



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional
Unidad de Genómica Avanzada

**La DNA Primasa-Helicasa organelar de *Arabidopsis thaliana*
sintetiza oligorribonucleótidos como primers para las DNA
polimerasas organelares usando una secuencia de reconocimiento
única**

Tesis que presenta
IBQ. Antolín Peralta Castro

Para obtener el grado de:
Maestro en ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Irapuato, Guanajuato

20/05/2017

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de bioquímica estructural bajo la dirección del Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro en LANGEBIO-CINVESTAV. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera León 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT-MEXICO la beca de maestría # 253739/ciencia básica

A CINVESTAV-LANGEBIO por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo

A mi asesor de tesis, **Dr. Luis G. Brieba de Castro**, por la dirección durante el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores de tesis, **Dr. Axel Tiessen Favier** y el **Dr. José J. Ordaz Ortiz** por su apoyo y comentarios para este trabajo, además de su constante y genuino interés por el mismo.

A la **I. A. Corina Diaz Quezada**, por las contribuciones hechas al proyecto

A **Luis Fernando Arroyo** por su tutoría en el trabajo de laboratorio

A **Noe Baruch** y **Carlos Trasviña** por su ayuda en la resolución de los problemas encontrados a lo largo del proyecto

A **Marcel Alamán**, **Eduardo Castro**, **Alma Fuentes**, **Paola-chan** y **Frank** por sus reactivos, su colaboración y ayuda para la realización de los experimentos.

A los jóvenes padawans **Julián Flores** y **Nallely Hoyos** cuya contribución no dejo de ser importante tanto para su formación como para la mía.

A los miembros y ex miembros del laboratorio 4 por su constante ánimo y consideraciones hacia el trabajo.

A mi **familia** que siempre me motivo a continuar mis estudios y me ha apoyado en todas mis decisiones.

A mis amigos de la maestría, Gaby, Héctor, Ale, Vale, Arely por hacer más grata la estancia

Gracias

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

NTP: nucleótido trifosfato

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

rNTPs: Ribonucleótidos trifosfato

NMP: Nucleótido monofosfato

DNAP: ADN polimerasas

rATP: Adenosina trifosfato

rCTP: Citosina trifosfato

rGTP: Guanosina trifosfato

UTP: Uracilo trifosfato

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE	5
INDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I.- Introducción.....	11
1.1 Enzimas de replicación de ADN organelar	11
1.2 Replicación en organelos de plantas	12
1.3 ADN primasas	14
1.3.1 Primasas eucariotas y de arqueas	14
1.3.2 Primasas de procariotas	14
1.3.3 Primasas de bacteriófagos	14
1.4 La primasa helicasa organelar de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
II. OBJETIVOS.....	18
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1 Clonación de las ADN primasas	19
3.2 Expresión y purificación de primasas	19
3.3 Reacción de síntesis de oligorribonucleótidos dirigida por el templado...21	
3.4 Reconocimiento de secuencia	22
3.5 Reacción de extensión por ADN polimerasas	22
IV. RESULTADOS.....	23
4.1 AtTwinkle es una primasa helicasa conservada en la evolución.....23	
4.2 AtTwinkle presenta baja actividad en un templado con el sitio de reconocimiento de la primasa del bacteriófago T7	27
4.3 AtPrimasa-Helicasa sintetiza ribonucleótidos mayores a 4 nts sobre 4 de 64 trinucleótidos.....	32
4.4 AtTwinkle reconoce 5'-GA-3' como bases crípticas	39
4.5 AtTwinkle presenta baja selectividad para el ribonucleótido 3' después del trinucleótido de reconocimiento	42

4.6 AtTwinkle realiza la síntesis de ribonucleótidos de forma eficiente.....	44
4.7 AtTwinkle sintetiza primers para las ADN polimerasas organelares de plantas	46
V. DISCUSION.....	48
VI. PERSPECTIVAS.....	51
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
IX. APÉNDICES	57
ANEXO I.....	57
ANEXO II.....	57
ANEXO III.....	58

INDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Enzimas que actúan en la replicación mitocondrial de eucariotas	12
Tabla 2. Secuencias de reconocimiento de diversas primasas	16
Figura 1. El replisoma del bacteriófago T7	13
Figura 2. Comparación en la estructura del genoma mitocondrial de metazoos y plantas	14
Fig. 3. Diferencias ADN primasas	16
Figura 4. Representación esquemática de la primasa helicasa del bacteriófago T7 en comparación a la proteína <i>twinkle</i> de <i>Arabidopsis</i> y humano.	24
Figura 5. Análisis filogenético entre primasas helicadas de bacteriófagos, plantas y metazoos.	25
Figura 6. Logo de la región correspondiente al ZBD entre plantas, metazoos y bacteriófagos.	26
Figura 7. Alineamiento estructural del dominio primasa de AtTwinkle y T7 gp4.	26
Figura 8. Modelo de homología del dominio primasas de AtTwinkle.	27
Figura 9. Purificación de proteínas recombinantes	28
Figura 10. Síntesis de oligorribonucleótidos en un templado heptamérico aleatorizado por la AtPrimasa y la T7 primasa	30
Figura 11. Identificación del nucleótido 3' sintetizado por AtPrimasa-Helicasa sobre M13.	31
Figura 12. Identificación del nucleótido 5' sintetizado por AtPrimasa-Helicasa sobre M13	32
Figura 13. Síntesis de oligorribonucleótidos por AtPrimasa-Helicasa en 64 secuencias de trinucleótido marcados con α -32P-rATP, α -32P rCTP.	34
Figura 14. Síntesis de oligorribonucleótidos por AtPrimasa-Helicasa en 64 secuencias de trinucleótido marcadas α -32P rGTP o α -32P UTP	35

Figura 15. Cuantificación de productos sintetizados en los 64 trinucleótidos.	36
Figura 16. Reacción de 64 oligonucleótidos marcadas con α -32P-rATP y α -32P rCTP.	37
Figura 17. Reacción de 64 oligonucleótidos marcadas con α -32P-rGTP y α -32P UTP.	38
Figura 18. Comparación directa de la síntesis de ribonucleótidos entre la AtPrimasa y la T7 primasa.	39
Figura 19. AtPrimasa reconoce un trinucleótido de reconocimiento novedoso	40
Figura 20. El reconocimiento del templado requiere del par críptico 5'-GA-3'	42
Figura 21. AtTwinkle no es selectiva para la incorporación de la base 3'.	44
Figura 22. AtTwinkle sintetiza primers de ARN de forma eficiente.	46
Figura 23. Ensayo de polimerización con un primer de ADN.	47
Figura 24. Las ADN polimerasas de <i>A. thaliana</i> extienden los primers sintetizados por AtTwinkle.	48

RESUMEN

Las ADN primasas reconocen una secuencia específica sobre una molécula de ADN de cadena única a fin de sintetizar los primers de ARN durante la replicación de la cadena discontinua. *Arabidopsis thaliana* codifica para un ortólogo de la ADN primasa helicasa del bacteriófago T7 llamada AtTwinkle que se localiza en cloroplastos y mitocondria. Aquí se reporta que AtTwinkle sintetiza primers de ARN a partir de la secuencia 5'-(G/C)GGA-3' en la secuencia templado. En esta secuencia, los nucleótidos subrayados son crípticos, es decir, son esenciales para el reconocimiento del templado, pero no son transcritos durante la síntesis del primer, en contraste a todas las primasas caracterizadas a la fecha, la secuencia de reconocimiento por la AtTwinkle requiere de dos nucleótidos (5'-GA-3') como elementos crípticos. La divergencia del dominio de dedo de zinc (ZBD) del dominio de primasa, con respecto al ZBD de otras primasas, puede ser el responsable de este único reconocimiento del templado. Durante la síntesis de oligorribonucleótidos, AtTwinkle muestra una fuerte preferencia por rCTP como su ribonucleótido inicial y una preferencia moderada para rGMP o rCMP durante la elongación. Los productos de ARN sintetizados por AtTwinkle son usados eficientemente como primers por las ADN polimerasas de organelos de plantas (POP´ s). En suma, nuestros datos fuertemente sugieren que AtTwinkle es la primasa responsable de sintetizar los primers durante la replicación de la cadena discontinua del ADN organelar en mitocondria y cloroplasto de plantas siguiendo un mecanismo similar al de la replicación de genoma del bacteriófago T7. Este mecanismo contrasta a la replicación de la cadena discontinua durante la replicación del genoma mitocondrial de metazoos en la cual los transcritos son sintetizados por la ARN polimerasa y elongados por al ADN polimerasa gamma.

ABSTRACT

DNA primases recognize single-stranded DNA (ssDNA) sequences to synthesize RNA primers during lagging-strand replication. *Arabidopsis thaliana* encodes an ortholog of the DNA primase-helicase from bacteriophage T7, dubbed AtTwinkle, that localizes in chloroplasts and mitochondria. Herein we report that AtTwinkle synthesizes RNA primers from a 5'-(G/C)GGA-3' template sequence. Within this sequence, the underlined nucleotides are cryptic, meaning that they are essential for template recognition but are not instructional during RNA synthesis. Thus, in contrast to all primases characterized to date, the recognition sequence by AtTwinkle requires two nucleotides (5'-GA-3') as a cryptic element. The divergent zinc finger binding domain (ZBD) of the primase module of AtTwinkle may be responsible to recognize this unique template sequence. During oligoribonucleotide synthesis, AtTwinkle shows a strong preference for rCTP as its initial ribonucleotide and a moderate preference for rGMP or rCMP incorporation during elongation. RNA products synthesized by AtTwinkle are efficiently used as primers for plant organellar DNAPs. In sum, our data strongly suggest that AtTwinkle primes organellar DNAPs during lagging strand synthesis in plant mitochondria and chloroplast following a mechanism that resembles phage T7-replication. This mechanism contrasts to lagging-strand DNA replication in metazoan mitochondria, in which transcripts synthesized by mitochondrial RNAP prime mitochondrial DNAP γ .

