

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TIMIDINA CINASA
DE MAIZ (TK)”.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:
BELEM YOVAL SÁNCHEZ

México,D.F.



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: Dra. Amanda Gálvez Mariscal.
Vocal: Dr. Eleazar Martínez Barajas.
Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra.
1er. Suplente: Dr. José Pedraza Chaverri.
2do. Suplente: Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera.

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: _____
Belem Yoal Sánchez

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis forma parte del proyecto DGAPA-PAPIIT IN225405 (Caracterización bioquímica y funcional de la timidina cinasa de plantas).

Belem Yoal Sánchez recibió beca-tesis del proyecto DGAPA-PAPIIT IN225405.

Parte de este trabajo se realizó dentro del subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química de la UNAM.

Se agradece al apoyo del Dr. José S. Rodríguez Zavala por su apoyo en las técnicas cromatográficas.

Se agradece el apoyo técnico de la M.C. Manuela Nájera Martínez y Q.F.B. Consuelo Enríquez Arredondo.

Se agradece la asistencia técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

Agradecimientos

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra, por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, por todo el apoyo y paciencia recibidos durante la elaboración de este proyecto.

A mis padres Víctor y Lety, por todo su amor, consejos, trabajo, esfuerzo, desvelos; valoro mucho todo lo que hacen por mí y espero algún día poder recompensarlos.

A mi hermano Oscar, por ser mi compañero y amigo durante 20 años, soportar mis enojos, hacerme reír, desvelarse conmigo y darme un abrazo cuando lo he necesitado.

A Luisito López, por caminar junto a mí todos estos años, ayudarme a construir sueños y locuras, formar parte de ellos y ser incondicional.

A mis Tíos Martha y Manuel, por ser como mis segundos padres, apoyarme siempre y quererme tanto.

A mis primos Ana, Camacho y Susy, por el apoyo y cariño brindados en todos estos años, por haberme permitido formar parte de ustedes cuando el mar estaba un poco revuelto.

A mi Abu Meche, por educarme, consentirme y regalarme tantas carcajadas, me has hecho muy feliz.

A la familia López Ochoa – Cano, por permitirme formar parte de ustedes y quererme mucho.

A Ricky, por ser como ese hermano mayor que tanto molesta, que nunca puede faltar y con el que siempre se puede contar.

A Toño, por enseñarme que podemos ser más fuertes de lo que imaginamos.

A mis tíos José y Mary, por enseñarnos a Oscar y a mí a ser niños.

A mi tía Toña, por todas tus porras, apoyo y cariño.

A mis amigos.

A Luz, Clau e Israel, por los momentos compartidos, abrazos, risas, tristezas, por preocuparse por mí y por su cariño.

A Javier Juárez, por ser un gran amigo, por tu honestidad, cariño, apoyo y música, por hacerme reír y confiar en mí, espero aún falten muchas escenas en la película.

Al Dr. José S. Rodríguez Zavala, por que he aprendido mucho de ti, no sólo como tutor, también como amigo, por enseñarme a confiar en mí. Eres un gran ser humano y te admiro mucho.

A mis amigas y compañeras del laboratorio Diana, Manu, Mariana y Andrea, por enseñarme que no importan las diferencias siempre que hay cariño y ustedes siempre me lo ofrecieron.

A Gaby, Carolina , Jorge, Daniel y Roberto, ustedes me han demostrado que no importa la distancia cuando la amistad es verdadera.

A Edgar, Pedro y Cris, por todas sus bromas, chistes, cariño y por ser mis amigos.

A Dulce, Susana, Mago, Liliana, Erika, Griselda, Amílcar, Diana y Ricardo Jasso por el camino recorrido, risas, enojos, consejos, abrazos y todo lo que nos falta.

Por que de cada tengo un poco que me ayuda a crecer y ser una mejor persona.

Al equipo de trabajo del laboratorio 101, del conjunto E, Facultad de Química.

A la Facultad de Química, UNAM; por que brindas conocimientos y bellas experiencias, con ayuda de tus profesores.

Gracias.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN

1. Biosíntesis de Nucleótidos	8
2. Biosíntesis de Precusores	11
2.1. Biosíntesis de Novo de Nucleótidos de Purina	12
2.2. Vía de Salvamento de Nucleótidos de Purina	15
3. Vía de Novo de Nucleótidos de Pirimidina	16
3.1. Vía de Salvamento de Nucleótidos de Pirimidina	17
4. Función de la enzima Timidina Cinasa (TK) en la Ruta de Salvamento de Nucleótidos	19
5. Actividad de Timidina Cinasa (TK)	19
6. Regulación de Timidina Cinasa (TK)	20
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Material Biológico	27
2. Desinfección e imbibición de semillas de maíz	27
3. Determinación de toma de agua, porcentaje de germinación y elongación	27
4. Extracción y Cuantificación de Proteínas	28
5. Determinación de Actividad enzimática TK de maíz	30
6. Purificación de la proteína	32
6a. Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio	32
6b. Cromatografía de Exclusión Molecular	33
6c. Cromatografía de Intercambio Iónico	35
6d. Cromatografía de Afinidad	37
7. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	39
8. Western Blot	41
RESULTADOS	43
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	64
APÉNDICE	65
BIBLIOGRAFÍA	71

RESUMEN

Los nucleótidos trifosfato son las bases estructurales de los ácidos nucleicos, por lo que son esenciales para la replicación del genoma, reparación del ADN, y síntesis de ARN. Las dos principales rutas para la síntesis de nucleótidos son la ruta *de novo* y la de salvamento. Las enzimas de la síntesis *de novo* construyen los nucleótidos de purina y pirimidina a partir de simples moléculas como CO_2 , aminoácidos y tetrahidrofolato. En las rutas de salvamento se reutilizan los nucleótidos y las bases libres, producto de la degradación de ADN, ARN y nucleótidos monofosfato. Mientras que la ruta *de novo* se lleva a cabo en los plastidios, la ruta de salvamento puede ocurrir en más de un compartimento celular. Se ha sugerido que las enzimas de las vías de salvamento pueden tener una función en el establecimiento de los niveles de las pozas de nucleótidos, mediante su participación en ciclos fútiles que regulen el flujo de desoxirribonucleósidos hacia dentro y fuera de la célula. La desoxitimidina cinasa (TK) es una enzima de la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina la cual cataliza la fosforilación de d-timidina para formar dTMP en presencia de ATP y el catión divalente Mg^{2+} . La TK1 humana es una proteína de 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25.5 kDa. En células de mamíferos se ha observado una correlación entre la actividad de la TK y el estado de proliferación, pues la actividad enzimática se incrementa durante la fase S, cuando ocurre la síntesis de ADN. En ápices de los ejes embrionarios de maíz, la actividad de TK incrementa durante la germinación de manera paralela a la síntesis de ADN. Sin embargo, no hay una asociación entre la actividad enzimática y los niveles de proteína lo que sugiere que esta enzima se encuentra regulada a nivel post-traducciona. Un tipo de regulación que se ha observado en esta enzima de otras especies es por oligomerización, ya que aumenta la afinidad por la timidina y la actividad cuando se encuentra como tetrámero. Con el objetivo de estudiar si este tipo de regulación ocurre, se debe contar con una preparación pura de la enzima. En este trabajo se reportan los resultados de la selección del tejido de la planta como fuente de enzima y la aplicación de distintos pasos de purificación. Para purificar la TK de maíz, se utilizaron diferentes métodos incluyendo precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diálisis, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad. Se logró un enriquecimiento de la enzima aplicando cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad lo que puede sentar las bases para elaborar un esquema de purificación íntegro de la enzima de plantas.

INTRODUCCIÓN

1. Biosíntesis de Nucleótidos.

Los nucleótidos son los precursores activados de los ácidos nucleicos. Como tales, son necesarios para la replicación del genoma, la reparación del material genético y la transcripción de la información genética en RNA. La célula requiere de una poza balanceada de cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) para la adecuada replicación y reparación del DNA (**Reichard, 1998**). Los nucleótidos están conformados de una base nitrogenada, una pentosa y uno, dos o tres grupos fosfato. Las bases que contienen nitrógeno pertenecen a dos familias de compuestos: las purinas y las pirimidinas; la purina puede considerarse como un derivado de la pirimidina; está constituida por un anillo de pirimidina y otro de imidazol condensados. (**Fig.1**).

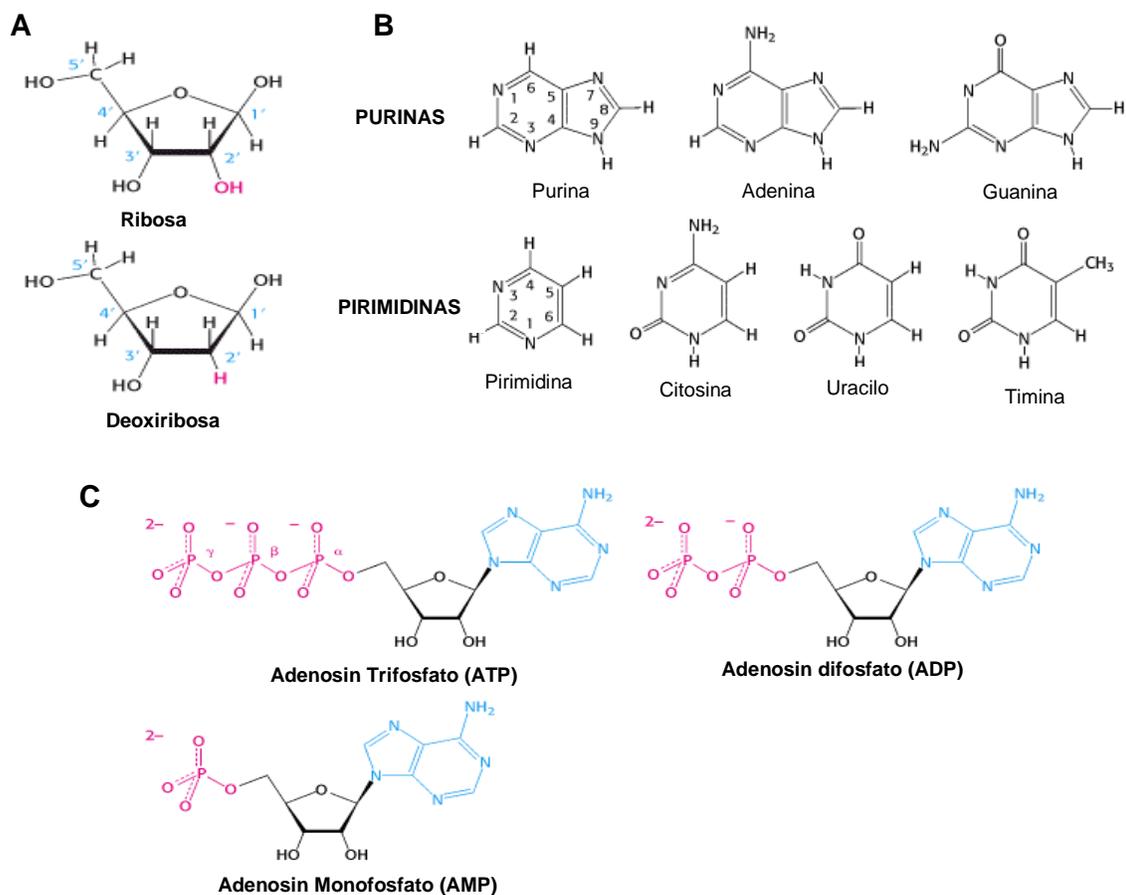


Figura 1. Estructura química de los nucleótidos. A) Estructuras químicas de las pentosas: Ribosa y Desoxirribosa. **B)** Estructura química de las bases: Purinas y Pirimidinas, **C)** Estructura química de nucleótidos de adenosina 5'- trifosfato (**Stryer, 2002**).

La desoxirribosa es el azúcar del ácido desoxirribonucleico (DNA). El prefijo desoxi- indica la ausencia del átomo de oxígeno en C2', que sí está presente en la ribosa (el azúcar de ácido ribonucleico o RNA). El grupo 3'-hidroxilo (3'-OH) del componente de azúcar de un nucleótido se esterifica a un grupo fosfato unido al grupo 5'-hidroxilo del azúcar adyacente, formando un enlace fosfodiéster. (Fig. 2). La cadena de azúcares unidos por puentes fosfodiéster es conocida como eje del ácido nucleico.

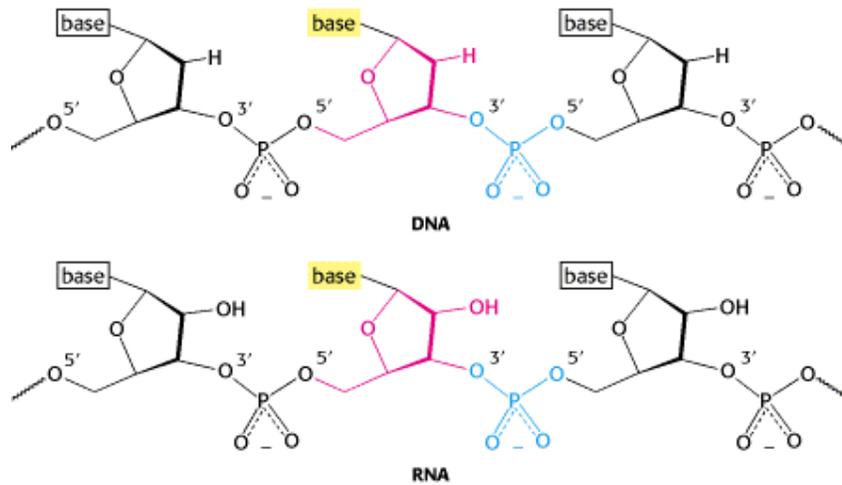


Figura 2. Ejes del DNA y RNA. Los ejes de estos ácidos están formados por uniones fosfodiéster de 3' a 5' (Stryer, 2002).

Mientras que el eje es constante tanto en el DNA como en el RNA, las bases varían de un monómero al siguiente. Dos de las bases son derivados de la purina –adenina (A) y guanina (G)- y dos de la pirimidina –citosina (C) y timina (T, sólo en el DNA) o uracilo (U, sólo en RNA).

Cada puente fosfodiéster contiene una carga negativa. Esta carga negativa repele especies nucleofílicas como el ión hidróxido y como consecuencia, los enlaces fosfodiéster son mucho menos susceptibles a un ataque hidrolítico que otros ésteres como los del ácido carboxílico. Esta propiedad es fundamental para mantener la integridad de la información que está almacenada en los ácidos nucleicos. La ausencia en el DNA del grupo 2'-hidroxilo aumenta aún más su resistencia a la hidrólisis. Esta estabilidad mayor del DNA es probablemente la razón por la que su función como material hereditario, ha perdurado en todas las células modernas y en muchos virus.

Una unidad consistente en una base unida a un azúcar se denomina nucleósido. Las cuatro unidades de nucleósido del RNA se llaman adenosina, guanosina, citidina y uridina, mientras que las del DNA se llaman desoxiadenosina, desoxiguanosina,

desoxicitidina y desoxitimidina. En cada caso, el N-9 de una purina o el N-1 de una pirimidina se une al C-1' de la pentosa. La base descansa por encima del plano del azúcar cuando se escribe la estructura en la orientación estándar; es decir, la configuración del enlace N-glucosídico es β (Stryer, 2002).

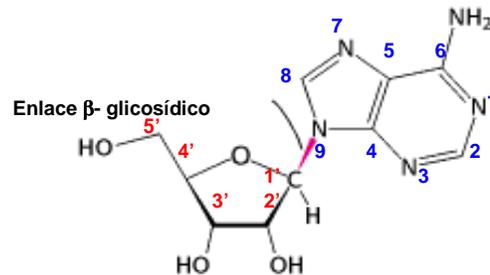


Figura 3. Enlace β - glicosídico en un nucleósido (Stryer, 2002).

Cuando un nucleósido es fosforilado, se obtiene un nucleótido. El sitio de esterificación más común en nucleótidos que se dan de forma natural es el grupo hidroxilo unido al C-5' del azúcar.

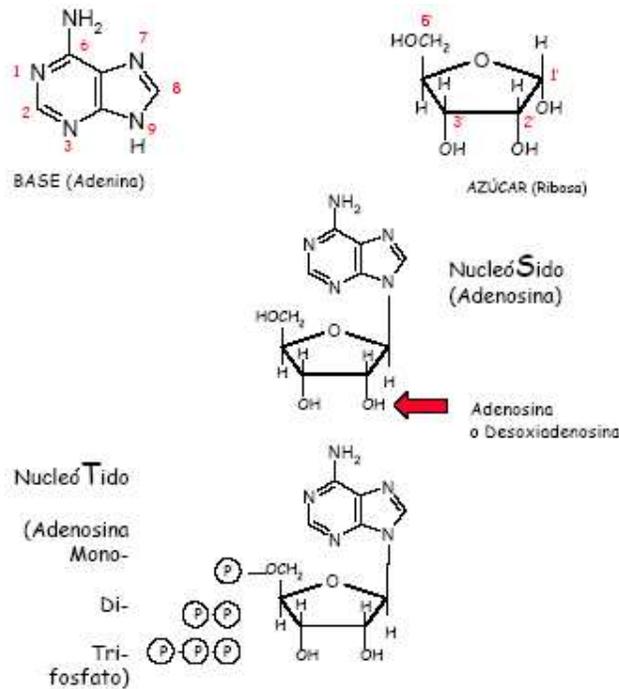


Figura 4. Estructura del nucleótido de adenosina. Se muestran sus componentes que son la base purina, la pentosa que forman un nucleósido que es trifosforilado para generar un nucleótido (León, 2005).

Un compuesto formado por la unión de un grupo fosfato al C-5' de un azúcar se llama nucleósido 5'-fosfato o 5'-nucleótido. Las cuatro unidades nucleotídicas del DNA se denominan desoxiadenilato, desoxiguanilato, desoxicitidilato y desoxitimidilato (Stryer, 2002).

2. Biosíntesis de Precursores.

Las rutas para la síntesis de nucleótidos en células de plantas son similares a las encontradas en animales y otros microorganismos. Esta conclusión está basada primordialmente en resultados de estudios realizados usando trazadores radioactivos *in vivo*, inhibidores específicos de la síntesis de nucleótidos y en los análisis de parámetros cinéticos de enzimas purificadas involucradas en la síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina.

Las dos principales rutas para la síntesis de nucleótidos son: la ruta *de novo* y la de salvamento. Las enzimas de la síntesis de novo construyen los nucleótidos de purina y pirimidina a partir simples moléculas como CO₂, aminoácidos y tetrahidrofolato. La ruta de síntesis de nucleótidos tiene un alto requerimiento de energía comparado con la ruta de salvamento. Por ejemplo, cinco de las doce reacciones en la síntesis de novo de purinas requieren de la hidrólisis de ATP o GTP, mientras que sólo una reacción en la vía de salvamento requiere de ATP. Las enzimas de ambas rutas biosintéticas son clasificadas como enzimas “housekeeping” o de mantenimiento debido a que son esenciales para la actividad celular y se encuentran presentes de forma constitutiva en la célula aunque a bajos niveles (**Moffatt, 2002**).

