a la capacidad de la biotina para interactuar con la estreptavidina, que a su vez está unida a partículas paramagnéticas (*StraptAvidin-ParaMagnetic Particles*, SA-PMPs), lo que permite separar al ARNm de otras especies de ARNs más abundantes.

Para la hibridación sonda-ARNm se mezclaron 1-5 mg de ARN total y agua desionizada tratada con DEPC c.b.p. 2.43 mL. La mezcla se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos en un heat block, transcurridos los cuales se adicionaron  $10 \mu\text{L}$  de la sonda oligo(dT) biotinilada y 60 mL de SSC  $20\times$ . La mezcla se incubó a T.A. por 30 minutos (o hasta que alcanzara la T.A.).

La mezcla de hibridación se adicionó al tubo que contiene las partículas SA-PMPs (que previamente han sido lavadas tres veces con SSC  $0.5\times$  y resuspendidas en 0.5 mL de SSC  $0.5\times$ ), y la mezcla se incubó a T.A. por 10 minutos. Cada 1-2 minutos se mezcló suavemente por inversión. El tubo se colocó en el soporte magnético que contiene el imán (Magnetic Stand) para capturar las partículas en una de las paredes del tubo, y entonces se decantó el sobrenadante. Las partículas con el ARNm se lavaron cuatro veces con SSC  $0.1\times$  (1.5 mL por



lavado) y se resuspendieron en 1.0 mL de agua-DEPC para eluir el ARNm; las partículas se separaron del ARNm con ayuda del soporte magnético.

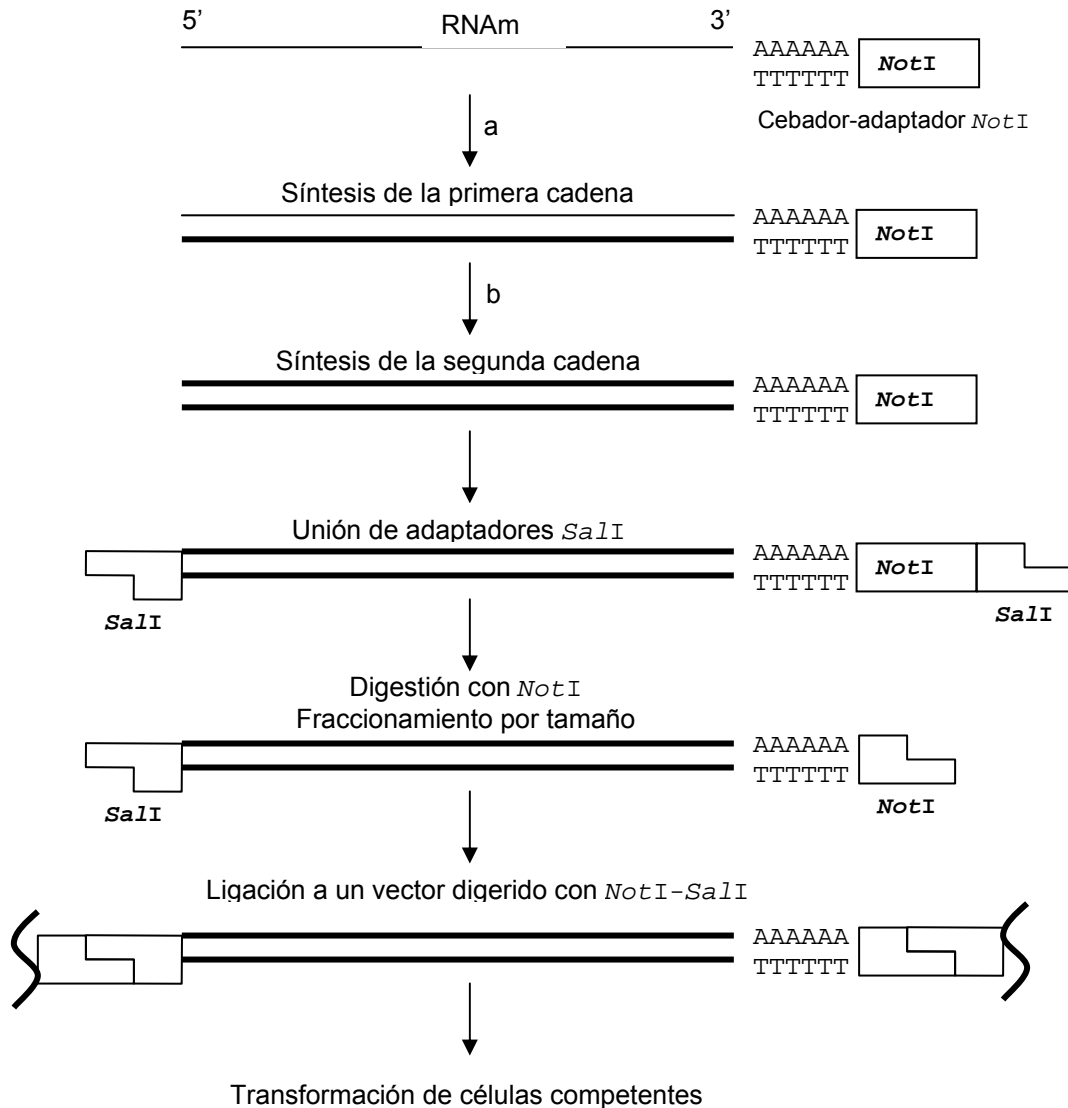
La concentración y pureza del ARNm aislado se evaluó por espectrofotometría a 260 y 280 nm. El ARN puro tiene un cociente  $A_{260}/A_{280}$  mayor o igual a 2.0. Para calcular la cantidad de ARNm se consideró que una solución de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARNm tiene una absorbancia de 1.00 a 260 nm. La integridad del ARNm se evaluó por electroforesis horizontal nativa en gel de agarosa (1.2%) con tinción de bromuro de etidio.

#### *Síntesis del ADNc y clonación en el vector pSPORT1*

Para la síntesis del ADNc obtenido a partir del ARNm se utilizó el kit SUPERScript™ Plasmid System with GATEWAY™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen). La síntesis y clonación del ADNc se esquematiza en la Figura 11.

Para evitar que ADNc incompletos sean clonados en el banco, la población de ADNc se fracciona por tamaño para eliminar los ADNc menores a 500 pb. Para el fraccionamiento se utilizaron columnas de exclusión en gel. Los ADNc seleccionados se ligan en el plásmido pSPORT 1, con el cual se transforman células de *E. coli* (Promega).

Para la ligación del ADNc en el vector pSPORT1 se preparó la siguiente mezcla: 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador para ADN ligasa T4 5 $\times$ , 1  $\mu\text{L}$  de vector digerido con *NotI* y *SalI*, 10 ng de ADNc ( $\geq 0.7$  ng/ $\mu\text{L}$ ), agua-DEPC c.b.p. 19  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de ADN ligasa T4. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 4°C para posteriormente transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los productos de la ligación.



**Figura 11.** Construcción de un banco de ADNc con el sistema SuperScript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen). La síntesis de la primera cadena del ADNc (a) se realizó con la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV). La síntesis de la segunda cadena de ADN (b) se llevó a cabo por *nick translational replacement* del ARNm, con las enzimas ADN polimerasa I, ARNasa H y ADN ligasa de *E. coli*. La ADN polimerasa T4 deja los extremos romos. Para la clonación direccional del ADNc la secuencia del cebador-adaptador (5'-pGACTAGT TCTAGA TCGCGA GCGGCCGC CC (T)<sub>15</sub>-3') utilizado para la síntesis de la primera cadena incluye un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *NotI* (subrayado). Después de la digestión con *NotI*, el ADNc posee en sus extremos un sitio de corte para cada una de las enzimas, lo que facilita su clonación direccional.

## b. Otras técnicas

### *Preparación de células competentes de E. coli (Inoue et al., 1990)*

Una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa de *E. coli* (DH5 $\alpha$ , BL21 o BL21-RIL) se inoculó en 10 mL de caldo Luria (LB) en un matraz de 125 mL y se incubó toda la noche con agitación (250 rpm) a 37°C. A partir del cultivo líquido, se transfirieron 2 mL a 200 mL de caldo LB en un matraz de 1 L que se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) hasta que la densidad óptica alcanzó un valor de 0.375 a 590 nm. El cultivo se repartió en cuatro tubos Falcon® de 50 mL estériles que se mantuvieron en hielo durante 5-10 minutos antes de centrifugarlos a 945  $\times$  g a 4°C durante 7 minutos (centrífuga Jouan MR 1812).

Cada botón celular se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> (Apéndice A) fría y se centrifugó a 945  $\times$  g a 4°C por 5 minutos. Los botones resultantes se resuspendieron en 10 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> fría, se juntaron en un mismo tubo Falcon® y se dejaron reposar a 4°C durante 30 minutos, para después centrifugarlos a 945  $\times$  g a 4°C por 7 minutos. Por último, el botón celular se resuspendió en 2.5 mL de solución de CaCl<sub>2</sub> fría y se repartió en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70°C.

### *Purificación de ADN a partir de geles de agarosa*

El ADN plasmídico digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* o *EcoRI*/*BamHI* se corrió en un gel de agarosa al 1.5% preparado con amortiguador TAE 1 $\times$ . La banda correspondiente al inserto (612 pb) se cortó y depositó en un tubo Eppendorf previamente pesado. Por diferencia de peso se calculó el peso del gel cortado y la equivalencia en microlitros (0.1 g equivalen a 100  $\mu$ L). La purificación del ADN se llevó a cabo con el kit GENECLEAN III (BIO 101). Al gel que contenía el ADN se le adicionaron 2 a 3 volúmenes de NaI y el tubo se colocó en un baño maría a una temperatura de 55°C durante 5 minutos, con el fin de disolver el gel de agarosa. Concluida la incubación, se adicionaron 5  $\mu$ L de la resina GLASS-MILK que une fuertemente al ADN, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos agitando el tubo cada minuto. Después de centrifugar la mezcla a máxima velocidad por 5 segundos (centrífuga Sorvall MC12 FA-MICRO), se eliminó el sobrenadante por decantación y se realizaron 3 lavados con 700  $\mu$ L de NEW-WASH helado (-20°C). Una vez completados los lavados, se permitió que el sobrenadante remanente se evaporara completamente, se adicionaron 15  $\mu$ L de agua desionizada estéril y se incubó el tubo a 50°C por 3 minutos. Por último, el ADN se centrifugó a

---

---

máxima velocidad por 30 segundos, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril.

#### *Preparación de ADN plasmídico*

Con una punta de micropipeta estéril se tomaron las colonias de células de *E. coli* transformantes y se sembraron en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 3 mL de caldo Luria (LB) suplementado con 3  $\mu$ L de una solución stock de ampicilina (100 mg/mL). El tubo se incubó con agitación (150-200 rpm) a 37°C durante un periodo de 8 horas; para la preparación del ADN se tomaron 1.5 mL del cultivo líquido que se centrifugaron 20 segundos a máxima velocidad en una microfuga Sorvall MC12 (rotor FA-MICRO). El sobrenadante se eliminó por aspiración, cuidando de no tocar el botón celular, que a su vez fue resuspendido en 200  $\mu$ L de amortiguador GTE frío (4°C), e incubado 5 minutos a temperatura ambiente. Para la lisis de las células, se adicionó un volumen de 300  $\mu$ L de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 300  $\mu$ L de acetato de potasio 3 M (pH 4.8) frío (4°C) y se incubó en hielo durante 5 minutos con el fin de precipitar el ADN cromosomal y carbohidratos de la pared celular. La suspensión se centrifugó por 10 minutos a temperatura ambiente en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se le adicionaron 5  $\mu$ L de ribonucleasa A (ARNasa 10 mg/mL), y el tubo se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para eliminar proteínas se realizó una extracción con 400  $\mu$ L de una mezcla de fenol-cloroformo 1:1 (v/v). La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se realizó una segunda extracción con 400  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v) que extrajo los lípidos y el fenol que se hubiese mezclado en la fase acuosa. Ésta se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se adicionaron 700  $\mu$ L de isopropanol helado (-20°C) para precipitar el ADN plasmídico, que se concentró por centrifugación a máxima velocidad a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración, el botón se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% helado (-20 °C) y se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente a máxima velocidad. El sobrenadante se eliminó por decantación y se dejó el tubo abierto para evaporar el disolvente restante. Finalmente, el botón se disolvió en 15  $\mu$ L de agua desionizada estéril. El ADN preparado de esta forma se utilizó para digestión con el fin de liberar el ADN clonado en el plásmido.

---

---

### *Secuenciación del ADN plasmídico*

Para secuenciar el ADN plasmídico, se realizó un paso adicional de purificación. El botón de ADN se disolvió en 32  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, se adicionaron 8  $\mu\text{L}$  de NaCl 4 M y 32  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol al 13% (p/v). El ADN se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para después centrifugarlo a máxima velocidad y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (Centrífuga Sorvall MC12, FAMICRO). El sobrenadante se eliminó por aspiración y el botón de ADN se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% helado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ); se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El botón se secó y se disolvió en 20  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril. La concentración del ADN plasmídico se determinó espectrofotométricamente en celdas de cuarzo a 260 y 280 nm.

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

### *Transformación de células competentes por choque térmico*

Se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de la solución de reacción de ligación con 50  $\mu\text{L}$  de células competentes y se incubaron durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se incubaron a  $42^{\circ}\text{C}$ , por 45-50 segundos y se colocaron en hielo por dos minutos. Se añadieron 950  $\mu\text{L}$  de medio SOC a temperatura ambiente y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1.5 horas con una agitación de 150 rpm en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker. Una vez concluida la incubación se plaquearon 100  $\mu\text{L}$  en dos cajas de LB/ ampicilina/ IPTG/ x-Gal (Apéndice A). Las cajas se incubaron 24-36 horas y se seleccionaron las colonias de color blanco, que son las que contienen el plásmido con el inserto. Para comprobar la transformación, se extrajo el plásmido, se digirió y se separó en un gel de agarosa.

Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , con agitación de 200 rpm durante 14-16 horas. Se tomaron 350  $\mu\text{L}$  del cultivo y se le añadieron 150  $\mu\text{L}$  de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril (la concentración final de glicerol fue de 15%).

---

---

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

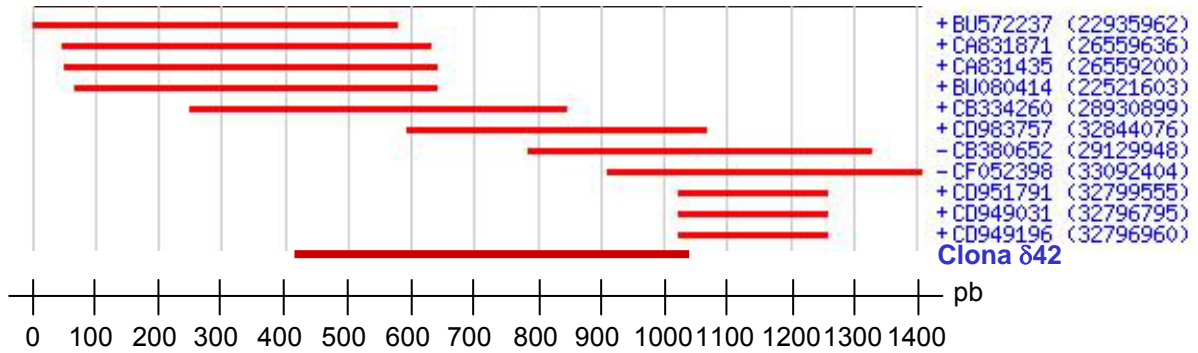
### 1. Búsqueda y aislamiento de una clona de la TK1 de maíz en un banco de ADNc

Con el fin de completar la secuencia de ADNc parcial de la clona  $\delta 42$ , se construyó un banco de ADNc a partir de ARNm de ejes embrionarios de maíz de la raza Chalqueño embebidos por diferentes periodos, según se describe en *Materiales y Métodos*. El rendimiento de la síntesis de la primera cadena de ADN fue de 18-19% lo que resultó óptimo pues, de acuerdo con el manual experimental, se puede lograr una eficiencia de síntesis hasta del 20%. El título del banco después de la transformación de células de *E. coli* fue de  $4.35 \times 10^5$  ufc/ $\mu$ g de ADN.

A pesar de múltiples intentos por aislar el ADNc completo de la TK1 de maíz mediante estrategias de PCR con cebadores complementarios tanto al ADNc de la TK1 como al vector del banco (pSPORT1), resultó imposible amplificar específicamente alguna clona de ADNc que correspondiera a la TK1. Esto sugiere que existen bajos niveles del transcrito en los tejidos de los estadios de germinación muestreados.

### 2. Análisis del ADNc completo de la TK1 de maíz obtenido de un banco de secuencias EST y su comparación con el ADNc de la clona $\delta 42$

Dado que la secuencia de ADNc incluida en la clona  $\delta 42$  carecía tanto de un marco abierto de lectura completo como de los extremos no traducidos 5' y 3' UTR, se realizó una búsqueda de una secuencia EST (secuencias de ARNm expresadas en tejidos *in vivo* y convertidas a ADNc) de la TK1 de maíz en la Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB, <http://www.maizegdb.org/>). Se encontraron 11 secuencias parciales EST que mostraron regiones de traslape para el ensamblaje de un ADNc de 1404 pb correspondiente a esta enzima (ZMtuc03-08-11.12975), y que se muestra en la Figura 12:



**Figura 12.** Ensamblaje de la secuencia EST de la TK1 de maíz ZMtuc03-08-11.12975 a partir de 11 secuencias contiguas. En la derecha de la figura se incluyen los nombres de cada una de estas secuencias parciales. La longitud de la secuencia es de 1404 pb y la clona  $\delta 42$  se ubica entre las posiciones 414 y 1030.

La secuencia de nucleótidos de la secuencia ZMtuc03-08-11.12975 se comparó con otras secuencias en el banco de datos GenBank usando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), e indicó como los principales alineamientos significativos la TK1 de arroz ( $e^{-103}$ ), de jitomate ( $1e^{-11}$ ), de *Arabidopsis thaliana* ( $9e^{-10}$ ), de *Lotus corniculatus* ( $5e^{-08}$ ) y de *Hevea brasiliensis* ( $3e^{-06}$ ).