I.- Introducción

1.1 Enzimas de replicación de ADN organelar

Los organelos son el producto de eventos endosimbióticos bacterianos tempranos, sin embargo, análisis filogenéticos muestran que los genes de las proteínas responsables de la transcripción y replicación mitocondrial en humanos y levaduras comparten un origen filogenético con la maquinaria de replicación de los bacteriófagos T-impar [1-3].

Previamente se han caracterizado los mecanismos de replicación del ADN mitocondrial de humano y *S. cerevisiae* de la que se tienen descritas las enzimas que actúan en este proceso. En el caso de plantas, específicamente de *A. thaliana* se han descrito proteínas con función putativa a enzimas que participan en la replicación y que se encuentran localizadas a mitocondria y cloroplasto (Tabla 1).

Tabla 1. Enzimas que actúan en la replicación mitocondrial de eucariotas

Función	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	Bacteriófago T7
DNA polimerasa	Poly (POLG)	Poly (MipI)	POLIA* (At1g50840) POLIB (At3g20540)	T7 DNA Pol (gp5)
Primasa	mtRNAP (POLRMT)	mtRNAP (Rpo41)	Twinkle* (At1g30680)	PrimHel (gp4)
Helicasa	Twinkle (PEO1)	-	Twinkle* (At1g30680)	PrimHel (gp4)
Unión a cadena sencilla	SSB (SSBP1)	SSB (RIM1)	SSB1* (At4g11060)	SSB (gp2.5)

*enzimas con función putativa no caracterizadas

En el replisoma del bacteriófago T7, tres de las proteínas codificadas por el mismo y una proteína del hospedero coordinan la síntesis del ADN; la T7 ADN polimerasa (T7 DNAP o gp5), la T7 primasa helicasa (T7 PrimHel o gp4), la proteína de unión a cadena sencilla (T7 SSB o gp2.5) [4, 5] y la tioredoxina de *Escherichia coli* (Fig. 1).

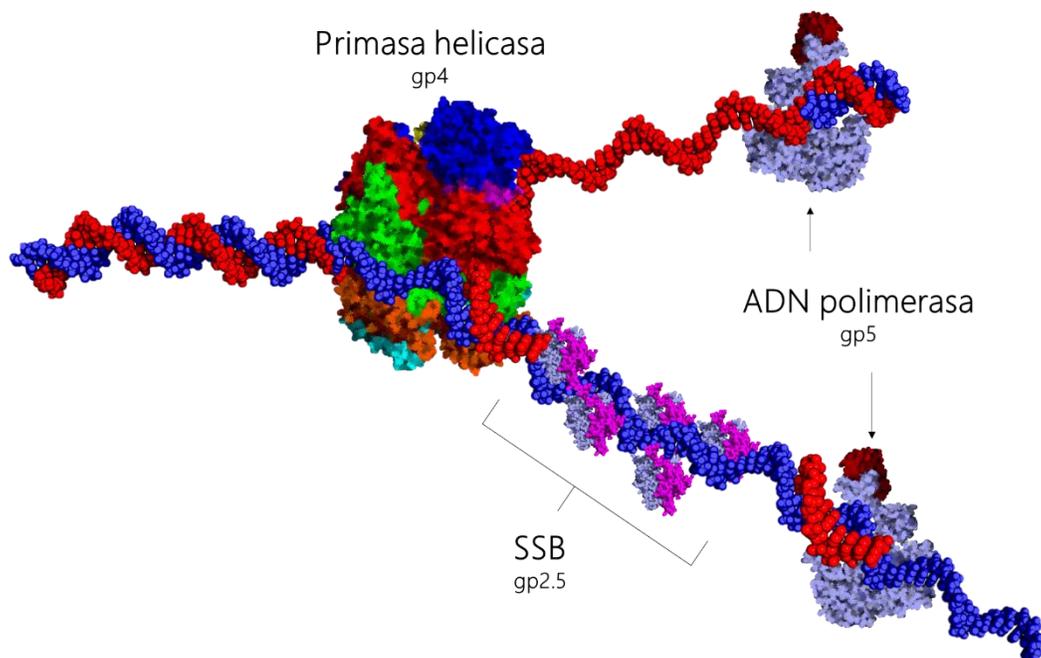


Figura 1. El replisoma del bacteriófago T7. Solo tres proteínas del bacteriófago T7 son necesarias para replicar su genoma de 40 kb. La primasa helicasa desdobra el ADN de cadena doble y sintetiza los primers para que la ADN polimerasa pueda replicar la cadena mientras que las SSB´s evitan la formación de estructuras secundarias en la cadena sencilla de ADN