Las purinas y pirimidinas comparten varios precursores importantes en las vías de síntesis *de novo* como es el fosforribosil pirofosfato (PRPP) (Fig. 5) que se sintetiza a partir de la ribosa 5-fosfato derivada de la vía de las pentosas fosfato, en una reacción catalizada por la ribosa fosfato fosfocinasa (PRPP sintetasa).

Este compuesto resulta importante para la síntesis de ambos tipos de bases; y en este caso la estructura de la ribosa se mantiene en el nucleótido sintetizado (**Lehninger,2000**). Mientras que la ruta de novo se lleva a cabo en los plastidios, la ruta de salvamento puede ocurrir en más de un compartimiento celular (**Moffatt, 2002**).

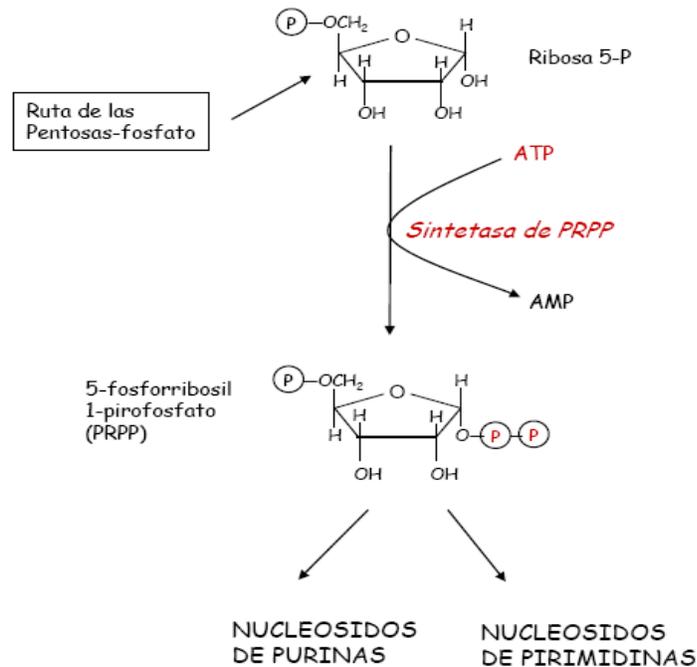


Figura 5. El fosforribosil-pirofosfato, molécula clave en el metabolismo de nucleótidos se sintetiza a partir de la ribosa 5-fosfato (León, 2005).

2.1. Biosíntesis de novo de nucleótidos de purina.

La síntesis *de novo* conlleva a la síntesis de nucleótidos purínicos precursores de los ácidos nucleicos que son la adenosina 5'-monofosfato (AMP; adenilato) y la guanosina 5'-monofosfato (GMP; guanilato) que contienen las bases púricas adenina y guanina (Lehninger, 2000). En el primer paso comprometido de la vía, un grupo amino proporcionado por la glutamina se une al C-1 del PRPP, una forma activada de la ribosa que acepta bases de nucleótidos. (Figura 6). El PRPP es usado tanto para la síntesis de novo como para la vía de salvamento de nucleótidos de purina y pirimidina, también para síntesis de NAD, histidina y triptofano. Dentro de la naturaleza esencial del PRPP, todos los organismos de vida libre contienen al menos un gen que codifica para la PRPP sintetasa (PRS; EC 2.7.6.1).

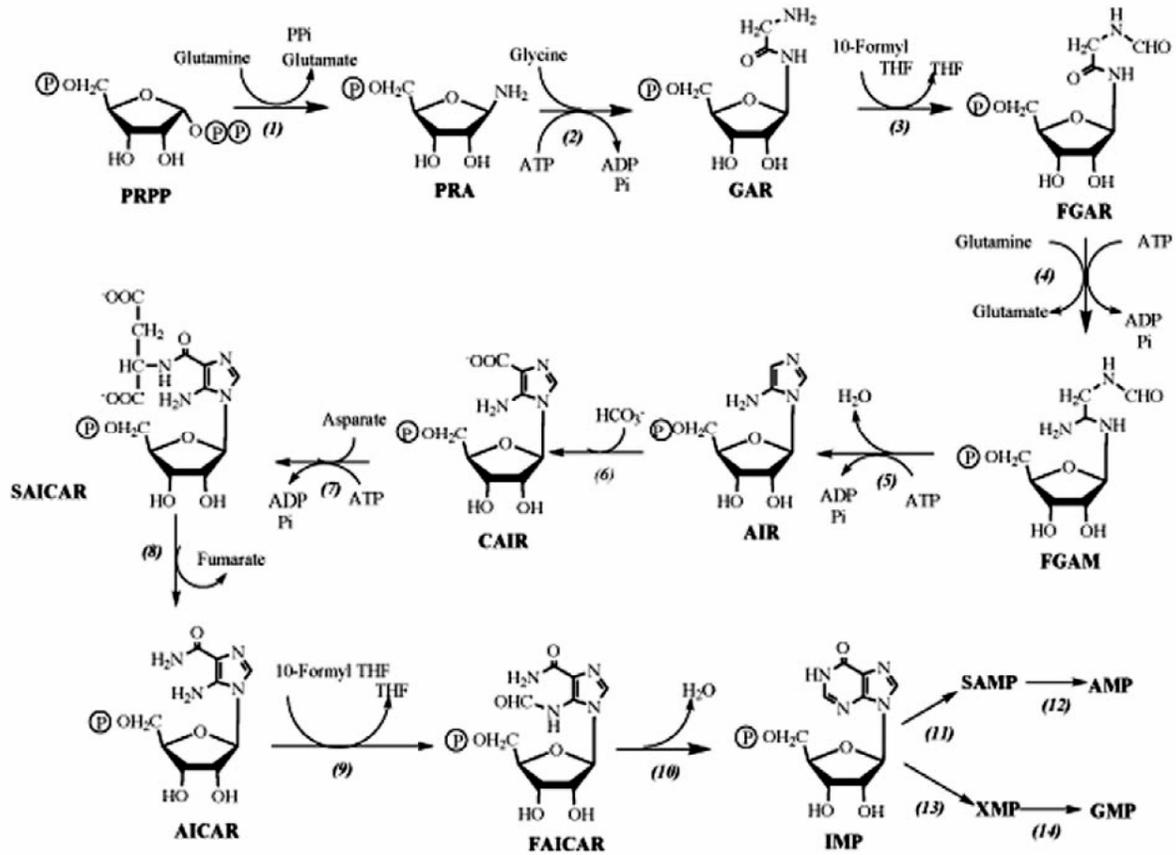


Figura 6. Biosíntesis de novo de nucleótidos de purina en plantas. Las enzimas que se muestran son: amidofosforribosiltransferasa, (2) GAR sintetasa, (3) GAR formiltransferasa, (4) FGAM sintetasa, (5) AIR sintetasa, (6) AIR carboxilasa, (7) SAICAR sintetasa, (8) adenilosuccinato liasa, (9) AICAR formiltransferasa, (10) IMP ciclohidrolasa, (11) SAMP sintetasa, (12) adenilosuccinasa, (13) IMP deshidrogenasa, (14) GMP sintetasa.

En células animales la glutamina-PRPP amidotransferasa o PRPP amidotransferasa (Atasa o PRAT; EC 2.4.2.14), cataliza la primera reacción en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y es sensible a la regulación por retroalimentación por ribonucleótidos de purina producidos en la vía de salvamento. La inhibición de la Atasa (PRPP) en cultivos de fibroblastos regulan no sólo la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina sino también la síntesis de DNA y proteínas y por lo tanto el crecimiento celular. Se tienen reportes en plantas en donde la Atasa es sensible a la regulación por retroalimentación, aunque este metabolismo no ha sido examinado completamente.

Los próximos 9 pasos en la biosíntesis de nucleótidos de purina llevan a la síntesis de IMP, la conversión de IMP a XMP es un paso limitante en la síntesis de novo de nucleótidos de guanina y son catalizados por la IMP deshidrogenasa (IMPDH o PUR13; EC 1.1.1.205) (Moffatt, 2002).

Son tres mecanismos principales de retroalimentación que cooperan en la regulación de la velocidad global de síntesis de novo de los nucleótidos purínicos y de la velocidad relativa de formación de los dos productos finales, adenilato y guanilato.

El primero de estos mecanismos de control se ejerce sobre la primera reacción específica de la síntesis de purinas, la transferencia de un grupo amino al PRPP para formar la 5-fosforribosilamina. Esta reacción está catalizada por la enzima alostérica glutamina-PRPP amidotransferasa, que es inhibida por los productos finales IMP, AMP y GMP. Estos últimos nucleótidos también inhiben la síntesis de PRPP a partir de ribosa fosfato, catalizada por la ribosa fosfato pirofosfocinasa. El AMP y el GMP actúan de manera sinérgica en esta inhibición concertada. Así pues, siempre que el AMP o el GMP se acumulan en exceso, el primer paso de su biosíntesis a partir de PRPP se inhibe parcialmente.

En el segundo mecanismo de control, que se ejerce más adelante, un exceso de GMP en la célula inhibe la formación de xantilato a partir de inosinato, catalizada por la IMP deshidrogenasa, sin afectar a la formación de AMP. Por el contrario, una acumulación de adenilato inhibe la formación de adenilosuccinato por la adenilosuccinato sintetasa, sin afectar a la síntesis de GMP. En el tercer mecanismo, el GTP es necesario para la conversión de IMP en GMP, un control recíproco que tiende a equilibrar la síntesis de los dos ribonucleótidos (**Lehninger, 2000**).

2.2. Vía de Salvamento de nucleótidos de Purina.

La vía de salvamento interconvierte bases de purina, nucleósidos y nucleótidos liberados como producto del metabolismo celular o del catabolismo de ácidos nucleicos. Esta estrategia de síntesis de nucleótidos de purina es energéticamente favorable para la célula ya que sólo una de las reacciones que se llevan a cabo requiere ATP (fosforilación de nucleósidos a nucleótidos).

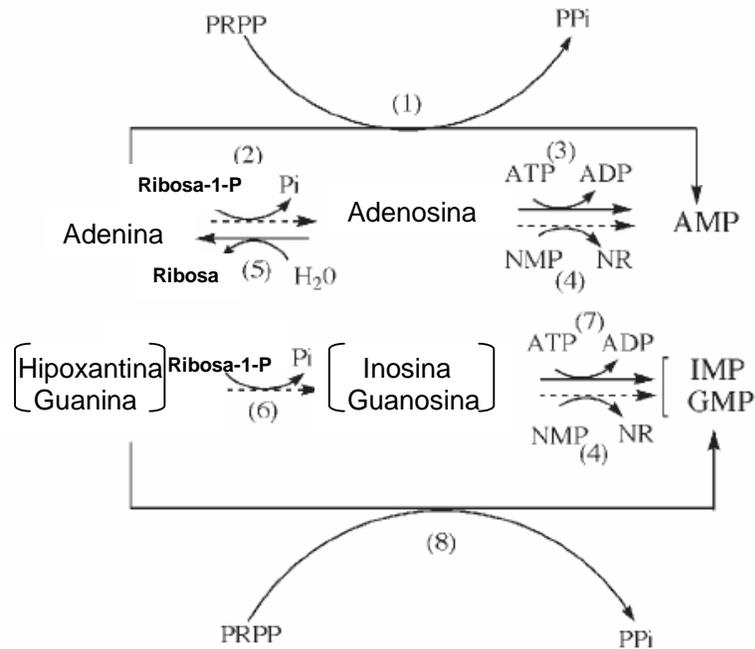


Figura 7. Reacciones involucradas en la vía de salvamento de nucleótidos de purina. Las enzimas que se muestran son: (1) Adenina fosforibosiltransferasa, (2) Adenosina fosforilasa, (3) Adenosina cinasa, (4) Adenosina fosforilasa, (5) Nucleósido nucleosidasa, (6) Inosina-Guanosina fosforilasa, (7) Inosina-guanosina cinasa, (8) Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Moffatt, 2002).

Una de las vías primarias de recuperación consiste en la reacción catalizada por la adenosina fosforribosiltransferasa, en la que la adenina libre reacciona con el PRPP para generar el correspondiente nucleótido de adenina:



La guanina libre y la hipoxantina (el producto de desaminación de la adenina) se recuperan de la misma forma por la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.

3. Biosíntesis de novo de nucleótidos de pirimidina.

La síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina también es conocida como la ruta del orotato y usualmente se define como la formación de UMP a partir de carbamil fosfato. Aunque la secuencia de eventos de biosíntesis de nucleótidos de pirimidina es esencialmente la misma en animales y microorganismos, en plantas la organización, el mecanismo de control y la localización subcelular de estas enzimas a través de esta ruta es diferente. La vía del orotato consiste de seis reacciones (**Figura 2**). La reacción inicial es catalizada por la carbamoil fosfato sintetasa (CPS) para formar carbamoil fosfato por combinación con el carbonato, ATP y el grupo amino de la glutamina. Tres reacciones adicionales son necesarias para formar el anillo de pirimidina que se une al C-1 del PRPP para formar el orotato de pirimidina. Esta reacción es catalizada por la orotato fosforribosil transferasa que descarboxila al sustrato para formar UMP, el primer nucleótido de pirimidina. El UMP es subsecuentemente fosforilado a UDP y UTP. La transferencia del grupo amino de la glutamina al UTP por la CTP sintetasa conlleva a la síntesis de CTP.

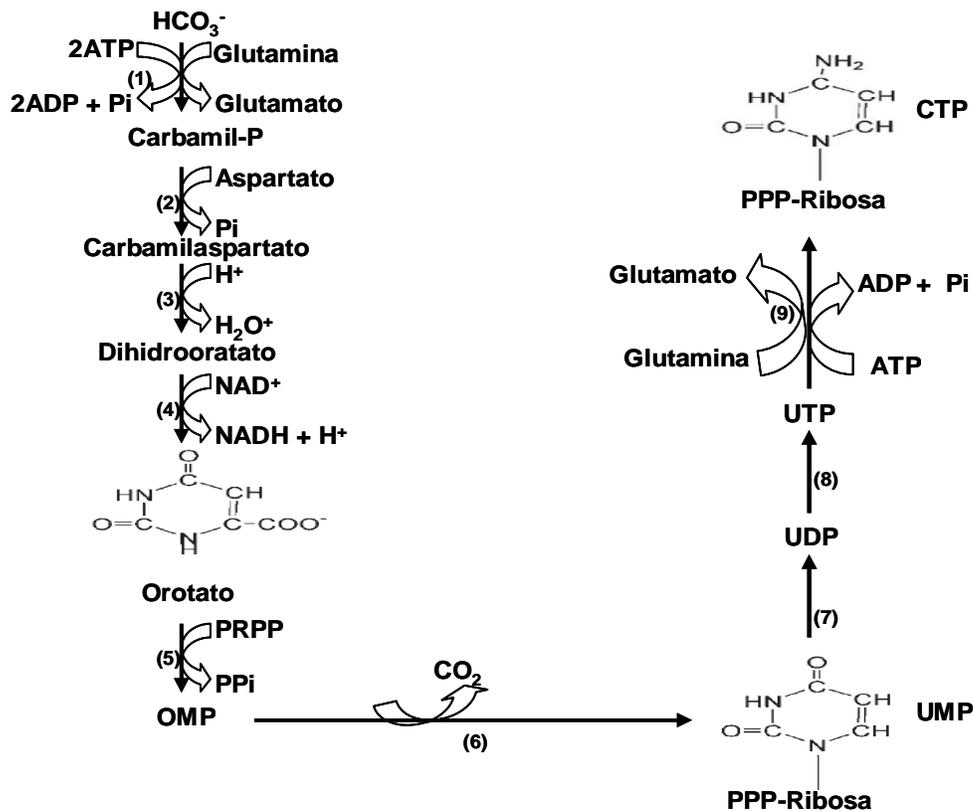


Figura 8. Síntesis de nucleótidos de pirimidinas en plantas. Las enzimas que se muestran son: (1) Carbamoil fosfato sintetasa,(2) Aspartato transcarbamilasa,(3) Dihidroorotasa,(4) Dihidroorotato deshidrogenasa, (5) UMP sintasa, (6) Oritidina-5'-fosfato descarboxilasa, (7) UMP cinasa,(8) Nucleósido difosfato cinasa, (9) CTP sintetasa (**Moffatt, 2002**).

3.1. Vía de Salvamento de nucleótidos de Pirimidina.

Además de la síntesis *de novo* de nucleótidos, en todos los organismos existen rutas de salvamento que reutilizan los nucleótidos y las bases libres, producto de la degradación de ADN, ARN y nucleótidos monofosfato. A diferencia de la semejanza reportada entre las rutas biosintéticas de purinas y pirimidinas entre plantas y animales, las rutas de salvamento son más diversas entre estos organismos (Sugiura y Takeda, 2000).

Dado que la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina consume precursores de alta energía en forma de ATP y GTP, se ha propuesto que las células de plantas reutilizan las bases de pirimidina y nucleósidos derivados de nucleótidos previamente formados para reciclarlos a nucleótidos trifosfato (Moffatt, 2002).

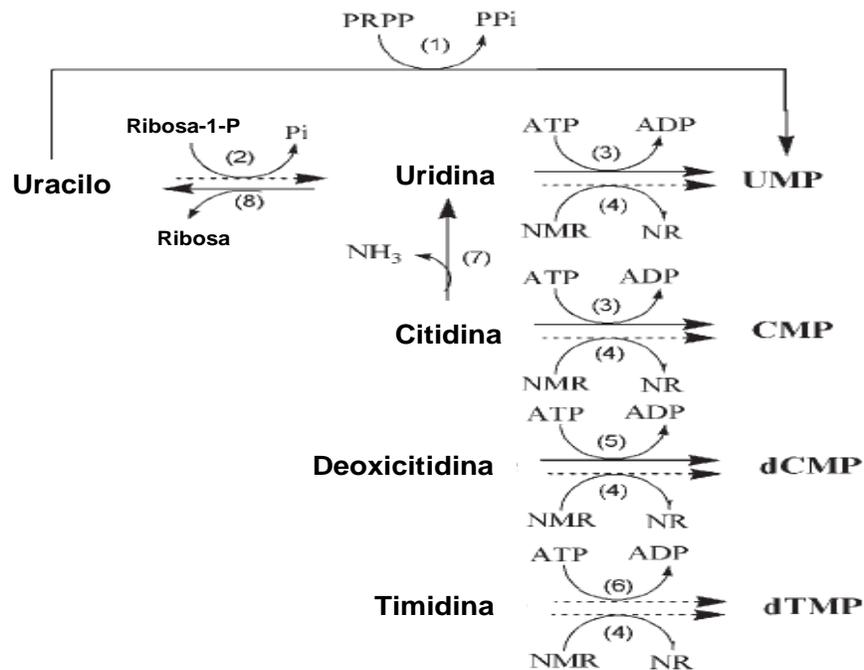
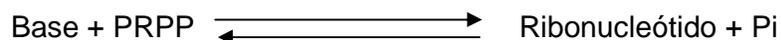


Figura 9. Salvamento de nucleótidos de pirimidina y vías relacionadas en plantas. Las enzimas que se muestran son: (1) Uracilo fosforibosil transferasa, (2) Uridina fosforilasa, (3) Uridina cinasa, (4) Nucleósido fosfotransferasa, (5) Deoxicitidina cinasa, (6) Timidina cinasa, (7) Citidina deaminasa, (8) Uridina nucleosidasa (Moffett, 2002).

