



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA TIMIDINA CINASA DE *Arabidopsis thaliana* Y SU FUNCIÓN EN LA REPARACIÓN DE DNA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. JOSÉ ANTONIO PEDROZA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

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

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. MARÍA DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Emilio Rojas del Castillo

Vocal: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Vocal: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Vocal: Dr. Ángel Arturo Guevara García

Secretario: Dra. María Imelda López Villaseñor

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM.

Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

Asesor

Q.F.B. José Antonio Pedroza García

Sustentante

Comité Tutorial:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez



AGRADECIMIENTOS

José Antonio Pedroza García recibió beca CONACYT durante sus estudios de Maestría.

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

Se agradece el apoyo técnico y la participación de la M.C. Manuela Nájera Martínez (Depto. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM) por la asistencia en el montaje de técnicas de Biología Molecular y en la discusión para la realización de este trabajo.

Se agradece la ayuda técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra por el mantenimiento de condiciones de invernadero para el cultivo de *Arabidopsis thaliana*.

Se agradece a la Dra. Carolina Peña Montes (Depto. de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM) por su asesoría en la técnica de qPCR-Tiempo Real.

Se agradece a las Dras. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez y Patricia Coello Coutiño por su valiosa participación en el comité tutorial y sus observaciones al proyecto.

Se agradece a la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología por donación de plásmidos usados en este trabajo.

Se agradece al Dr. Mario Rocha Sosa, Instituto de Biotecnología, UNAM por donación de plásmidos usados en este trabajo.

Se agradece al COMECYT por la beca otorgada para "*Titulación de Posgrado*".



DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis a mis padres y a todos mis seres queridos.

A mis amigos que han sido importantes en cada etapa de mi vida. Gracias por todos los momentos compartidos, por todas las vivencias y buenos ratos que hemos pasado.

Agradezco particularmente a mi amigo Fernando por su compañía y amistad durante todo este tiempo de conocernos, pero en especial por la ayuda que recibí de su parte para este trabajo, gracias por esas cientos de fotografías tomadas, extracciones y calibraciones de RNA, así como toda tu ayuda para los ensayos de qPCR y todo el apoyo que siempre me diste. Gracias por ser un gran amigo.

Gracias al Dr. Javier por dejarme trabajar libremente en el proyecto, por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo. Así como por haberme dejado aprender más acerca de la docencia.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio, Maru y Lalo por hacer siempre más amena la estancia en el Laboratorio, a Manu por su ayuda técnica en la realización de los experimentos y por las buenas conversaciones que siempre se presentaron. Así como a la Dra. Marina, a Chelo y a su equipo de trabajo; Ari, Pancho, Cinthia y Dora, por la buena convivencia que siempre está presente.

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

Gracias a Fer, Pau, Viry Zu, Viry Lu y Roberto del Lab 114, por siempre hacerme parte de sus convivencias.



ABREVIATURAS

APC	Complejo promovedor de la anafase	nt	nucleótidos
cbp	cuanto baste para	oetk1a	mutante de inserción de T-DNA del gen <i>TK1a</i>
cDNA	DNA complementario	ORF	marco de lectura abierto
Ci	Curie	pb	pares de bases
CPDs	dímeros de pirimidina ciclobutano	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
cpm	cuentas por minuto	promTK1a	Región promotora TK1a
Cyc	ciclina	promTK1b	Región promotora TK1b
DEPC	Dietil pirocarbonato	RNR	Ribonucleótido reductasa
DSBs	rupturas de la doble cadena de DNA	rpm	revoluciones por minuto
dTMP	desoxitimidina monofosfato	RT	transcriptasa reversa
dTTP	desoxitimidina trifosfato	SSB	ruptura de una sola cadena de DNA
GFP	Proteína verde fluorescente	UV	luz ultravioleta
GUS	proteína β -glucuronidasa	Thd	Timidina
HR	Recombinación homóloga	TK	Timidina cinasa
K_M	Constante de Michaelis y Menten	TK1a	Timidina cinasa 1a de <i>A. thaliana</i>
MMC	Mitomocina C	TK1b	Timidina cinasa 1b de <i>A. thaliana</i>
mTK1b	mutante de inserción de T-DNA del gen <i>TK1b</i>	TLS	Síntesis por translesión
NER	Reparación por escisión de nucleótidos	TS	Timidilato sintasa
NHEJ	Unión de extremos no homólogos	μL	microlitro
		3'UTR	Región 3' no traducida
		5'UTR	Región 5' no traducida
		wt	línea tipo silvestre de <i>A. thaliana</i>



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS EN PLANTAS.....	2
1.1 Vía <i>de novo</i> de síntesis de nucleótidos.....	2
1.2 Vía de salvamento de nucleótidos.....	6
2. TIMIDINA CINASA 1 (TK1)	10
2.1 Función biológica de la TK1 en mamíferos.....	11
2.2 Regulación de la TK1 durante el ciclo celular.....	13
2.3 Regulación transcripcional de la timidina cinasa en mamíferos.....	14
2.4 Regulación post-traducciona l de la TK1 en mamíferos.....	16
2.5 Timidina cinasa 1 en plantas.....	18
3. DAÑO GENOTÓXICO A DNA.....	20
3.1 Estrés genotóxico en plantas por luz ultravioleta.....	21
3.2 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)	25
3.3 Reparación de la ruptura de la doble hélice.....	27
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
1.1 Desinfección y siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
1.2 Resiembra de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2. CLONACIÓN DE PROMOTORES DE TKS CON LA TECNOLOGÍA GATEWAY®	35
2.1 Fundamento.....	35



2.2 Obtención de productos de PCR flanqueados por sitios <i>attB</i>	36
2.3 Clonación de promotores de los genes <i>TK1</i> en el vector donador.....	39
2.4 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	40
2.5 Recombinación en vectores binarios.....	40
3. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	41
3.1 Transformación por choque térmico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.3 Selección de plantas transgénicas.....	42
4. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS REPORTERAS	43
4.1 Ensayo de GUS.....	43
4.2 Microscopía confocal.....	43
5. EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE MUTANTES DE LA TK1 EN RESPUESTA A AGENTES GENOTÓXICOS.....	44
5.1 Ensayo de sensibilidad a UV-C en el crecimiento de la raíz.....	44
5.2 Ensayo de sensibilidad a MMC y a zeocina.....	45
6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>AtTK1a</i> Y <i>AtTK1b</i>	45
6.1 Extracción de RNA.....	45
6.2 Cuantificación y calibración del RNA total.....	46
6.3 Reacción de la transcriptasa reversa.....	47
6.4 PCR en tiempo real (qPCR)	48
7. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS.....	50
7.1 Extracción de proteínas.....	50
7.2 Determinación de la actividad enzimática de la timidina cinasa.....	50
RESULTADOS.....	53
1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS GENES <i>AtTK1a</i> Y <i>AtTK1b</i>	53



2.OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS DE PROMOTORES DE LOS GENES TKS CON LOS GENES REPORTEROS GUS Y GFP.....	56
2.1 Obtención de los productos de PCR flanqueados por sitios de recombinación (<i>attB</i>)	56
2.2 Recombinación de los promotores potenciales de los genes <i>TK1</i> con el vector donador pDONR221 y con los vectores binarios.....	57
3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>TK1a</i> Y <i>TK1b</i> DURANTE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
4. FUNCIÓN DE LOS GENES DE TK EN LA REPARACIÓN DEL DNA EN <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
4.1 Evaluación de la susceptibilidad de mutantes de T-DNA de la TK en respuesta a agentes genotóxicos.	66
4.1.1 Estandarización del tiempo de irradiación con luz UV-C.....	67
4.1.2 Efecto de los compuestos MMC y zeocina.....	68
4.2 Actividad de los promotores <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en respuesta a estrés genotóxico.....	70
4.2.1 Actividad de los promotores <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en respuesta a MMC y zeocina.....	71
4.2.2 Actividad de los promotores <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en respuesta a luz UV-C.....	74
4.2.3 Control positivo de daño al DNA.....	76
4.3 Expresión de los genes <i>TK1</i> en las células del meristemo de raíz.....	77
4.4 Determinación de los niveles de transcrito de los genes <i>TK1</i> en respuesta a radiación UV-C.....	79
4.4.1 Niveles basales de transcrito de los genes <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en las mutantes de T-DNA en plántulas de 7 días.....	79
4.4.2 Cuantificación de los niveles de transcrito <i>TK1a</i> de plántulas de 7 días irradiadas con luz UV-C	80
4.4.3 Cuantificación de los niveles de transcrito <i>TK1b</i> de plántulas de 7 días irradiadas con luz UV-C.....	81
4.4.4 Niveles del transcrito <i>TK1a</i> en plantas tipo silvestre (<i>wt</i>) y sobre-expresoras (<i>oetk1a</i>) en hojas maduras de roseta.....	82
4.5 Determinación de la actividad enzimática de TK en respuesta a luz UV-C.....	83



4.5.1 Estandarización del método para determinar la actividad enzimática de TK en <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
4.5.2 Estandarización del tiempo de exposición a luz UV-C para afectar la actividad de TK.....	85
4.5.3 Determinación de la actividad de TK en líneas mutantes (<i>oetk1a</i> y <i>mtk1b</i>) y tipo silvestre, en condiciones basales como en respuesta a irradiación UV-C.....	86
DISCUSIÓN.....	88
1. <i>AtTK1a</i> Y <i>AtTK1b</i> SE EXPRESAN A LO LARGO DEL DESARROLLO DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
2. EL GEN <i>TK1a</i> DE <i>A. thaliana</i> PARTICIPA EN VARIAS VÍAS DE RESPUESTA A ESTRÉS GENOTÓXICO.....	92
3. LOS GENES <i>TK1a</i> Y <i>TK1b</i> SE EXPRESAN DE MANERA DIFERENCIAL EN RESPUESTA A ESTRÉS GENOTÓXICO.....	95
4. ACTIVIDAD DE TIMIDINA CINASA EN <i>A. thaliana</i> EN RESPUESTA A RADIACIÓN UV-C	100
CONCLUSIONES.....	102
PERSPECTIVAS.....	103
REFERENCIAS.....	104
ANEXOS.....	113
ANEXO I. MATERIALES Y MÉTODOS COMPLEMENTARIOS.....	113
ANEXO II. RESULTADOS ADICIONALES.....	115
ANEXO III. COMPOSICIÓN DE MEDIOS Y SOLUCIONES.....	120



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el PCR 1	37
Tabla 2. Oligonucleótidos adaptadores empleados en el PCR2.....	37
Tabla 3. Programa de Amplificación de las potenciales secuencias promotoras.....	38
Tabla 4. Mezclas de reacción para los 2 PCRs.....	38
Tabla 5. Mezcla de reacción de RT.....	47
Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para qPCR.....	48
Tabla 7. Mezcla de reacción para la técnica de q-PCR para los diferentes pares de oligonucleótidos.....	49
Tabla 8. Porcentaje de sobrevivencia a MMC y zeocina.....	69

Tablas suplementarias:

Tabla 1S. Motivos <i>cis</i> -reguladores que dirigen expresión tejido-específica encontrados en las regiones promotoras de los genes <i>TK1</i>	115
Tabla 2S. Motivos <i>cis</i> -reguladores localizados en la región promotora del gen <i>TK1a</i>	116
Tabla 3S. Motivos <i>cis</i> -reguladores localizados en la región promotora del gen <i>TK1b</i>	116



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética <i>de novo</i> de purinas en plantas.....	4
Figura 2. Ruta biosintética <i>de novo</i> de nucleótidos de pirimidina en plantas.....	5
Figura 3. Vías de síntesis y degradación de nucleótidos de pirimidinas en tabaco.....	8
Figura 4. Metabolismo de la timidina.....	9
Figura 5. Representación de la regulación de la enzima TK1 durante el ciclo celular.....	14
Figura 6. Dímeros de pirimidinas inducidos por radiación UV-B/C.....	22
Figura 7. Reparación por escisión de nucleótidos.....	27
Figura 8. Reparación de DSBs por recombinación homóloga.....	29
Figura 9. Reacciones de recombinación del sistema Gateway.....	36
Figura 10. Estructura de los genes <i>TK1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
Figura 11. Secuencias tomadas como potenciales promotores de los genes de la <i>TK1</i> de <i>A. thaliana</i>	55
Figura 12. Productos de amplificación de la PCR1 y la PCR2.....	57
Figura 13. Clonación de las secuencias 5' de los genes <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en el vector donador pDONR221.....	58
Figura 14. Clonación de las secuencias 5' de <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en vectores binarios.....	59
Figura 15. Expresión de los genes <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> durante los 3 primeros días de desarrollo	62
Figura 16. Expresión del gen <i>TK1a</i> en diferentes tejidos y etapas del desarrollo.....	63
Figura 17. Expresión del gen <i>TK1b</i> en diferentes tejidos y etapas del desarrollo.....	64
Figura 18. Expresión de los genes <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i> en hojas de roseta.....	65
Figura 19. Líneas de inserción de T-DNA en los genes de la <i>TK1</i> de <i>A. thaliana</i>	66
Figura 20. Efecto de la luz UV-C en el crecimiento de la raíz primaria.....	67
Figura 21. Efecto de la exposición a MMC o zeocina sobre el desarrollo.....	69
Figura 22. Efecto de la zeocina en el peso fresco	70



Figura 23. Efecto de la exposición a zeocina o MMC en la expresión de <i>promTK1a::GUS</i>	72
Figura 24. Efecto de la exposición a zeocina o MMC en la expresión de <i>promTK1b::GUS</i>	73
Figura 25. Efecto de la exposición a luz UV-C en la expresión de <i>promTK1a::GUS</i> y <i>promTK1b::GUS</i>	75
Figura 26. Expresión de <i>pCycB1:1DB::GUS</i> en respuesta a daño genotóxico.....	76
Figura 27. Expresión de <i>promTK1a::GFP</i> en las células del meristemo de la raíz primaria en respuesta a estrés genotóxico.....	78
Figura 28. Niveles de expresión del transcrito TK1a en la línea <i>oetk1a</i> y del transcrito TK1b en la línea mutante <i>mtk1b</i>	79
Figura 29. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de transcrito del gen <i>TK1a</i> en plántulas de 7 días, tanto en la línea tipo silvestre como en <i>oetk1a</i>	80
Figura 30. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de transcrito del gen <i>TK1b</i> en plántulas de 7 días, tanto en la línea silvestre como en <i>mtk1b</i>	81
Figura 31. Niveles de expresión de <i>TK1a</i> en las líneas <i>oetk1a</i> en hojas de roseta de plantas de 6 semanas.....	82
Figura 32. Efecto de la concentración de la enzima TK1 y curso de la reacción con respecto al tiempo.....	84
Figura 33. Efecto del tiempo de exposición a luz UV-C sobre la actividad de TK1 en plántulas tipo silvestre (<i>wt</i>) de 7 días	85
Figura 34. Efecto de la exposición a luz UV-C sobre la actividad de TK1 en plántulas mutantes y tipo silvestre de 7 días.....	86

Figuras Suplementarias:

Figura 1S. Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.....	117
Figura 2S. Curvas estándar de amplificación (Ct vs log concentración) de los genes <i>APT1</i> , <i>TK1a</i> y <i>TK1b</i>	119



RESUMEN

La TK1 está involucrada en la vía de salvamento de pirimidinas y su función es crucial para mantener la poza de timidina trifosfato, un precursor directo para la síntesis de DNA, esta enzima cataliza la fosforilación del nucleósido de timidina en una reacción dependiente de ATP para producir dTMP. Se ha demostrado que las TK1s de mamíferos participan en la replicación del DNA por lo que sus niveles de transcrito, proteína y actividad enzimática aumentan en la transición G₁/S del ciclo celular, teniendo un máximo en la fase S. Asimismo se ha demostrado su función en los mecanismos de reparación del daño dependientes de la síntesis de DNA. Sin embargo, en plantas se desconoce su función, la TK1 de plantas en contraste a la de mamíferos no es regulada por el ciclo celular. Porque las plantas están expuestas a radiación UV proveniente de la luz solar, se ha sugerido que la expresión de la TK1 es crítica para reparar el daño al DNA generado por luz UV. El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes que codifican para la timidina cinasa 1 (TK1a y TK1b), mientras que las mutantes nulas simples no presentan diferencias fenotípicas durante el desarrollo en relación a la línea tipo silvestre, la doble mutante es letal, lo que sugiere que ambas proteínas catalizan reacciones redundantes y que la actividad de TK1 es esencial para el desarrollo. Para conocer más acerca de la función de estas proteínas en este trabajo se estudió sus patrones de expresión durante el desarrollo y su función en respuesta a estrés genotóxico.

Los patrones de expresión durante el desarrollo se evaluaron en plantas transgénicas, determinando la actividad del gen reportero GUS, cuya expresión fue dirigida por los promotores de los genes *TK1a* y *TK1b* respectivamente. Ambos genes de la TK1 de *A. thaliana* tuvieron patrones de expresión similares en los diferentes tejidos analizados, sin embargo, el gen *TK1a* se expresó en mayor nivel y diferencialmente en algunos tejidos.

Por otra parte, los genes *TKs* de *A. thaliana* fueron expresados diferencialmente en respuesta a estrés genotóxico. La expresión del gen *TK1a* fue inducida por luz UV-C, mientras que la expresión del gen *TK1b* no fue afectada por este agente genotóxico. Sin embargo, hubo un aumento en la expresión de ambos genes *TKs* por exposición a zeocina y MMC. Además se encontró que plántulas sobre-expresoras del transcrito *TK1a* y con mayor actividad enzimática TK mostraron mayor tolerancia a agentes genotóxicos en comparación a las tipo silvestre. Estos resultados sugieren que el gen *TK1a* participa en los mecanismos de reparación del DNA.



INTRODUCCIÓN

1. Vías de biosíntesis de nucleótidos en plantas.

Dentro de la célula hay dos clases de bases nucleotídicas, purinas y pirimidinas. Las pozas de estas moléculas están finamente reguladas de tal manera que se mantiene una proporción de cada una de ellas de manera muy estricta en todos los tipos celulares, incluyendo plantas (Kafer *et al.*, 2004). Estos precursores deben estar disponibles para los procesos que requieren síntesis de DNA como son la replicación y la reparación, así como en la transcripción. En general, el metabolismo de nucleótidos se divide en 4 procesos: 1) la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, 2) las respectivas rutas de salvamento, 3) las reacciones de fosfotransferencia (entre nucleótidos de purina y pirimidinas) y 4) las reacciones de degradación (Zrenner *et al.*, 2006). En plantas, la mayoría de estos procesos están pobremente comprendidos. El análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló la presencia de todos los genes involucrados en la biosíntesis de nucleótidos por lo que se piensa que es muy similar al de otros organismos eucariontes, con pocas excepciones (Kafer *et al.*, 2004). La ruta biosintética *de novo* produce nucleótidos a partir de compuestos sencillos como aminoácidos y CO₂, consumiendo grandes cantidades de energía, por otra parte, la vía de salvamento recicla nucleósidos y bases libres provenientes de la degradación de los ácidos nucleicos, convirtiéndolos a los respectivos nucleótidos a un costo energético, en forma de ATP, menor que la vía *de novo* (Zrenner *et al.*, 2006).

1.1 Vía *de novo* de síntesis de nucleótidos.

La síntesis *de novo* de nucleótidos de purina ocurre a partir de moléculas pequeñas como los aminoácidos glicina, glutamina y aspartato, el precursor de la ribosa 5 fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), 10-formil tetrahidrofolato y dióxido de carbono. Las plantas sintetizan inosina monofosfato (IMP), adenosina monofosfato (AMP) y guanosina monofosfato (GMP) usando reacciones similares a las encontradas en animales y microorganismos. La vía *de novo* de purinas está



constituida por 14 reacciones enzimáticas (Figura 1), comenzando con la formación de fosforribosil amina a partir de PRPP y glutamina, luego de varias reacciones se forma el ribonucleótido 5-aminoimidazol que es el primer anillo. Para la formación del segundo anillo de la estructura se emplea CO_2 , aspartato y una segunda molécula de tetrahidrofolato. La primera molécula de purina completa que se obtiene es IMP. Después de la formación de IMP, la biosíntesis de purinas se bifurca en dos: 1) la adenosina monofosfato es sintetizada al reemplazar el grupo carboxilo en el C6 por un grupo amino, el cual es proporcionado por el aspartato; GTP es el donador de fosfato para formar adenilsuccinato, posteriormente se remueve el fumarato para formar AMP. 2) la formación de GMP se inicia por la oxidación de IMP seguida por la inserción de un grupo amino que es proporcionado por la glutamina, lo que permite la formación de xantosina monofosfato que posteriormente da origen a GMP (Boldt & Zrenner, 2003; Zrenner *et al.*, 2006).

Se predice, aunque no se ha demostrado experimentalmente para todas ellas, que las enzimas involucradas en los primeros 10 pasos de la biosíntesis *de novo* de purinas que conducen a IMP están localizadas en los cloroplastos, mientras que las enzimas para las siguientes reacciones de la vía que participan en la formación de AMP y GMP están presumiblemente localizadas en el citosol (Boldt & Zrenner, 2003).

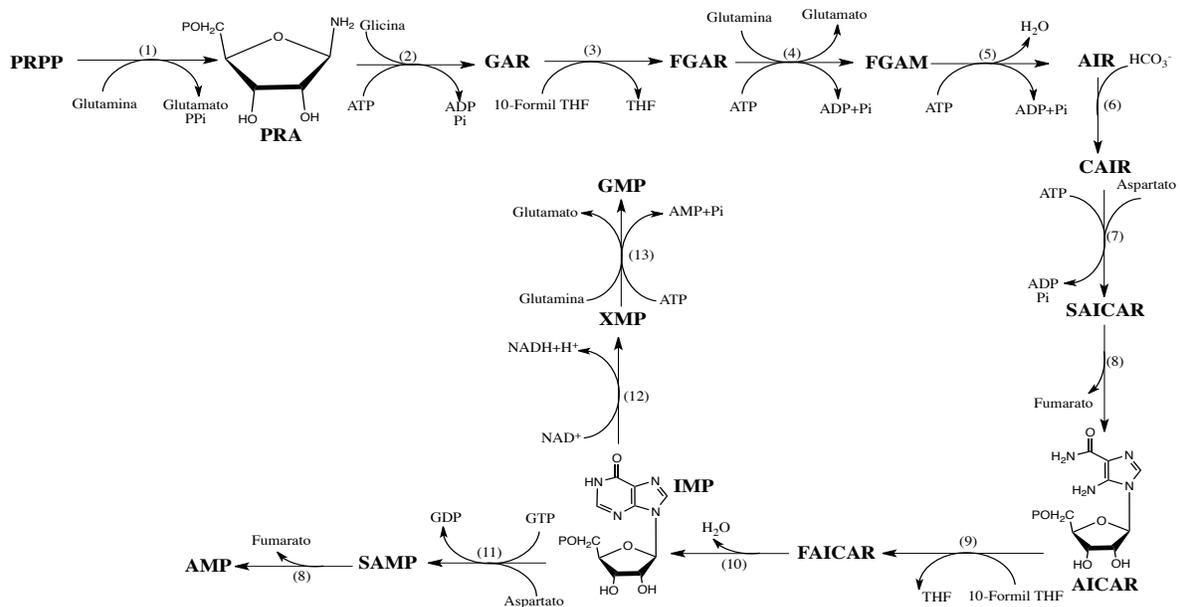


Figura 1. Ruta biosintética de novo de purinas en plantas. Metabolitos: PRA, 5-fosforribosil amina; GAR, glicinamida rionucleótido; FGAR, formilglicinamida rionucleótido; FGAM, formilglicina amidina rionucleótido; AIR, 5-aminoimidazol rionucleótido; CAIR, 5-aminoimidazol 4-carboxilato rionucleótido; SAICAR, 5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxiamida rionucleótido; AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboxiamida rionucleótido; FAICAR, 5-formamidoimidazol-4-carboxiamida rionucleótido; SAMP, adenilosuccinato; XMP, xantósina-5'-monofosfato. Las enzimas mostradas son: (1) amido fosforribosil transferasa, (2) GAR sintetasa, (3) GAR formil transferasa, (4) FGAM sintetasa, (5) AIR sintetasa, (6) AIR carboxilasa, (7) SAICAR sintetasa, (8) adenilosuccinato liasa, (9) AICAR formil transferasa, (10) IMP ciclohidrolasa, (11) SAMP sintetasa, (12) IMP deshidrogenasa, (13) GMP sintetasa (Tomada de Stasolla *et al.*, 2003).

La biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina está evolutivamente conservada en todas las especies estudiadas y es definida como la formación de uridina monofosfato (UMP) a partir de carbamoilfosfato (CP), aspartato y PRPP; esta ruta también es conocida como la vía del orotato. La biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina consiste en 6 pasos enzimáticos (Figura 2): en el primer paso se produce CP a partir de una reacción entre carbonato, ATP y un grupo amino proveniente de la glutamina; en el siguiente paso se forma carbamoilaspartato (CA) y enseguida se da la ciclación del CA para producir el anillo de pirimidina. Este compuesto es el dihidroorotato que subsecuentemente es oxidado para generar una molécula de orotato que es condensado con PRPP para producir oritidina 5'-monofosfato (OMP), la cual es descarboxilada para formar uridina-5'-monofosfato (UMP). En reacciones sucesivas, la UMP se fosforila hasta

generar UTP, que sufre transaminación para formar la citidina trifosfato (CTP) (Stasolla *et al.*, 2003; Kafer *et al.*, 2004; Zrenner *et al.*, 2006; Loukanina *et al.*, 2008).

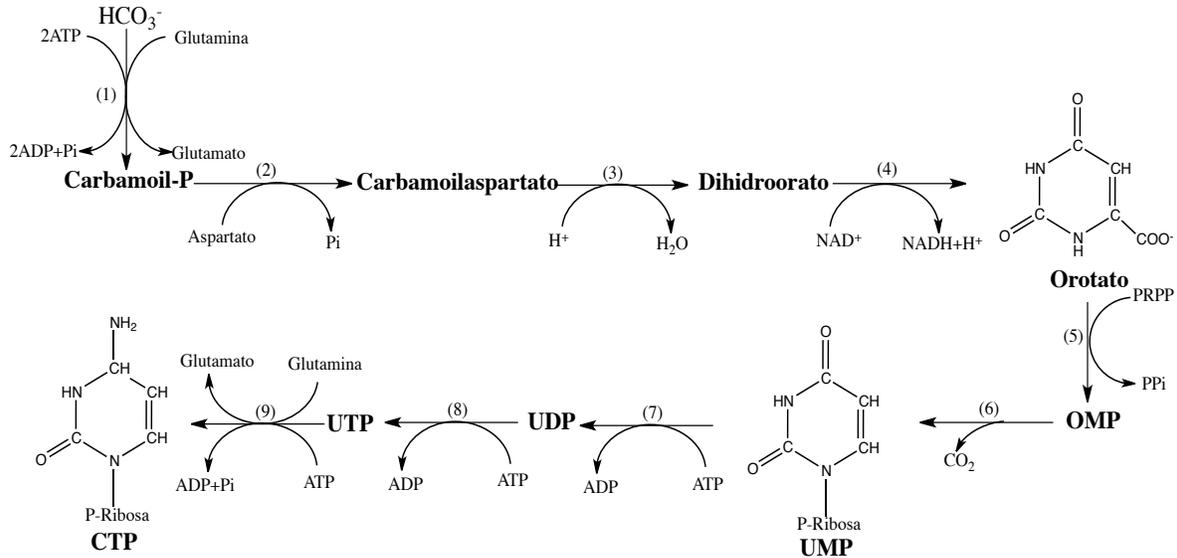


Figura 2. Ruta biosintética de novo de nucleótidos de pirimidina en plantas. Las enzimas de la vía: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarbamoilasa, (3) dihidroorotasa, (4) dihidroorotato deshidrogenasa, (5)-(6) UMP sintasa (orotato fosforibosiltransferasa más orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), (7) UMP cinasa, (8) nucleósido difosfato cinasa, (9) CTP sintetasa (Tomada de Stasolla *et al.*, 2003).

Una enzima esencial en la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina y pirimidina es la ribonucleótido reductasa (RNR) (Roa *et al.*, 2009). Esta enzima cataliza la reducción del grupo $-\text{OH}$ del $\text{C}2'$ de la ribosa de los cuatro ribonucleótidos difosfato (NDPs) para formar los correspondientes desoxirribonucleótidos (dNDPs) (Wang & Liu, 2006). Con excepción del dUDP, los dNDPs son posteriormente fosforilados y los resultantes dCTP, dATP y dGTP son utilizados como precursores directos para la síntesis de DNA. En plantas, la conversión de dUTP al nucleótido de timina implica la desfosforilación a dUMP seguida por una metilación (Stasolla *et al.*, 2003). En esta última reacción la enzima timidilato sintasa cataliza la transferencia del grupo metilo de N^5 , N^{10} -metiltetrahidrofolato (MTHF) al carbono $5'$ de dUMP para formar dTMP. La molécula MTHF es producida por la dihidrofolato reductasa, molécula que además



de participar como donador del grupo metilo tiene función como agente reductor. Una proteína bifuncional que consiste de timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa se ha detectado en plantas. La conversión de dTMP a dTTP ocurre por reacciones secuenciales catalizadas por la nucleósido monofosfato cinasa y la nucleósido difosfato cinasa (Stasolla *et al.*, 2003). En plantas, todas las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina se localizan en los plastidios, donde se lleva a cabo este proceso (Kafer *et al.*, 2004).

1.2 Vía de salvamento de nucleótidos.

Como la síntesis *de novo* de nucleótidos tiene un alto costo energético, los organismos han evolucionado otras actividades enzimáticas para reusar nucleósidos y bases libres, productos de la degradación intracelular del DNA, RNA y nucleótidos. Éstas constituyen las vías de salvamento que consumen menos energía y precursores que la síntesis *de novo* de nucleótidos, pues generalmente consisten en la refosforilación de nucleósidos preformados (Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006). Mientras que la vía *de novo* requiere de la hidrólisis de 5 nucleótidos trifosfato para producir AMP o de 7 para sintetizar GMP, la vía de salvamento de purinas solamente requiere una molécula de ATP (Zrenner *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han identificado y/o caracterizado varias enzimas que forman parte de algunas de las rutas de salvamento de nucleótidos en plantas (Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006; Zrenner *et al.*, 2009), lo que ha aportado evidencia de que ambas rutas de salvamento de nucleótidos caracterizadas en mamíferos se conservan en plantas superiores. Éstas son:

1. Reacciones de un paso catalizadas por la enzima fosforribosil transferasa, en las que la base libre se une a PRPP generando directamente un nucleótido monofosfato (Moffat & Ashihara, 2002).

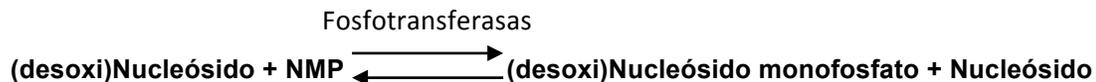
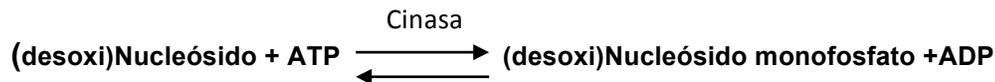




2. Reacciones de dos pasos catalizadas primero por la enzima nucleósido fosforilasa seguida de una nucleósido cinasa o una nucleósido fosfotransferasa. La nucleósido fosforilasa cataliza reversiblemente la fosforólisis de ribo- y desoxirribonucleósidos para generar la base libre y la 2`-desoxirribosa-1-fosfato.



La nucleósido cinasa o fosfotransferasa. En esta reacción el nucleósido es fosforilado por una cinasa que emplea ATP como donador de fosfato o bien por una fosfotransferasa inespecífica que puede incorporar el fosfato de un nucleótido monofosfato, como el AMP (Moffat & Ashihara, 2002).



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

Por su parte, los nucleósidos uridina/citidina y timidina son convertidos a sus respectivos nucleótidos por desoxinucleósido cinasas específicas, uridina cinasa (UK) y timidina cinasa (TK), siendo el uracilo la única base de pirimidina que es

directamente rescatada a UMP en una reacción dependiente de PRPP catalizada por UPRT (Figura 3). La enzima, uridina/citidina cinasa está presente en todas las plantas investigadas hasta la fecha y tiene especificidad dual para las dos bases. La dexocitidina cinasa y la timidina cinasa están presentes en plantas, pero aún no se han elucidado detalles de sus propiedades y de sus funciones (Stasolla *et al.*, 2003; Kafer *et al.*, 2004; Zrenner *et al.*, 2006).

El metabolismo de la timidina es el más complicado de todos los precursores de los ácidos nucleicos, porque se requieren más pasos para generar dTTP por la vía *de novo* que otros nucleótidos trifosfato de pirimidina. Como resultado, la función de salvamento de la timidina puede ser especialmente importante para la célula (Figura 4) (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

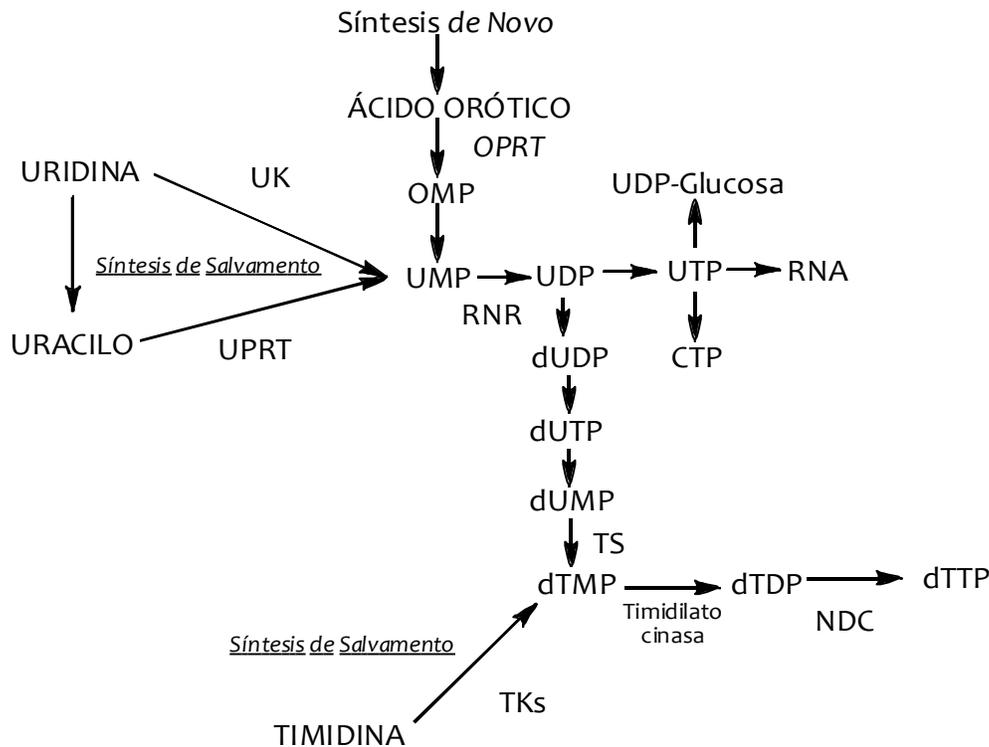


Figura 3. Vías de síntesis y degradación de nucleótidos de pirimidinas en tabaco. Orotato fosforribosiltransferasa (OPRT), Ribonucleótido reductasa (RNR), Timidilato sintasa (TS), Timidina cinasa (TK), Uridina cinasa (UK), uracil fosforribosil transferasa (UPRT), Nucleósido difosfato cinasa (NDC) (Adaptada de Loukanina *et al.*, 2008).