1.2 Replicación en organelos de plantas

Los genomas mitocondriales de plantas varían entre organismos de forma significativa, abarcando desde 200 kb hasta 11 Mb en comparación a los genomas mitocondriales de metazoos y levaduras, los cuales van desde un rango de 16-20 kb y 30-90 kb, respectivamente [6, 7]. Una característica compartida entre el genoma mitocondrial de hongos y de plantas es la presencia de rearrreglos de los

genes codificados en este, aunque si bien el número de estos no varía de forma significativa (**Fig. 2**) [8], estas diferencias entre la estructura del genoma mitocondrial de plantas y metazoos sugiere que la plantas pueden utilizar un mecanismo diferente de replicación para su ADN mitocondrial que puede estar ligado a la recombinación de ADN.



Figura 2. Comparación en la estructura del genoma mitocondrial de metazoos y plantas. La posición relativa de los genes codificados en el ADN mitocondrial de metazoos no presenta una variación significativa en comparación a la posición de los genes codificados en el ADN mitocondrial de plantas, en la cual organismos muy cercanos filogenéticamente presentan una variación significativa en el arreglo de sus genes.

1.3 ADN primasas

Las primasas son enzimas que sintetizan cadenas cortas de ARN que son usadas como primers o iniciadores por las ADN polimerasas en función de polimerizar la cadena complementaria durante la replicación del ADN [9]. En esta tesis utilizo el termino primer en lugar de iniciador.

No existe una clasificación universal para las ADN primasas, pero se han establecido las diferencias entre las primasas virales, procariotas y eucariotas.

1.3.1 Primasas eucariotas y de arqueas

Las primasas eucariotas inician la síntesis de nuevas cadenas de ADN mediante la síntesis de oligómeros de ARN (aproximadamente 8 a 12 nucleótidos) sobre cadenas sencillas de ADN. Todas las ADN primasas eucariotas están compuestas de dos subunidades denominadas PriS y PriL (**Fig. 3**), Estas primasas inician la síntesis de ARN sobre un templado de ADN de cadena sencilla que contenga una pirimidina (T-C) [10].

1.3.2 Primasas de procariotas

Las primasas procariotas están compuestas de una subunidad (**Fig. 3**), son capaces de sintetizar primers de hasta 20 nucleótidos y tienen la característica de reconocer una secuencia específica de tres nucleótidos dentro de la cadena de ADN sobre la cual iniciar la síntesis de primers (**Tabla 2**) [11]. A pesar de que las primasas de diversos procariotas comparten una similitud de residuos muy alta, la secuencia que esta es capaz de reconocer es muy variada.

1.3.3 Primasas de bacteriófagos

Las primasas de bacteriófagos, en su gran mayoría, forman complejos multiméricos de la misma subunidad (**Fig. 3**), esto se debe a que en el mismo polipéptido contienen tanto actividad primasa como helicasa, en la cual el dominio helicasa es responsable de esta multimerización. Al igual que las primasas de procariotas, estas reconocen una secuencia específica sobre el templado de ADN con el fin de iniciar la síntesis de primers [12].