La ruta de salvamento de nucleótidos se clasifica en dos categorías:

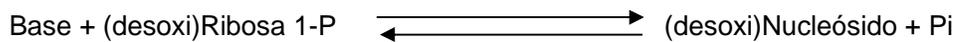
- (a) Reacciones de un paso catalizadas por la fosforibosiltransferasa. En este tipo de reacciones el PRPP proporciona a la base tanto el azúcar como el grupo fosfato.



Esta reacción es reversible en presencia de pirofosfatasa, la cual se encuentra en los plastidios pero no en el citosol de células de plantas.

(b) Reacciones de dos pasos catalizadas por una enzima nucleósido fosforilasa o una nucleósido cinasa respectivamente. En este tipo de reacciones primero se incorpora el azúcar y posteriormente el ATP es el donador del grupo fosfato, ambos necesarios para la síntesis del nucleótido (**Sugiura y Takeda, 2000**).

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



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

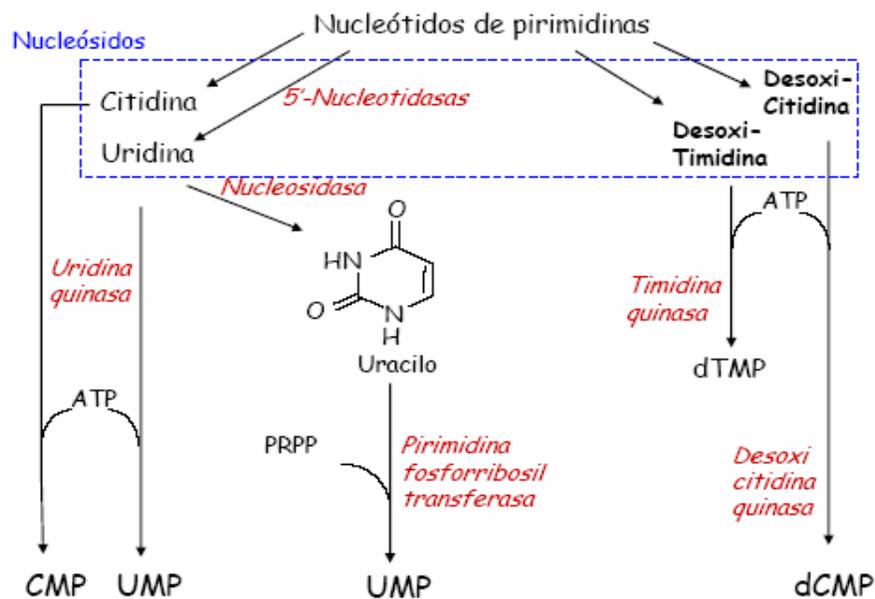
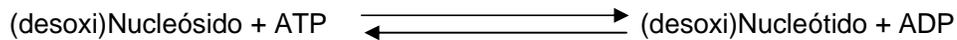


Figura 10. Recuperación de nucleótidos de pirimidina (UC J. León, 2005).

Se ha sugerido que las enzimas de las vías de salvamento pueden tener una función en el establecimiento de los niveles de las pozas de nucleótidos, mediante su participación en ciclos fútiles que regulen el flujo de desoxiribonucleósidos hacia dentro y fuera de la célula (**Reichard, 1998**). Actualmente, no existe evidencia que asegure que ambos tipos de reacciones ocurren *in vivo* en todos los organismos (**Sugiura y Takeda, 2000**).

4. Función de la Timidina cinasa en la ruta de salvamento de nucleótidos.

La desoxitimidina cinasa (dThd cinasa; ATP-timidina 5'-fosfotransferasa, EC 2.7.1.21) es una enzima de la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina la cual cataliza la fosforilación de dThd para formar dTMP en presencia de ATP y un catión divalente como el Mg^{2+} (**Lee y Cheng, 1976**). En células de eucariontes existen 2 isoenzimas: TK1 y TK2, con distinta localización celular. La TK1 es citosólica y sus niveles y actividad incrementan significativamente en células durante la transición de G1 a la fase S. En cambio, la TK2 se localiza en la mitocondria y sus niveles de expresión son bajos además de que su regulación no depende del ciclo celular (**Chang et al., 1998**).

La TK1 humana es una proteína de 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25.5 kDa y forma un homodímero con baja afinidad por la timidina (K_m 15-30 μ M) pero sufre una transición dependiente de ATP para formar un homotetrámero de alta afinidad (K_m 0.5-0.7 μ M para dThd) (**Markus et al., 2006**).

La secuencia de aminoácidos de esta enzima (TK1) en células de mamíferos es conocida y se muestra considerablemente similar a la de otras especies. Aunque es interesante hacer notar que la región del carboxilo terminal muestra una gran diferencia entre las diferentes especies. Esta parte de la molécula no juega un papel importante en la actividad de la enzima, sin embargo, si es de gran importancia en la regulación de la estabilidad de la proteína (**Wintersberger, 1997**).

La expresión de la TK citoplásmica es altamente regulada a través del ciclo celular. Su actividad es muy baja en células en estado quiescente, pero se incrementa en la transición de la fase G1/S. También se han reportado niveles máximos en el comienzo de la fase S que posteriormente decae en la fase G2 y M exhibiendo bajos niveles de TK (**Wintersberger, 1997**).

5. Actividad de la Timidina cinasa.

En células de mamíferos se ha observado una correlación entre la actividad de la timidina cinasa y el estado de proliferación, pues la actividad enzimática se incrementa durante la fase S, cuando ocurre la síntesis de DNA. Varias investigaciones han mostrado que los cambios en el mRNA de TK1 durante el ciclo celular son insuficientes para poder explicar las fluctuaciones pronunciadas en la actividad de la enzima. Esto indica que las modificaciones a nivel traduccional y postraduccional son predominantes en la actividad de la timidina cinasa durante el ciclo celular. Recientemente se ha demostrado que los

residuos de aminoácidos cercanos al C-terminal son responsables de la degradación de la TK1 en la transición de la fase G2/M y que las mutaciones en esta parte del gene permiten la expresión en las células en fase G0 (**Sherley y Kelly, 1998**).

6. Regulación de la Timidina cinasa.

La expresión de la TK1 es regulada durante la transición de G1/S a través de un incremento a nivel transcripcional y traduccional, ya en la fase de mitosis esta proteína es degradada, pues ya no se requiere su presencia para la síntesis de DNA pues ésta se ha completado. Durante la fase S la expresión de esta enzima es necesaria para suplir los dTTP necesarios para la síntesis de DNA y la regulación de ésta es importante una vez completada la síntesis de DNA pues ya no se requieren dTTP ya que se ha entrado en la fase G2/M (**Li et al., 2004**).

Los niveles de proteína y actividad para TK no se detectan con facilidad en células terminalmente diferenciadas. Sin embargo, en células en proliferación esta enzima se encuentra altamente expresada y con altos niveles de actividad cuando las células se encuentran en la transición G1/S. El incremento en la expresión de TK es mediada por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. La transcripción es regulada por un complejo proteínico específico en el cual se encuentra involucrado el factor E2F. Al parecer, la expresión de mRNA es dependiente de eventos específicos de crecimiento a diferentes niveles post-transcripcionales. Se ha demostrado que la expresión de TK humana en células quiescentes es regulada a nivel post-transcripcional, en este mecanismo de regulación se encuentra involucrado el extremo carboxilo terminal. También se ha demostrado que existen bajos niveles de la proteína TK durante la fase G1 del ciclo celular y durante la diferenciación, estos resultados muestran que existe represión en la síntesis de la proteína TK. Al parecer esta reducción en la expresión de TK se debe a la degradación ocurrida durante la mitosis. La región del C-terminal del polipéptido de TK1 es determinante para su estabilidad, en células en diferentes estados de crecimiento se ha observado una degradación dependiente del ciclo celular involucrado en la regulación de la expresión de TK1 (**Chang et al., 1998**). Se ha demostrado previamente la inhibición por retroalimentación de TK ocasionada por la unión de dTTP a la TK. Esta unión puede producir un cambio conformacional en la proteína influenciando su degradación (**Sutterluety, 1997**). Recientemente se ha encontrado un discreto decremento en la eficiencia de la traducción con una drástica reducción en la estabilidad de la enzima esto se ve reflejado en los bajos niveles de TK en

células quiescentes. Otros mecanismos, incluyendo la transcripción, el procesamiento de RNA, la traducción y la estabilidad de la enzima, así como modificaciones postraduccionales por fosforilación, aseguran que los niveles enzimáticos de TK son bajos en las células durante la transición G1/S del ciclo celular. Esta enzima se expresa en niveles muy bajos, en células en fase G0 debido a la baja eficiencia de la traducción y a su corto tiempo de vida media.

La TK1 puede ser fosforilada en células humanas promieloleucémicas en respuesta a una estimulación durante el crecimiento. Cuando las células se encuentran detenidas en la fase M por tratamiento con nocodazol, la TK1 es hiperfosforilada y el análisis de fosfoaminoácidos de la TK1 inmunoprecipitada revelan que existen varios posibles sitios de fosforilación por una variedad de proteínas cinasas de serina/treonina por lo cual se ha reportado que el sitio de fosforilación mitótica es primordialmente la Ser-13 por una cinasa dependiente de ciclina durante el arresto mitótico (**Chang et al., 1998**). Además de la regulación de su expresión, la actividad enzimática se encuentra regulada por su estado de oligomerización. Se ha encontrado que el residuo Ser-13 de la TK1 es el sitio de fosforilación mitótica llevada a cabo por la cdc2 cinasa. A lo largo de esta línea de evidencia, se ha especulado que la fosforilación de la serina-13 de TK1 en la fase G2/M puede tener un efecto funcional en la afinidad de TK1 por la timidina, esto se logró sustituyendo a la serina-13 por un ácido aspártico para mimetizar la fosforilación. Dado que el ATP es un regulador positivo del comportamiento catalítico de TK1 y siempre está presente en las células, se examinó el efecto activador en la enzima silvestre y en la mutante. La preincubación de ambas enzimas con 0-5 mM de ATP por 20 minutos provocó un incremento en la actividad de 50-100% únicamente en la enzima silvestre. En contraste, se observó sólo un ligero incremento en la actividad de la enzima mutante S13D. Como la TK1 no se encuentra fosforilada es probable que siempre se active por el ATP a nivel intracelular, este efecto no se observa cuando la Ser-13 es sustituida con ácido aspártico. Esto se reflejó en la afinidad por la timidina pues la Km para este sustrato en la enzima silvestre es de 0.54 μM , mientras que para la mutante es de 5.96 μM .

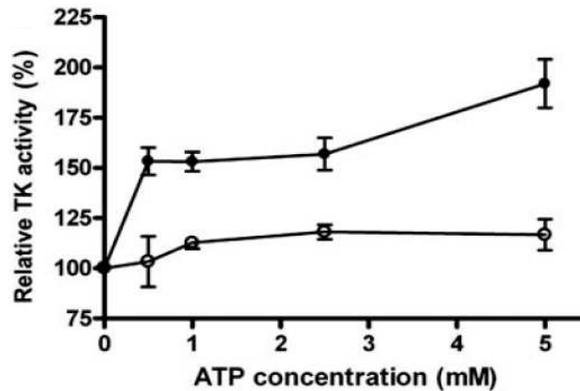


Figura 11. Efecto del ATP en la actividad de la enzima silvestre y en la enzima mutante S13D (Li et al., 2004).

En ausencia de ATP la TK1 se encuentra predominantemente en forma dimérica con una baja afinidad por la timidina, en contraste, se ha encontrado que la preincubación de la enzima purificada con ATP induce la formación de un tetrámero incrementándose así la actividad catalítica (Li et al., 2004).

Aunque las diferentes células exhiben una regulación similar en la expresión del gene de TK los promotores del gen de la misma difieren de manera importante en distintos organismos. Algunos de estos tienen cajas TATA, pero otros carecen de este elemento. Otros promotores tienen cajas GC, sitios de unión al factor de transcripción Sp1, y también cuentan con un sitio de unión al factor de transcripción E2F que es regulado durante el ciclo celular (Wintersberger, 1997).

Cuando las enzima silvestre y la mutante S13D se preincubaron con ATP y se aplicaron cada una en igual concentración en una columna Superdex-200 de exclusión molecular en presencia y ausencia de ATP, se encontró que el peso molecular aparente determinado para la enzima silvestre es de 100 KDa lo que es consistente con la formación de un tetrámero en presencia de ATP. En contraste, la mutante S13D eluye con un peso aproximado a los 50 KDa bajo las mismas condiciones experimentales, lo cual sugiere que se encuentra en forma dimérica. Ambas fracciones purificadas fueron sometidas a un análisis cinético y se muestra una K_m de 14 μM para el dímero y 0.9 μM para el tetrámero por la timidina. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente (Fig. 12); (Munch-Petersen, et al. 1993) para dímero y tetrámero de TK1 purificada de linfocitos obteniéndose una K_m de 15 y 0.7 μM por la timidina respectivamente (Li, et al., 2004).

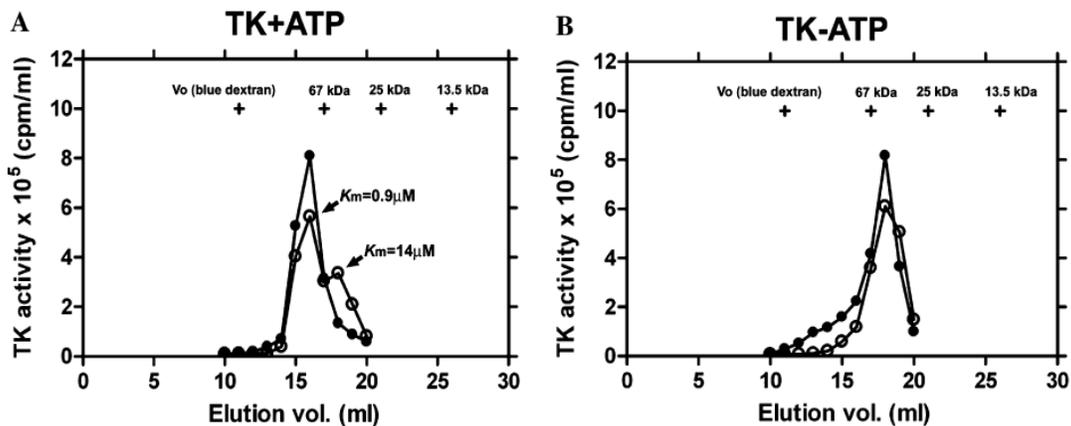


Figura 12. Cromatografía de Exclusión Molecular de la enzima silvestre y la mutante S13D. A) Cromatografía de exclusión molecular con ATP. B) Cromatografía de exclusión molecular sin ATP. Enzima silvestre (●) y S13DTK1 (○) (Munch-Petersen, et al. 1993).

Timidina cinasa en plantas.

En plantas se han reportado las secuencias genómicas o de cDNA de timidina cinasa de tres especies; *Arabidopsis thaliana*, de arroz (*Oryza sativa*) y de maíz (*Zea mays*) (Suzuri, 2001). Esta última ha sido aislada en nuestro laboratorio y constituye una secuencia de 840 nucleótidos cuyo único marco de lectura codifica una secuencia peptídica de 280 aminoácidos y en la que se identificaron dominios de unión para timidina, para el catión Mg^{2+} y para ATP. Muestran un 90% de identidad entre ellas y un 46% de identidad con la enzima humana; sin embargo no conservan el residuo de valina responsable para la tetramerización reversible dependiente de ATP (Nájera-Martínez et al., 2007). Cuando se empleó este cDNA como sonda en experimentos de Northern blot, se encontraron niveles más altos de expresión en RNA total proveniente de meristemas de embriones de maíz después de 12 horas de imbibición (Suzuri, 2001), que precede a la mayor incorporación de nucleótidos marcados al DNA. Asimismo, hemos determinado la actividad de la enzima en extractos de embriones de maíz durante la germinación y se ha detectado la actividad máxima a estos tiempos (Suzuri et al, 2006, Fig. 13).

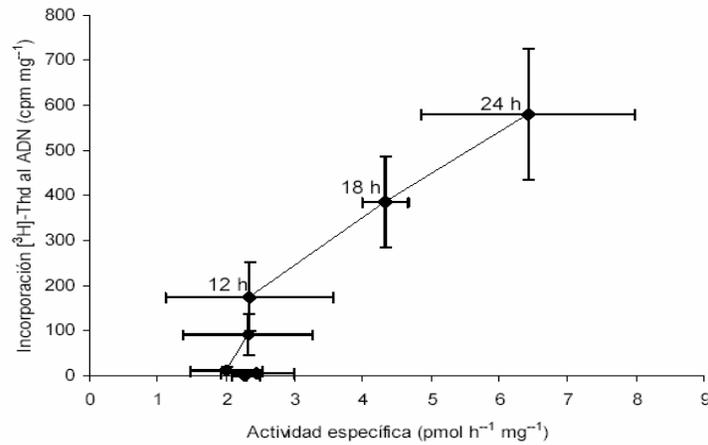


Figura 13. Correlación entre la síntesis de ADN y la actividad de la TK1 durante las primeras 24 horas de imbibición de embriones de maíz. Los últimos tres puntos corresponden a 12, 18 y 24 horas de imbibición.

Sin embargo no se puede hacer una asociación entre la actividad enzimática y los niveles de proteína. Lo cual sugiere que esta enzima se encuentra regulada a nivel post-traducciona, es decir por efecto de la oligomerización (**Suzuri-Hernández, 2006**).

Hipótesis

Dado que la actividad de Timidina Cinasa se incrementa sin que se observe aumento en los niveles de proteína, la regulación de su actividad se puede dar por algún mecanismo post-traduccional.

Objetivo General.

Obtener una preparación purificada de la Timidina Cinasa de maíz.

Objetivos Particulares.

- 1. Determinar el tejido y estadio de desarrollo en el cual se detecte una alta actividad de *Timidina cinasa*.**
- 2. Desarrollar un protocolo para la purificación de la actividad enzimática.**
- 3. Determinar el estado de oligomerización de la enzima purificada y relacionarlo con su actividad.**

Materiales y Métodos

1. Material Biológico.

Semillas de maíz, raza “Chalqueño”, obtenidas en Chalco, Edo. de México, cosechas 2004 y 2005.

2. Desinfección e imbibición de semillas de maíz.

Para la desinfección de las semillas se preparó una dilución 1:10 de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) en agua destilada estéril, resultando en una concentración final de aproximadamente 0.5% de hipoclorito. Las semillas se sumergieron en 100 mL de la solución desinfectante, se agitaron durante 2 minutos y la solución se decantó para sustituir con 200 mL de H₂O estéril para enjuagar las semillas por 1 minuto. Se realizaron un total de 4 lavados con agua estéril. Las semillas se dejaron secar en papel filtro o bien en una hoja de papel secante y se imbibieron en agar al 1% colocándolas sobre la superficie del medio.

Para los experimentos con embriones de maíz, estos se disecaron manualmente de la semilla y se desinfectaron como se indica arriba.

3. Determinación de toma de agua, porcentaje de germinación y elongación.

a) Determinación de toma de agua y porcentaje de germinación en embriones de maíz.

