



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE MUTANTES EN
EL GEN DE LA TIMIDINA CINASA EN ARABIDOPSIS THALIANA*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LUIS FERNANDO DE LA ROSA ORTEGA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Marina Gavilanes Ruíz
VOCAL: Dra. Sobeida Sánchez Nieto
SECRETARIO: Dr. F. Javier Plasencia de la Parra
1er. SUPLENTE: Dr. José Ignacio Páramo Ramírez
2° SUPLENTE: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

APOYO DGAPA-PAPIIT IN220010

ASESOR DEL TEMA:

Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María Manuela Nájera Martínez

SUSTENTANTE:

Luis Fernando de la Rosa Ortega

Abreviaturas

28s RNAr	RNA ribosomal 28s	<i>HbTK</i>	gen de la timidina cinasa de <i>Hevea brasiliensis</i>
6-4PP	foto-productos 6-4	HTC-116	líneas celulares humanas de carcinoma de colón
ADP	adenosina difosfato	IMP	inosina monofosfato
AMP	adenosina monofosfato	IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ATP	adenosina trifosfato	Kb	Kilobases
<i>AtTK1a</i>	gen <i>timidina cinasa 1a</i> de <i>A. thaliana</i>	kDa	kilo Daltones
<i>AtTK1b</i>	gen <i>timidina cinasa 1b</i> de <i>A. thaliana</i>	KJ/m ²	kilojoule por metro cuadrado
<i>AtTub</i>	gen de <i>tubulina</i> de <i>A. thaliana</i>	Km	constante Michaelis-Menten
Cbp	cuanto baste para	Lac	Lactosa
cDNA	DNA complementario	LB	medio o caldo Luria Bertani
CMP	citidina monofosfato	NER	reparación por escisión de nucleótidos
CPDs	dímeros de pirimidina ciclobutano	<i>OeTK1a</i>	línea mutante sobreexpresora del gen <i>TK1a</i>
CSA	proteína A del síndrome de Cockayne	p53	antígeno p53 antitumoral
CSB	proteína B del síndrome de Cockayne	Pb	pares de bases
CTP	citidina trifosfato	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
dADP	desoxiadenosina difosfato	Pi	fosfato inorgánico
dATP	desoxiadenosina trifosfato	Ppi	pirofosfato inorgánico
dCDP	desoxicitidina difosfato	PRPP	5-fosfo α-D-ribosa-1-pirofosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato	RNR	ribonucleótido reductasas
DEPC	dietilpirocarbonato	RT	reacción de transcripción reversa
dGDP	desoxiguanosina difosfato	SDS	dodecilsulfato sódico
dGTP	desoxiguanosina trifosfato	TAE	tampón o amortiguador de tris acetato EDTA
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato	TC-NER	reparación por escisión de nucleótidos acoplado a la transcripción
dTDP	desoxitimidina difosfato	T-DNA	DNA transferido
dTMP	desoxitimidina monofosfato	TK	timidina cinasa
dTTP	desoxitimidina trifosfato	TMP	timidina monofosfato
dUDP	desoxiuridina difosfato	TS	Timidina sintetasa
dUMP	desoxiuridina monofosfato	TTP	timidina trifosfato
dUTP	desoxiuridina trifosfato	U/μL	unidades de actividad enzimática por microlitro
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	UDP	uridina monofosfato
F1	primera generación filial	UK	uridina cinasa
F2	segunda generación filial	UMP	uridina monofosfato
F3	tercera generación filial	UTP	uridina trifosfato
F4	cuarta generación filial	UV	Ultravioleta
FAD	dinucleótido de flavina adenina	X-Gal	(5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
GDP	guanosina difosfato	XMP	xantosina-5' monofosfato
GG-NER	reparación por escisión de nucleótidos global del genoma	XPC	Proteína C de Xeroderma pigmentosum
GMP	guanosina monofosfato		
g's	unidades de aceleración en centrifugación		
GTP	guanosina trifosfato		

Tabla de contenido

Resumen.....	5
Introducción	6
Biosíntesis de nucleótidos	6
Síntesis <i>de novo</i>	7
Biosíntesis de desoxirribonucleótidos	11
Ruta de salvamento	11
Timidina cinasa (TK).....	12
Timidina cinasa de mamíferos.....	13
Timidina cinasa de plantas.....	15
Estrés genotóxico en plantas.	16
Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	17
Antecedentes inmediatos. Función de la TK en reparación de DNA en plantas.	18
Hipótesis:	20
Objetivos	20
Objetivo General:	20
Objetivos Particulares:.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Material biológico	21
Desinfección y siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Extracción y purificación de DNA genómico	21
PCR y electroforesis.....	21
Purificación del amplicón y reacción de ligación.....	23
Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α	24
Reacción de transformación.....	25
Extracción de DNA plasmídico y digestión.....	25
Análisis de las secuencias de DNA.....	25
Extracción de RNA	26
Densitometría.....	27
Transcripción reversa (RT).....	27
Reacción de PCR y electroforesis.....	28

Caracterización fenotípica.....	29
Comparación de peso fresco de plántulas.....	29
Comparación de las hojas verdaderas y del color de las plántulas	30
Resultados.....	31
Genotipificación de las líneas SALK_094632 y SALK_097767 y obtención de plantas homocigotas.....	31
Verificación de la identidad del inserto de T-DNA por secuenciación.....	34
Análisis de las secuencias de DNA y mapeo de la inserción en el gen <i>TK1a</i>	35
Niveles de transcrito del gen <i>TK1a</i> en las líneas SALK_94 Y SALK_97.	39
Caracterización fenotípica de las líneas mutantes SALK_094 y SALK_097.	41
Respuesta a estrés genotóxico. Ensayos con luz UV-C.	43
Ensayo de hojas verdaderas.....	45
Respuesta a exposición a luz UV.....	50
Caracterización fenotípica de las líneas de inserción.....	51
Resumen.....	53
Conclusión.....	53
Perspectivas.....	53
Bibliografía	54

Índice de figuras

	Descripción de la figura	Página
Figura 1	Ejemplos de desoxirribonucleótidos trifosfato.	7
Figura 2	Ruta biosintética <i>de novo</i> de purinas en plantas.	8
Figura 3	Transporte de intermediarios en la ruta biosintética <i>de novo</i> de nucleótidos de pirimidina en plantas.	9
Figura 4	Ruta biosintética <i>de novo</i> de nucleótidos de pirimidina en plantas.	10
Figura 5	Ruta biosintética <i>de novo</i> , síntesis de desoxirribonucleótidos en plantas.	11
Figura 6	Rutas del salvamento de nucleótidos.	12
Figura 7	Ruta de salvamento de timidina.	13
Figura 8	Foto-productos UV principales	17
Figura 9	Mapa del vector pGEM®-T Easy	24
Figura 10	Esquema de la disposición de las semillas para el crecimiento en vertical.	30
Figura 11	Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen TK1a en la línea SALK_094632	32
Figura 12	Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen TK1a en la línea SALK_097767 (a)	33
Figura 13	Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen TK1a en la línea SALK_097767 (b)	34
Figura 14	Electroforesis de las clonas pGEM®-T Easy con los amplicones de plantas homocigotas	35
Figura 15	Secuencia del fragmento clonado de la línea silvestre.	36
Figura 16	Secuencia del fragmento clonado de la línea SALK_094632	36
Figura 17	Secuencia del fragmento clonado de la línea SALK_097767	37
Figura 18	Secuencia del gen <i>TK1 para Arabidopsis thaliana (GenBank)</i>	38
Figura 19	Estructura del gen <i>AtTK1a</i> y mapeo de las inserciones de T-DNA en las líneas SALK_094632 y SALK_097767	39
Figura 20	Electroforesis de RNA total de hojas de roseta de las líneas de estudio	40
Figura 21	Esquema del transcrito del gen <i>AtTK1a</i> silvestre.	40
Figura 22	Análisis de los productos de RT-PCR dúplex por electroforesis	41
Figura 23	Plántula F3 típicas de diez días de desarrollo	42
Figura 24	Plántulas F4 típicas de quince días de desarrollo	42
Figura 25	Plántulas de diecisiete días de crecimiento.	44
Figura 26	Peso fresco promedio de plántulas de diecisiete días de desarrollo	45
Figura 27	Efecto de la irradiación con UV-C en la formación de hojas verdaderas en las plántulas de los tres genotipos	46
Figura 28	Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas en plántulas seis días post-irradiación	47
Figura 29	Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas en plántulas siete días post-irradiación	47

Índice de tablas

	Descripción de la tabla	Página
Tabla 1	Mezcla de reacción para PCR	22
Tabla 2	Cebadores utilizados en la genotipificación de las líneas de inserción	22
Tabla 3	Condiciones de amplificación de las PCR	22
Tabla 4	Características del vector pGEM®-T Easy	23
Tabla 5	Condiciones de la reacción de ligación entre vector pGEM®-T Easy y los amplicones.	24
Tabla 6	Condiciones de la reacción de digestión del vector	25
Tabla 7	Cebadores utilizados en la secuenciación de cada fragmento de DNA	25
Tabla 8	Condiciones de la reacción de transcripción reversa	27
Tabla 9	Condiciones para PCR dúplex de cDNA con cebadores de tubulina y TK	28
Tabla 10	Mezcla de reacción para PCR dúplex	28
Tabla 11	Cebadores utilizados para amplificar los genes que codifican la AtTK1a y la tubulina	29
Tabla 12	Tamaño esperado de los fragmentos de PCR usando las distintas combinaciones de cebadores (a)	31
Tabla 13	Tamaño esperado de los fragmentos de PCR usando las distintas combinaciones de cebadores (b)	33

Resumen

La timidina cinasa 1 (TK1) es una enzima clave en la vía de salvamento de nucleótidos de pirimidinas que cataliza la fosforilación de la timidina para generar timidina monofosfato (TMP) utilizando ATP. En mamíferos, la TK1 participa en la replicación del DNA por lo que sus niveles de transcrito aumentan en la transición G₁/S del ciclo celular. También participa en los mecanismos de reparación del daño al DNA dependientes de la síntesis de esta macromolécula. La TK1 está conservada filogenéticamente y si bien se conocen las secuencias de los genes en varias especies de plantas, poco se sabe sobre su función en estos organismos. El genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* tiene dos genes (*TK1a* y *TK1b*) que codifican para esta enzima.

Arabidopsis thaliana permite el estudio de la función de los genes pues se dispone de una amplia colección de mutantes. El objetivo general de este trabajo fue la caracterización genotípica y fenotípica de dos líneas de inserción de T-DNA (SALK_094632 y SALK_097767) en el gen *TK1a* que permitirán estudiar la función de éste. Por ello se mapeó la inserción en cada una de las mutantes y se encontró que para la línea SALK_097767, el T-DNA está insertado en el exón 4, unas 200 pb río abajo de lo reportado en la base de datos TAIR. Mientras que para la línea SALK_094632, se corroboró que la inserción de T-DNA se encuentra en el intrón 3. Se obtuvieron plantas homocigotas de ambas líneas y en éstas no se detectó el transcrito del gen *TK1a*, por lo que concluimos que son mutantes knockout para el gen. Las plantas mutantes no mostraron ninguna diferencia evidente durante el desarrollo con respecto a las plantas silvestres. Los protocolos empleados para estudiar la respuesta de estas plantas a estrés genotóxico no fueron suficientemente sensibles y se proponen alternativas para su solución.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (DNA) constituye el material genético heredable, forma parte de los cromosomas y su duplicación ocurre por el mecanismo semiconservativo durante la fase S del ciclo celular para generar dos copias idénticas del genoma. Por su función de almacenar la información genética, es esencial mantener la integridad del DNA durante su duplicación y a lo largo de la vida de la célula. Los organismos eucariontes y procariontes han desarrollado múltiples mecanismos que participan en la reparación del DNA cuando éste es dañado. Un requisito esencial para muchos mecanismos de reparación es el abastecimiento de los precursores necesarios, los desoxirribonucleótidos trifosfato (Stasolla *et al.* 2003; Zrenner *et al.* 2006). La disponibilidad y balance de nucleótidos resulta indispensable para la supervivencia celular y para su ensamblaje se requieren bases nitrogenadas. Estos precursores, las purinas y las pirimidinas, son las moléculas que distinguen a los nucleótidos entre sí. Las bases púricas utilizadas para la síntesis de DNA son adenina y guanina, y las pirimídicas son citosina y timina. Además de éstas, los desoxirribonucleótidos (Figura 1) se caracterizan porque en el carbono 2' están unidos dos átomos de hidrógeno, en lugar de un hidroxilo como en los ribonucleótidos.

Biosíntesis de nucleótidos

Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) se pueden generar por diversas vías: reacciones de fosfotransferencia (entre nucleótidos de purina y pirimidina), reacciones de degradación (Zrenner *et al.* 2006), rutas de salvamento y la síntesis *de novo*. La síntesis *de novo* de los dNTPs inicia con la formación de las bases nitrogenadas a partir de precursores como los aminoácidos glicina, glutamina, y aspartato, así como formil tetrahidrofolato y CO₂. Las rutas biosintéticas varían entre las bases púricas y pirimídicas, e involucran doce pasos enzimáticos en el caso de las purinas, nueve para la citidina trifosfato y diez para la desoxitimidina trifosfato.

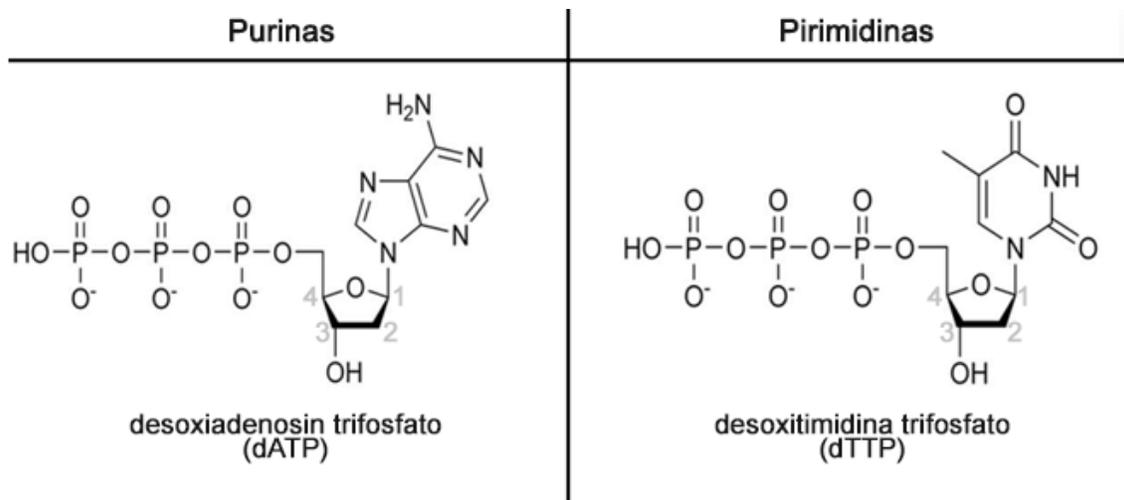


Figura 1. Ejemplos de desoxirribonucleótidos trifosfato. Purinas, dATP y pirimidina, dTTP.

Síntesis de novo

Los precursores de la síntesis *de novo* de nucleótidos son aminoácidos, 5-fosfo α -D-ribosa-1-pirofosfato –PRPP, procedente del ciclo de las pentosas–fosfato, CO_2 y NH_3 . El anillo de purina se forma a partir de glicina y aspartato, mientras que la glutamina aporta átomos de nitrógeno en reacciones de transaminación. El anillo de pirimidina proviene del aspartato para formar ácido orótico.

Biosíntesis de novo de purinas

La síntesis de las purinas, que inicia a partir de precursores simples hasta la inosina-5'-monofosfato (IMP), consiste en diez pasos metabólicos. En esta ruta se hidrolizan 4 cuatro moléculas de ATP. A partir del IMP se produce AMP o GMP que son fosforilados para formar los trifosfatos correspondientes. Estas reacciones son catalizadas por la acción de cinasas específicas dependientes de ATP. Una vez formados los ribonucleótidos, pueden ser utilizados para la síntesis de RNA o ser reducidos por la ribonucleótido reductasa (RNR) para ser incorporados al DNA (Figura 2).