Las secuencias de las regiones 5' y 3' del ARNm se analizaron con el programa desarrollado por Bengert & Dandekar (2003), y disponible en <http://wb2x01.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>. Este programa predice que la región 5' no traducida (UTR) abarca desde la posición 1 hasta la 212, con un marco abierto de lectura a partir de las posiciones 213 (posición del primer codón de inicio) hasta la 1052 que codificaría para un péptido de 279 aminoácidos. En el extremo 3' no traducido no se encontró señal de poliadenilación canónica AATAAA, pero sí algunas secuencias relacionadas que podrían funcionar como señales de poliadenilación (AATA, TAAA; Joshi, 1987; Rothnie, 1996). Para plantas, esto no es necesariamente cierto puesto que secuencias relacionadas de únicamente 4 nucleótidos provenientes de la secuencia canónica son suficientes para mediar la poliadenilación. Asimismo, dentro de la secuencia se identificaron 5 sitios posibles de unión para proteínas Sm o snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) empezando en las posiciones 752, 806, 1125, 1227 y 1245 (Figura 13), No se encontró ninguna secuencia ARE (AU-rich element; secuencia de ~50 nucleótidos en el 3' UTR necesaria para la desadenilación y posterior degradación del ARNm; su secuencia consenso es AUUUA repetido varias veces), pero sí una secuencia rica en los ribonucleótidos A y U en el 3' UTR, que semeja a un ARE parcial. Estos resultados sugieren la posible función como mensajero de ZMtuc03-08-11.12975.

```

1      cggcacgacaaaaacauugcccaauccaaaucuccauucccuccacucccaaaaauuucga
61     acuccgaauucgaagcuaucaugugcgcgagcgcucacccuacccacguugacuagaagaacc
121    guccgacuucacuucccauuuuugccuccaaaaaaaucaaaaauuuauucgacccccgcc
181    gccaucccguccgcccuacaaaucgccagcAUGCGCUCCAUGUUCGCCACUAGGUCGC
241    UUCUCGCCCGUGCCGCCUCCGCCCCACCUGCCUCCGCGCCAGCGCUUUCUCAUCGCGUU
301    CGCUGCUCUCUCUCUGCCUUUCCUCGGGGUCGUGCUGCCAGAAAUAUGCUUGGCGCGG
361    CGAGGUCGAUCUCUUCGGCCGCCCGUCGCGAGUCGGAGGCCGUGCGGCUAUGGAGGUCC
421    GGGCGGCUCAGUCCGGCGAGAUCCAUGUCAUCGUGGGCCCAUGUUCGCCGGCAAGACCA
481    CCGCGCUCUCCGCCCGGGUCCAGGCCGAGGCCGGCAACGGGAGGAGCGUGGCACUAAUAA
541    AGUCCGACAAAGACAACCGCUAUGGAUUGGAUUCUGUUGACUCAUGACGGUACAAAGA
601    UGGCGUGCUGGGCCUUGUCAGAACUGUCAAGUUUCAUGACAAAUAAGGAAUAGAGGCCU
661    AUAAUAAGGUAGAUGUUAUAGGUAUCAUGAGGCCCAAUUCUUCGACGAUCUUUAUGAUU
721    UCUGCUGCAAAGCUGCAGAUUGGAUUGGAAAAUUGUAGUUGUUGCUGGCCUAGAUGGUG
781    ACUACAAACGGAGAAAGUUCGGUUCAAUUCUUGAUUAUUGUUCUUCUGGCUGACUCGGUCA
841    CCAAGCUAACAGCACGCUGUGAGCUAUGUGGUCGCCGGGCGUUCUACACUGAGGAAGA
901    CGCAGGAAACCAAGACUGAACUAAUUGGAGGAGCAGAUUGUUAUUGCCUGUGUCAGGC
961    AGCACUACAUGGAUGGGCAGAUUGUUAUUGAGGCCACAAGGAUUGUUGGACCUUGACA
1021  GAUCCACCGUGACGGCGAAAGCCUUGAAAUAGgcc[aaualccugacuucugcaugcagauu
1081  ugcaguguguaacg[auuuuuuu]ugaugacauugguugcugucgaguguuagaagacgcac
1141  accaguuggugaaaagcuguuggccuugagauugcugccaccagcgaggggaagccaaauga
1201  guugaucccacaagaucugugagaaguuug[ua[aa]ua]ucuaacaguuuuugguuuaaa
1261  augcggacauguaucgcuuuucuaugcaauuggcauugcauuuuuuuuuaagcaaucag
1321  augcuuggaauucagcuguacgaauuuguaaccacaaaggaauugcauucaguuuugaagu
1381  aaacuaaggcuauccucauugc

```

**Figura 13.** Secuencia de nucleótidos de la clona EST de la TK1 de maíz ZMtuc03-08-11.12975. En mayúsculas se indica el marco abierto de lectura; en minúsculas los extremos no traducidos; en negritas, los codones de inicio y término. Subrayadas se indican las secuencias potenciales de unión a snRNPs. En el recuadro gris se encierra la secuencia rica en AU. En el recuadro negro se indica la región de la secuencia EST que corresponde a la clona  $\delta 42$ . En los recuadros se indican las secuencias de tetranucleótidos que probablemente sean señales de poliadenilación.

La secuencia de nucleótidos de ZMtuc03-08-11.12975 se tradujo a la secuencia de aminoácidos utilizando el programa Clustal W 1.82 (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) y que se muestra en la Figura 14.



```

1  cggcagacaaaaacattgccaatccaaatctccattccctccactcccaaaatttcgaac
-----
63  tccgaatcgaagctatcatgtgcgagcgctcacctaccccacgcttgactagaagaaccgt
-----
123 ccgacttcaacttcccaattttgctccaaaaattcaaatattattcgaccccgcgcg
-----
183 catcccgtccgcccatacaaatcccgccagcatgcgctccatggtcgccactaggtcgctt
1  -----M R S M F A T R S L
243 ctgcgcgtgccgcctccgccccaccgctcctccgcgcccagcgctttcccactcgcgctcg
11  L A A A A S A P T V L R A S A F P S R S
303 ctgctcctctctctgcctttccctcggggtcgtgctgccagaaatatgcttggcgcggg
31  L L L S L P F P R G R A A R N M L G A A
363 aggtcgatctctcggccgccccgctcgcgagtcggaggccgtgcccgtatggaggtccgg
51  R S I S S A A P S R V G G R A A M E V R
423 gcggtcagtcggcgagatccatgtcatcgtgggccccatggtcgccggcaagaccacc
71  A A Q S G E I H V I V G P M F A G K T T
483 gcgctcctccgcccgggtccaggccgaggccggcaacgggaggagcgtggcactaataaag
91  A L L R R V Q A E A G N G R S V A L I K
543 tccgacaaagacaaccgctatggattggattctgttgtgactcatgacggtacaaagatg
111 S D K D N R Y G L D S V V T H D G T K M
603 gcggtgctgggccttgtcagaactgtcaagttttcatgacaaattaggaaatgaggcctat
131 A C W A L S E L S S F H D K L G N E A Y
663 aataaggtagatggtataggtatcgatgaggcccaattcttcgacgatctttatgatttc
151 N K V D V I G I D E A Q F F D D L Y D F
723 tgctgcaaagctgcagatcgtgatggaaaaattgtagttggtgctggcctagatggtgac
171 C C K A A D R D G K I V V V A G L D G D
783 tacaaacggagaaagtccggttcaattcttgatattggtcctctggctgactcggtcacc
191 Y K R R K F G S I L D I V P L A D S V T
843 aagctaacagcagcgtgtgagctatgtggtcgcggggcgcttccttacactgaggaagacg
211 K L T A R C E L C G R R A F L T L R K T
903 caggaaaccaagactgaactaattggaggagcagatgtgtatatgcctgtgtgcaggcag
231 Q E T K T E L I G G A D V Y M P V C R Q
963 cactacatggatggcagattggtattgaggccacaaggattgtggtggaccttgacaga
251 H Y M D G Q I V I E A T R I V L D L D R
1023 tccaccgtgacggcgaaagccttgaaataggccaataacctgacttctgcatgcagatttg
271 S T V T A K A L K - -----
1083 cagtgtgtaacgatttatttatgatgacattgggttgctgtcgagtgttgaagacgcacac
-----
1143 cagttggtgaaaagctggtggccttgagatgctgccaccagcaggggaagccaaatgagt
-----
1203 tgatcccacaaagtactggtgagaagtttgtaaatatctaacagtggttgggtttaaaat
-----
1263 gcgacatgtatcgcttttcttatgcaattggcattgtcatttttattaagcaatcagat
-----
1323 gcttggaatcagctgtacgaatttgtaccacaaaggaattgcattcaagtttgaaagtaa
-----
1383 actaaggctatctccatcatgc
-----

```

**Figura 14.** Traducción de la secuencia de ADN ZMtuc03-08-11.12975. En negro se muestra la secuencia de aminoácidos. En los recuadros en negro se indican los sitios canónicos de unión ATP,  $Mg^{2+}$  y timidina respectivamente.

La secuencia de ZMtuc03-08-11.12975 codifica para una proteína con un peso molecular teórico de 30.2 kDa y un pl teórico de 9.44 ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html/](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html/)).

El extremo amino terminal de la proteína es rico en aminoácidos hidroxilados, lo cual es consistente con secuencias de tránsito al cloroplasto. El análisis de la secuencia traducida con los programas ChloroP 1.1 (Nielsen *et al.*, 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) y TargetP 1.1 (Emanuelsson, *et al.*, 2000; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), diseñados para identificar posibles secuencias de tránsito al cloroplasto, predijo como tal a los primeros 70 aminoácidos del ORF de la secuencia ZMtuc03-08-11.12975 (Figura 15) y un corte en la arginina 70.

Sin considerar el péptido de tránsito al cloroplasto en el análisis de la secuencia, tanto el tamaño molecular como el pI disminuyen a 22.9 kDa y 7.08 respectivamente. Estos últimos parámetros son semejantes a los obtenidos para la traducción obtenida a partir de la clona  $\delta 42$ , que posee un tamaño molecular teórico de 22.4 kDa y un pI de 6.49.

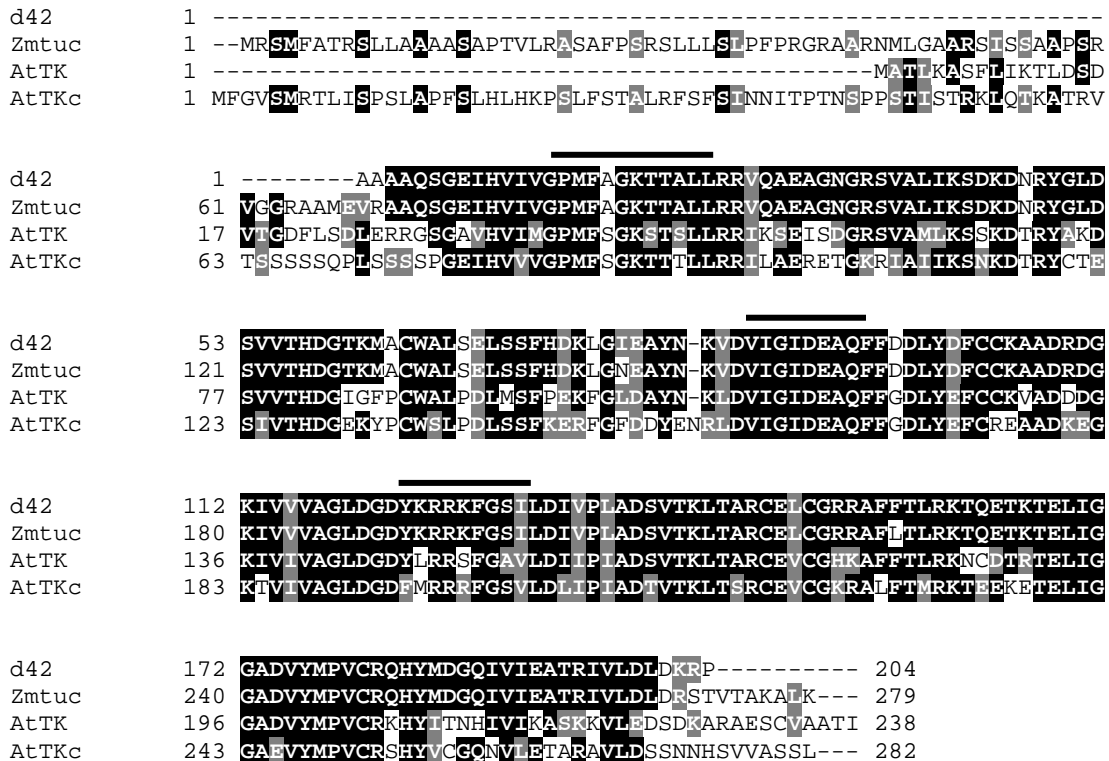
La comparación por BLAST proteína-proteína de la secuencia de aminoácidos traducida a partir de ZMtuc03-08-11.12975 arrojó los mismos resultados que el alineamiento a nivel de nucleótidos en lo referente a la homología con secuencias ya reportadas, es decir, alineamientos significativos con la TK1 de arroz ( $e-103$ ), de jitomate ( $1e-11$ ), de *A. thaliana* ( $9e-10$ ), de *L. corniculatus* ( $5e-08$ ) y de *H. brasiliensis* ( $3e-06$ ).

### **3. Búsqueda del ADNc de la TK1 de *A. thaliana* y comparación con la TK1 de maíz**

En la base de datos del genoma de *A. thaliana* The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) se encontraron dos secuencias potenciales de genes de TK1: la primera (AtTK) en el cromosoma 3 (AT3G07800.1) y la segunda (AtTKc) en el cromosoma 5 (AT5G23070.1). Esta última tiene una posible secuencia de tránsito al cloroplasto en su extremo amino. El tamaño molecular y el punto isoeléctrico teóricos de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la TK1 de Arabidopsis son 26 kDa y 6.52 para la primera, y 26.4 kDa y 6.88 (sin incluir el péptido de tránsito al cloroplasto) para la TK1 cloroplástica. La comparación de ambas secuencias con la clona  $\delta 42$  y ZMtuc03-08-11.12975 corroboró que son proteínas que muestran una alta identidad (Tabla 3):

**Tabla 3.** Porcentajes de identidad a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre las secuencias de ADNc de la TK1 de maíz y de *A. thaliana* (todas las comparaciones se realizaron sin incluir péptidos de tránsito).

Secuencias	Identidad (%) Nucleótidos	Identidad (%) Aminoácidos
δ42 vs. ZMtuc	96	96
δ42 vs. AtTK	65	66
δ42 vs. AtTKc	62	62
ZMtuc vs. AtTK	63	64
ZMtuc vs. AtTKc	60	60
AtTK vs. AtTKc	52	53



**Figura 15.** Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la TK1 de maíz y de *A. thaliana*. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W (1.82). δ42, clona δ42; Zmtuc, ZMtuc03-08-11.12975, AtTK, TK1 de *A. thaliana*; AtTKc, TK1 cloroplástica de *A. thaliana*. Las barras indican las secuencias de unión a ATP, Mg<sup>2+</sup> y timidina respectivamente. Según el programa ChloroP, los primeros 70 aminoácidos de la secuencia ZMtuc03-08-11.12975 corresponde a un péptido de tránsito al cloroplasto. Los primeros 44 aminoácidos de la secuencia de AtTKc corresponden a una posible secuencia de tránsito al cloroplasto.

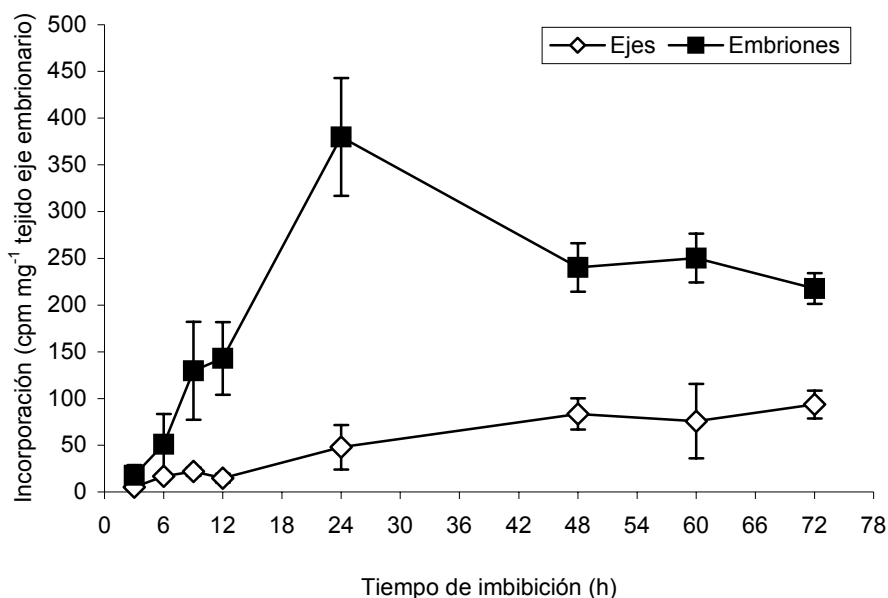
La comparación de la secuencia de la clona δ42 con la secuencia EST de maíz y las TK1 identificadas en *A. thaliana* confirman la identidad de δ42 como una TK1 (Figura 15). Existe un elevado porcentaje de identidad entre las secuencias de maíz y las de Arabidopsis, aunque entre δ42 y ZMtuc03-08-11.12975 no existe un 100% de identidad. La traducción de las cuatro

secuencias de nucleótidos exhibe los dominios típicos de unión a ATP,  $Mg^{2+}$  y timidina de las TKs tipo 1 identificadas y caracterizadas hasta el momento.

#### 4. Síntesis de ADN en ejes embrionarios y embriones durante la germinación medida por incorporación de [ $^3H$ ]-timidina

Aunque la cuantificación de la [ $^3H$ ]-Thd incorporada al ADN ha demostrado ser un marcador preciso del inicio de la fase S en la germinación de ejes embrionarios de maíz, su aplicabilidad en el caso de embriones no había sido demostrada. Por tal motivo, el objetivo de este ensayo era comprobar la incorporación de [ $^3H$ ]-Thd en el ADN de embriones, lo que demostraría el paso del nucleótido a través del escutelo hasta llegar al eje embrionario.

Para la realización del ensayo, 30 ejes o embriones de maíz se embebieron por diferentes periodos en medio MS en presencia de 100  $\mu$ L de [metil- $^3H$ ]-timidina 48.0 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech). A partir de los embriones germinados, se separaron los ejes de sus correspondientes escutelos, de manera que la [ $^3H$ ]-Thd alojada –pero no incorporada al ADN– en el tejido del escutelo no influyera en la determinación, y se cuantificó la radiactividad asociada al ADN precipitado con ácido tricloroacético (Figura 16).

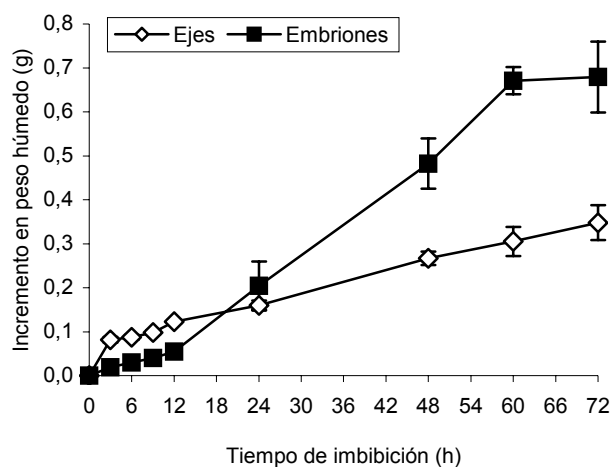


**Figura 16.** Incorporación de [ $^3H$ ]-Thd en el ADN de ejes embrionarios aislados de embriones de maíz *antes* de la incubación con timidina ( $\diamond$ ) y en ejes embrionarios aislados de embriones de maíz *después* de la incubación con timidina ( $\blacksquare$ ). Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados confirman que la [ $^3\text{H}$ ]-Thd atraviesa el escutelo y llega al eje embrionario, donde se incorpora al ADN. Asimismo, a lo largo de la germinación la magnitud de la radiactividad en los ejes embrionarios ( $\diamond$ ) es significativamente menor a la radiactividad de los ejes extraídos de embriones después de la imbibición ( $\blacksquare$ ). Este hecho indica que, a pesar de la barrera que representa el cotiledón o escutelo, la reservas lipídicas que éste contiene y los azúcares transportados al eje embrionario desde este tejido constituyen un aporte energético que aumentan el vigor del eje embrionario, lo que se refleja en la síntesis de ADN.

A pesar de las diferencias en magnitud, se observan patrones comparables en los dos tejidos: un primer incremento discreto entre las 3 y las 6 horas, que probablemente corresponda a la síntesis de ADN organelar y con fines reparativos (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991). Mientras que en ejes embrionarios los niveles de incorporación se mantuvieron constantes entre las 6 y las 12 horas, en los embriones hubo un incremento significativo a las 9 horas, y los niveles de incorporación se mantuvieron tres horas después. Los niveles de incorporación se duplicaron en ambos tejidos a las 24 horas y esta incorporación sí corresponde a la síntesis de ADN nuclear (Baíza *et al.*, 1989). En este punto, los niveles de incorporación específica de timidina fueron 7 veces más altos en los embriones que en los ejes embrionarios, probablemente debido a que éstos constituyen un tejido más vigoroso que contendrá un mayor número de células en proliferación.