Para la determinación de toma de agua se pesaron 20 embriones de maíz, se desinfectaron y se imbibieron en placas de agar al 1% a 28°C durante distintos periodos de tiempo (3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas). A cada tiempo se determinó el número de embriones germinados y la acumulación de peso húmedo según la siguiente fórmula:

$$\text{Acumulación de Peso Húmedo} = (\text{Peso germinado} - \text{Peso seco}) / \text{Peso seco}$$

b) Porcentaje de germinación en semillas de maíz y elongación radicular.

Para la determinación del % de germinación y elongación radicular se tomaron 30 semillas de maíz, se desinfectaron y se imbibieron en placas de agar al 1% a 28°C durante distintos periodos de tiempo (15, 18, 24, 48 y 36 horas). A cada tiempo se determinó el número de semillas germinadas y se midió la longitud de la radícula. Se consideró una semilla germinada cuando presentó emergencia de estructuras (Moreno, 1984).

4. Extracción y Cuantificación de Proteínas.

a) Antecedentes.

Las proteínas solubles se extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Nájera Martínez (2001). Dicho protocolo se adaptó, como se detalla a continuación con el fin de inmunodetectar a la TK por ensayos de Western Blot y determinar su actividad enzimática.

b) Extracción de Proteínas.

- 1) Pesar y colocar el tejido , aproximadamente 8.0 g, en un mortero, congelar con nitrógeno líquido.
- 2) Macerar el tejido y adicionar 10 ml de solución amortiguadora de homogenización **(Apéndice)** (aproximadamente 10 ml por 8.0 g de tejido), para resuspender.
- 3) Transferir con una micropipeta, y si es necesario con una espátula, la suspensión a tubos eppendorf de 2.0 ml.
- 4) Dejar reposar de 30 a 60 minutos en hielo.
- 5) Centrifugar a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C (Centrífuga Jouan MR 1812).
- 6) Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml cuidando de no tomar la capa superficial compuesta por lípidos.
- 7) Separar una alícuota de 20 µl para cuantificar proteínas totales.

c) Cuantificación de proteína por el método de Bradford. (2000, UNAM p.43)

Para cuantificar el contenido de proteína de las muestras:

- 2.5 µl de extracto proteico
- 200 µl de reactivo de Bradford. (Bio- Rad, Protein-assay #500-006)
- 797.5 µl de H₂O desionizada.

Para la curva patrón de albúmina:

- 1) Se prepara una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA), disolviendo 3 mg de BSA en 1 ml de H₂O.
- 2) La curva se prepara como sigue:

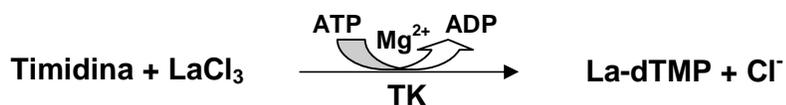
Tubo	Muestra (µg BSA)	µl stock BSA (3 mg/mL)	Reactivo de Bradford (µl)	H ₂ O
1	Blanco 1	-	-	1000
2	Blanco 2	-	200	800
3*	Blanco 3	-	200	798.33
4	3	1	200	799
5	6	2	200	798
6	9	3	200	797
7	12	4	200	796
8	15	5	200	795
9	18	6	200	794
10	21	7	200	793
11	24	8	200	792
12	27	9	200	791
13	30	10	200	790

*Nota: al blanco 3 hay que adicionarle 1.67 µl de amortiguador de homogenización.

- 3) Agitar en vortex, transferir a la cubeta y medir la absorbancia de las muestras de la curva y las muestras experimentales a 595 nm, en un espectrofotómetro (Shimadzu UV160U).

5. Determinación de Actividad enzimática TK de maíz.

Se siguió el protocolo reportado por Wolcott y Colacino (1989) que se basa en la precipitación de fosfatos de lantano que son insolubles en agua. Una vez formado el nucleótido monofosfato mediante la catálisis de la Timidina cinasa (TK) en una reacción dependiente de ATP y Mg^{2+} éste precipitará al adicionar $LaCl_3$ y se podrá cuantificar posteriormente la timidina tritiada ([metil- 3H]-Timidina) fosforilada en un contador de centelleo (BECKMAN LS6000IC). Este principio ha sido usado exitosamente para separar los metabolitos intracelulares de la timidina.



Método.

Preparación del buffer de reacción.

Este buffer debe prepararse inmediatamente antes de realizar el ensayo (Nota: por cada reacción se utilizan 500 μ l de amortiguador).

- 1) Transferir 10 ml de la solución de reacción (Tris 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM) a un tubo Falcon[®].
- 2) Añadir 55.1 mg de ATP (conc. Final 10 mM) a la solución de reacción.
- 3) Añadir 1.43 μ l de 2-mercaptoetanol (concentración final 2 mM).

Preparación de las muestras.

1) Preparar las muestras según la siguiente tabla:

	Proteína (μ l)	H ₂ O (μ l)	Buffer de reacción (μ l)	Thd* [5 mCi] (μ l)	Thd [1 mM] (μ l)	Tris [50 mM] (μ l)
Blanco	x	x	500	37.5	1.25	461.25
Muestras	¿?	c.b.p. 1000	500	37.5	1.25	x

La concentración final de Thd total (marcada y no marcada) es 2 μ M.

La concentración final de Thd no marcada es 1.25 μ M.

La concentración final de Thd marcada es 0.75 μ M.

La solución blanco es Tris-HCl 50 mM pH 7.4.

La concentración de la solución stock de Thd fría es 1 mM.

- 2) Una vez preparadas las muestras, incubarlas a 37°C por 2 ho ras.
- 3) Preparar tubos eppendorf de 2 mL con 1 mL de solución de precipitación (LaCl₃ 100mM, trietanolamina 5 mM).
- 4) Transferir 100 μ L de cada muestra de la reacción al tubo con la solución de precipitación.
- 5) Agitar en vortex por 10 segundos.
- 6) Centrifugar (SORVALL MC12) a 4°C y 1600 rpm dura nte 10 minutos.
- 7) Eliminar el sobrenadante por decantación y adicionar 1 mL de solución de precipitación. Agitar en vortex 10 segundos.
- 8) Centrifugar (SORVALL MC12) a 4°C y 1600 rpm, dur ante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante por decantación.
- 9) Disolver el botón en 300 μ l de HCl 0.05N y agitar en vortex por unos segundos.
- 10) Transferir el contenido a un vial de centelleo que contenga 3 mL de líquido de Bray (Apéndice).
- 11) Determinar las cpm en el contador de centelleo (BECKMAN LS6000IC) durante 1 minuto por cada muestra.

6. Purificación de la proteína.

a) Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio.

Principio.

Este protocolo para la precipitación de proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se basa en la deshidratación del microambiente de las proteínas que están en solución. Un gran número de moléculas de agua forman puentes de hidrógeno con el ion sulfato (SO_4^{2-}) reduciendo la cantidad de agua disponible para interactuar con las moléculas de proteína. A una determinada concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se reduce el número de moléculas de agua con las que la proteína se puede unir para mantenerse en solución y por lo tanto precipita. **(Bollag et al., 1996)**

Método.

- 1) Mantener la solución de proteínas (aproximadamente 10 mL) a 4°C con agitación suave y constante.
- 2) Agregar el sulfato de amonio (1.76 g a 10 mL) para alcanzar una concentración de 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradualmente hasta su disolución.
- 3) La agitación continúa durante toda la noche a 4°C.
- 4) Centrifugar a 13000 rpm (SORVALL MC12) durante 30 minutos a 4°C.
- 5) Separar las dos fracciones: la fracción precipitada y el sobrenadante.
- 6) La fracción precipitada se resuspende en aproximadamente 2 volúmenes de buffer de equilibrio y se determina actividad enzimática.
- 7) Al sobrenadante se le adiciona una vez su volumen en buffer de equilibrio **(Apéndice)** y se inyecta en un filtro AMICON® con capacidad de 10 KDa con el fin de eliminar el sulfato de amonio y concentrar a la proteína.
- 8) Una vez concentrada la proteína y determinada su concentración se prosigue al siguiente paso.

b) Cromatografía de Exclusión Molecular.

Principio.

Mediante esta técnica se separan proteínas en base a sus diferencias en tamaño o peso molecular. Se usa una columna empacada con una resina como la Sepharosa[®], mediante la cual las moléculas pequeñas pueden entrar en las esferas de la resina antes mencionada, mientras que las moléculas más grandes se localizan solamente en la disolución entre las esferas de la resina (**Figura 14**). Las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de esta columna y salen antes por que disponen de un volumen accesible menor, mientras que las moléculas más pequeñas eluyen al final, ya que quedan atrapadas entre las esferas de la Sepharosa[®] (**Stryer, 2002**).

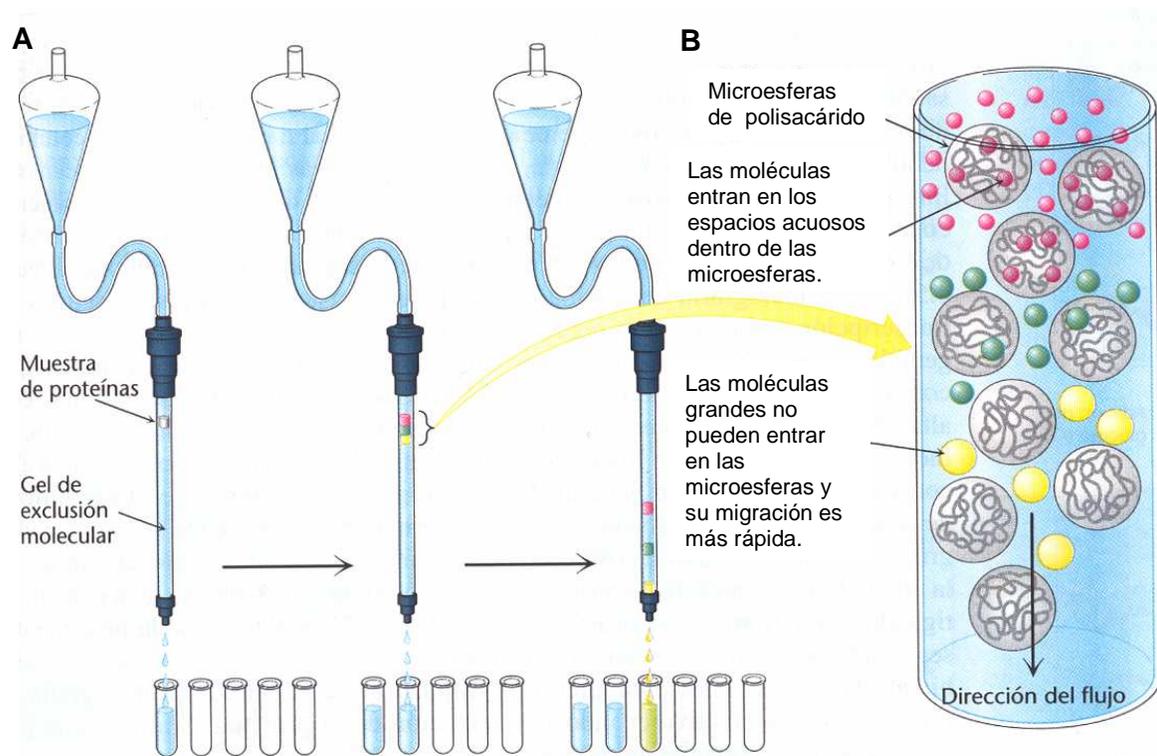


Figura 14. Cromatografía de Exclusión Molecular. Una mezcla de proteínas en un volumen pequeño se coloca en una columna rellena de resina. Como las proteínas grandes no pueden penetrar en el volumen interno de las esferas de resina, se eluyen antes que las pequeñas (**Stryer, 2002**).

Método.

Se usó una columna analítica Sephacryl S-200 de 70 cm de altura y 1.0 cm de diámetro. El equipo utilizado fue un FPLC de Bio-Rad modelo Automated Econo System con un detector Econo UV monitor modelo EM-1 que es parte del mismo equipo.

- 1) La columna se equilibró con 100 ml de buffer de fosfatos (Apéndice), con un flujo de 0.7 ml/min.
- 2) Una vez equilibrada la columna se realizó la calibración con los siguientes marcadores de peso molecular:

Marcador	Mr (Kda)
Azul Dextran	2000
Ferritina	440
Catalasa	232
Aldolasa	158
Albúmina	67
Ovoalbúmina	43
Quimiotripsinógeno	25

Los marcadores se inyectan a la columna en pares (uno de bajo peso molecular con uno de alto peso molecular), exceptuando a la albúmina que se inyecta sola, para que no interfiera en la detección.

- 3) Una vez calibrada la columna, se inyectó la muestra de proteína previamente concentrada (2.7 mg en 1.5 mL) en tubos AMICON® DE 10KDa.
- 4) Las fracciones se eluyen con el buffer de fosfatos inicial (**APÉNDICE**).
- 5) Se colectaron 50 fracciones de aproximadamente 5.0 mL cada una, para su posterior determinación de proteína y actividad.

c) Cromatografía de Intercambio Aniónico.

Principio.

Las proteínas se separan basándose en su carga neta. Una proteína cargada negativamente se une a una resina cargada positivamente, a esta columna puede eluirse incrementando la concentración de NaCl u otra sal en el amortiguador de elución por que los iones sodio compiten con los grupos de la proteína cargados negativamente para unirse a la columna. Las proteínas con densidad baja de cargas negativas netas tenderán a eluir primero, seguidas por las que tienen una densidad de carga mayor (Stryer, 2002).

PRINCIPIO DE LA CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

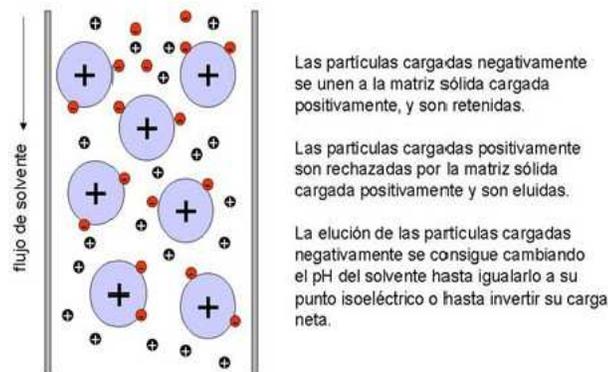


Figura 15. Cromatografía de Intercambio Iónico. Separación de proteínas basada en su carga neta. (Stryer, 2002).

Método.

Se usó una columna de DEAE-SEPHACEL[®] (SIGMA-ALDRICH), que es un intercambiador aniónico, de 15 cm de altura por 1 cm de diámetro.

- 1) Se equilibró la columna con 50 mL buffer de intercambio iónico (Apéndice) pH 7.0, con un flujo de 2.0 ml/min.
- 2) Una vez equilibrada la columna se inyectó la muestra previamente concentrada (5.4 mg en 3.0 mL) en tubos AMICON[®].
- 3) Las fracciones se eluyeron con buffer de intercambio iónico y se colectaron.
- 4) Una vez obtenido el pico principal en el graficador y que no se detectó más proteína, se aplicó un gradiente de 200 ml de 0-500 mM NaCl, para eluir la proteína unida a la resina.
- 5) Se colectaron 81 fracciones de 6.0 mL para su posterior determinación de proteína y actividad.

d) Cromatografía de Afinidad.

Principio.

La cromatografía de afinidad es otro procedimiento aplicable a la purificación de proteínas. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen muchas proteínas de unirse a distintos ligandos con cierta selectividad. La proteína se une a un ligando específico unido a la resina, por lo cual las proteínas inespecíficas se eliminan en el primer lavado, posteriormente la proteína de interés se eluye cuando se adiciona buffer adicionado con el ligando de la proteína de interés de esta manera compite con el ligando unido a la resina y se eluye en el segundo lavado.

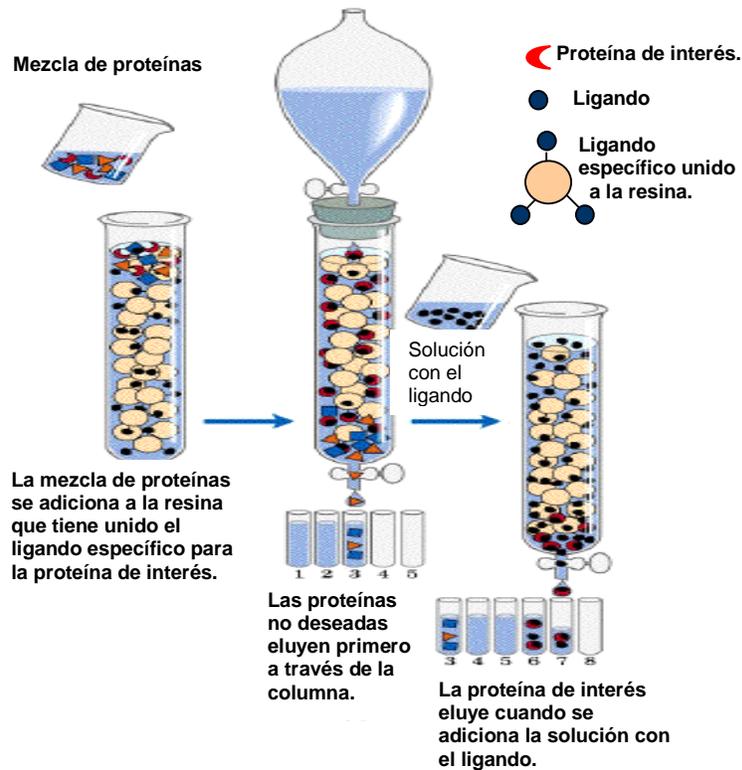
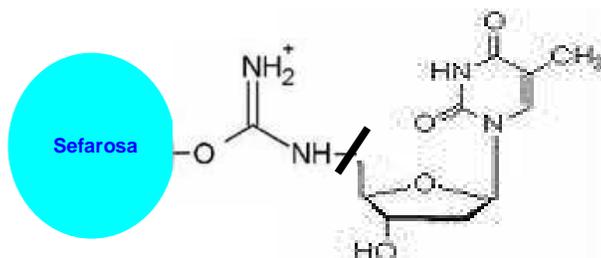


Figura 16 Cromatografía de afinidad. Esta técnica es más específica cuando la interacción de la proteína y la molécula que se usa como atrayente (Stryer, 2002).

Método.

Basado en el método reportado por Kokoris y Black (2002).

- 1) Se usó una columna con 5.0 mg de 5'-Amino-deoxitimidina como ligando específico unido a 2.0 g de resina CNBr-activated Sepharose™ 4 Fast Flow. Esta resina se acopló de la siguiente manera:
 - a) Los 2.0 g de resina CNBr-activated Sepharose™ 4 Fast Flow se rehidrataron en 30 mL de HCl 1 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave .
 - b) Con la ayuda de un equipo All-Glass Filter Holder Millipore® conectado al vacío, se lavó la resina con 2 L de HCl 1 mM.
 - c) En 30 mL de buffer de acoplamiento (Apéndice) se adicionaron los 5 mg de 5'-Amino-deoxitimidina.
 - d) La mezcla del paso anterior se adicionó a la resina previamente lavada y se agitó suavemente a temperatura ambiente por 2 horas.
 - e) El exceso de ligando fue removido por lavados de 5 volúmenes (aproximadamente 30 mL) con respecto a la resina con buffer de acoplamiento, nuevamente con la ayuda del equipo All-Glass Filter Holder Millipore® conectado al vacío.
 - f) Los grupos activos remanentes de la resina fueron bloqueados mediante una serie alternativa de 4 lavados de 30 ml con buffer de bloqueo (100 mM Tris pH 8.0 500 mM NaCl) y con el buffer 100 mM Acetato pH 4, 500 mM NaCl, usando el equipo All-Glass Filter Holder Millipore® conectado al vacío.