Además del aporte de nucleótidos, la vía de salvamento también participa en la regulación de los niveles de estos metabolitos, debido a que la degradación de los nucleótidos por múltiples fosfatasa, nucleotidasas y nucleosidasas, en conjunto

con las vías de síntesis, regulan el tamaño de estas pozas (Dobrovolsky *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006). Por lo que la expresión de algunos genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos son dependientes del ciclo celular. Durante las distintas fases del ciclo celular hay variaciones en las pozas de nucleótidos, que se incrementan durante las fases S y G2 (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

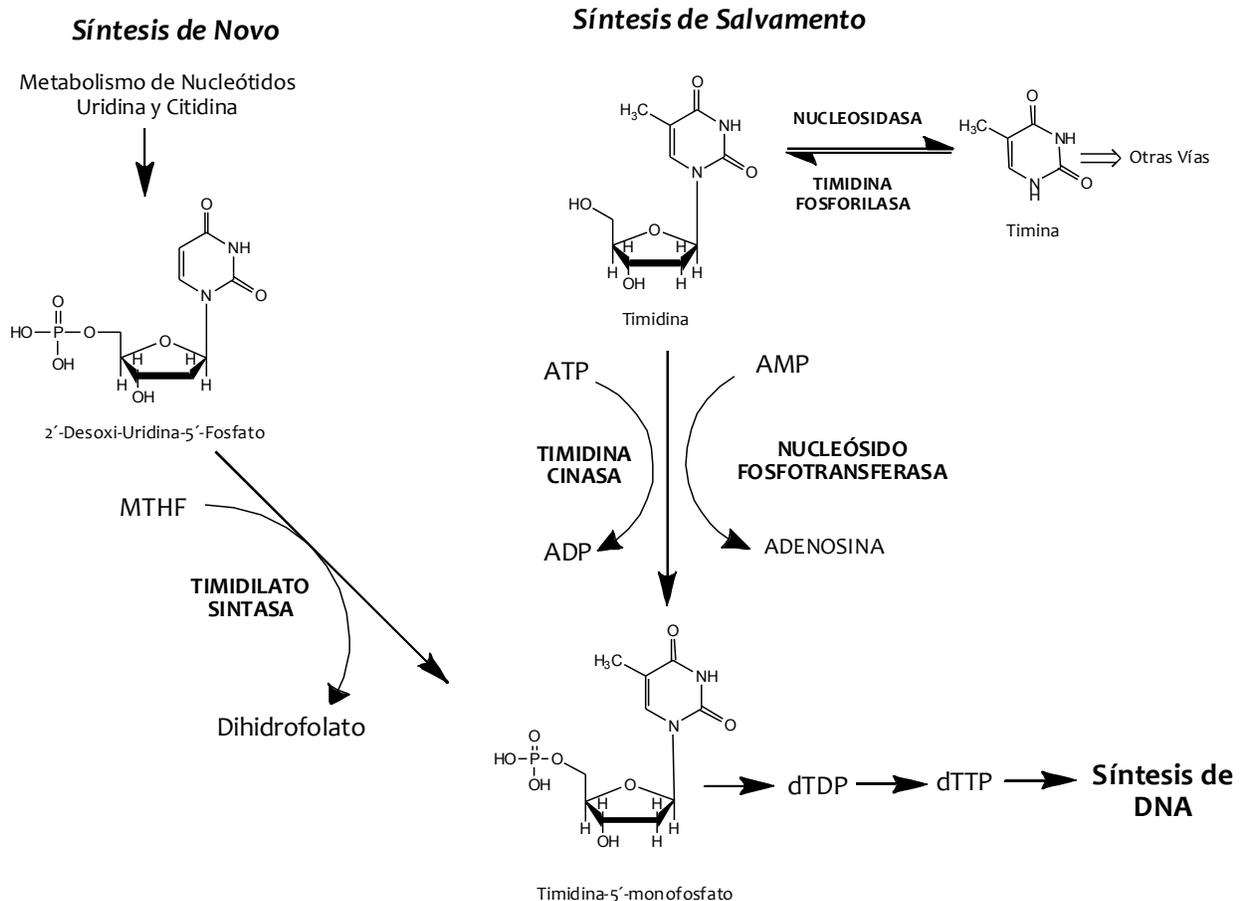


Figura 4. Metabolismo de la timidina. La actividad de la timidina cinasa (vía de salvamento) y de la timidilato sintasa (TS; vía *de novo*), se incrementa en la fase S, incrementando la concentración de Timidina monofosfato (TMP). La TS cataliza la transformación de 2' Desoxi-uridina-5'-fosfato (dUMP) a TMP, mediante la transferencia dependiente de folato de un grupo metilo al C5 del anillo pirimidínico. Reacciones clave del metabolismo de uridina y citidina, permiten la formación de dUMP. La TMP es fosforilada dos veces más antes de incorporarse al DNA por la timidilato sintasa y una nucleósido difosfato cinasa inespecífica (Tomada de Dobrovolsky *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis thaliana* se ha caracterizado la expresión de las isoformas de la enzima uracil fosforribosil transferasa (UPRT), que participan en la vía de salvamento de pirimidinas convirtiendo al nucleósido uridina a uridina monofosfato.



Los resultados indicaron que son expresadas diferencialmente. De este hallazgo se ha concluido que el salvamento de pirimidinas puede ocurrir tanto en el citosol, como en los plastidios (Zrenner *et al.*, 2006).

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

2. Timidina cinasa 1 (TK1).

La timidina cinasa 1 o citosólica (ATP: timidina 5'-fosfotransferasa, EC 2.7.1.21; TK) pertenece a la familia de las enzimas desoxirribonucleósido cinasas; esta enzima tiene una función crucial en la vía de salvamento de pirimidinas, su actividad cataliza la transferencia del grupo fosfato γ del ATP al grupo 5' hidroxilo de la timidina para formar dTMP, en una reacción dependiente de Mg^{2+} (Flemington *et al.*, 1987; Johansson & Karlsson, 1997). Una vez que se ha formado la dTMP, se requieren dos pasos adicionales de fosforilación, que son llevados a cabo por la timidilato cinasa y una nucleósido difosfato cinasa, para producir timidina trifosfato (dTTP) que posteriormente es incorporada al DNA en los procesos de replicación y reparación (Pérez-Pérez *et al.*, 2008).

En células de mamíferos existe otra isoforma de la TK designada como TK2, que está localizada en la mitocondria. La TK2 se expresa constitutivamente, mientras que la expresión de TK1 citosólica es regulada durante el ciclo celular (Hazra *et al.*, 2009). Cada una pertenece a una familia filogenéticamente diferente y en humanos estas dos enzimas sólo exhiben una identidad significativa a nivel de aminoácidos en el extremo amino.

La TK1 está filogenéticamente conservada en una amplia variedad de organismos, se ha identificado y/o caracterizado en virus, bacterias, protozoarios, plantas y



mamíferos. Sin embargo, organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* carecen de esta enzima (Eriksson *et al.*, 2002).

2.1 Función biológica de la TK1 en mamíferos.

Durante mucho tiempo se consideró que la función de la timidina cinasa estaba exclusivamente asociada al proceso de replicación del DNA en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que el decremento en los niveles de dTTP debido a la deficiencia de la TK en líneas celulares se correlacionaba con el incremento en el daño a DNA induciendo muerte celular y mutagénesis (Wakazono *et al.*, 1994; Wakazono *et al.*, 1996). Además se demostró que la expresión de la TK1 no estaba restringida a la fase S de células en proliferación, ya que también se expresa en tejidos diferenciados (Al-Nabulsi *et al.*, 1994). Estos datos sugirieron la participación de la TK1 en los procesos de reparación del DNA.

En líneas celulares deficientes en el supresor tumoral p53, expuestas a varios agentes genotóxicos se incrementan los niveles de transcrito y proteína TK1 24 h después del tratamiento. Esto indica que la regulación positiva de la TK1 es un evento general asociado al daño a DNA. La expresión de la TK1 es inducida por daño a DNA en diferentes líneas celulares y la prolongación de la inducción de la TK1 está relacionada con el contexto celular de p53, ya que en células tumorales deficientes en dicha proteína la poza de dTTP se expande hasta la fase G2, lo que mejora la reparación del daño y la sobrevivencia de las células. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la inhibición del ciclo celular es mediada por la proteína p21 afectando los niveles de TK1 en respuesta al daño a DNA en presencia de la proteína p53 funcional, ya que el arresto del ciclo celular ocurre en la transición G1/S. En cambio, en ausencia de p53 se bloquea el ciclo celular en la fase G2, permitiendo una mayor acumulación de TK1 (Chen *et al.*, 2010). También se encontró que la TK1 se transloca al núcleo después de un determinado tiempo del tratamiento (Chen *et al.*, 2010), si bien en un estudio previo ya se había reportado



la localización de la TK1 en el núcleo (Brockenbrough *et al.*, 2009). La localización nuclear podría facilitar la provisión eficiente de dTTP para la reparación del DNA.

La función *in vivo* de la TK1 se ha estudiado durante el desarrollo de ratones knockout (KO) homocigotos ($tk^{-/-}$). Los ratones KO tienen un desarrollo embrionario normal, pero a partir del destete o más tarde, adquieren una postura jorobada, después arrastran sus patas traseras al caminar y eventualmente quedan inmóviles. Asimismo, su periodo de vida se reduce a menos de la mitad que en los ratones sin dicha mutación. Además presentan un bajo índice reproductivo y los niveles de timidina en sangre son del doble que en los ratones silvestres. Esto permite suponer que la ruta biosintética *de novo* no es suficiente para mantener la poza de TMP en muchas células o que la actividad degradativa de las nucleotidasas es alta y por ende, se requiere la vía de salvamento para el mantenimiento de la poza (Dobrovolsky *et al.*, 2003). Además, todos los ratones KO de la TK1 desarrollan esclerosis del glomérulo del riñón y exhiben alteraciones histológicas en la estructura linfoide del bazo e inflamación espontánea de las arterias, lo cual, junto con las anomalías de linfocitos y bazo, sugiere un sistema inmune anormal (Dobrovolsky *et al.*, 2003).

La timidina cinasa también tiene una función primordial en el balance de la concentración intracelular de dTTP y precursores de otros nucleótidos trifosfatos, ya que el dTTP actúa como un efector alostérico de la ribonucleótido reductasa, estimulando la conversión de GDP a dGDP e inhibiendo la conversión de CDP a dCDP (Segura-Peña *et al.*, 2007). El aporte excesivo de dTTP y la consecuente disminución en los niveles de dCTP, comprometen la fidelidad de la síntesis del DNA, debido a la acumulación de errores durante el prolongado retraso de la mitosis (Rampazzo *et al.*, 2010).

Por otra parte, estudios basados en marcaje isotópico de dT han proporcionado una idea del papel de TK1 y TK2 para el mantenimiento de las pozas de dTTP en el citosol y en la mitocondria y se demostró que existe un rápido intercambio entre los dos compartimentos. Se propone que en células en proliferación los dNTPs del DNAm son importados a partir de nucleótidos del citosol, mientras el salvamento



de los desoxirribonucleósidos intra-mitocondriales provee dNTPs en células diferenciadas. Sin embargo, también hay una alta dependencia de la síntesis *de novo* de dTTP. Esto sugiere que el salvamento por la TK2 es importante sólo en células diferenciadas, debido a la ausencia de la síntesis *de novo*, por lo que en el citosol no hay suficientes dNTPs para importar dentro de la mitocondria para la replicación y reparación del DNAm (Pontarin *et al.*, 2003; Rampazzo *et al.*, 2010).

2.2 Regulación de la TK1 durante el ciclo celular.

La actividad de la TK1 está estrechamente asociada con la proliferación celular, por lo que sus niveles de RNAm y proteína son regulados por múltiples mecanismos durante el ciclo celular. Los niveles de RNAm y la actividad de la proteína se incrementan cuando las células entran en fase S (Gasparri *et al.*, 2009). Es por ello que las células diferenciadas o en un estado quiescente, poseen niveles muy bajos de RNAm de la TK1 que se reflejan en los niveles de actividad de la proteína (Mikulits *et al.*, 1996). Asimismo su expresión incrementa en el arresto en la interfase G1/S del ciclo celular por daño al DNA.

La expresión de la TK1 ocurre en células que se encuentran en la fase G1 tardía e incrementa aproximadamente 20 veces en la fase S, coincidiendo con el aumento en la síntesis de DNA, en la fase G2 declina y desaparece durante la mitosis (Figura 5) (Mikulits *et al.*, 1996). De un gran número de estudios, está claro que la regulación positiva durante la fase S de la TK1 correlaciona con la proliferación celular.

La TK1 es la única desoxirribonucleósido cinasa cuya expresión está limitada a la fase S del ciclo celular. Esta diferencia en expresión se explica porque el nucleótido dTTP es sólo requerido para la replicación del DNA, mientras que el resto de nucleótidos trifosfato se requieren durante todas las fases del ciclo debido a que participan en diversas funciones biológicas. Así, en células no proliferativas no hay necesidad de nucleótidos de timidina en el citosol, pero la expresión constitutiva de la TK2 permite la replicación del DNA mitocondrial que ocurre aun en células no proliferativas (Hazra *et al.*, 2009).

La regulación de la TK1 durante la progresión de la fase S ocurre a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, todo esto contribuye a un control muy fino de la actividad enzimática.

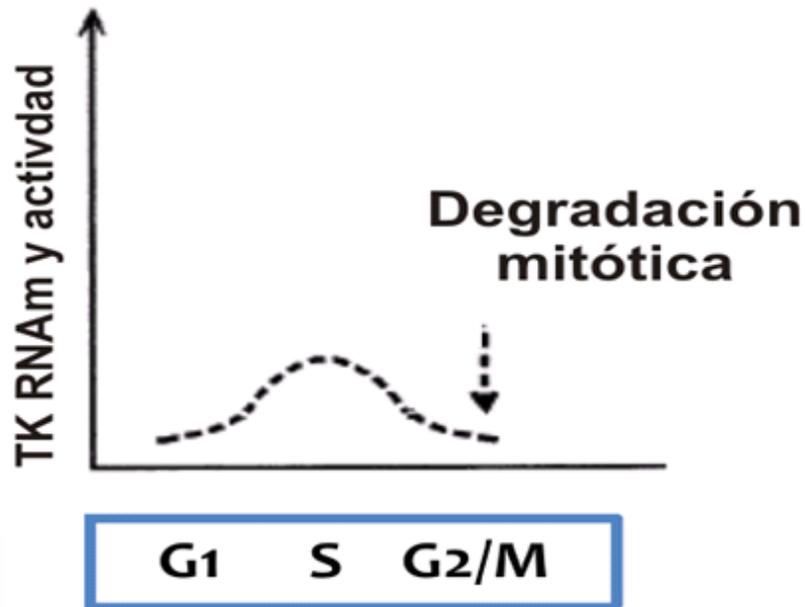


Figura 5. Representación de la regulación de la enzima TK1 durante el ciclo celular. El pico de la actividad de la enzima se presenta en la fase S, declinando en la fase G2 y desaparece durante la mitosis (M) (Adaptada de Mikulits *et al.*, 1996).

2.3 Regulación transcripcional de la timidina cinasa en mamíferos.

La expresión de la TK1 está fuertemente regulada en el ciclo celular a nivel transcripcional (Mikulits *et al.*, 1996). Muchos genes que codifican enzimas involucradas en la replicación de DNA y producción de precursores de ácidos nucleicos son regulados similarmente, por lo mismo no sorprende que los promotores de cada uno de estos genes compartan elementos de reconocimiento de diversos factores transcripcionales. Sin embargo, esto no es igual para los genes de la TK donde las diferentes especies muestran marcadas divergencias en los elementos de respuesta presentes en la región promotora, mientras que la región codificante guarda una alta identidad. Esto sugiere que hay una variación



alta en los mecanismos de regulación transcripcional de este gen (Wintersberger, 1996; Sorensen *et al.*, 1999).

La regulación transcripcional de un gen está dada por la cooperación entre los componentes de la maquinaria basal de la transcripción y los factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta específica en la región promotora. Los promotores de genes regulados durante el ciclo celular, frecuentemente tienen sitios de unión para factores de transcripción como los de la familia E2F y Sp1 (Rotheneder *et al.*, 1999).

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

Por otra parte, el promotor de la TK1 murina contiene un sitio de unión a Sp1, un motivo de unión para E2F y no presenta caja TATA. En cuanto al promotor de la TK1 de hámster contiene una caja TATA, sitios de unión a Sp1, una caja CCAAT en la cual se une el factor de transcripción NF-Y y no contiene una secuencia E2F funcional, es por ello que el par de factores de transcripción Sp1/NF-Y está activo en este promotor y sustituye al par E2F/Sp1 que está activo en el promotor murino. Así, aunque los genes de la TK de hámster y murino son regulados de



manera similar durante el crecimiento, esto ocurre por mecanismos distintos (Sorensen *et al.*, 1999).

Adicionalmente, se ha establecido que la transcripción del gen de la TK1 de humano es regulado por la formación de estructuras secundarias en la secuencia de su promotor, pues se encontró que la ruptura o desestabilización de un motivo cuádruplex G, provoca un cambio apreciable en la actividad del promotor. Este motivo es una conformación estructural formada de 4 guaninas arregladas coplanarmente que forman una estructura de tétrada que tiene un papel represor en la transcripción del gen *TK1*, por lo que su desestabilización resulta en un incremento de la transcripción del gen (Basundra *et al.*, 2010).

Por otra parte, la activación transcripcional del gen de la TK1 de humano en respuesta a daño genotóxico requiere de la señalización “río arriba” de las cinasas ATM y ATR, que reconocen el daño causado en el DNA. La transducción de señales iniciada activa a p53, culminando en el aumento de la expresión de la TK1 (Chen *et al.*, 2010).

2.4 Regulación post-traducciona de la TK1 en mamíferos.

Además de la regulación a nivel transcripcional, mecanismos post-traduccionales también son importantes para controlar los niveles de proteína y regular la actividad enzimática de la TK1.

A nivel post-traducciona, el perfil temporal de oligomerización de la TK1 contribuye a la regulación de su actividad. La TK1 humana es una enzima que puede encontrarse en dos formas, un dímero con baja actividad y un tetrámero con alta actividad. La conversión entre las dos formas es reversible y depende de la concentración de la enzima y de la presencia de ATP. La eficiencia catalítica es aproximadamente 30 veces más alta cuando se pre-incuba a la enzima con ATP, lo cual propicia la formación del tetrámero. Esto se refleja también en el valor de K_M del tetrámero (0.5 μM) que es aproximadamente 30 veces menor al del dímero (15 μM). Se ha propuesto que cuando ocurre la fosforilación de la Ser-13 de la



hTK1 se previene la formación del tetrámero inducida por ATP, reduciendo su actividad catalítica (Ke *et al* 2005; Munch-Petersen, 2008). El papel de la serina como modulador de la conformación de la TK1 se demostró mediante el análisis de mutantes, cuando este aminoácido es sustituido por alanina, la proteína adquiere preferentemente la conformación tetramérica, mientras que la sustitución por ácido aspártico, que simula al grupo fosfato, favorece la conformación dimérica (Li *et al.*, 2004).

Además de esta regulación, la TK1 está sujeta a inhibición por retroalimentación por el producto final, el dTTP; éste inhibe a la enzima al unirse a los sitios para timidina y ATP simultáneamente: la base nitrogenada ocupa el lugar de la timidina, mientras que el grupo trifosfato se une en forma invertida de como lo hace el ATP (Welin *et al.*, 2004; Sandrini & Piskur, 2005).

Los niveles de proteína de la TK1 de humano se regulan por degradación mediada por el proteosoma. La TK1 se ubiquitina en las etapas finales de la mitosis, lo que la hace blanco del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C), contribuyendo a la disminución de la TK1 hasta niveles indetectables. La secuencia que se ubiquitina de la TK1 se conoce como caja KEN (Lys-Asp-Asn), ubicada en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Ke & Chang, 2004). La eliminación de esta secuencia suprime la degradación específica en G2/M y deja la expresión de la enzima en células quiescentes, exhibiendo un incremento anormal en la concentración de dTTP y ocasionando una alta frecuencia de mutaciones y bajo crecimiento celular (Segura-Peña *et al.*, 2007). Para que el complejo APC/C medie la ubiquitinación y la degradación de la TK1 requiere del activador Cdh1, siendo este el que se une a la caja KEN. Existe evidencia que la unión de timidina a la TK1 interfiere con su interacción con Cdh1 aboliendo la degradación mediada por el complejo e incrementando la poza de dTTP (Ke *et al* 2007).



2.5. Timidina cinasa 1 en plantas.

Hasta la fecha son pocas secuencias de los genes de la TK1 que han sido reportados en plantas, entre los que se encuentran arroz (*Oryza sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), tomate (*Solanum lycopersicon*) y *Arabidopsis thaliana*, pero hay poca información detallada disponible sobre su función celular. Aunque hay reportes de mediciones de la actividad de TK1, la enzima no se ha purificado a homogeneidad (Zrenner *et al.*, 2006) y hasta el momento no se ha caracterizado la regulación de su expresión, ni la estructura de los promotores de estos genes en plantas.

Se ha reportado la actividad de timidina cinasa en plántulas de maíz, sin embargo, se ha sugerido que la timidina cinasa medida en extractos crudos pudiera ser debida en parte a la combinación de actividades de la nucleósido fosfotransferasa y fosfohidrolasa de ATP. En maíz hay sólo un gen de TK1 (AM492793) cuyos niveles máximos de transcrito ocurren a las 12 h de germinación de ejes embrionarios y hay una estrecha relación entre la actividad de la enzima y la síntesis del DNA. Esto sugiere una función relevante de la vía de salvamento de nucleótidos en esta etapa del desarrollo, ya sea para la replicación del DNA o para procesos de reparación (Suzuri, 2006).

En *Hevea brasiliensis*, árbol del hule, se aisló el cDNA de la TK1 y la expresión del gen se asoció estrechamente con el síndrome “*tapping panel dryness*” (TPD), que es una condición fisiológica de etiología desconocida en la que se detiene la producción del látex. Se encontró que en tejidos no proliferativos de árboles afectados por TPD, hay niveles 7 veces menores del transcrito de *HbTK* que en plantas que no muestran esta condición. Estos resultados sugieren que la regulación positiva de la expresión de este gen puede estar involucrada en respuesta a estrés mecánico, así como en la vía de reparación de daño a DNA, en la activación de la división celular y el metabolismo (Venkatachalam *et al.*, 2010).

Recientemente se han determinado las propiedades cinéticas y de oligomerización de la TK1 recombinante de tomate (*LeTK1*). Esta enzima muestra propiedades



particulares distintas a la TK1 de mamíferos, pues estudios con proteínas recombinantes demostraron que la pre-incubación con ATP no induce la formación del tetrámero y el dímero presenta una alta actividad y afinidad por el sustrato, determinado por las constantes cinéticas (Mutahir *et al.*, 2011; Mutahir *et al.* 2013). Asimismo, ya se había demostrado que la *LeTK1* tiene mayor actividad catalítica que la hTK1, Km de 1 μ M y 16 μ M respectivamente, parámetros obtenidos sin una pre-incubación con ATP (Khan *et al.*, 2010).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay dos genes que codifican potenciales TKs que se transcriben. La primera (TK1a) se localiza en el cromosoma 3 (AT3G07800) y la segunda (TK1b) en el cromosoma 5 (AT5G23070). Esta última tiene un potencial péptido de tránsito al cloroplasto en el extremo amino. El peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la TK1 de *Arabidopsis* son 26kDa y 6.52, para AtTK1a, y 26.4kDa y 6,88, para AtTK1b. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias a nivel de nucleótidos es del 52% y a nivel aminoácidos es del 53% considerando en el análisis la potencial secuencia de tránsito al cloroplasto (Suzuri, 2006).

Recientemente se han determinado las propiedades cinéticas de las TKs recombinantes de *A. thaliana*, la TK1a tiene mayor afinidad por el sustrato y una Kcat mayor que la proteína TK1b. Ambas muestran una alta especificidad por el sustrato, pues no fosforilan a ninguno de los otros 3 nucleósidos. Por otra parte, las mutantes simples para cada gen de la TK1 no presentan un fenotipo diferente a la línea silvestre durante su desarrollo, sin embargo, la doble mutante *atrk1a*^{-/-}/*atrk1b*^{-/-} es letal, aunque las semillas germinan y las plántulas se desarrollan hasta la aparición de los cotiledones, mueren en este estadio (Clausen *et al.*, 2012).

Los datos de expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* en el atlas de expresión AtGenExpress obtenido por microarreglos (Schmid *et al.*, 2005), muestran que los niveles de transcrito para el gen *TK1a* son ubicuos y más abundantes que de los del gen *TK1b* durante el desarrollo de la planta. Asimismo, la expresión del gen *TK1a* es inducida por tratamiento con agentes genotóxicos como bleomicina en



combinación con mitomicina C (Chen *et al.*, 2003) y radiación ionizante (Nagata *et al.*, 2005; Culligan *et al.*, 2006). Este drástico incremento en la transcripción de este gen bajo estrés genotóxico, podría reflejar una alta demanda para la síntesis de DNA durante la reparación. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se reporta la inducción del gen *TK1b* con estos tratamientos. Por análisis de microarreglos se observó que *TK1b* es inducido en respuesta a citocininas (Kiba *et al.*, 2005). Además, en un estudio donde se inactivó la subunidad γ de la ATPasa de cloroplasto, se observó que los niveles de transcrito del gen *TK1b* disminuían, junto con otras proteínas de localización cloroplástica (Dal Bosco *et al.*, 2003).

3. Daño genotóxico a DNA.

A pesar de que el genoma de las plantas está expuesto a múltiples agentes genotóxicos, tanto endógenos como del ambiente, es muy estable (Bray & West, 2005; Tuteja *et al.*, 2009). Todos los componentes estructurales del DNA: residuos de azúcares, enlaces fosfodiéster y las bases púricas y pirimidicas que contribuyen al contenido de información del genoma, pueden sufrir daños que son modificaciones covalentes en su estructura y que incluyen eliminación de bases, formación de dímeros de pirimidinas, entrecruzamientos, rompimientos de una o de dos cadenas y modificación de bases, como son la alquilación y la oxidación. Las consecuencias biológicas que surgen del daño al genoma dependen de la naturaleza química de la alteración a la estructura del DNA y pueden variar de inocuas a ser altamente mutagénicas (Bray & West, 2005). La acumulación de estos daños provoca inestabilidad genómica y se asocia con una alta tasa de mutaciones (Tuteja *et al.*, 2009).

Entre los agentes que dañan el DNA se encuentran la luz ultravioleta (UV), las radiaciones ionizantes (rayos X, radiación γ), mutágenos químicos que producen rupturas en el DNA (mitomicina C, cisplatino), agentes alquilantes que modifican las bases, compuestos aromáticos y toxinas producidas por hongos y bacterias (Tuteja *et al.*, 2009). Además, se incluye el estrés del ambiente como sequía, alta y baja temperaturas e incremento de UV-B debido al deterioro de la capa de



ozono, resultando en reducciones significativas en la calidad y productividad de cultivos, debido al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). En células vegetales, las ROS tienen actividad genotóxica, siendo la principal causa del rompimiento de cadena simple (SSBs) en el DNA, directamente a través de la destrucción de desoxirribosas o por modificación covalente de las bases (Bray & West, 2005; Balestrazzi *et al.*, 2011).

3.1 Estrés genotóxico en plantas por luz ultravioleta.

De los agentes genotóxicos mencionados, el más relevante, por su incidencia natural y al que están expuestas las plantas, es la luz UV proveniente de la radiación solar. Ésta comprende principalmente tres tipos: UV-A (320-400nm), UV-B (290-320nm) y un tercer componente que pertenece al espectro electromagnético, UV-C (180-290nm), aunque este último no penetra a la biosfera porque es fuertemente absorbido por el oxígeno y el ozono de la atmósfera (Tuteja *et al.*, 2009; Ganpudi & Schroeder, 2011).

Por su naturaleza sésil, las plantas generalmente tienen una mayor tolerancia a la radiación UV en comparación con células animales. Las plantas son capaces de reflejar o absorber los rayos UV dañinos mediante compuestos presentes en su pared celular, asimismo, la acumulación intracelular de sustancias como los flavonoides, previenen la acumulación de ROS evitando daño al DNA (Balestrazzi *et al.*, 2011). A pesar de estos mecanismos, la radiación UV-C/B puede ser absorbida directamente por el DNA induciendo lesiones que inhiben funciones celulares vitales como la transcripción y la replicación del DNA (Ganpudi & Schroeder, 2011).

El principal tipo de daño a DNA causado por la exposición a UV-B es la formación de dímeros entre pirimidinas adyacentes (Figura 6), por ejemplo; fotoproductos que consisten primariamente de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs), los cuales se forman por uniones covalentes entre los átomos de carbono 5 y 6 de pirimidinas adyacentes, aunque también se pueden formar fotoproductos 6-4 PPs entre nucleótidos adyacentes TT, TC y CC dependiendo de la longitud de onda y

secuencia adyacente. Los CPDs son mucho más frecuentes que los otros fotoproductos. La formación de CPDs y 6-4PPs producen diferentes tipos de distorsiones estructurales dentro del DNA, los primeros inducen una leve flexión en la hélice del DNA, mientras que los segundos producen una flexión más pronunciada e incluso desenrollamiento. Desde el punto de vista de la formación de fotoproductos inducidos por radiaciones UV-B y UV-C, en exposición a dosis bajas ambas presentan un patrón similar en la distribución de fotoproductos y en el daño a DNA (Tuteja *et al.*, 2009).

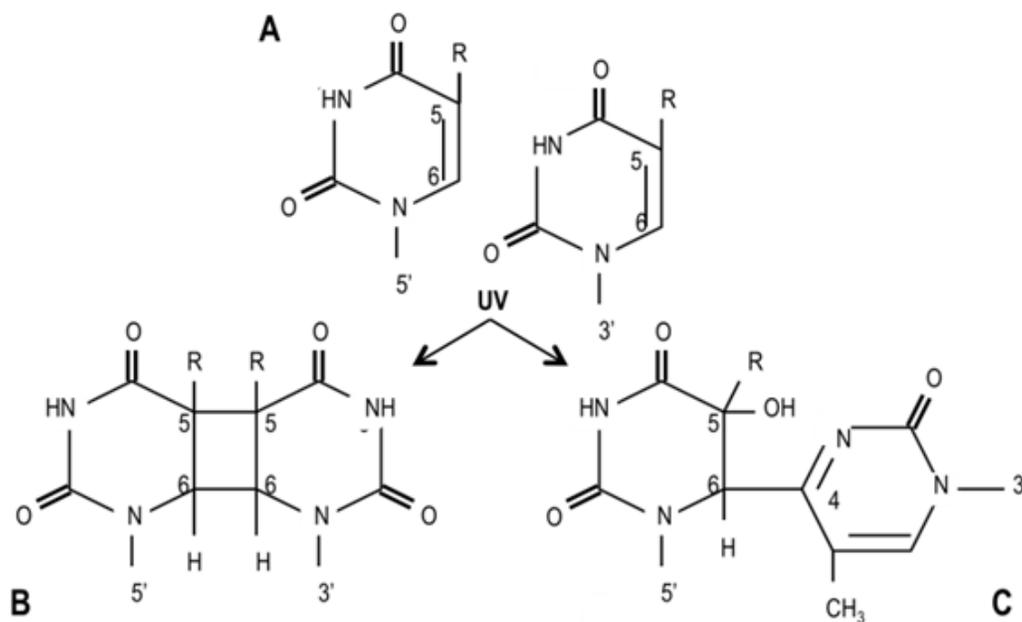


Figura 6. Dímeros de pirimidinas inducidos por radiación UV-B/C. (A) Residuos de pirimidinas adyacentes normales, (B) Dímero de pirimidina ciclobutano (CPDs) y (C) fotoproducto de pirimidina-pirimidona 6-4 (6-4PP) (Tomada de Ganpudi & Schroeder, 2011).

La producción de estos dímeros puede bloquear el avance de la horquilla de replicación y afectar la transcripción (Al Khateeb & Schroeder, 2009). Los efectos de radiación UV son especialmente perjudiciales en plantas, aunque la luz del sol tiene papeles antagónicos, por un lado es una fuente de daño y por el otro es un requerimiento para la fotosíntesis aportado por el espectro visible de la radiación (Tuteja *et al.*, 2009).



La radiación UV-B/C tiene muchos efectos directos e indirectos en plantas, incluyendo daño a DNA, proteínas y membranas (Al Khateeb & Schroeder, 2009), alteraciones en la transcripción y fotosíntesis, cambios en el crecimiento, desarrollo, morfología e inestabilidad genética (Ganpudi & Schroeder, 2011). Entre los cambios morfológicos que la radiación UV-B induce en plantas se incluyen: inhibición de la elongación del hipocótilo, engrosamiento y expansión de la hoja, deformación del cotiledón, elongación del tallo y ramificación axilar. Además de los cambios asociados con la protección a UV-B, como el incremento de ceras epicuticulares (Al Khateeb & Schroeder, 2009; Leasure *et al.*, 2009).

Recientemente, a causa del deterioro de la capa de ozono, se ha incrementado la radiación UV (especialmente UV-B) en la superficie de la tierra, esto es un problema serio, ya que la productividad de cultivos para alimento está estrechamente relacionada con la estabilidad del genoma, un requisito esencial para el óptimo crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de reparación de DNA tendrá relevancia en el futuro con el propósito de evitar efectos indeseables en la productividad de cultivos (Kimura & Sakaguchi, 2006; Balestrazzi *et al.*, 2011). Asimismo, los avances en esta área proporcionarán posibles maneras de mejorar el crecimiento de las plantas bajo diferentes condiciones de estrés, usando en conjunto la información teórica adquirida acoplada a herramientas biotecnológicas ya disponibles (Waterworth *et al.*, 2011).

El daño al DNA causado por estrés genotóxico debe ser reparado para mantener la integridad del genoma. Como las plantas están expuestas de forma obligada a luz UV, sus células deben ser muy eficientes en reparar este tipo de daños (Tuteja *et al.*, 2009). En plantas las vías de reparación del daño a DNA incluyen un mecanismo de reparación directa que es la fotoreactivación. En esta vía se utiliza luz visible (UV-A) para revertir el daño al DNA a una configuración normal a través de la acción de la enzima fotoliasa, la cual, en una reacción independiente de la luz se une a la lesión del dímero de pirimidina que tiene una distorsión en la estructura del DNA, y forma un complejo estable sustrato-enzima. El cromóforo



folato de la fotoliasa absorbe un fotón de la luz azul y transfiere su energía de excitación al cofactor FADH⁻ promoviendo la transferencia de un electrón de FADH⁻ al complejo de dímero de pirimidina unido a la enzima. El enlace covalente entre las pirimidinas adyacentes del CPD se rompe y las dos bases de las pirimidinas retornan a su estado original en el DNA (Bray & West, 2005). Si bien esta vía de reparación es muy eficiente, es dependiente de luz visible y solamente opera para la eliminación de CPDs y 6-4PPs. Otras vías de reparación, independientes de luz visible no revierten directamente el daño a DNA, pero operan mediante la eliminación de la región dañada y en su lugar reemplaza el daño con nuevos nucleótidos. Este proceso es conocido como reparación por escisión de nucleótidos (Al Khateeb & Schroeder, 2009) y requiere síntesis activa de DNA. Finalmente, lesiones residuales en condiciones de oscuridad son reparadas por la vía de síntesis por translesión (TLS), la cual comete muchos errores y sólo participa cuando el daño es persistente (Ganpudi & Schroeder, 2011).

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

La presencia de DNA dañado por UV y su percepción por proteínas reguladoras también desencadena otras respuestas celulares, como el arresto del ciclo celular e inducción de la muerte celular. En general se conocen poco las bases moleculares de estas respuestas en plantas, aunque algunos mecanismos están conservados con células de mamíferos, como la presencia de las proteínas reguladoras ATM y ATR que perciben el daño producido por radiación UV y controlan muchos aspectos de la respuesta celular (Jenkins, 2009; Furukawa *et al.*, 2010). Sin embargo, en plantas no hay un homólogo a p53 y las vías de



señalización activadas por el daño convergen sobre el factor transcripcional SOG1, afectando genes que participan en los procesos de arresto del ciclo celular e inducción de la muerte celular (Furukawa *et al.*, 2010).

3.2 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER).

A diferencia de las fotoliasas que reparan solamente un tipo de daño al DNA, el mecanismo de NER reconoce y repara DNA dañado por distintos agentes como la radiación UV, cisplatino y otros agentes genotóxicos. Las vías de NER pueden ser clasificadas como reparación global del genoma (GGR), en la cual se detecta el daño a DNA en cualquier lugar del genoma, o la reparación acoplada a la transcripción (TCR), la cual específicamente restaura las hebras de DNA que están siendo transcritas (Kimura & Sakaguchi, 2006; Balestrazzi *et al.*, 2011). Estos mecanismos se distinguen por las proteínas encargadas de percibir el DNA dañado, pero convergen en el mecanismo de reparación que consiste en 4 pasos: 1) el desenrollamiento de la doble hebra de DNA en los alrededores del daño (apertura del complejo de pre-escisión), 2) escisión dual de la lesión, 3) síntesis del DNA y 4) la ligación de la nueva hebra de DNA sintetizada (Figura 7)(Molinier *et al.*, 2008; Ganpudi & Schroeder, 2011).

En la GGR, el daño al DNA es reconocido por XPC/Rad23 (Xeroderma pigmentosum, grupo de complementación C/Rad 23) o UV-DDB (proteína de unión a DNA dañado por UV). La función de DDB es alterar la estructura de la cromatina y reclutar factores de NER a los sitios de daño a DNA. En contraste, durante TCR el contacto de la RNA polimerasa II durante la transcripción con los nucleótidos dañados desencadena el reconocimiento del daño a DNA por la proteína CSA (Síndrome de Cockayne, tipo A) o la proteína CSB (Síndrome de Cockayne, tipo B). La región del DNA que ha sido reconocida con el daño es desenrollada por TFIIH (factor de transcripción basal IIH), las proteínas XPB, XPD, XPA (Xeroderma pigmentosum, respectivo grupo de complementación B, D y A) y RPA (proteína de replicación A), de esta manera hacen más espacio para reclutar a las otras proteínas que participan en la reparación. Posteriormente, las endonucleasas



específicas XPF/ERCC1 y XPG cortan la cadena dañada en los extremos 3' y 5', respectivamente, con lo que se escinden un oligonucleótido 20 a 30 unidades de longitud que contiene la parte dañada del DNA. El hueco formado por la escisión es rellenado mediante un complejo que contiene a PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), RFC (factor de replicación C) y las DNA polimerasas δ/ϵ , en donde la cadena intacta sirve como molde para la síntesis de la nueva hebra. NER es completado por la ligación de la nueva cadena de DNA sintetizada con la participación de la DNA ligasa I (Figura 7) (Bray & West, 2005; Kimura & Sakaguchi, 2006; Molinier *et al.*, 2008; Tuteja *et al.*, 2009; Balestrazzi *et al.*, 2011).

El análisis de la secuencia del genoma de *Arabidopsis* reveló que la mayoría de los genes involucrados en NER están presentes en esta planta, indicando que esta vía de reparación está conservada filogenéticamente (Tuteja *et al.*, 2009).