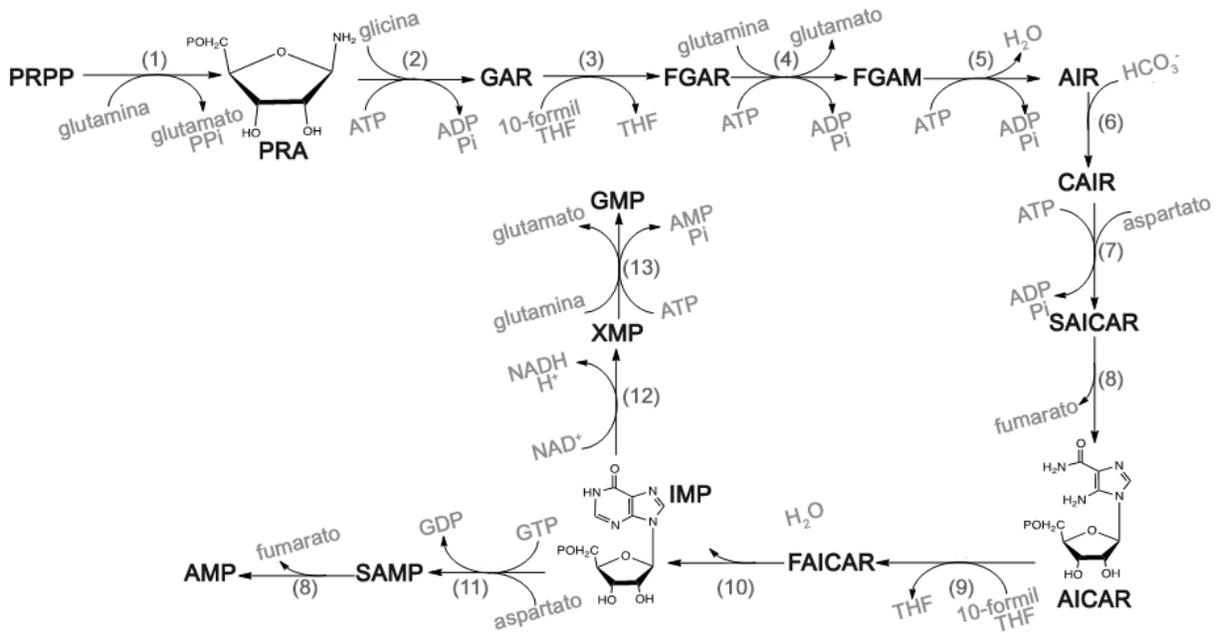


Figura 2. Ruta biosintética *de novo* de purinas en plantas. Metabolitos: PRPP, 5-fosfo- α -D-ribose-1-pirofosfato; PRA, 5-fosforribosil amina; GAR, glicinamida ribonucleótido; FGAR, formilglicinamida ribonucleótido; FGAM, formilglicina amidina ribonucleótido; AIR, 5-aminoimidazol ribonucleótido; CAIR, 5-aminoimidazol 4-carboxilato ribonucleótido; SAICAR, 5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxiamida ribonucleótido; AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido; FAICAR, 5-formamidoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido; SAMP, adenilosuccinato; XMP, xantosina-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 y modificada de Stasolla et al. 2003).

Biosíntesis *de novo* de pirimidinas

En plantas superiores, algunos detalles de esta ruta biosintética se desconocen, pero los estudios bioquímicos en algunas especies se han complementado con la información genómica obtenida en *Arabidopsis thaliana*; todo esto ha permitido tener un panorama más completo de la biosíntesis (Stasolla et al. 2003). En plantas, las enzimas que participan en la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina se localizan en el citosol, los plastídios y la mitocondria, por lo que transportadores organelares están involucrados también (Kafer et al. 2004).

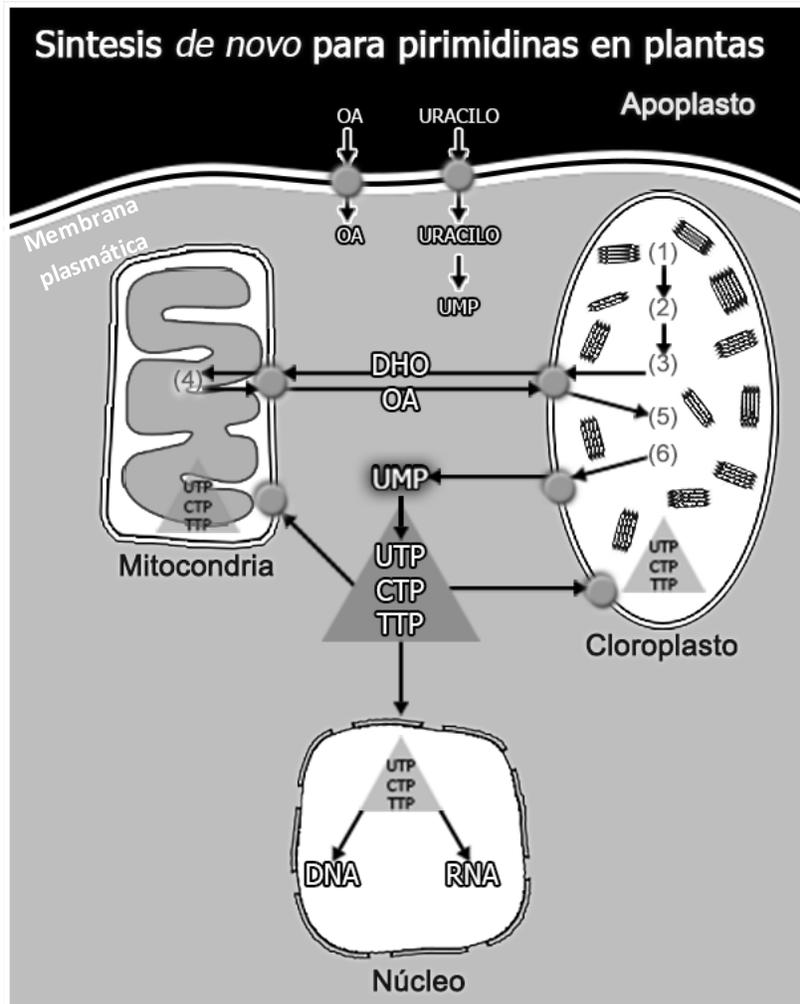


Figura 3. Transporte de intermediarios en la ruta biosintética de novo de nucleótidos de pirimidina en plantas. Metabolitos: OA, Orotato; URACILO; DHO, Dihidrorotato; UMP, Uridina monofosfato; UTP, Uridina trifosfato; CTP, citidina trifosfato; TTP, timidina trifosfato. Las enzimas de la vía: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarbamoilasa, (3) dihidrorotasa, (4) dihidrorotato deshidrogenasa, (5)-(6) UMP sintasa (orotato fosforibosiltransferasa más orotidina-5'-fosfato descarboxilasa). (Modificada de Kafer et al. 2004).

Los ribonucleótidos de pirimidina son la uridina 5'-monofosfato (UMP) y citidina 5'-monofosfato (CMP), que contienen las bases nitrogenadas uracilo y citosina respectivamente. Su síntesis comienza en el cloroplasto a partir de carbamoil fosfato y aspartato para la formación de dihidrorotato (DHO), el cual se transporta a la mitocondria donde la dihidrorotato deshidrogenasa (DHODH) forma orotato

que regresa al cloroplasto (Figura 3). En seguida, el anillo incorpora la ribosa a su estructura a partir de PRPP formando UMP. La síntesis de pirimidinas se diferencia de la de purinas en estos pasos pues el anillo de pirimidina se forma de manera independiente para que a continuación sea añadido el azúcar (Figura 4).

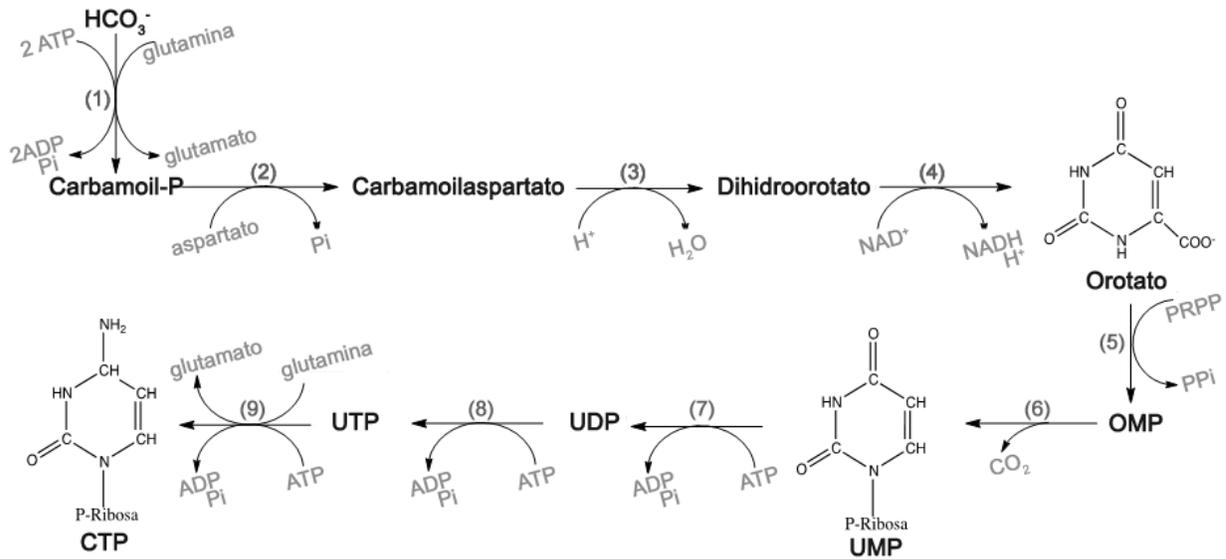


Figura 4. Ruta biosintética de novo de nucleótidos de pirimidina en plantas. Metabolitos: OMP, Orotato monofosfato; UMP, uridina monofosfato; UDP, uridina difosfato; UTP, Uridina trifosfato; CTP, citidina trifosfato. Las enzimas de la vía: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarnamoilasa, (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 y modificada de Stasolla et al. 2003).

Una vez generado el UMP, éste se fosforila en dos ocasiones para producir UTP en reacciones dependientes de ATP, y si el UTP es aminado se genera citidina trifosfato (CTP) (Stasolla et al. 2003). Para el caso de la desoxitimidina trifosfato (dTTP) el UTP es reducido y desfosforilado formando dUMP; en plantas la dUMP es metilada para formar dTMP por la timidilato sintetasa utilizando el 5,10-metilentetrahidrofolato como donador (Stasolla et al. 2003) (Figura 5). Entonces el dTMP es fosforilado consecutivamente para formar dTTP, en reacciones dependientes de ATP.

Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

La RNR cataliza la reducción del hidroxilo en el carbono 2' de la ribosa de los ribonucleótidos difosfato (NDP) formando desoxirribonucleótidos (dNDP) (Stasolla *et al.* 2003). Esta enzima contribuye al balance de las pozas de los dNTPs por lo que es esencial para la síntesis y reparación de DNA (Roa *et al.* 2009).

La síntesis *de novo* de dTTP requiere de pasos adicionales, pues transcurre a partir de un intermediario de dUTP, que es desfosforilado, metilado y trifosforilado para generar dTTP (Figura 5).

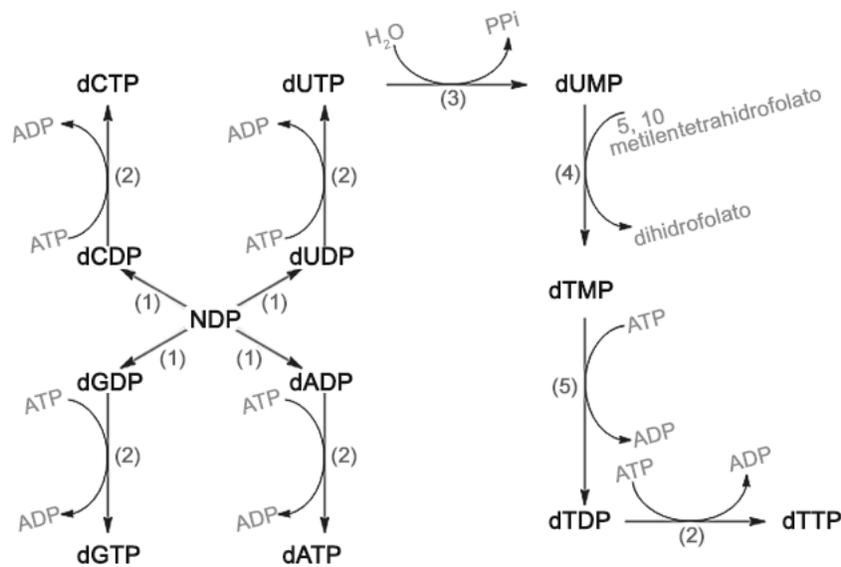


Figura 5. Ruta biosintética *de novo*, síntesis de desoxirribonucleótidos en plantas. (1) Ribonucleótido reductasa, (2) Nucleósido difosfato cinasa, (3) dUTP pirofosfatasa, (4) Timidilato sintasa, (5) Nucleósido monofosfato cinasa y/o dTMP cinasa. (Tomada de Stasolla *et al.* 2003)

Ruta de salvamento

Además de la síntesis *de novo*, la mayoría de los organismos han desarrollado a través de la evolución mecanismos capaces de utilizar nucleósidos y bases libres producidos por la degradación de DNA y RNA para generar dNTPs. Este mecanismo, llamado vía de salvamento, implica la fosforilación de los nucleósidos para formar nucleótidos trifosfato necesarios en la síntesis de ácidos nucleicos (Stasolla *et al.* 2003; Zrenner *et al.* 2006).

Las bases adenina, hipoxantina, guanina, uracilo y orotato pueden ser convertidos a sus respectivos monofosfatos por las fosforribosil transferasas utilizando PRPP como fuente de ribosa-fosfato para liberar pirofosfato inorgánico (Figura 6).

Otra ruta para reciclar bases púricas es catalizada por fosforilasas de adenosina o de inosina/guanosina, que forman un desoxinucleósido a partir de la base libre y d-ribosa 1-fosfato. Este desoxinucleósido puede ser posteriormente fosforilado por cinasas dependientes de ATP o por nucleósido fosfotransferasas inespecíficas (Figura 6).

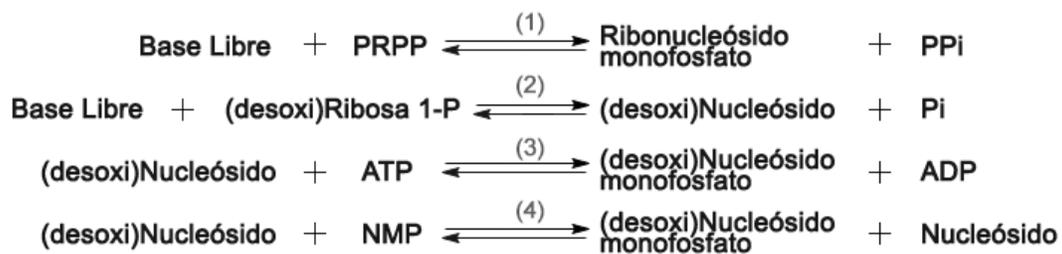


Figura 6. Rutas del salvamento de nucleótidos. 1) Adenina fosforribosil transferasa, hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, orotato fosforribosil transferasa o uracilo fosforribosil transferasa. 2) Adenosina fosforilasa e Inosina/guanosina fosforilasa 3) Nucleósido transferasa 4) Adenosina cinasa e Inosina/guanosina cinasa

Para el salvamento de los nucleósidos de uridina, citidina y timidina participan la uridina cinasa (UK) que fosforila a los dos primeros, y la timidina cinasa (TK) (Kafer *et al.* 2004; Zrenner *et al.* 2006). La TK cataliza la fosforilación de la timidina para generar timidina monofosfato (TMP) que sufre dos fosforilaciones adicionales por la timidilato cinasa para llegar hasta dTTP, el cual es incorporado al DNA (Dobrovolsky *et al.* 2003).