- 2) Se equilibró la columna con buffer de fosfatos que contiene: 10 mM NaPO₄/1 mM EDTA/0.025% βME/ pH =7.0

- 3) Una vez equilibrada la columna se inyectó el sobrenadante obtenido en la precipitación de 30% con $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ previamente concentrado ($1.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) en tubos AMICON[®] con capacidad de 10 KDa.
- 4) Las fracciones se eluyeron con el buffer de fosfatos antes mencionado y se colectaron.
- 5) Una vez que se obtiene el pico principal de proteína medido a 280 nm (indicio de que ha salido la mayor cantidad de proteínas que no se unen a la timidina) y no hay más detección de proteína, se eluyó con el buffer de fosfatos antes mencionado adicionado con 1.5 mM de Timidina para eluir a la Timidina cinasa que haya quedado unida a la columna.
- 6) Las fracciones se colectaron para su posterior determinación de proteína y actividad.
- 7) La columna se lavó con el buffer de equilibrio y se guardó con 50 mM de Tris pH 7.5 adicionado con 0.004% de Azida de sodio, para evitar el crecimiento de microbiano.

7. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Principio.

La electroforesis en geles de acrilamida permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y/o carga eléctrica. En condiciones desnaturalizantes la mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que rompe las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. El complejo formado de SDS-proteína desnaturalizada tiene una gran carga negativa por lo cual migra hacia el ánodo, en la parte inferior del gel en la cámara de electroforesis (**Stryer, 2002**).

Método.

- 1) Preparar gel separador (**Apéndice**) al 14%, dejar polimerizar durante 10 minutos,
- 2) Preparar gel concentrador (**Apéndice**) al 4%, dejar polimerizar durante 10 minutos.
- 3) Una vez preparado el gel, combinar la muestra de proteína con 5 μ l de buffer de corrida (**Apéndice**), en tubos eppendorf.
- 4) Calentar las muestras a 100°C por 2-5 minutos.
- 5) Inyectar cada muestra en carril correspondiente dentro del gel.
- 6) Incluir 5 μ L de marcador de peso molecular, Precision Plus Protein™ BIO-RAD.
- 7) Correr el gel a 90 V por 40 minutos.
- 8) Retirar el gel de la cámara de electroforesis
- 9) Lavar el gel 3 veces durante 5 minutos con H₂O estéril.
- 10) Adicionar 20 mL de colorante SimplyBlue™SafeStain Invitrogen y dejar en agitación constante durante 1-2 horas a temperatura ambiente.
- 11) Lavar el gel con 100mL de H₂O estéril al menos 1 hora, para eliminar el fondo y obtener bandas más intensas se realizan al menos 3 lavados de 20 minutos cada uno (**Bollag et al., 1996**).

8. Western Blot.

Esta técnica se usa para detectar proteínas inmovilizadas en una matriz (Towbin et al. 1979), empleando un anticuerpo monoclonal o policlonal capaz de reconocer la proteína de interés contenida en un extracto crudo o bien en una fracción más pura **(Bollag et al., 1996)**.

Se somete la muestra a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas separadas en el gel electrotransfieren a la superficie de una membrana de polímero para hacerlas más accesibles a la reacción. Se sumerge la membrana en una solución de anticuerpo que sea específico para la proteína de interés y éste reaccionará formando un complejo antígeno-anticuerpo que se puede detectar con un segundo anticuerpo marcado con una enzima y que reconoce al primer anticuerpo **(Stryer, 2002)**. Para el caso de este experimento se utilizó suero de conejo preparado contra el el péptido TK-KHL sintetizado por Global Peptide Services, Colorado, E.U.A. Consta de 16 aminoácidos (NH₂-DYKRRKSGSILDIVPC-CONH₂) correspondientes al dominio de unión de la timidina. **(Suzuri Hernández, 2006)**.

Las condiciones del Western Blot fueron las siguientes:

- 1) Preparar la siguiente solución de bloqueo (10 mL):
 - a) 500 mg de leche en polvo descremada.
 - b) 60 µL Tween-20.
 - c) PBS 1X cbp 10 mL.
- 2) Colocar la membrana en un recipiente con 8-10 ml de solución de bloqueo.
- 3) Agitar por ~3 horas suavemente a 4°C.
- 4) Eliminar la solución bloqueadora y reemplazarla con 8-10 ml de solución de bloqueo fresca.
- 5) Adicionar el primer anticuerpo (dilución 1:1000, en la solución de bloqueo)
- 6) Incubar toda la noche con agitación a 4°C.
- 7) Realizar un lavado con 8 mL de PBS 1X, 15 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Realizar un lavado con 8 mL de PBS 1X, NaCl 0.5M, 15 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Realizar un lavado con 8 mL de PBS 1X, 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10) Incubar con agitación durante 2 horas a 4°C con el segundo anticuerpo (dilución 1:10000) con solución de bloqueo fresca.

- 11) Realizar tres lavados con PBS 1X, 15 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Escurrir la membrana contra el borde del recipiente y colocar sobre un acetato.
- 13) Añadir 500 μ l de solución de detección ECLTM Western Blotting Detection Reagents GE Health Care sobre la membrana.
- 14) Incubar de 1 a 2 minutos, escurriendo el exceso de solución de detección.
- 15) Exponer la membrana entre dos acetatos durante 3 a 6 minutos máximo, para revelar las bandas.

Resultados

1. Determinación de porcentaje de germinación, toma de agua y elongación.

En el lote de semillas de maíz empleado (“Chalqueño”, obtenidas en Chalco, Edo. de México, cosechas 2004 y 2005.) se determinaron los siguientes parámetros fisiológicos: porcentaje de germinación, y elongación radicular.

Para evaluar el % de germinación se consideró una semilla germinada al observar la protusión radicular y como se muestra en la figura 17A, el 50% de las semillas germinaron a las 28 h pero a las 48 h se tuvo un 100% de germinación. Se determinó la elongación radicular durante este periodo y a las 48 h el promedio de elongación fue de 3.5 cm (Fig. 17B).

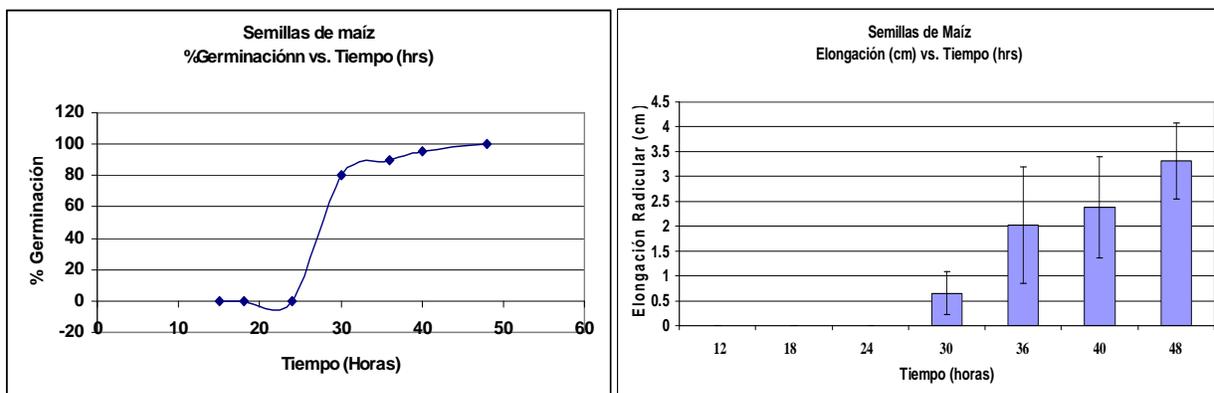


Figura 17 A). Porcentaje de germinación, el 100% de germinación se alcanza después de las 24 horas.

B) Elongación radicular se ve incrementada a lo largo del tiempo de germinación.

Los parámetros fisiológicos determinados para embriones de maíz fueron: % de germinación y acumulación de peso húmedo. Los embriones muestran resultados un tanto diferentes comparados con las semillas de maíz, pues éstos se encuentran expuestos directamente al agar. Como se puede observar, aproximadamente el 100% de los embriones germinan una vez transcurridas las primeras 24 horas (Fig. 18A), así mismo, la acumulación de peso húmedo se incrementó en ese intervalo de tiempo y se muestran las fases 1 y 2 de toma de agua durante la germinación (Fig. 18B).

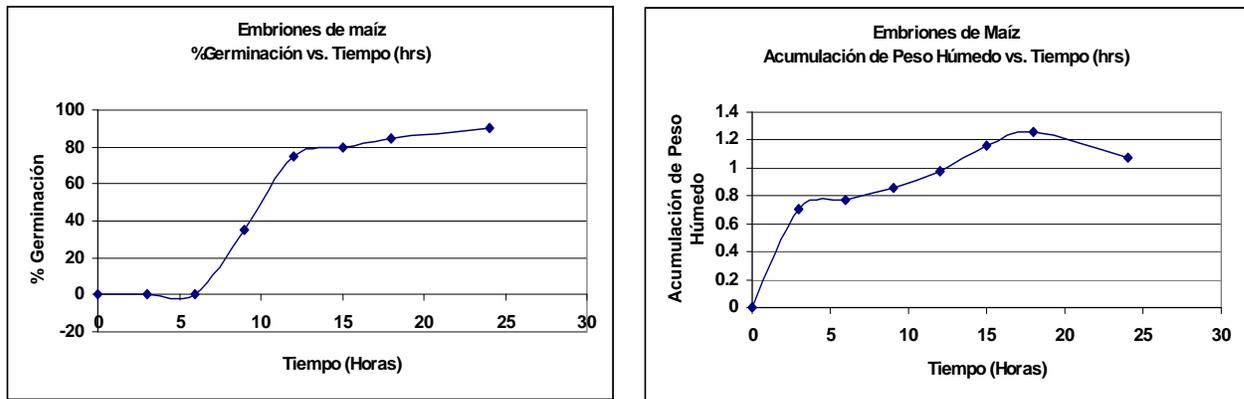


Figura 18 A). Porcentaje de germinación, el 100% de germinación se alcanza después de las 24 horas.
B) Toma de agua, la acumulación de peso húmedo se ve incrementado a lo largo del tiempo de germinación.

Estos parámetros proporcionan información acerca de la viabilidad y vigor de las semillas y embriones de maíz, es decir, si el lote elegido cuenta con semillas sanas y de adecuado desarrollo para el fin de este proyecto.

2. Comparación de la actividad de Timidina Cinasa entre radículas y ápices de maíz.

Con el fin de encontrar un tejido de maíz óptimo que contuviera una actividad elevada de la enzima timidina cinasa se realizó un experimento preliminar para detectarla. Se probaron ápices de embriones germinados por 24 horas y radículas de plántulas de maíz de diferentes tiempos de imbibición (30, 36, 40 48 y 72 horas).

Tabla 1. Actividad de timidina cinasa en ápices de embriones y en radículas de semillas de maíz.

Muestra	cpm	pmol Thd-MP	Actividad específica pmol Thd-MP/mg*h
Apice (24 h)	30001 \pm 1484	1.62 \pm 0.22	4.32 \pm 0.59
Radícula (30 h)	102509	12.5	33.25
Radícula (36 h)	368448 \pm 4484	52.24 \pm 0.67	139 \pm 1.8
Radícula (40 h)	137573 \pm 37811	17.71 \pm 5.65	47.13 \pm 15.03
Radícula (48 h)	309463 \pm 41795	43.42 \pm 6.24	115.51 \pm 16.67
Radícula (72 h)	382353	54.33	144.51

Para convertir cpm a pmol de timidina monofosfato (Thd-MP) se elaboró una curva de cuantificación de timidina (**Apéndice**), se calculó la actividad enzimática específica de TK en pmol/mg*h al considerar la cantidad de proteína en el ensayo y el tiempo de éste. La actividad medida en este tejido fue de un orden de magnitud mayor que en los ápices de embriones (Suzuri-Hernández, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con radículas de 48 horas, puesto que éstas presentan mayor actividad de TK comparadas con los ápices de embriones y se procedió a realizar un ensayo comparativo entre diferentes regiones tomando el 1^{er} y 2^{do} cm (Fig. 19) a partir de la punta de la radícula del mismo tejido con el fin de determinar la región con los mayores niveles de enzima (TK). La actividad específica en el 2^{do} cm fue de 113 pmol/mg*h, es decir 4.5 veces mayor que en el primer cm donde se determinó una actividad de 25 pmol/mg*h, por lo cual a partir de éste se realizaron los siguientes extractos crudos para iniciar el ensayo de purificación de la enzima (TK).



Figura 19. Semillas de maíz germinadas durante 48 hrs en agar al 1%. Se muestra la zona del tejido radicular que se tomó para el ensayo.

3. Determinación de Actividad y Purificación preliminar de TK.

Se realizó un primer fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a partir de 8.0g de tejido (radículas de maíz de 48 horas), macerado y suspendido en 10 mL de buffer de extracción (Extracto crudo; EC). A partir de esta preparación clarificada por centrifugación se inició un esquema de fraccionamiento al 30%, 50% y 70% de Sulfato de Amonio. (Los resultados del fraccionamiento a 70% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no se muestran).

Se evaluó la actividad en cada una de las fracciones y se determinó la actividad específica. Como se observa en la figura 20, la actividad específica se enriqueció 18 veces en el sobrenadante ($537 \text{ pmol mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) después de alcanzar el 30% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Al alcanzar el 50% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se precipitó la actividad de TK pero la actividad específica disminuyó a $58 \text{ pmol mg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

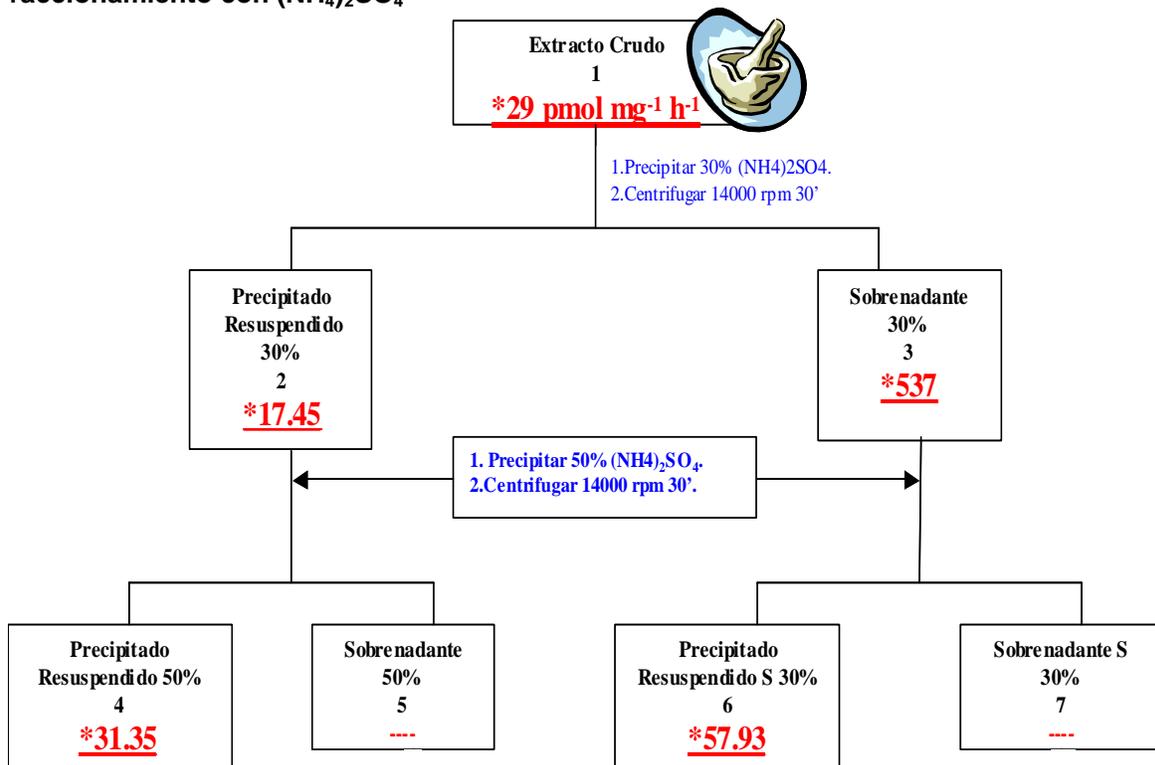
Fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

Figura 20. Evaluación de la actividad de timidina cinasa en extracto proteico de radículas de maíz y en fracciones obtenidas al precipitar con sulfato de amonio. La actividad específica se expresa en $\text{pmol/mg}\cdot\text{h}$.

De acuerdo a los resultados anteriores y que fueron reproducibles la fracción más rica en actividad de TK fue el sobrenadante del extracto crudo fraccionado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%.

4. Estabilización de la actividad de Timidina Cinasa.

A pesar de que las fracciones de precipitación con sulfato de amonio se desalaron por diálisis, se observó baja actividad enzimática en muchas de éstas. Por lo tanto se probó el efecto de la albúmina sérica bovina (BSA) al 1.0% en el buffer de reacción de TK como estabilizador de la enzima. Para esto se utilizaron fracciones viejas obtenidas a partir de radículas de maíz de 48 horas y se probaron con y sin BSA.

Como se observa en la figura 21 la adición de BSA al 1% tuvo un efecto notable en la actividad enzimática pues en la fracción soluble de 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se obtuvo una actividad de 33 pmol/mg*h, cuando en este extracto viejo no se había detectado actividad.

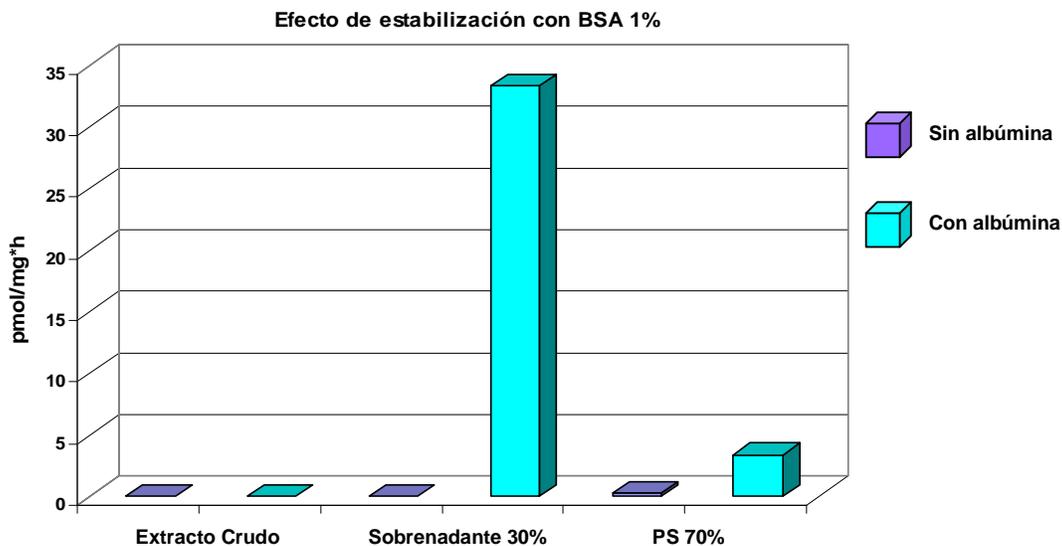


Figura 21. Efecto de estabilización de TK con BSA al 1%. Recuperación de actividad de TK en las fracciones: sobrenadante 30% y PS70%, no se recobró actividad de TK para el Extracto Crudo.