A. thaliana contiene dos homólogos de DDB, *DDB1* y *DDB2*, y la sobreexpresión de cualquiera de estos genes incrementa la resistencia a radiación UV. En contraste, mutaciones por inserción en estos genes provocan hipersensibilidad (Al Khateeb & Schroeder., 2009; Molinier *et al.*, 2008). Mutantes de *Arabidopsis* en otros genes relacionados con NER también son sensibles a UV, entre estos se encuentran *XPF* (*AtRad1*), *XPG* (*AtRad2*) y *XPD* (*AtRad3*) (Hays, 2002). Asimismo, mutantes *ERCC1* (*AtRad10*) de *Arabidopsis* son sensibles a irradiación γ , una mutante en *XPB* presenta hipersensibilidad a peróxido de hidrógeno y MMS (metilmetanosulfonato), así como mutantes en *XPG* son sensibles a peróxido de hidrógeno y radiación ionizante (Hays, 2002). Además, XPF y ERCC1 tienen papeles claves en la recombinación homóloga. Por todo lo mencionado, se concluyó que NER puede estar involucrado en la reparación de diferentes tipos de daño a DNA en plantas (Kimura & Sakaguchi, 2006). Algunos genes relacionados con NER, como son *DDB*, *PCNA*, DNA polimerasa δ , *RPA* y *CSB*, han sido aislados de arroz (Kimura & Sakaguchi, 2006; Tuteja *et al.*, 2009; Ganpudi & Schroeder, 2011). Aunque homólogos a PCNA y RFC han sido identificados en

plantas y estudiados extensivamente, su papel específico en NER no ha sido elucidado (Balestrazzi *et al.*, 2011).

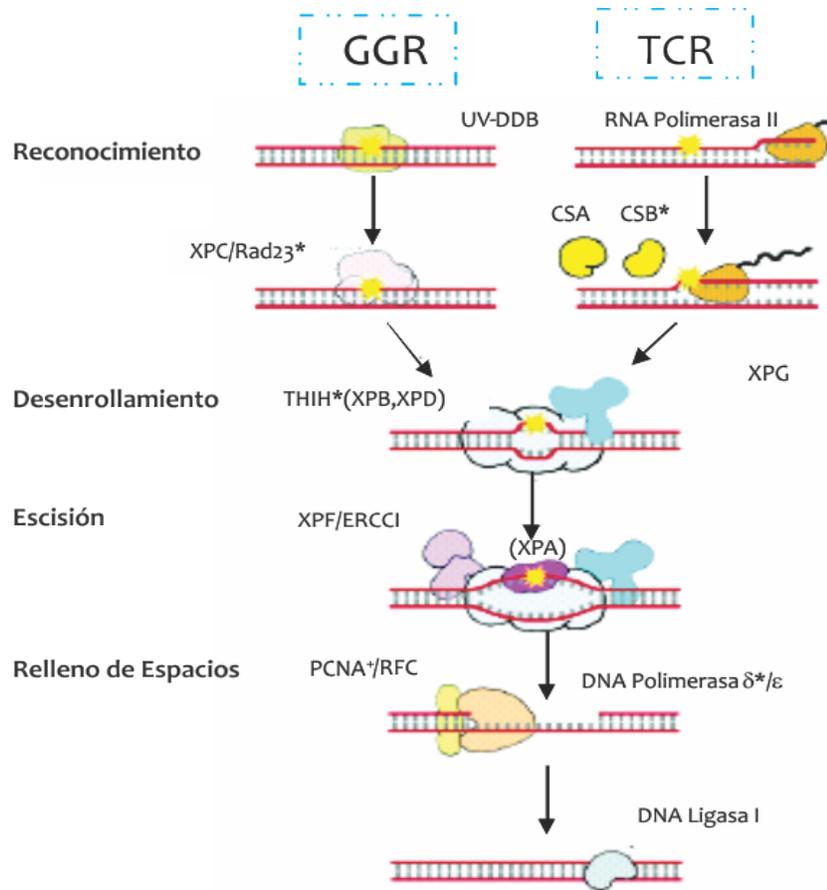


Figura 7. Reparación por escisión de nucleótidos. Las vías de NER pueden clasificarse dentro de 2 grupos, reparación global del genoma (GGR) y reparación acoplada a la transcripción (TCR). En la figura se muestra la serie de reacciones en las que consisten estos mecanismos. Las proteínas marcadas con asteriscos están presentes en múltiples copias. Sólo la proteína XPA mostrada no se ha encontrado en plantas (Adaptada de Kimura & Sakaguchi, 2006).

3.3 Reparación de la ruptura de la doble hélice.

Otra posibilidad de daño directo al DNA es el rompimiento de los enlaces fosfodiéster en la doble hélice (“Double-strand break” DSB), que puede ocurrir espontáneamente como resultado del corte de una región de cadena sencilla, debido al estrés mecánico de un cromosoma o como parte de la iniciación del



entrecruzamiento en la meiosis. Además, factores externos como son la radiación ionizante y los compuestos químicos que se intercalan en el DNA, pueden inducir este tipo de lesiones, así como especies reactivas de oxígeno generadas en la célula como respuesta a otros tipos de estrés (Britt, 1999). Asimismo, se tiene evidencia que la exposición a la radiación UV puede ocasionar estrés oxidativo que culminará en la producción de DSBs y SSBs principalmente (Bray & West, 2005). Hay dos vías para reparar los rompimientos de este tipo, la unión de extremos no homólogos (NHEJ; non-homologous end joining) y la recombinación entre homólogos (Bray & West, 2005).

La recombinación homóloga es un proceso en el que ocurre el cruce de regiones homólogas del DNA. Debido a que hay cortes y desplazamientos en las cadenas de DNA éste puede sufrir daños, de tal manera que una copia intacta de la región dañada, que puede estar localizada en una cromátida hermana o en un cromosoma homólogo, es usado como un templado para reparar el daño. En el mecanismo de síntesis dependiente del alineamiento de la cadena, el DNA de cadena simple en las regiones con lesiones DSBs es formado por la acción del complejo Mre11/Rad50/Xrs2, el cual reconoce uno de los extremos del sitio del rompimiento, luego los extremos del DNA son recortados, permitiendo la unión de RPA, RAD51 y RAD52 al extremo de DNA de cadena simple. El complejo RPA-RAD51-RAD52 rastrea una región homóloga en un DNA intacto (cromosoma homólogo) e inicia el emparejamiento, que se facilita mediante la acción de RAD54. La síntesis de DNA ocurre desde el extremo de la cadena invasora, extendiendo la región reparada y formando una unión de Holliday durante la recombinación. Esta unión es cortada por nucleasas, obteniéndose dos secciones de DNA intactas (Figura 8) (Kimura & Sakaguchi, 2006; Bray & West, 2005).

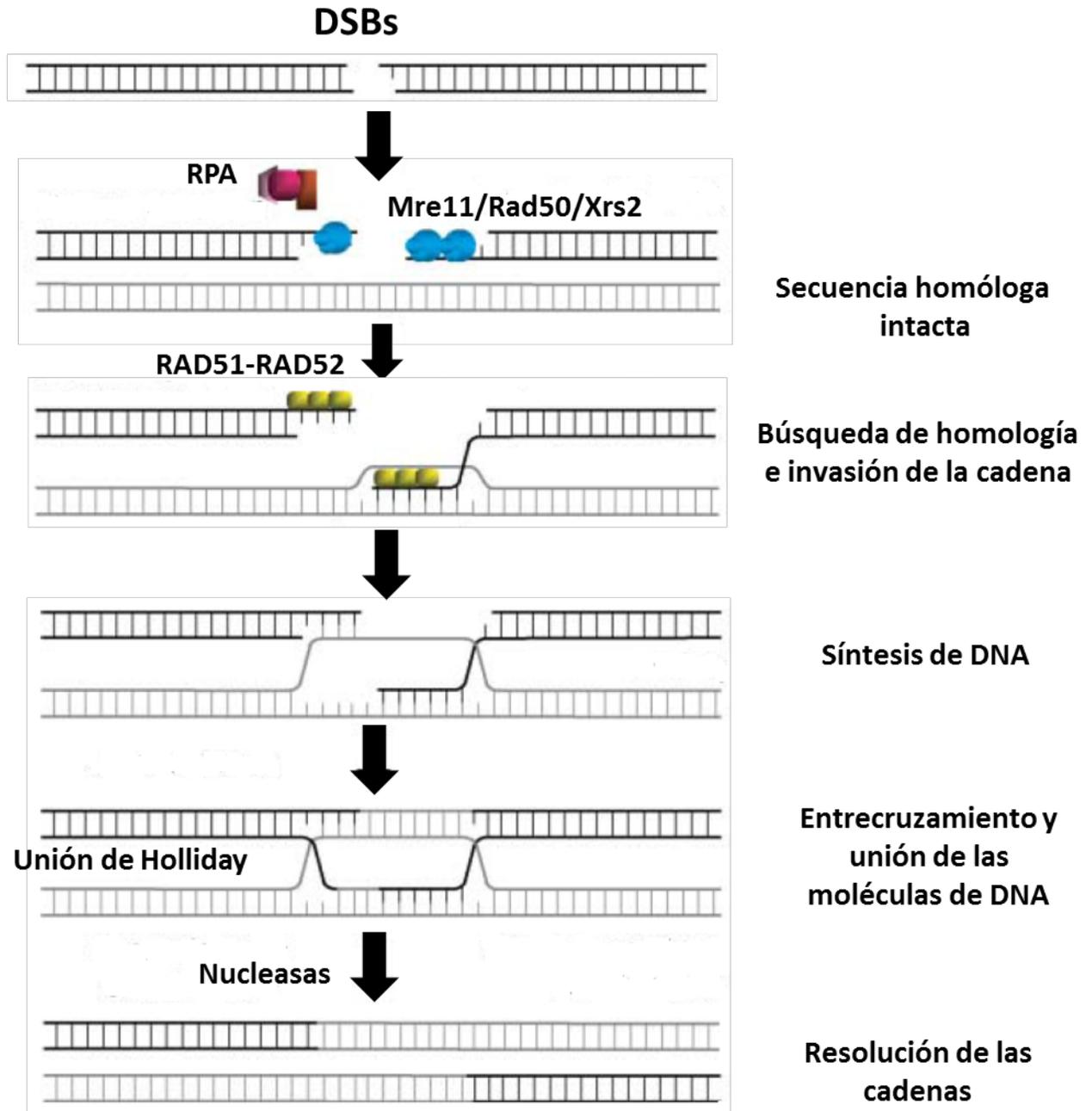


Figura 8. Reparación de DSBs por recombinación homóloga. La recombinación homóloga es iniciada por el reconocimiento de la ruptura de la doble cadena, luego los extremos del DNA son procesados, lo que permite que Rad51 promueva la búsqueda de homología y la invasión de la cadena, resultando en la formación de la unión de Holliday y el entrecruzamiento, con lo que se obtienen dos secciones de DNA intactas (Adaptada de Bray & West, 2005).



La reparación por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), también conocida como recombinación ilegítima, incluye la religación directa de los extremos rotos del DNA, con un mínimo de procesamiento de las secuencias de los extremos, lo que sugiere que este mecanismo se activa cuando hay pérdida de nucleótidos en los extremos. El mecanismo inicia con el reconocimiento del rompimiento por el dímero Ku70-Ku80 y cinasas de proteínas dependientes de DNA (DNA-PKs), que interaccionan entre sí para mantener los extremos muy cercanos uno del otro. La unión de una tercera proteína, Artemisa, y la consiguiente fosforilación de todos los componentes, induce el procesamiento final de los extremos por un complejo formado por XLF, XRCC4 y la ligasa IV, que une los dos extremos para completar la reparación. Esta vía recombina DNA en gran medida independiente de la secuencia (Bray & West, 2005; Kimura & Sakaguchi, 2006; Charbonnel *et al.*, 2010).

En las plantas, al igual que en humanos, la vía de reparación por NHEJ es predominante sobre la recombinación homóloga (Kimura & Sakaguchi, 2006). En *Arabidopsis* se han analizado mutantes en *Rad51*, *Rad50* y *Mre11*; mientras que mutantes en los dos primeros genes no presentaron anomalías en su desarrollo vegetativo, las mutantes *Mre11* exhiben defectos en el crecimiento y son infértiles. Estos resultados sugieren que el mecanismo de recombinación homóloga no es esencial para el estadio vegetativo de la planta (Kimura & Sakaguchi, 2006).

Las proteínas centrales en el mecanismo de NHEJ, Ku80, Ku70, Xrcc4 y DNA ligasa 4, han sido descritas en plantas y mutantes de *Arabidopsis* de estos genes, son hipersensibles a agentes que inducen DSBs y reducen su eficiencia en la reparación por NHEJ (Britt, 1999). Además, se ha reportado que el genoma de *Arabidopsis* codifica para tres proteínas parecidas a Artemisa (Charbonnel *et al.*, 2010).

A diferencia de otros organismos, las plantas tienen vías alternativas de NHEJ para reparar una amplia variedad de lesiones, la conclusión hasta ahora es que



existe una jerarquía en las vías de reparación de DSBs que son activadas, siendo la NHEJ dependiente de Ku la vía preferentemente utilizada por las células vegetales. Sin embargo, en una cuádruple mutante (*Ku 80, xrcc1, xrcc2, xfp*), una vía de reparación de DSBs sin caracterizar fue activada aún en la ausencia de estos cuatro factores que son requeridos para la reparación clásica por NHEJ (Waterworth *et al.*, 2011).

A excepción de la fotoreactivación, los mecanismos de reparación del daño a DNA descritos son dependientes de la síntesis de DNA, por lo tanto, la regulación de las enzimas que participan en el metabolismo de síntesis de nucleótidos trifosfatos, debe ser afectada en respuesta a estrés genotóxico.



HIPÓTESIS

Dado que la timidina cinasa (TK) participa en la vía de síntesis de salvamento del dTMP, tendrá una función esencial en el aporte de dTTP en las diferentes etapas del desarrollo de la planta *Arabidopsis thaliana* así como en los eventos de reparación del DNA inducido por daño genotóxico.



OBJETIVO GENERAL

Estudiar los patrones de expresión durante el desarrollo y la función de los genes de las timidina cinasas (*TK1a* y *TK1b*) de *Arabidopsis thaliana* en la reparación del daño al DNA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el patrón de expresión de *TK1a* y *TK1b* durante el desarrollo y en respuesta a estrés genotóxico, mediante construcciones quiméricas de su promotor con un gen reportero.
- Analizar la participación de la timidina cinasa en respuesta a agentes genotóxicos, a través de la evaluación de la susceptibilidad de mutantes de inserción sobre estos genes.
- Determinar el efecto de la radiación UV-C sobre los niveles de expresión de *TK1a* y *TK1b* por RT-qPCR en líneas mutantes y tipo silvestre de *A. thaliana*.
- Determinar el efecto de la radiación UV-C sobre la actividad enzimática de TK en líneas mutantes y tipo silvestre de *A. thaliana*.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre (ecotipo Columbia) y las líneas de inserción de T-DNA SALK037113, que tiene integrado el T-DNA en la región promotora del gen *TK1a*, y SALK07256, que tiene integrado el T-DNA en el exón 1 del gen *TK1b*. Dichas líneas mutantes, que se nombraron *oetk1a* y *mtk1b*, respectivamente, se obtuvieron del *Arabidopsis* Biological Resource Center, Universidad de Ohio, E.U.A.

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

Las semillas se sumergieron en una solución de etanol al 50% durante 1 min con agitación constante. Posteriormente se centrifugó en la nanofuga durante 5 seg, y el etanol se decantó y se sustituyó por 1.5 mL de una solución acuosa de hipoclorito de sodio (2.5%) y Tween-20 (0.05%). Las semillas se incubaron por 10 min con agitación constante, después de transcurrido el tiempo el tubo se centrifugó y se decantó la solución. Finalmente se lavaron las semillas con 1 mL de solución Tween-20 (0.05%), se agitaron e inmediatamente se centrifugaron para decantar la solución. Este último paso se repitió tres veces más.

Las semillas se sembraron en cajas Petri con medio Gamborg's B5 (Sigma) suplementado con sacarosa (2%) y se incubaron 48h a 4°C, en condiciones de oscuridad. Para la germinación de semillas y desarrollo de plántulas las cajas se transfirieron a una incubadora con condiciones controlados de temperatura (22°C) y fotoperiodo (8h luz/16h oscuridad).

1.2. Resiembra de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Después de 8 días de crecimiento en caja Petri, las plántulas de *Arabidopsis* tipo silvestre y mutantes se trasplantaron a macetas con una mezcla de sustrato



Sunmix 4[®], vermiculita y agrolita (en proporciones 3:1:1 respectivamente), manteniéndose en las mismas condiciones descritas, hasta su uso experimental o floración y producción de semilla.

2. Clonación de promotores de TKs con la Tecnología Gateway[®].

2.1 Fundamento.

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

La recombinación ocurre entre los sitios específicos de acoplamiento (*att*): *attB* en el cromosoma de *E. coli* y *attP* en lambda. Los sitios *att* sirven como el sitio de unión para las proteínas de recombinación. En la integración ocurre la recombinación entre los sitios *attB* y *attP*, para generar los sitios *attL* y *attR*. El cruce real que ocurre entre las regiones homólogas centrales es de 15 pares de bases en los dos sitios, pero las secuencias circundantes se requieren ya que contienen los sitios de unión para las proteínas de recombinación (Figura 9) (Gateway, 2004).

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

La Tecnología Gateway[®] requiere del diseño de secuencias de DNA flanqueadas por los sitios de recombinación *att*, estos son mezclados *in vitro* con un vector que también contiene sitios de recombinación e incubados con proteínas de

recombinación del bacteriófago λ que acoplan la transferencia de la secuencia de interés dentro del nuevo vector (Hartley *et al.*, 2000). Esta tecnología proporciona una manera rápida y altamente eficiente para trasladar secuencias de DNA dentro de múltiples vectores, lo cual permite la expresión y el análisis funcional de proteínas (Earley *et al.*, 2006). Las dos reacciones de recombinación Gateway que se emplearon en este trabajo se muestran en la Figura 9.

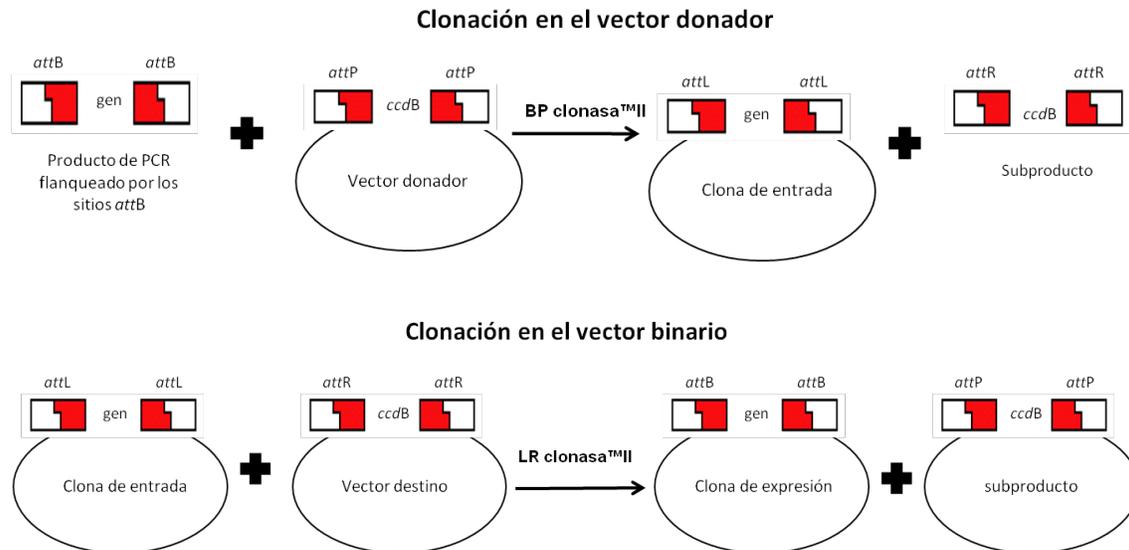


Figura 9. Reacciones de recombinación del sistema Gateway. Se muestran las 2 reacciones de recombinación requeridas en este sistema para obtener la secuencia de interés clonada en el vector binario para expresión en plantas.

2.2 Obtención de productos de PCR flanqueados por sitios *attB*.

Para crear las secuencias de DNA de interés flanqueadas por los sitios de recombinación *attB*, se requirió realizar 2 reacciones de amplificación. En la primera reacción (PCR1), se utilizó como molde las secuencias amplificadas a partir de DNA genómico de *A. thaliana*, previamente clonadas en el vector pGEM-T-Easy (Promega) usando los cebadores que se presentan en la Tabla 1. La segunda amplificación (PCR2), se realizó empleando cebadores adaptadores que contienen la secuencia restante del sitio de recombinación y la secuencia del sitio



de recombinación ya incluida en los oligonucleótidos anteriores (Tabla 2). Las condiciones de temperatura y ciclos para cada reacción de amplificación, que fueron las mismas para ambas potenciales regiones promotoras, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el PCR 1*.

Promotor	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud (pb)
TK1a	Forward (ATK1aF)	5' CAA AAA AGC AGG CT GG ATG GTG CCA CTA AAA GTT 3'	36
	Reverse (ATK1aR)	5' AGA AAG CTG GGTC CAT GGC AGA GAC TTG AGA AGA 3'	33
TK1b	Forward (ATK1bF)	5' CAA AAA AGC AGG CT GAA GGA GAG GAG AT TTT TCA 3'	37
	Reverse (ATK1bR)	5' AGA AAG CTG GGTC TGT TCT CAT CGA AAC ACC AAA CAT 3'	35

*Para la obtención de las secuencias flanqueadas por *attB*. Se muestran la secuencia de los sitios de recombinación (negritas) y parte de la secuencia del promotor (letras claras).

Tabla 2. Oligonucleótidos adaptadores empleados en el PCR 2*

Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido (adaptadores)	T _m (°C)	Longitud (pb)
<i>attB</i> 1 Forward	5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T 3'	61.4	29
<i>attB</i> 2 Reverse	5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG G 3'	62.8	28

* Para la obtención de las secuencias de interés flanqueadas con las secuencias completas de recombinación. En negritas se señalan las secuencias presentes en el primer amplión.



Tabla 3. Programa de amplificación de las potenciales secuencias promotoras.

	Pre-desnaturalización	Ciclos de Amplificación	Extensión final
PCR 1 y PCR2	98°C por 30s	Desnaturalización, 98°C por 10s Alineamiento, 50°C por 30s Extensión, 72°C por 60s (35 ciclos)	72°C por 1 min

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen final de 20µL con los componentes que se muestran en la Tabla 4. Dichas reacciones se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems modelo Gene Amp9700. Los productos de las reacción de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1.5% y se purificaron con Gel extraction kit (50) QIAquick (Qiagen).

Tabla 4. Mezclas de reacción para los 2 PCRs.

Reactivo	PCR 1 (µL)	PCR2 (µL)
*Buffer 5X Phusion HF + Mg ²⁺ (1.5mM)	4.0	4.0
dNTPs 10mM	0.4	0.4
Oligonucleótido Forward 10µM (concentración en la reacción)	1.0 (0.5µM)	1.0 (0.5 µM)
Oligonucleótido Reverse 10µM (concentración en la reacción)	1.0 (0.5µM)	1.0 (0.5 µM)
*Polimerasa HF Phusion (2 U/µL)	0.2	0.2
DNA plasmídico o producto de PCR [30ng/µL]	1.0 (plasmídico 1:10)	1.0 (producto PCR)
H ₂ O estéril (cbp. 20µL)	12.4	12.4

*New England Biolabs.



2.3 Clonación de promotores de los genes TK1 en el vector donador.

Para obtener las clonas necesarias para recombinarse con el vector binario de expresión en plantas, las secuencias promTK1a y promTK1b flanqueadas por los sitios de recombinación *attB* se clonaron en el plásmido pDONR™221 que contiene los sitios *attP*. Para la reacción de recombinación se mezclaron los siguientes componentes: 150 ng de DNA del vector donador, 50 fmol del producto de PCR y buffer TE (pH 8.0) cbp 8.0 µL. Después de descongelar la mezcla de enzimas BP Clonasa™ II en hielo por 2 min, se añadió 2 µL y se incubaron las reacciones a 25°C durante 1 hora. Para calcular el volumen necesario de los productos de PCR se utilizó la siguiente fórmula:

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

Donde N, es el tamaño del producto de PCR.

Para desactivar la enzima y detener la reacción de recombinación se adicionó 1µL de la solución de proteinasa K incubando la reacción por 10 min a 37°C. Con esta reacción se prosiguió a realizar la transformación por choque térmico de células de *E. coli* DH5α. Para la selección de las colonias recombinantes, las células se plaquearon en medio LB-Agar/Kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias que crecieron de cada construcción, se sembraron en los medios LB/Kanamicina (50µg/mL) y LB/cloramfenicol (50µg/mL) y se incubaron toda la noche. Ya que los plásmidos que recombinaron perdieron la resistencia a cloramfenicol, se seleccionaron las colonias que crecieron sólo en el medio LB/Kanamicina. Para corroborar que estas colonias contenían el vector recombinante se purificó el plásmido empleando Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) y se digirió con la enzima de restricción *AvaI* (37°C por 2 h). Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y los plásmidos con un tamaño



aproximado de 3.7 Kb se secuenciaron para verificar el sitio y dirección de clonación.

2.4 Transformación de *E.coli* por choque térmico.

Se agregaron los 10 μL de las reacciones de recombinación a 100 μL de células competentes (ANEXO I), se mezclaron y se incubaron en hielo durante 20 min. Subsecuentemente se incubaron a 42°C por 50-60 seg y nuevamente en hielo por 2 min. Se añadieron 900 μL de medio LB y se incubaron en una incubadora Lab-Line Orbit Environ-Shaker a 37°C durante 2 horas con una agitación de 150 rpm. Los cultivos se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm y el botón de células se resuspendió en 100 μL de medio LB. Finalmente, 50 μL de la suspensión de células se dispersaron en medio LB, con los respectivos marcadores de selección de colonias transformantes. Para verificar las transformaciones se extrajeron los plásmidos, se digirieron y se separaron en geles de agarosa al 1.5%. Las colonias positivas se conservaron a partir de cultivos líquidos en medio LB selectivo con 14-16 horas de crecimiento a 37°C, con agitación a 200 rpm, de donde se tomaron 350 μL a los que se les agregaron 150 μL de una mezcla de glicerol-LB (1:1) estéril (concentración final del glicerol 15%).

2.5 Recombinación en vectores binarios.

Para el análisis de los patrones de expresión de los promotores de los genes *TK1a* y *TK1b* de *A. thaliana*, las secuencias se clonaron para dirigir la expresión de un gen reportero en los vectores binarios de expresión en plantas, pMDC163, pGWB3 y pGWB4. Los dos primeros contienen al gen de la β -glucuronidasa (*GUS*), mientras que el tercero codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). Para la reacción de recombinación, se mezclaron los siguientes componentes: 100 ng de la clona de entrada, 150 ng del vector binario y buffer TE (pH 8.0) $8.0 \mu\text{L}$, finalmente se añadieron 2 μL de enzima BP Clonasa™ II y las reacciones se incubaron a 25°C durante 16 horas, para las reacciones con pGWB3 y 4, y durante 2 horas para las reacciones con pMDC163.



Para la inactivación de la enzima de recombinación y la recuperación de clonas recombinantes se procedió de la manera ya descrita. La selección de colonias recombinantes se realizó en medio LB/Kanamicina (50 µg/mL). Cinco colonias de cada construcción se seleccionaron para confirmar la presencia del vector binario recombinante, mediante la purificación del plásmido empleando Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) y se digiriendo con *EcoRI* (37°C por 2 horas). Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (1.5%). Con esta restricción, el vector sin recombinar debe presentar 2 bandas, mientras el recombinante solo una. Además se realizó PCR y se secuenciaron los plásmidos para confirmar las secuencias en las clonas de expresión y que se conservará la continuidad del marco de lectura de los promotores con los genes reporteros.

3. Obtención de plantas transgénicas.

3.1 Trasformación por choque térmico de *Agrobacterium tumefaciens*.

La introducción de plásmidos a *A. tumefaciens* se realizó por transformación por choque térmico de células competentes (Anexo I) de la cepa (PGV2260/C58) con 1 µg de DNA plasmídico. A los 100 µL de células competentes mezcladas con el DNA, se colocaron en nitrógeno líquido durante 5 min y subsecuentemente se incubaron a 37°C por 25 min. Se agregó 1 mL de medio LB y se incubaron las células a 28°C por 3h con agitación a 225 rpm. Los cultivos se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm en una centrífuga Jouan MR1812, se decantó el medio y el botón de células se resuspendió en 100 µL de medio LB, se usaron 50 µL para dispersarse en medio LB selectivo (50µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de rifampicina). Las placas se incubaron a 28°C por 3 días y las colonias transformantes se analizaron mediante PCR sobre los plásmidos purificados. Para almacenar las células transformadas se sembraron las bacterias en LB y se incubaron a 28°C, con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Se tomaron 350 µL del cultivo y se le agregaron 150 µL de una mezcla de glicerol-H₂O (1:1) estéril (la concentración final del glicerol fue de 15%).



3.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por *A. tumefaciens* se realizó mediante la técnica de inmersión floral (Clough & Bent., 1988). Para realizar la metodología el primer paso fue la inoculación de las clonas de *Agrobacterium* transformadas con las construcciones en 20 mL de medio LB suplementado con kanamicina y rifampicina, cada antibiótico a una concentración de 50 µg/mL, los matraces se incubaron a 28°C con agitación (250 rpm) hasta alcanzar una A_{600} de aproximadamente 0.8 (alrededor de 36 h de incubación). Una vez alcanzada la absorbancia requerida se tomaron 7.5 mL del inóculo y se adicionaron a un matraz de 2 L que contenía 750 mL de caldo Luria suplementado con kanamicina (50µg/mL) y rifampicina a la misma concentración, se incubaron a 28°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una A_{600} de 0.7. Una vez finalizada la incubación, los medios se centrifugaron a 6000 g por 15 min a 4°C y los botones celulares se resuspendieron en 0.5 L de un solución de sacarosa al 5%, la A_{600} de la suspensión fue de 0.8. A la suspensión se le agregaron 500 µL de Silwet (concentración final de 0.05%). Por su parte, a las plantas se les retiraron todas las flores y las yemas florales por abrirse, dejando sólo las yemas florales cerradas. Una vez que las plantas estaban listas, se sumergieron los tallos en la suspensión referida por 1 min. Las plantas tratadas se acomodaron en una charola de manera horizontal y se cubrieron para conservar la humedad, se incubaron de esta forma a temperatura ambiente durante 3 días, para finalmente mantenerse en una cámara de incubación con luz continua hasta la producción de semillas.

3.3 Selección de plantas transgénicas.

Las semillas que se obtuvieron de las plantas sometidas a transformación (T1), se sembraron en medio Gamborg's B-5 (2% de sacarosa) suplementado con 15 µg/mL de higromicina para la selección de semillas transformadas. De las plántulas derivadas de semillas resistentes se obtuvo la siguiente generación de plantas (T2) que exhibieron una segregación 3:1 para la resistencia a higromicina.



Para la recuperación de líneas transgénicas homocigotas (T3), se colectaron semillas de 10 plantas resistentes de la generación T2 y se llevaron a la siguiente generación y se seleccionaron líneas que exhibieron 100% de resistencia a higromicina. Estas últimas líneas fueron utilizadas para el análisis de la expresión de los transgenes. Para los estudios de expresión se emplearon 3 líneas homocigotas independientes de las generaciones T3 y T4.

4. Determinación de la expresión de las proteínas reporteras.

4.1 Ensayo de GUS.

La actividad de GUS fue analizada por tinción histoquímica. Tejidos frescos y tratados fueron sumergidos en el buffer de actividad de GUS [Na_2HPO_4 100mM, pH 7.0, Tween 20 al 0.1% y 0.5mg/mL del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-GlcUA (X-Gluc) predisoluto en 0.5% de *N*-dimetilformamida] y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El buffer fue removido y la clorofila de las muestras se removió mediante incubaciones subsecuentes en etanol absoluto (Jefferson *et al.*, 1987). Para su observación al microscopio las muestras se mantuvieron al menos 30 min en un amortiguador de PBS (Anexo III) al 0.5X y glicerol al 50%.

Las muestras se observaron en un microscopio óptico Zeiss primo star y en un microscopio estereoscópico Zeigen. Las imágenes se capturaron con una cámara digital.

4.2 Microscopía confocal.

Para analizar los patrones de expresión en la zona del meristemo de la raíz de los genes *TK1a* y *TK1b* de *Arabidopsis* después del tratamiento genotóxico se utilizaron las plantas transgénicas portadoras de la construcciones en las que los promotores de los genes *TK1* a y b dirigen la expresión de GFP. Para la microscopía confocal las plántulas se colocaron en un portaobjetos donde las puntas de las raíces se sumergieron en 20 μL de yoduro de propidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en



agua). Este fluorocromo incrementa la visibilidad de los contornos de las células del ápice de la raíz, ya que al ser excitado con luz UV emite una fluorescencia intensa de color rojo, que permitió observar cambios de expresión en células específicas que componen el meristemo. Las observaciones se hicieron en la unidad de microscopía de la Facultad de Química de la UNAM utilizando un microscopio Olympus BX51 equipado con filtros para UV e isotiocianato de fluoresceína. La fluorescencia de la GFP fue analizada a las longitudes de onda de excitación/emisión de 488nm/505-545nm. Se capturaron imágenes en los objetivos 10X sobreponiendo las señales de fluorescencia del yoduro de propidio y de GFP.

5. Evaluación fenotípica de mutantes de la TK1 en respuesta a agentes genotóxicos.

Las líneas mutantes (SALK037113) del gen *TK1a* y (SALK07256) del gen *TK1b* se nombraron *oetk1a* y *mtk1b* respectivamente, así se manejarán en el presente trabajo. Además se empleó como control la línea tipo silvestre (wt) del ecotipo Columbia.

5.1 Ensayo de sensibilidad a UV-C en el crecimiento de la raíz.

En plantas las raíces son el material a elegir para medir el efecto de tolerancia a UV, porque carecen de compuestos fotoprotectores presente en las partes aéreas (Molinier *et al.*, 2008). Para estos ensayos se sembraron 10 semillas por caja Petri en medio Gamborg's B5 de cada línea de *A. thaliana*, las cajas se colocaron en posición vertical y se incubaron a 22°C con un fotoperiodo de 8h luz/16 horas de oscuridad.

Para establecer el tiempo de irradiación con luz UV-C (254nm) necesario para inhibir el crecimiento de la raíz, se irradiaron plántulas de 4 días que crecieron verticalmente, con un fotoperiodo de 8h luz/16 horas de oscuridad. Para la irradiación se empleó una lámpara marca UVP modelo UVGL-25, utilizando la longitud de onda corta. Antes de la irradiación se marcó el crecimiento máximo de



cada raíz y después del estímulo las cajas fueron colocadas en posición vertical y se incubaron en condiciones de oscuridad para evitar la fotoreactivación durante 3 días para finalmente registrar el crecimiento de la raíz a partir de la marca previa.

5.2 Ensayo de sensibilidad a MMC y zeocina.

Para estos ensayos se sembraron 16 semillas de cada línea de *Arabidopsis* en placas cuadradas (9 x 9 cms) con medio Gamborg's B5 (Anexo III) suplementado con MMC (entrecruzador del DNA) o zeocina (intercalador del DNA, productor de DSBs) como agente genotóxico. Las semillas se incubaron en condiciones de oscuridad por 5 días a 4°C, posteriormente se transfirieron a una incubadora a una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de 8h luz/16h oscuridad. Las cajas se mantuvieron en posición vertical y se evaluó el desarrollo de las plántulas a los 17 días post-incubación. Para determinar la dosis que causara diferencias fenotípicas, se probaron concentraciones de 10, 15, 20, 25 y 50 μM de cada uno los compuestos. Las concentraciones seleccionadas fueron 25 μM para la MMC y 10 μM para la zeocina. Se analizó el porcentaje de sobrevivencia para cada compuesto y el peso fresco fue determinado con el tratamiento con zeocina.

6. Determinación de los niveles de expresión de los genes *AtTK1a* y *AtTK1b*.

6.1 Extracción de RNA.

Se obtuvo RNA total de plántulas completas, tipo silvestre y mutantes de 7 días de desarrollo, crecidas en condiciones control o expuestas a luz UV-C.

El tejido (0.2-0.5 g) se pulverizó en un mortero estéril con N_2 líquido hasta obtener un polvo fino al que se le agregó Trizol (Invitrogen) en una relación P (mg):V (μL) de 3:1. La muestra se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se transfirió la muestra a un tubo Eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo de 2 mL, se le agregaron 200 μL de una mezcla de fenol-



cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), después de una agitación por inversión durante 15 seg, la muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo de 2 mL a la que se le añadieron 400 µL de CHCl₃ y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4°C. Este último paso se repitió una vez más y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le agregó 1 volumen de isopropanol, se agitó en vórtex, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% compactándose por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y dejando destapado el tubo, el botón se secó a temperatura ambiente durante 15 min, enseguida el botón se resuspendió en 500 µL de H₂O-DEPC. Se añadieron 167µL de LiCl 8M y se incubó a 4°C durante toda la noche. La muestra se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C y el botón obtenido se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC, se agregaron 500 µL de etanol al 95% y 25 µL de acetato de sodio 3M y se incubó toda la noche a -70°C. Pasado el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente, se eliminó el etanol residual, el botón se secó a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendió en 30-40 µL de H₂O-DEPC. Se cuantificó la concentración de RNA total y la muestra se almacenó a -70°C.