La disminución en la incorporación de la marca radiactiva después de 24 horas en los embriones embebidos se debe a un aumento en la velocidad de la toma de agua – correspondiente a la fase III de la germinación– que se refleja en el aumento rápido de su peso. Esto contrasta con los ejes, que después de 24 horas ganan peso más lentamente (Figura 17).



**Figura 17.** Toma de agua de ejes embrionarios ( $\diamond$ ) y embriones de maíz ( $\blacksquare$ ) durante la germinación. La toma de agua de los embriones se midió en los ejes embrionarios extraídos a partir de los embriones después de terminado el periodo de imbibición. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

---

---

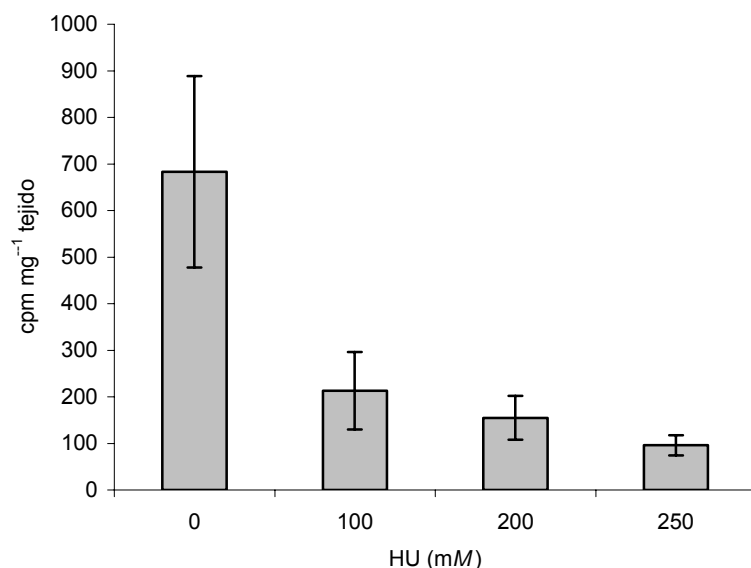
## 5. Efecto de la hidroxurea en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en embriones de maíz

Las estrategias para detener el ciclo celular pueden ser tanto de índole física como química. En sistemas vegetales, las primeras se emplean poco y sólo en cultivos celulares en suspensión, y se basan en la modificación de las condiciones de crecimiento (luz y temperatura). Los métodos químicos suelen ser más reproducibles y efectivos, y se basan en la remoción de compuestos necesarios para el crecimiento (*e.g.* carbohidratos, nitratos o fosfatos) o en la adición de compuestos cuya acción bloquea el avance del ciclo celular, *e.g.* inhibidores de la síntesis de ADN (Doležel *et al.*, 1999).

Uno de estos compuestos es la hidroxurea (HU) que inhibe reversiblemente a la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), a través de la reacción entre un radical libre nitróxido con un radical libre tirosilo ubicado en el sitio activo de la enzima. La RNR cataliza la reducción del carbono en la posición 2' del anillo de la ribosa de los cuatro ribonucleótidos para producir sus correspondientes desoxirribonucleótidos. Cuando esta actividad se inhibe, se detiene la síntesis de ADN por escasez de precursores, conduciendo ya sea a la detención del ciclo celular en G<sub>1</sub> tardía/ S temprana, o a la muerte celular en la fase S. (Chabouté *et al.*, 1998). La HU no afecta el comienzo de la replicación del ADN, pero sí evita la elongación de nuevas cadenas. La HU se ha utilizado tradicionalmente como una herramienta para sincronizar cultivos de células de mamífero y levadura (Futcher, 1999) y también hay antecedentes de su uso en sistemas vegetales (Doležel *et al.*, 1999).

El bloqueo del avance del ciclo celular por acción de la HU permitirá determinar la posible función de la vía de salvamento de nucleótidos, en la que participa la TK1. Asimismo, permitirá estudiar si la regulación de los niveles de proteína de la TK1 y su correspondiente actividad enzimática están sujetas al avance temporal del ciclo celular durante la germinación y elongación de embriones de maíz.

Con el fin de determinar la concentración de HU necesaria para inhibir la replicación del ADN en este sistema biológico, se sembraron embriones de maíz y se embebieron durante 24 horas (momento de la máxima síntesis de ADN; Figura 16) en presencia de [<sup>3</sup>H]-Thd y de diferentes concentraciones de HU.



**Figura 18.** Efecto de la HU en la síntesis de ADN durante la germinación de embriones de maíz. En cada experimento se sembraron 10 embriones, a partir de cuyos ejes se realizó la medición de la incorporación de la Thd marcada radiactivamente a las 24 horas de imbibición. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

En la Figura 18 se muestra el efecto de la HU sobre la incorporación de timidina al ADN. La HU afectó la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Thd al ADN pues se observó una reducción de 2.4, 5.2 y 7.9 veces con respecto al control, con 100, 200 y 250 mM de HU respectivamente. La disminución en la incorporación confirma que el inhibidor fue capaz de penetrar a través del escutelo y es probable que la inhibición del aporte *de novo* de desoxirribonucleótidos cause detención en la primera fase S de la germinación/elongación, indispensable para el establecimiento exitoso de la plántula.

De acuerdo con estos resultados experimentales, la concentración de HU 200 mM fue elegida para estudiar la regulación de los niveles de proteína y actividad de la TK1 durante la germinación/elongación de semillas de maíz.

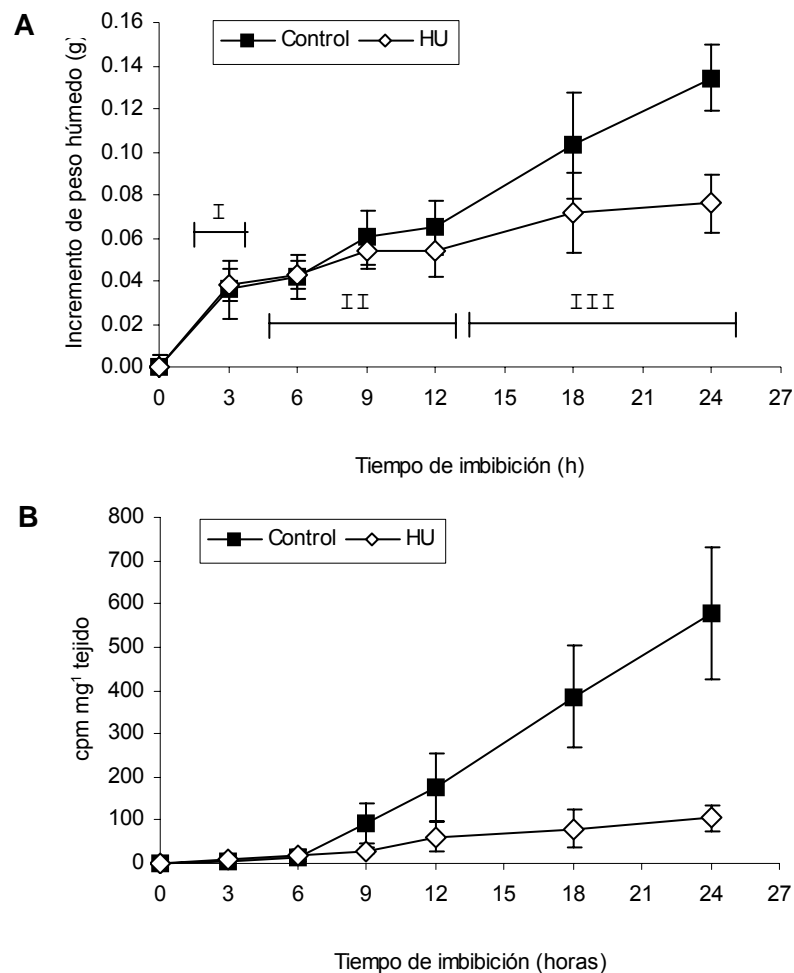
## 6. Incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN durante la germinación en presencia de HU

Una vez caracterizado el perfil de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Thd durante la germinación de embriones de maíz, se determinó este parámetro en presencia de HU 200 mM hasta las 24 horas.

La presencia de la HU causó una reducción en la toma de agua de los embriones. A las 24 horas, la HU (200 mM) inhibió el 23% la toma de agua (Figura 19A). A tiempos más cortos (3-18 horas) la toma de agua no difirió significativamente entre el control y el tratamiento. Este comportamiento concuerda con la evidencia que demuestra que el crecimiento de los ejes

durante las primeras horas de la germinación (proceso que concluye con la protrusión de la radícula) depende en gran medida de la rápida toma de agua, mientras que en tiempos posteriores depende de la división celular (Baíza *et al.*, 1989).

La incorporación de timidina al ADN se detectó entre las 6 y las 9 horas de imbibición, como ya se había observado, y se incrementó de manera importante a partir de las 12 horas. La HU claramente inhibió la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Thd desde las 9 horas, y no se observó incremento significativo a tiempos posteriores. A las 24 horas, la inhibición en la incorporación de Thd fue aproximadamente de 80%, consistente con el hecho de que el crecimiento en esta etapa depende de la proliferación celular.



**Figura 19.** Efecto de la HU en la toma de agua y en la incorporación de timidina al ADN. A. Incremento en el peso húmedo durante la germinación de embriones de maíz embebidos en ausencia y presencia de HU. La toma de agua se midió pesando los ejes extraídos a partir de los embriones germinados. Se indican las tres fases de la toma de agua, I, II y III. B. Síntesis de ADN medida como la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Thd. El contenido del nucleótido marcado se midió en el material precipitado con ácido tricloroacético (TCA) de ejes extraídos a partir de los embriones germinados.



## **7. Actividad de timidina cinasa durante la germinación**

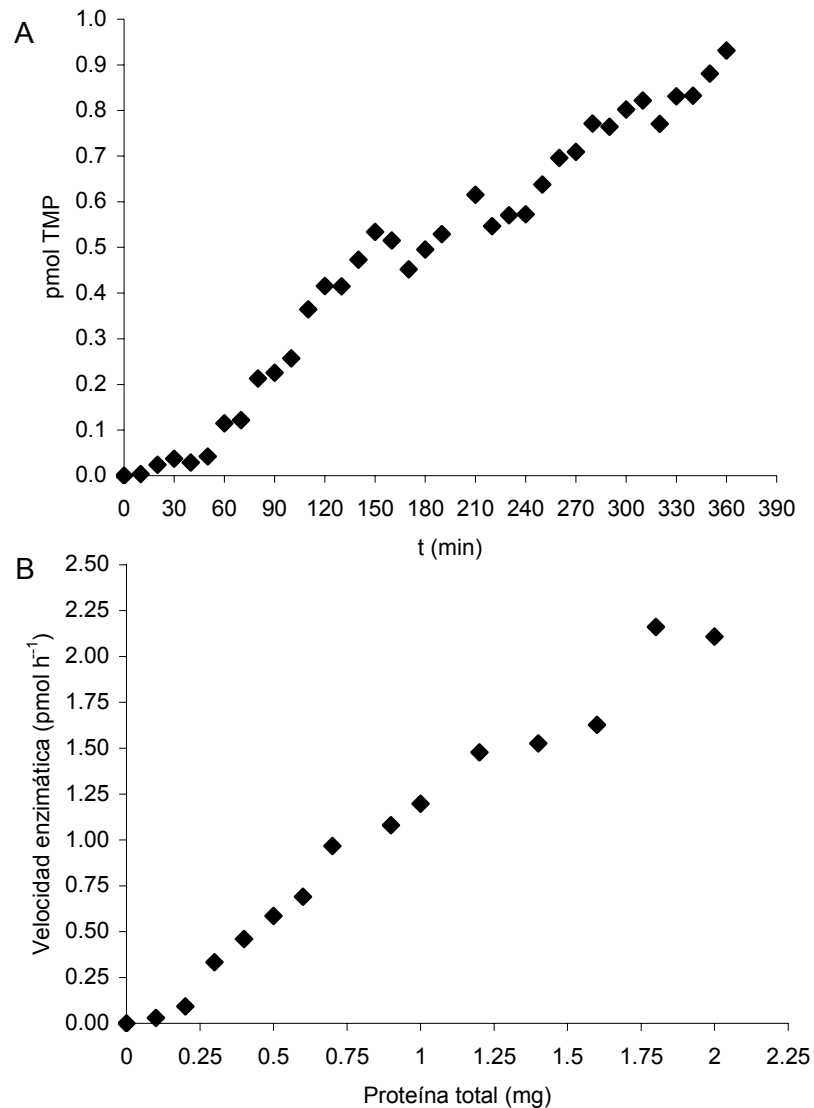
Se evaluó la actividad de la enzima durante la germinación de los embriones de maíz, usando el protocolo de Wolcott & Colacino (1989). Este método se fundamenta en la incubación del nucleósido radiactivo [<sup>3</sup>H]-Thd con el extracto proteico en presencia de ATP y la consecuente precipitación selectiva con cloruro de lantano (LaCl<sub>3</sub>) de los compuestos fosforilados. Después de lavar el precipitado se determina la cantidad de marca radiactiva por centelleo.

### **a. Condiciones para medición de la actividad de TK1 en extractos proteicos**

La linealidad de la reacción con respecto al tiempo se evaluó en un periodo de 6 horas, durante el cual se observó muy baja actividad durante los primeros 60 min y una relación lineal a partir de este tiempo (Figura 20A). Este ensayo permitió establecer un tiempo de reacción de 120 minutos que permitió detectar cuantitativamente la actividad pues se obtuvieron consistentemente valores de incorporación de marca radiactiva muy superiores al blanco.

### **b. Efecto de la concentración de enzima en la velocidad enzimática**

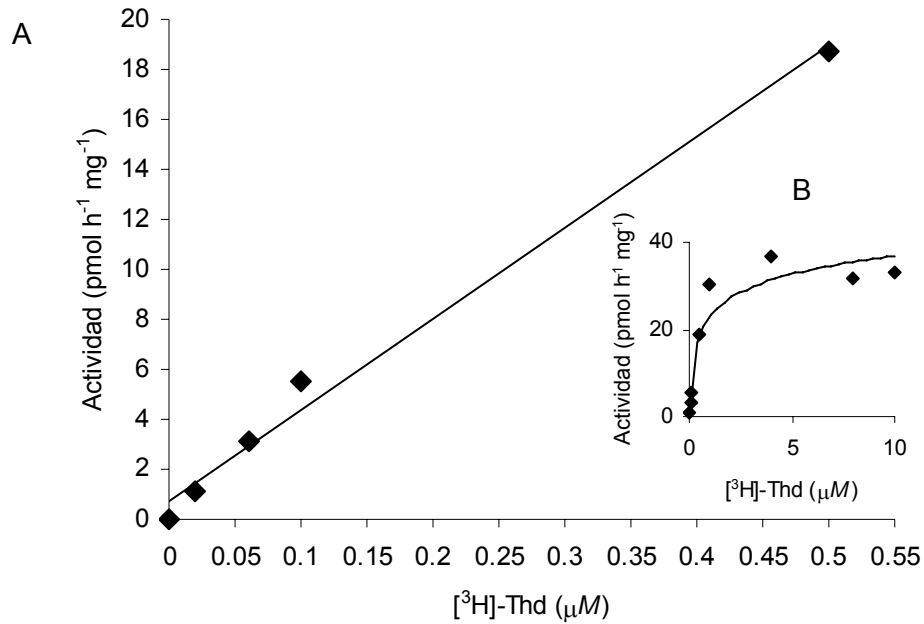
El objetivo de este ensayo es determinar la existencia de proporcionalidad entre la velocidad inicial y la cantidad de proteína presente en el extracto proteico, para lo cual se midió la velocidad a diferentes concentraciones de proteína. En la Figura 20B se muestra que hubo muy baja actividad cuando se probaron cantidades menores a 250 µg de proteína. Sin embargo se pudo detectar actividad apreciable a partir de 300 µg de extracto proteico y se observó a partir de este punto una relación lineal entre la velocidad y la cantidad de proteína. Para los ensayos subsiguientes se utilizaron 500 µg de proteína total, pues resultó conveniente de acuerdo a la cantidad de proteína extraída de los tejidos.



**Figura 20.** Curso de reacción y efecto de la concentración de enzima. A. Curso temporal de la reacción catalizada por la TK1. Las mediciones se tomaron en intervalos de 10 minutos durante 6 horas. La concentración de [<sup>3</sup>H]-Thd en el ensayo fue 20 nM, equivalente a 1  $\mu$ Ci. La concentración de proteína total fue de 500  $\mu$ g/mL. La concentración de ATP y Mg<sup>2+</sup> es la indicada en *Materiales y Métodos*. B. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática. La concentración de [<sup>3</sup>H]-Thd en el ensayo fue 20 nM, equivalente a 1  $\mu$ Ci. El tiempo de reacción fue de 2 horas. La concentración de ATP y Mg<sup>2+</sup> es la indicada en *Materiales y Métodos*.

### c. Efecto de la concentración de [<sup>3</sup>H]-Thd sobre la velocidad de la reacción enzimática

Para determinar el efecto de la concentración de sustrato en el ensayo de actividad se hicieron diluciones de la solución stock de [<sup>3</sup>H]-Thd en la mezcla de reacción y se determinó la actividad con un extracto proteico (500  $\mu$ g) de 12 horas de germinación (Figura 21).



**Figura 21.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la reacción enzimática. La cantidad de proteína en el ensayo fue de 500 μg. El tiempo de incubación fue de 2 horas. La máxima concentración de [<sup>3</sup>H]-Thd que se puede alcanzar con la solución adquirida al proveedor es de 2.0 μM. Para las concentraciones 4, 8 y 10 μM se completó con 2, 6 y 8 μL de una solución 1 mM de timidina no marcada radiactivamente.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 21, se observó que a bajas concentraciones de timidina, la actividad fue proporcional a la concentración de sustrato (0.025—0.5 μM; Figura 21A, Tabla 4) pero a partir de 2.0 μM de timidina total no se observó un incremento sustancial en la actividad enzimática (Figura 21B, recuadro). La concentración de timidina total elegida fue de 2.0 μM, para los ensayos subsiguientes.

#### d. Efecto de la dilución isotópica de [<sup>3</sup>H]-Thd

Con el propósito de aprovechar al máximo la [<sup>3</sup>H]-Thd disponible, se realizaron diluciones isotópicas con Thd sin marca para determinar la relación óptima de [<sup>3</sup>H]-Thd/Thd cuando se utiliza 2 μM de Thd total como sustrato (Tablas 4 y 5):

**Tabla 4.** Actividad de la TK1 de maíz con diferentes concentraciones del sustrato marcado radiactivamente. La actividad está expresada tanto en  $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína como en porcentajes relativos.

Concentración [ $^3\text{H}^*$ ]-Thd ( $\mu\text{M}$ )	2.00	1.60	0.80	0.20	0.02
Actividad ( $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$25.56 \pm 5.22$	$21.94 \pm 2.09$	$15.53 \pm 0.28$	$5.83 \pm 1.20$	$1.05 \pm 0.38$
Actividad (%)	$100.0 \pm 20.4$	$85.8 \pm 8.2$	$60.7 \pm 1.1$	$22.8 \pm 4.7$	$4.1 \pm 1.5$

**Tabla 5.** Efecto de la dilución isotópica sobre la actividad de la TK1 de maíz cuando se adiciona a la mezcla de reacción timidina no marcada. La actividad se expresa tanto en  $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína como en porcentajes relativos. La concentración total de timidina (marcada + no marcada) es en todos los casos  $2 \mu\text{M}$ .