Timidina cinasa (TK)

La timidina cinasa es una enzima que forma parte de la vía de salvamento de pirimidinas (Figura 7) y está ampliamente distribuida filogenéticamente. La función de la TK es clave en la síntesis de DNA y por lo tanto en la división celular, su papel en la vía de salvamento de la timidina es el de la síntesis de timidina-5-fosfato (TMP) con una reacción dependiente de ATP y de Mg^{2+} . El TMP es

precursor de la timidina-5-trifosfato (TTP), nucleótido requerido en la síntesis de DNA.

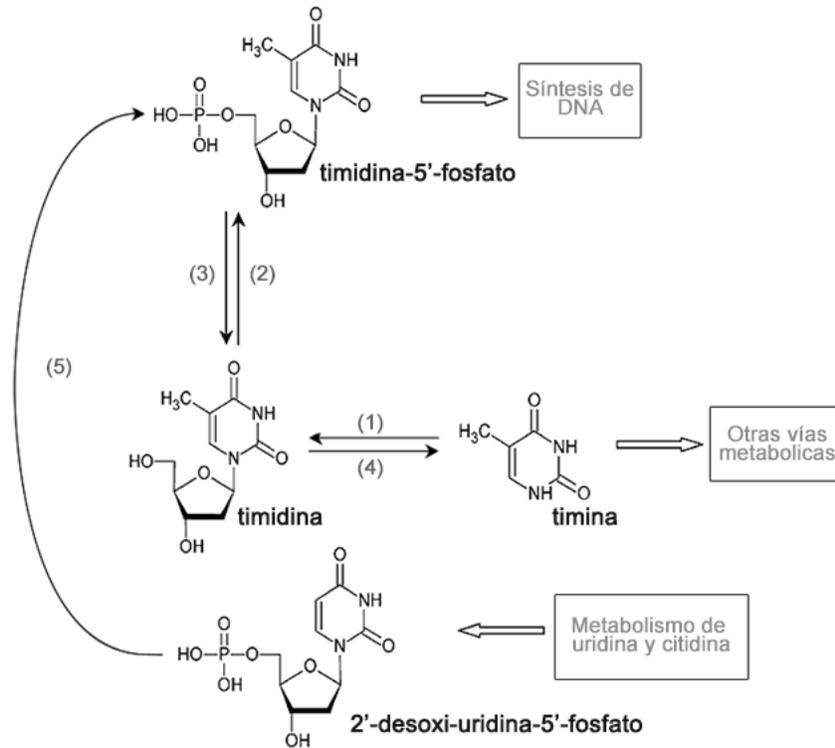


Figura 7. Ruta de salvamento de timidina. (1) Nucleosidasa, (2) Timidina cinasa, (3) 5'-Nucleotidasa, (4) Timidina fosforilasa, (5) Timidilato sintasa (dependiente de metilen-tetrahidrofolato). (Modificada de Dobrovolsky et al. 2003).

Timidina cinasa de mamíferos.

Los mamíferos tienen dos isoenzimas, TK1 y TK2. La TK1 está presente en el citoplasma y los niveles de su transcrito, proteína y actividad enzimática se incrementan durante la fase S del ciclo celular. La TK2 se localiza en la mitocondria y sus niveles son constantes, independiente de la fase del ciclo celular. Las pozas de dNTPs mitocondriales se encuentran separadas de las citosólicas debido a que la membrana interna mitocondrial es impermeable a las moléculas cargadas. Las pozas mitocondriales se mantienen, ya sea por importación de dNTPs citosólicos a través de transportadores específicos o por salvamento de nucleótidos dentro de las mitocondrias, pues las enzimas de la vía de síntesis *de novo* están ausentes en este organelo (Pontarin et al. 2003).

En las células que no están en división, donde hay niveles bajos de dNTPs citosólicos, la síntesis de DNA mitocondrial depende únicamente de las enzimas de la vía de salvamento, las desoxirribonucleósido cinasas. Dos de las cuatro cinasas humanas, la dGK y la TK2, se expresan en las mitocondrias. La dGK humana fosforila eficientemente desoxiguanosina y desoxiadenosina, mientras que la TK2 fosforila desoxitimidina, desoxicitidina y desoxiuridina (Saada *et al.* 2001).

Las mutaciones en el gen de la TK2 mitocondrial humana provocan miopatías en distintos grados y la disminución de la cantidad de DNA mitocondrial durante la infancia. La actividad enzimática de la TK2 en las mitocondrias de músculo de los pacientes se reduce entre un 14 y 45 % del valor medio de los individuos sanos (Saada *et al.* 2001).

Por otro lado, estudios con ratones knockout en el gen *TK1* revelaron algunas funciones de esta enzima. Los ratones presentan un desarrollo normal en etapas tempranas, sin embargo, su periodo de vida disminuye a menos de la mitad en comparación a la de los ratones silvestres. Asimismo, presentan neumonía crónica, esclerosis glomerular, anomalías en el bazo, páncreas, y riñones. Este fenotipo indica que la inactivación del gen *TK1* modifica el metabolismo del nucleótido de timidina, lo que se refleja en un desbalance en las pozas de dNTPs. Lo anterior sugiere que la vía biosintética *de novo* no es suficiente para corregir esta perturbación en las pozas celulares de dNTPs (Dobrovolsky *et al.* 2003).

También hay evidencias de la participación de la TK1 en reparación de DNA pues en células tumorales HTC-116 tratadas con distintos agentes genotóxicos –doxorubicina, radiación- γ e hidroxiurea– aumentan los niveles del transcrito y la proteína TK1. La vía de reparación del DNA en la que participa la TK1 está mediada por el factor transcripcional p53 que detiene el ciclo celular en la transición G1/S, regulando la expresión del gen *TK1* (Chen *et al.* 2010).

Timidina cinasa de plantas.

La TK1 está conservada en una amplia variedad de organismos, y se conocen varias secuencias de los genes de la *TK1* en plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas: *Oryza sativa* (arroz), *Medicago sativa* (alfalfa), *Solanum lycopersicon* (tomate), *Hevea brasiliensis* (árbol del caucho), *Zea mays* (maíz) y *Arabidopsis thaliana*.

Existe poca información detallada sobre la función celular de la enzima en plantas y en general los reportes sugieren que la expresión del gen *TK1* se correlaciona con las etapas de desarrollo y proliferación de las especies estudiadas.

En *H. brasiliensis*, existe una relación entre la disminución de la expresión del gen *TK*, y la incidencia del síndrome “*tapping panel dryness*” (TPD), condición que afecta la producción de caucho. En tejido no proliferativo sano se encontró que la expresión del gen *HbTK* es siete veces mayor que en árboles afectados por el TPD (Venkatachalam *et al.* 2010).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes que codifican a la timidina cinasa, uno en el cromosoma 3 (*TK1a*; *At3G07800*) y el otro en el cromosoma 5 (*TK1b*; *At5G23070*). La enzima *AtTK1a* se encuentra en el citosol, mientras que *AtTK1b* tiene un péptido de tránsito que la localiza en la mitocondria (Xu J. *et al.* 2015). La actividad de cinasa encontrada en ambas TKs es similar, catalizan la fosforilación de dT y dU para formar dTMP y dUMP respectivamente. La *TK1a* presenta su máxima expresión en hojas de la roseta, mientras que la mayor expresión de la *TK1b* se encontró en inflorescencias y silicuas, lo que indica que existe una regulación diferenciada entre los tejidos a lo largo del desarrollo (Xu J. *et al.* 2015). El peso molecular y el punto isoeléctrico teóricos de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la *TK1* de *Arabidopsis* son de 26 kDa y 6.52, para la *AtTK1a*, y de 26.4 kDa y 6.88 para la *AtTK1b* (Clausen *et al.* 2012). El porcentaje de identidad entre ambas secuencias a nivel de aminoácidos es del 62% al considerar el péptido de tránsito a la mitocondria, el sitio de unión a Mg^{2+} , el sitio de unión al fosfato y el motif LID, que forma una tapa en el sitio de transferencia de del fosfato y que se cierra al unirse el ATP (Xu J. *et al.* 2015). Las

propiedades cinéticas de estas dos TKs difieren, la AtTK1a tiene una Km de 0.62 μ M para la timidina, mientras que la AtTK1b tiene una Km de 1.4 μ M (Clausen *et al.* 2012). Ambos genes tienen expresión ubicua en los tejidos examinados, durante el desarrollo de la planta, sin embargo los niveles de transcrito de *AtTK1a* son mayores que los de *AtTK1b* (Pedroza-García *et al.* 2015).

Aunque las mutaciones en cada uno de los genes no afectan ni el crecimiento, ni el desarrollo de las plantas, las semillas de la doble mutante germinan pero las plántulas mueren durante la formación de las primeras hojas verdaderas. Estos datos sugieren que a pesar de su distinta sublocalización celular, las TK1 son redundantes, pero su actividad es esencial para el crecimiento y desarrollo vegetal (Clausen *et al.* 2012).

Estrés genotóxico en plantas.

Las plantas están expuestas a varios agentes que dañan el DNA, entre los cuales la luz ultravioleta (UV) de la radiación solar es la más relevante. La luz UV-B (290-320 nm) y la luz UV-C (180-290 nm) generan uniones covalentes entre pirimidinas adyacentes en el DNA: Los principales productos que se generan son dímeros de pirimidina ciclo butano (CPDs) y/o los foto-productos de 6,4 pirimidina-pirimidona ([6,4] PPs) (Figura 8). La presencia de los foto-productos puede bloquear el avance de la DNA polimerasa en la horquilla de replicación, pues se detiene en la región de DNA dañado. Cuando estos daños no son reparados, se puede generar una mutación por la acción de DNA polimerasas susceptibles a errores (Al Khateeb & Schroeder, 2009). Un mecanismo de reparación directo de estos daños es la fotoreactivación, mediado por la enzima fotoliasa, que rompe los enlaces covalentes formados entre las pirimidinas para reparar al DNA. El cofactor metilentetrahidrofolato (MTHF) de la fotoliasa absorbe un fotón de la luz azul y UV-A (320-400 nm) y transfiere la energía al otro cofactor (FADH) que a su vez traspassa el electrón al dímero para romper el enlace covalente. El mecanismo de reacción es análogo a la fotosíntesis, de manera que el cromóforo MTHF capta la luz y el FADH es el centro de reacción fotoquímica donando un electrón al ciclo butano (Weaver, 2002).

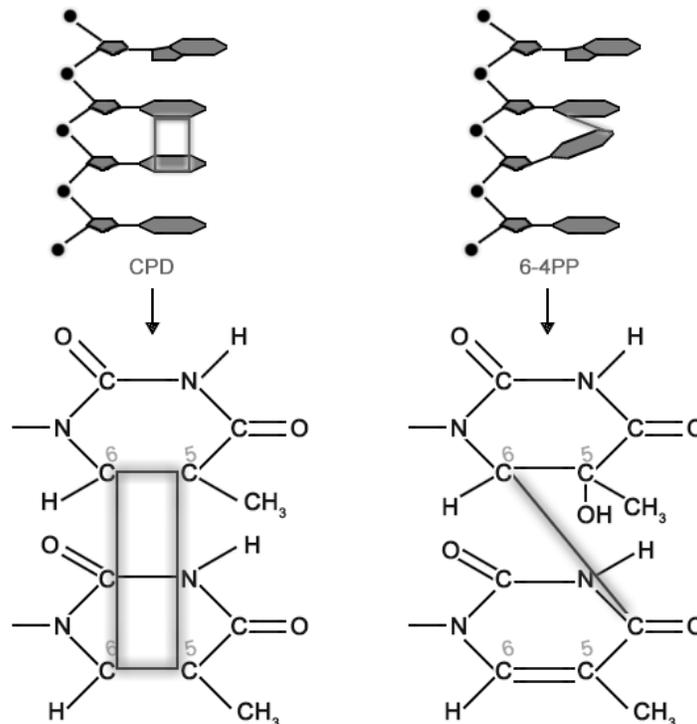


Figura 8. Foto-productos UV principales. CPD, dímeros de pirimidina ciclo butano; [6,4] PPs, foto-productos de pirimidina pirimidona.

Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

Otras vías de reparación implican la remoción de un fragmento de la cadena de DNA dañada y la síntesis de DNA que emplea a la cadena intacta como molde. Estos mecanismos de reparación conocidos como escisión de nucleótidos (NER) requieren la síntesis activa de DNA (Al Khateeb & Schroeder, 2009). A diferencia de la fotoreactivación, la NER es independiente de luz y permite la reparación de CPDs, y también de otros tipos de daño como la ruptura en una o ambas cadenas del DNA. El sistema NER actúa principalmente sobre genes activos y está acoplada a la transcripción, y mediado por cerca de 30 proteínas que son reclutadas en el sitio de la lesión. En general, los pasos que se siguen para la reparación incluyen:

- 1) el reconocimiento del daño en el DNA,
- 2) apertura local de la doble hélice,
- 3) escisión del segmento de DNA dañado,

4) reparación secuencial, síntesis y cierre de la doble cadena.

Esta vía de reparación está altamente conservada filogenéticamente y su importancia en humanos, por ejemplo, se refleja en el hecho de que mutaciones en alguno de los genes de las proteínas involucradas causa varias enfermedades como Xerodermia pigmentosa o síndrome de Cockayne, caracterizadas por una sensibilidad extrema a la luz solar y una alta incidencia de tumores.

El mecanismo de NER consiste en dos sub-vías relacionadas que difieren en la identidad del complejo proteico que detecta al DNA dañado: la GG-NER (Global Genome) que actúa de manera global en el genoma, el dímero XPC-HHR23B detecta el daño en el DNA, mientras que en la vía TC-NER (Transcription Coupled) es el complejo formado por la RNA polimerasa II con CSA y CSB al llegar a los sitios dañados en una hebra al ser transcrita. (Houtsmuller *et al.* 1999). Un vez detectado el daño, el mecanismo de reparación es común para ambas vías y éste consiste en la apertura de la doble hélice en la región por una helicasa y el corte endonucleolítico (XPF y XPG) en dos sitios de la cadena dañada de tal manera que se libera un oligonucleótido de 24-30 unidades. Dado que la cadena complementaria está íntegra, sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena de DNA y finalmente la DNA ligasa sella el último enlace fosfodiéster (Weaver, 2002).

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

Hay varias evidencias que apoyan la función del gen *TK1a* en eventos de reparación de DNA en *Arabidopsis*. Los genes de *TK1a* y *TK1b* tienen una expresión diferencial pues cuando se irradian plántulas de 7 días con luz UV-C, se induce la transcripción del gen *TK1a* durante las primeras horas post-irradiación, mientras que los niveles de transcrito del gen *TK1b* permanecen inalterados. El gen *TK1a* también es fuertemente inducido por zeocina, agente que rompe la doble cadena de DNA, y por mitomicina, agente entrecruzador del DNA. Estos datos asociativos de la función de la *TK1a* en la reparación de DNA se

confirmaron por la caracterización de una línea mutante (*oeTK1a*) que contiene una inserción de T-DNA en el promotor del gen *TK1a*. La inserción en la región promotora causa una mayor expresión del gen que en las plantas silvestres, y estas mutantes muestran una mayor tolerancia a luz UV-C y otros agentes genotóxicos, determinado por diversos parámetros como el crecimiento de raíz, longitud e integridad del meristemo y desarrollo de la parte aérea.

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

Hipótesis:

Dado que la timidina cinasa participa en vías de reparación de DNA, la eliminación de este gen causará que las plantas mutantes sean más sensibles a luz ultravioleta C.

Objetivos

Objetivo General:

Caracterizar el genotipo y el fenotipo de dos líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con una inserción de T-DNA en el gen *TK1a*.

Objetivos Particulares:

- Genotipificar dos líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, con inserciones de T-DNA en el gen *TK1a* (SALK_094632 y SALK_097767).
- Obtener plantas homocigotas de ambas líneas de inserción.
- Evaluar los niveles de expresión del gen *TK1a* en las líneas homocigotas y compararlos con los de la línea silvestre.
- Evaluar la sensibilidad de las líneas de inserción a estrés genotóxico (luz UV-C) y compararla con la línea silvestre.