6.2 Cuantificación y calibración del RNA total.

La cuantificación del RNA total en cada muestra se realizó con 1.5µL utilizando un NANODROP 2000 Thermo Scientific. Además de la cuantificación espectrofotométrica, el RNA se calibró por análisis densitométrico de la banda correspondiente al RNAr 28S en un gel de agarosa al 3.0% con buffer TAE 1X (preparado con H₂O-DEPC; Anexo III) y bromuro de etidio 0.5 µg/ mL. En el gel se resolvieron a 90mV por 40 min 1 µg estimado de cada muestra mezclada con 2 µL de buffer de carga y H₂O-DEPC cbp 5µL. El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV (Hoefler Scientific Instruments modelo UVTM) y su



imagen se capturó con un equipo KODAK Image Station (modelo 400R-PRO). La densitometría de las bandas de los RNAr 28S, que permitió homogenizar las concentraciones de las muestras en un rango inferior al 12% de diferencias, se realizó en el analizador de imágenes Carestream 5.0.

6.3 Reacción de la transcriptasa reversa.

La reacción de RT se realiza mediante la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una molécula de cDNA a partir de una molécula de RNA mensajero poliadenilado. Este cDNA se utiliza como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar una secuencia de DNA y evaluar los niveles de expresión del gen de interés (Rodríguez & Barrera, 2004).

La reacción para obtener el cDNA a partir de los transcritos de los genes de la TK1 se efectuó mezclando en un tubo Eppendorf 1 μ L (61 μ M) de Oligo dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'), 1 μ g de RNA total y H₂O-DEPC cbp 10 μ L. Esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo de incubación se colocó en hielo por 5 min y se le agregó 15 μ L de la mezcla de reacción indicada en la Tabla 5. La mezcla se incubó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento y a 42° por 1 hora para la síntesis del cDNA. Para inactivar a la enzima se calentó a 70°C durante 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla 5. Mezcla de reacción de RT.

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración final
Buffer ImProm-II 5X*	4.0	1X
MgCl ₂ 25mM.	2.4	2.4 mM
dNTP's 10mM	1.0	0.4 mM
TR (Transcriptasa reversa)*	1.0	10 U/ μ L
H ₂ O-DEPC	6.6 (cbp15 μ L)	-----

*Promega



6.4 PCR en tiempo real (qPCR).

Se diseñaron cebadores específicos para los genes *TK1a*, *TK1b* y *APT1* (adenina fosfotransferasa 1 utilizado como gen de referencia) empleando el programa Primer3PLUS. Las características y secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para qPCR.

Gen	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud (pb)	Contenido de GC (%)
<i>TK1a</i>	Forward (AT3TK1F)	5' TTGGAAGATTCTGACAAGGCTA 3'	22	40.9
	Reverse (AT3TK1R)	5' CAACATTAAGGATAAACCAGACCA 3'	24	37.5
<i>TK1b</i>	Forward (AT5TK1F)	5'TGTTTGGTGTTCGATGAGAA 3'	21	37.5
	Reverse (AT5TK1R)	5'AAATGGTGGGAAGGAGGTGAA 3'	21	48
<i>APT1</i>	Forward (ATAPT1)	5' TTCGGAGGAGTATTCGTTGG 3'	20	50
	Reverse (ATAPT2)	5' CGCAAGCACATTCAACAATC 3'	20	45



Antes de proceder a la cuantificación de los niveles de expresión de los genes, se realizó la estandarización de la técnica de RT-qPCR, evaluando la especificidad de los oligonucleótidos y estableciendo la eficiencia, reproductibilidad y sensibilidad del método (Anexo II.II).

La reacción de q-PCR se realizó en un volumen final de 20µL conteniendo los componentes que se muestran en la Tabla 7.

La técnica de q-PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C y 1min a 60°C (Tm). El análisis de los resultados se efectuó con el software ABI PRISM 7000SDS.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la técnica de q-PCR para los diferentes pares de oligonucleótidos.

Reactivo	(µL)
SYB Green PCR Master Mix*	10.0
Oligonucleótido Forward (20 µM)	0.15 (0.15 µM)
Oligonucleótido Reverse (20 µM)	0.15 (0.15 µM)
cDNA	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (cbp 20µL)	7.7

*Invitrogen

Para realizar la cuantificación relativa se empleó el Método Comparativo Ct, usando la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra de interés} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

Siendo el valor de Ct el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia alcance el umbral establecido para las muestra de interés (templado proveniente del organismo bajo las condiciones de estudio establecidas) y para el calibrador (la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos



comparar las diferencias de expresión). En este ensayo se utilizó como calibrador RNA total proveniente de plantas tipo silvestre sin tratamiento.

7. Técnicas de proteínas.

7.1 Extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se partió de 200 mg de tejido de plántulas completas de 7 días de desarrollo. Una vez que el tejido se pesó inmediatamente se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para la extracción de proteínas el tejido se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, al que se le añadió amortiguador de homogeneización (Anexo III) en una relación de peso del tejido:amortiguador de 1:0.8. Posteriormente se homogeneizó el tejido con el amortiguador y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. El extracto se dejó reposar durante 30 a 60 min en hielo.

El extracto se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 30 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 4°C y 13000 rpm durante 10min, conservando el sobrenadante a -70°C hasta su uso.

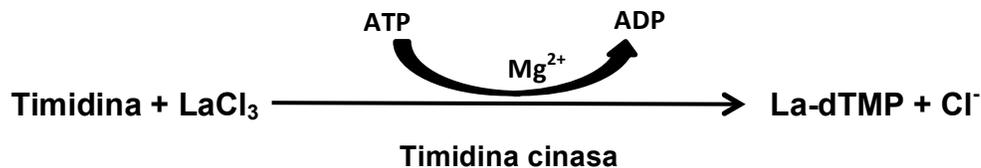
La cuantificación de la concentración de proteína en los extractos se realizó con el método de Bradford utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay, empleando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de concentraciones de 3 hasta 21 µg/µL (Bradford *et al.* 1976).

7.2 Determinación de la actividad enzimática de la timidina cinasa.

Se siguió el protocolo reportado por Wolcott & Colacino (1989) que ha sido usado exitosamente para separar metabolitos intracelulares de la timidina y 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 TK, en una reacción



dependiente de ATP y Mg^{2+} , el dTMP precipitará al adicionar $LaCl_3$ y se podrá cuantificar la timidina tritiada ([metil- 3H]-Timidina) fosforilada en un contador de centelleo.



La mezcla de reacción para estos ensayos contiene:

- 500 μ L de amortiguador de reacción (Anexo III)
- 37.5 μ L de [metil- 3H]-timidina (actividad específica de la marca 6.7 Ci/mmol y concentración radiactiva 1 mCi/mL)
- 1.25 μ L de solución de timidina 1 mM
- Un volumen de extracto proteico equivalente a 150 μ g de proteína total
- Agua desionizada cbp 1 mL

La concentración de timidina total fue de 2 μ M (0.75 μ M de [metil- 3H]-timidina suplementada con 1.25 μ M de timidina no marcada), suficiente para saturar a la enzima durante el tiempo que dura la reacción. El blanco de reacción se preparó con los mismos componentes mencionados, pero sustituyendo el extracto proteico por amortiguador Tris-HCl (50 mM pH 7.4).

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 90 minutos y la reacción enzimática se detuvo transfiriendo 200 μ L de la mezcla a un tubo Eppendorf de 2 mL con 1 mL de solución de precipitación ($LaCl_3$ 100 mM; trietanolamina 5 mM). Esta



mezcla se agitó en vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 4°C a 1600 rpm durante 10 min (centrifuga Jouan MR1814). El sobrenadante se descartó y al precipitado se le adicionó 1 mL de la solución de precipitación, se agitó en el vortex por 10 seg y se centrifugó en las condiciones mencionadas. Finalmente, el sobrenadante se decantó y el precipitado se disolvió en 300 μ L de HCl 0.05 N y 3 mL de líquido de Bray (Anexo III). Las cpm se determinaron en un contador de centelleo automático (Beckman LS 6000IC).

RESULTADOS

1. Análisis *in silico* de los genes *AtTK1a* y *AtTK1b*.

En la base de datos del genoma de *A. thaliana* (The Arabidopsis Information Resource/TAIR; <http://www.arabidopsis.org>) (Swarbreck *et al.*, 2008), se encontraron dos secuencias potenciales de genes de la TK1: la primera (*AtTK1a*) en el cromosoma 3 (AT3G07800) y la segunda (*AtTK1b*) en el cromosoma 5 (AT5G23070). En la Figura 10A se resumen las características estructurales de ambos genes y de las proteínas que codifican. La proteína TK1b tiene un P.M. mayor debido a que en su extremo amino presenta una extensión que contiene un potencial péptido de tránsito al cloroplasto. Asimismo, la estructura genómica difiere pues mientras que el gen *TK1b* carece de intrones, su parólogo *TK1a* contiene 3 intrones. La estructura de ambos genes se presenta en la Figura 10B.

A

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

B

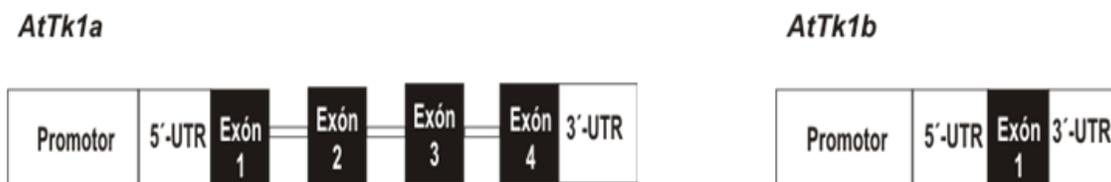


Figura 10. Estructura de los genes *TK1* de *Arabidopsis thaliana*. A. Resumen de las características estructurales de ambos genes y sus proteínas. B. Esquema estructural de cada gen.



Con las secuencias de los aminoácidos de cada una de las proteínas de la TK se calculó el porcentaje de identidad entre ambas que resultó ser del 63% (ClustalW2; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), este valor es sin incluir los aminoácidos que forman el posible péptido de tránsito a cloroplasto.

De los genes identificados se amplificaron las secuencias de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) río arriba de las regiones 5'-UTR considerando que en ellas estarían contenidos los promotores de cada uno de los genes. La secuencia amplificada para *TK1a* (*promTK1a*) fue de 1080 pb que incluyó la región del promotor putativo, la región 5'-UTR y el primer aminoácido del marco de lectura. Para el gen *TK1b* (*promTK1b*) se amplificaron 1086 pb, que incluyeron la región 5'-UTR y la secuencia de los 7 primeros aminoácidos del marco de lectura. Las secuencias amplificadas para ambos genes de la TK1 de *A. thaliana* se presentan en la Figura 11.

Estas secuencias se analizaron en las bases de datos NEWPLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/NEWPLACE>) (Higo *et al.*, 1999) y PlantPAN (plant promoter analysis navigator; seq_analysis.php), para localizar los elementos *cis*-reguladores presentes. Entre los elementos encontrados en ambas secuencias hay cajas que regulan la expresión tejido específica, como las cajas *Agamous* y *Apetala* características de genes de identidad floral. Asimismo, se localizaron cajas de genes que tienen una expresión restringida en polen y raíz (Tabla 1S Anexo II.I).

Adicionalmente, en ambas regiones se identificaron elementos reguladores que participan en la respuesta a algún tipo de estrés; algunos de ellos se muestran en las Tablas 2S y 3S (Anexo II.I).



Entre los elementos *cis*-reguladores encontrados en la región 5' del gen *TK1a* se tienen algunos previamente identificados en genes de respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental y en genes controlados por el ciclo celular. Una de las secuencias encontradas fue la secuencia consenso de reconocimiento para el factor de transcripción E2F, cuya funcionalidad ya se ha demostrado experimentalmente en algunos genes en *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Nicotiana benthamiana*. Además, se localizaron elementos que participan en la activación de genes que responden a sequía y daño mecánico. Interesantemente, entre estas últimas se incluye la caja CGCGBOXAT, que es reconocida por factores de transcripción cuya expresión es inducida por diversas condiciones de estrés como son luz UV-B, temperaturas extremas y daño por herida.

Por su parte, en la región 5' del gen *TK1b* se encontraron elementos regulatorios que participan en inducir la expresión de genes en respuesta a estrés hídrico y salino, pero no se encontraron secuencias que indiquen su regulación por el ciclo celular.

Asimismo, en ambos promotores se encontraron elementos de respuesta a distintas fitohormonas como son ácido abscísico, giberelinas y ácido salicílico.

2. Obtención de las construcciones quiméricas de promotores de los genes TKs con los genes reporteros GUS y GFP.

Para poder analizar funcionalmente las regiones promotoras de los genes *TK1* de *A. thaliana* se requirió clonaras frente a un gen reportero en un vector binario. Con este propósito se empleó el sistema Gateway®, el cual está basado en un sistema de recombinación en sitios específicos.

2.1 Obtención de los productos de PCR flanqueados por sitios de recombinación (*attB*).

En la Figura 12A se muestra un gel de agarosa con los amplicones obtenidos con los cebadores respectivos para cada promotor. Estos amplicones se purificaron del gel y se utilizaron como molde para una segunda PCR realizada con

cebadores adaptadores que contienen las secuencias de recombinación *attB* completas. En la Figura 12B se muestra un gel de agarosa con los amplicones de cada promotor obtenidos con los cebadores adaptadores. Nuevamente las bandas se purificaron del gel y se emplearon para la reacción de recombinación con el vector donador.

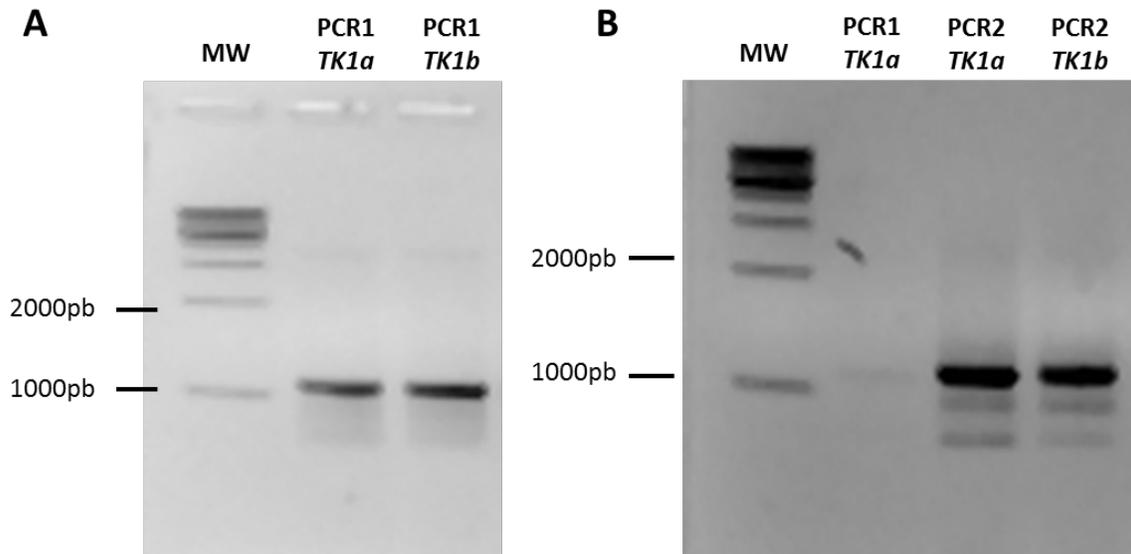


Figura 12. Productos de amplificación de la PCR1 y la PCR2. (A) Amplicones flanqueados con parte de las secuencias de recombinación *attB* obtenidos de la PCR1 de los promotores potenciales de los genes *TKs* de *A. thaliana*. (B) Amplicones flanqueados con las secuencias completas de recombinación *attB* obtenidos de la PCR2, como molde se utilizó 1 μ L de la PCR1.

2.2 Recombinación de los promotores potenciales de los genes *TK1* con el vector donador pDONR221 y con los vectores binarios.

Con las regiones 5' modificadas en sus extremos con las secuencias *attB* completas, se realizó la primera reacción de recombinación con el vector donador pDONR221. La recombinación se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción *Ava*I, ya que el vector donador sin recombinar presenta 2 sitios de reconocimiento para esta enzima, uno de los cuales se pierde por el proceso de recombinación, mientras que las secuencias a introducirse no contienen el sitio blanco para esta enzima. En la Figura 13A se muestra el mapa del vector donador

pDONR-221 y en la Figura 13B se presenta un gel de agarosa con los productos de digestión de los vectores recombinantes para ambas secuencias introducidas, que en caso de ser positiva resultaría en una banda de aproximadamente 3,650 pb. En la Figura 13C se muestran los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para cada fragmento sobre los vectores correspondientes. Finalmente, los plásmidos recombinantes se secuenciaron con los cebadores M13 forward y M13 reverse, para confirmar la identidad de los fragmentos clonados.

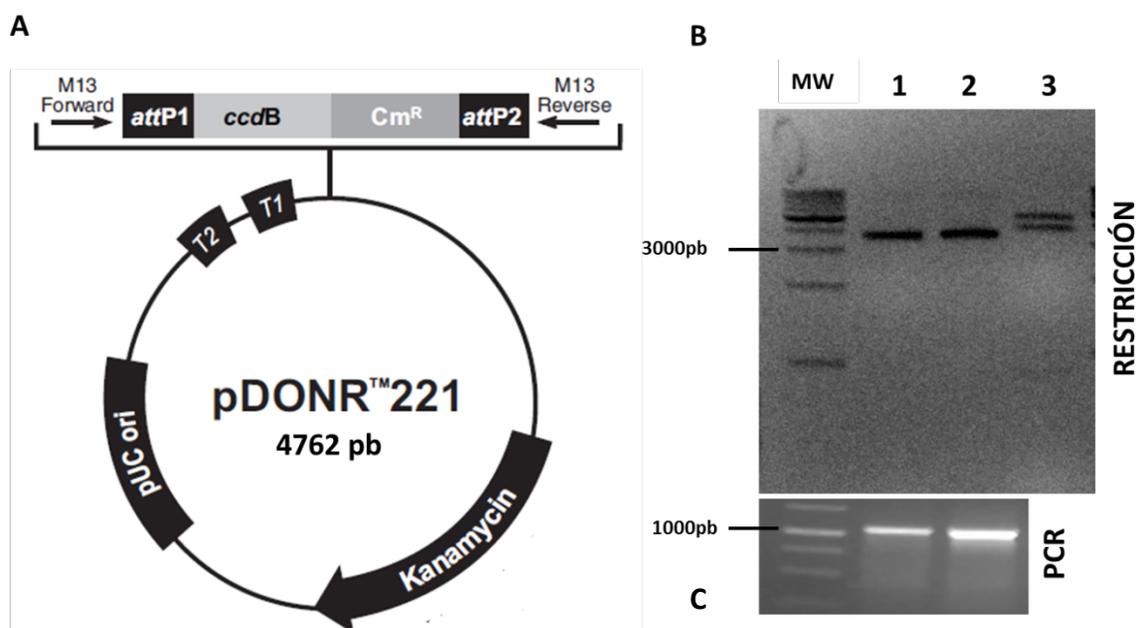


Figura 13 . Clonación de las secuencias 5' de los genes *TK1a* y *TK1b* en el vector pDONR221. (A) Mapa del vector pDONR221. (B) Productos de digestión de los vectores con *Ava*I. MW, Escalera de DNA de 1Kb; 1, digestión de la construcción pDONR221/promTK1a; 2, digestión de la construcción pDONR221/promTK1b. 3, restricción del vector pDONR221 sin recombinar. (C) Productos de PCR con oligonucleótidos específicos para dicha secuencia sobre los plásmidos correspondientes.

Una vez confirmada la clonación de las secuencias 5' de *TK1a* y *TK1b* en el vector donador, se realizaron las segundas reacciones de recombinación descritas en Materiales y Métodos, para subclonarlas en los vectores de expresión pGWB3 (Figura 14A) y pMDC163 (Figura 14C), para controlar la expresión del gen reportero *GUS*, y en el vector pGWB4 (Figura 14B) para dirigir la expresión del gen reportero GFP.

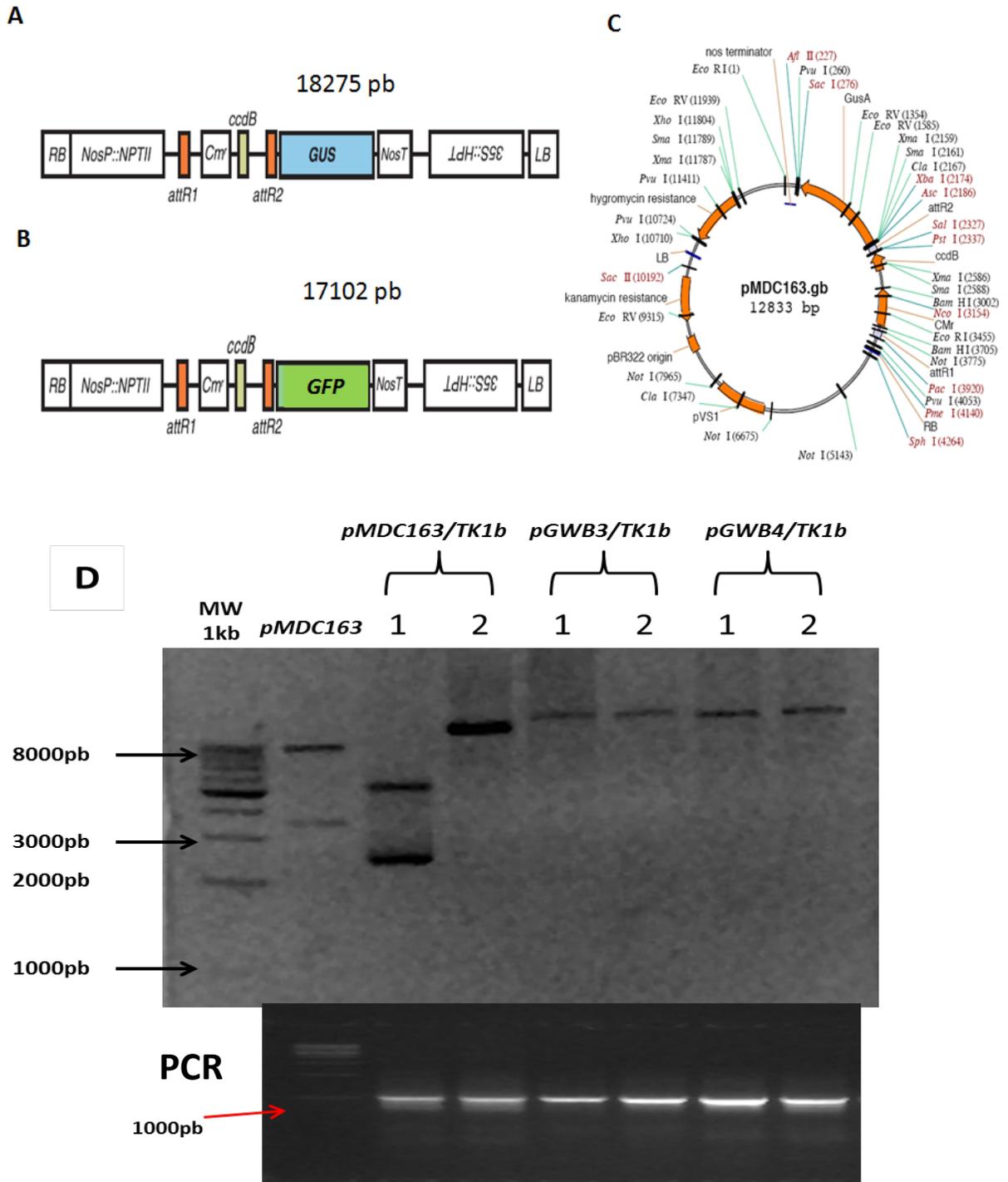


Figura 14. Clonación de las secuencias 5' de *TK1a* y *TK1b* en vectores binarios. pGWB3 (A), pGWB4 (B) y pMDC163(C). (D) Productos de digestión con *EcoRI* de los vectores recombinantes con la secuencia 5' de *TK1b*, 1 y 2 indican el número de colonia seleccionada. En la parte inferior se muestra los productos de PCR con oligonucleótidos específicos para dicha secuencia sobre los plasmidos correspondientes.



Los plásmidos binarios recombinantes se analizaron por digestión con la enzima *EcoRI*. Las clonas recombinantes presentaron una sola banda en el gel de agarosa, ya que ninguna de las secuencias clonadas contienen el sitio blanco para dicha enzima. En la parte superior de la Figura 14D se muestra la restricción con la enzima *EcoRI* de dos candidatos recombinantes independientes con la secuencia de *TK1b*. Con excepción de la clona 1 de la construcción pMDC163 el resto presentó el patrón de resticción esperado. En la parte inferior de la Figura 14D, se muestra las reacciones de PCR con los cebadores específicos sobre los vectores correspondientes con lo que se confirmó la identidad del fragmento de DNA clonado. El mismo procedimiento se llevó a cabo para la identificación de las colonias recombinantes del promotor *TK1a* en los vectores binarios.

Una vez confirmada la clonación de los secuencias en los vectores binarios, se seleccionó una clona de cada construcción y se secuenció usando cebadores internos del gen reportero correspondiente, la secuencia de los cebadores se localiza alrededor de 200 pb río abajo del inicio de la traducción. De esta manera se confirmó que las secuencias clonadas de los genes *TK1a* y *TK1b* quedaron en fase con el marco de lectura abierto de los genes reporteros. Estos vectores se movilizaron hacia *A. tumefaciens* y cepas transformantes para cada construcción se utilizaron para transformar plantas de *A. thaliana*, sobre las que se evaluó la actividad promotora de las secuencias clonadas. En el caso del gen reportero *GUS* después de análisis preliminares de actividad sobre plantas transgénicas T1, se decidió continuar únicamente con plantas portadoras de la construcción pMDC163/pTK1 ya que presentaron mayor sensibilidad que plantas pGWB3/pTK1.

3. Patrón de expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* durante el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Todos los análisis se realizaron sobre plantas homocigotas de las generaciones T3 y T4 como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

La expresión tejido específica de *promTK1(a/b)::GUS* fue determinada por tinción histoquímica. La actividad del gen reportero fue monitoreada las primeras 72h de



crecimiento cada 24h después de que las semillas se colocaron en la cámara de incubación. Durante las primeras 48h, no se observaron diferencias en los patrones de expresión de ambos genes (Figura 15 A-B y E-F). Ambos mostraron expresión fuerte en el meristemo de la raíz primaria a las 24 h, que disminuyó notablemente a las 48h. A las 72h no se observó actividad de GUS en el meristemo de la raíz de plántulas *promTK1b::GUS* y la expresión *promTK1a::GUS* fue muy baja (Figura 15 D y H). Además, ambos genes se expresan en la zona de transición de la raíz, a lo largo de toda la raíz primaria antes de llegar a la zona del meristemo y en los cotiledones. Sin embargo, a las 72h no se detectó actividad de GUS en el hipocótilo. Cabe resaltar que en comparación con *promTK1b::GUS*, la expresión de *promTK1a::GUS* fue ligeramente mayor en todos los estadios del crecimiento evaluados.

En etapas posteriores de desarrollo, ambas secuencias promotoras dirigen la expresión de GUS en cotiledones, en el primordio de la hoja (Fig. 16A y 17A), estípulas (Fig. 16B y 17B), tricomas (Fig. 16C y 17C), primordio de raíz lateral (Fig. 16D y 17E). Así como en flores, en especial en anteras y polen (Fig. 16I-J y 17G-I), aunque en pétalos hay mayor expresión en flores *promTK1a::GUS*. En plantas mayores de 5 días, se observó una intensa actividad de GUS en la raíz primaria, principalmente en la zona vascular, pero no se detectó actividad en la región del meristemo (Fig.16F y 17D).

En general, los niveles de expresión de GUS fueron mayores bajo el control del promotor *TK1a*, que también dirige expresión en tallo (Fig.16G), hojas caulinares (Fig.16H) y en diferentes estructuras y estadios de las silicuas (Fig. 16K-M). Esto se observó en al menos tres líneas independientes.

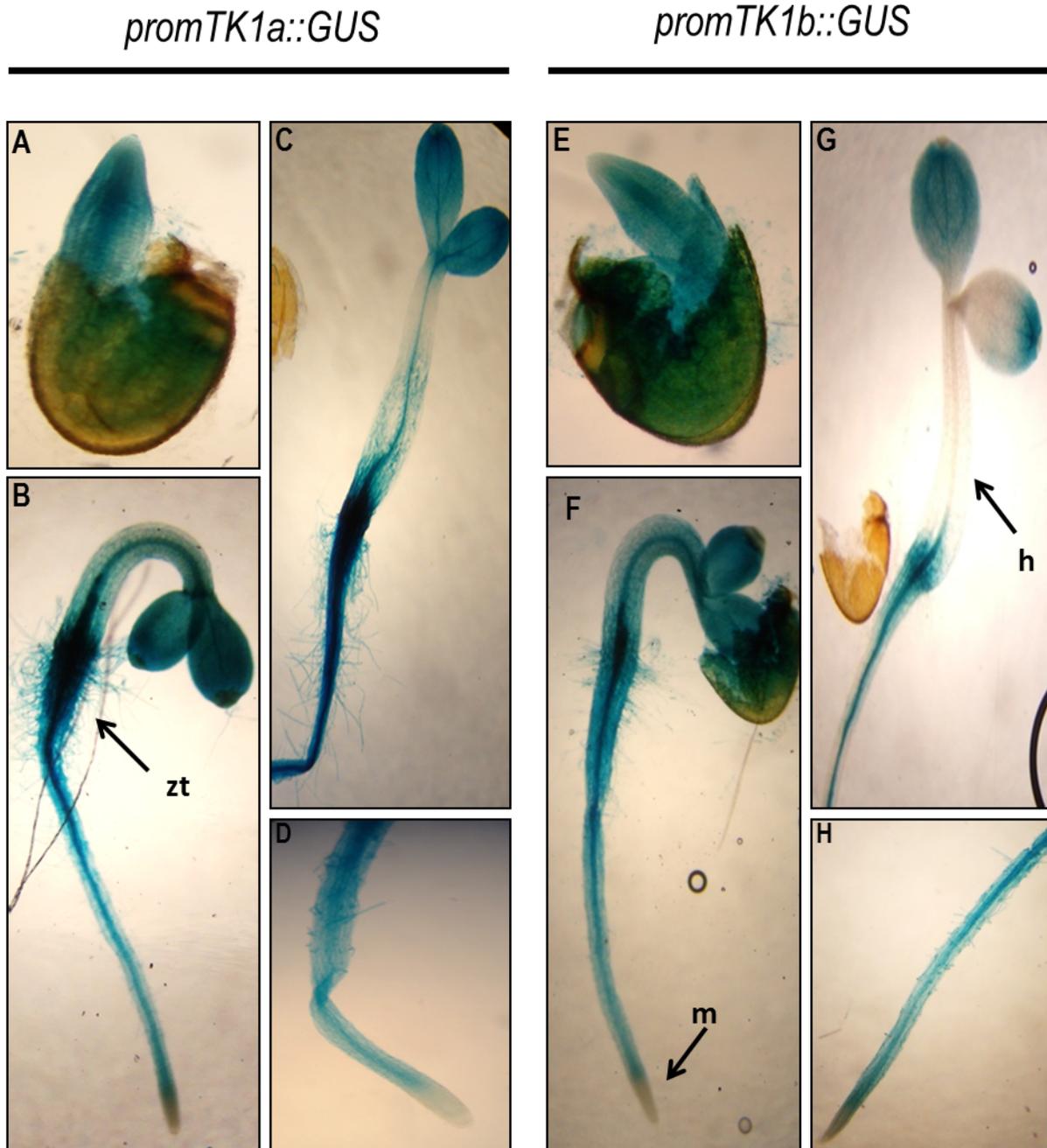


Figura 15. Expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* durante los 3 primeros días de desarrollo. Expresión de *promTK1a::GUS* a las 24h (A), 48h (B) y 72h (C y D) del desarrollo. Expresión de *promTK1b::GUS* a las 24h (E), 48h (F) y 72 (G y H) del desarrollo. zt (zona de transición), m (meristemo de la raíz), h (hipocótilo). Las imágenes mostradas son representativas del análisis 3 líneas independientes para cada construcción.

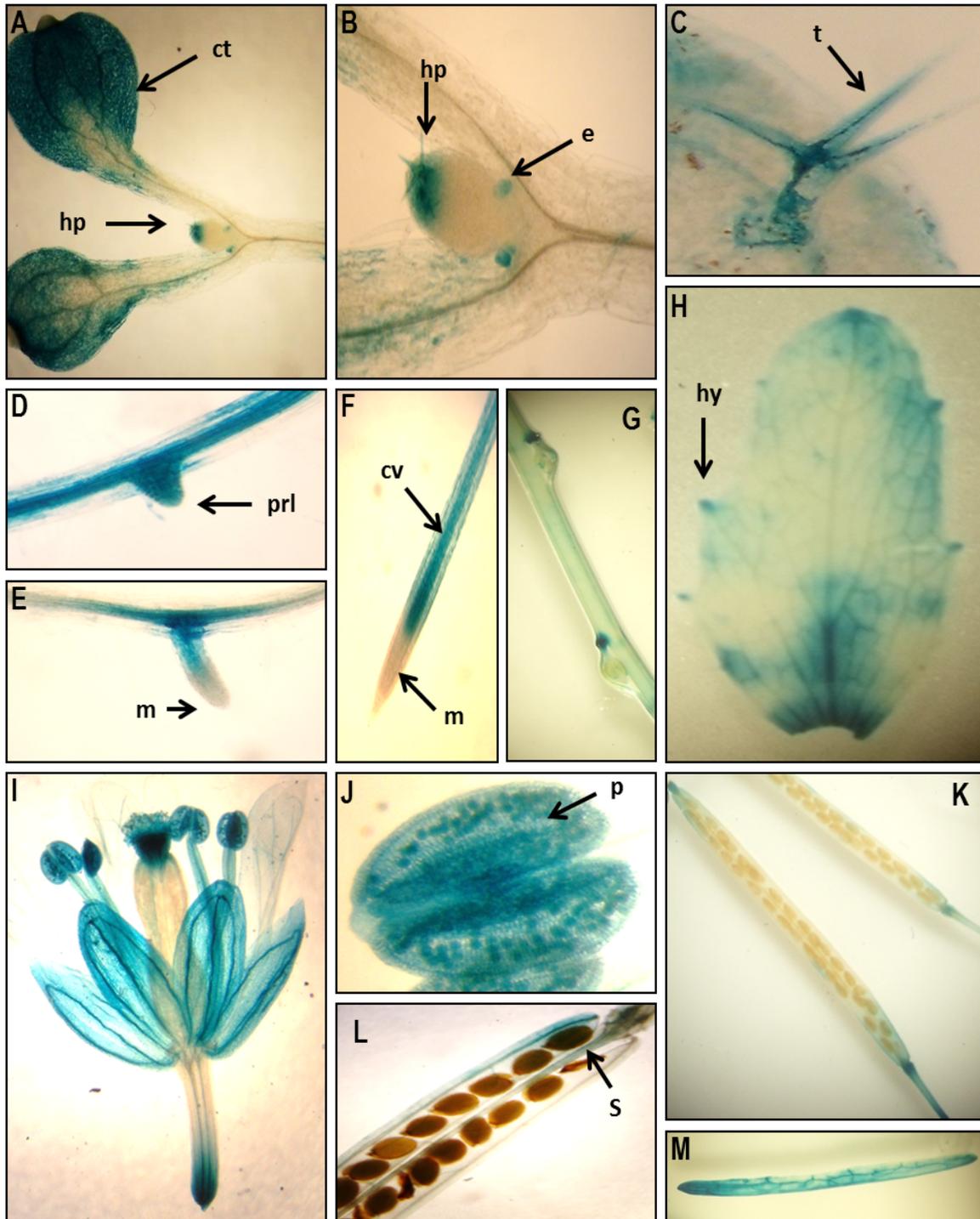


Figura 16. Expresión del gen *TK1a* en diferentes tejidos y etapas del desarrollo. Plántula de 7 días (A-F), Se muestra la actividad de GUS en: A, primordio foliar (hp) y cotiledones (ct). B, estípulas (e) y hp. C, Tricoma (t). D, primordio de raíz lateral (prl). E, raíz lateral en desarrollo que no muestra actividad en el meristemo (m). F, raíz primaria; región vascular de la raíz (cv). G, tallo. H, hoja caulinar; hidátodos (hy) I, Flor. J, antera; polen (p). L-M, sílicuas; L, expresión en el septo (s), K, expresión en el pedicelo de la sílicua y M, sílicua seca sin semillas. Las imágenes mostradas son representativas de 3 líneas independientes.