Aún en la fracción precipitada se incrementó la actividad aproximadamente 14 veces al añadir BSA. Lo cual muestra un efecto estabilizador de la albúmina. A partir de estos resultados se adicionó BSA al 1% en el buffer de reacción para TK en los ensayos posteriores.

5. Determinación de Actividad TK en diferentes tejidos de maíz.

Aún cuando ya se había realizado un ensayo preliminar comparando la actividad entre dos tejidos de maíz (ápices y radículas), se hizo un escrutinio más amplio entre diversos tejidos de la planta de maíz, como son: embrión, coleóptilo (5 días de desarrollo), radícula (48 horas), plántula (10 días), tallo (20 días), hoja (20 días) y grano (Fig. 22); con el fin de realizar una óptima cuantificación y detección de la enzima (TK) que nos pudieran ayudar a realizar una mejor purificación.

Determinación de Actividad en diferentes tejidos.

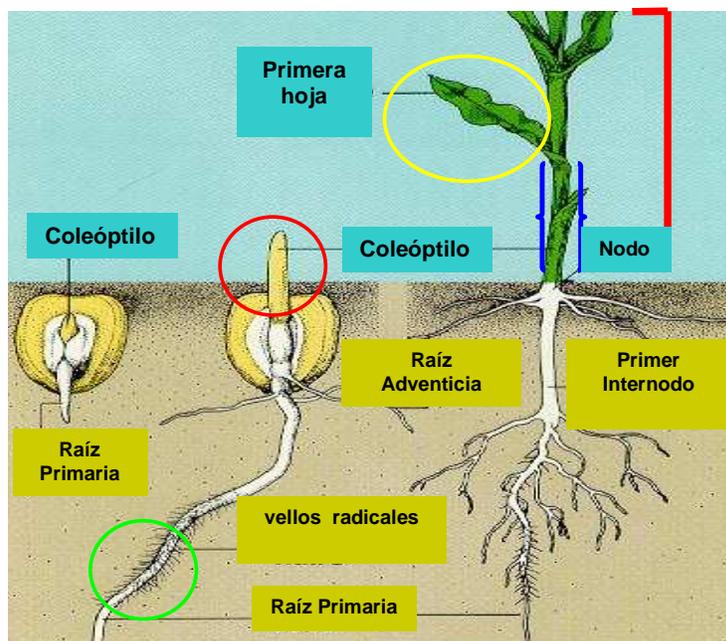


Figura 22. Se muestran diferentes tejidos de maíz (marcados en círculos) a partir de los cuales se obtuvieron los Extractos crudos para la posterior determinación de actividad de TK.

La obtención de los extractos crudos se realizó a partir de 1.6 g de embrión, 0.40 g de coleóptilo, 2.7 g de radícula, 1.0 g de plántula, 1.80 g de tallo, 2.16 g de hoja y 2.5 g de grano. Una vez que los extractos crudos estuvieron listos se realizó el ensayo de actividad para cada uno de ellos por triplicado.

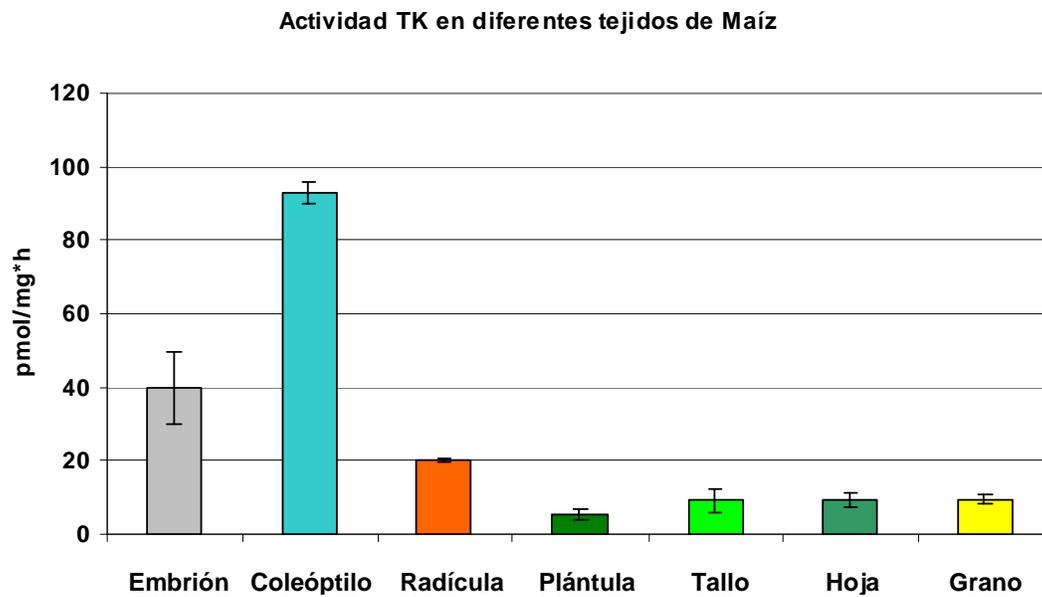


Figura 23. Actividad específica de timidina cinasa en diferentes tejidos de la planta de maíz. El tejido con mayor actividad es el coleóptilo.

El tejido que presentó mayor actividad es el coleóptilo (92 pmol/mg*h), seguido del embrión (36 pmol/mg*h) y la radícula (20 pmol/mg*h), por lo cual se decidió tomar el coleóptilo para realizar los posteriores ensayos.

6. Purificación de TK.

6a. Cromatografía de Exclusión Molecular.

Para continuar con la purificación de la proteína se usaron extractos de coleóptilo de 5 días y se fraccionaron con Sulfato de Amonio al 30%.

El sobrenadante del fraccionamiento se concentró en tubos AMICON^R (1.80µg/µl de proteína) y se aplicó a una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 de 50 cm de altura y 1.5 cm de diámetro, a un flujo de 0.6 ml/min y se colectaron 42 fracciones de 4.8ml a las cuales se les determinó concentración de proteína y actividad de TK.

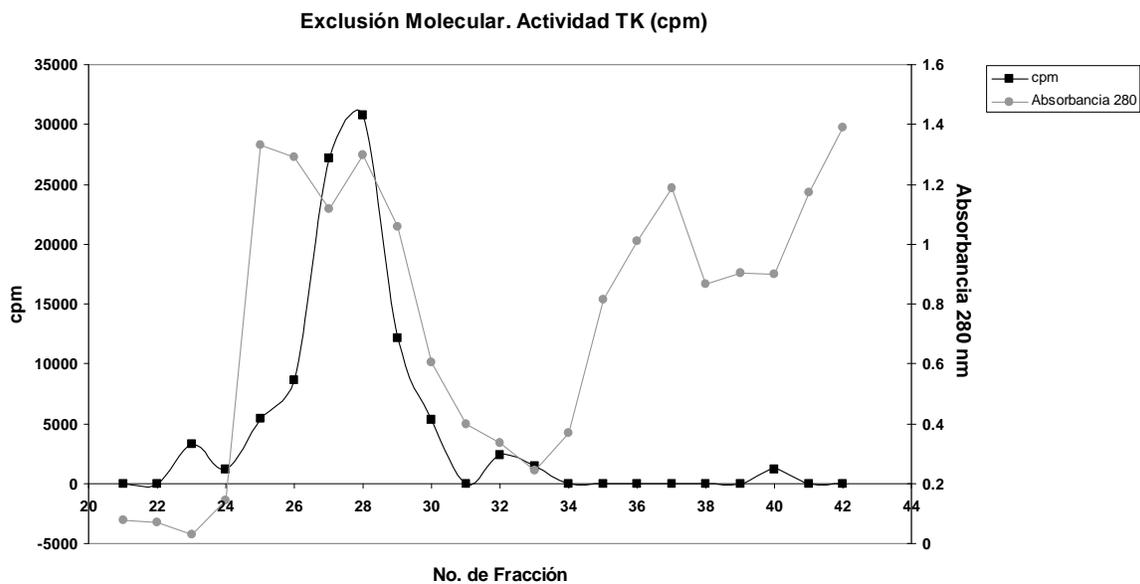


Figura 24. Actividad de TK en fracciones eluidas de la Cromatografía de Exclusión Molecular. Se muestra el patrón de absorbancia a 280nm y las cpm obtenidas para cada fracción.

El perfil de elución de proteínas determinado por su A_{280} , se muestra en la Fig.24 que muestra una cantidad importante de proteínas en las fracciones 24 a 30 y en fracciones posteriores (34-42). En todas estas fracciones se determinó la actividad enzimática y se muestra que en las fracciones 27 y 28 hubo una mayor actividad enzimática. Al convertir cpm en actividad específica se observa que ésta se conserva en valores altos en esta fracción (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad específica de TK de las fracciones obtenidas mediante Cromatografía de Exclusión Molecular.

Muestra	μg proteína	cpm	pmol	pmol/mg*h
Extracto crudo	660	120350	15.14	30.51
SN 30% (NH ₄) ₂ SO ₄	292	67513	7.23	32.96
Fracción 22	0	0	0	0
Fracción 23	0	3324	0	0
Fracción 24	7.68	1210	0.124	8.06
Fracción 25	66	5452	0.626	4.74
Fracción 26	100	8674	1.007	5.036
Fracción 27	120	27135	1.2	13.26
Fracción 28	92	30751	1.73	25.12
Fracción 29	68	12174	1.42	10.54
Fracción 30	34	5308	0.608	8.95
Fracción 31	31.2	0	0	0
Fracción 32	25.2	2330	0.256	5.08
Fracción 33	24	1470	0.155	3.22
Fracción 34	0	0	0	0
Fracción 35	0	0	0	0
Fracción 36	0.64	0	0	0
Fracción 37	0	0	0	0
Fracción 38	0	0	0	0
Fracción 39	6.4	0	0	0
Fracción 40	8	1177	0.119	7.5
Fracción 41	0	0	0	0
Fracción 42	0	0	0	0

Con el objetivo de determinar el peso molecular en las fracciones correspondientes a las de mayor actividad se corrió una cromatografía con cinco proteínas de peso molecular conocido (Fig. 25) en el rango de 25 a 440 Kda. Se calculó el peso molecular de las proteínas que eluyeron en la fracción 28 en ≈ 26.5 Kda (Fig. 25).

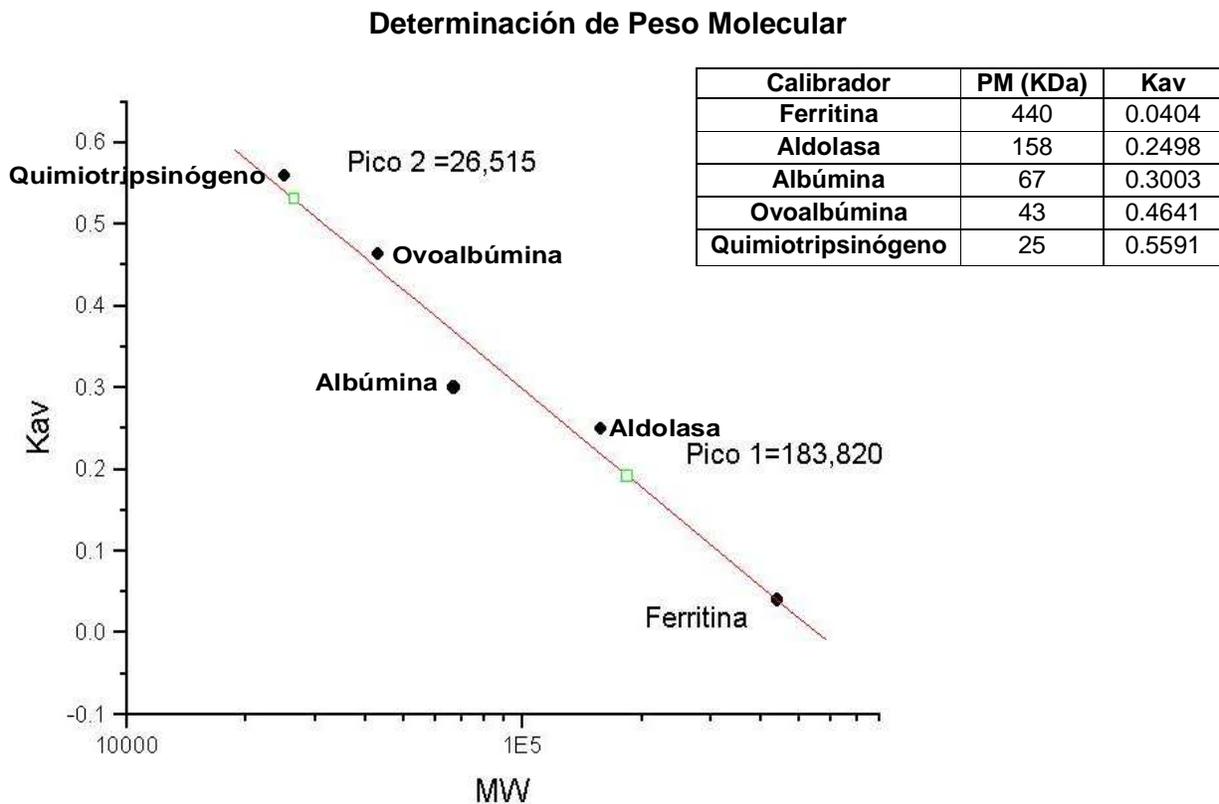


Figura 25. Determinación de Peso Molecular. El pico correspondiente a la fracción 28 obtenida mediante E.M., presenta un peso de 26 Kda.

Para calcular el Kav (coeficiente de distribución de las proteínas en la columna) se usó la siguiente ecuación:

$$K_{av} = (V_c - V_0) / (V_t - V_0)$$

donde.....

V_t= volumen total.

V₀= volumen vacío (blue dextran)

V_c = ml a los cuales eluyó la fracción.

El experimento realizado no generó una fracción pura o parcialmente purificada de la enzima (TK); sin embargo, muestra una fracción con un peso molecular parecido (26 Kda) al reportado para otras TK's. La detección de TK por Western Blot no fue muy específico (Fig. 26) aún cuando se probaron diversas condiciones de incubación, se observaron bandas de aproximadamente 27 a 30 Kda en las fracciones 24 a 29, pero se esperaba una detección más limpia sobre todo en la fracción 28 que reporta mayor actividad y corresponde a un peso de 26 Kda.

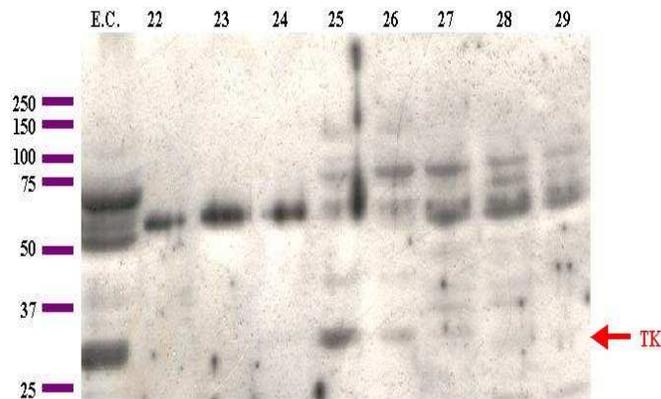


Figura 26. Western Blot de las fracciones obtenidas en la Exclusión Molecular, el resto de las fracciones no se muestran por que no se detectó ninguna banda.

6b. Cromatografía de Intercambio Iónico y Exclusión Molecular.

A consecuencia de los resultados anteriores, se modificó el protocolo de purificación, partiendo nuevamente de 10 mL de Extracto Crudo de coleóptilo y fraccionando con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, posteriormente se concentró el sobrenadante en filtros AMICON[®] hasta obtener una concentración de proteína de 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, una vez concentrada la muestra se inyectó en una columna de intercambio iónico previamente equilibrada con el buffer de Intercambio iónico (Apéndice), la muestra se eluyó con el mismo buffer y posteriormente se aplicó un gradiente de NaCl de 0-500 mM para separar de la resina la proteína que hubiera quedado adherida. Cada fracción fue colectada para la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford y determinación de actividad. Una vez determinadas las fracciones en las cuales las cpm eran altas, éstas se mezclaron y se concentraron en columnas AMICON[®] hasta obtener 0.567 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se inyectó en una columna de Exclusión Molecular (Apéndice). Las fracciones de esta columna se colectaron y se midió la actividad enzimática que se presenta en la tabla 7 y Figura 27.

Tabla 7. Ensayo de actividad Fracciones de Exclusión Molecular (previo intercambio iónico)

Fracción	cpm	pmol	pmol/mg*h
Sobrenadante 30%	27808	1.29	34.88
Fracción concentrada	4506	0.514	8.03
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	-
8	2581	0.286	5.62
9	3320	0.373	2.74
10	32688	2.027	34.75
11	11632	1.35	12
12	4438	0.505	18
13	1916	0.2074	8.14
14	5292	0.607	12.8
15	3239	0.364	65.94
16	0	0	0
17	6010	0.692	58.64
18	1305	0.135	9.93
19	973	0.0958	10.46

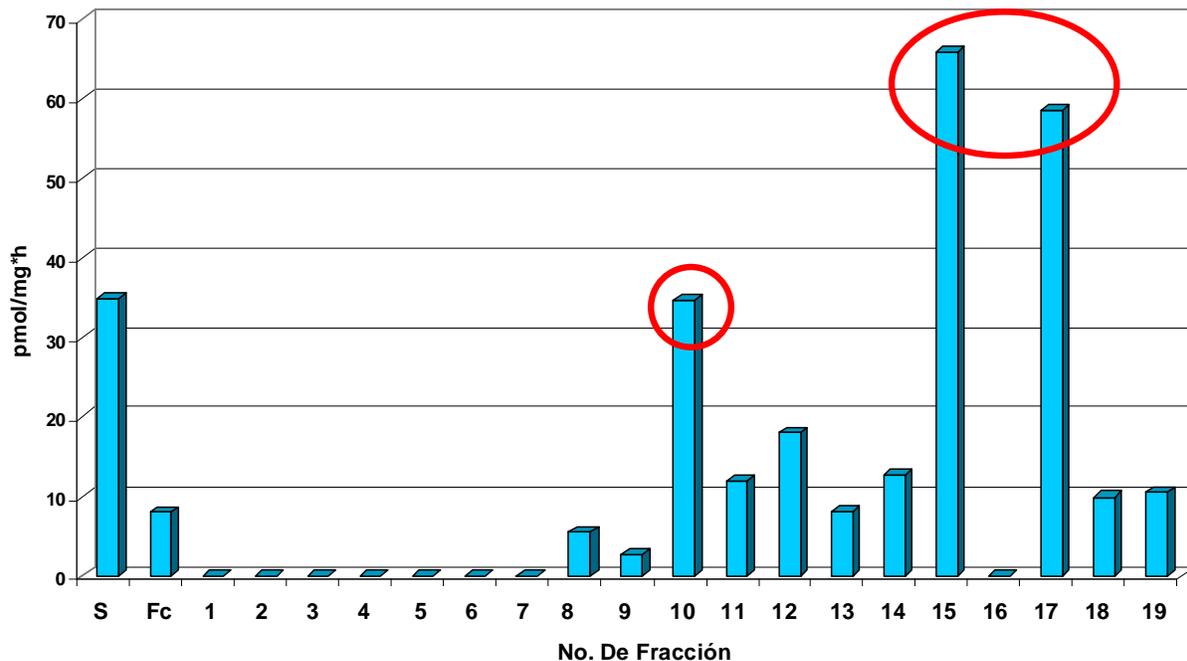
Actividad TK. Exclusión Molecular.
(Previo Intercambio Iónico)

Figura 27. Actividad específica de timidina cinasa en fracciones obtenidas por purificación en una columna Sephacryl S-200 de Exclusión Molecular.