Materiales y Métodos

Material biológico

Se obtuvieron semillas de las líneas mutantes (SALK_094632 y SALK_097767) de *Arabidopsis thaliana* a través del *Arabidopsis* Biological Resource Center (www.arabidopsis.org). Ambas líneas tienen una inserción de T-DNA en el gen *TK1a*. Como control se emplearon semillas de *A. thaliana* de tipo silvestre (ecotipo Columbia, Col-0).

Desinfección y siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.01%) y Tween-20 (0.05%) durante 15 minutos con agitación constante, después se centrifugaron en vortex y el líquido se decantó. Las semillas se lavaron con agua destilada en cuatro ocasiones, se sembraron 72 semillas por cada línea en medio Gamborg's B-5 (Sigma), suplementado con agar al 1.0% y sacarosa al 2%, se vernalizaron a 4°C durante 48 horas en oscuridad para sincronizar su germinación, y se incubaron a 22°C con luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en una cámara de crecimiento (Weigel, 2002). A las tres semanas se trasplantaron a macetas que contenían una mezcla de SunGroMix#3:agrolita:vermiculita en una proporción de 2:2:1.

Extracción y purificación de DNA genómico

Se tomaron hojas de la roseta de 30 plantas maduras (30 días) de cada línea de inserción y el tejido se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido, se pulverizó y las células se lisaron con una solución de Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5% a un pH de 6.8. El DNA se precipitó con isopropanol y se centrifugó a 11357 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón se disolvió en agua estéril (Edwards , *et al.* 1991).

PCR y electroforesis

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 1, para la genotipificación de las líneas mutantes. Se utilizaron diferentes cebadores cuyos nombres y secuencias se muestran en la Tabla 2. Las condiciones de las PCR se muestran en la Tabla 3. Los productos de

PCR fueron resueltos a 80mV por 40 min en geles de agarosa al 1.5% (p/v) con buffer TAE 1X y bromuro de etidio 0.05%.

Tabla 1. Mezcla de reacción para PCR.

Reactivo	Alícuota	Concentración final
Go Taq Buffer 5X + Mg ²⁺ (1.5mM)	4.0 µL	0.3 mM
dNTPs 10mM	0.4 µL	0.2 mM
Cebador Sentido 10µM	2.0 µL	6 µM
Cebador Antisentido 10µM	2.0 µL	6 µM
Go Taq Polimerasa (5 U/µL)	0.2 µL	0.05 U/µL
Molde (~1 ng/µL)	1.0 µL	0.05 ng/µL
H ₂ O	cbp 20 µL	

Tabla 2. Cebadores utilizados en la genotipificación de las líneas de inserción.

Mutante	Cebador	Secuencia (5' → 3')
SALK_094632	LPR094 (antisentido)	AAT GCA ACA ATG GAA GAA TGC
	RPF094 (sentido)	GCG ATG CTG AAA TCG AGT AAG
	LBb1.3 (antisentido)	ATT TTGCCG ATT TCG GAA C
SALK_097767	LPR094 (antisentido)	AAT GCA ACA ATG GAA GAA TGC
	RPF097 (sentido)	AAA ATG ATT GGC AGC TTG ATG
	RPF094 (sentido)	GCG ATG CTG AAA TCG AGT AAG
	LBb1.3 (antisentido)	ATT TTGCCG ATT TCG GAA C

Tabla 3. Condiciones de amplificación de las PCR.

MOLDE	Desnaturalización	Ciclos de Amplificación (35 ciclos)	Extensión final
DNA	94°C por 5 min	Desnaturalización, 94°C por 1 min Alineamiento, 60°C por 1 min Extensión 72°C por 1 min	72°C por 5 min

Una vez que se purificaron los amplicones obtenidos del DNA genómico de plantas silvestres y mutantes, se ligaron al vector pGEM como se describe a continuación.

Purificación del amplicón y reacción de ligación

Para verificar la secuencia de los fragmentos de DNA amplificados (1044 y 830 pb para plantas silvestres, 655 pb para línea SALK_094632 y 600 pb para línea SALK_097767), se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa y se cortaron del gel con una navaja en el transiluminador de luz UV y se purificaron utilizando el protocolo de MinElute® Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Se realizó una reacción de ligación utilizando el vector pGEM®-T Easy (Promega), las características del vector se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 9. La reacción fue catalizada por la DNA ligasa en una reacción amortiguada por el buffer T4 DNA Ligase (Tabla 5). La cantidad de amplicón para la reacción de ligación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(50ng \text{ de vector})(Kb \text{ de amplicón})}{Kb \text{ del vector}} * \frac{4}{1} = ng \text{ de amplicón}$$

Tabla 4. Características del vector pGEM®-T Easy.

Secuencia	Posición
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Antisentido Primer binding site	176-197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operador	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
Phage f1 region	2380-2835
Lac operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Sentido sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter	2999-3

Preparación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

Se incubó una asada de un stock en glicerol de la cepa de *E. coli* DH5α en caldo LB para ser incubado a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 590 nm de 0.375. El cultivo se centrifugó a 11357 g y el botón se lavó con una solución fría de CaCl₂ 60 mM (en glicerol al 15%) en dos ocasiones. Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para después ser centrifugadas a la misma velocidad por 7 minutos y resuspendidas en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría. Las células fueron almacenadas a -70°C.

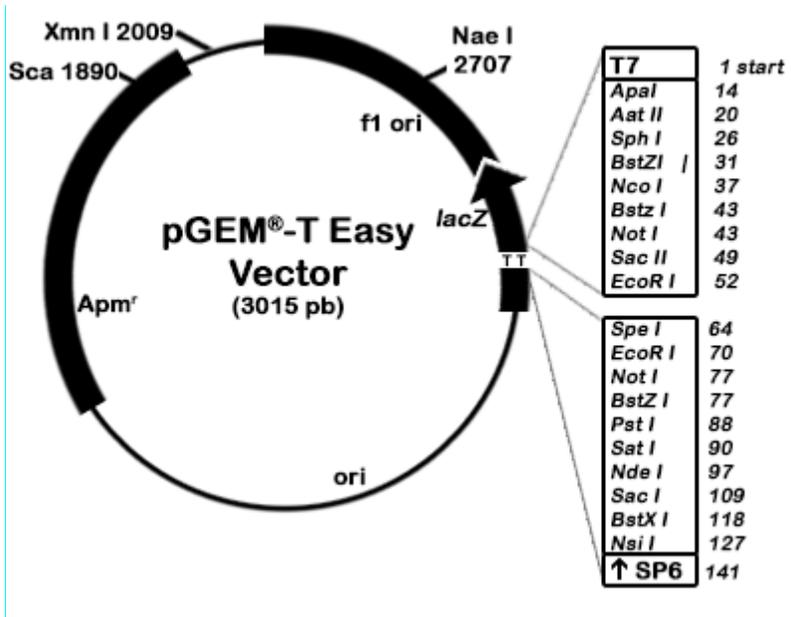


Figura 9. Mapa del vector pGEM®-T Easy.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de ligación entre vector pGEM®-T Easy y los amplicones.

Reactivo	Volumen por reacción
2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase	5 µL
pGEM® T Easy (50 ng)	1 µL
PCR product	ng de amplicón calculadas
T4 DNA Ligase (3 Weiss unit /µL)	1 µL
H2O	cbp. 10.0µL

Reacción de transformación

Se usaron 2 μL de la reacción de ligación para la transformación por choque térmico de células competentes, según el protocolo de pGEM®-T Easy Vector Ligation Reactions (Promega).

Se preparó una caja con medio LB para cada reacción de ligación, suplementada con ampicilina 0.05 mg/mL, IPTG 0.1 M y X-Gal 7.5 mM. Las células transformadas se sembraron en este medio y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Extracción de DNA plasmídico y digestión

Se extrajo DNA plasmídico de varias colonias siguiendo el protocolo de Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Se verificó la presencia del DNA clonado mediante la digestión con la enzima *Eco* RI (Tabla 6). Se desnaturalizó el DNA plasmídico con el H₂O a 95°C durante 5 minutos, se enfrió la mezcla a 4°C durante 5 minutos y se agregó el amortiguador H (10X) y la enzima, se incubó a 37°C durante 1 hora.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de digestión del vector.

Reactivo	Volumen por reacción
DNA plasmídico	(400ng)
Amortiguador H (10X)	1.5 μL
<i>Eco</i> RI (U/ μL)	1.0 μL
H ₂ O	cbp 15.0 μL

Análisis de las secuencias de DNA

Se mandaron a secuenciar los insertos clonados al Instituto de Biotecnología de la UNAM utilizando los cebadores T7 primer y SP6 (Tabla 7). Las secuencias obtenidas se leyeron fueron leídas en el programa *Chromas Lite 2.0*, y se analizaron usando las herramientas de *The European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk). La secuencias se compararon con la del gen depositada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla 7. Cebadores utilizados en la secuenciación de cada fragmento de DNA.

T7 primer	m13/pUC antisentido
5> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG >3	5> TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC >3
Amplicón de 1044 pb (silvestre)	Amplicón de 1044 pb (silvestre)
Amplicón de 655 pb (SALK_094632)	
Amplicón de 830 pb (silvestre)	Amplicón de 830 pb (silvestre)
Amplicón de 600 pb (SALK_097767)	Amplicón de 600 pb (SALK_097767)

Extracción de RNA.

Se extrajo RNA de hojas de la roseta de plantas de *A. thaliana* de 30 días de edad. Se tomó de 0.5 a 1 g de tejido y se congeló con N₂, se pulverizó hasta obtener un polvo fino, se agregó Trizol (Invitrogen) en relación 3:1 en p/v. La muestra se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL para centrifugarla a 11357 g durante 15 min a 4°C.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se le agregaron 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una mezcla 25:24:1, se agitó por inversión durante 15 s, la muestra se centrifugó a 11357 g, el sobrenadante se separó y se le agregaron 400 µL de cloroformo, se centrifugó a 11357 g durante 5 min a 4°C para recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo, este último procedimiento se repitió una vez más. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le agregó 1 volumen de isopropanol y se agitó en vórtex. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente y después se centrifugó a 11357 g por 10 minutos, el sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% en dos ocasiones, centrifugando a 11357 g por 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. El botón se resuspendió en 500 µL de agua DEPC. Se añadieron 167 µL de LiCl 8M y se incubó durante toda la noche a 4°C.

La muestra se centrifugó a 11357 *g* por 15 min y el botón se disolvió en 250 μL de H_2O -DEPC, se le agregaron 500 μL de etanol al 95% y 25 μL de acetato de sodio 3M, y se incubó toda la noche a -70°C .

La muestra se centrifugó por 20 min en frío, el sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% en dos ocasiones. Se eliminó el etanol residual y el botón se secó a temperatura ambiente durante 10 min, finalmente se resuspendió en 30-40 μL de H_2O -DEPC. Se cuantificó el RNA total utilizando el NANODROP 2000 Thermo Scientific y la muestra se almacenó a -70°C .

Densitometría

Las muestras de RNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% con buffer TAE 1X preparado con H_2O -DEPC y bromuro de etidio al 0.1%. El gel se visualizó y registró en el equipo Chemidoc™ MP System (Bio-Rad) y la densitometría de las bandas se realizó tomando como referencia la banda correspondiente al RNA ribosomal 18S, con un el software Carestream (KODAK Image Station).

Transcripción reversa (RT)

Se tomó 1 μg de RNA previamente calibrado y se desnaturalizó a 70°C durante 5 min con 1 μL de oligo-dTVN en un volumen de 5 μL con H_2O (DEPC), se mantuvo en hielo durante 5 min, se agitó en vórtex y se le añadió la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 8 con un volumen final de 20 μL . La mezcla se incubó a 25°C por 5 minutos y posteriormente a 42°C por 1h; para inactivar la enzima la mezcla de reacción se calentó a 70°C por 15 min.

Tabla 8. Condiciones de la reacción de transcripción reversa.

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer Improm 5X	4 μL	1X
MgCl_2 25mM	2.4 μL	3 mM
dNTPs 10mM	1 μL	0.5 mM
Transcriptasa Reversa (U/ μl)(Promega)	1 μL	0.05 U/ μL
RNA desnaturalizado	5 μL	0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
H_2O (DEPC)	cbp 20 μL	

Reacción de PCR y electroforesis

Se utilizó el cDNA, producto de las reacciones de la RT, como molde en una PCR dúplex durante 35 ciclos con las condiciones mostradas en la Tabla 9 y con la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 10, los cebadores utilizados para amplificar regiones de los cDNAs de los genes *AtTK1a* y de tubulina (control de cargado) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 9. Condiciones para PCR dúplex de cDNA con cebadores de tubulina y TK.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	60 s
Alineación	55°C	70 s
Extensión	72°C	80 s

Tabla 10. Mezcla de reacción para PCR dúplex.

Reactivo	Alícuota	Concentración final
Go Taq Buffer 5X + Mg ²⁺ (1.5mM)	4.0 µL	0.3 mM
dNTPs 10mM	0.5 µL	0.25 mM
Cebador Sentido GKAtTK1a 10µM	3.0 µL	1.5 µM
Cebador Antisentido AT3TK 10µM	3.0 µL	1.5 µM
Cebador Sentido Tubulina 10µM	1.0 µL	0.5 µM
Cebador Antisentido Tubulina 10µM	1.0 µL	0.5 µM
Go Taq Polimerasa (5 U/µL)	0.2 µL	0.05 U/µL
Molde	5 µL de cDNA	
H ₂ O	cbp 20 µL	

Tabla 11. Cebadores utilizados para amplificar los genes que codifican la AtTK1a y la tubulina.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Amplicón
TK1	GKAtTK1a F	GCTATTCACCATCGCTACCTAAAA	896 pb
	AT3TK1 R	TGGTCTGGTTTATCCTTAATGTTG	
Tub	Tub F	GTC AAGAGGTTCTCAGCAGTA	483 pb
	Tub R	TCACCTTCTTGATCCGCAGTT	

Los productos de PCR fueron resueltos a 60mV por 30 min en geles de agarosa del 2.5% (p/v) con buffer TAE 1X y bromuro de etidio.

Caracterización fenotípica.

Para evaluar el efecto de las inserciones de T-DNA en el gen *TK1a*, se evaluaron varios parámetros fenotípicos durante el desarrollo y en respuesta a la irradiación con luz UV-C.

Comparación de peso fresco de plántulas

Para este ensayo se utilizaron cajas de medio Gamborg's B-5 con sacarosa al 2% y agar al 1%. Se utilizaron las líneas: 1) silvestre, 2) sobreexpresora (*oeAtTK1a*) y 3) knockout. (SALK_097767). Se sembraron diez cajas de medio con diez semillas de *A. thaliana* por línea (5 cajas control y 5 para ser tratadas con luz UV-C). Las semillas se sembraron sobre una línea recta para poder observar el crecimiento de la raíz de las plántulas (Figura10). Las semillas se vernalizaron en la oscuridad durante 2 días a 4°C y se incubaron durante 5 días a 22°C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 horas de oscuridad. Cinco cajas por línea se irradiaron con luz UV-C (10 kJ/m²) durante 6 minutos, se cubrieron de la luz con papel aluminio y se incubaron a 22°C durante 12 días en oscuridad, finalmente se registró el peso promedio de las diez plántulas frescas de cada réplica y sus controles.

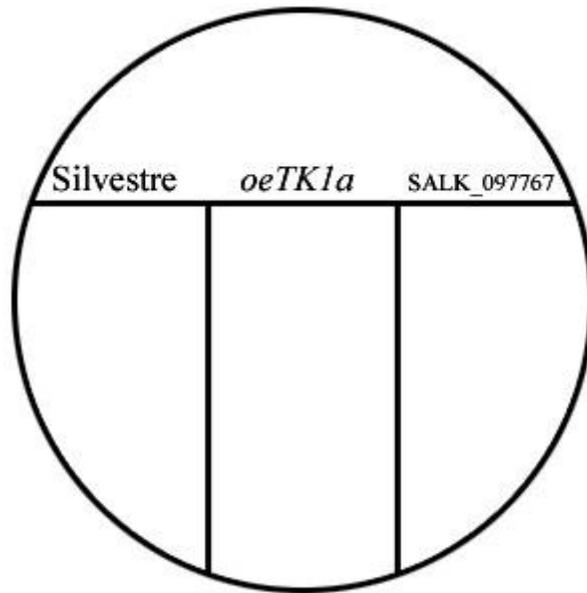


Figura 10. Esquema de la disposición de las semillas para el crecimiento en vertical. Se sembraron las semillas en la línea horizontal sobre medio GB-5/sacarosa al 2%/agar al 1%. Las cajas permanecieron en posición vertical durante su crecimiento.