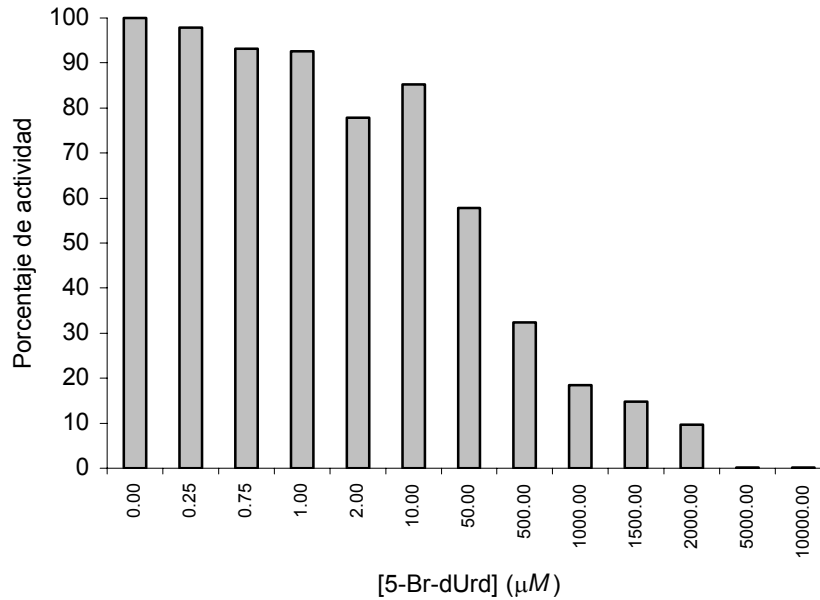
Relación [ $^3\text{H}^*$ ]-Thd : Thd	4 : 1	1 : 1.5	1 : 90	1 : 990
Concentración [ $^3\text{H}^*$ ]-Thd ( $\mu\text{M}$ )	1.60	0.80	0.20	0.02
Concentración Thd ( $\mu\text{M}$ )	0.40	1.20	1.80	1.98
Actividad ( $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$22.85 \pm 1.35$	$11.89 \pm 0.67$	$3.01 \pm 0.39$	$0.33 \pm 0.01$
Actividad (%)	$89.4 \pm 5.3$	$46.5 \pm 2.6$	$11.8 \pm 1.5$	$1.3 \pm 0.04$

A pesar de la presencia de Thd no marcada, en todos los casos fue posible detectar la actividad enzimática. Para los ensayos sucesivos se eligió una relación [ $^3\text{H}$ ]-Thd/Thd = 1 : 1.66, es decir, de  $0.75 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thd por  $1.25 \mu\text{M}$  de Thd ( $37.5 \mu\text{L}$  de [ $^3\text{H}$ ]-Thd y  $1.25 \mu\text{L}$  de Thd  $1 \text{ mM}$ ), suficiente para saturar la enzima y al mismo tiempo minimizar el consumo del nucleósido marcado; esta relación se consideró para los cálculos de actividad.

#### e. Efecto de la concentración de 5-bromo-desoxiuridina sobre la actividad de la TK1

Un criterio adicional para caracterizar la actividad de fosforilación en los extractos de maíz como timidina cinasa, consiste en usar 5-bromo-desoxiuridina (5-Br-dUrd), un inhibidor competitivo bien caracterizado de la TK1 humana que tienen una  $K_i = 1.8 \mu\text{M}$  (Lee & Cheng, 1976).

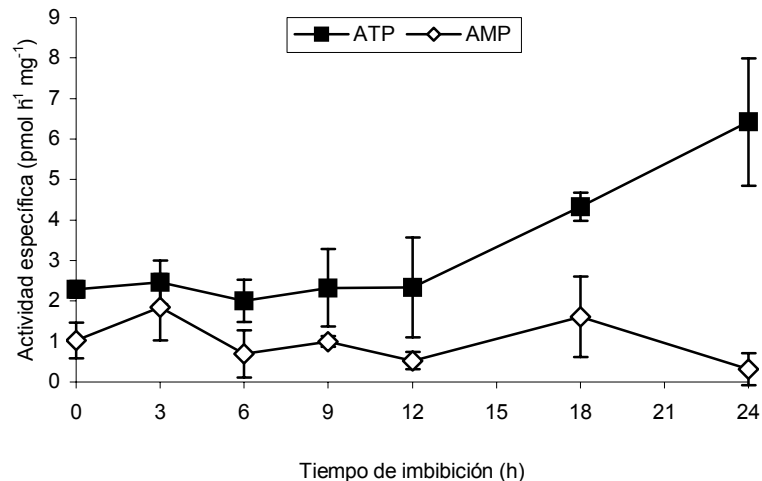
En la Figura 22 se muestra que la actividad de fosforilación fue susceptible a concentraciones crecientes del inhibidor y se encontró que a una concentración de  $50 \mu\text{M}$  se inhibió aproximadamente el 50% de la actividad de TK1 medida ( $I_{50} \approx 50 \mu\text{M}$ ); con concentraciones elevadas del inhibidor se observó un abatimiento total de la actividad fosforilante (Figura 22B).



**Figura 22.** Efecto de la concentración de 5-Br-dUrd sobre la actividad de la TK1. El ensayo se realizó como se describe en *Materiales y Métodos*, usando  $[^3H]$ -Thd ( $2.0 \mu M$ ) como sustrato.

#### f. Uso de AMP como donador de fosfato en la reacción de fosforilación

El AMP es un donador de grupos fosfato en reacciones catalizadas por nucleósido fosfotransferasas que pueden fosforilar a la timidina. Para determinar si esta actividad estaba presente en los extractos proteicos de los embriones, se sustituyó el ATP por AMP ( $10 \text{ mM}$ ) en la mezcla de reacción del ensayo enzimático y se midió la actividad de fosforilación en extractos proteicos obtenidos a partir de ápices de embriones germinados por 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas.

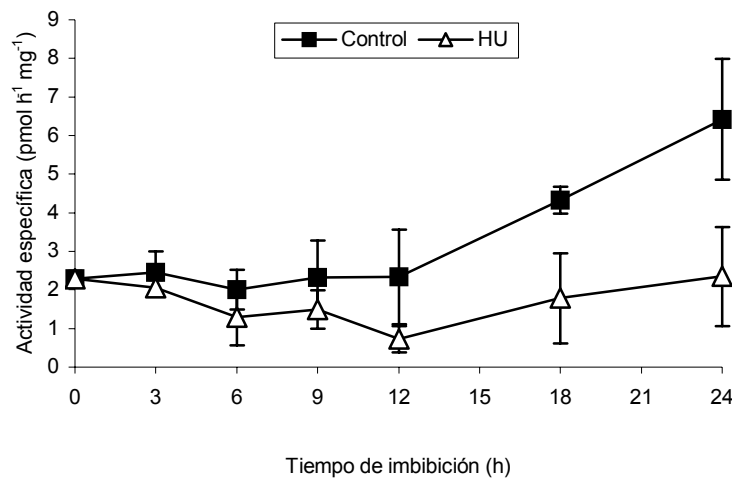


**Figura 23.** Actividad de fosforilación de timidina debida a nucleósido fosfotransferasas dependientes de AMP. La concentración de AMP o ATP en el ensayo correspondiente fue de  $10 \text{ mM}$ . Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 23, se detectó una actividad basal de nucleósido fosforilasa dependiente de AMP en los extractos de semilla seca y estos niveles de actividad se mantienen constantes durante la germinación de los embriones. Esto contrasta con la actividad de fosforilación dependiente de ATP que correspondería a la TK1 y que se incrementó durante la germinación.

#### g. Efecto de la HU sobre la actividad de la TK1 durante la germinación

Para determinar el efecto de la HU en la actividad de la TK1 se germinaron embriones de maíz hasta 24 horas en presencia de HU (200 mM) y se determinó la actividad enzimática en los extractos proteicos de ejes embrionarios de muestras colectadas a distintos tiempos de imbibición.



**Figura 24.** Efecto de la HU en la actividad de la TK1 durante la germinación. La concentración de HU en el medio de imbibición fue de 200 mM. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El efecto de la HU sobre la actividad de la TK1 no fue evidente durante las primeras horas de germinación y fue comparable a la de los embriones control. Sin embargo, mientras que en los embriones control la actividad se incrementó a partir de las 12 horas de germinación, como ya se había observado, en los embriones germinados en presencia de HU la actividad se mantuvo en los mismos niveles (Figura 24). A las 24 horas se observó una inhibición aproximada del 67%. Estos datos son consistentes con la detención del avance del ciclo celular y la biosíntesis de ADN.

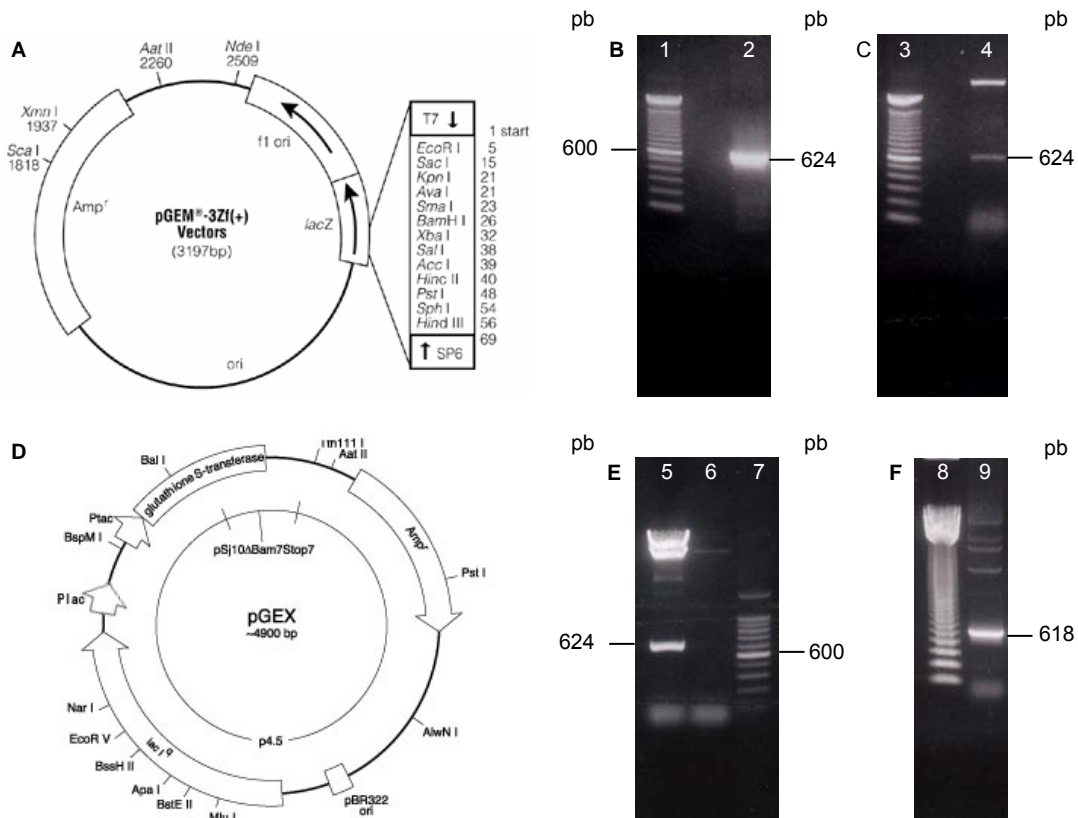
## 8. Obtención de anticuerpos anti-TK1 de maíz

### a. Amplificación del ADNc de la TK1 de maíz y clonación en un vector de expresión

Para la obtención de anticuerpos homólogos y polivalentes dirigidos en contra de la TK1 de maíz, se reamplificó por PCR toda la secuencia codificante de la clona  $\delta 42$  para clonarla en un vector de expresión. Se diseñaron dos cebadores (TKFOR2 y TKREV2) con sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI en sus extremos 5', de manera que permitieran la clonación direccional.

El producto amplificado por PCR (llamado TK22) obtenido utilizando como molde el ADNc  $\delta 42$  y los cebadores TKFOR2 y TKREV2, se clonó en un vector de la serie pGEM (Figura 25A). La clonación exitosa se comprobó liberando el inserto mediante digestión con *Eco*RI (Figura 25C) y amplificando el inserto con los cebadores TKFOR2 y TKREV2, con el plásmido pGEM-TK22 como molde (Figura 25B). Cuando el producto de la digestión y de la amplificación se resolvieron en geles de agarosa, se observó una banda correspondiente a un ADN mayor a 600 pb.

Para realizar la clonación direccional del inserto TK22, primero se extrajo la construcción pGEM-TK22 de un cultivo de células de *E. coli* y se purificó por MINIPREP a partir de un gel de agarosa. El inserto se liberó por digestión con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI, y se ligó a un plásmido de la serie pGEX (Figura 25D) que había sido digerido con las mismas enzimas de restricción. La clonación exitosa en pGEX se demostró por digestión del plásmido recombinante con *Eco*RI y *Bam*HI (Figura 25E) y amplificación con los cebadores TKFOR2 y TKREV2 (Figura 25F).



**Figura 25.** Clonación del ADNc de la TK1 de maíz en el vector pGEM y en el vector de expresión pGEX. A. Mapa de restricción del plásmido pGEM. B. Carril 1, marcador de 100 pb; carril 2, PCR con los cebadores TKFOR2 y TKREV2 del inserto TK22 clonado en pGEM. C. Carril 3, marcador de 100 pb; carril 4, digestión con *EcoRI* y *BamHI* para liberar el inserto TK22 del vector pGEM. D. Mapa de restricción del plásmido pGEX. E. Carril 5, digestión con *EcoRI* y *BamHI* para liberar el inserto TK22 del vector pGEX; carril 6, digestión con *EcoRI* y *BamHI* de un vector pGEX vacío; carril 7, marcadores de 100 pb. F. Carril 8, marcadores de 123 pb; carril 9, PCR con los cebadores TKFOR2 y TKREV2 del inserto TK22 clonado en pGEX.

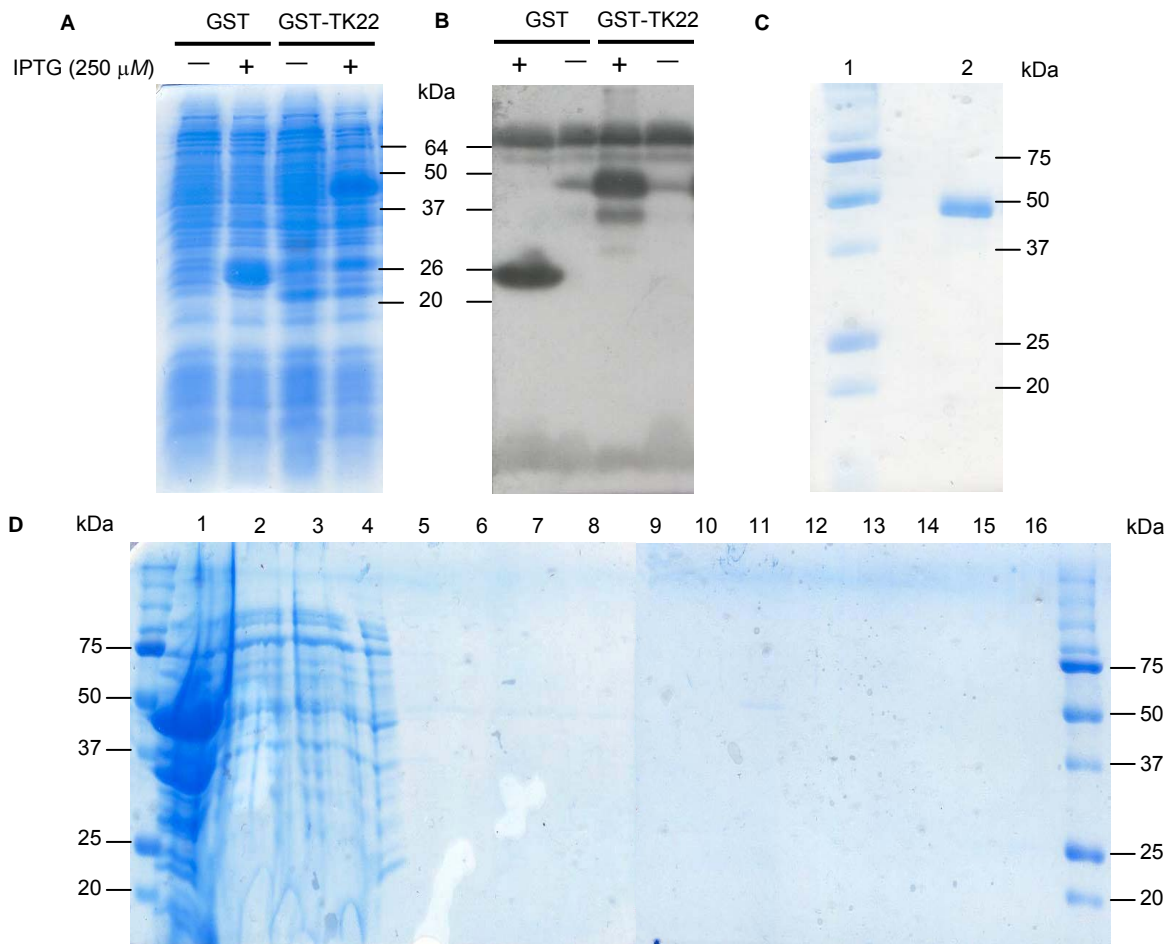
### b. Sobreexpresión de la proteína recombinante GST-TK22

La sobreexpresión de un péptido a partir de un vector pGEX produce una proteína quimérica fusionada a la proteína glutatión S-transferasa (GST; P.M. 26 kDa). El péptido de interés puede escindirse de la GST utilizando la proteasa trombina. Asimismo, la presencia de la GST permite purificarla mediante cromatografía de afinidad con glutatión unido a esferas de sefarosa. La inducción del promotor de la  $\beta$ -galactosidasa que regula la transcripción de la proteína quimérica se efectúa con isopropiltiogalactósido (IPTG), un compuesto análogo de la lactosa.

Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido GST-TK22 (Figura 26A y B) sobreexpresaron la proteína de fusión de aproximadamente 28 kDa. Sin embargo, no fue posible purificarla por cromatografía de afinidad debido a que la proteína se localizaba en cuerpos de inclusión en la bacteria. Se probaron diferentes concentraciones de IPTG, durante distintos periodos de inducción y también se intentaron otras condiciones y tiempos de



sonicación de las células, pero no se pudo solubilizar a la proteína bajo ninguna de esas condiciones (Figura 26D, carril 1). Dada la dificultad para purificar la proteína recombinante en suficiente cantidad y pureza para la inmunización de conejos, solamente se purificaron bajas cantidades de ésta por la técnica de electroelución a partir de geles SDS-PAGE (Figura 26C). La concentración aproximada de proteína recombinante obtenida por este método fue de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , y se empleó para los experimentos de competencia en la caracterización del anticuerpo.