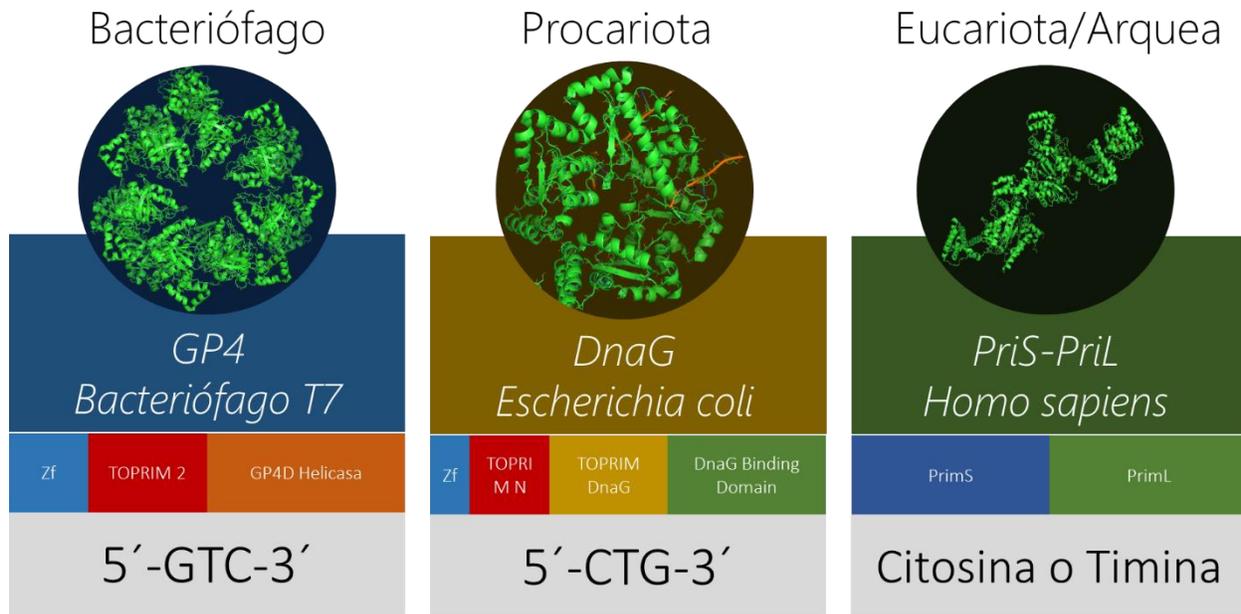


Figura 3. Diferencias entre ADN primasas. Las ADN primasas son clasificadas dependiendo del organismo al cual pertenecen, las cuales presentan características únicas; las primasas de bacteriófagos contienen en una solo subunidad actividad primasa y actividad helicasa y son capaces de formar multímeros de hasta siete subunidades. Las primasas de procariontes están compuestas de una sola subunidad y de forma similar a las primasas de bacteriófagos son capaces de reconocer una secuencia específica en una cadena de ADN. Las primasas de eucariotas y arqueas están compuestas de dos subunidades las cuales no pueden actuar por separado e inician la síntesis de primers sobre una citosina o una timina.

Tabla 2. Secuencias de reconocimiento de diversas primasas

Organismo	Secuencia de reconocimiento	Dímero transcrito	Referencia
Bacteriófago T7	5'-GTC-3'	pppAC	[13, 14]
Bacteriófago SP6	5'-GCA-3'	pppGC	[15]
Bacteriófago T4	5'-GTT-3'	pppAC	[16]
<i>Escherichia coli</i>	5'-CTG-3'	pppAG	[6]
<i>Staphylococcus aureus</i>	5'-CTA-3'	pppAG	[17]
<i>Aquifex aeolicus</i>	5'-CCC-3'	pppGG	[18]

1.4 La primasa helicasa organelar de Arabidopsis thaliana

La T7 primasa helicasa es una proteína modular que incluye un dominio de primasa que sintetiza primers para la T7 ADN polimerasa que actúa en la cadena discontinua y un dominio helicasa que desdobra el ADN de cadena doble de forma procesiva [4, 19, 20].

El dominio primasa de la primasa helicasa del bacteriófago T7 pertenece a la familia de las primasas procariotas que están compuestas de un dominio de polimerización de ARN (RPD) que cataliza la adición de ribonucleótidos y un dominio de dedo de zinc (ZBD) el cual está involucrado en el reconocimiento de ADN de cadena sencilla [9, 21].

Las proteínas organelares derivadas de los bacteriófagos T-odd han sufrido cambios evolucionarios con respecto a las proteínas ancestrales de estos [22-24].

Un ejemplo de estos cambios ocurre en la ADN helicasa mitocondrial replicativa TWINKLE (“T7 gp4-like protein with intra-mitochondrial nucleoid localization”) de metazoos.

Las primasas procariotas reconocen una variedad de secuencias del templado de ADN (**Tabla 2**). En una primasa, la identidad de la base central de una secuencia de reconocimiento mínima de tres nucleótidos determina la identidad inicial del 5' NTP, y la base 5' determina la especificidad de la incorporación del 3' NMP [9, 25].

A pesar de la diversidad en reconocimiento de la secuencia de un templado de ADN, en todas las primasas estudiadas hasta la fecha el nucleótido 3' de la secuencia del trinucleótido no es transcrito, pero es requerida para el reconocimiento del templado, y por esta razón es llamada críptica.

La proteína TWINKLE de metazoos carece de las cisteínas necesarias para la coordinación de zinc en la región homologa al ZBD de la T7 primasa y los residuos de aminoácidos en la región parecida al RPD requeridos para la síntesis de RNA [26, 27].

En metazoos, los transcritos generados por la ARN polimerasa mitocondrial son usados como primers durante la síntesis de la cadena discontinua [27]. Por otro lado los hongos carecen de un homólogo de TWINKLE y los transcritos cortos necesarios de ARN para la replicación de la cadena discontinua pudieran ser por la ARN polimerasa mitocondrial [22, 28-31].