Comparación de las hojas verdaderas y del color de las plántulas

Se sembraron de 60 a 80 semillas de *A. thaliana* de ambas líneas mutantes y silvestres en un medio sólido de crecimiento (Gamborg's B-5 con sacarosa al 2% y agar al 1%), se vernalizaron en oscuridad a 4°C durante 2 días. Las cajas se transfirieron a la incubadora con fotoperiodo de 16 horas de luz blanca y 8 horas de oscuridad a 22°C. Se trataron al cuarto día de crecimiento con luz UV-C por 6 min (10 kJ/m²)¹, se cubrieron de la luz con papel aluminio y se incubaron en la cámara de crecimiento con fotoperíodo. Al tercer día de crecimiento en oscuridad se retiró el papel aluminio permitiendo que la planta siguiera creciendo hasta el día doce, se registró el número de plantas que mostraron hojas verdaderas en cada caja los días diez, once y doce (Rosa *et al.* 2013).

¹ Previo a los tratamientos se esterilizó el interior de la cabina de irradiación con etanol 70% y se dejó correr la lámpara con la máxima dosis de luz UV-C. Las cajas deben ser abiertas, tratadas y cerradas dentro de la cabina.

Resultados

Genotipificación de las líneas SALK_094632 y SALK_097767 y obtención de plantas homocigotas.

Para verificar y mapear la inserción de T-DNA en las dos líneas mutantes de la colección SALK, así como para identificar plantas homocigotas con la inserción, se extrajo DNA genómico de 30 plantas de cada una de las líneas. El DNA se empleó como molde en reacciones de PCR con los cebadores que se presentan en la Tabla 2 pues permiten detectar la presencia del T-DNA insertado y el sitio de inserción (Figura 11).

De acuerdo con la secuencia del genoma de *A. thaliana* y con la información proporcionada por TAIR, los tamaños esperados de los fragmentos de DNA con cada combinación de cebadores se presenta en la Tabla 12. La Figura 11 muestra un gel representativo de estos resultados que permitió identificar plantas homocigotas; en la parte superior de los carriles se encuentran los cebadores utilizados para cada reacción de PCR, se amplificaron fragmentos de 1044 y 655 pares de bases. Con estos resultados y la información de la Tabla 12 se distinguieron las plantas homocigotas.

Tabla 12. Tamaño esperado de los fragmentos de PCR usando las distintas combinaciones de cebadores (a). Genotipificación de las mutantes SALK_094632 y SALK_097767.

Línea	SALK_094632		SALK_097767	
	RPF094/ LPR094	RPF094/ LBb1.3	RPF097/ LPR094	RPF097/ LBb1.3
Plantas silvestres	1044 pb	Sin amplicón	830 pb	Sin amplicón
Plantas heterocigotas	1044 pb	655 pb	830 pb	450 pb
Plantas homocigotas	Sin amplicón	655 pb	Sin amplicón	450 pb

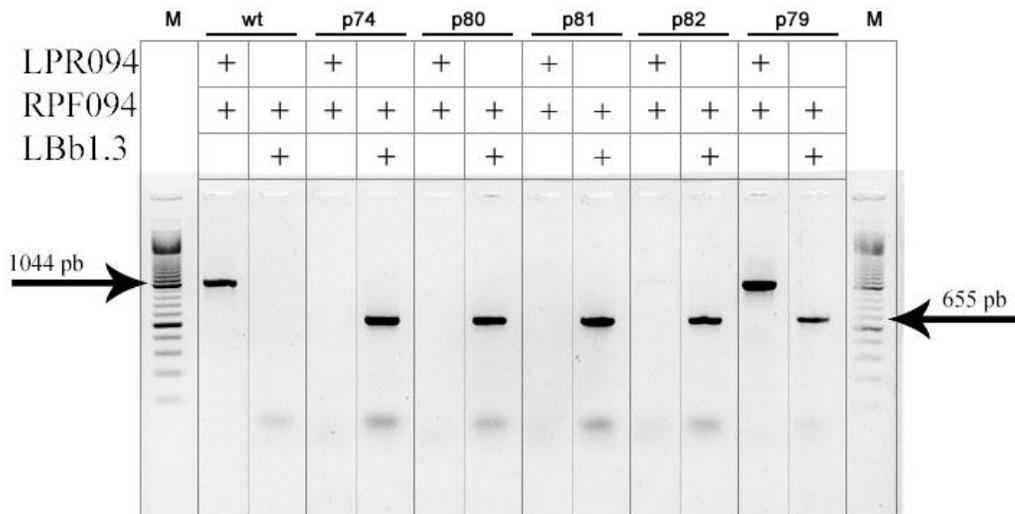


Figura 11. Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen *TK1a* en la línea *SALK_094632*. En la parte superior de cada carril se indica la planta analizada y la mezcla de cebadores utilizada, se aplicaron 10 ng de DNA en cada caso. **M) Marcador de tamaño (100 pares de bases).**

Por el patrón de la presencia/ausencia de amplicones, se determinó si los fragmentos provenían de plantas silvestres que carecían de la inserción de T-DNA, o bien de plantas que lo contenían en uno de los alelos del gen *TK1a* (heterocigota) o en ambos (homocigota). Por ejemplo, del gel que se muestra en la Figura 11 se deduce que la planta 82 fue homocigota para la inserción de T-DNA mientras que la planta 79 fue heterocigota.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis de los fragmentos amplificados para la genotipificación de la mutante *SALK_097767* con los cebadores de la Tabla 2. Sin embargo, los resultados con estas combinaciones de cebadores no fueron concluyentes, pues se encontró una banda de aproximadamente 650 pb con los cebadores RPF097/LBb1.3 (carril 3), en plantas silvestres, lo que parece un artefacto.

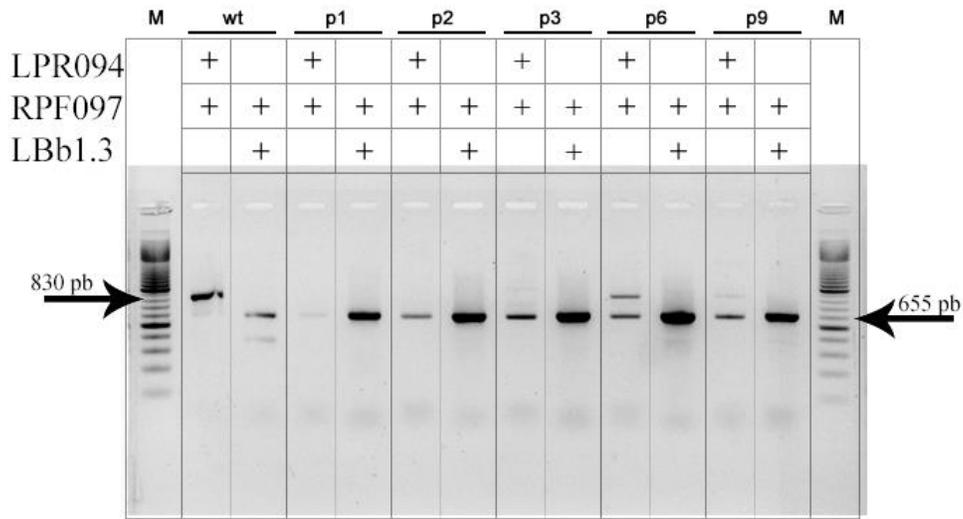


Figura 12. Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen *TK1a* en la línea *SALK_097767*. En la parte superior de cada carril se indica la planta analizada y la mezcla de cebadores utilizada, se aplicaron 10 ng de DNA en cada caso. **M)** Marcador de tamaño (100 pares de bases).

Para poder completar el análisis, se incluyó el cebador antisentido (**RPF094**) y con las combinaciones de cebadores que se muestran en la Tabla 13 se obtuvieron fragmentos distintos según el genotipo de la planta.

Tabla 13. Tamaño esperado de los fragmentos de PCR usando las distintas combinaciones de cebadores (b). Genotipificación de las mutantes de la línea *SALK_097767*.

Línea	<i>SALK_097767</i>	
	<i>RPF097/LPR094</i>	<i>RPF094/LBb1.3</i>
<i>Plantas silvestres</i>	830 pb	Sin amplicón
<i>Plantas heterocigotas</i>	830 pb	655 pb
<i>Plantas homocigotas</i>	Sin amplicón	655 pb

La Figura 13 muestra un gel representativo del análisis realizado para identificar plantas homocigotas de la línea *SALK_097767*.

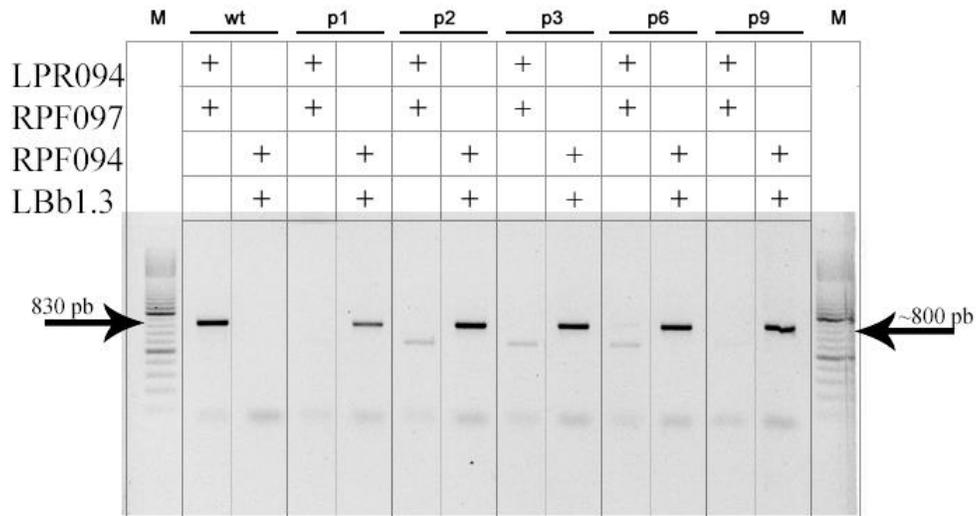


Figura 13. Separación electroforética de fragmentos de DNA amplificados a partir de cebadores para el gen *TK1a* en la línea *SALK_097767*. En la parte superior de cada carril se indica la planta analizada y la mezcla de cebadores utilizada, se aplicaron 10 ng de DNA en cada caso. **M) Marcador de tamaño (100 pares de bases).**

En las plantas silvestres, los cebadores **LPR094** y **RPF097** permitieron la amplificación de un fragmento de DNA de 830 pb correspondiente al gen *TK1a* (carril 1). Mientras que los cebadores **RPF094** y **LBb1.3** amplificaron un fragmento de DNA de aprox. 800 pb conteniendo el extremo del T-DNA y parte de la secuencia del gen *TK1a*. Este amplicón es unas 200 pb mayor al tamaño esperado según la base de datos TAIR (Tabla 13). Entonces, por el patrón de bandas (Figuras 12 y 13), se determinó que la planta 6 era heterocigota y las plantas 1, 2, 3 y 9 eran homocigotas.

De las plantas que resultaron homocigotas, tanto silvestres como de las líneas de inserción, se sembraron semillas hasta obtener la generación F3.

Verificación de la identidad del inserto de T-DNA por secuenciación.

Para verificar la identidad de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, se obtuvieron las secuencias respectivas. Para ello se aislaron los amplicones y se clonaron en el vector pGEM®-T Easy. La Figura 14 muestra la digestión del

plásmido con la enzima *Eco RI* para liberar los fragmentos de los tamaños esperados (Figura 14).

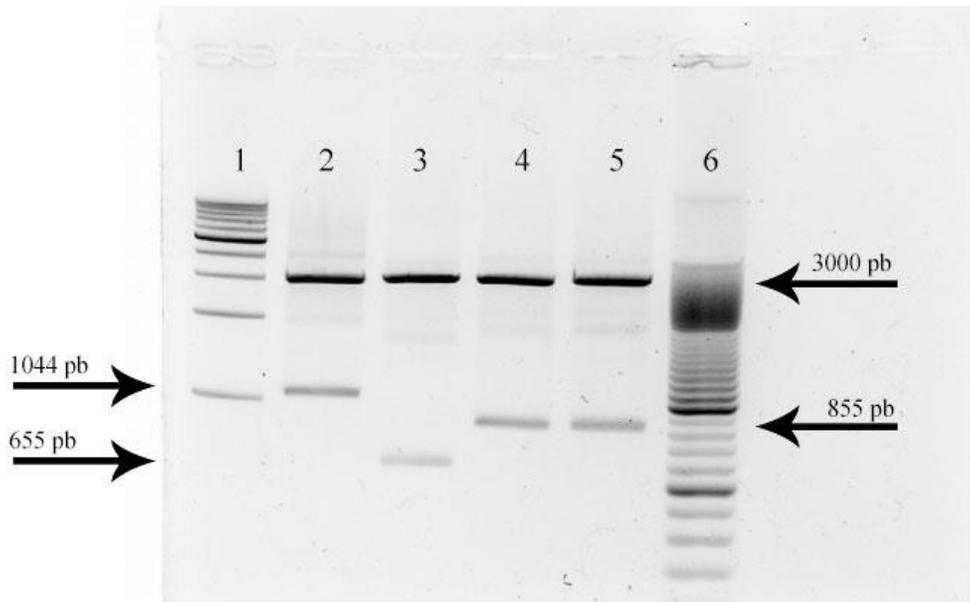


Figura 14. Electroforesis de las clonas pGEM T-Easy con los amplicones obtenidos en la genotipificación de las plantas. El plásmido pGEM-TEasy se digirió con la enzima *Eco RI*. Orden de cargado: 1) Marcador 1 kpb, 2) pGEM-TEasy-libera el amplicón de 1044 pb obtenido de plantas silvestres, 3) pGEM-TEasy libera el amplicón de 655 pb, obtenido de plantas mutantes 094. 4 y 5) pGEM-TEasy- libera el amplicón de 855 pb obtenido de plantas mutantes 097. 6) Marcador 100 pares de bases.

Análisis de las secuencias de DNA y mapeo de la inserción en el gen *TK1a*

En las secuencias se localizaron los cebadores utilizados en las reacciones de PCR, cuya secuencia se muestra en la Tabla 2.