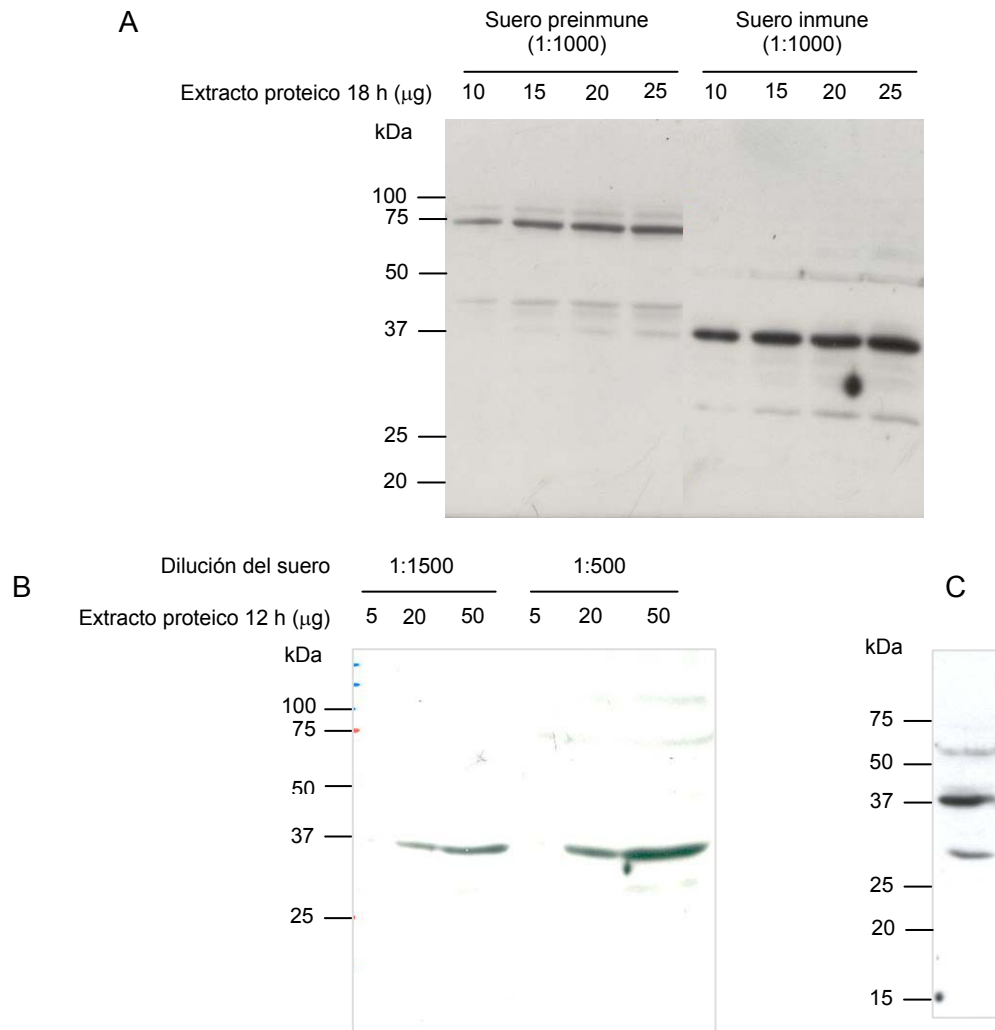
**Figura 26.** Sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante GST-TK22. A. Sobreexpresión con IPTG de la proteína GST (26 kDa) a partir de células de *E. coli* transformadas con un plásmido pGEX vacío y sobreexpresión de la proteína recombinante GST-TK22 (48 kDa). B. Inmunoblot anti-GST del SDS-PAGE de la Figura A. C. Proteína GST-TK22 purificada por electroelución. D. Purificación por cromatografía de afinidad con glutatión-sefarosa de la proteína GST-TK22: carril 1, residuos insolubles de las células de *E. coli* después de la sonicación; carril 2, sobrenadante después de la sonicación; carril 3, sobrenadante después de la adición de la resina de glutatión-sefarosa; carriles 4, 5, 6, 7 y 8, lavados de la resina con PBS 1x pH 7.3; carriles 9, 10 y 11, lavados con Tris 50 mM pH 8; carriles 12, 13, 14 y 15, elución con glutatión 15, 20, 30 y 50 mM respectivamente; carril 16, tratamiento con trombina.

**c. Diseño de un péptido inmunogénico a partir del ADNc  $\delta$ 42 de la TK1 de maíz**

La alternativa para la obtención de anticuerpos fue la síntesis química de un péptido con la secuencia de aminoácidos de la TK1 traducida a partir del ADNc  $\delta$ 42, correspondiente al sitio de unión del nucleósido timidina. Asimismo, el análisis de inmunogenicidad y del perfil hidrofóbico de la secuencia de aminoácidos (realizado con el programa disponible en <http://www.changbioscience.com/abie/abie.html/>) indicó como uno de los posibles péptidos inmunógenos la secuencia comprendida entre los aminoácidos 120 y 130 de la clona  $\delta$ 42 **DGDYKRRKFGSILD** (en negritas se indica la secuencia de unión a Thd), que además posee un carácter hidrofílico.

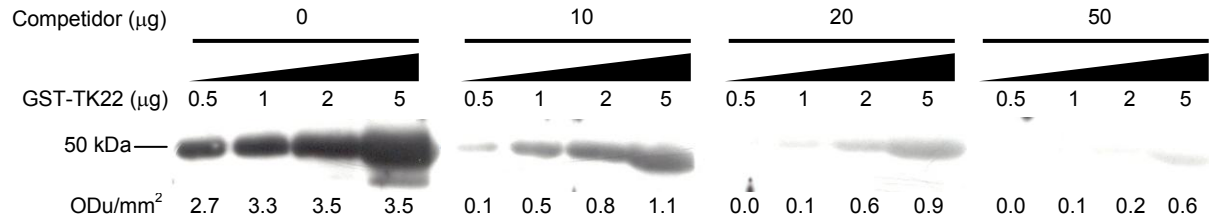
**d. Caracterización del suero anti-TK1 de maíz**

Para determinar la presencia de anticuerpos, se probaron diluciones iguales del suero preinmune y del suero inmune en un inmunoblot contra extractos proteicos de 18 horas de germinación (Figura 27C). Se observó que el suero preinmune únicamente reaccionó una proteína de alto peso molecular (~75 kDa) mientras que con el suero inmune se identificó una proteína de 37 kDa que reaccionó fuertemente, y cuya intensidad fue proporcional a la dilución del anticuerpo (Fig. 27A). Al incrementar el tiempo de exposición de la película autorradiográfica se observó la aparición de otras bandas inmunorreactivas de aproximadamente 30 y 60 kDa (Fig. 27B). Del suero inmune se precipitaron las inmunoglobulinas y esta fracción se empleó para el resto de los experimentos.



**Figura 27.** Caracterización del suero anti-TK1 por western blot (quimioluminiscencia). A. Suero preinmune versus suero anti-TK1. El tiempo de exposición de la película fue de 15 minutos. B. Titulación del suero anti-TK1 de maíz contra diferentes cantidades de proteína total de extractos de 12 horas de imbibición; se probaron diluciones 1:500 y 1:1500 del suero. C. Inmunoblot del suero anti-TK1 dilución 1:1000 contra extracto proteico (ver *Materiales y Métodos*) de 12 horas de germinación (15 µg de proteína total). La película se expuso por 20 minutos.

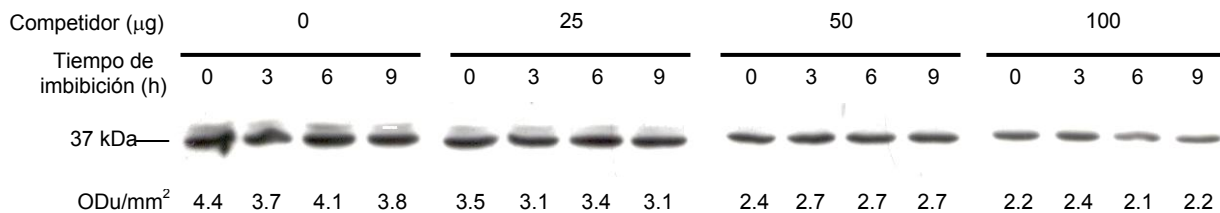
Con el objetivo de determinar la especificidad de los anticuerpos se probaron éstos por inmunoblot contra la proteína recombinante GST-TK22 (Figura 28). Se observó un reconocimiento específico de la proteína de fusión, y que este reconocimiento fue abatido cuando el anticuerpo fue preincubado primero con la proteína recombinante purificada. Cuando se probaron cantidades más altas de proteína, el reconocimiento se abatió por completo.



**Figura 28.** Reconocimiento por inmunoblot de la proteína recombinante GST-TK22 (48 kDa) con suero competido con GST-TK22. En la membrana se transfirieron diferentes cantidades de GST-TK22 aislada por electroelución. En la parte inferior de la figura se incluyen las mediciones de densidad óptica de las bandas detectadas por inmunoblot. La exposición de la película de autorradiografía fue de 5 minutos. Las imágenes fueron capturadas con un equipo Fluor-STM Multilmager (Bio-Rad), y analizadas con el programa de análisis Quantity One®.

Se desconoce porqué el tamaño molecular de la proteína de mayor inmunorreactividad es superior a los 30 kDa que predice el ADNc armado a partir de secuencias EST, y no se descarta la posibilidad de que la proteína sufra modificaciones post-traduccionales que alteren su migración en SDS-PAGE. Sin embargo, por el tamaño (~37 kDa), es muy probable que la señal detectada corresponda a un monómero de la TK1.

Se diseñó un segundo ensayo de competencia, pero ahora se inmovilizaron en la membrana 15 µg de proteína de ápices de embriones sin germinar y germinados durante 3, 6 y 9 horas. El anticuerpo se incubó con la proteína GST-TK22 (25, 50 y 100 µg) como ya se describió.



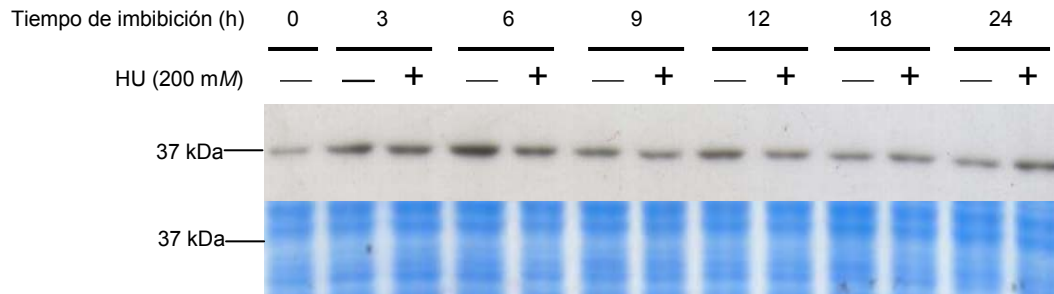
**Figura 29.** Reconocimiento por inmunoblot de la proteína TK1 de maíz en extractos de meristemos de embriones germinados con suero competido con GST-TK22. En la membrana se transfirieron 15 µg de extracto proteico de embriones germinados por los periodos de tiempo indicados. En la parte inferior de la figura se incluyen las mediciones de densidad óptica de las bandas detectadas por inmunoblot. La exposición de la película de autorradiografía fue de 25 minutos. Las imágenes fueron capturadas con un equipo Fluor-STM Multilmager (Bio-Rad), y analizadas con el programa de análisis Quantity One®.

En extractos proteicos obtenidos a partir de embriones secos o germinados, el suero anti-TK1 reconoció fuertemente una banda de aproximadamente 37 kDa que probablemente corresponde a la TK1 de maíz (Figura 29). La señal correspondiente a esta proteína disminuyó conforme se incrementó la concentración de GST-TK22 en el ensayo de competencia. El hecho

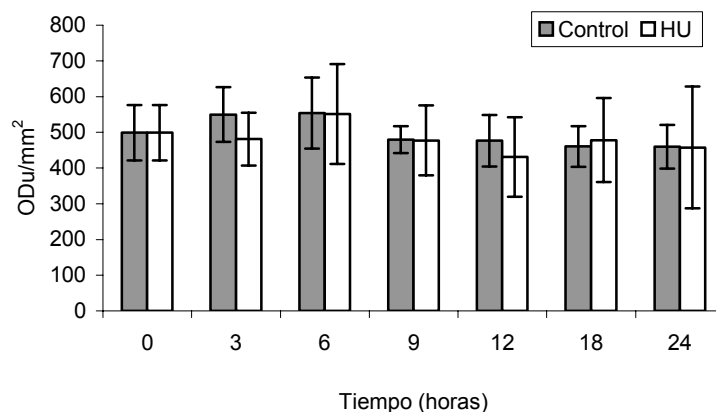
de que la señal no haya desaparecido completamente, como en el caso de la figura anterior, probablemente se deba al prolongado (25 minutos) tiempo de exposición de la autorradiografía, que fue cinco veces más largo. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la señal reconocida por los anticuerpos no corresponda a la TK1 de maíz. En este ensayo preliminar, la cantidad aparente de la proteína inmunorreactiva se mantiene constante en los cuatro diferentes tiempos de la germinación muestreados, independientemente de la cantidad de competidor.

### 9. Determinación de los niveles de la TK1 de maíz durante la germinación de embriones

Una vez establecidas las condiciones para la detección de la proteína TK1 se determinaron los niveles de ésta en los ápices de embriones germinados durante 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas, en ausencia y presencia de HU (Figura 30 y 31).



**Figura 30.** Detección de los niveles de TK1 durante la germinación de embriones de maíz en presencia de HU. Se transfirió a la membrana el equivalente a 10  $\mu\text{g}$  de proteína total y el inmunoblot se realizó con una dilución 1:1000 del suero anti-TK1. En el recuadro inferior se muestra la calibración del contenido proteico por SDS-PAGE. El tiempo de exposición de la autorradiografía fue de 6 minutos.



**Figura 31.** Análisis densitométrico del inmunoblot anti-TK1 durante la germinación, en ausencia y presencia de HU. Las imágenes fueron capturadas con un equipo Fluor-S<sup>TM</sup> Multilmager (Bio-Rad), y analizadas con el programa de análisis Quantity One®. Se muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de tres ensayos independientes.

Durante la germinación –ya sea con o sin HU en el medio–, la cantidad de TK1 en el tejido apical de los embriones parece mantenerse constante, a pesar de que la incorporación de timidina marcada radiactivamente aumenta conforme transcurre la germinación y la elongación. Asimismo, el inmunoblot demuestra la presencia de proteína en embriones secos.

---

---

## DISCUSIÓN

### 1. Análisis de la secuencia de nucleótidos de la TK1 de maíz

La clona  $\delta 42$  contiene un ADNc parcial con una alta identidad a la TK1 de plantas, mamíferos, hongos filamentosos, bacterias y virus. La traducción de la secuencia de nucleótidos de la clona  $\delta 42$  predijo un polipéptido de 204 aminoácidos con un peso molecular teórico de 22.4 kDa y un punto isoeléctrico de 6.49, que contiene los sitios consenso de unión a timidina, ATP y  $Mg^{2+}$ , característicos de la TKs tipo 1 conocidas.

Con el propósito de conocer la secuencia completa del transcrito  $\delta 42$ , se construyeron un par de bancos de ADNc a partir de ARNm extraído de embriones de maíz de la raza Chalqueño embebidos por 6, 24, 48 y 72 horas, tiempos en los cuales se había demostrado previamente la presencia del transcrito de la TK1 por Northern blot. Sin embargo, no fue posible aislar la secuencia completa del ADNc de la TK1 por técnicas de PCR con cebadores complementarios a diferentes regiones de la clona  $\delta 42$  y al sitio múltiple de clonación del vector del banco pSPORT1. Por otro lado, se aprovechó la información de las bases de datos del proyecto de secuenciación del genoma de maíz, lo que permitió analizar la secuencia probable del ADNc de la TK1 de maíz al ensamblar secuencias parciales EST (ZMtuc03-08-11.12975) que tienen una alta identidad con la secuencia de la clona  $\delta 42$ .

Aunque el análisis de las regiones no traducidas 3' y 5' no se realizó con un programa diseñado para la identificación de elementos regulatorios de transcritos de plantas, permitió la identificación de un extremo 5' UTR de 213 pb, un marco abierto de lectura de 837 pb (nucleótidos 213–1052) y un extremo 3' UTR de 352 pb (nucleótidos 1053–1404). En la región 3' UTR de ZMtuc03-08-11.12975 no se encontró la señal de poliadenilación canónica, AAUAAA, pero sí se identificaron variantes de ésta que pudieran ser funcionales (Joshi, 1987; Rothnie, 1996).

El porcentaje de identidad entre ZMtuc03-08-11.12975 y  $\delta 42$  es del 96% a nivel de nucleótidos, con nueve nucleótidos diferentes ubicados al principio y final de la secuencia  $\delta 42$ . Esta alta identidad sugiere que provienen de un par de copias polimórficas del mismo gen.

### 2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la TK1 de maíz

La traducción de la secuencia de nucleótidos de ZMtuc03-08-11.12975 predijo un péptido de 271 aminoácidos con un tamaño teórico de 30.2 kDa, en cuya secuencia se identificaron los

---

---

motivos consenso de unión a ATP, Mg<sup>2+</sup> y timidina, idénticos a los traducidos a partir de la clona  $\delta 42$ . A diferencia de esta secuencia, ZMtuc03-08-11.12975 parece tener un ORF completo. A partir de la comparación de ambas secuencias es evidente que la clona  $\delta 42$  es 75 aminoácidos más corta (68 aminoácidos menos en el extremo N-terminal y 7 aminoácidos menos en el C-terminal). El porcentaje de identidad entre las secuencias es del 96% con 7 aminoácidos diferentes en la secuencia que comparten.

Fue interesante identificar que los primeros 70 aminoácidos del extremo amino de ZMtuc03-08-11.12975 corresponden a una secuencia potencial de tránsito al cloroplasto que podría localizar a la timidina cinasa en los cloroplastos o plastidios. Aunque la longitud y la secuencia de los péptidos de tránsito (cTPs o chloroplast transit peptides) son muy variables (desde 30 hasta más de 80 residuos [von Heijne & Nishikawa, 1991]), generalmente son ricas en aminoácidos hidroxilados y tienen un bajo contenido de aminoácidos ácidos (Emanuelsson *et al.*, 1999). La comparación de los cTPs –cuyo procesamiento ha sido confirmado experimentalmente– con respecto a la secuencia de las proteínas cloroplásticas cuyo importe dirigen, demostró la abundancia relativa de los aminoácidos Ser (19% contra 6%) y Thr (9% contra 5%), así como un bajo contenido o ausencia de residuos de Asp, Glu y Tyr. Entre los primeros 10 residuos la abundancia de Pro y Gly es baja y predominan los aminoácidos sin carga; en la región central de longitud variable la Ser es abundante, y en los últimos 10 residuos la Arg es abundante y la Leu escasa. Entre las posiciones –3 y –1 con respecto al sitio de procesamiento, la abundancia de aminoácidos que favorecen giros en la estructura secundaria (Gly, Ser, Asp, Asn y Pro) es baja (von Heijne *et al.*, 1989). Los cTPs carecen tanto de secuencias como de motivos estructurales conservados, a diferencia de lo observado en los péptidos señal de secreción y de importe a la mitocondria (von Heijne *et al.*, 1989; von Heijne & Nishikawa, 1991).

El perfil de hidrofobicidad, el análisis del momento hidrofóbico, la predicción de estructura secundaria y el análisis de péptidos de estructura tridimensional conocida han sido incapaces de demostrar la presencia de estructuras secundarias conservadas en los péptidos de tránsito al cloroplasto. Este hecho sugiere que dichos péptidos forman estructuras flexibles de plegamiento al azar. Las longitudes variables y la tolerancia a deleciones e inserciones en la región central concuerdan con esta hipótesis (von Heijne & Nishikawa, 1991).

La mayoría de los péptidos de tránsito al cloroplasto carecen de secuencia consenso en el sitio de procesamiento. Sin embargo, algunos poseen el motivo (Val/Ile)-X-(Ala/Cys)↓Ala. El 72% de 32 secuencias analizadas posee un residuo hidrofóbico con una ramificación en el



---

---

carbono  $\beta$  (Ile o Val) en la posición  $-3$  o  $-2$ . Asimismo, el 45% de dichas secuencias presenta una Ala en la posición  $-1$  y/o  $+1$  (Gavel & von Heijne, 1990).