Las fracciones 10 (34.75 pmol/mg^*h), 15 (65.94 pmol/mg^*h) y 17 (58.64 pmol/mg^*h) son las que presentaron un incremento en la actividad de TK comparándose con la fracción concentrada que se inyectó en la columna (Fc, 8.03 pmol/mg^*h). Se corrió un gel SDS-PAGE con las fracciones colectadas y se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa para su posterior detección por medio de Western Blot.

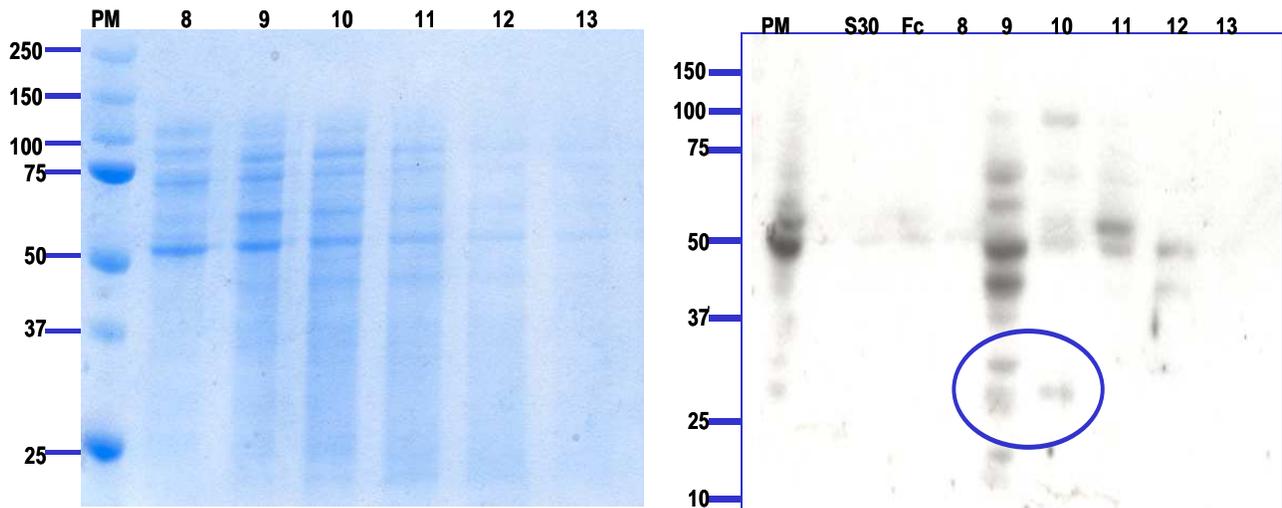


Figura 28. Gel SDS-PAGE 14% teñido con azul Coomassie y Western Blot.

En el gel SDS-PAGE no se identificó ninguna banda de 25 a 30 KDa correspondiente al peso molecular reportado para TK, sin embargo en el Western Blot se observaron 2 bandas de entre 25–30 KDa en las fracciones 9 y 10 lo cual concuerda con lo observado en la determinación de actividad de TK para la fracción 10, no así para las fracciones 16 y 17 en las cuales no se detectó banda alguna (no se muestra la transferencia).

6c. Cromatografía de Afinidad.

Al igual que en los experimentos anteriores se partió de la obtención del extracto crudo de coleóptilo de aproximadamente 5 o 6 días de desarrollo, éste se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30%, posteriormente se concentró en tubos AMICON® de 10 KDa y la fracción concentrada ($8.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) se aplicó en la columna de afinidad, previamente equilibrada. Las fracciones eluidas fueron analizadas mediante la determinación de proteína por Bradford a 595 nm y detección de actividad de TK.

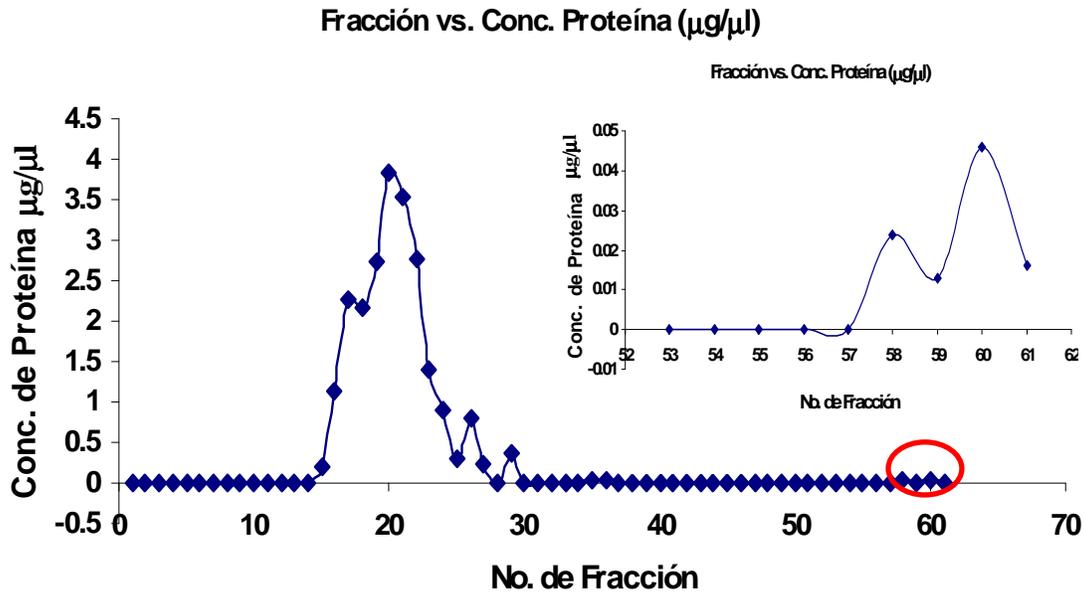


Figura 29. Concentración de proteína (595nm) en las diferentes fracciones obtenidas en la Cromatografía de Afinidad.

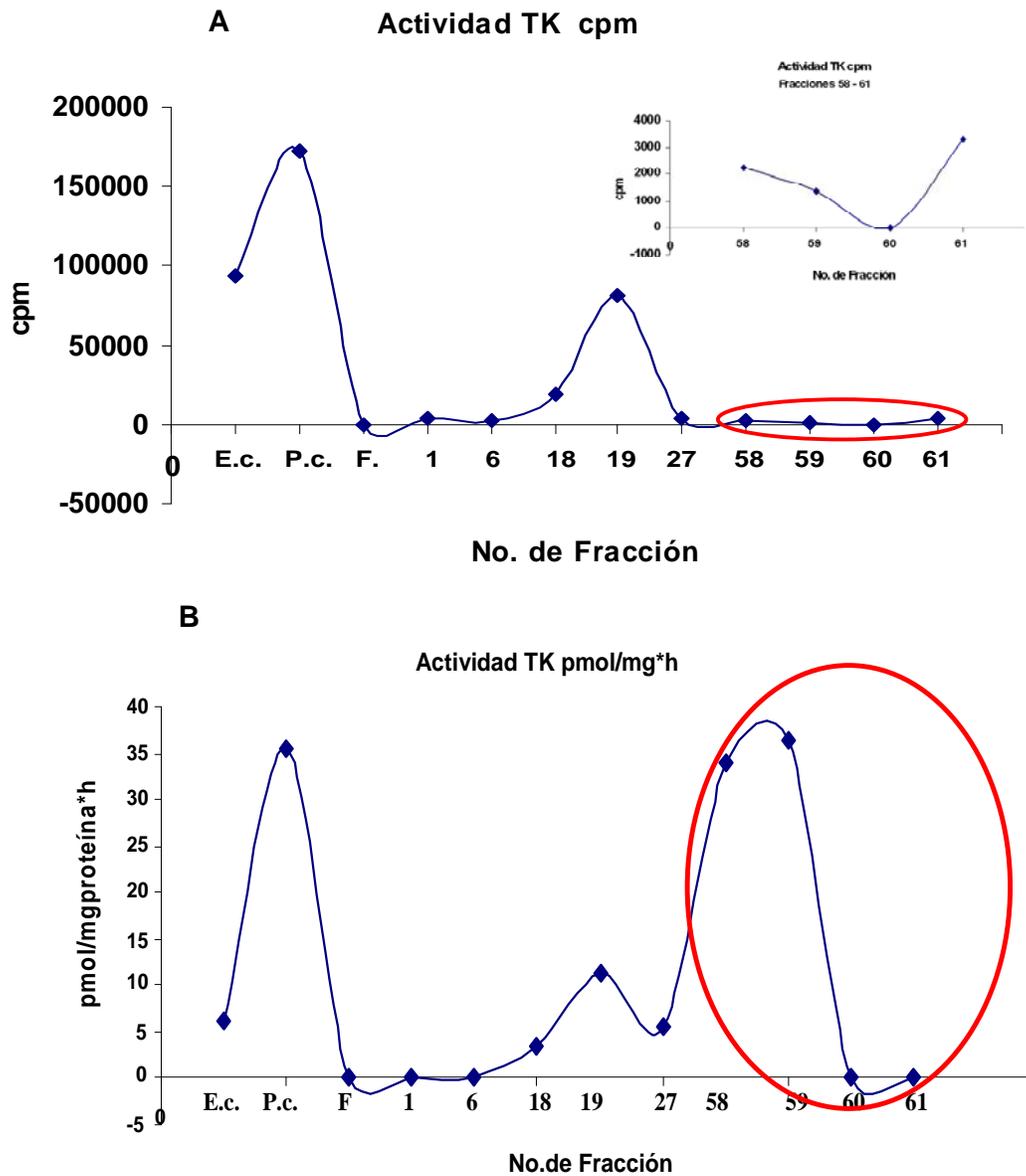


Figura 30. Actividad de TK en fracciones de Cromatografía de Afinidad. A) cpm vs. Número de fracción, B) pmol/mg proteína*h vs. Número de fracción.

Como se puede observar en las figuras anteriores las fracciones 58 y 59 obtenidas después del lavado con el buffer de elución suplementado con timidina (1.5 mM), muestran una elevada actividad de TK, aún cuando la concentración de proteína en estas fracciones es mínima; lo cual indica que probablemente en esas fracciones se encuentra concentrada la enzima.

7. Discusión.

Las proteínas en sistemas biológicos raramente actúan de forma aislada, la mayoría de las veces actúan en asociación con otras para efectuar respuestas celulares específicas. Estas asociaciones de proteínas pueden llegar a formar dímeros u otros oligómeros; la dimerización y oligomerización de las proteínas pueden conferir diferentes cambios a nivel estructural y funcional proporcionando ventajas como, mayor estabilidad, especificidad del sitio activo e incremento en la complejidad generando nuevos sitios de unión para distintos efectores.

El sitio activo de una enzima es frecuentemente formado como una subunidad en la interfase la cual resulta en una alta concentración local de sitios activos y sitios de actividad enzimática, bajo la regulación multifacética de la oligomerización. De esta simple forma, la función de la oligomerización es un mecanismo general para determinar la concentración de proteína. Un incremento en la concentración por encima del umbral de oligomerización puede ser un estímulo para la activación enzimática; de manera similar la desactivación puede ocurrir cuando los niveles de la enzima decaen. En adición a la respuesta de la concentración de proteína la formación de dímeros se usa también para regular la actividad enzimática.

La generación de nuevas formas intermoleculares puede también producir sitios de regulación alostérica, permitiendo la unión de algún cofactor o facilitando la cooperatividad positiva (**Marianayagan et al., 2004**). Debido a que se ha demostrado que la timidina cinasa de mamíferos forma un homodímero con una transición a homotetrámero dependiente de ATP, nos preguntamos si esta característica es compartida por la timidina cinasa de plantas. Un primer paso para responder esta pregunta es la purificación de la enzima, que fue en lo que se centró este trabajo. El primer paso fue seleccionar el tejido que sirviera como fuente abundante de enzima y encontramos que tejidos con meristemos en proliferación como coleóptilo y radícula contenían actividad enzimática más alta que tejidos diferenciados. Estos tejidos resultaron convenientes pues se desarrollan durante la germinación de la semilla y se puede obtener varios gramos de tejido a partir de 30 a 50 semillas. Esto contrasta con experimentos anteriores realizados en ápice de ejes embrionarios de maíz en el que se demostró la relación entre la síntesis de DNA y la actividad enzimática de TK (Suzuri Hernández, 2006) pues de este tejido se obtiene una cantidad baja de proteína. El fraccionamiento con sulfato de amonio resultó en un moderado enriquecimiento de la proteína pues la actividad enzimática solamente se pudo detectar consistentemente en el sobrenadante de la fracción precipitada con sulfato de

amonio al 30%, que fue utilizado para iniciar el siguiente paso en la purificación de la enzima.

La timidina cinasa de maíz resultó ser una enzima poco estable pues observamos pérdida completa de actividad pocos días después de obtener los extractos crudos, incluso en el paso de fraccionamiento con sulfato de amonio y desalado. Una aportación importante de este trabajo fue encontrar las condiciones para estabilizar la enzima pues se observó que al incluir albúmina sérica bovina (1%) en el ensayo de actividad, se estabiliza la enzima, y se pudo medir la actividad enzimática.

Además de incluir un agente estabilizador de la enzima, se aplicaron diferentes protocolos de purificación para TK, incluyendo entre ellos: Cromatografía de Exclusión Molecular con la cual se logró determinar una masa molecular de **(26KDa)** que corresponde a lo reportado para el monómero de TK **(25 – 30 KDa)**; además de Intercambio Iónico y Cromatografía de Afinidad. A continuación se muestra una tabla que incluye algunos de los resultados más sobresalientes de los métodos de purificación aplicados a la enzima, es importante resaltar que cada método se realizó de manera independiente y sólo se muestra la comparación entre la eficiencia de los diferentes métodos empleados:

Fracción y Paso de Purificación	Proteína (µg)	Actividad específica (pmol/mg*h)
1. Extracto Crudo	660	30
2. SN (NH₄)₂SO₄ (30%)	292	32.9
3. Exclusión Molecular	92	25.12
4. Exclusión Molecular previo Intercambio Iónico	77	34.75
5. Cromatografía de Afinidad	9.6	35

Cada método de purificación muestra resultados importantes, pero en cada uno de ellos se perdió mucha actividad, aún con el agente estabilizador (BSA); sin embargo, los resultados más alentadores se obtuvieron con la cromatografía de afinidad, pues, mediante ésta se logró eliminar una gran cantidad de proteínas inespecíficas. Quizá la única falla que presenta este último protocolo, es que no se observa un enriquecimiento en la actividad de TK al ser purificada, sin embargo ésta se conserva; una explicación a esto se puede relacionar con la cantidad de ligando específico unido a la resina, ya que ésta última no fue saturada completamente con el ligando específico para la enzima, por

lo cual una gran porción de ésta pudo haber sido eliminada en lavados previos, reportándose únicamente la actividad de la enzima que se logró unir al sustrato.

De acuerdo a lo observado en todos los experimentos realizados se puede proponer un protocolo de purificación que incluya un paso de precipitación con sulfato de amonio (30%), seguido por cromatografía de exclusión molecular para concluir con un paso de cromatografía de afinidad. Las condiciones de este último paso se tendrán que optimizar, como incrementar la concentración de 5-amino deoxitimidina.

Si bien aún faltan experimentos para concluir este proyecto el avance en el desarrollo de un protocolo de purificación es muy importante, puesto que brinda parámetros (tejido óptimo, estabilización, condiciones de precipitación y concentración, etc) importantes para la implantación de éste como una herramienta en posteriores ensayos.

Se han reportado diversos procedimientos de purificación para Timidina cinasa de mamíferos, obteniéndose diferentes grados de purificación que van desde 3250 hasta 67 veces, al compararse con el extracto crudo de partida (como se muestra en la siguiente tabla).