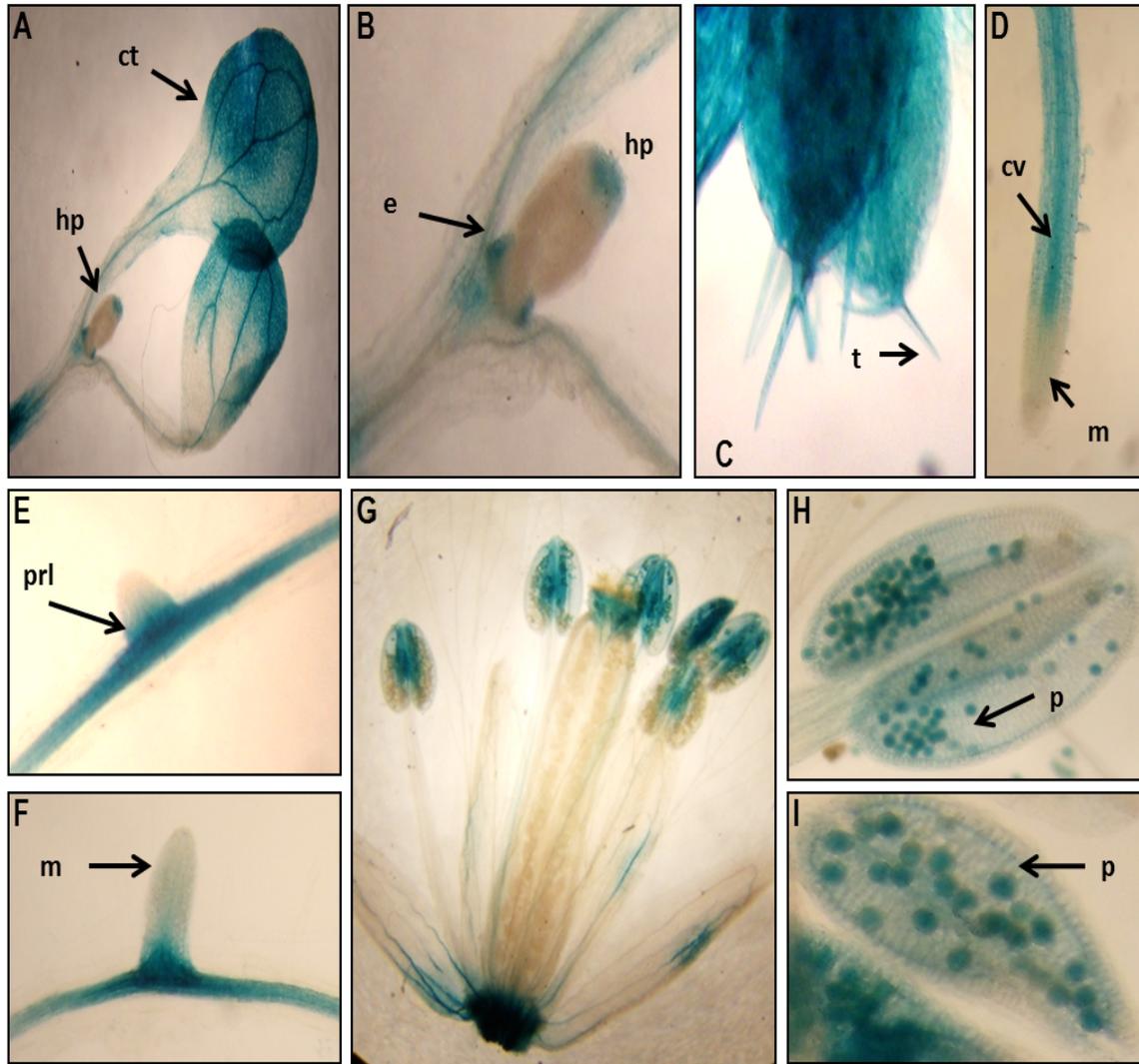


Figura 17. Expresión del gen *TK1b* en diferentes tejidos y etapas del desarrollo. Plántula de 7 días (A-F). Actividad de GUS en: A, primordio foliar (hp) y cotiledones (ct). B, estípulas (e) y hp. C, Tricoma (t). D, raíz primaria; región vascular de la raíz (cv). E, primordia de raíz lateral (prl). F, raíz lateral en desarrollo que no muestra actividad en el meristemo (m). G, Flor. H e I, anteras y polen. Las imágenes mostradas son representativas de 3 líneas independientes.

También se evaluó la expresión de ambos genes en hojas de la roseta durante diferentes estadios de desarrollo. A los 17 días de crecimiento se detectó actividad de GUS en los hidátodos y nervaduras de las hojas, mientras que a los 28 días el patrón de expresión cambió, ya que en este caso la expresión se localizó principalmente en puntos definidos de las hojas. Para los dos primeros tiempos evaluados no se observó un patrón de expresión diferencial entre ambos promotores, sin embargo, en hojas de roseta de plantas de 42 días la expresión

del transgen controlada por el promotor *TK1a* incrementó notablemente en toda la hoja, mientras que la expresión de GUS con el promotor *TK1b* se abatió casi por completo limitándose a una expresión baja en las nervaduras de la base de la hoja (Figura 18).

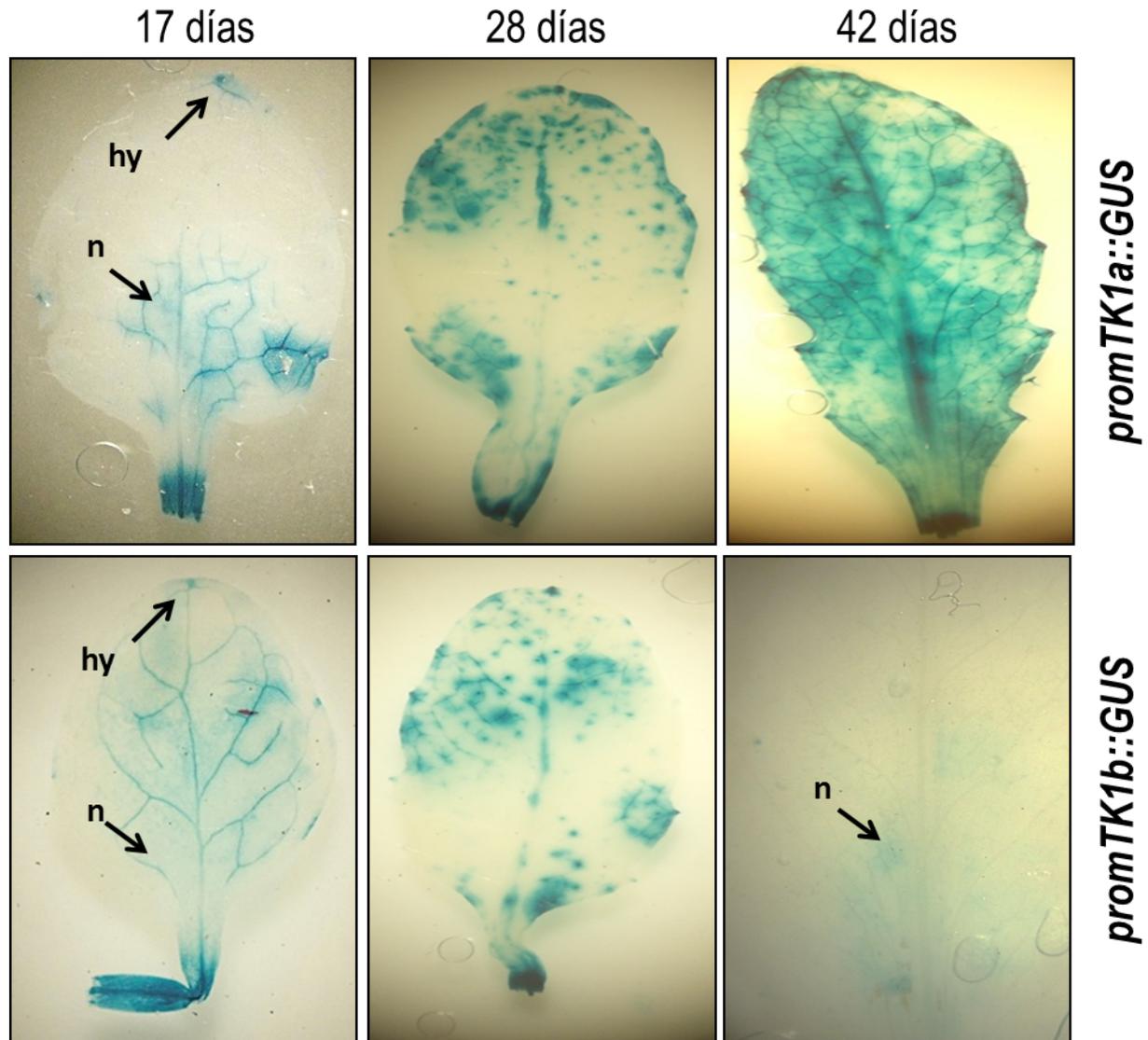


Figura 18. Expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* en hojas de roseta. Actividad de GUS en: nervaduras (n) e hidátodos (hy). Las imágenes mostradas son representativa del análisis 3 líneas independientes para cada construcción.

4. Función de los genes de TK en la reparación del DNA en *Arabidopsis thaliana*.

4.1 Evaluación de la susceptibilidad de mutantes de T-DNA de la TK en respuesta a agentes genotóxicos.

Para estudiar la función de la timidina cinasa se emplearon dos líneas mutantes de inserción de T-DNA en los genes *TK*. La línea SALK037113 tiene integrado el T-DNA en la región promotora del gen *TK1a* (Figura 19 A), mientras que la línea SALK07256 tiene integrado el T-DNA cerca del extremo 3' del exón 1 del gen *TK1b* (Figura 19B). La inserción de T-DNA en la región promotora de la mutante *atrk1a* resultó en mayores niveles de expresión del gen (Figura 19C) por lo que se denominó *oetk1a*; por su parte, la línea mutante *atrk1b* presenta una disminución en el nivel del transcrito respectivo (Figura 19D) y se le denominó *mtk1b*. Durante el desarrollo en condiciones convencionales de crecimiento ambas mutantes no presentan diferencias fenotípicas con respecto a las plantas tipo silvestre.

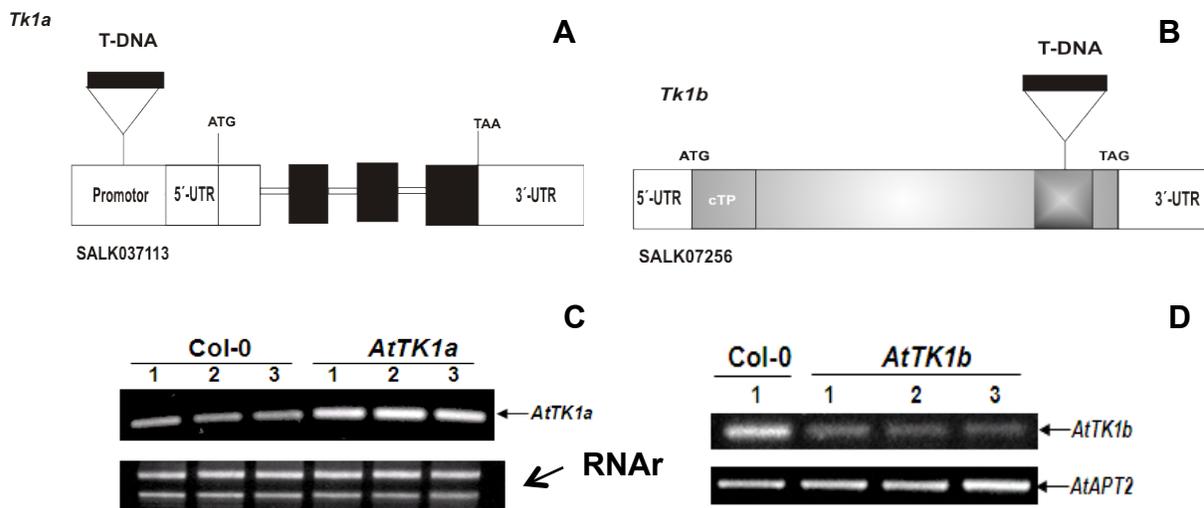


Figura 19. Líneas de inserción de T-DNA en los genes de la TK1 de *A. thaliana*. Se muestra un esquema indicando los sitios de inserción del T-DNA sobre los genes *TK1a* (A) y *TK1b* (B). Así como los niveles de transcrito de los genes correspondientes en las mutantes *oetk1a* (C) y *mtk1b* en relación a los niveles en plantas tipo silvestre (D). La extracción de RNA se realizó a partir de hojas de roseta de plantas de 6 semanas. Como control de carga se muestran los niveles de RNAr (C) y los niveles de expresión del gen *APT1* (D). 1, 2 y 3 es el número de planta analizada (Nájera-Martínez, 2010).

En trabajos previos del laboratorio se caracterizó la sensibilidad de estas líneas mutantes en respuesta a luz UV-C, estableciéndose que en la mutante *oetk1a* la longitud de la raíz primaria, así como la región del meristemo del ápice fueron menos afectadas que plantas tipo silvestre, mientras que la mutante *mtk1b* no presentó diferencias en estos parámetros con respecto a las plántulas tipo silvestre (Pedroza-García, 2011).

4.1.1 Estandarización del tiempo de irradiación con luz UV-C.

Inicialmente se estandarizó el tiempo necesario de exposición a radiación UV-C para causar efectos en la elongación de la raíz de plantas tipo silvestre y la mutante *oetk1a* (Figura 20).

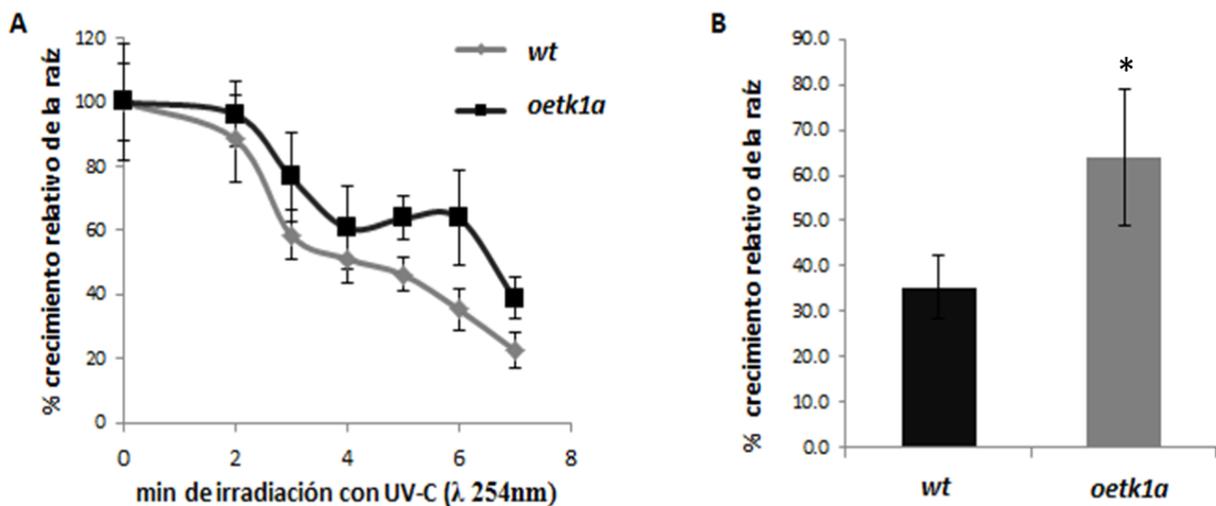


Figura 20. Efecto de la luz UV-C en el crecimiento de la raíz primaria. (A) Inhibición del crecimiento de la raíz en diferentes tiempos de exposición a luz UV-C. (B) Efecto de 6 min de irradiación con luz UV-C sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas tipo silvestre (wt) y la mutante *oetk1a*. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco indica diferencia significativa a $P \leq 0.05$ con la prueba estadística t-student. Experimento realizado por triplicado (n=12).

Se observó que de manera general las plántulas *oetk1a* toleraron mejor el estrés genotóxico de la radiación con luz UV-C determinado por la elongación de la raíz primaria. Así como que en los 3 tiempos de irradiación más cortos hubo diferencias mínimas en la inhibición de la longitud de la raíz entre plántulas tipo silvestre en comparación con las raíces de la mutante (Figura 20A). Con este



experimento se estableció un tiempo de irradiación de 6 min, que causa una inhibición del 65% en plantas tipo silvestre y del 35% en plantas *oetk1a* del crecimiento de la raíz primaria, como una condición adecuada para evaluar los efectos de este tratamiento (Figura 20B). Por su parte, la mutante *mtk1b* respondió a este tratamiento de manera muy similar a plantas tipo silvestre, por lo que los datos no se incluyeron en las gráficas mostradas.

4.1.2 Efecto de los compuestos MMC y zeocina.

Se evaluaron los efectos de la mitomicina C (MMC) y la zeocina en el crecimiento y porcentaje de sobrevivencia de las mutantes de la TK1. La MMC forma aductos con guaninas en el DNA actuando como un entrecruzador (Lee *et al.*, 2005), mientras la zeocina actúa como un agente intercalante del DNA, ocasionando la separación de bases complementarias y consecuentemente el rompimiento de la doble cadena del DNA (DSBs) (Chen *et al.*, 2003). El daño ocasionado por los aductos formados con MMC pueden ser reparados por las vías de NER, TLS y HR (Deans & West, 2011). Mientras que las DSBs producidas por la exposición a zeocina son principalmente reparadas por el mecanismo de reparación NHEJ. Todas las vías anteriores requieren de la síntesis de DNA y el aporte de nucleótidos.

Con una concentración de 25 μM de MMC se observaron diferencias discretas entre la línea *oetk1a* y las plantas tipo silvestre en la longitud de la raíz primaria y en el crecimiento del tejido aéreo de plantas de 17 días (Figura 21A). Por su parte, la exposición a zeocina 10 μM causó diferencias más notables en los mismos parámetros (Figura 21B). En general, en presencia de estos compuestos genotóxicos las plántulas de la línea *oetk1a* se desarrollaron mejor que las plántulas tipo silvestre y *mtk1b*. Asimismo la línea *oetk1a* presentó mayor porcentaje de sobrevivientes en ambos tratamientos, mientras que la línea *mtk1b* no mostró diferencias significativas con la línea tipo silvestre (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de sobrevivencia a MMC y zeocina.

Línea de <i>A. thaliana</i>	MMC (25 μ M)	Zeocina (10 μ M)
<i>wt</i>	78% (^a)	63% (^a)
<i>oetk1a</i>	97% (^b)	80% (^b)
<i>mtk1b</i>	82% (^a)	65% (^a)

Diferente superíndice en cada columna indica diferencias significativas por la prueba t-student ($P \leq 0.05$). Valores obtenidos con una $n=100$ para cada tratamiento.

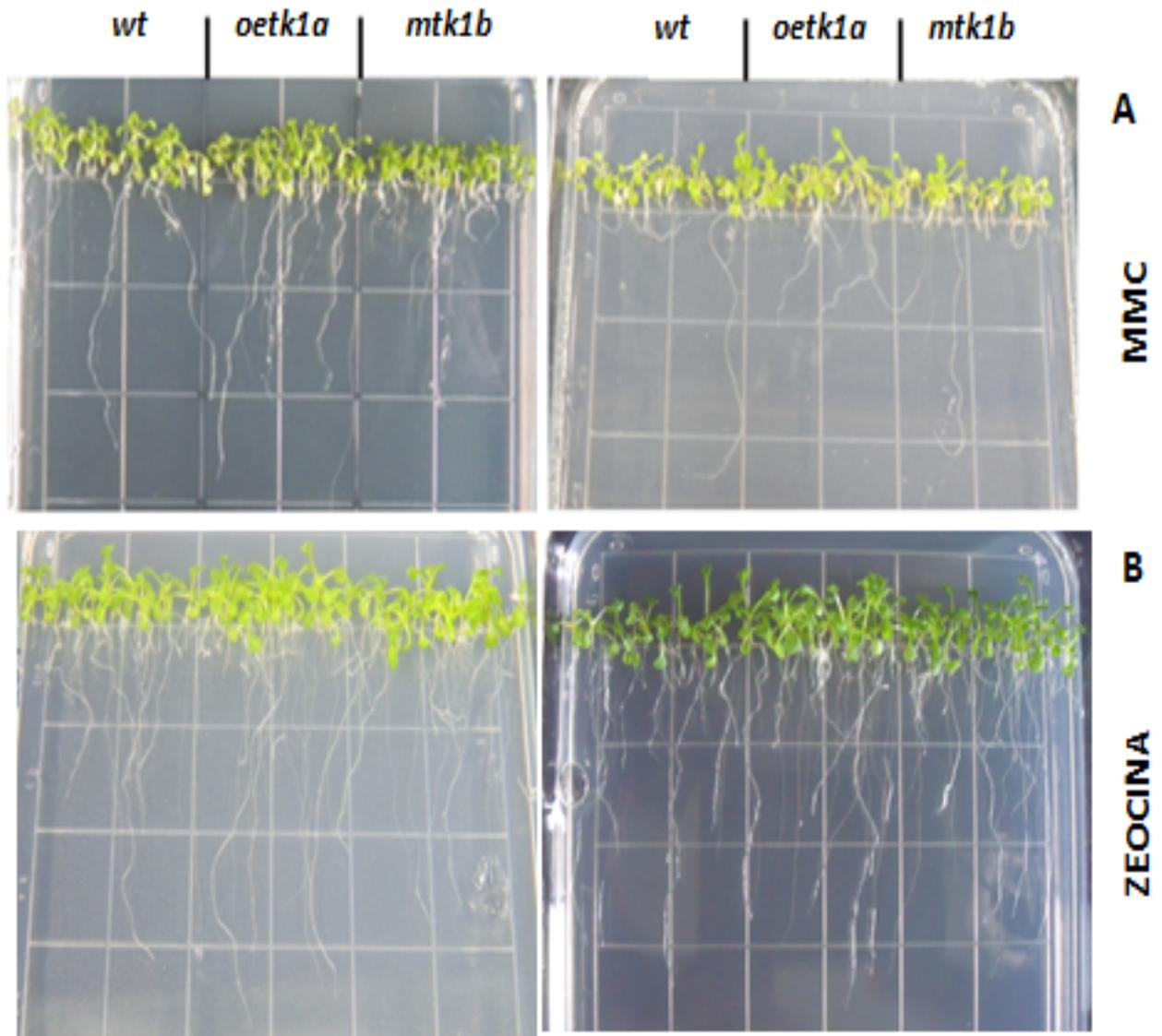


Figura 21. Efecto de la exposición a MMC o zeocina sobre el desarrollo. Se muestran plantas de 17 días crecidas en medio Gamborg's B5 suplementado con MMC 25 μ M (A) o zeocina 10 μ M (B). Las imágenes mostradas son de 2 experimentos independientes.

Para determinar los efectos de la zeocina sobre el crecimiento se evaluó el peso fresco de las plántulas de cada línea. Este parámetro también demostró que las plántulas *oetk1a* son más tolerantes a DSBs, el tratamiento causó una reducción de 23% con respecto a plántulas control, mientras que en plantas tipo silvestre y *mtk1b* la reducción fue casi del 50% (Figura 22).

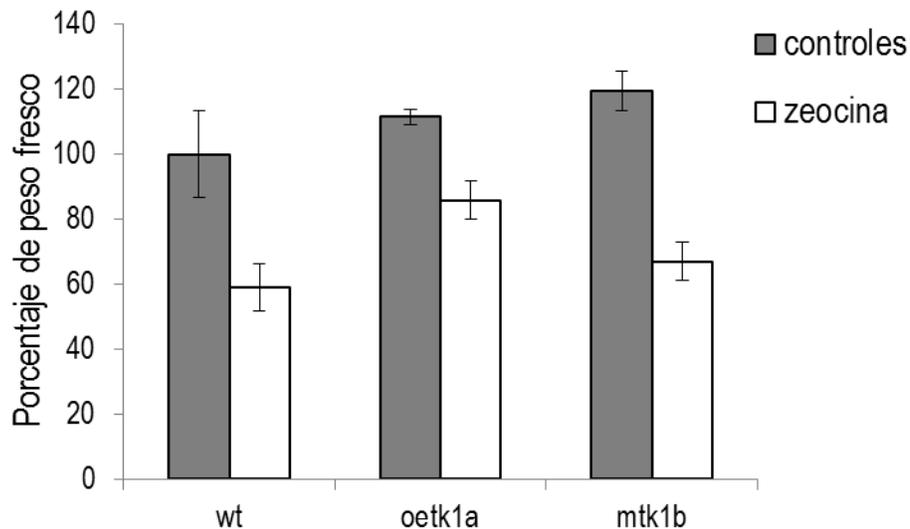


Figura 22. Efecto de la zeocina en el peso fresco. Las semillas se sembraron en medio Gamborg's B5 suplementado con zeocina (10 μ M) y se incubaron a 4°C en oscuridad por 5 días, posteriormente se crecieron por 17 días a 22°C con un fotoperiodo 8h luz/16h oscuridad. Pasando este tiempo se determinó el peso fresco de las plántulas de cada línea. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar, los valores se estandarizaron con respecto al peso de las plantas tipo silvestre sin tratamiento. Experimento realizado 6 veces (n=16, en cada experimento).

4.2 Actividad de los promotores *TK1a* y *TK1b* en respuesta a estrés genotóxico.

Los resultados obtenidos del análisis del fenotipo de las mutantes de T-DNA en respuesta a estrés genotóxico sugieren que al menos el gen *TK1a* está involucrado en la respuesta a daño por agentes entrecruzantes al DNA y productores de DSBs, además resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraron que la transcripción del gen *TK1a* es inducida por tratamiento con luz UV-C pero no se induce la transcripción del gen *TK1b* (Pedroza-García, 2011).



Por lo tanto para relacionar los resultados obtenidos con los fenotipos y corroborar los resultados obtenidos por RT-PCR semicuantitativo se evaluó la expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* en respuesta a los agentes genotóxicos: luz UV-C, MMC y zeocina, sobre plantas transgénicas *promTK1a::GUS* y *promTK1b::GUS*.

4.2.1 Actividad de los promotores *TK1a* y *TK1b* en respuesta a MMC y zeocina.

El ensayo se realizó con plántulas de 4 días crecidas en condiciones estándares que posteriormente se transfirieron a medio suplementado con zeocina (10 μ M) o MMC (25 μ M), como ya se habían utilizado en los ensayos de tolerancia con las líneas mutantes de T-DNA. Se monitoreó el cambio en la actividad de GUS a diferentes tiempos a partir de 1h y hasta las 48h de exposición al compuesto genotóxico.

La expresión del transgen controlada por el promotor *TK1a* se incrementó discretamente después de 1h de exposición en respuesta a cualquiera de los dos compuestos, principalmente en el área del meristemo de la raíz primaria. A las 3h de exposición aumentó la actividad del gen reportero en toda la raíz, sin embargo, la inducción siguió siendo mayor en el meristemo, el mismo patrón se observó a 6h del tratamiento. En los tiempos de 24h y 48h de exposición el incremento de la actividad del transgen fue más acentuado en toda la raíz (Figura 23).

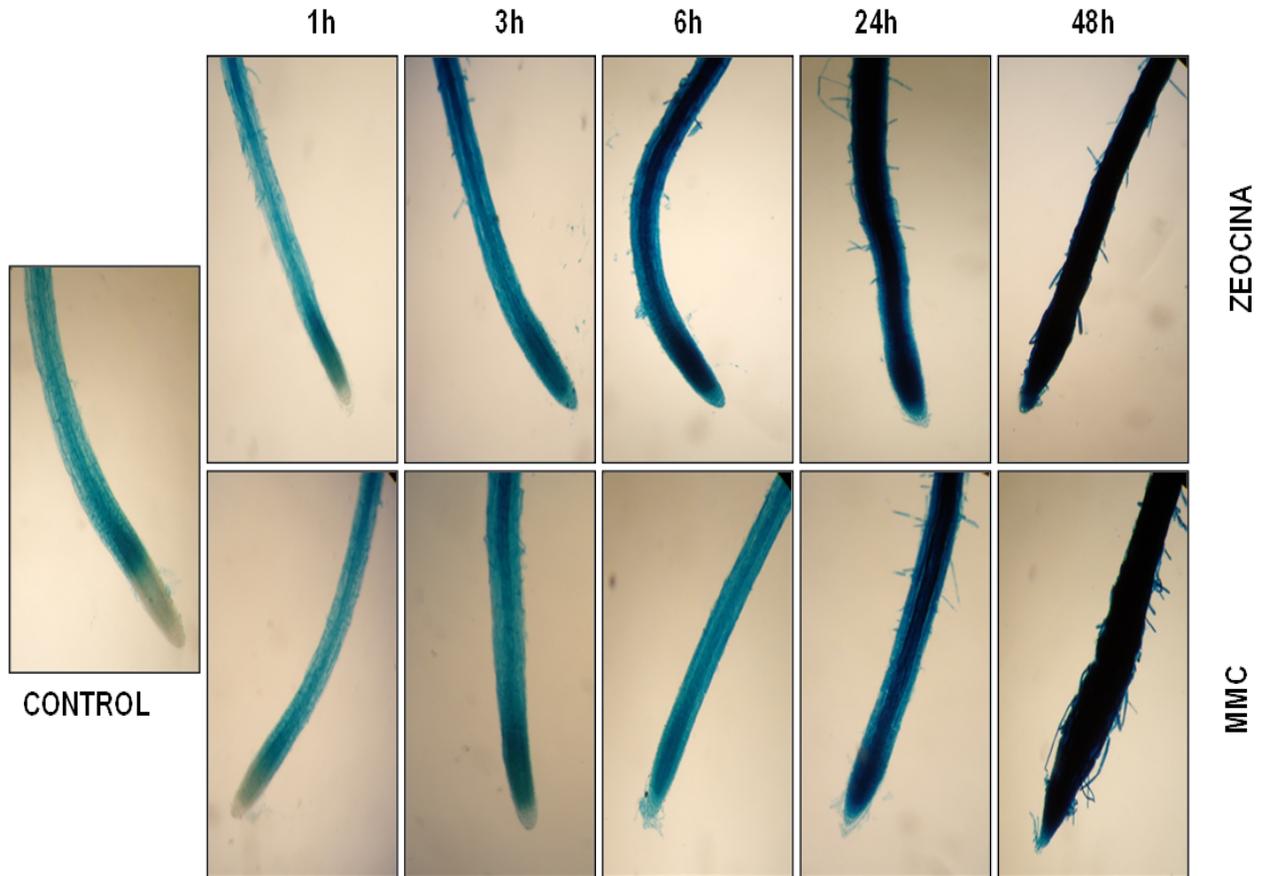


Figura 23. Efecto de la exposición a zeocina o MMC en la expresión de *promTK1a::GUS*. Los paneles superiores muestran el patrón de expresión de plántulas de 4 días en respuesta a diferentes tiempos de exposición a zeocina ($10\mu\text{M}$) y los inferiores el de exposición a MMC ($25\mu\text{M}$). Se muestra la actividad histoquímica de GUS después de los tiempos de tratamiento indicados en relación a plantas no tratadas (CONTROL). Experimento realizado con plántulas T3 de tres líneas independientes.

Mientras que el promotor *TK1a* activó rápidamente la transcripción de GUS, el promotor *TK1b* no indujo la expresión de GUS en tiempos cortos de exposición a agentes genotóxicos (6 - 24 h). Sin embargo, si se observó una ligera inducción de la expresión del transgen discretamente después de 24h de exposición, el incremento de la expresión también se observó en la raíz primaria, sobretudo en la zona por encima del meristemo. Este patrón de expresión se acentuó a las 48h de exposición a MMC o zeocina (Figura 24).

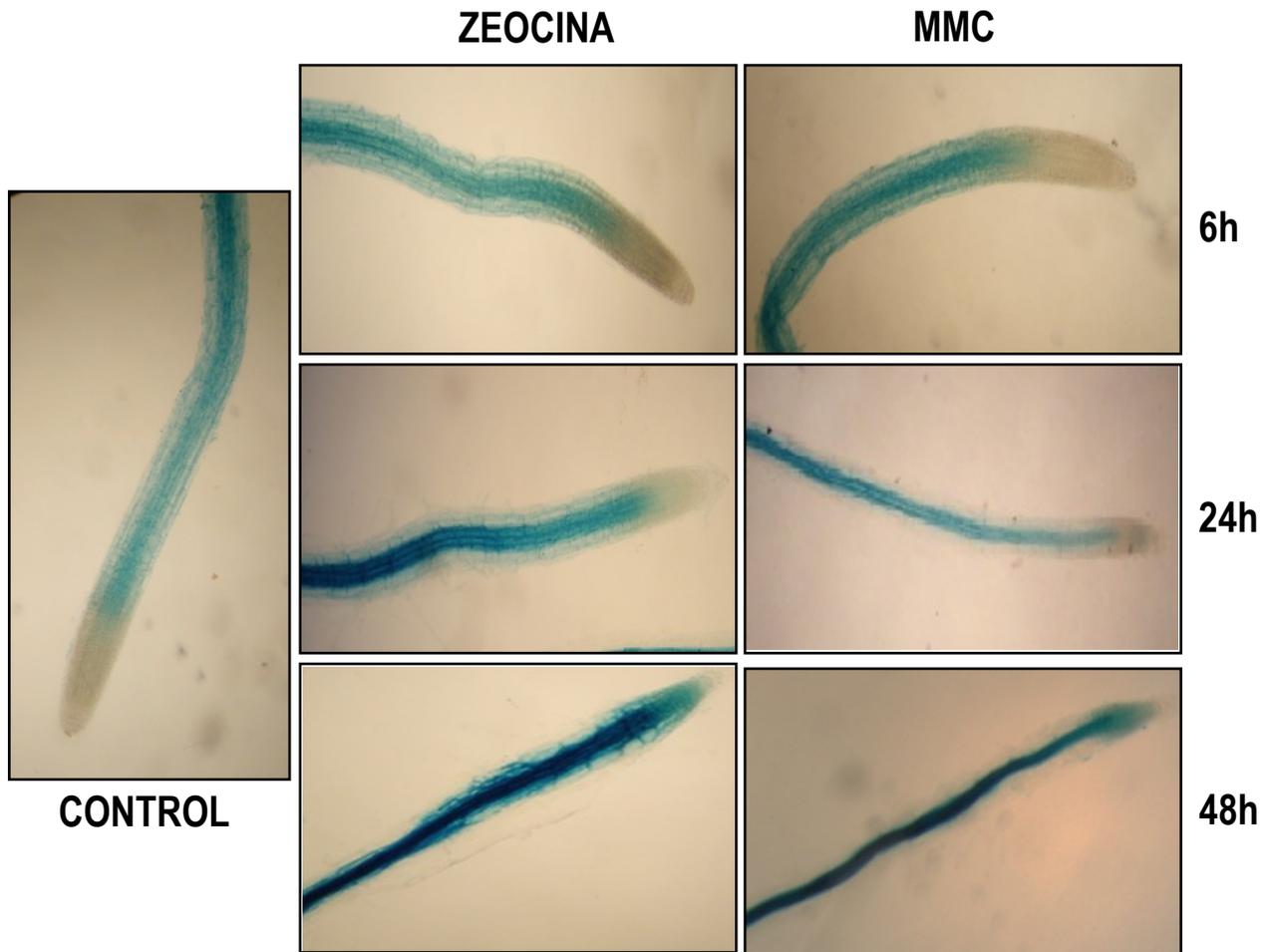


Figura 24. Efecto de la exposición a zeocina o MMC en la expresión de *promTK1b::GUS*. La figura muestra el patrón de expresión de *promTK1b::GUS* de plántulas de 4 días en respuesta a diferentes tiempos de exposición a zeocina ($10\mu\text{M}$) y a MMC ($25\mu\text{M}$). Se muestra la actividad histoquímica de GUS después de los tiempos de tratamiento indicados en relación a plantas no tratadas (CONTROL). Experimento realizado con plántulas T3 de tres líneas independientes.

Ambos promotores activaron la transcripción de los genes *TK1* de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a zeocina y MMC aunque con patrones de expresión temporal diferentes.



4.2.2 Actividad de los promotores *TK1a* y *TK1b* en respuesta a luz UV-C.

Cuando plántulas que expresan el transgen *GUS* bajo el control de los promotores *TK1a* y *TK1b* se irradiaron con luz UV-C, se observó que el promotor *TK1a* indujo la expresión del transgen principalmente en la zona del meristemo de la raíz. Desde 1h post-radiación (hpr) se incrementó discretamente la expresión del transgen en la raíz y en tiempos posteriores (3 y 6hpr), los niveles fueron mayores. A las 12 hpr se detectó mayor actividad de GUS, pero a las 24h la actividad disminuyó (Figura 25).

En contraste, el promotor *TK1b* no indujo la expresión del transgen *GUS* en la zona del meristemo de la raíz primaria después del tratamiento con luz UV-C en ninguno de los tiempos evaluados, solamente se observó un tenue incremento de la actividad de GUS por encima de la zona del meristemo a las 12 y 24 hpr (Figura 25).

Estos resultados indicaron que hay una expresión diferencial de ambos genes en respuesta a luz UV-C y que la transcripción del gen *TK1a* se indujo principalmente en células meristemáticas de la raíz primaria, aunque la inducción se observó en toda la raíz.