La longitud del péptido señal probable de la TK1 de maíz está acorde con las longitudes reportadas (30-80 residuos) para otros péptidos de este tipo. Según el análisis de los primeros 70 residuos de la secuencia de la TK1 de maíz, hay 11 residuos de Ser (16% de la composición del péptido señal con respecto al 5% del resto de la composición de la proteína) y solamente un residuo ácido (Glu en la posición  $-3$  con respecto al sitio de procesamiento y ningún residuo de Asp). Asimismo, dicha secuencia carece de Tyr en toda su secuencia, de Leu en las últimas 10 posiciones y en  $-3$  y  $-1$  no hay Gly, Ser, Asp, Asn, o Pro. En la posición  $-2$  existe una Val y en  $+1$  una Ala, y de los últimos 10 residuos, dos son Arg. En conjunto, estas características hacen suponer la posible función del péptido como señal para el importe de la TK1 al cloroplasto, a pesar de la ausencia del motivo que caracteriza el sitio de procesamiento de algunos péptidos. Esto colocaría a esta enzima con las enzimas de la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina, pues se ha demostrado que esta vía ocurre en los plastidios (Moffatt & Ashihara, 2002).

La comparación entre la secuencia potencial de tránsito al cloroplasto de la TK1 de maíz con las secuencias correspondientes de 32 secuencias proteínas que contienen *bona fide* cTPs demostró una muy baja identidad (Tabla 6, Apéndice B), lo que es consistente con la baja conservación a nivel de estructura primaria de este péptido de tránsito.

El procesamiento del posible péptido señal generaría una proteína madura de aproximadamente 23 kDa, que no se detectó en los inmunoblots, por lo que es indispensable comprobar experimentalmente la funcionalidad de esta secuencia y la localización subcelular de la timidina cinasa de maíz.

La estrecha interrelación regulatoria entre la vía *de novo* y la de salvamento hace viable que las enzimas de esta última ruta puedan ubicarse también en el cloroplasto o en plastidios no fotosintéticos. Aunque los embriones de maíz son tejidos no fotosintéticos se ha demostrado que hay plastidios funcionales en este tejido que son capaces de realizar intercambio de ácidos orgánicos (Lara-Núñez & Rodríguez-Sotres, 2004) y otras funciones. Además de las funciones fotosintéticas y de asimilación de carbono, los plastidios llevan a cabo la asimilación de nitrógeno inorgánico y la biosíntesis de aminoácidos, ácidos grasos, almidón, metabolitos secundarios y pigmentos. A diferencia de los cloroplastos, el metabolismo biosintético de los plastidios no fotosintéticos depende del importe tanto de fuentes de carbono como de energía desde el citosol. Los plastidios poseen todas o muchas de las enzimas que participan en la glicólisis y en la vía de las pentosas fosfato. El ATP, NADPH y los azúcares (*e.g.* ribosa fosfato)

---

---

producto de dichas rutas metabólicas son sustratos indispensables para la síntesis de nucleótidos, por lo que resulta factible que el metabolismo del plastidio sea capaz de sostener el aporte de los sustratos necesarios para la síntesis tanto *de novo* como de salvamento de nucleótidos. Los procesos biosintéticos que se llevan a cabo en los plastidios no fotosintéticos resultan especialmente relevantes en el caso de los tejidos de almacenamiento de especies como maíz (Emes & Neuhaus, 1997). Dada la ausencia de tejidos fotosintéticos durante la germinación de los embriones de maíz, es factible que los plastidios desempeñen un papel importante en la contribución de metabolitos (por ejemplo nucleótidos para la síntesis de ADN) para el crecimiento y desarrollo tempranos.

En plantas son escasos los reportes en torno a la TK1. Sin embargo, en el alga unicelular fotosintética *Acetabularia mediterranea* se ha reportado la presencia de una TK1 en cloroplasto que proviene de un gen que parece ubicarse en el cromosoma del plastidio. La actividad de la enzima se incrementa en la fase generativa del alga, caracterizada por la proliferación celular, y se debe a un aumento en la síntesis de la proteína (Bannwarth & Schweiger, 1975; Bannwarth *et al.*, 1977a y b). En este mismo organismo se ha reportado la presencia de la timidilato cinasa (TMP cinasa) y la TDP cinasa, que catalizan la fosforilación dependiente de ATP de la TMP que produce la TK1 para producir TTP. Ambas enzimas se localizan también en el cloroplasto y su actividad aumenta en la fase generativa del alga (de Groot & Schweiger, 1983).

La regulación coordinada y el rápido intercambio de nucleótidos entre diferentes compartimientos celulares ha sido demostrado en cultivos celulares de mamíferos (Pontarin *et al.*, 2003). La pozas de TTP citoplásmica y mitocondriales se hallan comunicadas entre sí, con intercambio de este nucleótido entre uno u otro compartimiento. En células con una TK1 activa, la poza de TTP mitocondrial depende en su mayoría del salvamento de nucleótidos de timina y la síntesis *de novo* que se llevan a cabo en el citoplasma. En este caso, la contribución de la TK2 mitocondrial es mínima. Por el contrario, en células sin TK1, el TTP citoplásmico proviene del aporte mitocondrial (Welin *et al.*, 2004). Aunque los estudios acerca de la interrelación entre las pozas de diferentes organelos son escasos, es posible suponer que las pozas citoplásmicas y cloroplásticas se comunican entre sí.

En las secuencias de timidina cinasa de plantas se encuentran conservados los dominios de unión a ATP,  $Mg^{2+}$  y timidina comparables con las secuencias homólogas de otros eucariontes. Sin embargo, otros motivos que se han caracterizado en esta enzima y que regulan su actividad y estabilidad no se encuentran en las secuencias de las proteínas de plantas. La Ser 13 de la TK1 de humano es blanco de fosforilación por un complejo Cdk-ciclina,

---

---

y esta modificación regula la oligomerización de un estado tetramérico activo, a uno dimérico inactivo. Este residuo está conservado en humano, rata, ratón y gallo, y parece ser exclusivo de las TKs 1 de animales, ya que está ausente de las TKs 1 virales, de bacterias, parásitos, hongos y plantas (Suzuri, 2001). Otro aminoácido que participa en la transición reversible dímero ↔ tetramero dependiente de la concentración de ATP es la Val 106 de la TK1 de humano ya que la sustitución de este residuo por Met induce la oligomerización permanente del tetramero activo (Berenstein *et al.*, 2000). El tamaño y la conformación de la valina parecen ser los factores que influyen en la actividad y la conformación de la TK1 de humano (Frederiksen *et al.*, 2004). Este residuo también está ausente en la TK1 de maíz y Arabidopsis.

La secuencia KEN necesaria para la degradación de la TK1 de humano por el APC/C, conservada en humano, gallo y ratón, está ausente en las enzimas de plantas y de virus. Hasta el momento no existen reportes acerca de la regulación post-traducciona l de la oligomerización y la degradación por el proteasoma de las TKs 1 de plantas.

La búsqueda de la secuencia de la TK1 en el genoma de Arabidopsis también identificó una TK1 de posible localización cloroplástica, así como otra secuencia que carece de ese péptido señal; ambas tienen un peso molecular semejante de aproximadamente 26 kDa.

La mayor conservación entre las secuencias de maíz y Arabidopsis se encuentra en la región central de las proteínas que incluyen los dominios de unión a timidina, ATP y  $Mg^{2+}$ . Los porcentajes de identidad semejantes tanto para  $\delta 42$  como para ZMtuc03-08-11.12975 con respecto a las TKs 1 de Arabidopsis hacen suponer que los dos ADNcs de maíz corresponden a la misma proteína. Aunque el ORF de la clona  $\delta 42$  aislada experimentalmente está incompleto, el alineamiento con ZMtuc03-08-11.12975 muestra una identidad del 96%, lo que permite suponer que codifican la misma proteína, pues las dos formas en especies como Arabidopsis muestran una identidad únicamente del 53% a nivel de aminoácidos (sin tomar en cuenta la secuencia del péptido de tránsito).

### **3. Incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN durante la germinación de embriones de maíz**

La incorporación de timidina marcada radiactivamente al ADN durante la imbibición de semillas de maíz ha sido utilizada con éxito para definir la presencia y duración de las etapas del ciclo celular (Welin *et al.*, 2004) y se ha aplicado al estudio de la progresión del ciclo celular durante la germinación. Este evento se caracteriza por un aumento súbito en la incorporación de timidina marcada al ADN, que comienza alrededor de las 12 y las 15 horas de imbibición de semillas de maíz y alcanza valores máximos a las 24 horas. Este incremento notable en la

---

---

incorporación de timidina se debe a la duplicación de los cromosomas previo a la primera división celular de las células meristemáticas del eje embrionario, y por tanto, corresponde a la fase S del ciclo celular. Previo a la síntesis del ADN cromosomal, se registra muy baja incorporación de timidina marcada hasta aproximadamente las 6 horas, cuando un ligero aumento en la incorporación sin síntesis neta de ADN se ha asociado a mecanismos de reparación del ADN dañado durante la maduración y secado de la semilla (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

En nuestros estudios de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Thd en embriones de maíz se confirmó el perfil de incorporación reportado con anterioridad (Baíza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991), pues se observó un discreto incremento en la radiactividad asociada al ADN entre las 3 y las 9 horas. Un incremento considerable en la incorporación específica se observó a partir de las 12 horas, con un máximo de incorporación a las 24 horas. Entre las 24 y las 72 horas de imbibición, se registró una disminución considerable en la incorporación medida en relación con el peso húmedo, muy probablemente debida al rápido aumento de peso de los embriones por la acelerada toma de agua y la división celular.

La presencia del escutelo de la semilla de maíz en los embriones influyó positivamente en la incorporación de timidina, que fue 6 veces mayor a las 12 horas de imbibición en comparación con los ejes embrionarios. Sin embargo, no hubo variaciones apreciables en los tiempos, lo que sugiere la programación fisiológica de estos eventos durante la germinación de ejes, embriones o semillas. El aporte de lípidos y azúcares como una fuente de energía por parte del escutelo hacia el eje embrionario puede ser responsable del aumento en la magnitud de la síntesis de ADN. La realización de los ensayos con embriones en lugar de ejes embrionarios seguramente aproxima los resultados experimentales a lo que realmente ocurre en la semilla. Este ensayo permitió constatar que el perfil de la síntesis de ADN concuerda con los reportes de la literatura y que además funciona como un marcador adecuado de la fase S del ciclo celular con el cual comparar el comportamiento de la expresión y actividad de la TK1.

#### **4. Actividad de la TK1 durante la germinación de embriones de maíz.**

Se establecieron las condiciones para determinar la actividad de la TK1 en extractos proteicos de embriones de maíz y se demostró la presencia de esta actividad saturable a concentraciones de sustrato superiores a 2  $\mu M$ . Aunque no se estimaron parámetros cinéticos, el rango de concentraciones de sustrato es comparable con el de la TK1 humana que tiene un valor de  $K_M$  igual a 2.6  $\mu M$  (Lee y Cheng, 1976). Asimismo, también se demostró que la actividad

---

---

enzimática es susceptible a la 5-bromo-desoxiuridina (5-Br-dUrd). Este compuesto, estructuralmente análogo a la timidina, inhibe competitivamente a la enzima con una alta especificidad pues tiene una  $K_i$  de  $1.8 \mu M$  (Lee & Cheng, 1976) para la enzima de humanos. En nuestros ensayos encontramos una inhibición dependiente de la concentración de 5-Br-dUrd que causó un 40% de inhibición de la actividad a una concentración de  $50 \mu M$ .

En los extractos proteicos de embriones secos se encontró una actividad específica de la TK1, que probablemente participa en la embriogénesis, y que durante las etapas tempranas de la germinación contribuye al mantenimiento y regulación de la poza de nucleótidos. La actividad detectada en tejidos secos concuerda con la presencia de la proteína en estos mismos tejidos y fortalece la hipótesis de que durante la formación, maduración y secado del embrión se almacenan proteínas en estado funcional de manera que, apenas iniciada la imbibición e independientemente del reinicio de la síntesis de proteínas, sea posible reanudar el metabolismo. La actividad de TK1 se mantuvo constante entre las 3 y las 12 horas, y probablemente también contribuya a proveer de nucleótidos a los mecanismos de reparación y duplicación del ADN organelar.

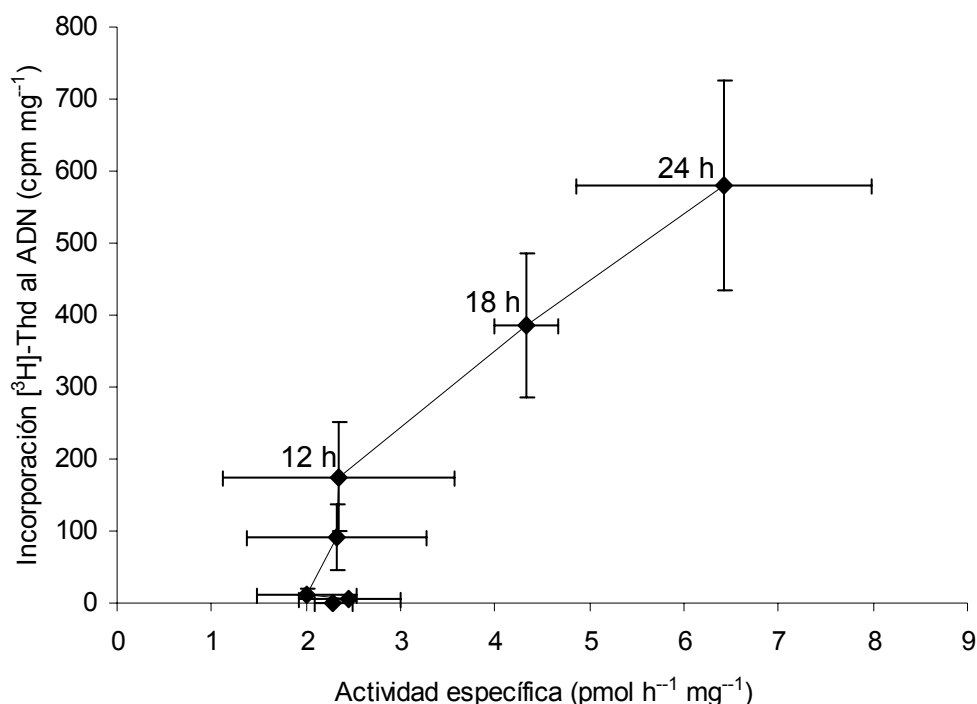
El perfil de actividad de la TK1 exhibió un aumento significativo entre las 12 y las 18 horas que concuerda con el intervalo de tiempo en el que ocurre el incremento de mayor magnitud en la síntesis de ADN medido por incorporación de [ $^3H$ ]-Thd. Es probable que el aumento en la actividad de la TK1 esté destinado a proveer nucleótidos necesarios para la duplicación del ADN nuclear indispensable para proseguir con la división celular y sin la cual no hay establecimiento de la plántula.

Durante la germinación de embriones de maíz la actividad de la TK1 exhibió un perfil que concuerda con la evidencia acumulada sobre el avance del ciclo celular durante la germinación del maíz. Entre las 12 y las 15 horas inicia la duplicación del ADN, y este intervalo de tiempo corresponde al máximo incremento en la incorporación de [ $^3H$ ]-Thd en embriones de maíz y también al máximo incremento en la actividad de la TK1. El perfil de actividad demuestra una estrecha regulación de la enzima sujeta al avance del ciclo celular.

La conversión de timidina a TMP puede llevarse a cabo por la reacción catalizada por la TK1 o por la reacción catalizada por fosfotransferasas de nucleósidos inespecíficas dependientes de nucleótidos monofosfato como fuentes de fosfato. La contribución de ambos tipos de enzimas al salvamento de timidina parece depender de la especie. A pesar de que la actividad de la TK1 se ha detectado en extractos de semillas de maíz (Georgieva *et al.*, 1994), es posible que esta actividad sea en realidad la mezcla de la cinasa específica y la fosfotransferasa inespecífica y ATP fosfohidrolasa que proporcione el AMP (Moffatt & Ashihara,

2002; Stasolla *et al.*, 2003). La actividad de la fosfotransferasa de nucleósidos también se determinó usando AMP como donador de fosfatos. Esta actividad se encontró en embriones secos pero, a diferencia de la actividad de TK1, ésta no varió durante el periodo de imbibición.

La actividad de la TK1 mostró una estrecha asociación con la incorporación de timidina al ADN a partir de las 12 h, como se muestra en la Fig. 32, lo que sugiere su participación en la biosíntesis de precursores del ADN durante la germinación de embriones de maíz.



**Figura 32.** Correlación entre la síntesis de ADN y la actividad de la TK1 durante las primeras 24 horas de imbibición de embriones de maíz. Los últimos tres puntos corresponden a 12, 18 y 24 horas de imbibición.

De acuerdo con la Figura 32, existe una correlación positiva ( $R^2 = 0.9984$ ) entre la incorporación de timidina marcada y la actividad de la TK1 a partir del momento en que ambas aumentan de manera significativa, es decir, a partir de las 12 horas. Este análisis aporta una prueba adicional a favor de la dependencia de la síntesis de ADN del aporte de nucleótidos de timidina debido al incremento en la actividad de la TK1.

## 5. Perfil de los niveles de proteína de la TK1 durante la germinación de embriones de maíz

En cultivos de células de mamífero, los niveles de transcrito, proteína y actividad enzimática de la TK1 aumentan en paralelo al momento de la transición G<sub>1</sub>/S, previo a la duplicación del ADN.

---

---

Los genes de otras proteínas involucradas en el metabolismo de nucleótidos, como la ribonucleótido reductasa (RNR) también incrementa su expresión durante  $G_1/S$ , con el consecuente aumento en la cantidad de proteína y actividad. En estudios previos (Suzuri, 2001) se determinó que la expresión del gen de la TK1 de maíz aumenta entre 6 y 7 veces entre las 0 y las 12 horas de imbibición, justo antes del inicio de la síntesis de ADN en la fase S, que ocurre entre las 12 y las 15 horas.

Con el fin de detectar los niveles de TK1 durante la germinación y determinar si se encuentran bajo una regulación dependiente del avance del ciclo celular, se preparó un suero inmune policlonal homólogo de conejo en contra de un péptido de 16 aminoácidos de la TK1 de maíz, que incluye el sitio consenso de unión a timidina. A pesar de la conservación de este motivo en las TKs 1 de todas las especies, éste es el que presenta mayor divergencia en plantas con respecto a mamíferos.

En los primeros ensayos de western blot para caracterizar el suero anti-TK1 en contra de extractos proteicos de meristemas se observó un grupo de 3 bandas; una de 37 kDa con una señal intensa de reconocimiento y un par más de 27 y 52 kDa con señales de reconocimiento más débiles. Cuando las condiciones del inmunoblot se hicieron más astringentes aumentando el tiempo de bloqueo de la membrana y disminuyendo los tiempos de exposición de la película autorradiográfica, la señal de 37 kDa mantuvo su intensidad mientras que la señal de 27 kDa disminuyó y la de 52 kDa prácticamente desapareció. Dada la intensidad de la señal de 37 kDa, es muy probable que esta proteína contenga la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido inmunogénico. Sin embargo, el peso molecular es superior a los que se predicen por la traducción de los ADNc que indican un P.M. entre 22 y 25 kDa para los monómeros de la TK1. La adición de 70 aminoácidos que correspondería al potencial péptido de tránsito, aumentaría el P.M. a 30 kDa. Los experimentos de competencia con la proteína recombinante GST-TK22 indican un epítipo común aunque no demuestran inequívocamente que esta banda inmunorreactiva corresponde a la TK1 de maíz. Cabe la posibilidad de que la señal de 37 kDa corresponda a una mezcla entre la TK1 citoplásmica y cloroplástica. Otras estrategias experimentales como inmunoprecipitación seguida de la determinación de la actividad de TK1 en el inmunoprecipitado, e inmunoréplica en geles bidimensionales contribuirían a definir este punto. Por otro lado, también es posible que la proteína tenga un corrimiento anómalo en SDS-PAGE debido a modificaciones post-traduccionales que se deben también demostrar.