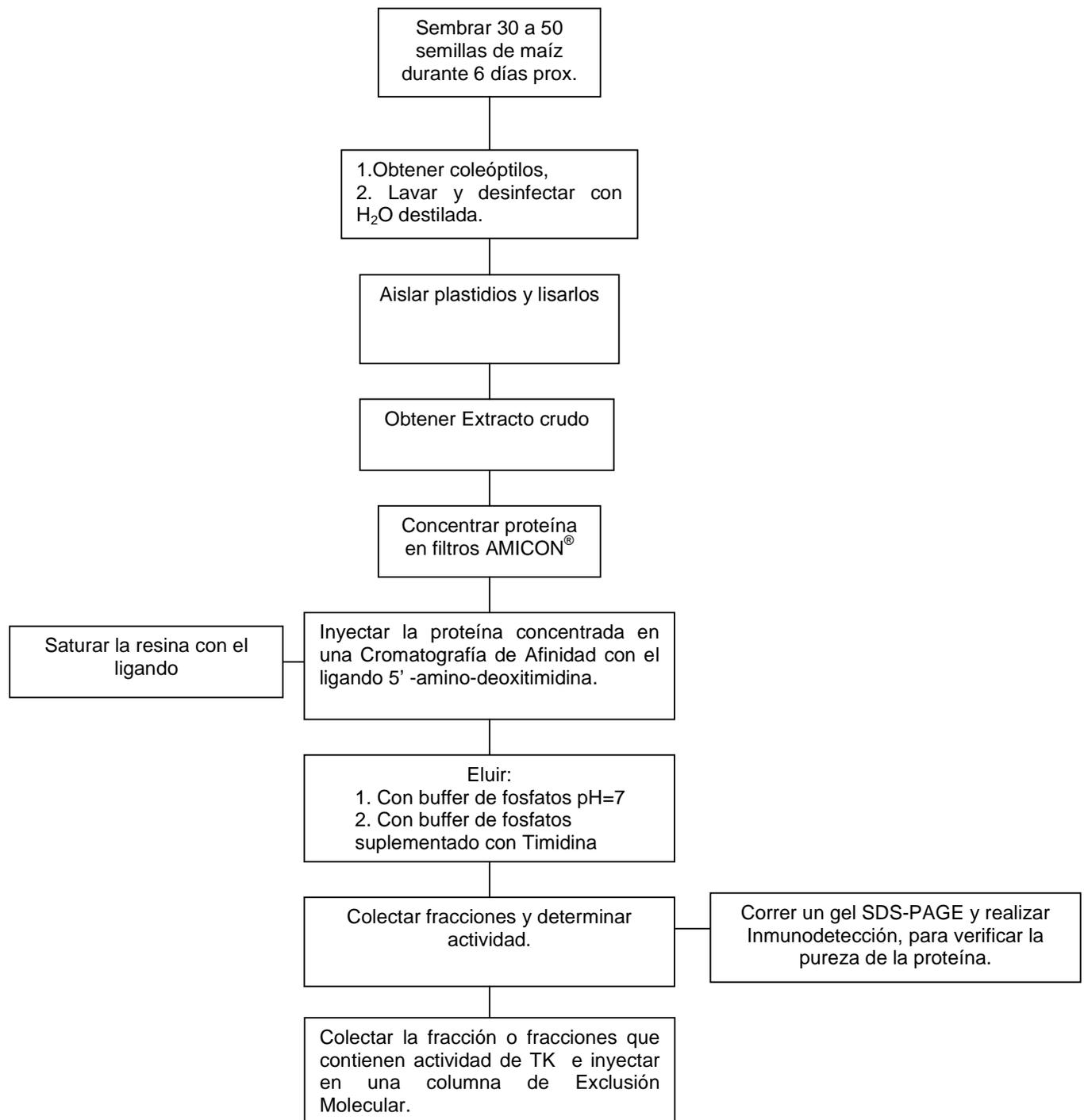
Referencia	Agentes estabilizantes	Pasos de purificación	Magnitud de actividad específica
Sherley & Kellya, 1988. J. Biol. Chem..	Digitonina 0.8 mg/mL en el buffer de extracción y otras soluciones. Timidina 25 µM en el buffer de elución de cromatografía en filtración en gel	1) Cromatografía CM-Sefarosa 2) Cromatografía Sefarosa-timidina 3) Filtración en gel Bio-Gel P300 y Bio-Gel A-0.5	Extracto : 0.1 u/mg CM-Sepharose 0.43 unidad/mg Thd-Sepharose 325 unidad/mg Purificación de 3250X
Lee & Cheng, 1976. J. Biol. Chem. 251.	Glicerol 10% en el buffer de extracción y en el buffer de elución de cromatografía de afinidad. DTT 5mM en el buffer de elución de cromatografía de afinidad.	1)Fraccionamiento con sulfato de estreptomycin. 2)Fraccionamiento con (NH ₄) ₂ SO ₄ . 3)Cromatografía de Afinidad con timidina unida a la matriz.	Extracto: 0.076u/mg. 1) 0.051u/mg. 2) 0.125u/mg 3) 183.7u/mg Purificación de 2417X.
Cheng & Ostrander, 1976. J. Biol. Chem.	Glicerol 10% + 0.15M KCl en el sobrenadante obtenido. 3mM DTT 200µM dThd. En el buffer de elución de cromatografía de afinidad.	1)Fraccionamiento sulfato de estreptomycin. 2)Fraccionamiento Sulfato de Amonio. 3)Columna de Afinidad	Extracto crudo: 1.0 nmol/min/mg 1)0.95 nmol/min*mg 2)1.41 nmol/min*mg 3)67.2 nmol/min*mg Purificación de 67X.
Yoval, S.B. 2008	DTT 1 mM + dThd 1.5 mM en el buffer de elución de cromatografía de afinidad. BSA 1% en el ensayo de actividad.	1) Proteína concentrada 2) Cromatografía de Afinidad	1) 35.4 pmol/mg*h 2) 35 pmol/mg*h

Si bien los protocolos de purificación reportados para TK de mamíferos dieron una pauta, no se aplican completamente a la purificación de TK en plantas. Casi siempre el comportamiento y la actividad de una enzima varían según su localización celular en el mismo sistema biológico, por lo tanto al cambiar de un sistema biológico a otro es de esperarse un comportamiento diferente. Se observó esta variación en la estabilidad de la enzima, aún usando agentes estabilizadores, las fracciones eluidas no mantienen su actividad por mucho tiempo, lo cual hizo difícil encontrar las condiciones necesarias para la purificación de la misma.

En plantas, todas las enzimas que participan en la síntesis de *novó* 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 y Takeda, 2000**). Asimismo, la secuencia de aminoácidos de la TK1 de maíz contiene una secuencia en el extremo amino que podría funcionar para su tránsito al cloroplasto (Suzuri, 2006). Esta localización subcelular se podría probar experimentalmente y de confirmarse se podrá aprovechar esta información para diseñar un protocolo de purificación de la TK de plantas. Así, un primer paso implicaría el aislamiento de los plastidios de los coleóptilos de maíz y la purificación de la enzima a partir de estos.

Al comparar los protocolos reportados para TK en otros sistemas biológicos, el resultado parece pobre en términos de purificación; sin embargo, este trabajo establece algunas condiciones para continuar la tarea de la purificación de la enzima. Hasta la fecha no se ha reportado ningún protocolo de purificación de esta enzima en plantas.

Con la experiencia obtenida en este proyecto, se propone un esquema general de purificación que podría incluir los siguientes pasos:



8. Conclusiones.

- 1) Es muy importante establecer las condiciones para estabilizar a una proteína en el momento de ser purificada.
- 2) Un protocolo de purificación que incluya precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad podrían componer un protocolo adecuado para la purificación de la timidina cinasa de plantas.
- 3) A partir de este protocolo se pueden iniciar los ensayos posteriores para la determinación del estado de oligomerización de la enzima.

8. Apéndice.

1. Buffer de reacción TK.

Este buffer debe prepararse inmediatamente antes de realizar el ensayo.

1a. Solución de reacción:

TRIS.....	100 mM
MgCl ₂	10 mM
NaF.....	10 mM

1b. Transferir 10 ml de la solución de reacción a un tubo Falcon® y adicionar 0.00551 g de ATP (conc. Final 10 mM) a la solución de reacción.

1c. Reemplazar 1.43 µl de la solución de reacción por el mismo volumen de 2-b-mercaptoetanol. (Conc. Final 2 mM).

Nota: por cada reacción se utilizan 500 µl de amortiguador.

2. Buffer de Homogenización.

2a. Solución de Homogenización para la extracción de proteínas:

La composición del buffer de homogenización es: Tris 70 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1 mM, KCl 25mM, Na₂EDTA*2H₂O 5mM pH 8.0, sacarosa 0.25 mM, β-mercaptoetanol 15 mM, Tritón X-100 0.1% (V/V) y 40 µl de soln. stock del coctel de inhibidor de proteasas Complete™ (Boehringer) por cada ml de amortiguador.

(La solución stock de inhibidor de proteasas se prepara disolviendo una tableta de 0.08 g en 2 ml de PBS 1X o H₂O desionizada estéril. La solución se reparte en alícuotas de 300 µl (volumen suficiente para preparar 7.5 ml de amortiguador) y se almacena a -20°C.

Para preparar 10 ml de amortiguador de Homogenización:

1) Adicionar a 9.16 ml de amortiguador (Tris 70 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1 mM, KCl 25mM, Na₂EDTA*2H₂O 5mM pH 8.0):

- 0.9 mg de sacarosa.
- 10.5 µl de β-mercaptoetanol.
- 10 µl de Tritón X-100.
- 400 µl de solución stock de inhibidor de proteasas.
- 1 mL de glicerol 99%+.

2b. Solución stock de Inhibidor de proteasas.

La solución stock de inhibidor de proteasas se prepara disolviendo una tableta en 2 mL de PBS 1X o H₂O desionizada. La solución se reparte en alícuotas de 300 µl (volumen suficiente para preparar 7.5 ml de amortiguador y se almacena a -20°C).

3. Soluciones para el Gel SDS-PAGE.

3a. Solución A. (stock de Acrilamida, 100 mL).

Acrilamida..... 29.2 g
 Bis-acrilamida..... 0.8 g

Adicionar agua desionizada hasta 100 mL y agitar hasta disolver completamente.

Nota: estable por meses a 4°C.

3b. Solución B. (Buffer de separación 4X, 100 mL).

TRIS-HCl pH 8.8, 75 mL 2M 1.5 M
 SDS 4 mL 10%..... 0.4%
 H₂O cbp 100 mL

Nota: estable por meses a 4°C.

3c. Solución C. (Buffer de concentración 4X, 100 mL).

TRIS-HCl pH 6.8, 50 mL 1M..... 0.5 M
 SDS 10% 4 mL 0.4%
 H₂O c.b.p. 100 mL

Nota: estable por meses a 4°C.

3d. Persulfato de Amonio 10%.

Persulfato de Amonio 0.5 g
 H₂O 5 mL

Nota: estable por meses a 4°C.

3e. Buffer de Electroforesis.

TRIS..... 25 mM
 Glicina 192 mM
 SDS 0.1%
 H₂O c.b.p. 1 L

Nota: pH 8.3 aproximadamente, estable a temperatura ambiente por tiempo indefinido.

3f. Buffer de corrida 5X.

TRIS-HCl pH 6.8, 0.6 mL 1M	6 mM
Glicerol 50% 5 mL	25%
SDS 10% 2 mL	2%
2-mercaptoetanol 0.5 mL	14.4 mM
Bromofenol 1% 1mL	0.1%
H ₂ O c.b.p.	10 mL

Nota: estable por meses a -20°C.

4. Solución de Bloqueo. Western Blot.

Leche en polvo descremada	5%
Tween 20	0.6%
PBS 1X	10 mL

5. Amortiguador de Transferencia. Western Blot.

TRIS	25 mM
Glicina	192 mM
MeOH 10%	100 mL
H ₂ O c.b.p.	1 L

6. Solución Reveladora. Western Blot.

Kodak GBx developer and Replenisher.....103 mL de solución y diluir con 473 mL de H₂O destilada.

7. Líquido de Bray.

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

8. Buffer de elución. Exclusión Molecular.

NaPO ₄ (monobásico)	1.32 g
NaPO ₄ (dibásico)	5.71 g
NaCl	2.92 g
H ₂ O c.b.p.	500 mL
Ajustar a pH 7.4	
β-mercaptoetanol	125 μl
100 mM NaPO ₄ pH 7.4 / 100 mM NaCl / 0.025% β-mercaptoetanol.	

9. Buffer de equilibrio y elución. Intercambio Iónico.

NaH ₂ PO ₄	0.52 g
NaHPO ₄	2.29 g
EDTA	744 mg
H ₂ O c.b.p.	2 L
Ajustar pH a 7.0	
β-mercaptoetanol	300 μL (0.025%).

10. Buffer de equilibrio y elución. Cromatografía de Afinidad.

NaHPO₄10 mM

EDTA 1 mM

Ajustar a pH 7.0

β-mercaptoetanol 0.025%

Nota: para la elución de Timidina cinasa el buffer se suplemento con 1.5 mM de Timidina.

11. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación de proteína.

Se realizaron modificaciones a la curva patrón original, pues cuando se determinó concentración de proteína de las fracciones obtenidas en cada una de las cromatografías éstas eran muy bajas y no entraban en la curva patrón.

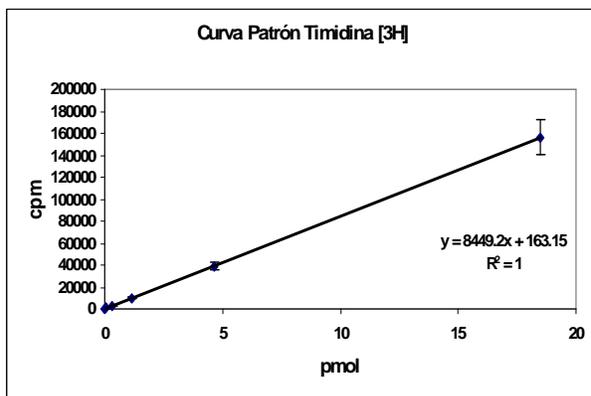
Stock de partida: 0.3 µg/ µl de BSA.

	BSA (µg)	BSA (µl)	Buffer de Extracción (µl)	Bradford (µl)	H₂O (µl)
1	Blanco	0	0	-	1000
2	Blanco	0	0	200	800
3	Blanco	0	10	200	790
4	0.5	1.66	0	200	798.34
5	1.0	3.33	0	200	796.67
6	1.5	5	0	200	795
7	2.0	6.66	0	200	793.34
8	2.5	8.33	0	200	791.67
9	3.0	10	0	200	790
10	3.5	11.66	0	200	788.34
11	4.0	13.33	0	200	786.67
12	4.5	15	0	200	785
13	5.0	16.66	0	200	783.34

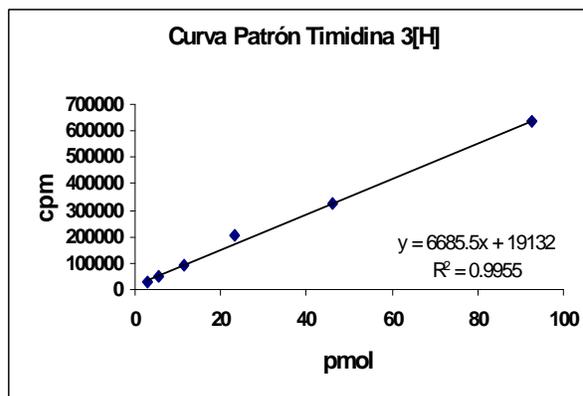
12. Curva Patrón Timidina [³H] para convertir cpm a pmol.

Concentración (pmol/µl)	c_pm	pmol
9.25	633 548	92.5
4.62	322 928	46.2
2.31	204 089	23.1
1.15	93 807	11.6
0.57	51 282	5.7
0.28	25 566	2.9

Rango Bajo de cpm.



Rango Alto de cpm.



12a. Solución blanco.

300 mL HCl 0.05N
 3 mL Líquido de Bray.

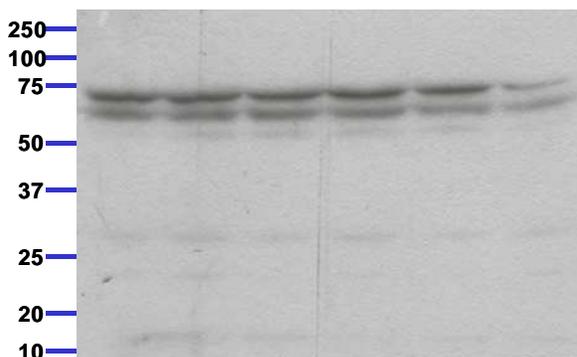
12b. Actividad específica [³H].

Actividad específica = 54 Ci/ mmol
 Concentración = 1 mCi/ mL
 entonces: (0.001 Ci/mL) * 0.01 mL = 1×10^{-5} Ci
 por lo tanto:

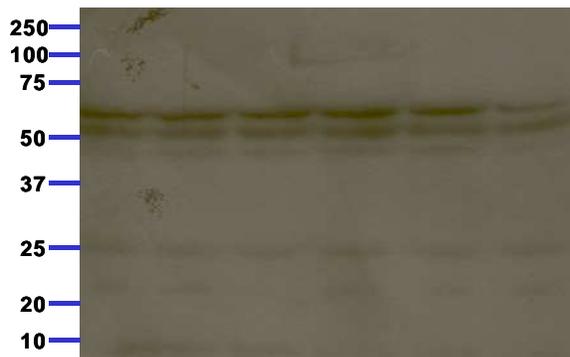
$$\begin{array}{lcl} 54 \text{ Ci} & \longrightarrow & 1 \text{ mmol} \\ 1 \times 10^{-5} \text{ Ci} & \longrightarrow & x = 1.85 \times 10^{-7} \text{ mmol} \end{array}$$

$1.85 \times 10^{-7} \text{ mmol} \times (10^9 \text{ pmol/1 mmol}) = \underline{185 \text{ pmol}}$

13. Modificación a las condiciones de inmunodetección por Western Blot.



Tiempo de exposición 3 minutos.



Tiempo de exposición 6 minutos.

- a) Se usó como 1er. Anticuerpo el anticuerpo purificado en una dilución 1:1000.
- b) Los lavados se redujeron a 5 minutos cada uno.
- c) El segundo lavado después de la exposición al 1er. Anticuerpo se realizó con PBS 2%.
- d) El segundo anticuerpo se incubó durante 2 horas.

Bibliografía.

- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. (1996). Protein methods. WILEY-LISS Inc., 2da.ed. publication p 196.
- Chang, Z.F., Huang, D.Y., et al. (1998) Serine 13 is the site of mitotic phosphorylation of human thymidine kinase. *J. Biol. Chem.* 273:12095-12100.
- Lee, L.S. Cheng, Y.C. (1976) Human Deoxythymidine kinase. Purification and general properties of the cytoplasmic and mitochondrial isozymes. *J. Biol. Chem.* 251: 2006-2604.
- Li, C. L., Lu, C.Y., Chang, Z.F., et al. (2004) Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 587-593
- Marianayagan, N.J., Sude, M., Matthews, J.M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol.29 No.11.
- Markus, S. et al. (2006) High-level expression and purification of human thymidine kinase 1: Quaternary structure, stability, and kinetics. *Protein Expression and Purification*.
- Moffett, B., Ashiara, H. (2002) Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. *Arabidopsis Book*. 2nd. Ed. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD. U.S.A. 39:1-20.
- Moreno, E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. UNAM 383 pp.
- Munch-Petersen, B., Tyrsted, G., 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.
- Nájera-Martínez, 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.
- Nájera-Martínez, M., Suzuri Hernández, J., Yoval Sánchez, B., Vázquez-Ramos, J., Plasencia, J. (2007) Estudio de la expresión, actividad y análisis funcional de la timidina cinasa (TK) de plantas. Resumen de presentación en el XII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Nov. 11-15, Veracruz, México.
- Reichard, P., (1998) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 57:349-374.
- Sherley, J.L., Kelly, T.J. (1988) Human Cytosolic Thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from Hela cells. *J. Biol. Chem.* 263: 375-382.
- Stryer, L. et al (2002) *Bioquímica* 5ta. Edición.
- Sugiura, M., Takeda, Y., (2000) Nucleic Acids, Biochemistry and Molecular Biology of Plants (Buchanan, B., Gruissen, W., Jones, R. eds.) American Society of Plant Biologist, E.U.A. pp 260-272.

- Sutterluety, H., Seiser, C., (1997) Thymidine inhibits the growth-arrested-specific degradation of thymidine kinase protein in transfected L fibroblasts. *J. Mol. Biol.* 265:153-160.
- Suzuri Hernández, L.J. (2001) Estructura y expresión del gene de la timidina cinasa de maíz. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM
- Suzuri Hernández, L. J. (2006) Actividad y expresión de la Timidina cinasa de maíz durante la germinación de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Wintersberger, E. (1997) Regulation and biological function of thymidine kinase *Biochem. Soc. Trans.* 25(1): 303-308.
- Wolcott, R.M., Colacino, J. M. (1989) Detection of Thymidine Kinase Activity using an assay based on the precipitation of Nucleoside Mono phosphates with Lanthanum Chloride. *Analytical Biochemistry* 178:38-40.