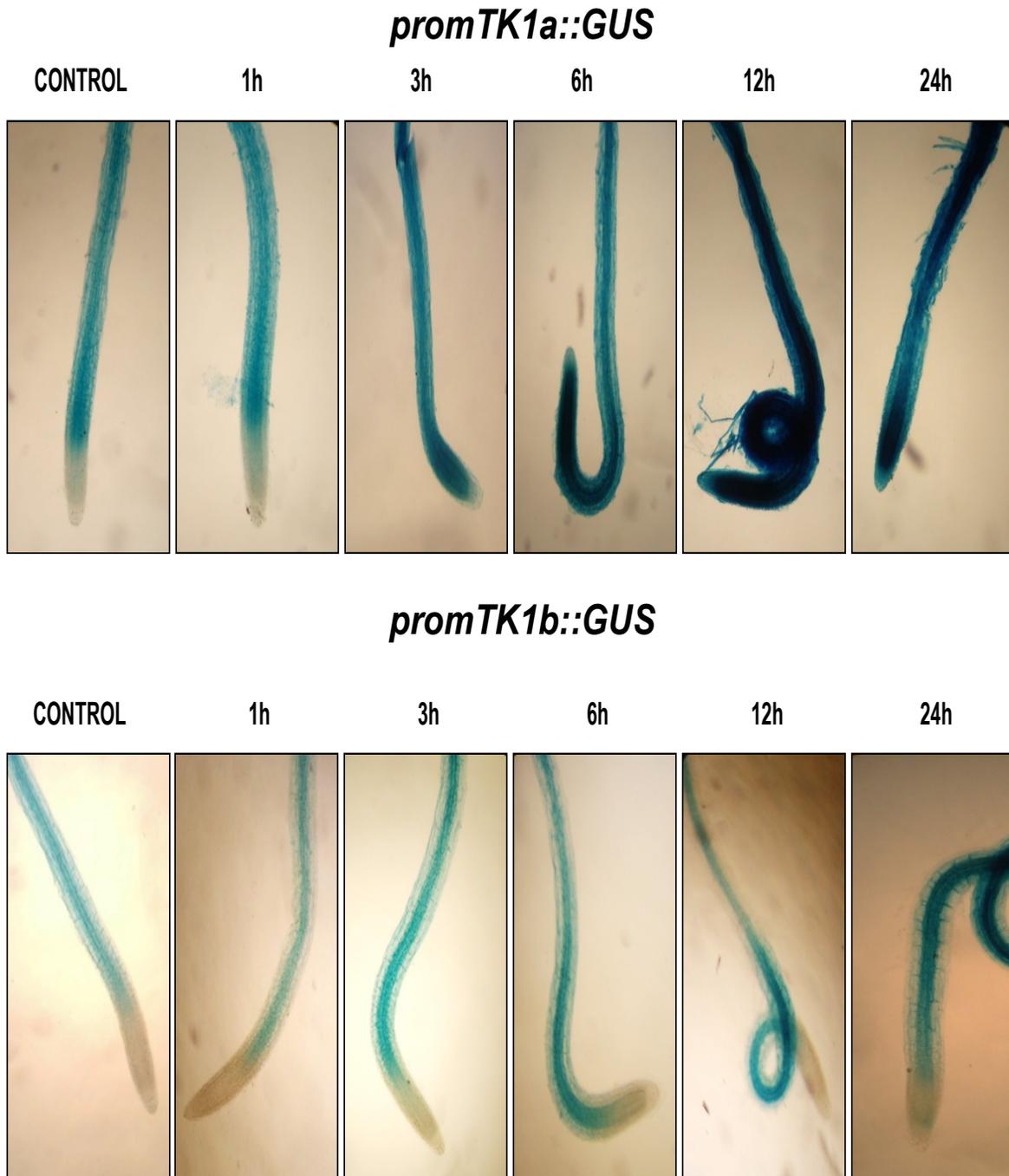


Figura 25. Efecto de la exposición a luz UV-C en la expresión de *promTK1a::GUS* y *promTK1b::GUS*. El panel superior muestra el patrón de expresión de *promTK1a::GUS* y el inferior muestra el de *promTK1b::GUS* de plántulas de 4 días irradiadas con luz UV-C (λ 254nm) durante 6 min y mantenidas en oscuridad después del tratamiento durante los tiempos indicados antes de realizar la tinción histoquímica. Las plantas control no se sometieron al tratamiento con luz UV-C. Experimento realizado con plántulas T3 de tres líneas independientes.

4.2.3 Control positivo de daño al DNA.

Como control positivo de daño al DNA se empleó la inducción de la expresión del gen *GUS* dirigida por el promotor del gen de la ciclina B1:1 (línea marcadora *CycB1;1DB::GUS*). La ciclina B1:1 es específica de la fase G2 del ciclo celular y su expresión se incrementa en respuesta a daño inducido por cualquier agente genotóxico (Colón-Carmona *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003; Planchais *et al.*, 2005), aunque su función en respuesta a daño aun no es muy clara. Las plántulas de 4 días de dicha línea marcadora se transfirieron a los medios suplementados con los compuestos MMC, zeocina o se irradiaron con luz UV-C, el incremento de la expresión de *GUS* bajo el control del promotor de la ciclina B1:1 después del tratamiento con estos agentes se muestra en la Figura 26 donde claramente se observa el incremento en la expresión de *GUS* por arriba de la zona del meristemo. Esta línea transgénica fue proporcionada por la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez.

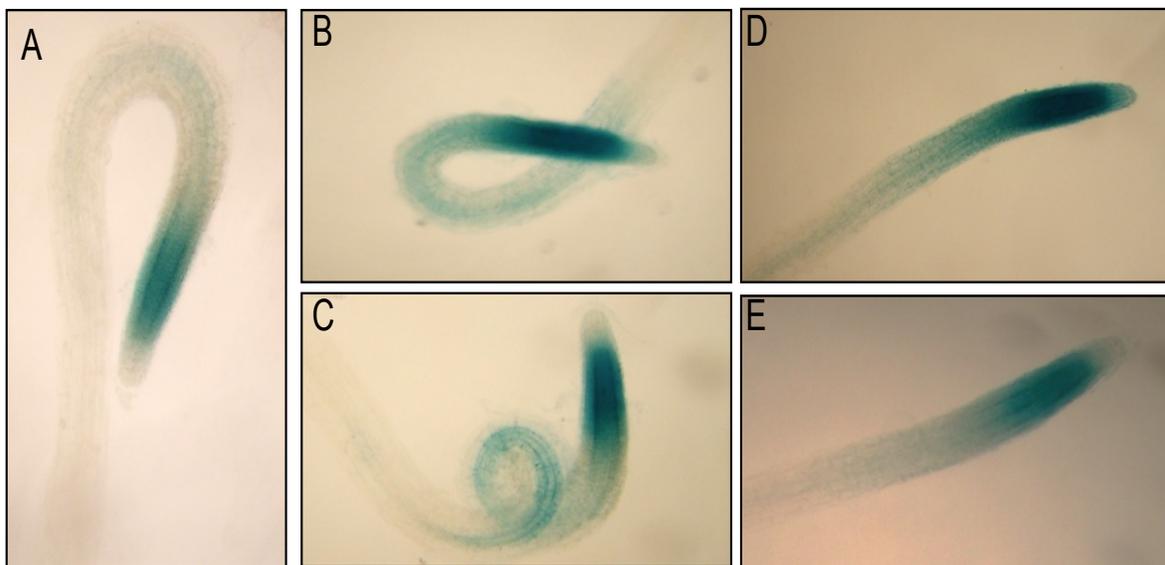


Figura 26. Expresión de *pCycB1:1DB::GUS* en respuesta a daño genotóxico. A) Control sin tratamiento. B) Tinción histoquímica 6h después del tratamiento con UV-C. C) Tinción histoquímica 12h después del tratamiento con UV-C. D) Tinción histoquímica a las 6h de exposición con zeocina (10 μ M). E) Tinción histoquímica a las 6h de exposición con MMC (25 μ M). Se muestran raíces de plántulas de 4 días. Experimento realizado con plántulas homocigotas.



4.3 Expresión de los genes *TK1* en las células del meristemo de raíz.

Para estudiar la expresión de los genes *TKs* de *A. thaliana* específicamente en las células del meristemo de la raíz se utilizaron las plantas transgénicas con las construcciones *promTK1a::GFP* y *promTK1b::GFP*. Para detectar la fluorescencia de la proteína reportera GFP se empleó microscopía confocal y a la par las raíces se tiñeron con yoduro de propidio, lo que permitió observar a detalle la estructura de las diferentes capas de células que se encuentran en esta región. En la Figura 27 se presentan imágenes representativas de microscopía confocal de las fluorescencias de GFP y yoduro de propidio sobrepuestas, así como las imágenes que muestran sólo la fluorescencia de GFP. En los ápices de raíces de las plantas transgénicas *promTK1a::GFP* que no fueron sometidas a estrés genotóxico la señal de fluorescencia de la proteína reportera es muy baja, pero se induce ligeramente con luz UV-C 6h después del tratamiento, observándose fluorescencia en células de la capa de la endodermis (Figura 27, indicado con una flecha).

Cuando las plántulas fueron expuestas a MMC o zeocina por 6h, la señal de GFP se incrementó considerablemente en diferentes capas de las células del meristemo, incluyendo a las células iniciales. Aunque la expresión de GFP se observó mayormente en la capa de la epidermis y en la zona vascular de la raíz.

Cabe mencionar que con los tiempos y tratamientos mencionados arriba no se logró detectar fluorescencia de la proteína GFP en las plantas transgénicas transformadas con la construcción *promTK1b::GFP*. Lo que corroboró lo observado con el gen reportero GUS.

Estas observaciones son preliminares y para determinar a detalle cómo cambia la expresión de los genes de timidina cinasa en esta zona de la raíz, será necesario hacer un análisis más detallado evaluando la expresión de GFP en más tiempos de tratamiento con MMC y zeocina, y más tiempos post-radiación con luz UV-C.

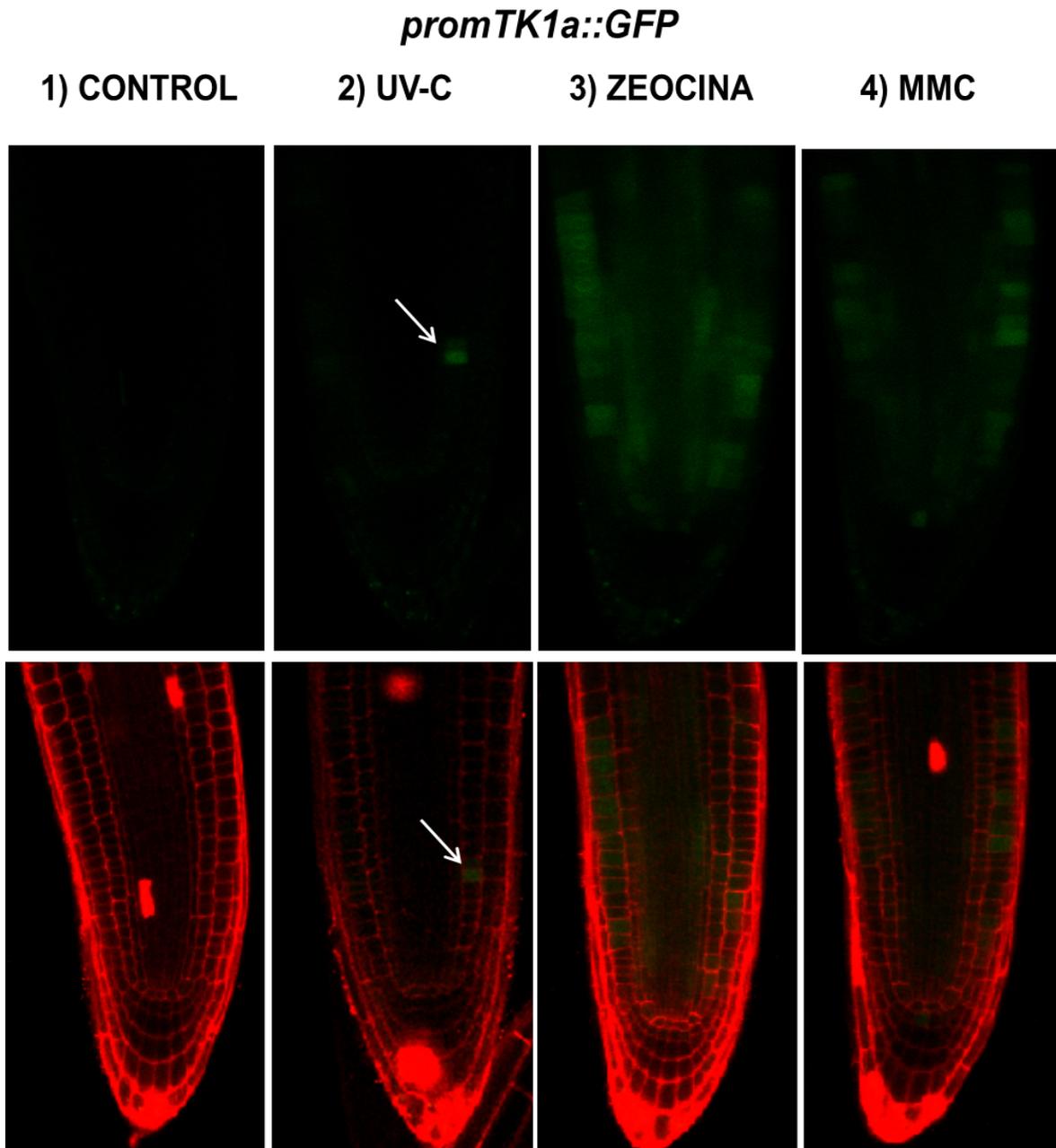


Figura 27. Expresión de *promTK1a::GFP* en células del meristemo de la raíz primaria en respuesta a estrés genotóxico. Se muestran raíces de plántulas de 4 días teñidas con yoduro de propidio y la fluorescencia de GFP. Los paneles superiores muestran sólo la fluorescencia emitida por GFP y los inferiores las fluorescencias emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y GFP (verde) superpuestas. 1) Raíces sin tratamiento son consideradas los controles, 2) Plántulas irradiadas con luz UV-C (λ 254nm) durante 6 min y mantenidas en oscuridad por 6h antes de su observación al microscopio, 3) Plántulas tratadas con MMC (25 μ M) y 4) zeocina (10 μ M) durante 6h antes de la observación al microscopio. Experimento realizado con plántulas T3 de tres líneas independientes.

4.4 Determinación de los niveles de transcrito de los genes *TK1* en respuesta a radiación UV-C.

4.4.1 Niveles basales de transcrito de los genes *TK1a* y *TK1b* en las mutantes de T-DNA en plántulas de 7 días.

Los niveles de transcrito de los genes *TK1a* y *TK1b* se cuantificaron mediante la técnica de RT-qPCR, con el propósito de conocer sus niveles en las líneas *oetk1a* y *mtk1b* con respecto a la línea tipo silvestre en los estadios de desarrollo en que se hicieron los estudios. En plántulas de 7 días se encontró que la línea *oetk1a* tiene 37% más cantidad de transcrito *TK1a* con respecto a la línea tipo silvestre (Figura 28A). Por su parte, la línea *mtk1b* presentó una disminución del 80% del transcrito *TK1b* con respecto a la línea tipo silvestre (Figura 28B).

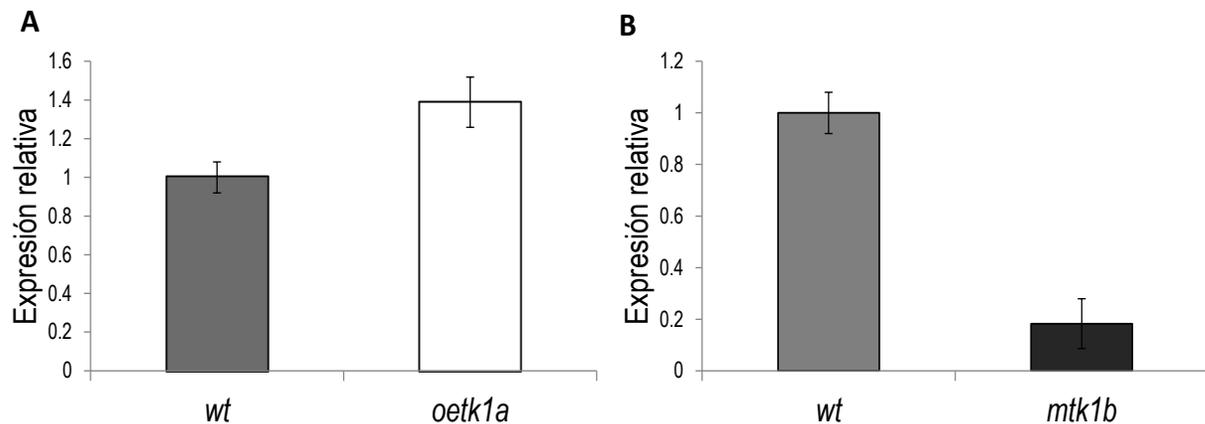


Figura 28. Niveles de expresión del transcrito *TK1a* en la línea *oetk1a* y del transcrito *TK1b* en la línea mutante *mtk1b*. (A) Nivel de RNAm del gen *TK1a* en plántulas de 7 días tipo silvestre y la mutante *oetk1a*, (B) Nivel de RNAm del gen *TK1b* en plántulas de 7 días tipo silvestre y la mutante *mtk1b*. Los datos están expresados como la media relativa tomando como la unidad de expresión el nivel de transcrito en la línea silvestre. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de tres muestras independientes ($n = 3$).

4.4.2 Cuantificación de los niveles de transcrito *TK1a* en plántulas de 7 días irradiadas con luz UV-C.

Se determinaron los niveles de transcrito del gen *TK1a* en plántulas tipo silvestre y *oetk1a* a las 0, 1, 3, 6 y 12 hpr. Después de la irradiación las plántulas se mantuvieron en oscuridad hasta la toma de la muestra para evitar la fotoreactivación.

En la Figura 29 se observa que el nivel de RNAm del gen *TK1a* en el tiempo cero fue de aproximadamente 35% más alto en las plántulas mutantes que en la línea tipo silvestre. Al irradiar con luz UV aumentaron los niveles del RNAm desde 1 hpr, observándose un incremento de éste de alrededor de 3 veces en la línea *oetk1a*, mientras que en la tipo silvestre fue solamente de un 40%. A las 3, 6 y 12 hpr el patrón de acumulación del transcrito fue similar para ambas líneas. Cabe señalar que el nivel de transcrito *TK1a* se incrementó más de 6 veces respecto al control sin tratar a las 12 hpr con luz UV-C.

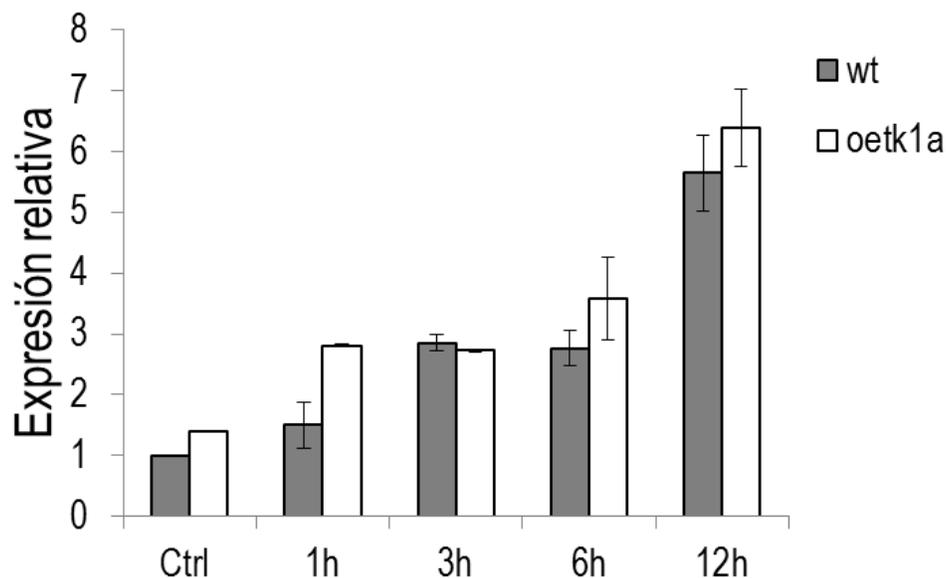


Figura 29. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de transcrito del gen *TK1a* en plántulas de 7 días, tanto en la línea silvestre como en *oetk1a*. Los datos están expresados como la media relativa tomando como la unidad de expresión el nivel de transcrito del tiempo cero de la línea silvestre. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de tres experimentos ($n = 3$).

4.4.3 Cuantificación de los niveles de transcrito TK1b en plántulas de 7 días irradiadas con luz UV-C.

Como ya se ha descrito (Figura 28), la línea *mtk1b* presenta una disminución en el nivel de transcrito correspondiente de alrededor del 80% con respecto a la línea tipo silvestre, esto se corroboró también con estos experimentos. Una diferencia relevante entre los dos genes fue su patrón de expresión, ya que el gen *AtTK1b* no mostró cambios en los niveles de transcrito después de irradiar con luz UV-C (Figura 30). Cabe mencionar que los niveles de transcrito en plántulas pequeñas, del gen *TK1b* son alrededor de 10 veces menores que los del gen *TK1a*, mientras que en hojas de roseta de plantas adultas de 4 semanas los niveles de transcritos de ambos genes son altos y muy similares (Atlas de expresión de *Arabidopsis*).

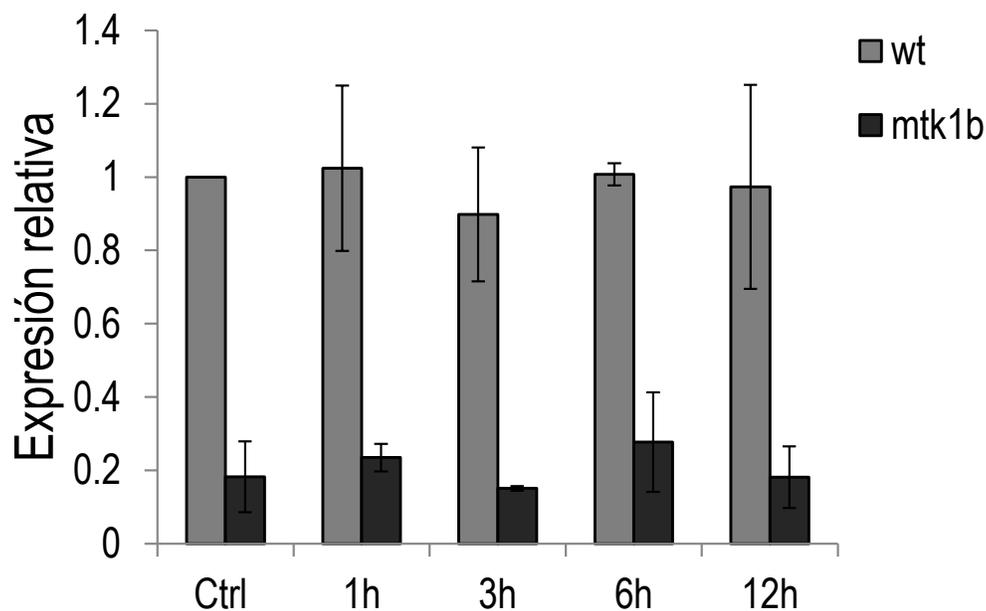


Figura 30. Efecto de la irradiación UV-C en el nivel de transcrito del gen *TK1b* en plántulas de 7 días, tanto en la línea silvestre como en *mtk1b*. Los datos están expresados como la media relativa tomando como la unidad de expresión el nivel de transcrito del tiempo cero de la línea silvestre. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de tres experimentos ($n = 3$).

4.4.4 Niveles del transcrito *TK1a* en plantas tipo silvestre (*wt*) y sobre-expresoras (*oetk1a*) en hojas maduras de roseta.

Debido que cuando se caracterizó por primera vez a la mutante *oetk1a* por ensayos de RT-PCR semicuantitativo mostraron que la expresión del gen *TK1a* era significativamente mayor en hojas de la mutante que en la línea tipo silvestre (Figura 19C), lo que no sucede en plántulas completas de siete días en las que el incremento del RNAm de *TK1a* en la línea *oetk1a* fue solamente del 37% (Figura 28A), también se estudiaron los niveles del transcrito *TK1a* en hojas de roseta de plantas de 6 semanas por RT-qPCR. Con este análisis se corroboraron los resultados obtenidos por los ensayos semicuantitativos. Es decir, el nivel de transcrito *TK1a* es tres veces mayor en la línea *oetk1a* en comparación con la tipo silvestre (Figura 31) en condiciones basales (sin tratamiento genotóxico). También se observó que en hojas de roseta de este estadio, el transcrito de *TK1a* es inducido por el tratamiento con luz UV-C en ambas líneas (Figura 31).

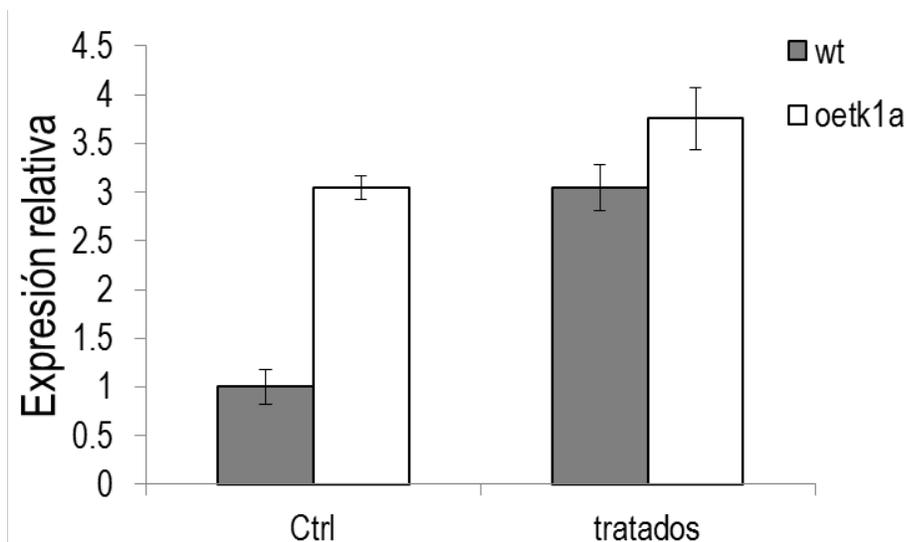


Figura 31. Niveles de expresión de *TK1a* en las líneas *oetk1a* en hojas de roseta de plantas de 6 semanas. Las barras control son los niveles basales del transcrito en cada línea y las barras de tratados corresponden a hojas de plantas después de 6h del tratamiento con luz UV-C. Los datos están expresados como la media relativa tomando como la unidad de expresión el nivel de transcrito del tiempo cero de la línea silvestre. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de dos experimentos ($n = 2$).



4.5 Determinación de la actividad enzimática de TK en respuesta a luz UV-C.

Con el fin de asociar los patrones de expresión observados de los genes *TK1a* y *TK1b*, con el fenotipo de las mutantes y la actividad enzimática de la TK, la actividad de esta enzima se evaluó en plántulas de *A. thaliana* de 7 días de las 3 líneas bajo estudio (tipo silvestre y las mutantes *oetk1a* y *mtk1b*) tanto en condiciones basales, como en respuesta al tratamiento con luz UV-C.

4.5.1 Estandarización del método para determinar la actividad enzimática de TK en *Arabidopsis thaliana*.

Primero se evaluó el efecto de la concentración de la enzima en la velocidad enzimática, con el objetivo de determinar la relación entre la velocidad inicial y la cantidad de proteína presente en el extracto proteico. En la Figura 32A se muestra que se detectó una velocidad enzimática apreciable, aún con cantidades bajas de proteína (50 μg). Además, se observó una relación lineal entre la velocidad y la cantidad de proteína. Este experimento permitió establecer el uso de 150 μg de proteína total, para las determinaciones subsecuentes., hecho que resultó conveniente por el tipo de muestra (plántulas de 7 días).

La linealidad de la reacción con respecto al tiempo se determinó en un periodo de 5 horas, observándose muy baja actividad en los primeros tiempos, así como una relación lineal entre los 60 y los 120 min. A tiempos más largos de la reacción, la actividad comenzó a disminuir (Figura 32B). Este ensayo permitió establecer un tiempo de reacción de 90 min como adecuado para cuantificar los cambios de actividad.

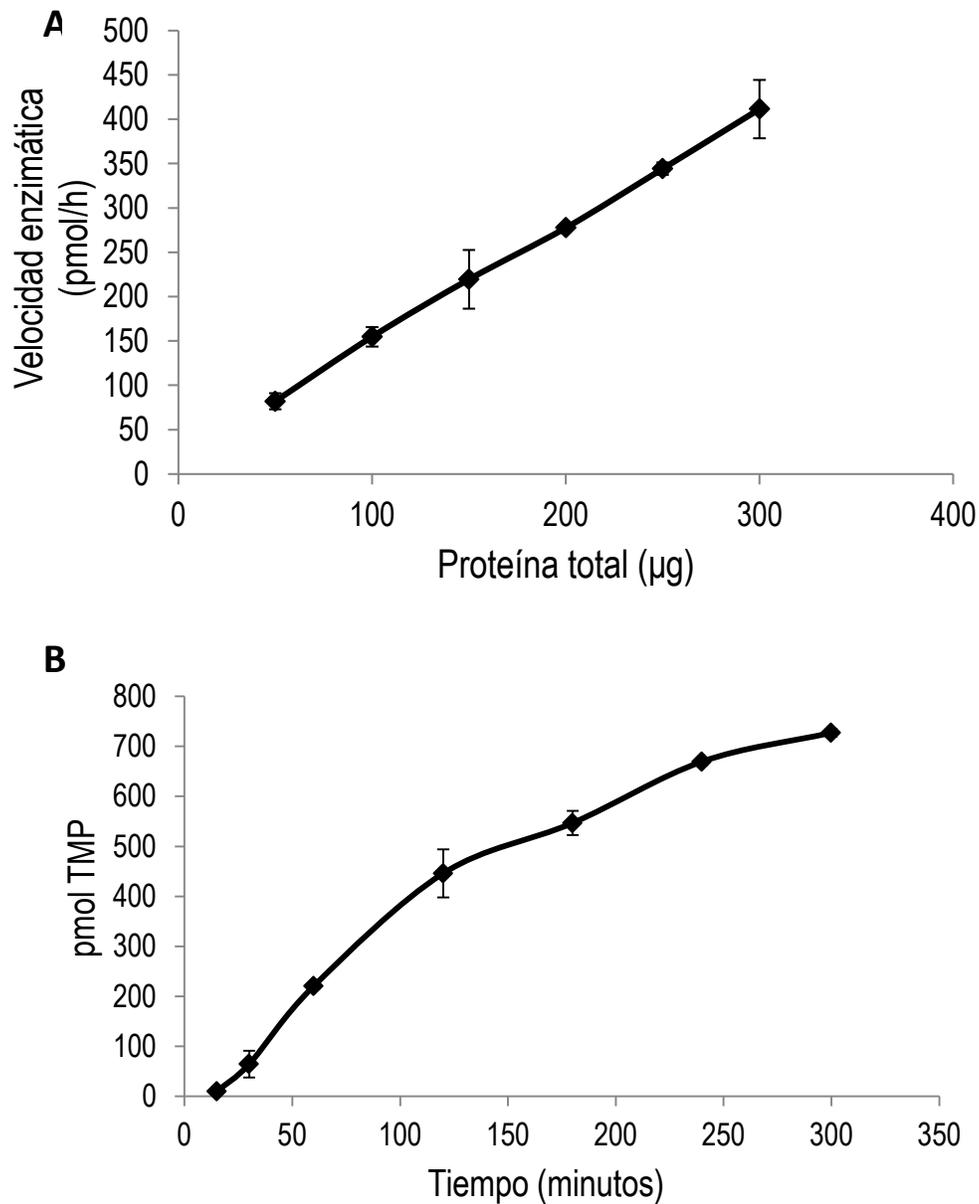


Figura 32. Efecto de la concentración de la enzima TK1 y curso de la reacción con respecto al tiempo. (A) Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática. El tiempo de reacción fue de 2 horas. (B) Curso temporal de la reacción catalizada por la TK1. La concentración de proteína total fue de 150 μg . La concentración de ATP, Mg^{2+} y $[\text{}^3\text{H}]\text{-Thd}$ es la indicada en *Materiales y métodos*. Los datos mostrados son la media y desviación estándar de 3 réplicas independientes.

En resumen las condiciones que resultaron óptimas para determinar la actividad enzimática de TK en plántulas de *A. thaliana* de 7 días fueron: temperatura de 37°C, cantidad de proteína total 150 μg y tiempo de la reacción de 90 minutos.

4.5.2 Estandarización del tiempo de exposición a luz UV-C para afectar la actividad de TK.

Por otra parte, se evaluó el efecto de exposición a luz UV-C por diferentes tiempos sobre la actividad de TK1. El ensayo se realizó con plántulas de 7 días que posteriormente al tratamiento se incubaron en oscuridad por 3 horas (tiempo donde en ensayos preliminares se observó una mayor actividad de TK1 después del tratamiento con UV-C). A partir de los 6 min de exposición la actividad de TK1 incrementó alrededor del 40% con respecto al extracto del tejido sin tratar. Como con tiempos de irradiación más prolongados la actividad prácticamente no aumentó (Figura 33), se decidió utilizar el tiempo de 6 min de irradiación para los siguientes ensayos.

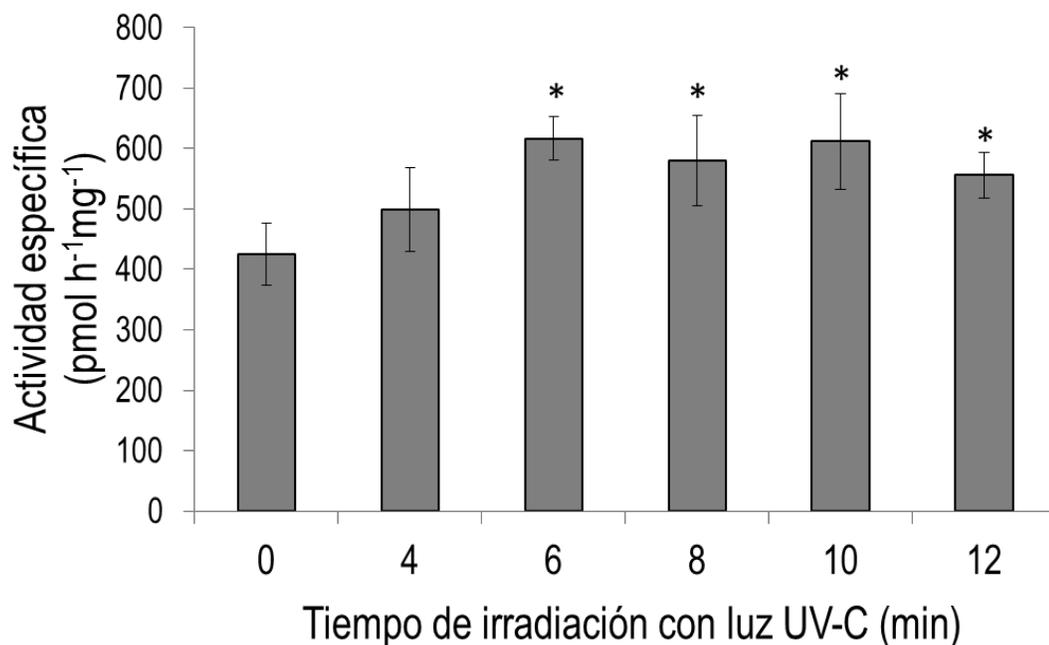


Figura 33. Efecto del tiempo de exposición a luz UV-C sobre la actividad de TK1 en plántulas tipo silvestre (wt) de 7 días. Experimento realizado sobre plantas tipo silvestre de 7 días. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control (tiempo 0) con un análisis de t-student. Los datos mostrados son la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes.

4.5.3 Determinación de la actividad de TK en líneas mutantes (*oetk1a* y *mtk1b*) y tipo silvestre, en condiciones basales como en respuesta a irradiación UV-C.

El efecto de la radiación UV-C sobre la actividad de TK1 también se evaluó sobre las líneas mutantes bajo estudio. Después del tratamiento de irradiación las plántulas de 7 días se incubaron en oscuridad por 1, 3, 6 y 12h, antes de medir la actividad enzimática.

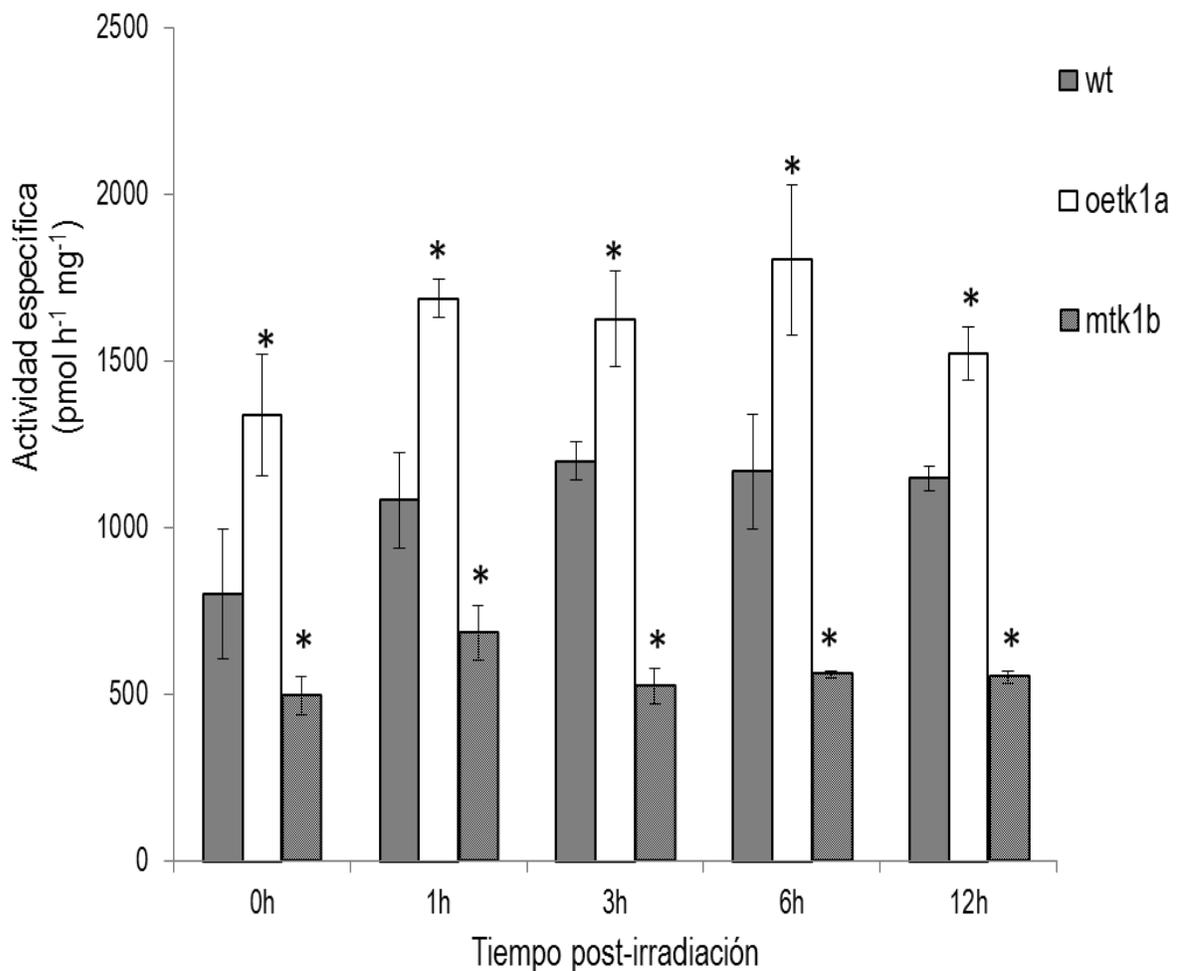


Figura 34. Efecto de la exposición a luz UV-C sobre la actividad de TK1 en plántulas mutantes y tipo silvestre de 7 días. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a la muestra tipo silvestre en el mismo tiempo con un análisis de t-student (entre las muestras tipo silvestre con cada mutante) .Los datos mostrados son la media y desviación de 3 experimentos independientes.