Al comparar las secuencias obtenidas de la línea silvestre (Figura 15), de la línea SALK_094632 (Figura 16) y de la línea SALK_097767 (Figura 17) con las secuencias reportadas del gen *AtTK1a* (Gen Bank; Figura 18), se comprobó que el DNA de las plantas silvestres contenía íntegra la secuencia del gen (Figura 19). Por su parte, en los fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de las líneas SALK se localizó la secuencia parcial del T-DNA. La Figura 19 presenta

diagramas que muestran la localización de T-DNA en ambas líneas SALK, así como la posición de los cebadores utilizados en la genotipificación.

```
>94wtT7
      GC GATGCTGAAA TCGAGTAAGG ATACGAGATA CGCMAAAGAT TCGGTGGTGA
CACATGATGG AATGGATTCC CTGCTGGCTC TCCAGATCTC ATGTCATTCC TGAGAAATTC
GGACTAGATG CTTATAACAA GGTAATAAAT TCGATGCTCT ATTTGGTGTT TCGGGTCTTA
ATTGTGAAGG ATCTGTATTG AATTTGTGTT TTTCTCTTAA AATGATTGGC AGCTTGATG
GATTGGTATT GATGAGGCTC AGTTCCTTGG AGATCTTTAT GAGTTTGTGCT GCAAAGTCGC
TGATGATGAT GGTAAAATTG TGATCGTTGC TGGCCTAGAT GGTGACTATT TAAGGTGCTT
CATCTAGTA CCAAAGCTGT GATTTTGATA TTTTACTTCA ATGTTTAAACA ATTTTGTTGA
CTGTAAAATG TGAATTGAT CTCTCTATGT GCAGGAGGAG TTTTGGGGCT GTACTTGACA
TTATACCAAT AGCTGATTCT GTGACTAAGC TAACTGCAAG GTGTGAGGTC TGTGGACATA
AAGCTTCTT CACTTTAAGA AAGAATTGTG ACACCAGAAC TGAGCTTATT GGTGGAGCTG
ATGTCATATG GCCTGTTTGT CGCAAGCATT ACATCACTAA TCATATTGTT ATTAAAGCCT
CTAAGAAAGT CTTGGAAGAT TCTGACAAGG CTAGAGCTGA ATCCTGTGTT GCTGCTACAA
TCTAACTATA AATGATATGG AACAAAGCAAC ATATGTTATG GTGAAGTTT CTTTCTTTT
TGGTTGTTTGG TTTTCTTTAC TGGTCTGGTT TATCCTTAAT GTTGTCTTTG AAATACACTT
GTGATGTTCA TTGTATATAA ATATAAGTTT GATGCTTTCT CTACAGCCTC TGGTCCATGT
TTCATACTCT TCATTTTCCA AGACCACCTA GTTTTTCGAG TTGGACTTAC AATGTTGCGT
ATGAGAGGTT GTTTTGTGAC AGAAGCATT TTTTCATCAG ATCCTGGATT TGATACTTGT
GGATTCCGAT TCTTCCATTG TTGCA
```

Figura 15. Secuencia del fragmento de 1044 pb amplificado con los cebadores RPF094 y LPR094 a partir de DNA genómico de plantas línea silvestre. Las secuencias de los cebadores RPF094 y LPR094 están resaltadas en gris y en negro la secuencia del cebador RPF097.

```
>13633 94LB.T7
      G CGATGCTGAA ATCGAGTAAG
GATACGAGAT ACGCAAAAGA TTCGGTGGTG ACACATGATG GAATTGGATT CCCTTGCTGG
GCTCTTCCAG ATCTCATGTC ATTTCTGAG AAATTCGGAC TAGATGCTTA TAACAAGGTA
ATAAATTCGA TGCTCTATTT GGTGTTTCGG GTCTTAATTG TGAAGGATCT GTATTGAATT
TGTGTTTTCC TCTTAAAATG ATTGGCAGCT TGATGTGATT GGTATTGATG AGGCTCAGTT
CTTTGGAGAT CTTTATGAGT TTTGCTGCAA AGTCGCTGAT GATGATGGTA AAATTGTGAT
CGTTGCTGGC CTAGATGGTG ACTATTTAAG GTGCTTCAT
      Ubicación del inserto
      A ACAAATTGAC AAATTGACGC
TTAGACAACT TAATAACACA TTGCGGACGT TTTTAATGTA CTGGGGTGGT TTTTCTTTTC
ACCAGTGAGA CGGGCAACAG CTGATTGCC TFCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC
AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCCAGCAGG CGAAAATCCT GTTTGATGGT GGTTCGAA
TCGGCAAAAT
```

Figura 16. Secuencia parcial del amplicón de 655 pb obtenido con los cebadores RPF097 (gris) y Lb1.3 (negro) a partir de DNA genómico de la línea SALK_094632.

>97.M13

```
GCGATGC TGAAATCSAG TAAGGATACG AGATACRCAA AAGATTCGGT GGTGACACAT
GATGGAATTG GATTCCCTTG CTGGGCTCTT CCAGATCTCA TGTCATTTCC TGAGAAAATTC
SGACTAGATG CTTATAACAA GGKAATAAAT TCRATGCTCT ATTTGGTGTT TCGGGTCTTA
ATTGTGAAGG ATCTGTATTG AATTTGTGTT TTTCTCTTAA AATGATTGSC AGCTTGATGT
GATTGGTATT GATGAKGCTC AKTTCTTTGG AGATCTTTAT GAGTTTTGCT GCAAAGTCRC
TGATGATGAT GGTA AAAATTG TGATCGTTGC TGGCCTASAT GGTGACTATT TAAGGTGCTT
CATCCTARTA CCAAAGCTGT GATTTTGATA TTTTACTTCA ATGTTTAAACA ATTTTGTGA
CTGTAAAATG TGGAATTGAT CTCTCTATGT GCAGGAGGAG TTTWGGGGCT GTACTTGACA
TTATACCAAT AGCTGATTCT GTGACTAAGC TAACTGCRAG GTGTGAGGTC TGTGGACATA
AAGCTTTCTT CACTTTAASA AAGAATTGTG ACACCAKAAC TGASCTTATT GGTGGAGCTG
ATGTCTAT
```

Ubicación del inserto

```
AA CAAATTGACG CTTAGACAAC TTAATARCAC ATTGCGGACG TTTTAAATGT
ACTGGGGTGG TTTTTCTTTT CACCAGTGAG ACSGGCAACA KCTGATWGCC CTTCACCGCC
TGRSCCTGAS AGAGTTGSAK CAAGCGGWCC ACGCTGGTTT GCCCCARCAS GYKAAAATCC
TGTWVGATGG TGGTTCCGAA TCGGCAWAT
```

Figura 17. Secuencia parcial del amplicón de 850 pb obtenido con los cebadores RPF094 (gris), LBb1.3 (negro) a partir de DNA genómico de la línea SALK_097767.

Promotor

CTCCAGCAATTTTCTTCCTTGTCAACTTCTGGATGTCCGCGTATATATATCTTCAACAAGCTATTCACCATCG
CTACCTAAAACCACAAGCAAATGAACCCTTCTCCCTTTTTTCATCTACAAACCATCTTTTCTCTCAAGTCTC
TG

Primer Exón

CCATGGCGACTCTCAAAGCTTCCTTTTTGATCAAAACCCTCGACAGTGACGTCACCGGAGATTTTCTCTCCGAT
CTGGAACGTCGTGGGTCAGGTGCTGTTTCATGTTATCATGGGCCTATGTTTTCTGGGAAATCGACCTCTCTCT
TCGCCGAATCAAGTCAGAGATCAGCGACGGAAG

Primer Intrón

gtacagtttattttctatctccgtagattttaattgtagatctatctccgtaaatttcttaatttcggtgtttt
ggttaagcaga

Segundo Exón

AGTGTTCGCGATGCTGAAATCGAGTAAGGATACGAGATACGCAAAGATTTCGGTGGTGACACATGATGGAATTGG
ATTCCCTTGCTGGGCTCTTCCAGATCTCATGTCATTTCTGAGAAATTCGGACTAGATGCTTATAACAAG

Segundo Intrón

gtaataaattcogatgctctatgttggtgtttcgggtcttaattgtgaaggatctgtattgaatttggtgttttct
cttaaaatgattggcagcttgatgtga

Tercer Exón

TTGGTATTGATGAGGCTCAGTTCCTTGGAGATCTTTATGAGTTTTGCTGCAAAGTCGCTGATGATGATGGTAAA
ATTGTGATCGTTGCTGGCCTAGATGGTGACTATTTAAG

Tercer Intrón

gtgcttcacccctagtaccaaagctgtgattttgatattttacttcaatgtttaacaattttgttgactgtaaaa
tgtggaattgatctctctatgtgcagg

Cuarto Exón

AGGAGTTTTGGGGCTGTACTTGACATTATACCAATAGCTGATTCTGTGACTAAGCTAACTGCAAGGTGTGAGGT
CTGTGGACATAAAGCTTCTTCACTTTAAGAAAGAATTGTGACACCAGAACTGAGCTTATTGGTGGAGCTGATG
TCTATATGCCTGTTTGTGCAAGCATTACATCACTAATCATAATTGTTAATAAGCCTCTAAGAAAGCTTTGGAA
GATTCGACAAGGCTAGAGCTGAATCCTGTGTTGCTGCTACAATCTAA

5' UTR

CTATAAATGATATGGAACAAGCAACATATGTTATGGTGAAGTTTTCTTTCTTTTTTGGTTGTTTGGTTTCTTTA
CTGGTCTGGTTTATCCTTAATGTTGTCTTTGAAATACACTTGTGATGTTTCATTGTATATAAATATAAGTTTGAT
GCTTTCTCTACAGCCTCTGGTCCATGTTTCATACTCTTCATTTTCCAAGACCACTTAGTTTTTCGAGTTGGACT
TACAAATGTTGCGTATGAGAGGTTGTTTTGTGACAGAAGCATTCTTTTCATCAGATCCTGGATTTGATACTTGTG
GATTCGCATTCTTCCATTGTTGCATTGCTCTGGTTTAAAGAAGCACTGTTTTCTTGATCCACCTTCATCACTGAA
AGGTATCTCTAGGGAGCAAACATTTGATGCTAGAGGTGTCCTCACTGTTGTGAATCTCGAATCACTCTTTGGAC
CGAGACCATAGATCTTGACATCTACGTCTACTTCATGCTGCTGGAATATTGAAACTCTTGTTCAGTCGGTTC
TGCTCCAGATCTTAATGTAAGGATACATAAACATTAAT

Figura 18. Secuencia del gen TK1a para Arabidopsis thaliana (Gen Bank). En gris se observan las secuencias de los cebadores RPF094 (sentido) yLPR094 (antisentido).

En la línea mutante SALK_094632, la inserción de T-DNA se localizó en el inicio del tercer intrón, mientras que en la línea mutante SALK_097767, la inserción de T-DNA se mapeó en la región intermedia del cuarto exón con una diferencia de

unas 200 pb hacía la región 3'UTR, con respecto a la información que se tenía de ABRC (Figura 19).

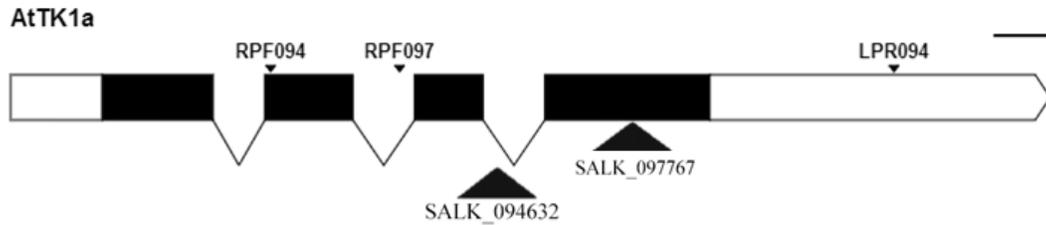


Figura 19. Estructura del gen AtTK1a y mapeo de las inserciones de T-DNA en las líneas SALK_094632 y SALK_097767. Se muestran en cajas negras los exones y con líneas intermedias los intrones; se indican las posiciones de los cebadores en la parte superior y los sitios en los cuales se encuentran los insertos de T-DNA en cada línea mutante en la parte inferior. En la esquina superior derecha se puede ver la escala con una línea que representa 100 pb. (Esquema realizado con wormweb.com)

Niveles de transcrito del gen TK1a en las líneas SALK_94 Y SALK_97.

Para determinar si la inserción de T-DNA abatía los niveles de transcrito en estas líneas mutantes homocigotas, se extrajo el RNA total de plántulas crecidas durante diez días. La calidad e integridad del RNA se verificó por electroforesis horizontal en un gel de agarosa y se empleó la banda del RNAr 18S para el análisis densitométrico y la calibración de las muestras (Figura 20).

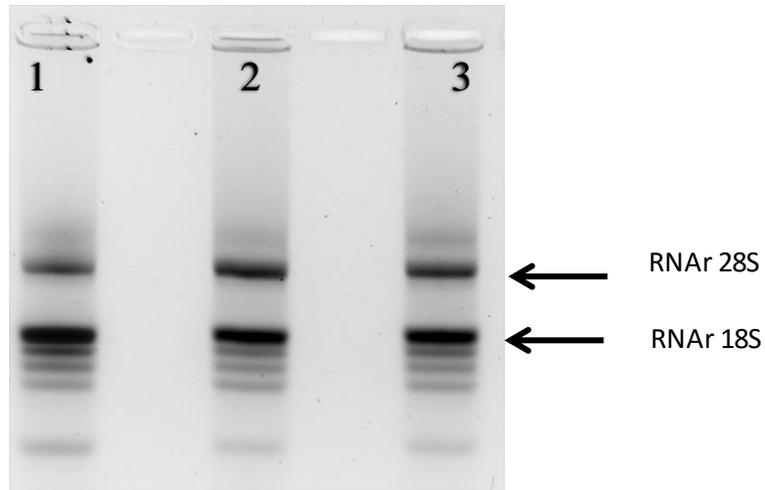


Figura 20. Electroforesis de RNA total de hojas de roseta de las líneas de estudio. Se utilizó gel de agarosa al 2.5%: 1) planta silvestre, 2) línea SALK_097767, y 3) línea SALK_094632. Se empleó el RNAr 18S para el análisis densitométrico en la calibración.

A partir de 1 µg de RNA se sintetizó el cDNA que se empleó como molde en una PCR con los cebadores GKAtTK1a(f) y AT3TK(r) cuyas secuencias se alinean en las regiones 5' y 3'-UTR del cDNA (Tabla 11 y Figura 21) y generan un amplicón de 896 pb. Se incluyeron también los cebadores para amplificar un fragmento del cDNA (483 pb) del gen de tubulina como control de carga.



Figura. 21 Esquema del transcrito del gen AtTK1a silvestre. Las flechas indican la posición de los cebadores GKAtTK1a (f) y AT3TK (r) que contienen el transcrito maduro de la TK. En la esquina superior derecha se puede ver la escala con una línea que representa 100 pb. (Esquema realizado con wormweb.com)

Los productos de RT-PCR se separaron por electroforesis y la Figura 22 muestra que el cDNA de las plantas silvestres permitió la amplificación de ambos productos con los tamaños esperados (carriles 1 y 4). En contraste, para las líneas mutantes únicamente se amplificó el producto correspondiente al transcrito de tubulina, pero no se detectó el de TK1a.

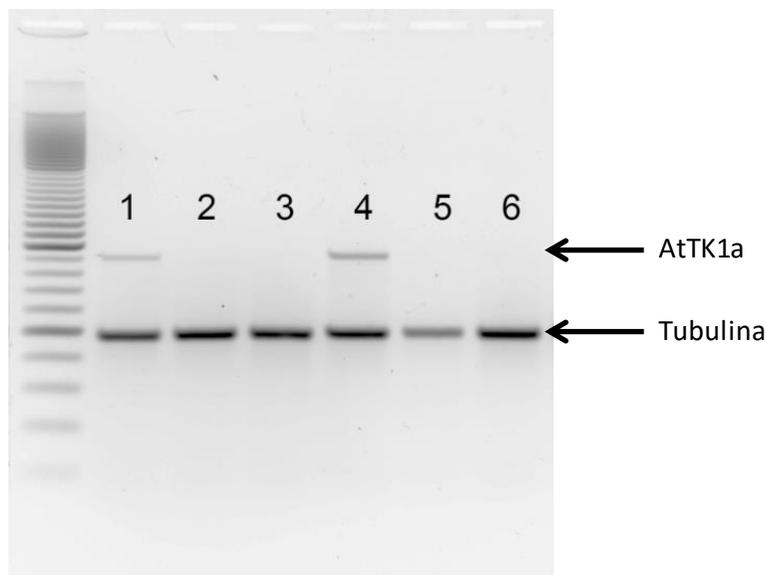


Figura 22. Análisis de los productos de RT-PCR dúplex por electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa (2.5%). Orden de cargado: Marcador 100 pares de bases, cDNA planta silvestre (1, 4), cDNA mutante SALK_09767 (2, 5), cDNA mutante SALK_094632 (3,6). Se indica la posición donde migran los amplicones de *AtTK1a* (869 pb) y de *AtTub* (483 pb).