Todas las proteínas cloroplásticas cuyos genes se ubican en el núcleo y que se sintetizan en el citosol en forma de precursores poseen en su extremo amino terminal una secuencia que dirige el importe al estroma o a los tilacoides según sea el caso. Una vez que la

---

---

proteína precursora se introduce en el cloroplasto, peptidasas de procesamiento del estroma (SPP o Stromal Processing Peptidase) separan a la proteína madura del péptido de tránsito. Experimentalmente se ha demostrado la actividad proteolítica de una SPP sobre los precursores de la proteína de unión a la clorofila *a/b* (LHCP o light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein) y la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) y la proteína de transporte de grupos acilo (VanderVere *et al.*, 1995). La longitud de los péptidos de tránsito varía de acuerdo con la proteína y la especie de que se trate: 45 residuos en la LHCP tipo III de cebada (Brandt *et al.*, 1992), 38 en la de chícharo (Clark *et al.*, 1991) y 34-37 en la de trigo (Clark *et al.*, 1990), 80 residuos en la Rubisco de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2006), 25 en la plastocianina de *Silene pratensis* (Basshan *et al.*, 1991), 48 en la subunidad de 33 kDa de pOE y 39 en la subunidad de 23 kDa de pOE, y 45 residuos en la ferredoxina de *S. pratensis* (Rensink *et al.*, 2000). En todos los ejemplos anteriores se ha demostrado el procesamiento *in vitro* del péptido de tránsito al cloroplasto. Una estrategia experimental para determinar si la proteína detectada es de naturaleza cloroplástica consiste en realizar un ensayo de traducción *in vitro* a partir de ADN de plastidio y la posterior inmunoprecipitación con anticuerpos homólogos anti-TK1 de maíz.

De acuerdo con los resultados del western blot anti-TK1, la proteína ya se encuentra presente en embrión seco, y siendo que la síntesis reparativa del ADN comienza en etapas tempranas de la germinación (alrededor de las 6 horas en semillas de maíz), es posible que la TK1 presente en el embrión antes de iniciada la imbibición tenga la función de proporcionar nucleótidos, por la vía de salvamento, con este fin específico. Otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y la síntesis de ADN, como Cdk-A y PCNA se han encontrado en la semilla seca también (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Los niveles de la proteína TK1 se mantuvieron constantes durante las primeras 24 horas de imbibición, comportamiento que contrasta con el reportado en varios sistemas animales (ratón, humano y hámster chino), en que se observa incrementos en los niveles de proteína durante la transición G<sub>1</sub>/S del ciclo celular (Mikulits *et al.*, 1996). Esta falta de correlación entre los niveles de proteína y actividad se ha observado en otras proteínas involucradas en la replicación del ADN durante la germinación, como la ADN polimerasa  $\alpha$  (Coello *et al.*, 1995) y PCNA (Sánchez *et al.*, 2002). También, en linfoblastos humanos la cantidad de timidilato sintasa se mantiene constante durante el ciclo celular, mientras que su actividad aumenta significativamente durante la fase S (Xu *et al.*, 1993).

Los niveles constantes de proteína en conjunto con el perfil de activación de la TK1 sugiere un mecanismo de regulación post-traducciona l de la actividad enzimática. Como se ha



---

---

demostrado para la TK1 de mamíferos, la oligomerización de la proteína es un mecanismo importante en la regulación de su actividad enzimática. La afinidad por la timidina de la estructura dimérica de la TK1 de humano es 30 veces menor en comparación con la afinidad de la estructura tetramérica. El cambio conformacional dímero ↔ tetrámero puede ocurrir ya sea por cambios en la concentración de ATP o por cambios en el estado de fosforilación de la serina 13. Durante la germinación de la semilla, se produce un aumento en el número de mitocondrias y en la eficiencia de la fosforilación oxidativa, que conducen al incremento en la formación de ATP inmediatamente después de iniciada la imbibición (Bewley & Black, 1994). El incremento en la producción de ATP y la exposición de la TK1 a éste podría favorecer la transición del dímero al tetrámero en G<sub>1</sub>/S con el consecuente aumento en la actividad enzimática. Por esto, sería interesante investigar si la TK1 de plantas es una fosfoproteína con un mecanismo regulatorio similar al de la TK1 humana y si también se oligomeriza.

También, a diferencia de animales, la transcripción del gen de la TK1 de arroz no correlaciona con la actividad del ciclo celular pues se encontraron altos niveles del ARNm en tejidos diferenciados como hoja pero no se encontraron en tejido meristemático (Ullah *et al.*, 1999). Una posible explicación de este perfil es que la TK1 participe en el aporte de nucleótidos con fines reparativos en tejidos expuestos a radiación ultravioleta (Moffatt & Ashihara, 2002).

El tiempo de vida media de la TK1 en mamíferos depende de la etapa del ciclo celular. En G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M el tiempo de vida media de la enzima es de 3 horas, debido al aumento en la degradación de la proteína promovida por la ubiquitinación, mientras que en la fase S el tiempo de vida media aumenta a 9 horas. La estabilidad prolongada de la proteína durante la etapa de duplicación del ADN ofrece otra alternativa que podría explicar el mantenimiento sin variaciones significativas de los niveles de enzima (Ke & Chang, 2004). Dados los resultados de Western blot y actividad enzimática, existe la posibilidad de que la regulación de la TK1 durante el ciclo celular sea a nivel de la actividad enzimática y no en función de la síntesis y degradación de la enzima de manera concertada con las etapas del ciclo celular, como ocurre en otros organismos.

## **6. Efecto de la HU en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina y en la actividad de la TK1 durante la imbibición de embriones de maíz**

Para obtener poblaciones celulares vegetales sincronizadas, se han empleado sistemas experimentales tales como cultivos de células en suspensión, protoplastos de mesófilo de hoja y meristemas radiculares (Doležel *et al.*, 1999). En estudios de la regulación dependiente del ciclo celular de la RNR en cultivos celulares de tabaco BY-2 se empleó la HU en una concentración

---

---

60 mM, suficiente para disminuir significativamente la síntesis de ADN sin afectar la viabilidad celular (Chabouté *et al.*, 1998). Asimismo, la HU ha sido utilizada para sincronizar meristemas radiculares *in planta* de especies como *Medicago sativa* (alfalfa), *Hordeum vulgare* (cebada), *Oryza sativa* (arroz), *Pisum sativum* (chícharo), *Triticum aestivum* (trigo), *Vicia faba* (haba), y *Zea mays* (maíz), entre otros.

Doležel *et al.* han sincronizado con éxito varias de las anteriores especies por inmersión directa de los meristemas durante 15 a 18.5 horas en soluciones de HU 1.25 a 2.5 mM. Por su parte, Górnick *et al.* (1997) demostraron, mediante citometría de flujo, que un tratamiento con HU 500 mM por 12 días bloquea por completo la división celular en el meristemo radicular de semillas de col, a pesar de registrarse la protrusión.

En embriones de maíz, HU a una concentración 200 mM, abatió casi por completo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Thd al ADN a partir de las 9 horas de imbibición. Su efecto en el crecimiento, medido por toma de agua, se observó a partir de las 18 horas de imbibición, lo que confirma que en esta fase de la germinación, el crecimiento depende tanto de la toma de agua como de la proliferación celular que necesariamente requiere de duplicación cromosomal.

Aunque el principal efecto de la HU es sobre la RNR, se observó también alteración de la vía de salvamento de nucleótidos pues la actividad de la TK1 se mantuvo a niveles constantes y comparables a los que estaban presentes en la semilla seca. Además de la inhibición directa de la actividad de la RNR, el tratamiento con HU de cultivos celulares a punto de reiniciar el ciclo celular después de permanecer en un estado quiescente, reduce los niveles del transcrito de la RNR, que en condiciones normales aumentan en la transición G<sub>1</sub>/S cuando comienzan a abrirse las horquillas de replicación (Chabouté *et al.*, 1998). Este hallazgo indica que una vez que la HU detiene el aporte de nucleótidos para la duplicación del ADN y las horquillas de replicación ven impedido su avance, se activa un mecanismo que inhibe la transcripción del gen de la RNR. Este mecanismo está bajo control del factor transcripcional E2F con el fin de detener por completo el aporte *de novo* de nucleótidos y evitar el avance posterior de la fase S cuando las condiciones fisiológicas no permiten la duplicación completa del ADN (Chabouté *et al.*, 1998). En algunas especies, como ratón, la transcripción del gen de la TK1 está bajo control del factor transcripcional E2F (Dou *et al.*, 1994), que regula muchos genes de la fase S. Por análisis de microarreglos se identificó que en *A. thaliana*, la transcripción de una TK1 (At3g07800) se induce 15 veces en plantas que sobreexpresan el factor transcripcional E2F (Vandepoele *et al.*, 2005). No sabemos si en maíz la regulación de los genes de TK1 se encuentran bajo el control general de estos factores transcripcionales que responden a HU pero los niveles de la proteína, determinados por western blot, no variaron en

---

---

los extractos proteicos de embriones de maíz germinados en presencia del inhibidor. Estos datos sugieren que el mecanismo regulatorio de la actividad enzimática de la TK1 responde a la detención del ciclo celular provocada por la HU, pues a pesar de que se puede detectar a la proteína inmunorreactiva, la actividad se mantiene constante y no aumenta.

Entre las 12 y las 24 horas se observó un leve incremento de la actividad en presencia de HU, que probablemente no sea significativo. Sin embargo, esto se puede deber a hidrólisis parcial del compuesto y reinicio de la fase S. Los estudios de Chabouté *et al.* (1998) en plantas demuestran que es posible continuar el progreso del ciclo celular en presencia de HU por un mecanismo que implica un aumento en la expresión de la RNR. En células de tabaco, el incremento en la expresión de la RNR en presencia de HU se acompaña de un incremento en la expresión de la ciclina A (NtcdcA59), que normalmente se expresa en la transición G<sub>1</sub>/S. El ligero incremento en la actividad de la TK1 podría ser parte de una respuesta similar en maíz por reiniciar la duplicación del ADN. Por otro lado, este discreto aumento a partir de las 12 horas podría ser una respuesta a la inhibición de la actividad de la RNR y tener la finalidad de restaurar el aporte de TTP supliendo la deficiencia de la vía *de novo* con el fin de tratar de mantener la síntesis de ADN y rescatar la germinación. Para definir esto se podrían hacer ensayos utilizando concentraciones menores de HU.

El efecto de la HU en cultivos celulares de mamíferos y plantas es reversible. Una explicación alternativa al aumento en la incorporación a pesar de la HU podría ser la gradual y progresiva hidrólisis de la HU disuelta en el medio MS, lo que permitiría que las células reanuden el avance de la fase S y eventualmente terminen la división celular.

Xu & Plunkett (1993), al aplicar HU 1 mM a cultivos de linfoblastos humanos CCRF-CEM, encontraron que la actividad de la TK1 se abatió. En primer lugar, la acción de la HU sobre la RNR provocó la disminución en el aporte de nucleótidos para la síntesis de ADN y detuvo el avance de las horquillas de replicación. A pesar del bloqueo de la síntesis de ADN y de la inactivación de la RNR se produjo una acumulación de TTP debido a la desaminación del dCMP por acción de la desoxicitidina deaminasa para producir dUMP, que a su vez –por la metilación catalizada por la timidilato sintasa– se convirtió en TMP y eventualmente TTP. Como se esperaba, el aumento en la poza de TTP se acompañó de una disminución en la poza de dCTP. El aumento de entre 24 y 55% con respecto al control en la poza de TTP provocó la inhibición por retroalimentación de la actividad de la TK1. Este mecanismo de regulación post-traducciona l de la TK1 tal vez tenga el propósito de evitar un aporte mayor de nucleótidos cuando las horquillas se encuentran detenidas. Esta inhibición por retroalimentación es factible

que ocurra en los embriones de maíz por efecto de la HU, y explicaría la disminución en la actividad observada.

Asimismo, Xu & Plunkett (1993) observaron que la inhibición de la síntesis del ADN directamente inhibía la actividad de la TK1, independientemente de la inhibición por retroalimentación. Cuando la poza de TTP se aumentó artificialmente –mediante la adición de precursores– a niveles similares a los provocados por la HU, la inhibición sobre la TK1 fue del 25% de la observada en el tratamiento con HU. Esta disparidad en la inhibición con los diferentes tratamientos sugirió que otro mecanismo vincula la síntesis de ADN con la actividad de la TK1, probablemente algún mecanismo de “checkpoint”.

Los puntos de regulación (“checkpoints”) son mecanismos encargados de interrumpir el avance del ciclo celular cuando existe daño en el ADN o en el huso mitótico. Los mecanismos de checkpoint intra-S, es decir, que actúan cuando la fase S ya ha iniciado, se encargan de evitar que inicie la mitosis cuando no se ha duplicado por completo el genoma. En *Saccharomyces cerevisiae* este checkpoint se encarga de evitar la activación de los orígenes de replicación tardíos ante la deficiencia de desoxinucleótidos provocada por la HU (DePamphilis, 1999). Aunque existe la posibilidad de que tanto la inhibición por retroalimentación como la activación de algún mecanismo de checkpoint activado por la HU puedan actuar en conjunto sobre la actividad de la TK1 de maíz, aún no existen evidencias que apoyen esta hipótesis en un sistema vegetal.



---

---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se realizó una caracterización parcial de la timidina cinasa de maíz y de su expresión y actividad durante la germinación de embriones. Se encontró una estrecha relación entre la actividad de la enzima y la replicación del ADN, lo que sugiere una función relevante de la vía de salvamento de nucleótidos en esta etapa del desarrollo vegetal. Esta asociación no se extendió a los niveles de proteína, lo que sugiere una regulación post-traducciona, probablemente por un mecanismo no compartido con las enzimas de mamíferos, o bien, mediado por otros motivos en la estructura primaria de la proteína. La localización de la TK de plantas es otro aspecto importante por investigar y para ello se generaron herramientas que permitirán realizar estos estudios. La determinación experimental de la localización subcelular de la enzima de maíz requerirá la aplicación de técnicas como inmunolocalización con anticuerpos homólogos e hibridación *in situ* con sondas de ARN. La purificación de la proteína y la medición de la actividad enzimática de TK1 a partir de plastidios extraídos de ejes embrionarios, según el método de purificación de plastidios reportado por Lara-Núñez & Rodríguez-Sotres (2004), demostraría la existencia de esta isoforma plastídica. Asimismo, podrían determinarse ambos parámetros en los tejidos fotosintéticos para determinar su presencia en cloroplastos maduros. De existir una TK1 cloroplástica activa, la contribución de esta poza de timidilato organelar en el metabolismo celular podría determinarse midiendo los niveles de timidina y timidilato por cromatografía de alta eficiencia (HPLC), cromatografía en capa fina, o aplicando precursores marcados radiactivamente con el fin de identificar el destino subcelular de los nucleótidos sintetizados a partir de dichos precursores.

El mecanismo de regulación de la actividad enzimática de la TK1 de plantas es otro aspecto interesante por investigar. En este trabajo se realizaron ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído y detección por western blot, pero no se pudo detectar la presencia de estructuras cuaternarias, como tetrámeros o dímeros (resultados no mostrados). Sin embargo, estos ensayos podrían repetirse con fracciones purificadas de la enzima y complementar los datos utilizando cromatografía de filtración en gel en presencia de ATP para separar los oligómeros de la TK1 según su tamaño molecular. De esta manera puede determinarse la actividad en las distintas fracciones y detectar a la proteína por western blot.

Finalmente, estas estrategias bioquímicas pueden complementarse con estrategias genéticas para definir la función de la enzima durante el desarrollo vegetal. Actualmente, tenemos la línea homocigota (SALK\_074256) de *A. thaliana* que tiene una inserción de ADN-T en el gen de la timidina cinasa y que se empleará para estudiar el fenotipo durante el desarrollo

de la planta. Esta estrategia experimental se podrá completar y corroborar con el silenciamiento de la expresión del gen (o genes) que codifiquen esta enzima mediante el uso de ARN de interferencia complementario a la(s) secuencia(s) genómica(s) en plantas de Arabidopsis.





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.M., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.) (1992) *Short Protocols in Molecular Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. Greene Publishing Assoc. & Wiley and Sons. U.S.A. pp 6-3 to 6-14.
- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M., and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135**: 416-421.
- Balzarini, J., Zhu, C., DeClercq, E., Pérez-Pérez, M., Chamorro, M., Camarasa, M., and Karlsson, A. (2000) Novel ribofuranosylnucleoside lead compounds for potent and selective inhibitors of mitochondrial thymidine kinase-2. *Biochem. J.* **352**: 167-171.
- Bannwarth, H., Ikehara, N., and Schweiger, H.G. (1977a) Thymidine phosphorylating enzymes in *Acetabularia*: Evidence for the occurrence of a thymidine kinase. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **198**: 155-176.
- Bannwarth, H., Ikehara, N., and Schweiger, H.G. (1977b) Nucleocytoplasmic interactions in the regulation of thymidine phosphorylation in *Acetabularia*: *Proc. R. Soc. Lond B.* **198**: 177-190.
- Bannwarth, H., and Schweiger, H.G. (1975) Regulation of thymidine phosphorylation in nucleate and anucleate cells of *Acetabularia*. *Proc. R. Soc. Lond B.* **188**: 203-219.
- Bassham, D.C., Bartling, D., Mould, R.M., Dunbar, B., Weisbeek, P., Herrmann, and R.G., Robinson, C. (1991) Transport of proteins into chloroplasts: Delineation of envelope "transit" and thylakoid "transfer" signals within the pre-sequences of three imported thylakoid lumen proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 23606-23610.
- Beltran-Pena, E., Ortiz-Lopez, A., and Sánchez de Jiménez, E. (1995) Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* **28(2)**: 327-336.
- Bengert, P., and Dandekar, T. (2003) A software tool-box for analysis of regulatory RNA elements. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3441-3445.
- Benedetto, J.P., Ech-Chaoui, R., Plissonneau, J., Laquel, P., Litvak, S., and Castroviejo, M. (1996) Changes of enzymes and factors involved in DNA synthesis during wheat embryo germination. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1217-1225.
- Berenstein, D., Christensen, J.F., Kristensen, T., Hofbauer, R., and Munch-Petersen, B. (2000) Valine, not methionine, is amino acid 106 in human cytosolic thymidine kinase (TK1). *J. Biol. Chem.* **275**: 32187-32192.
- Bewley, J.D., and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press. U.S.A. pp 1-33, 98-111 and 147-197.
- Bianchi, V., Borella, S., Rampazzo, C., Ferraro, P., Calderazo, F., Bianchi, L.C., Skog, S., and Reichard, P. (1997) Cell cycle-dependent metabolism of pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 16118-16124.
- Bradshaw, H.D., and Deiniger, P.L. (1984) Human thymidine kinase gene: Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA expressible in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2316-1320.
- Brandt, J., Nielsen, V.S., Thordal-Christense, H., Simpson, D.J., and Okkels, J.S. (1992) A barley cDNA clone encoding a type III chlorophyll a/b-binding polypeptide of the light-harvesting complex II. *Plant Mol. Biol.* **19**: 699-703.
- Britton, F., Munch-Petersen, B., Hofbauer, R., and Barnett, Y.A. (1998) An investigation of thymidine kinase 1 from normal and transformed mammary cell lines. *Biochem. Soc. T.* **26**: S63.
- Castroviejo, M., Tharaud, D., Mocquot, B., and Litvak, S. (1979) Factors affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination: Study of the changes in DNA polymerases A, B and C and the pool of DNA precursors. *Biochem. J.* **181**: 193-199.