La actividad basal (tiempo 0h) de TK1 fue aproximadamente 40% mayor en plántulas de la línea *oetk1a* en comparación a la silvestre y 250% mayor que la de *mtk1b*. En los tiempos analizados, la actividad de TK incrementó ligeramente en las líneas *oetk1a* y tipo silvestre a partir de 1h y este incremento se mantuvo constante hasta las 12h post-irradiación. Asimismo, la actividad de TK1 fue más alta en la línea *oetk1a* con respecto a las líneas tipo silvestre y *mtk1b* para todos los tiempos evaluados. Por su parte, la actividad de TK1 en plántulas *mtk1b* irradiadas no presentaron cambios significativos con respecto a los valores basales, que siempre fueron menores a lo de las otras dos líneas (Figura 34).



DISCUSIÓN

1. *AtTK1a* y *AtTK1b* se expresan a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

La estructura de los genes *AtTK1a* y *AtTK1b* difiere significativamente, mientras el gen *TK1b* está formado por un exón, el parólogo *TK1a* presenta 4 exones y 3 intrones (Figura 10). Estas diferencias en la estructura del gen sugieren que la duplicación génica no ocurrió recientemente (Clausen *et al.*, 2012). Se puede suponer que ocurrió la inserción de intrones en el gen *AtTK1a* o bien eliminación de éstos en el gen *AtTK1b* después de la duplicación, e información de esto se podría inferir a través de un análisis detallado de estos genes en otras especies vegetales. Otras diferencias entre los genes *AtTK1* son la longitud de las regiones 3' y 5'UTRs, que podría tener un significado biológico afectando la regulación de su expresión, como se ha demostrado que ocurre en otros genes de plantas (Gallie, 1993). Otra diferencia importante es que el gen *TK1b* codifica una proteína con una secuencia potencial de tránsito al cloroplasto en su extremo amino. Otros genes TKs en plantas también muestran esta característica; el genoma de maíz contiene sólo un gen *TK1* y la proteína que codifica también presenta una secuencia potencial de tránsito al cloroplasto en su extremo amino (Suzuri, 2006). Aunque se han obtenido datos de enzimas participantes en la vía de salvamento de pirimidinas que indican que las reacciones de esta vía pueden ocurrir tanto en el citosol como en los plastidios (Zrenner *et al.*, 2006), sin embargo, en ningún caso se ha demostrado experimentalmente su localización subcelular. En *Arabidopsis*, se ha postulado que la *TK1a* se encuentra en el citosol y que la *TK1b* está localizada tanto en el cloroplasto como en la mitocondria (Clausen *et al.*, 2012). En el laboratorio contamos con fusiones traduccionales *TK1a-GFP* y *TK1b-GFP* que pronto permitirán resolver esta controversia. Dada la importancia de los mecanismos de regulación transcripcional en la expresión y en la subsecuente actividad de la timidina cinasa en mamíferos (Mikulits *et al.*, 1996; Rotheneder *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 1999), se hizo un análisis comparativo *in silico* de las secuencias promotoras de los genes *TK1a* y *TK1b*, que reveló que comparten



pocos elementos reguladores. Entre los elementos en común, se tienen los que regulan la expresión en tejido específico como en flores y polen (Tabla 8). Por su parte, aquellos que posiblemente regulan respuestas a diferentes tipos de estrés, fueron muy distintos entre ambos promotores (Tabla 9 y 10). Todas estas diferencias sugirieron que los genes *TK1a* y *TK1b* pueden tener una función y un patrón de expresión diferencial.

Al evaluar la expresión de GUS bajo el control de las regiones promotoras de los genes *TK1a* y *TK1b* en diferentes estadios de desarrollo, se observó expresión de ambos genes en diversas etapas del desarrollo y órganos durante todo el crecimiento vegetativo. Estos datos coinciden con estudios de microarreglos reportados en el Atlas de expresión de *Arabidopsis* que muestran que ambos genes se transcriben durante todos los estadios de desarrollo de la planta, sin embargo, el gen *TK1a* presenta mayores niveles de expresión (Schmid *et al.*, 2005). Asimismo, estos resultados indicaron que las TK1s de *Arabidopsis* no son reguladas por el ciclo celular como sucede con la de mamíferos, cuya expresión está asociada con tejido proliferativo porque está confinada a la fase S del ciclo celular (Mikulits *et al.*, 1996). En contraste, a las 48h de crecimiento la actividad de GUS fue muy baja en el meristemo de la raíz de plántulas *promTK1a::GUS* y nula en las plántulas *promTK1b::GUS* (Figura 15B y 15F). Este resultado es consistente con lo reportado acerca de la transcripción del gen de la TK1 de arroz, ya que la expresión de este no correlacionó con la actividad del ciclo celular, pues se encontraron altos niveles de RNAm en tejidos diferenciados como en hoja pero no se encontraron en tejido meristemático (Ullah *et al.*, 1999). De igual forma en maíz la actividad enzimática de TK1 es muy baja en meristemas de raíces (Suzuri, 2006, Yoval-Sánchez, 2008).

En la secuencia del promotor *TK1a* se encontró un elemento canónico de reconocimiento para el factor transcripcional E2F el cual se encuentra en genes de *Arabidopsis* que están involucrados en la replicación del DNA, la regulación del ciclo celular, transcripción, respuesta de defensa y señalización (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). Este elemento regulador parece ser funcional, pues en plantas de



Arabidopsis que sobre-expresan el factor transcripcional E2F, la transcripción del gen *TK1a* se incrementa alrededor de 15 veces con respecto a las plantas control (Vandepoele *et al.*, 2005). Al parecer la regulación por E2F en este promotor no está asociada a controlar la transcripción en la fase S del ciclo celular, como sucede con la TK1 de mamíferos (Rotheneder *et al.*, 1999). Sin embargo, este mismo factor transcripcional regula la expresión del gen de la subunidad 1b de la ribonucleótido reductasa (RNR1b) en tabaco, enzima clave para la síntesis de nucleótidos en la vía *de novo*. Mediante este mecanismo regulatorio la RNR1b se expresa específicamente en la fase S del ciclo celular y como consecuencia se halla expresión específica en tejido meristemático (Chabouté *et al.*, 2002). De igual forma, la expresión de la subunidad pequeña TSO2 de la RNR de *Arabidopsis* es controlada por el ciclo celular y mutantes de este gen presentan defectos en el meristemo apical del brote (Wang & Liu, 2006). Todos estos datos sugieren que la síntesis de nucleótidos de pirimidinas en tejido meristemático depende principalmente de la síntesis *de novo*.

Sin embargo, durante la germinación nuestros datos apoyan la participación de la vía de salvamento, pues en las primeras 24h se observó intensa actividad de GUS en la semilla completa en la que comienza a protruir la radícula (Figura 15A y 15E). Esto coincide con datos en *Picea glauca*, *Zea mays* y *Arabidopsis*, donde se ha demostrado que en las primeras horas de desarrollo se requiere la participación de la vía de salvamento de nucleótidos de uridina (Kafer *et al.*, 2004; Mainguet *et al.*, 2009). De hecho, durante la fase 1 de la germinación de la semilla ocurre una alta actividad enzimática de las reacciones de salvamento de pirimidinas, las cuales se mantienen a lo largo de todo el proceso de germinación (Kafer *et al.*, 2004). En estadios más tardíos se induce también la vía *de novo* dejando el salvamento de pirimidinas en un segundo plano (Stasolla *et al.*, 2003). Asimismo, durante la fase de división celular en cultivos celulares, la síntesis de nucleótidos es mediada principalmente por la vía *de novo* (Zrenner *et al.*, 2006).

Por otra parte, la expresión de los 2 genes *TK1* se encontró en tejidos reproductivos florales como las anteras y el polen, durante esta etapa del



desarrollo se requiere una activa síntesis de nucleótidos (Kafer *et al.*, 2004). Estos resultados son consistentes con la presencia de elementos *cis* localizados en las regiones promotoras, que regulan la expresión de genes en estos tejidos (Tabla 8). Tal es el caso de la caja CArG (AP1) que permite la expresión del gen *APETALA3* en flores de *Arabidopsis*. La expresión de ambos genes también se observó en el primordio de las raíces secundarias, se ha encontrado que el salvamento de pirimidinas es esencial durante la formación del primordio de brote de la planta y en general en la organogénesis, aunque estos ensayos solamente se han realizado *in vitro* (Stasolla *et al.*, 2003). No obstante al estar formado el meristemo de éstas, no se observó actividad de la proteína reportera como en la raíz primaria.

Ambos promotores condujeron la expresión del gen reportero en tricomas, que son células especializadas que llevan varios ciclos de endoreduplicación del material genético, por lo requieren una alta demanda de nucleótidos (Bramsiepe *et al.*, 2010). También se encontró expresión en las estípulas e hidátodos, aunque la función de estas estructuras no ha sido establecida a detalle.

En los tejidos donde se observó expresión diferencial de ambos promotores fue en hojas caulinares, hojas de roseta de 6 semanas, tallos y en las cubiertas de silicuas secas, donde sólo fue activo el promotor *TK1a*. La expresión en hojas caulinares y hojas de roseta madura del gen *TK1a* se puede asociarse a que en ambos tejidos comúnmente ocurre la endoduplicación, que es una característica en tejido diferenciado (Li *et al.*, 2012). Lo mismo puede pensarse de la expresión de *TK1a* en tallo. En hojas senescentes de *Arabidopsis* se encuentra una alta actividad de las proteínas de salvamento, mientras que la síntesis de la vía *de novo* de pirimidinas disminuye (Stasolla *et al.*, 2003). Estos resultados correlacionan con lo anotado en el Atlas de expresión de *Arabidopsis* (Schmid *et al.*, 2005), donde se reporta expresión mucho más alta del gen *TK1a*, en comparación con la del gen *TK1b* en todos estos tejidos. Mientras tanto durante el desarrollo de las hojas de la roseta ambos genes presentaron patrones de



expresión parecidos a los 17 y 28 días del desarrollo de la planta, lo cual también fue consistente con lo previamente reportado.

Es interesante notar que no se observó actividad de ninguno de los promotores durante la embriogénesis, sin embargo, esto corroboró lo reportado acerca de que alrededor del 80% de nucleótidos durante el proceso embriogénico de embriones somáticos de abeto blanco (*Picea glauca*), son sintetizados por la vía *de novo* (Stasolla *et al.*, 2003).

La gran mayoría de los estudios realizados para elucidar la función de la timidina cinasa en eucariontes superiores se han hecho en líneas celulares, por lo que resulta de gran relevancia el estudio en un organismo completo. Es por esto que mutantes de la TK1 de *A. thaliana* resultan ser una poderosa herramienta para lograr este propósito. El único estudio similar se hizo en mamíferos con ratones Knockout (TK1^{-/-}), donde se demostró que la enzima es indispensable para el adecuado desarrollo de los animales (Dobrovolsky *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* se han caracterizado mutantes nulas para cada gen durante el desarrollo, las mutantes simples no muestran diferencias fenotípicas en comparación a las plantas silvestres, sin embargo, la doble mutante muere en estadio de plántula (Clausen *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que ambas proteínas catalizan reacciones redundantes y que la actividad de TK1 es esencial durante el desarrollo.

2. El gen *TK1a* de *A. thaliana* participa en varias vías de respuesta a estrés genotóxico.

Estudios previos del laboratorio demostraron que las plantas de líneas mutantes para *TK1a* (*oetk1a*) y *TK1b* (*mtk1b*) (Figura 14) no presentaron diferencias fenotípicas durante el desarrollo con respecto a las plantas tipo silvestre bajo condiciones estándares de crecimiento. No obstante, las mutantes presentaron diferencias en sus niveles de transcrito, la línea *oetk1a* resultó ser una línea de sobreexpresión (Figura 28A y 31), posiblemente debido a que la inserción de T-DNA se encuentra en la región promotora eliminando alguna secuencia de



regulación negativa del gen. Por su parte, la mutante *mtk1b*, contiene la inserción de T-DNA cerca del codón de término por lo que se esperaría obtener un RNAm con menor estabilidad, los niveles de transcrito de este gen disminuyeron alrededor del 80% en comparación a la línea tipo silvestre (Figura 28). Estas diferencias en los niveles de expresión, nos permitieron evaluar la participación de ambos genes en la reparación al daño a DNA inducido por los agentes genotóxicos: zeocina (productora de DSBs), mitomicina C (entrecruzador del DNA) y luz UV-C (productor de dímeros de timidina). Aún cuando estas lesiones se reparan por mecanismos distintos, requieren polimerización de DNA, y por lo tanto el aporte de nucleótidos es fundamental.

Las plántulas *oetk1a* mostraron mayor tolerancia a la exposición de las genotoxinas productoras de DSBs y formadoras de aductos, ya que su porcentaje de sobrevivencia (Tabla 11) y peso fresco (Tabla 22) fueron 20% mayores en comparación a la línea tipo silvestre, además se observó un mayor desarrollo del tejido aéreo (Figura 21). Consistente con estos resultados, las plántulas *oetk1a* también fueron más tolerantes a UV-C, ya que la inhibición en el crecimiento de su raíz fue menor en comparación a la tipo silvestre y en un trabajo previo del laboratorio se demostró que el tratamiento no reduce el tamaño del meristemo drásticamente como sucede en raíces de plantas tipo silvestre (Pedroza-García, 2011).

El retraso en el crecimiento de las plántulas y raíces se puede explicar debido a que el daño al DNA desencadena el arresto del ciclo celular en los puntos de regulación, por lo que la división celular se detiene hasta que el daño es reparado o debido a que se desencadena la muerte celular. En células de mamífero el arresto del ciclo celular, en el cual participa la TK1, ocurre en la transición G1/S (Chen *et al.*, 2010). El hecho de contener niveles elevados de TK1a, podría tener como consecuencia una poza mayor de nucleótidos de timidina trifosfato o una síntesis más rápida de este precursor, lo que le estaría permitiendo a las plantas *oetk1a* realizar una reparación más eficiente del DNA dañado, facilitando que las células se liberen del arresto del ciclo celular antes que las plantas tipo silvestre, y



el tejido puede continuar con su desarrollo y división. Lo que sugiere que la enzima TK1a puede tener un papel fundamental en los mecanismos de reparación de daño que requieren síntesis de DNA o de sus precursores. A pesar que en plantas el mecanismo principal de reparación de DSBs es por NHEJ, que anteriormente se creía que no requería la síntesis de DNA, se ha reportado que frecuentemente proteínas de este mecanismo requieren que haya una homología discreta en la secuencia del sitio donde se localiza la ruptura de la cadena, aunado a lo anterior la aparición de inserciones de DNA en el sitio donde ocurrió el daño es indicativo de un proceso de reparación dependiente de la síntesis de DNA (Bray & West, 2005; Waterworth *et al.*, 2011). Asimismo, en mamíferos el complejo KU recluta polimerasas lo que sugiere que este mecanismo en estos organismos también depende de la síntesis de DNA (Lieber, 2012).

Se ha reportado que la reparación por escisión de nucleótidos depende de la síntesis *de novo* de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Esta dependencia se ha sustentado porque mutantes de *A. thaliana* deficientes en niveles de ribonucleótido reductasa, son más susceptibles a agentes genotóxicos que las plantas tipo silvestre (Wang & Liu, 2006; Roa *et al.*, 2009). Además, la expresión de la subunidad TSO2 de *Arabidopsis* es inducida por DSBs (Roa *et al.*, 2009). Estas evidencias junto con nuestros resultados sugieren que tanto la vía *de novo* como la vía de salvamento participan aportando nucleótidos para la reparación del daño a DNA.

Por su parte, la mutante de la TK1b (*mtk1b*), no presentó diferencias significativas con el genotipo tipo silvestre en respuesta a la exposición a estrés genotóxico. Aunque esta mutante tiene niveles menores de transcrito del gen *TK1b*, muy probablemente la TK1a que permanece sin cambios puede compensar la actividad de la TK1b, por lo que no muestra diferencias notables en los parámetros evaluados.



3. Los genes *TK1a* y *TK1b* se expresan de manera diferencial en respuesta a estrés genotóxico.

Para obtener mayor evidencia de la participación de los genes de la TK1 en respuesta a estrés genotóxico por zeocina o MMC, se emplearon las líneas transgénicas *promTK1(a o b)::GUS*.

En plántulas *promTK1a::GUS* expuestas a las genotoxinas zeocina o MMC, se observaron incrementos de la expresión del reportero a partir de 1h de exposición en ambos casos. Esta inducción se dio principalmente en la zona del meristemo de la raíz en tiempos cortos de exposición, sin embargo, el aumento de la expresión del gen fue dependiente del tiempo en que la plántula se sometió al estrés genotóxico y el incremento de expresión se presentó en toda la raíz en tiempos prolongados de exposición (Figura 23). Dicho resultado es consistente con un estudio del perfil del transcriptoma en *Arabidopsis*, donde se reportó que los niveles de transcrito del gen *TK1a* se elevan hasta 30 veces después del tratamiento con los agentes genotóxicos bleomicina y mitomicina C, el primero causa ruptura en el DNA, mientras que el segundo forma aductos con el DNA al actuar como un entrecruzador (Chen *et al.*, 2003; Kilian *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado que la inducción del gen *TK1a* es dependiente de la proteína ATM, ya que mutantes nulas para esta cinasa sensora del daño, no mostraron activación del gen *TK1a*, el cual incrementa su transcrito hasta 46 veces después de inducir DSBs por exposición a irradiación γ en plantas tipo silvestre. Mientras que el gen de la subunidad pequeña de la RNR incrementa su transcripción hasta 37 veces más después de dicho tratamiento (Culligan *et al.*, 2006). Esta información sugiere que el gen *TK1a* de *Arabidopsis* se regula en respuesta a daño a DNA muy similar a la TK1 humana (hTK1). Después de detectar el daño ATM fosforila a la proteína p53 que activará diferentes genes de reparación entre estos el de la TK1 humana (Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, no existe un homólogo a p53 en plantas pero se ha sugerido que esta función es realizada por la proteína supresora de respuesta gamma (SOG1), pues tanto p53 como SOG activan el “checkpoint” del ciclo celular



después del daño e inducen la transcripción de diferentes genes de reparación. Además, ambas son indispensables para desencadenar la muerte celular programada en respuesta a niveles altos de estrés genotóxico (Waterworth *et al.*, 2011). La proteína ATM aumenta la transcripción de la TK1a de *Arabidopsis* después de producir daño genotóxico y es probable que esta inducción sea dependiente de SOG1.

La expresión del gen *GUS* bajo el control del promotor *TK1b* se indujo en las raíces de las plantas expuestas a las genotoxinas zeocina y MMC en tiempos mayores de 24h y una expresión considerable en el meristemo de la raíz se observó hasta 48h de estar bajo estrés genotóxico (Figura 24). Este reporte es el primero en el que se asocia la inducción de la transcripción del gen *TK1b* de *Arabidopsis* en respuesta a daño al DNA ya que no hay publicaciones o datos de microarreglos que sugieran su activación por daño genotóxico. Esta inducción pudiera explicarse debido a la prolongada exposición a la genotoxina, que al ocasionar un daño constante y persistente la célula requiere activar todos los genes posibles que contribuyan de alguna forma a mantener la integridad del genoma. Otra alternativa es que la inducción tardía del gen *TK1b* se deba a un efecto adverso generado por el tratamiento que active su transcripción. Será difícil saber cuál de las hipótesis propuestas es la correcta, sin embargo, hasta el momento se puede mencionar que la transcripción del gen *TK1b* se induce por exposición prolongada a compuestos productores de la ruptura de la doble cadena de DNA como la zeocina y a compuestos que forman aductos con el DNA como el caso de la MMC.

Con el propósito de conocer cómo se regula la expresión de los genes de timidina cinasa de *Arabidopsis* al inducir otro tipo de daño al DNA. Se monitoreó la expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* en respuesta a radiación UV-C, para este propósito se emplearon las plantas transgénicas promotor TK1(a o b)::*GUS* y los niveles de transcrito de cada gen se determinaron por RT-qPCR.

Después del tratamiento de plántulas *promTK1a::GUS* con luz UV-C los niveles de expresión del reportero se incrementaron paulatinamente hasta alcanzar un



máximo a las 12h post-tratamiento (Figura 25), lo cual fue consistente con los niveles del transcrito TK1a evaluados por RT-qPCR (Figura 29). Sin embargo, lo más interesante es que en las primeras horas posteriores a la exposición, la inducción del gen se dio principalmente en la zona del meristemo de la raíz. Lo cual puede relacionarse con los fenotipos de la raíz de la línea *oetk1a*, cuyo crecimiento de la raíz primaria y en especial el tamaño del meristemo son más tolerantes a la exposición a luz UV-C (Pedroza-García, 2011). Se sabe que en tejidos meristemáticos participan mayoritariamente los mecanismos de NER, mientras que en tejidos no proliferativos es la fotoreactivación (Kimura *et al.*, 2004). Se ha sugerido que los meristemas de raíz y brote, presentan una respuesta especializada al daño ya que contienen un enriquecimiento en la expresión de genes de reparación de DNA como se determinó en un perfil de transcripción (Yadav *et al.*, 2009). Aunque la TK1a no se encuentra enriquecida basalmente en los meristemas, al parecer tiene un papel fundamental en los procesos de reparación en el meristemo de la raíz ya que la inducción de su expresión se da fuertemente en estas células después de inducir daño.

Acorde con lo anterior, la expresión específica en las células del meristemo de los genes de la TK1 fue analizada en plantas *promTK1(a o b)::GFP*. En raíces de plántulas *promTK1a::GFP* sin tratamiento se detectó una señal de GFP muy baja, mientras que con la exposición al compuesto productor de DSBs (zeocina) y al compuesto entrecruzador (MMC) se observó un aumento considerable de GFP en todas las capas celulares, incluyendo células iniciales (Figura 27). En el caso del tratamiento con UV-C, sólo se detectó a GFP en algunas células de la endodermis. Se ha reportado que las células del centro quiescente responden al daño genotóxico realizando un mayor número de divisiones para tratar de reemplazar a las células dañadas (Jiang & Feldman, 2005), por lo que será interesante hacer un estudio más detallado de cómo cambia la expresión del gen *TK1a* en los distintos tipos celulares que conforman el meristemo. Asimismo, las fusiones TK::GFP, permitirán determinar si la proteína TK1a se transloca al núcleo después de inducir daño como sucede con su homóloga humana (Chen *et al.*, 2010). Por otra parte, con el promotor *TK1b* no fue detectada la fluorescencia de



GFP en plantas controles ni en respuesta a estrés genotóxico por lo menos en las condiciones probadas.

Tanto en plántulas de la línea mutante *oetk1a* como de tipo silvestre, se realizó el perfil de expresión del gen *TK1a* post irradiación con luz UV-C, En este estudio se observó que los niveles del transcrito *TK1a* a las 3h post-irradiación en la línea tipo silvestre, son muy similares a los que alcanza la línea de sobreexpresión desde 1h después de la irradiación, que son casi el doble que alcanzan las plántulas tipo silvestre en el mismo tiempo. Esto sugiere que la mayor disponibilidad del RNAm después del estrés genotóxico en las plantas *oetk1a*, permite una mejor respuesta en los procesos de reparación del DNA dañado. Además, el aumento del transcrito en ambas líneas se continua hasta ser 6 veces más que el control 12h después de la radiación (Figura 29). Esto es consistente con lo observado con la actividad de GUS. En plantas se sabe que la cinasa sensora ATR identifica el daño que provoca estrés replicativo generado por dímeros de timidina o formación de aductos, desencadenando la activación transcripcional de diversos genes (González-Besteiro & Ulm, 2013), este mecanismo podría también activar la transcripción del gen *TK1a* en respuesta a este tipo de estrés genotóxico.

De la misma manera se estudió la expresión del gen *TK1b* en respuesta a estrés genotóxico inducido por luz UV-C, tanto en plántulas de la línea *mtk1b* como de la tipo silvestre. Para este gen no hubo cambios en los niveles de transcrito después de irradiar con UV-C (Figura 30) y la expresión de GUS bajo el control del promotor *TK1b* tampoco se incrementó después del tratamiento (Figura 25).

A pesar de que se lograron observar diferencias fenotípicas entre *oetk1a* y plántulas tipo silvestre en respuesta a estrés genotóxico, los niveles de sobre-expresión del gen *TK1a* en la línea mutante fueron solamente del 37% mayores, pero en trabajos previos se encontró que la sobre-expresión fue mayor en hojas maduras de roseta, en este trabajo se confirmó que la sobre-expresión en este último tejido fue 3 veces mayor que los niveles de hojas de plantas tipo silvestre. Esto nos permitirá evaluar la eficiencia de reparación en extractos de hojas en este estadio, lo cual se realizará determinando los niveles de dímeros de timidina



usando anticuerpos específicos. Estos experimentos serán relevantes para determinar el papel de la TK1a en la reparación de DNA en tejido diferenciado. Al igual que en plántulas, se observó un aumento en los niveles de transcrito de TK1a después del tratamiento (Figura 31). Adicionalmente, el nivel de transcrito TK1a en tejido diferenciado es mayor que en plántulas. Una posible explicación que se ha dado de este perfil, es que la TK1 participa en el aporte de nucleótidos con fines reparativos en tejidos expuestos a radiación UV proveniente de la luz solar (Moffatt & Ashihara, 2002). También se ha sugerido que la regulación positiva de la expresión del gen *TK1* en tejido diferenciado, puede estar involucrada en la reparación del daño a DNA ocasionado por otro tipo de estrés, debido a que en tejidos no proliferativos del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) se encontraron niveles basales 7 mayores del transcrito HbTK en plantas resistentes a un síndrome que afecta a las células productoras del látex debido al estrés abiótico a las que se someten (Venkatachalam *et al.*, 2010). En base a estas observaciones, parece que una función importante de la timidina cinasa en plantas se realiza en tejidos no proliferativos, contribuyendo a la síntesis de DNA en respuesta a daño genotóxico.

Nuestros resultados mostraron que los dos genes de la timidina cinasa de *Arabidopsis* tienen un patrón de expresión diferencial en respuesta a estrés genotóxico. Además, estos resultados fueron consistentes con los elementos de respuesta identificados en el promotor del gen *TK1a* (Tabla 9) y que se comparten con otros genes de respuesta a daño a DNA. Entre estos elementos se encuentran la caja E2F y la caja WBOX, la cual es un sitio de unión para el factor transcripcional WRKY1, esta proteína incrementa su transcrito 21 veces en respuesta a entrecruzamientos con el DNA y formación de DSBs, y esta caja se encuentra también en los genes de reparación GR1 y Rad51 en una posición muy similar a la encontrada en el promotor *TK1a* (Chen *et al.*, 2003). Por otro lado, es interesante que la línea *oetk1a* mantenga su inducción por estrés genotóxico, ya que esto indica que los elementos que regulan las respuestas a este estímulo se deben localizar en los 312 pb que conserva hacia el extremo 5' del inicio de la traducción. Un análisis de esta región reveló la presencia de la caja



MYBCOREATCYCB1, previamente caracterizada en el promotor de la ciclinaB1:1, que es el sitio de unión de un factor MYB que controla el aumento de expresión de este gen en respuesta a estrés genotóxico (Planchais *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Se ha comprobado que motivos contenidos en la región 5' UTR pueden participar en la regulación de la expresión (Haberer *et al.*, 2004); dentro de la región 5'UTR del gen *TK1a* se localiza la caja CGCGBOXAT que es reconocida por proteínas de la familia AtSR1-6 (genes de respuesta a señales), que responden diferencialmente a diversos estímulos del medio ambiente como luz UV-B, temperaturas extremas, altas concentraciones de sales y herida física, así como a las fitohormonas ABA y etileno. Además, este motivo también se encuentra en genes que participan en la reparación del DNA como en RAD 23, así mismo su ubicación dentro del promotor puede encontrarse entre el nucleótido -106 al -162, y en el promotor de la *TK1a* se localiza a -110pb (Yang & Poovaiah, 2002). Por lo tanto estos dos últimos elementos pudieran estar participando en la regulación de la transcripción del gen *TK1a* en respuesta a daño genotóxico.

Para conocer si la transcripción del gen *TK1b* se regula a la alza por algún estímulo del medio ambiente se realizó una búsqueda en el Atlas de expresión de *Arabidopsis*. Lo único que se encontró que incrementa los niveles de este transcrito son las fitohormonas ácido abscísico (ABA) y giberelina. Mientras que en su promotor se localizan algunos motivos consenso que responden a estrés hídrico. Sin embargo, necesitaremos realizar varios experimentos para comprobar lo anterior.

4. Actividad de timidina cinasa en *A. thaliana* en respuesta a radiación UV-C.

Además de la determinación de los niveles de transcrito en respuesta a estrés genotóxico, se determinó la actividad enzimática tanto en plántulas tipo silvestre como en mutantes. Los extractos de la línea *oetk1a* presentaron mayor actividad desde los controles, a 1h después del tratamiento *oetk1a* tuvo el doble de actividad que el control de la línea silvestre. Sin embargo, la inducción de la actividad por el tratamiento fue discreta alrededor del 30% con respecto a su



control de las líneas tipo silvestre y *oetk1a* (Figura 34). Los niveles de actividad enzimática no correlacionaron con las veces de incremento a nivel de transcrito después de inducir daño al DNA. En líneas que sobreexpresan la proteína DDB1A, la cual participa en la vía de NER, se encontraron 8 veces más de transcrito, en comparación a la línea tipo silvestre, sin embargo, los niveles de proteína sólo aumentaron entre un 20-50%, lo cual fue suficiente para presentar resistencia a luz UV-C (Al Khateeb & Schroeder, 2009). Además, es posible que existan diversos mecanismos regulatorios a nivel post-transcripcional, por ejemplo, en células de mamífero mientras los niveles de transcrito se incrementan apenas tres veces en la fase S del ciclo celular con respecto a la fase G1, los niveles de la proteína se elevan hasta 15 veces (Sherley & Kelly, 1988). No obstante, al parecer los mecanismos de regulación a nivel proteína no están conservados entre las TK1s de plantas y mamíferos, por ejemplo, la regulación por oligomerización es claramente diferente, mientras que la TK1 humana requiere de la formación de un tetrámero para ser activa, las TKs de plantas son funcionales con la formación del dímero (Mutahir *et al.*, 2013). Para tener más información de la regulación de las proteínas TKs de *Arabidopsis*, se requerirá determinar la cantidad de proteína en extractos crudos mediante anticuerpos específicos.

Otra posible explicación a la baja inducción de la actividad, es que haya un efecto de dilución de la actividad debido a que se utilizaron plántulas completas de 7 días para el análisis, donde el peso mayoritario es de los cotiledones, tejido donde no se observó una inducción notable de GUS después del tratamiento. Así, para los ensayos de proteína sería recomendable hacerlos sólo con tejido de la raíz, donde se observó la mayor inducción, lo que probablemente permitiría observar mejor las diferencias. En apoyo a esta estrategia, se ha reportado que los genes de reparación río arriba de la TK1a son regulados diferencialmente dependiendo del tejido (González-Besteiro & Ulm, 2013).



CONCLUSIONES

Los genes de la *TK1a* y *TK1b* de *A. thaliana* se expresan durante diferentes estadios del desarrollo y tienen una expresión común en diversos tejidos y órganos de la planta. Sin embargo, el gen *TK1a* se expresa en mayor nivel y presenta expresión diferencial, en tejidos diferenciados como hojas maduras, hojas caulinares y tallo.

El gen de la *TK1a* se expresa ligeramente en el meristemo de la raíz, mientras el gen *TK1b* no se expresa en estas células. Esto sugiere que en células en proliferación el aporte de nucleótidos es dado principalmente por la vía de síntesis *de novo*.

Plantas que sobre-expresan el transcrito *TK1a* (línea mutante *oetk1a*) tienen mayores niveles de actividad enzimática antes y después del daño y presentan tolerancia a diferentes tipo de estrés genotóxico.

La expresión de los genes *TK1a* y *TK1b* se inducen por la exposición a zeocina (compuesto productor de DSBs) y a MMC (compuesto formador de aductos) con el DNA. La transcripción del gen *TK1a* se induce en tiempos cortos de exposición a los agentes genotóxicos, mientras que el gen *TK1b* necesita tiempos prolongados de exposición, siendo además el incremento de expresión de *TK1b* menor que el de *TK1a*.

Los genes *TK1a* y *TK1b* se expresan diferencialmente en respuesta a estrés genotóxico producido por luz UV-C, pues solo la expresión del gen *TK1a* es inducible por este tratamiento.

En resumen, los datos sugieren que una mayor poza o disponibilidad de dTTP permiten que el daño a DNA sea reparado más rápido y eficientemente. Por lo tanto, la función del gen *TK1a* es importante para diferentes mecanismos de reparación dependientes de síntesis de DNA en *Arabidopsis*.



PERSPECTIVAS

Establecer la capacidad reparativa de las líneas mutantes de T-DNA cuantificando la cantidad de dímeros de pirimidina presentes en el DNA genómico después de la exposición a luz UV-C utilizando anticuerpos específicos contra CPDs y 6-4 PPs.

Continuar con los estudios de cambios de expresión en células del meristemo en respuesta a daño empleando las líneas transgénicas *promTK1a::GFP* y *promTK1b::GFP*.

Determinar la localización subcelular de las proteínas TKs empleando las fusiones proteicas TK1a-GFP y TK1b-GFP. Asimismo se evaluará si la proteína TK1a se transloca al núcleo en respuesta a daño genotóxico.

Evaluar líneas silenciadas del gen *TK1a*, para corroborar la función de esta enzima en los procesos de reparación de DNA dependientes de síntesis. Así como generar una línea sobre-expresora en la que se dirija la expresión por un promotor fuerte como el 35S para determinar el efecto sobre el desarrollo.

Determinar los niveles de las proteínas TK1a y TK1b por western blot, en las líneas mutantes de T-DNA como en la tipo silvestre en condiciones normales de crecimiento y en respuesta a estrés genotóxico.

Determinar la actividad enzimática de TK en respuesta a luz UV-C utilizando solamente raíces de plántulas de 7 días.

Estudiar la participación de las proteínas ATM, ATR, SOG y E2F en la regulación de los genes *TK1a* y *TK1b* en respuesta a daño al DNA.

Evaluar el efecto de las fitohormonas ABA, giberelinas y brasinoesteroides sobre la expresión de los genes *TK1a* y *TK1b*.

Estudiar el papel de los genes *TK1a* y *TK1b* en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental como sequía, temperaturas extremas, salinidad y daño mecánico.



REFERENCIAS

- Al Khateeb, W. M; and Schroeder, D. F.** (2009) Overexpression of *Arabidopsis* damaged DNA binding protein 1A (DDB1A) enhances UV tolerance. *Plant Mol. Biol*, 70: 371-383.
- Al-Nabulsi, I; Takamiya, Y; Voloshin, Y; Dritschilo, A; Martuza, R. L; and Jorgensen, T. J.** (1994) Expression of Thymidine Kinase I is essential to low dose radiation resistance of rat glioma cells. *Cancer Res*, 54: 5614-5617.
- Balestrazzi, A; Confalonieri, M; Macovei, A; Donà, M; and Carbonera, D.** (2011) Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity. *Olant Cell Rep*. 3:287-295.
- Basundra, R; Kumar, A; Amrane, S; Verma, A; Tuán Phan, A; and Chowdhury, S** (2010) A novel G-quadruplex motif modulates promoter activity of human thymidine kinase 1. *FEBS Journal* 277 (20): 4254-4264.
- Boldt, R; and Zrenner, R.** (2003) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant*, 117:297-304.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Chemistry*. 72: 248-254.
- Bramsiepe, J; Wester, K; Weini, C; Roodbarkelari, F; Kasili, R; Larkin, J; Hulskamp, M; and Schnittger, A.** (2010) Endoduplication controls cell fate maintenance. *PLoS Genet* 6(6): e1000996.
- Bray, C. M; and West, C. E.** (2005) DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol*, 168: 511-528.
- Britt, A.** (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in plant Sci*. 4(1): 20-25.
- Brockenbrough, J. S; Morihara, J. K; Hawes, S. E; Stern, J. E; Rasey, J. S; Wiens, L. W; Feng, Q; and Vesselle, H.** (2009) Thymidine kinase 1 and thymidine phosphorylase expression in non-small-cell lung carcinoma in relation to angiogenesis and proliferation. *J Histochem Cytochem* 57(11): 1087-1097.
- Chabouté, M. E; Clément, B; and Philipps, G.** (2002) S phase and meristem-specific expression of the tobacco RNR1b gene is mediated by an E2F element located in the 5' leader sequence. *J. Biol. Chem*, 277(20): 17845-17851.