Se ha predicho que TWINKLE tienen actividad tanto de primasa como de helicasa en la mayoría de eucariotas, con excepción de los metazoos donde solo es activa como helicasa [1, 32].

El homólogo de TWINKLE de la planta *Arabidopsis thaliana* (nombrada AtTwinkle) es una proteína de 709 aminoácidos que es transportada a mitocondria y cloroplasto debido a su secuencia N-terminal de señalización dual [33-36]. La región con actividad primasa predicha contiene los seis motivos presentes en primasas procariotas. El motivo I corresponde al ZBD que es necesario para el reconocimiento del templado [25], mientras que los motivos II a VI están localizados en el dominio RNAP. La caracterización *in vitro* de AtTwinkle mostro que esta enzima tiene actividad de primasa y helicasa [33, 34, 37], sin embargo su templado de ADN de cadena doble preferido, su rol putativo en la replicación del ADN organelar o sus interacciones con las polimerasas organelares de plantas permanecen sin conocerse.

II. OBJETIVOS

Determinar la secuencia de reconocimiento de la primasa helicasa de *Arabidopsis thaliana* y evaluar la capacidad de esta para permitir la elongación mediante las ADN polimerasas organelares.

- Evaluar la capacidad de la ADN primasa helicasa para sintetizar productos de ARN.
- Comparar la síntesis de oligorribonucleótidos por parte de AtTwinkle con aquellos sintetizados por la primasa helicasa del bacteriófago T7.
- Determinar las secuencias específicas sobre las cuales AtTwinkle es capaz de realizar la síntesis de oligorribonucleótidos.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Clonación de las ADN primasas

El marco de lectura abierto correspondiente al gen de AtTwinkle procesado fue optimizado para su expresión en *Escherichia coli* y clonado en un vector pUC19. Los marcos de lectura de la AtPrimHel (ANEXO I) y la AtPrim fueron amplificados por PCR usando el vector de clonación como templado. Los productos de PCR de AtPrimHel y AtPrim fueron subclonados en un vector pET-19b modificado entre los sitios de endonucleasa NdeI y BamHI. El vector pET-19b modificado añade una etiqueta de nueve histidinas en el extremo N-terminal de cada construcción. La etiqueta de histidinas puede ser removida con la adición de PreScission Protease®

El dominio de la primasa de la primasa helicasa del bacteriófago T7 (residuos 1-255) fue amplificado por PCR a partir del ADN genómico del bacteriófago. El producto de PCR de T7Prim fue clonado en un vector pET-11b.

3.2 Expresión y purificación de primasas

AtPrimHel y AtPrim fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) a 21°C en medio Luria Bertani suplementado con 0.1 mM de ZnCl₂ y 100 µg/ml de ampicilina. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0.6 a 0.8 A₆₀₀ la expresión de proteína fue inducida mediante la adición de 1 mM de IPTG y los cultivos fueron incubados por 12 h.

Los cultivos fueron centrifugados y resuspendidos en 30 ml de buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 500 mM NaCl) y se incubaron en presencia de 0.2 mg/ml de lisozima a 4 °C durante 30 minutos; posteriormente se sonicaron a una frecuencia de 30 pulsaciones por minuto. El lisado celular fue clarificado por centrifugación a 18,000 RPM, el sobrenadante filtrado en una membrana de 0.45 µm y cargado en una columna de afinidad a níquel HisTrap® 1ml ff. La proteína fue lavada dos veces con buffer A suplementada con 20 y 45 mM de imidazol.

Finalmente, la proteína fue eludida de la columna de níquel con buffer A + 500 mM de imidazol, la elución fue dializada en buffer B (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl y 10% glicerol) durante toda la noche. La proteína dializada fue cargada en una columna de heparina HiTrap® HP y lavada con 100 ml de un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones que contenían proteína pura fueron mezcladas, concentradas y dializadas en buffer C (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 20% glicerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) durante toda la noche.

Como último paso, la proteína fue cargada en una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300, en el caso de AtPrim, y en una columna Superdex 200 10/300 para AtPrimHel; la columna fue previamente equilibrada con buffer C. la proteína fue eluída con un flujo isocrítico de buffer C y las fracciones que contenían proteína pura fueron mezcladas y dializadas en buffer D (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 50% glicerol) y almacenadas a -20 °C

T7prim fue expresada en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) a 37°C en medio Luria Bertani suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Cuando el cultivo alcanzo una densidad óptica de 0.6 a 0.8 A600 la expresión de proteína fue inducida mediante la adición de 1 mM de IPTG y lo cultivos fueron incubados por 4 h.