- Chabouté, M., Combettes, B., Clément, B., Gigot, C., and Philipps, G.** (1998) Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Mol. Biol.* **38**: 797-806.
- Chang, Z., Huang, D., and Hu, S.** (1999) NF-Y-mediated *trans*-activation of the human thymidine kinase promoter is closely linked to activation of cyclin-dependent kinase. *J. Cell. Biochem.* **75**: 300-309.
- Chou, W., and Chang, Z.** (2001) Cap-independent translation conferred by the 5'-untranslated region of human thymidine kinase mRNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **1519**: 209-215.
- Clark, S.E., and Lamppa, G.K.** (1991) Determinants for cleavage of the chlorophyll a/b binding protein precursor: A requirement for a basic residue that is not universal for chloroplast imported proteins. *J. Cell Biol.* **114**: 681-688.
- Clark, S.E., Oblong, J.E., and Lamppa, G.K.** (1990) Loss of efficient import and thylakoid insertion due to N- and C- terminal deletions in the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein. *Plant Cell.* **2**: 173-184.
- Coello, P., Rodríguez, R., García, E., and Vázquez-Ramos, J.M.** (1992) A DNA polymerase from maize axes: Its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.* **20**: 1159-1168.
- Coello, P., and Vázquez-Ramos, J.M.** (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* **231**: 99-103.
- De Groot, E.J., and Schweiger, H.** (1983) Thymidylate kinase from *Acetabularia*: I. Properties of the enzyme. *J. Cell Sci.* **64**: 13-25.
- DePamphilis, M.L.** (1999). DNA replication in eukaryotic cells: 1996 to 1998, in: *DNA Replication in Eukaryotic Cells* (DePamphilis, M.L. ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pp 461-502.
- Dou, Q., Zhao, S., Levin, A.H., Wang, J., Helin, K., and Pardee, A.B.** (1994) G1/S-regulated E2F-containing protein complexes bind to the mouse thymidine kinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**: 1306-1313.
- Dobrovolsky, V.N., Bucci, T., Heflich, R.H., Desjardins, J., and Richardson, F.C.** (2003) Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Mol. Gen Metabol.* **78**: 1-10.
- Doležel, J., Čihalíková, J., Weiserová, J., and Lucretti, S.** (1999) Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Method Cell Sci.* **21**: 95-107.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**: 978-984.
- Emes, M.J., and Neuhaus, H.E.** (1997) Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *J. Exp. Bot.* **48**: 1995-2005.
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., and Eklund, H.** (2002) Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1327-1346.
- Evans, J.S., Lock, K.P., Levine, B.A., Champness, J.N., Sanderson, M.R., Summers, W.C., McLeish, P.J., and Buchan, A.** (1998) Herpesviral thymidine kinases: Laxity and resistance by design. *J. Gen. Virol.* **79**: 2083-2093.
- Flemington, E., Bradshaw, H.D., Traina-Dorge, T., Slagel, V., and Deininger, P.L.** (1987) Sequence, structure and promoter characterization of the human thymidine kinase gene. *Gene.* **52**: 267-277.
- Flores, E.** (1999) *La Planta. Estructura y Función.* El Libro Universitario. Costa Rica. pp 695-734, 773-789 y 790-803.
- Foster, A.S., and Gifford, E.M.** (1959) *Comparative Morphology of Vascular Plants.* W.H. Freeman and Company. U.S.A. pp 536.

- Frederiksen, H., Berenstein, D., and Munch-Petersen, B.** (2004) Effect of valine 106 on structure-function relation of cytosolic human thymidine kinase: Kinetic properties and oligomerization pattern of nine substitution mutants of V106. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2248-2256.
- Futcher, B.** (1999) Cell cycle synchronization. *Meth. Cell Sci.* **21**: 79-86.
- Gavel, Y., and von Heijne, G.** (1990) A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* **261**: 455-458.
- Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichtinger, H., Brosch, G., and Loidl, P.** (1994) Maize embryo germination: Cell cycle analysis. *Planta.* **192**: 118-124.
- Górnick, K., De Castro, R.D., Liu, Y., Bino, R.J., and Groot, S.P.C.** (1997) Inhibition of cell division during cabbage (*Brassica oleracea* L.) seed germination. *Seed Sci. Res.* **7**: 333-340.
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., and Vázquez-Ramos, J.M.** (2005) Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell. Physiol.* **46**: 166-173.
- Harlow, E. and Lane, D.** (1998) *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- He, Q., and Skog, S.** (2002) Involvement of a substrate cycle between thymidine and thymidylate in the regulation of DNA precursor pool in Ehrlich ascites tumour. *Cell. Physiol. Biochem.* **12**: 305-314.
- Herrera, I, Sánchez, M.D.P., Molina, J., Plasencia, J. and Vázquez-Ramos, J.M.** (2000) Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol Plantarum.* **110**: 127-134.
- Huntley, R.P. and Murray, J.A.H.** (1999) The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 440-446.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformants of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**: 23-28.
- Joshi, C.P.** (1987) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: A compilation and analysis. *Nucleic Acids Res.* **23**: 9627-9640.
- Karssen, C.M.** (1995) Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. *Seed Development and Germination* (Kigel, J., y Galili, G., eds.). Marcel Dekker Inc. U.S.A. pp 333-346.
- Katahira, R., and Ashihara, H.** (2002) Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta.* **215**: 821-828.
- Ke, P., and Chang, Z.** (2004) Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome-Cdh1-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 514-526.
- Ke, P., Kuo, Y., Hu, C., and Chang, Z.** (2005) Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Gen Dev.* **19**: 1920-1933.
- Ke, P., Yang, C., Tsai, I., and Chang, Z.** (2003) Degradation of human thymidine kinase is dependent on serine-13 phosphorylation: involvement of the SCF-mediated pathway. *Biochem. J.* **370**: 265-273.
- Lara-Núñez, A., and Rodríguez-Sotres, R.** (2004) Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for L-malate in non-photosynthetic plastids from developing maize embryos. *Plant Sci.* **166**: 1335-1343.
- Lee, L., and Cheng, Y.** (1976) Human deoxythymidine kinase: I. Purification and general properties of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia. *J. Biol. Chem.* **251**: 2600-2604.

- Lee, L., and Cheng, Y.** (1976b) Human deoxythymidine kinase: II. Substrate specificity and kinetic behavior of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia. *Biochemistry*. **15**: 3686-3690.
- Li, C., Lu, C., Ke, P., and Chang, Z.** (2004) Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **313**: 587-593.
- Lipson, K., and Baserga, R.** (1989) Transcriptional activity of the human thymidine kinase gene determined by a method using the polymerase chain reaction and an intron-specific probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 9774-9777.
- Meyer, B.S., Anderson, D.B. Bohning, R.H., and Fratianne, D.G.** (1973) *Introduction to Plant Physiology*. 2<sup>nd</sup> edition. D. Van Nostrand Company. U.S.A. pp 530-547.
- Mikulits, W., Hengstschläger, M., Sauer, T., Wintersberger, E., and Müllner, E.W.** (1996) Overexpression of thymidine kinase mRNA eliminates cell cycle regulation of thymidine kinase enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **271**: 853-860.
- Milthorpe, F.L. and Moorby, J.** (1974) *An Introduction to Crop Physiology*. Cambridge University Press. U.K. pp 110-123.
- Moffett, B.A., and Ashihara, H.** (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2<sup>nd</sup> edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. U.S.A.
- Montoya-García, L., Muñoz-Ocotoero, V., Aguilar, R., and Sánchez de Jiménez, E.** (2002) Regulation of acidic ribosomal protein expression and phosphorylation in maize. *Biochemistry*. **41(31)**: 10166-10172.
- Munch-Petersen, B., Tyrsted, G., and Cloos, L.** (1993) Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **268**:15621-15625.
- Munch-Petersen, B., Cloos, L., Jensen, H.K., and Tyrsted, G.** (1995) Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Advan. Enzyme Regul.* **35**: 69-89
- Nájera-Martínez, M.M.** (2000) Caracterización de la estructura y expresión del gen que codifica la proteína de maíz relacionada a la de retinoblastoma. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
- Neuffer, G.M., Coe, E.H., and Wessler, S.R.** (1997) *Mutants of Maize*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pp 17.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**: 1-6.
- Pontarin, G., Gallinaro, L., Ferraro, P., Reichard, P., and Bianchi, V.** (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 12159-12164.
- Posch, M., Hauser, C., and Seiser, C.** (2000) Substrate binding is a prerequisite for stabilisation of mouse thymidine kinase in proliferating fibroblasts. *J. Mol. Biol.* **300**: 493-502.
- Reichard, P.** (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 349-74.
- Rensink, W.A., Schnell, D.J., and Weisbeek, P.J.** (2000) The transit sequence of ferredoxin contains different domains for translocation across the outer and inner membrane of the chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.* **275**: 10265-10271.
- Reyes, J., Jiménez-García, L.F., Gonzalez, M.A. and Vázquez-Ramos, J.M.** (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA síntesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.* **1**: 113-117.

- Rotheneder, H., Geymayer, S., and Haidweger, E.** (1999) Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J. Mol. Biol.* **293**: 1005-1015.
- Rothnie, H.M.** (1996) Plant mRNA 3'-end formation. *Plant Mol. Biol.* **32**: 43-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- Sánchez, M.D.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutiérrez, C., and Vázquez-Ramos, J.M.** (2003) PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* **50**: 167-175.
- Sánchez-Martínez, D., Puigdoménech, P., and Pagés, M.** (1986) Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos: protein synthesis during embryogenesis and early germination of maize. *Plant Physiol.* **82**: 543-549.
- Sandrini, M.P.B., and Piškur, J.** (2005) Deoxyribonucleoside kinases: Two enzyme families catalyze the same reaction. *Trend Biochem. Sci.* **30(5)**: 225-228.
- Sanjuan-Badillo, A.** (1997) La poliadenilación citoplásmica como un mecanismo de control traduccional en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Stasolla, C., Katahira, R., Torpe, T.A, and Ashihara, H.** (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* **160**: 1271-1295.
- Sherley, J.L., and Kelly, T.J.** (1988a) Human cytosolic thymidine kinase: purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 375-382.
- Sherley, J.L., and Kelly, T.J.** (1988b) Regulation of thymidine kinase during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **263**: 8350-8358.
- Spyrou, G., and Reichard, P.** (1988) Dynamics of the thymidine triphosphate pool during the cell cycle of synchronized 3T3 mouse fibroblasts. *Mutat. Res.* **200**: 37-43.
- Street, H.E. and Öpik, H.** (1986) *The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development*. 3<sup>rd</sup> edition. Edward Arnold. U.K. pp 4-25.
- Sugiura, M., and Takeda, Y.** (2000) Nucleic acids, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. eds.) American Society of Plant Biologists. U.S.A. pp 260-272.
- Suzuri, L.J.** (2001) Estructura y expresión del gene de la timidina cinasa de maíz. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica-Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Ullah, H.M., Robertson, D., and Fites, R.C.** (1999) A gene for thymidine kinase in plants. *Plant Physiol.* **119**: c/pp.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D., and De Veylder, L.** (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**: 316-328.
- VanderVere, P.S., Bennett, T.M., Oblong, J.E., and Lamppa, G.K.** (1995) A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metalloendopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7177-7181.
- Von Heijne, G., and Nishikawa, K.** (1991) Chloroplast transit peptides: The perfect random coil? *FEBS Lett.* **278**: 1-3.
- Von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G.** (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**: 535-545.
- Vázquez-Ramos, J.M., and Sánchez, M.D.P.** (2003) The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* **13**: 113-130.
- Voet, D., and Voet, J.** (1995) *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. pp 803.
- Wang, L., and Eriksson, S.** (2000) Cloning and characterization of full-length mouse thymidine kinase 2: The N-terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria. *Biochem. J.* **351**: 469-476.

- Welin, M., Kosinska, U., Mikkelsen, N., Carnrot, C., Zhu, C., Wang, L., Eriksson, S., Munch-Petersen, B., and Eklund, H.** (2004) Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(52)**: 17970-17975.
- Wettin, K., Johansson, M., Zheng, X., Zhu, C., and Karlsson, A.** (1999) Cloning of mouse mitochondrial thymidine kinase 2 cDNA. *FEBS Lett.* **460**: 103-106.
- Wintersberger, E.** (1996) DNA damage and mutagenesis: Regulation and biological function of thymidine kinase. *Biochem. Soc. T.* **25(1)**: 303-308.
- Wolcott, R.M., and Colacino, J.M.** (1989) Detection of thymidine kinase activity using an assay based on the precipitation of nucleoside monophosphate with lanthanum chloride. *Anal. Biochem.* **178**: 38-40.
- Xu, Y., and Plunkett, W.** (1993) Regulation of thymidine kinase and thymidylate synthase in intact human lymphoblast CCRF-CEM cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 22363-22368.
- Zúñiga-Aguilar, J.J., López, I., Gómez, A., and Vázquez-Ramos, J.M.** (1995) Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination? *Seed Sci. Res.* **5**: 219-226.



---

---

**APÉNDICE A**

- **Agua tratada con DEPC**

DEPC	2 mL
Agua desionizada c.b.p.	1 L
- **Amortiguador de carga para ARN**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.0)	10 mM
- **Amortiguador de carga para ADN**

Azul de bromofenol	0.25%
Glicerol	50%
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	2 mM
- **Amortiguador de carga para proteínas**

Tris-HCl pH 6.8	100 mM
SDS	4% v/v
Glicerol	20% v/v
Azul de bromofenol	0.2 v/v
β-mercaptoetanol	1.4 M
- **Amortiguador de electrodos 0.5×**

Tris-HCl pH 8.3	12.5 mM
Glicina	96 mM
SDS	0.05% p/v
- **Amortiguador de homogenización para la extracción de ADN marcado con [metil-<sup>3</sup>H]-timidina**

NaCl	0.15 mM
EDTA	0.1 M
SDS	0.5% p/v

Ajustar el pH a 7.5
- **Amortiguador de homogenización para la extracción de proteínas**

Tris pH 7.5	70 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	25 mM
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O pH 8	5 mM
Sacarosa	0.25 mM
β-mercaptoetanol	15 mM
Tritón X-100	0.1% v/v

Solución stock del coctel de inhibidor de proteasas Complete™ (Boehringer)  
(40 μL por cada mililitro de amortiguador)
- **Amortiguador para el gel apilador**

Tris-HCl	0.14 M
TEMED	0.11% v/v
SDS	0.11% v/v



---

---

Ajustar el pH a 6.7-6.9

- **Amortiguador para el gel separador**

Tris-HCl                    1.5 M  
SDS                         0.4% v/v

Ajustar el pH a 8.8

- **Amortiguador de reacción**

Tris                         100 mM  
MgCl<sub>2</sub>                    10 mM  
NaF                        10 mM  
ATP                        10 mM  
β-mercaptoetanol       2 mM

- **Amortiguador TEN**

Tris-HCl (pH 7.5)        10 mM  
EDTA                     0.1 mM  
NaCl                      25 mM

Esterilizar en autoclave

- **Amortiguador de transferencia**

Trizma base              24.8 mM  
Glicina                    192 mM  
Metanol                  10% v/v

Ajustar el pH a 8.3

- **CaCl<sub>2</sub>**

CaCl<sub>2</sub>                     60 mM  
Glicerol                  15%  
PIPES                    10 mM

Ajustar el pH a 7

- **GTE**

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

- **IPTG 0.1 M**

IPTG                      23.83 g  
Agua c.b.p.              1 L

- **Líquido de Bray**

2,5-difenildiazol (PPO)                    4 g  
1,4-bis[2-(4-metil-S-feniloxazol)]-benceno    0.2 g  
Naftaleno                                      60 g  
Etilénglicol                                    20 mL  
Metanol                                        100 mL  
Dioxano c.b.p.                                1 L

- 
- 
- **Líquido de centelleo**

2,5-difenildiazol (PPO)	4 g
1,4-bis[2-(4-metil-S-feniloxazol)]-benceno	0.1 g
Tolueno c.b.p.	1 L
  
  - **Medio LB/ampicilina/IPTG/x-GAL**

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Ajustar el pH a 7	
Agua cbp.	1 L
Esterilizar durante 20 min. y dejar enfriar a 50° C.	
Ampicilina	100 µg/mL
IPTG	5 mM
X-Gal	80 µg/µL
  
  - **Medio Luria**

NaCl	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaOH 2.5 N	1 mL
Agua c.b.p.	1 L
  
  - **Medio MS**

Sales MS	1.29 g
Agar	3 g
Sacarosa	6 g
Agua c.b.p.	300 mL
  
  - **Medio SOC**

Peptona de caseína	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 1 M	1 mL
KCl 1 M	0.25 mL
Mg <sup>2+</sup> 2 M	1 mL
Glucosa 2 M	1 mL
Agua c.b.p.	100 mL
  
  - **PBS 1x**

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	4.3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 mM
Ajustar el pH a 7.3	

- 
- 
- **Solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8**

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

Leche descremada Svelty®	5% p/v
Tween 20	0.6%
PBS	1×
  - **Solución de cloruro de sodio (NaCl) 4 M**

NaCl	11.7 g
Agua c.b.p.	50 mL
  - **Solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v)**

Cloralex	100 mL
Agua destilada estéril c.b.p.	1 L
  - **Solución NaOH 0.2N/SDS 1%**

NaOH 1 N	200 $\mu$ L
SDS 20%	50 $\mu$ L
Agua	750 $\mu$ L
  - **Solución de precipitación**

LaCl <sub>3</sub>	100 mM
Trietanolamina	5 mM
  - **Solución TE**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
  - **SSC 20×**

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Agua desionizada c.b.p.	1 L
  - **TAE 1×**

Tris acetato	40 mM
EDTA	2 mM
  - **Tris 50 mM pH 8**

Tris•Cl	6.06 g
NaCl	0.5 M
Ajustar el pH a 8	

---



---

**APÉNDICE B**
**Tabla 6.** Comparación de la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto de ZMtuc03-08-11.12975 con cTPs de otras especies vegetales.

Proteína cloroplástica	Identidad (%)	Longitud (en residuos)
Subunidad $\gamma$ de la ATPasa (espinaca)	14	57
Ferredoxina NADP oxidorreductasa (espinaca)	7	55
Subunidad V del fotosistema I (espinaca)	11	69
Superóxido dismutasa (petunia)	12	65
UDP-Glucosa:almidón glucosil transferasa (maíz)	10	72
Subunidad $\delta$ de la ATPasa (espinaca)	21	70
Light harvesting complex II (chícharo)	16	36
Piruvato ortofosfato dicinasa (maíz)	5	71
Proteína ribosomal L12 (espinaca)	10	56
Proteína acarreadora de acilos (cebada)	13	59
Tiorredoxina m (espinaca)	13	68
NADPH-protoclorofilida oxidorreductasa (cebada)	8	74
Subunidad de 20 kDa de fotosistema I (espinaca)	20	50
5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (petunia)	8	72
Subunidad GapA de la gliceraldehído-3-fosfato sintasa (chícharo)	7	68
Subunidad pequeña de rubisco ( <i>Acetabularia mediterranea</i> )	9	42
Subunidad VI del fotosistema I (espinaca)	6	49
Nitrato reductasa (espinaca)	15	32
Proteína acarreadora de acilos (espinaca)	16	56
Cu/Zn-superóxido dismutasa (chícharo)	14	48
Subunidad pequeña de rubisco ( <i>Solanum tuberosum</i> )	13	58
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (maíz)	16	66
Ferredoxina ( <i>Silene pratensis</i> )	20	48
Subunidad de 10.8 kDa del fotosistema I (cebada)	21	46
Oxygen-evolving complex (papa)	10	39
Ribulosa-bifosfato carboxilasa/oxigenasa activasa (espinaca)	10	58
Oxygen-evolving complex (espinaca)	9	41
Proteína acarreadora de acilos ( <i>Brassica napus</i> )	7	51
Fosforibulocinasa (espinaca)	11	51
NADP-malato deshidrogenasa (maíz)	10	57
Proteína Rieske FeS (espinaca)	11	68
$\alpha$ -glicano fosforilasa (papa)	4	48

---