Los resultados de este experimento son consistentes con el hecho de que la inserción de T-DNA en el gen *TK1a* estuviera generando niveles bajos de expresión del gen y/o inestabilidad de los transcritos, y por ello no fueron detectables por esta técnica. De los resultados anteriores se concluyó que las mutantes de inserción SALK_094632 y SALK_09767 fueron knock-out para *AtTK1a*.

Caracterización fenotípica de las líneas mutantes SALK_094 y SALK_097.

Para estudiar la función del gen *TK1a* durante el desarrollo, se emplearon plantas de las generaciones F3 y F4 de las líneas mutantes SALK_094 y SALK_097. Durante la germinación y desarrollo de la plántula no se observaron diferencias entre la línea silvestre (Col-0) y las mutantes. El tamaño de las plántulas y el color de los cotiledones fueron semejantes en ambas líneas (Figura 23).

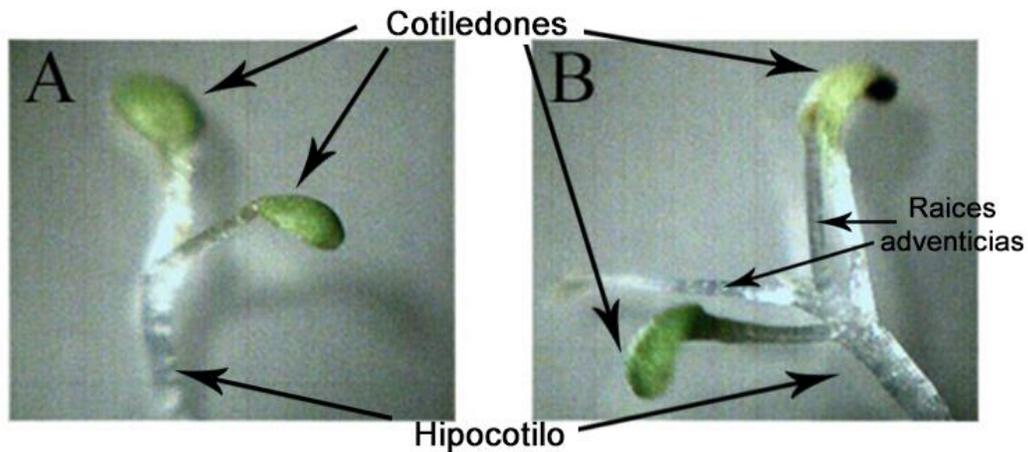


Figura 23. Plántulas F3 típicas de diez días de desarrollo. Se utilizó un aumento 10x, **A)** línea silvestre Col-0 y **B)** línea SALK_097767.

En la figura 24 se muestran plántulas de 15 días de las diferentes líneas en la misma caja. No se observaron diferencias fenotípicas entre las líneas silvestres y las mutantes. Se observó el desarrollo de las plantas hasta los 30 días, tiempo en el cual no hubo diferencias evidentes entre las líneas estudiadas.



Figura 24. Plántulas F4 típicas de quince días de desarrollo. Se observan tres grupos de plántulas, a la izquierda las silvestres, en el centro las mutantes SALK_097767 y a la derecha las mutantes SALK_094632 n=6.

Respuesta a estrés genotóxico. Ensayos con luz UV-C.

Para evaluar la respuesta de las plantas mutantes a estrés genotóxico, se irradiaron plántulas de 5 días con luz UV-C (10 kJ/m^2) durante 6 minutos y se incubaron en oscuridad por 12 días más para prevenir la fotoreactivación. La Figura 25A muestra una fotografía representativa de las plántulas control (sin irradiar) crecidas en la oscuridad por 12 días. Las plántulas irradiadas (Figura 25B) muestran una raíz de menor tamaño, más delgada, enredada y ramificada que las plántulas control. Otro cambio entre las plántulas tratadas con luz UV-C y las control es el color de los cotiledones, en las control se observa un color verde, mientras que las tratadas muestran clorosis. Además, las imágenes sugieren que las plantas irradiadas comenzaron el crecimiento del tallo antes que las plántulas control, el epicotilo de las plántulas irradiadas se observa de mayor tamaño que el hipocotilo. Sin embargo, no se observaron diferencias evidentes entre los tres genotipos estudiados.

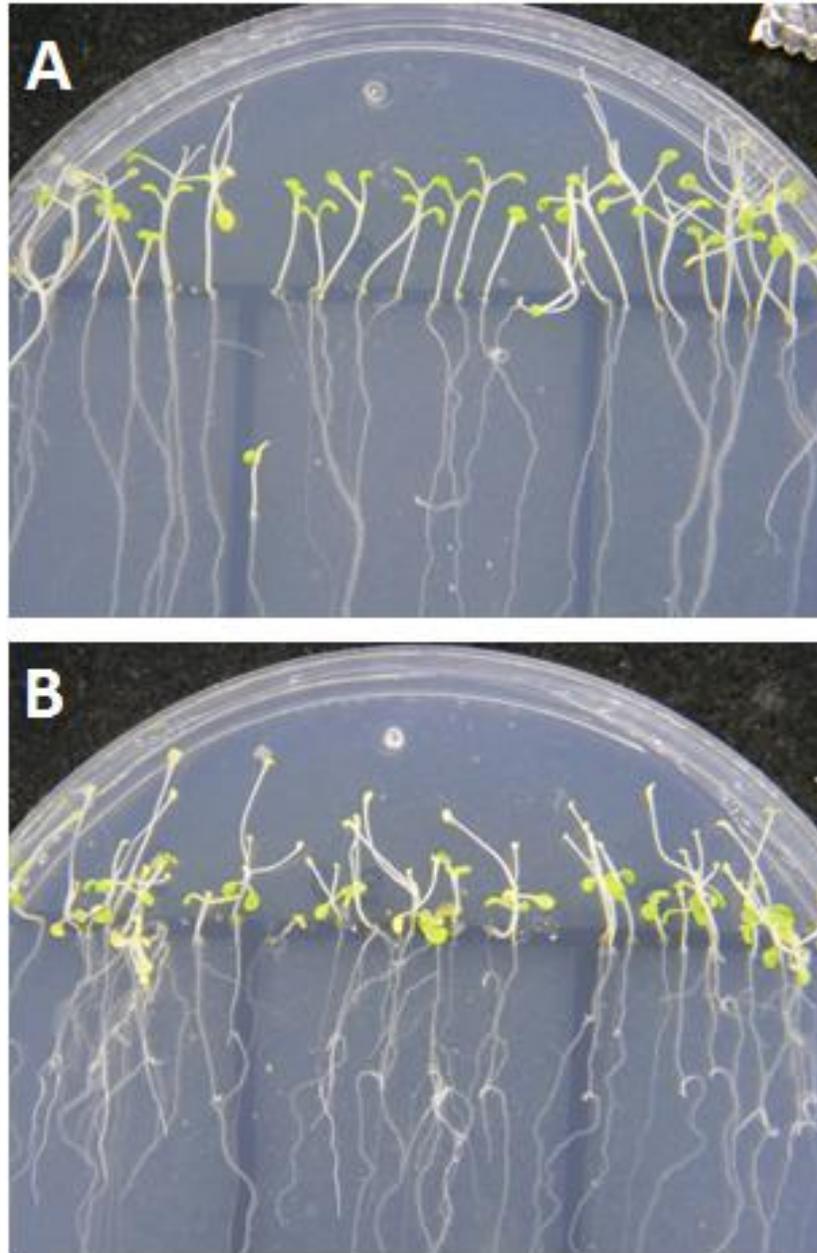


Figura 25. Plántulas de diecisiete días de crecimiento. **A)** Las semillas crecieron en condiciones estándar durante cinco días, al sexto día se irradiaron con luz UV-C durante 6 min y se cubrieron de la luz durante doce días. A la izquierda se observa el grupo de plántulas silvestres, en el centro el grupo de plántulas sobre-expresoras y la derecha la mutante SALK_097767 (KO). **B)** Las plántulas crecieron en condiciones estándar hasta el quinto día, se irradiaron con luz UV-C durante 6 min y se cubrieron de la luz hasta el día doce. A la izquierda se observa el grupo de plántulas silvestres, en el centro el grupo de plántulas sobre-expresoras y la derecha la mutante SALK_097767 (KO).

Se evaluó el peso fresco como parámetro para evaluar la tolerancia relativa a la irradiación de UV-C en los tres genotipos. La Figura 26 muestra que si bien, el peso fresco de las plántulas irradiadas fue aparentemente menor que el de las plantas control, la diferencia no fue significativa ($p < 0.1$), por lo que el parámetro no fue lo suficientemente sensible para evaluar la tolerancia a este tipo de estrés genotóxico.

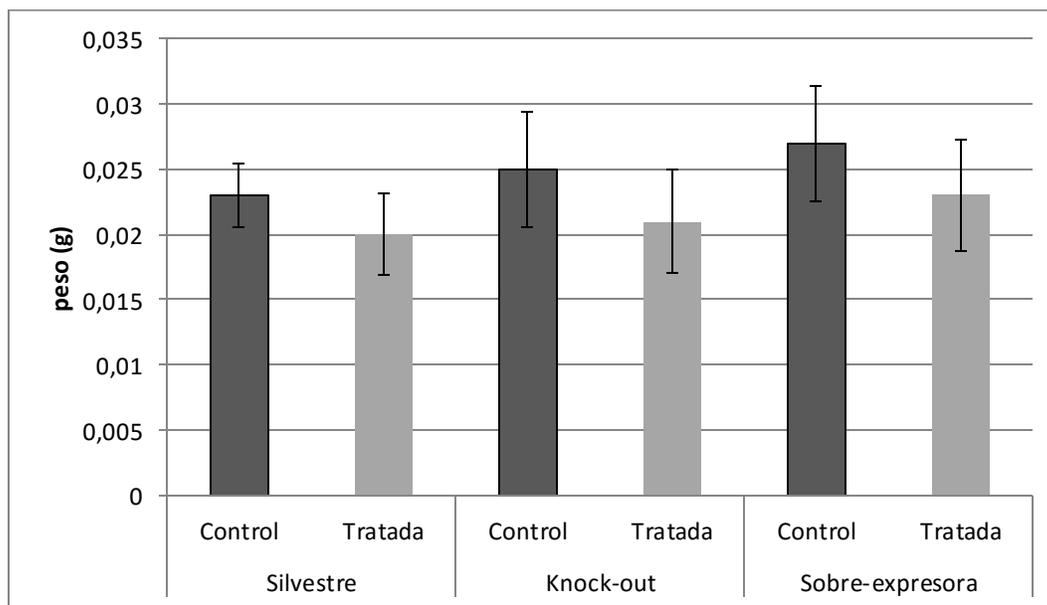


Figura 26. Peso fresco promedio de plántulas de diecisiete días de desarrollo. Las plántulas control se crecieron en oscuridad a partir del quinto día de germinación. Las plántulas tratadas se expusieron a luz UV-C el quinto día y posteriormente se crecieron por doce días antes de ser analizadas, $n=50$. Utilizando una prueba de ANOVA se determinó que no existe diferencia entre las muestras.

Ensayo de hojas verdaderas.

Se montó un ensayo para evaluar los efectos de la radiación UV-C en las plantas silvestres y en las líneas con los dos genotipos mutantes a través de la determinación del porcentaje de plántulas que muestran hojas verdaderas a 5 y 6 días post-irradiación. La figura 27 muestra plántulas representativas de los distintos genotipos evaluados.

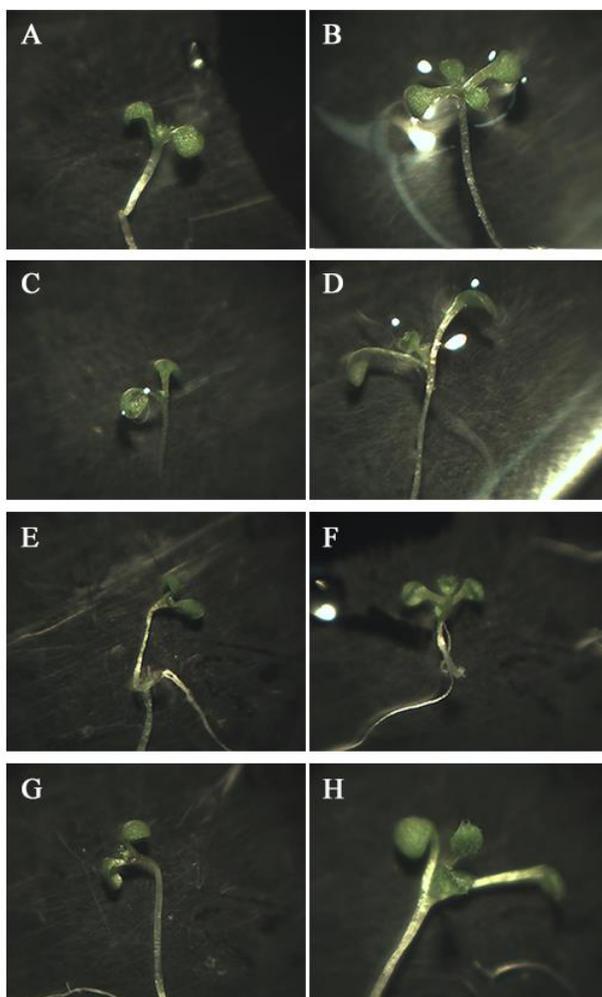


Figura 27. Efecto de la irradiación con UV-C en a formación de hojas verdaderas en las plántulas de los tres genotipos. Se muestran plántulas representativas de cada línea. A) SALK_094632 irradiada con primordios de hojas verdaderas, B) SALK_094632 sin irradiar con hojas verdaderas, C) SALK_097767 sin irradiar sin hojas verdaderas, D) SALK_097767 sin irradiar con hojas verdaderas. E) OeAtTK1a irradiada sin hojas verdaderas, F) OeAtTK1a irradiada con hojas verdaderas, G) Silvestre irradiada con primordios de hojas verdaderas, H) Silvestre sin irradiar con hojas verdaderas.

De manera similar a lo que observamos con el peso fresco, este protocolo tampoco permitió distinguir la sensibilidad entre los genotipos pues no hay una diferencia significativa en el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas de plantas irradiadas y sin irradiar (Figuras 28 y 29).

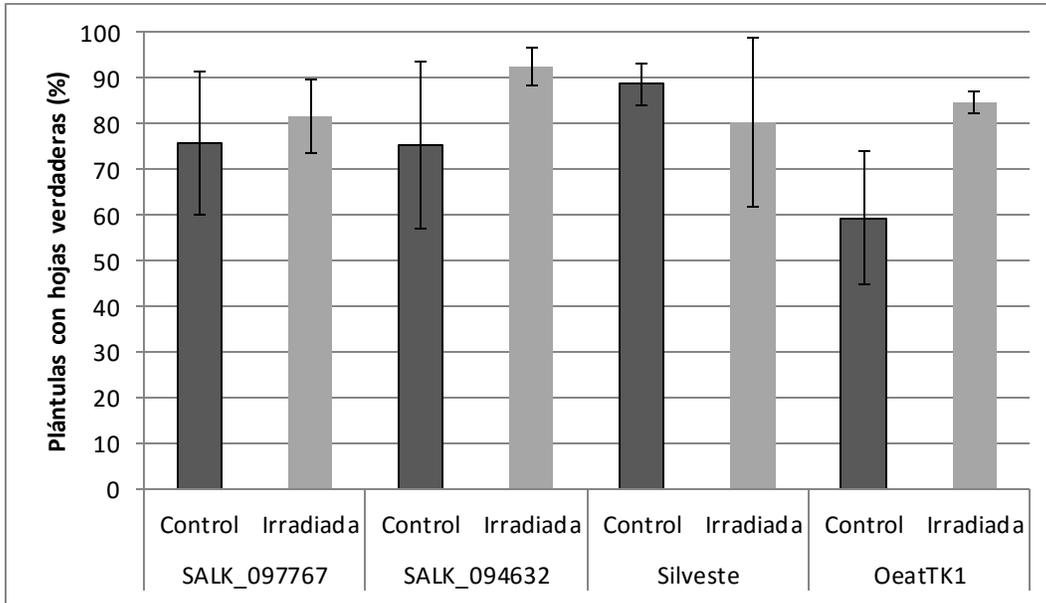


Figura 28. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas en plántulas seis días post-irradiación. Las plántulas crecieron por tres días y se irradiaron con luz UV-C, se crecieron en oscuridad por tres días más, al noveno día se contaron las plántulas con hojas verdaderas de cada medio, los porcentajes obtenidos en cada réplica se analizaron por medio de una ANOVA ($n = 210$).