El cultivo celular fue centrifugado y resuspendido en 30 ml de buffer A1 (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM de NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), posteriormente se sonicaron sonicado a una frecuencia de 30 pulsaciones por minuto. El lisado celular fue clarificado por centrifugación a 19,000 RPM durante 30 min, se midió el volumen del sobrenadante y se agregó sulfato de amonio a 60% de saturación en agitación durante 30 min a 4 °C y se centrifugo a 12500 RPM durante 20 min. El pellet de sulfato de amonio fue resuspendido en 200 ml de buffer A2 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) y centrifugado para remover partícula, la muestra se cargó en una columna con DEAE previamente equilibrada con buffer A2 y la proteína eluída con un gradiente lineal de NaCl de 0 mM a 1 M, las fracciones que contenían proteína

fueron mezcladas y precipitadas con sulfato de amonio a 65% de saturación. El pellet de sulfato de amonio fue resuspendido en 160 ml de buffer A2 y cargada en una columna de heparina HiTrap® Heparin HP 5 ml y la proteína fue eluída con un gradiente de NaCl de 50 mM a 1 M, las fracciones con proteína pura fueron mezcladas y precipitadas con sulfato de amonio a 65% de saturación. El pellet de sulfato de amonio fue resuspendido en 5 ml de buffer A1 y la proteína fue carga en una columna Superdex 200 10/300 GL previamente equilibrada con buffer A1y eluída con un flujo isocrítico del mismo buffer, las fracciones que contenían proteína pura fueron combinadas y concentradas, se añadió un volumen de glicerol 100% y se almaceno a -20 °C.

3.3 Reacción de síntesis de oligorribonucleótidos dirigida por el templado

Se ensayaron reacciones de primasa en un buffer que contiene 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM glutamato de potasio, 10 mM MgCl₂ y 10 mM DTT. Las reacciones de primasas contenían 100 µM del NTP indicado a 10 µCi de [α -³²P]-NTP (3,000 Ci/mM). Después de un tiempo de incubación de 60 min a 30 °C, las reacciones fueron terminadas mediante la adición de buffer de carga (95% formamida, 25 mM EDTA, 0.1% xileno cianol) y los productos de la reacción fueron separados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 27% conteniendo 3 M de urea. Cada reacción de primasa contenía diversas cantidades de proteína recombinante o templado de ADN de cadena sencilla como se indica en el pie de figura. Los productos radioactivos fueron visualizados usando un equipo de fosforoimagen Storm 860.

Para determinar la cantidad molar de oligorribonucleótidos sintetizados por las primasas de T7 y *A. thaliana*, el sustrato radioactivo y los primers sintetizados fueron cuantificados con ImageQuant®. La intensidad procesada fue sujeta a la siguiente ecuación, previamente derivada por otro grupo [30]

$$ARN_{total}(\mu M) = \frac{R}{R + A} * [ATP]$$

Dentro de esta ecuación, R se refiere a la intensidad de lavanda observada para cada oligorribonucleótido, A es la intensidad del ATP marcado radioactivamente y [ATP] se refiere a la concentración micromolar del ATP (marcado y sin marcar). La cantidad molar de los productos de ARN es obtenida mediante la división del número de ATP's en la cadena de ARN.

3.4 Reconocimiento de secuencia

Para determinar la secuencia del trinucleótido sobre la cual la primasa era capaz de comenzar la síntesis de primers se usó una reacción primasa estándar y se probaron las 64 combinaciones posibles de tres nucleótidos con oligonucleótidos sintéticos, usando ATP, CTP, GTP y UTP marcados con α -³²P.

3.5 Reacción de extensión por ADN polimerasas

Una reacción de 10 μ l conteniendo 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 mM glutamato de potasio, 25 μ g/ml BSA, 150 nM de primasa, 10 μ M de templado, 0.1 mM rNTPs, 0.2 mM dNTPs, y concentraciones crecientes de AtPolIA exo-, AtPolIB exo-, KF exo- de E. coli, y T7 ADN polimerasa. La reacción fue incubada 60 min a 37 °C y terminada con la adición de buffer de carga. Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 22% con 3 M de urea y los productos visualizados mediante fosforoimagen.

IV. RESULTADOS

4.1 AtTwinkle es una primasa helicasa conservada en la evolución

Análisis computacionales predicen que la proteína codificada en el núcleo AtTwinkle es procesada en el residuo 91 durante su translocación a los organelos [33]. Los residuos correspondientes a la proteína procesada solo tienen un 22% de identidad en aminoácidos en comparación con la primasa helicasa del bacteriófago T7. A pesar de la limitada identidad en aminoácidos, AtTwinkle conserva la mayor parte de los residuos catalíticos; contiene cuatro cisteínas conservadas en su extremo amino terminal que se predice coordinan aun átomo de Zn^{+2} y los aminoácidos que conforman el dominio de RNA polimerasa y el dominio de ADN helicasa (**Fig. 4**).