- Charbonnel, C; Allain, E; Gallego, M. E; and White, C.** (2010) Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in *Arabidopsis*. *DNA Repair*, 10: 611-619.
- Chen, I-P; Haehnel, U; Altschmied, L; Schubert, I; and Puchta; H.** (2003) The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress- a high-density colony array study (HDCA). *Plant J*, 35:771-786.
- Chen, Y-L; Eriksson, S; and Chang, Z.** (2010) Regulation and functional contribution of Thymidine kinase 1 repair of DNA damage. *J. Biol. Chem*, 285; 35: 27327-27335.
- Clausen, A. R; Girandon, L; Ali, A; Knecht, W; Rozpedowska, E; Sadrini, M; Andreasson, E; Munch-Petersen, B; and Piskur, J.** (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 279(20):3889-3896.
- Clough, S. J; and Bent, A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16(6):735-743.
- Cools, T; and De Veylder, L.** (2009) DNA stress checkpoint control and plant development. *Plant Biol*, 12:23-28.
- Colón-Carmona, A; You, R; Haimoritch-Gal, T; and Doerner, P.** (2003) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J*, 20(4):503-508.
- Culligan, K. M; Robertson, C. E; Foreman, J; Doerner, P; and Britt, A. B.** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J*, 48(6): 947-961.
- Curtis, M. J; and Hays, J. B.** (2007) Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated *Arabidopsis* roots: Requirements for DNA translesion polymerases η and ζ . *DNA Repair*, 6:1341-1358.
- Dal Bosco, C; Lezhneva, L; Biehl, A; Leister, D; Strotmann, H; Warner, G; and Meurer, J.** (2003) Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem*, 279(3): 1060-1069.
- Deans, A. J; & West, S. C.** (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Rev Cancer*, 11:467-480
- Dewitte, W; and Murray, J. A.H.** (2003) The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol*, 54:235-264.
- Dobrovolsky, V. N; Bucci, T; Heflich, R. H; Desjardins, J; and Richardson, F. C.** (2003) Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Mol Gen. Metabol*; 78:1-10.



- Earley, K.W; Haag, J.R; Pontes, O; Opper, K; Juehne, T; Song, K; and Pikaard, C.S.** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*, 45:616-629.
- Eriksson, S; Munch-Petersen, B; Johansson, K; and Eklund, H.** (2002) Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell.Mol. Life Sci*, 59:1327-1346.
- Flemington, E; Bradshaw J; Harvey, D; Traina-Dorge, V; Slagel, V; and Deininger, Prescott L** (1987) Sequence, structure and promoter characterization of the human thymidine kinase gene. *Gene*, 52:267-277.
- Furukawa, T; Curtis, M.J; Tominey, C.M; Duong, Y.H; Wilcox, B.W.L; Aggoune, D; Hays, J.B; and Britt, A.B.** (2010) A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair*, 9(9):940-948.
- Gallie, D. R.** (1993) Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 44: 77-105.
- Ganpudi, A. L; and Schroeder, D. F.** (2011) UV damaged DNA Repair & Tolerance in plants. Selected Topics in DNA Repair, Prof. Clark Chen (Ed.), ISBN: 978-953-307-606-5, InTech, DOI: 10.5772/22138. Available from: <http://www.intechopen.com/books/selected-topics-in-dna-repair/uv-damaged-dna-repair-tolerance-in-plants>.
- Gasparri, F; Wang, N ; Skog, S; Galvani, A; and Eriksson, S.** (2009) Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan™ assays. *Eur. J. Cell Biol*, 88: 779-785.
- Gateway.** (2004) Gateway® Technology with Clonase™ II A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Invitrogen corporation.
- González-Besteiro, M; and Ulm, R.** (2013) ATR and MPK1 play distinct roles in response to UV-B stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73: 1034-1043.
- Haberer, G; Hindemitt, T; Meyers, B. C; and Mayer, K.** (2004) Transcriptional similarities, dissimilarities and conservation of cis-elements in duplicated genes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 136:3009-3023
- Hartley, J. L; Temple, G. F; and Brasch, M. A.** (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 11:1788-1795.
- Hays, J. B.** (2002) *Arabidopsis thaliana* a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair*, 1: 579-600.



- Hazra, S; Sabini, E; Ort, S; Konrad, M; and Lavie, A.** (2009) Extending thymidine kinase activity to the catalytic repertoire of human deoxycytidine kinase. *Biochemistry*, 48:1256-1263.
- Higo, K. Y; Ugawa, M. I; and Korenaga, T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 27:297-300.
- Jefferson, R. A; Kavanagh, T. A; and Bevan M. W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6: 3901-3907.
- Jenkins, G. I** (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu. Rev. Plant. Biol*, 60: 407-431.
- Jiang, K; and Feldman, L.J.** (2005) Regulation of root apical meristem development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21:485-509.
- Johansson, M; and Karlsson, A.** (1997) Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *J. Biol Chem*, 272, 8454-8458.
- Kafer, C; Zhou, L; Santoso, D; Guirgis, A; Weers, B; Park, S; and Thornburg, R.** (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers Biosci*, 9: 1611-1625.
- Ke, P; and Chang, Z.** (2004) Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-Cdh1-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol*, 24: 514-526.
- Ke, P; Kuo, Y; Hu, C; and Chang, Z.** (2005) Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Gen. Dev*, 19: 1920—1933
- Ke, P.Y; Hu, C. M; Chang, Y. C; and Chang, Z. F.** (2007) Hiding human thymidine kinase 1 from APC/C-mediated destruction by thymidine binding. *The FASEB J*, 21(4): 1276-1284.
- Khan, Z; Knecht, W; Willer, M; Rozpedowska, E; Kristoffersen, P; Clausen, A; Munch-Petersen, B; Almqvist, P. M; Gojkovic, Z; Pikur, J; and Ekstrom, Y. J.** (2010) Plant thymidine kinase 1: a novel efficient suicide gene for malignant glioma therapy. *Neuro-Oncology*, 12(6):549-558.
- Kiba, T; Naitou, T; Koizumi, N; Yamashino, T; Sakakibara, H; and Mizuno, T.** (2005) Combinatorial microarray analysis revealing Arabidopsis genes implicated in cytokinin responses through the His-to-Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiol*, 46(2): 339-355.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K.** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50, 347-363.



- Kimura, S; and Sakaguchi, K.** (2006) DNA repair in plants. *Chem. Rev*, 106: 153-766.
- Kimura, S; Tahira, Y; Ishibashi, T; Mori, Y; Mori, T; Hashimoto, J; and Sakaguchi K.** (2004) DNA repair in higher plants; photoreactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells. *Nucleic Acid Res*, 32(9): 2760-2767.
- Kreidberg, J. A; and Kelly, T.J.** (1986) Genetic analysis of the human thymidine kinase gene promoter. *Molecular Cell. Biol*, 6(8):2903-2909.
- Leasure, C.D; Tong, H; Yuen, G; Hou, X ;Sun, X; and He, Z.** (2009) Root UV-B sensitive2 acts with root UV-B sensitive1 in a root ultraviolet B-Sensing Pathway. *Plant Physiol*, 150:1902-1915.
- Lee, Y-J; Park, S-J; Ciccone, S; Kim, C-R; and Lee, S-H.** (2006) An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage its repair. *Carcinogenesis*, 27(3):446-453.
- Li, C; Lu, C; Ke, P; and Chang, Z.** (2004) Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of Serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 313:587-593.
- Li, Z.Y; and Dong, A. W.** (2012) The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoduplication by modulating expression of key cell cycle genes. *Mol. Plant*, 5 (1): 270-280
- Lieber, M. R.** (2012) The mechanism of double strans break DNA repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79:181-211.
- Loukanina, N; Stasolla, C; Belmonte, M.F; Yeung, E.C; and Thorpe, T. A.** (2008) Changes in the novo, salvage, and degradation pathways of pyrimidine nucleotides during to tobacco shoot organogenesis. *Plant Physiol. Biochem*, 46: 665-672.
- Manguet, S; Gakiere, B; Majira, A; Pelletier, S; Bringel, F; Guerard F; Caboche, M; Berthomé, R; and Renou, J. P.** (2009) Uracil salvage is necessary for early Arabidopsis development. *The Plant J*, 60:280-291.
- Mikulits, W; Hengstschlagers, M; Sauer, T; Wintersberger, E; and Mullner, E. W.** (1996) Overexpression of thymidine kinase mRNA eliminates cell cycle regulation of thymidine kinase enzyme activity. *J. Biol. Chem*, 271:2; 853-860.
- Moffatt, B; and Ashihara, H.** (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2nd edition, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD. U.S.A.



- Molinier, J; Lechner, E; Dumbliauskas, E; and Genschik, P.** (2008) Regulation and role *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *Plos Gen*, 4:6.
- Munch-Petersen, B.** (2008) Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate, in addition to tripolyphosphates, or high enzyme concentration. *The FEBS Journal*, 276(2): 571-580.
- Mutahir, Z; Larsen, N. B; Christiansen, L. S.; Andersson, K-M; Rico, R; Wisen, S. M; Clausen, A. R; Munch-Petersen, B; and Piskur, J.** (2011) Characterization of oligomeric and kinetic properties of tomato thymidine kinase. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30:1223-1226.
- Mutahir Z. Clausen, A. R; Anderson, K. M; Wisen, S. M; Munch-Petersen, B; and Piskur, J.** (2013) Thymidine kinase 1 regulatory fine tuning through tetramer formation. *FEBS J*, 280(6): 1531-1541.
- Najata, T; Yamada, H; Du, Z; Todoriki, S; and Kikuchi, S.** (2005) Microarray analysis of genes that respond to γ irradiation in *Arabidopsis*. *J. Agric. Food Chem*, 53:1022-1030.
- Nájera-Martínez, M.** (2010) "Herramientas genéticas para estudiar la función de la timidina cinasa en *Arabidopsis thaliana*" 4nd Coloquio invernal. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química de la UNAM.
- Pedroza-García, J.A.** (2011) Expresión de los genes de Timidina cinasa (TK1a y TK1b) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM
- Pérez-Pérez, M; Priego, E; Hernández, A. I; Familiar, O; Camarasa, M. J; Negri, A; Gago, F; and Balzarini, J.** (2008) Structure, physiological rule, and specific inhibitors of human thymidine kinase 2 (TK2): Present and future. *Med. Res. Rev*, 28(5): 797-820.
- Planchais, S; Perennes, C; Glab, N; Mironov, V; Inze, D; and Bergounioux, C.** (2002) Characterization of cis-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath*;CycB1;1 transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol Biol*. 50:111-127
- Pontarin, G; Gallinaro, L; Ferraro, P; Reichard, P; and Bianchi, V.** (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100: 12159-1264.
- Ramirez-Parra E; Frundt C; and Gutierrez C.** (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J*, 33: 801–811.
- Rampazzo, C; Miazzi, C; Franzolin, E; Pontarin, G; Ferraro, P; Frangini, M; Reichard, P; and Bianchi, V.** (2010) Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutation Res*, 703:2-10.



- Ricaud, L; Proux, C; Renou, J-P; Pichon, O; Fochesato, S; Ortet, P; and Montané, M-H.** (2007) ATM-mediated transcriptional and developmental responses to γ -rays in *Arabidopsis*. PLoS ONE, 2:e4301-21.
- Rodríguez, I. P; and Barrera, H. A.** (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL, 7(3): 323-335.
- Rotheneder, H; Geymayer, S; and Haidweger, E.** (1999) Transcription factors of the Sp1 family: Interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. J. Mol. Biol, 293: 1005-1015.
- Roa, H; Lang, J; Culligan, K. M; Keller, M; Holec, S; Cognat, V; Montané, M-H; Houlné, G; and Chabouté, M-E.** (2009) Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 151: 461-471.
- Sandrini, M.P.B; and Piskur, J.** (2005) Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction. Trends Biochem. Sci, 30; 5 225-228.
- Schmid, M; Davison, T.S; Henz, S.R; Pape, U. J; Demat, M; Vingron, M; Scholkopt, B; Weigel, D; and Lohmann, J. U.** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. Nature Gen, 37: 501-506
- Segura-Peña, D; Lutz, S; Monnerjahn, C; Konrad, M; and Lavie, A.** (2007) Binding of ATP to TK1-like enzymes is associated with a conformational change in the quaternary structure. J. Mol. Biol, 369:129-141.
- Sherley, J.L; and Kelly, T. J.** (1988). Regulation of thymidine kinase during the cell cycle. J.Biol. Chem, 263:8350-8358.
- Sorensen, P; and Wintersberger, E.** (1999) Sp1 and NF-Y are necessary and sufficient for growth-dependent regulation of the hamster thymidine kinase promoter. J. Biol. Chem, 274: 30943-30949.
- Stasolla, C; Katahira, R; Thorpe, T.A; and Ashihara, H.** (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. J. Plant Physiol, 160:1271-1295.
- Swarbreck, D; Wilks, C; Lamesch, P; Berardini, T.Z; García-Hernandez, M; Foerster, H; Li, D; Meyer, T; Muller, R; and PLoetz, L.** (2008) The *Arabidopsis* information resource (TAIR): gene structure and function annotation. Nucleic Acids Res, 36:D1009-1014.
- Suzuri, L.J.** (2006) Actividad y expresión de la timidina cinasa de maíz durante la germinación de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.



- Terpstra, I; and Heidstra, R.** (2009) Stem cells: The root of all cells. *Sem. Cell Dev. Biol*, 20:1089-1096.
- Tuteja, N; Ahmad, P; Panda, B.B; and Tuteja, R.** (2009) Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Res. Rev*, 681:134-149.
- Ullah, H. M; Robertson, D; and Fites, R. C.** (1999) A gene for thymidine kinase in plants. *Plant Physiol*, 119:c/pp.
- Vandepoele, K; Vlieghe, K; Florquin, K; Henning, L; Beemster, G. T. S; Gruissem, W; Van de Peer, Y; Inze, D; and De Veylder, L.** (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol*, 139: 316-328.
- Venkatachalam, P; Geetha, N; and Priya, P.** (2010) Identification of a differentially expressed thymidine kinase gene related to tapping panel dryness syndrome in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by random amplified polymorphic DNA screening. *Int. J. Plant Biol*, 1:e7: 33-39.
- Wakazono, Y; Kubota, M; Furusho, K; Liu, L; and Gerson, S. L.** (1996) Thymidine kinase deficient cells with decreased TTP pools are hypersensitive to DNA alkylating agents. *Mutation Res*, 362:119-125.
- Wakazono, Y; Kubota, M; Sano, H; Matsubara, K; Hirota, H; Kuwakado, K; and Adachi, S.** (1994). Different effect of thymidine kinase loss on TTP pools; comparison among human leukemia cell lines. *Mutation Res*, 304:295-300.
- Wang, C; and Liu, Z.** (2006) *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell*, 18: 350-365.
- Waterworth, W; Drury, G. E; Bray, C. M; and West, C. E.** (2011) Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytologist*, 192:805-822.
- Weling, M; Kosinska, U; Mikkelsen, N; Carnrot, C; Zhu, C; Wang, L; Eriksson, S; Munch-Petersen, B; and Eklund, H.** (2004) Structures of thymidine kinase 1 of human and micoplasmic origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(52): 17970-17975.
- Wintersberger, E.** (1996) Regulation and biological function of thymidine kinase. *Biochem. Soc. Trans*, 25:303-305
- Wolcott, R. M; and Colacino, J. M.** (1989) Detection of thymidine kinase activity using an assay based on the precipitation of nucleoside monophosphates with lanthanum chloride. *Analytical Biochemistry*, 178(1): 38:40.
- Yadav, R. K; Girke, T; Pasala, S; Xie, M; and Reddy, G. V.** (2009) Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS*, 106(12): 4941-4946.



- Yang, T; and Poovaiah, B. W.** (2002) A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J. Biol. Chem*, 277(47):45049-45058.
- Yoval-Sánchez, B.** (2008) Purificación y caracterización de timidina cinasa de maíz (TK). Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Facultad de Química. UNAM.
- Zrenner, R; Riegler, H; Marquard, C.R; Lange, P.R; Geserick, C; Bartosz, C. E; Chen, C.T; and Slocum, R.D.** (2009) A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 183:117-132.
- Zrenner, R; Stitt, M; Sonnewald, U; and Boldt, R.** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Biol*, 57: 805-836



ANEXOS

ANEXO I. Materiales y Métodos Complementarios.

I.I Análisis *in silico* de los promotores.

Se realizó la búsqueda de la secuencia de los genes de la timidina cinasa AtTK1a (AT3G07800) y AtTK1b (AT5G23070) de *Arabidopsis* en la base de datos TAIR *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>), con el propósito de conocer la organización estructural de ambos genes. Una vez identificados los genes se localizaron las secuencias de 1000 pares de bases (pb) río arriba de la región 5'-UTR de cada uno de los genes en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se seleccionó una secuencia de aproximadamente 1100pb hacia el extremo 5' del inicio del marco de lectura para ambos genes. Las secuencias de sus regiones 5' se analizaron (ANEXO II.I) en las bases de datos PlantPAN (plant promoter analysis navigator; http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php) y NEWPLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA elements; <https://sogo.dna.affrc.go.jp/newplace>) para localizar potenciales elementos *cis*-reguladores.

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

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

Cada botón celular se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ fría y se centrifugó a 3000rpm durante 5 min a 4°C. Los botones resultantes se resuspendieron en 10 mL de solución de CaCl₂ fría, se juntaron en un mismo tubo



Falcon® y se dejaron reposar en hielo durante 30 min, para después centrifugar a 3000 rpm por 7 min a 4°C. Por último, el botón celular se resuspendió en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría y se repartió en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL que se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70°C.

I.III Preparación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*.

Una colonia aislada o una asada de un stock de glicerol de la cepa PGV2260/C58 de *A. tumefaciens* se inoculó en 3 mL de medio LB en un tubo de ensaye y se incubó a 28°C con agitación (250 rpm) durante 16 horas. De este cultivo se tomaron 2 mL que se transfirieron a 50 mL de medio LB en un matraz de 250 mL, se incubó a 28°C con agitación a 200 rpm hasta que la A₅₉₀ alcanzó un valor aproximado de 0.5. El cultivo se pasó a un tubo Falcon® de 50 mL estéril que se mantuvo en hielo durante 15 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 1 mL de la solución de CaCl₂ 20 mM/glicerol 10%. Se distribuyó en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL que se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70°C.



ANEXO II. Resultados Complementarios.

II.I Análisis *in silico* de los promotores de los genes *AtTK1a* y *AtTK1b*.

Tabla 1S. Motivos *cis*- reguladores que dirigen expresión tejido-específica encontrados en las regiones promotoras de los genes *TK1*.

Motivo	Secuencia	Locus* promTK1a	Locus* promTK1b	Descripción
AP1	CCAAAAA	232, 464, 490, 635	323, 505, 604, 684	Caja encontrada en el promotor del gen APETALA 3 de identidad floral
Agamous	NTTWCCWAAWNN GGNAAN	631	115, 316, 703, 747	Caja encontrada en genes de identidad floral
POLLEN1LELAT5	AGAAA	317, 513, 539, 549	146, 210, 441, 510	Genes que se expresan en polen
SORLIP1AT	GGGCC	640	896	Genes que se expresan en raíz y que son inducidos por luz

* Con respecto a su posición hacia el extremo 5' del origen de la traducción.



Tabla 2S. Motivos *cis*-reguladores localizados en la región promotora del gen *TK1a*.

Motivo**	Secuencia	Locus* promTK1a	Descripción
Consenso E2F	GGGCCAAA	637	Motivo de unión para el factor transcripcional E2F
MYBCOREATCYCB1	CCGTT	289	Encontrado en el promotor de la ciclina B1:1
MYCCONSUSAT	CANNTG	363, 380, 554, 672	Encontrada en promotores que se inducen por deshidratación
WBOXNTERF3	TGACC	469	Activación por herida
QARBNEXTA	AACGTGT	689	Genes que se inducen por estrés por deshidratación y senescencia Controla la activación por estrés mecánico
<u>CGCGBOXAT</u>	CCGCGT	110	Los factores de transcripción que reconocen esta caja son rápidamente y diferencialmente inducidos por señales ambientales como son UV-B, temperatura extremas y heridas

* Con respecto a su posición hacia el extremo 5' del origen de la traducción.

**Motivos caracterizados en genes que responden a diferentes tipos de estrés o que son controlados por el ciclo celular.

Tabla 3S. Motivos *cis*-reguladores localizados en la región promotora del gen *TK1b*.

Motivo**	Secuencia	Locus* promTK1b	Descripción
GBF5	ACTCAT	342	Sitio de unión de factores transcripcionales que responden a hipoosmolaridad
MYB1AT	TAACCA	695	Sitio encontrado en los promotores que responden a deshidratación
MYBCORE	TAACAG	479	Involucrados en genes que responden a estrés hídrico

**Motivos caracterizados en genes que responden a diferentes tipos de estrés.

*Con respecto a su posición río arriba del origen de la traducción.

II.II. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real por SyBr Green.

La **especificidad** del método se evaluó con las curvas de disociación (Figura 1S), estas deben de presentar un solo pico para poder utilizar los cebadores diseñados con esas condiciones de reacción. Si los cebadores formaran dímeros o amplificaran productos inespecíficos, la curva de disociación presentaría más de un pico a diferentes temperaturas.

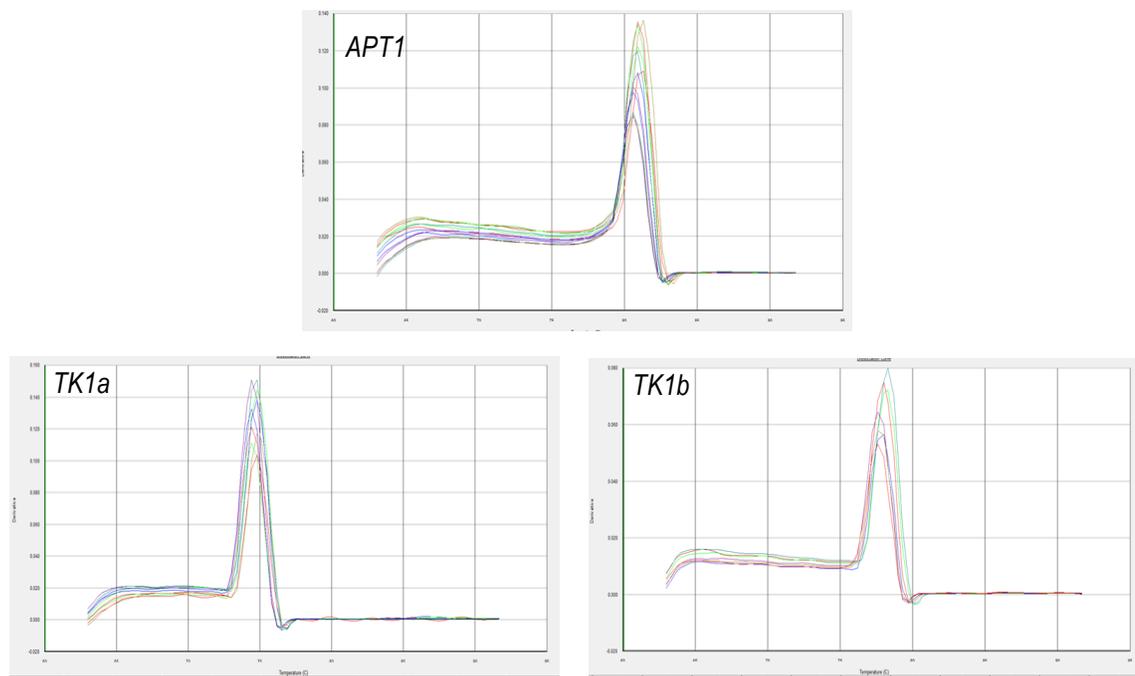


Figura 1S. Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados para RT-qPCR. Se muestran las gráficas para los genes *APT1*, *TK1a* y *TK1b* .

Para establecer la eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad del método se ajustó la línea base (“Baseline” y el umbral (Threshold) de detección de la fluorescencia para cada gen .Un error experimental, como la presencia de contaminantes o error de pipeteo, entre otros, pueden producir resultados que desvíen la curva de amplificación típica y generar una línea base y un umbral incorrecto. Asimismo, se validó el ensayo mediante una curva estándar a partir de muestras de cDNA diluidas serialmente en órdenes de 2, la cual se determinó por triplicado y se



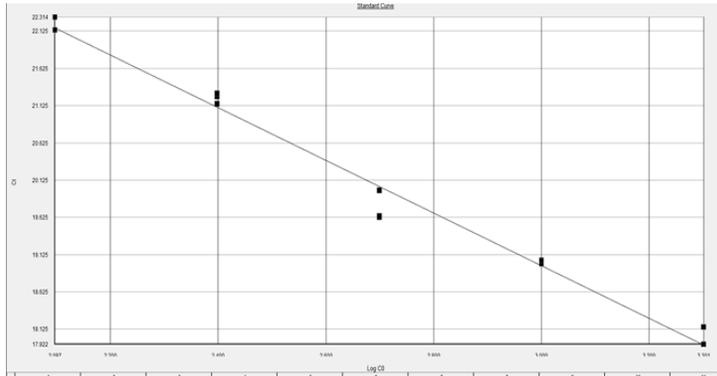
verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada, apareciera la curva típica de amplificación. La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido en ordenes de 1:2 hasta 1:16), donde la pendiente debe ser cercana a -3.32, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100 % (Figura 2S). La fórmula empleada para calcular el % de eficiencia de amplificación a partir de la pendiente dada es:

$$\%E = \left(\left[10^{-1/m} \right] - 1 \right) \times 100$$

donde:

m= pendiente de la curva Ct vs Log Concentración

Considerándose como aceptable entre el intervalo de 90% a 105%



APT1

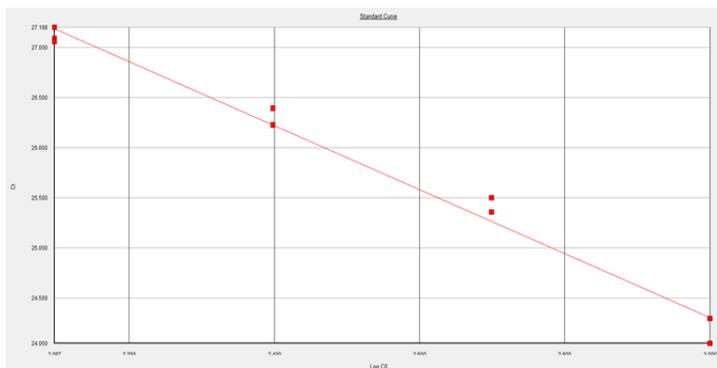
Baseline: 3-14

Threshold: 0.0950253

m= -3.536

R²= 0.9804

%E = 92.0%



TK1a

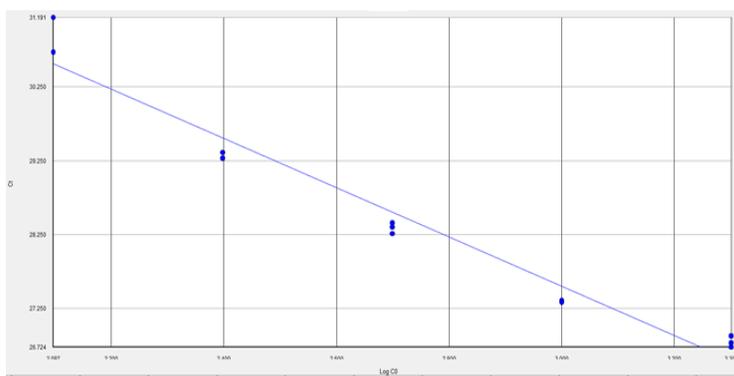
Baseline: 3-17

Threshold: 0.082584

m= -3.186

R²= 0.9837

%E = 105.0%



TK1b

Baseline: 3-19

Threshold: 0.101284

m= -3.339

R²= 0.9713

%E = 99.0%

Figura 2S. Curvas estándar de amplificación (Ct vs log concentración) de los genes *APT1*, *TK1a* y *TK1b*. Se muestran los datos de línea base (“Baseline”), umbral (“Threshold”), pendiente (m), R² y el % de eficiencia para cada gen. Las concentraciones de cDNA utilizados fueron las generadas a partir de 1.0 µg de RNA.



ANEXO III. Composición de Medios de Cultivo y Soluciones.

- **Agua tratada con DEPC**

DEPC	2 mL
Agua desionizada cbp	1 L

- **Amortiguador de carga para RNA**

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

- **Amortiguador de carga para DNA**

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

- **Amortiguador de extracción de proteínas**

Tris pH 7.5	70 mM
MgCl ₂	1 mM
KCl	25 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O pH 8	5 mM
Sacarosa	0.25 mM
β-mercaptoetanol	15 mM
Tritón X-100	0.1%(v/V)
Inhibidor de proteasas	Lo indicado por el fabricante

- **Amortiguador para determinar la actividad enzimática de TK1**

Tris	100 mM
MgCl ₂	10 mM
NaF	10 mM
ATP	10 mM
β-mercaptoetanol	2 mM

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

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

- **CaCl₂ 60mM**

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



- **Medio Luria**
Medio Luria 15.5 g
Agua estéril 1 L
Esterilizar por 20min/121°C a una presión de 15 lb/in²

- **Etanol al 75 % para la extracción de RNA**
Etanol absoluto 75 mL
H₂O-DEPC 25 mL

- **Gel de Agarosa al 1.5%**
Agarosa 0.375 g
H₂O estéril 25 mL
Fundir la mezcla
TAE 50X 500 µL
Bromuro de etidio 0.5 mg/mL 25 µL

- **Líquido de Bray**
2,5-difenildiazol (PPO) 4 g
1,4-bis[2-(4-metil-S-feniloxazol)]-benceno 0.2 g
Naftaleno 60 g
Etilénglicol 20 mL
Metanol 100 mL
Dioxano cbp 1 L

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

- **Medio Gamborg's B5**
Sales GB-5 (Promega) 0.8 g
H₂O estéril desionizada 200 mL
Agar 25 g
Sacarosa al 10% 50 mL

- **Solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8**
Acetato de potasio 29.5 g
Agua cbp 100 mL
Ajustar el pH a 4.8

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



- **TAE 50X**

Trizma base	24.2 g
Ácido acético glacial	5.7 mL
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	3.72 g
HCl concentrado	5.5 mL
Agua cbp	100 mL
Ajustar pH 8.0	

La **especificidad** del método se evaluó con las curvas de disociación (Figura 1S), estas deben de presentar un solo pico para poder utilizar los cebadores diseñados con esas condiciones de reacción. Si los cebadores formaran dímeros o amplificaran productos inespecíficos, la curva de disociación presentaría más de un pico a diferentes temperaturas.

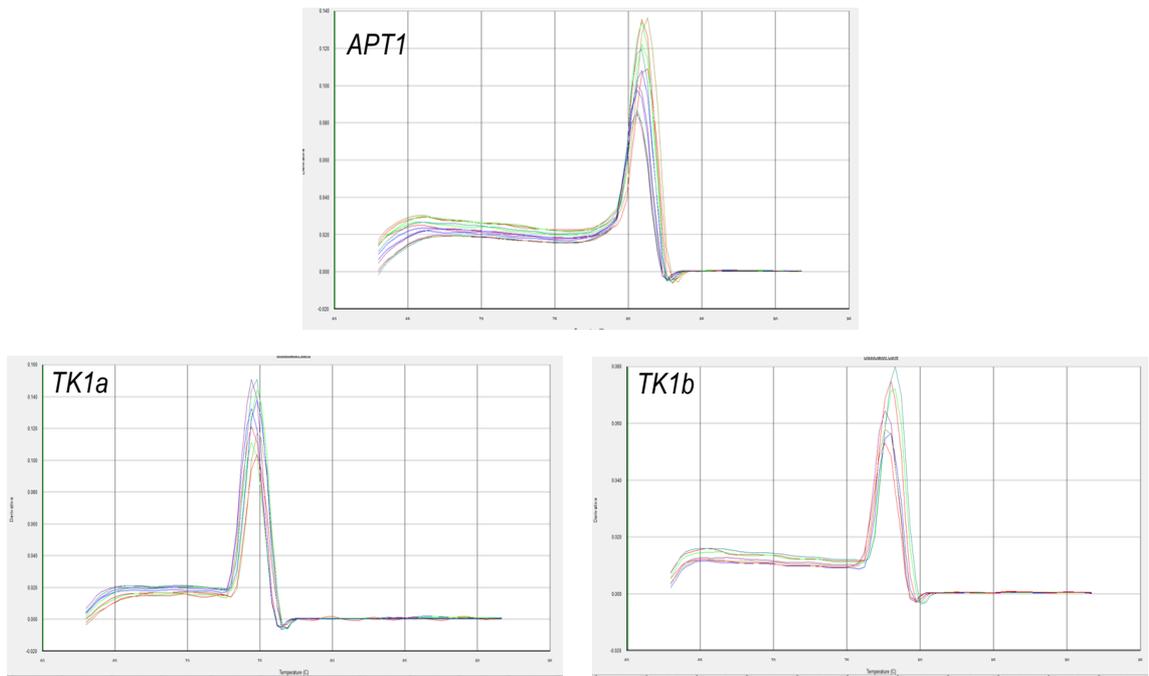


Figura 1S. Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados para RT-qPCR. Se muestran las gráficas para los genes *APT1*, *TK1a* y *TK1b*.

Para establecer la eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad del método se ajustó la línea base (“Baseline” y el umbral (Threshold) de detección de la fluorescencia para cada gen. Un error experimental, como la presencia de contaminantes o error de pipeteo, entre otros, pueden producir resultados que desvíen la curva de amplificación típica y generar una línea base y un umbral incorrecto. Asimismo, se validó el ensayo mediante una curva estándar a partir de muestras de cDNA diluidas serialmente en órdenes de 2, la cual se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada, apareciera la curva típica de amplificación. La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido en ordenes de 1:2 hasta 1:16), donde la pendiente debe ser cercana a -3.32, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al

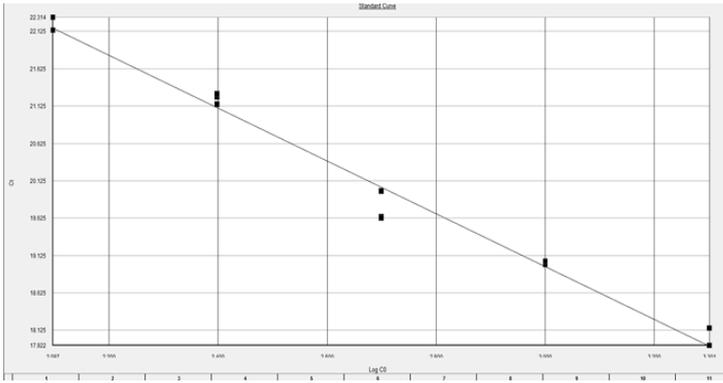
100 % (Figura 2S). La fórmula empleada para calcular el % de eficiencia de amplificación a partir de la pendiente dada es:

$$\%E = \left(\left[10^{-1/m} \right] - 1 \right) \times 100$$

donde:

m= pendiente de la curva Ct vs Log Concentración

Considerándose como aceptable entre el intervalo de 90% a105%



APT1

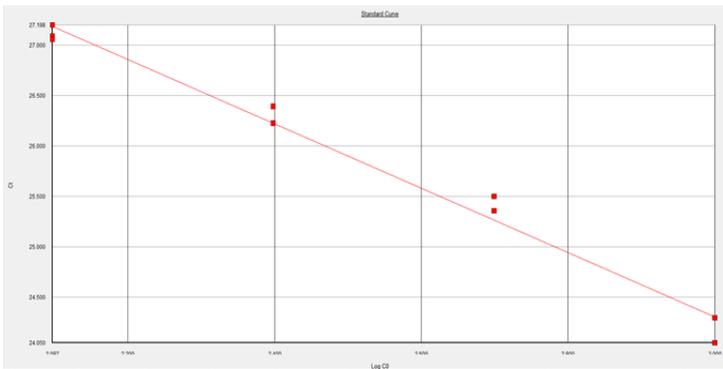
Baseline: 3-14

Threshold: 0.0950253

m= -3.536

R²= 0.9804

%E = 92.0%



TK1a

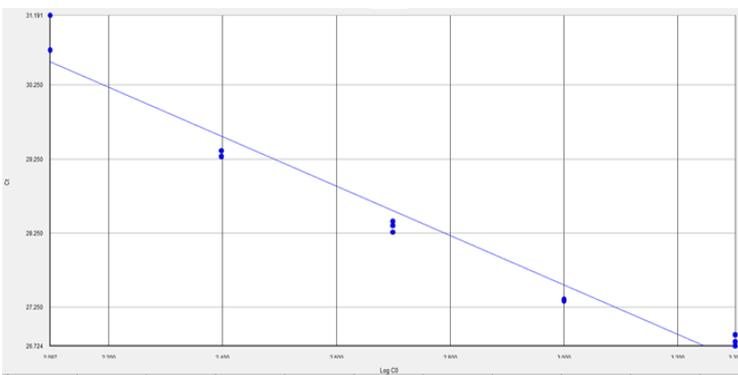
Baseline: 3-17

Threshold: 0.082584

m= -3.186

R²= 0.9837

%E = 105.0%



TK1b

Baseline: 3-19

Threshold: 0.101284

m= -3.339

R²= 0.9713

%E = 99.0%

Figura 2S. Curvas estándar de amplificación (Ct vs log concentración) de los genes *APT1*, *TK1a* y *TK1b*. Se muestran los datos de línea base (“Baseline”), umbral (“Threshold”), pendiente (m), R² y el % de eficiencia para cada gen. Las concentraciones de cDNA utilizados fueron las generadas a partir de 1.0 µg de RNA.