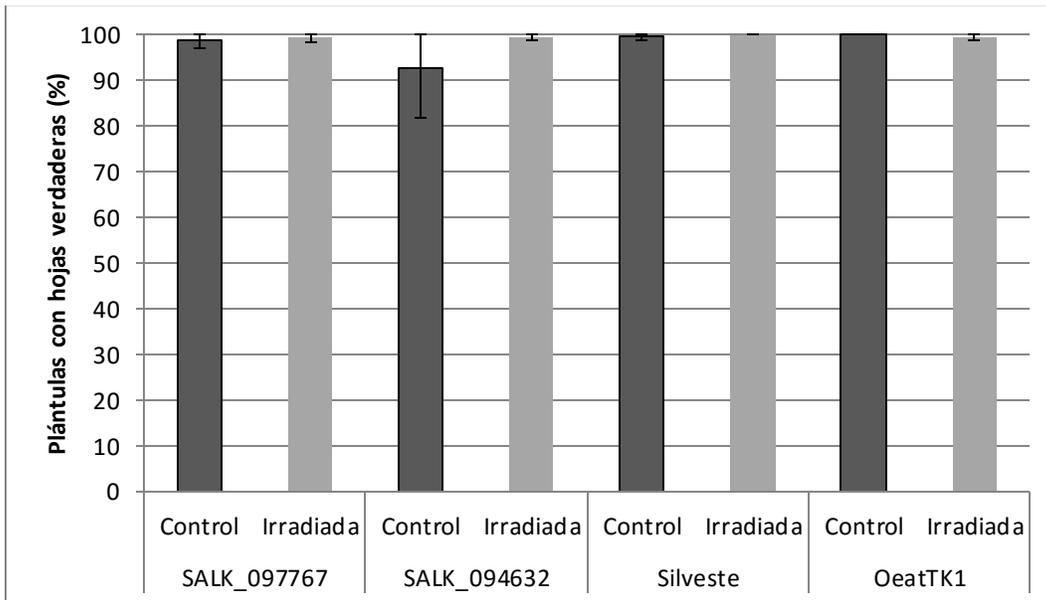


Figura 29. Porcentaje de plántulas con hojas verdaderas en plántulas siete días post-irradiación. Se siguió el experimento planteado en la figura 27, el décimo día se contaron las plántulas con hojas verdaderas, $n = 210$.

Discusión

En este trabajo se obtuvieron y genotificaron plantas homocigotas de las líneas SALK_094632 y SALK_097767 que contienen una inserción de T-DNA en el gen *TK1a* (At3g07800). Se mapeó la inserción en cada una de las mutantes y se encontró que para la línea SALK_097767, el T-DNA está insertado en el exón 4, unas 200 pb río abajo de lo reportado en la base de datos TAIR. No se detectó el transcrito en plantas homocigotas de ambas líneas mutantes por lo que podemos asumir que son plantas KO en el gen *TK1a*. Estas plantas facilitarán el estudio de la función de dicho gen durante el desarrollo y en respuesta a estrés genotóxico, y para ello se deben emplear protocolos más sensibles que permitan esta investigación.

La genotipificación se realizó con cebadores que se aparean en exones del gen *TK1a* y un cebador que se encuentra en la zona flanqueante del T-DNA (Tabla 1). Los productos obtenidos en las amplificaciones de la línea SALK_094632 permitieron corroborar la inserción de T-DNA. Sin embargo, encontramos problemas al utilizar las combinaciones de cebadores RPF097/LPR094 y RPF097/LBb1.3, pues generaron artefactos de aproximadamente 600 pb, que es un tamaño similar (655 pb) al del fragmento esperado del alelo mutante. Esto dificultó la caracterización de la línea SALK_097767, por lo que optamos por incluir al cebador RPF094 en lugar del cebador RPF097 para la búsqueda del alelo mutante. Este cambio facilitó la identificación clara a las plantas mutantes homocigotas.

El uso de esta combinación de cebadores permitió la amplificación de un fragmento de DNA que fue aproximadamente 200 pb más largo que lo esperado según el reporte de la base de datos de la colección de mutantes TAIR. La secuencia del fragmento de DNA reveló que el T-DNA está insertado en el exón 4 del gen *TK1a* (Figura 19).

El mapeo de las inserciones de T-DNA también permitió obtener plantas homocigotas para la mutación pues se confirmaron 4 líneas independientes tanto para SALK_094632 como para SALK_097767.

Para determinar si el T-DNA de cada mutante modifica los niveles de transcrito del gen *TK1a* se extrajo RNA de las hojas de roseta de plántulas de 30 días de desarrollo de las líneas de inserción y de la silvestre. La densitometría de la banda de RNA en el gel se realizó tomando como parámetro la banda del RNA ribosomal 18S, y se sintetizó el cDNA. Para determinar la presencia del transcrito de TK1, se emplearon los cebadores que se aparean en zonas 5'UTR (GKA_tTK1a) y 3'UTR (AT3TK) del RNA mensajero del gen *TK1a*, por lo que se amplificaría prácticamente el cDNA completo. Esta amplificación se observó a partir de la preparación de RNAs de plantas silvestres pero no de las mutantes. La calidad del RNA y la eficiente síntesis del cDNA se corroboró por la amplificación de un fragmento del cDNA del gen de tubulina en todas las muestras. El hecho de que no detectamos la presencia del transcrito *TK1a* en las mutantes SALK_94 y SALK_097, por una técnica tan sensible como PCR se explica por la presencia del T-DNA. En el caso de la línea SALK_094 en la que el T-DNA está insertado en el intrón 3, el procesamiento de éste no elimina el T-DNA y no se produce un RNA mensajero maduro funcional. Asimismo, en la línea SALK_097 la inserción de T-DNA causaría inestabilidad del transcrito o síntesis incompleta de éste. Estos resultados permiten concluir que las líneas de inserción, SALK_094632 y SALK_097767, son *knockout* para *TK1a*. La medición de la actividad enzimática de TK en estas líneas sería exclusiva de TK1b por lo que resulta interesante investigar si es capaz de compensar la falta de TK1a.

Dado que el gen *Tk1a* es inducido por agentes genotóxicos que no modifican la expresión del gen *TK1b* (Pedroza-García *et al.* 2015), se decidió evaluar la respuesta al daño por luz UV-C y su capacidad de reparación en oscuridad de las líneas KO para el gen *TK1a*. Los experimentos planteados para evaluar el fenotipo de las plántulas irradiadas no presentaron diferencia en peso fresco o desarrollo de hojas verdaderas al ser comparadas con plántulas silvestres con el mismo

tratamiento. Sin embargo la diferencia obtenida en la misma línea entre las plántulas irradiadas y no irradiadas tampoco fue significativa, por lo que para la realización de este estudio se necesitan protocolos más sensibles que permitan la evaluación del fenotipo de las plantas. Esta caracterización aportará más información sobre la función de gen *TK1a* durante el desarrollo y en respuesta a estrés genotóxico.

Respuesta a exposición a luz UV

Se comparó la respuesta a la irradiación con luz UV de diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana*, en la línea mutante *oetk1a*, que sobreexpresa el transcrito de la *TK1a*, se observa un fenotipo de menor sensibilidad como respuesta a radiación con luz UV-C al ser comparada con la línea silvestre (Pedroza-García *et al.* 2015). Por lo tanto, el fenotipo que esperamos de las mutantes *TK1a* es de hipersensibilidad a estrés genotóxico pues muchas mutaciones en proteínas sensoras, transductoras, mediadoras o efectoras de la respuesta al daño al DNA producen estos efectos. Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis* con la mutación en el gen *atr*, que codifica para una proteína transductora de la respuesta de daño al DNA (DDR), es fenotípicamente normal pero presenta hipersensibilidad a la exposición a agentes que inducen daños en el DNA como hidroxurea (HU), afidicolina y luz UV-B. Por ejemplo, la hidroxurea provoca un 40% de inhibición en el crecimiento de la raíz de las plántulas silvestres pero un 95% de inhibición en plántulas mutantes *atr* (Culligan *et al.* 2004). La HU inhibe a la RNR provocando la depleción de dNTPs disponibles para la síntesis de DNA. Este tipo de estrés replicativo se centra en la síntesis *de novo* de dNTPs por lo que permite evaluar la contribución de la ruta de salvamento y por lo tanto la función de la *TK1a*. Por otro lado, la radiación UV-B causa una reducción del 70% en el crecimiento de la raíz de plántulas mutantes *atr*, comparado con plantas silvestres que no son afectadas por la dosis empleada (2.5 J/s/m²).

También, la mutante del gen *atm*, otro transductor de DDR, es sensible a diferentes agentes que inducen daño al DNA; la radiación ionizante (80 Gy)

causan una disminución en la elongación radicular y eventualmente su detención permanente en las plántulas mutantes, mientras que las plantas silvestres se recuperan días después de la radiación. Sin embargo, estas plantas no son hipersensibles a luz UV-B en las dosis probadas de hasta 1 J/cm² (García *et al.* 2003).

Por otro lado, la mutante en el gen *SOG1*, que codifica para la proteína efectora principal de la vía de DDR, no presenta hipersensibilidad a luz UV-B. Asimismo, estas plantas mutantes no presentan muerte celular cuando son expuestas a agentes que producen ruptura de la doble cadena de DNA, lo que sugiere que *SOG1* regula esta respuesta ante el estrés genotóxico (Biever *et al.* 2014; Yoshiyama *et al.* 2014).

La respuesta de otras plantas a radiación con luz UV-B es heterogénea, la petunia (*Petunia hybrida*) presenta estimulación y proliferación celular (Staxen and Bornman, 1994), en *Brassica carinata* y *Medicago sativa* se presenta un incremento en el espesor de la hoja (Bornman and Vogelmann, 1991), mientras que en lechuga (*Lactuca sativa*) la luz UV-B reduce el ritmo de crecimiento y el tamaño final de hojas (Wargent *et al.* 2009a).

Caracterización fenotípica de las líneas de inserción.

Clausen *et al.* (2012) caracterizaron diferentes líneas de inserción de T-DNA en los genes TK de *Arabidopsis thaliana*. Estas mutantes simples de *AtTK1a* o *AtTK1b* no presentan efectos evidentes en el desarrollo y crecimiento. Sin embargo, la doble mutante germina y expande los cotiledones pero muere en este estadio. En este trabajo, las dos líneas mutantes homocigotas de *TK1a* se desarrollaron de manera similar a las plantas del genotipo silvestre durante el crecimiento y maduración. Esta información corrobora que la mutación simple en el gen *TK1a* no tiene un fenotipo letal en *Arabidopsis*, y que es posible que la

enzima TK1b compense esta deficiencia a pesar de que se encuentra en otro compartimento celular, posiblemente la mitocondria.

Resumen

1. Se obtuvieron plantas homocigotas de las dos líneas de inserción (SALK_094632 y SALK_097767).
2. Se caracterizaron genotípicamente dos líneas de inserción de T-DNA (SALK_094632 y SALK_097767) en el gen *TK1a* de *Arabidopsis thaliana* y se corroboró el sitio de la inserción.
3. Las líneas SALK_09463 y SALK_097767 son KO para *TK1a*.
4. La interrupción del gen *AtTK1a* no afectó la germinación de las semillas, el desarrollo de las plantas ni su reproducción.

Conclusión

Plantas homocigotas con mutación en el gen *TK1a* (líneas SALK_094632 y SALK_097767) no presentaron un fenotipo diferente de la línea silvestre en respuesta a la luz UV-C pues las técnicas para evaluar esto no fueron lo suficientemente sensibles.

Perspectivas

1. Continuar con la caracterización fenotípica de las líneas mutantes tras su exposición a otros agentes genotóxicos.
2. Estudiar el efecto del silenciamiento del gen *AtTK1a* en las diferentes etapas del desarrollo y la posible respuesta del gen *AtTK1b*.
3. Determinar la actividad de las enzimas TK en las líneas de inserción y compararla con la de las plantas silvestres.
4. Determinar la actividad de las enzimas TK como respuesta al daño genotóxico en diferentes tejidos y etapas de desarrollo.

Bibliografia

- Al Khateeb, W., Schroeder D. (2009) Overexpression of *Arabidopsis* damaged DNA binding protein 1A (DDB1A) enhances UV tolerance. *Plant Molecular Biology*, 70: 371-383.
- Biever J., Brinkman D., Gardner G. (2014) UV-B inhibition of hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is a consequence of cell cycle arrest initiated by photodimer accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 65: 2949-2961.
- Bornman J., Vogelmann, T. (1991) Effect of UV-B radiation on leaf optical-properties measured with fiber optics. *Journal of Experimental Botany* 42: 547–554
- Chen Y., Eriksson S. Chang Z. (2010) Regulation and Functional Contribution of Thymidine Kinase 1 in Repair of DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 27327-27335.
- Clausen AR., Girandon L., Ali A., Knecht W., Rozpedowska E., Sandirini MP., Andreasson E., Munch-Petersen B. (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279: 3889–3897.
- Culligan K., Tissier A., Britt A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16: 1091-1104.
- Dobrovolsky, V., Bucci, T., Heflich, R., Desjardins, J., Richardson, F. (2003) Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism*; 78: 1-10.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19: 1349.

- García V., Bruchet H., Comesca D., Granier F., Bouchez D., Tissier A. (2003) AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant Cell*, 15: 119-132.
- Houtsmuller A., Rademakers S., Nigg A., Hoogstraten D., Hoeijmakers J., Vermeulen W. (1999) Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*, 5416: 958-961.
- Kafer C., Zhou L., Santoso D., Guirgis A., Weers B., Park S., Thornburg. (2004) Regulation of pyrimide metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9: 1611 -1625.
- Pedroza-Garcia J.A., Najera-Martinez M., Sanchez M.P., Plasencia J. (2015) *Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a* is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology*, 87: 303-315.
- Pontarin G., Gallinaro L., Ferraro P., Reichard P., Bianchi V., (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100: 12159-12164
- Rosa, M., Von Harder, M., Cigliano, R. A., Schlögelhofer, P., Mittelsten Scheid, O. (2013) The *Arabidopsis* SWR1 chromatin-remodeling complex is important for DNA repair, somatic recombination, and meiosis. *Plant Cell* 25: 1990-2001.
- Roa H., Lang J., Culligan K., Keller M., Holec S., Cognat V., Montané M., Houlné G., Chabouté M. (2009) Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151: 461-471
- Saada A., Shaag A., Mandel H., Nevo Y., Eriksson S., Elpeleg O. (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genetics*, 29: 342-344.

- Stasolla C., Katahira, R., Thorpe, T. Ashihara, H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1271-1295.
- Staxen I., Bornman J. (1994) A morphological and cytological study of *Petunia hybrida* exposed to UV-B radiation. *Plant Physiology*, 91: 735-740.
- Venkatachalam P., Geetha N., Priya P., Thulaseedharan A. (2010) Identification of differentially expressed thymidine kinase gene related to tapping panel dryness syndrome in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by random amplified polymorphic DNA screening. *International Journal of Plant Biology*, 1:e7: 33-39.
- Wargent J., Moore J., Roland Ennos A., Paul, N. (2009) Ultraviolet radiation as a limiting factor in leaf expansion and development. *Photochemical and Photobiology*. 85: 279–286.
- Weigel D., Glazebrook J. (2002) *Arabidopsis: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Weaver, R.F. (2002). *Molecular Biology 2nd*. Ed. McGraw Hill, New York.
- Xu J., Zhang L., Yang D.L., Li Q., He Z. (2015) Thymidine kinases share a conserved function for nucleotide salvage and play an essential role in *Arabidopsis thaliana* growth and development. *New Phytologist*. 208: 1089-1103.
- Yoshiyama, K.O., Kimura, S., Maki, H., Britt, A.B., Umeda, M. (2014) The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant Signaling and Behavior*. 9, e28889
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 805-836.