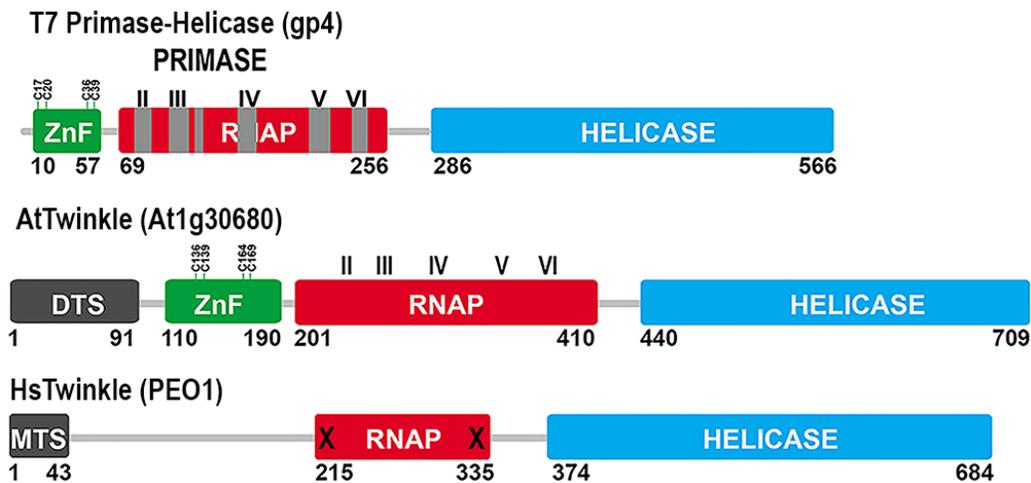


Figura 4. Representación esquemática de la primasa helicasa del bacteriófago T7 en comparación a la proteína twinkle de *Arabidopsis* y humano. La T7 primasas helicasa contiene los seis motivos conservados para la actividad primasa. El motivo I está localizado en el ZBD y los motivos II a VI en el dominio RNAP. AtTwinkle conserva estos motivos y contiene una secuencia extra en el extremo amino terminal (residuos 1 a 91) que contienen la señal de localización dual organelar. La proteína TWINKLE de humanos contiene una secuencia de señalización a mitocondria en su extremo N-terminal, pero carece de los dominios ZBD y RNAP funcionales.

Un análisis filogenético usando las primasas helicadas encontradas en bacteriófagos, plantas, y metazoos indica que las primasas helicadas de plantas son las más cercanas filogenéticamente a las primasas helicadas de los bacteriófagos T-impar (**Fig. 5**).

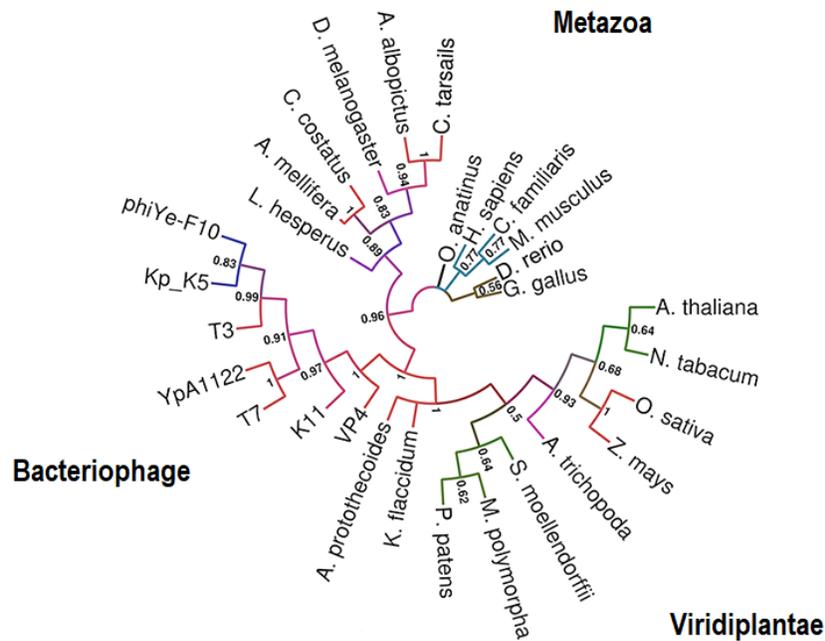


Figura 5. Análisis filogenético entre primasas helicadas de bacteriófagos, plantas y metazoos. El árbol filogenético muestra que las primasas helicadas de plantas y bacteriófagos comparten una relación evolucionaria más cercana entre ellos que entre metazoos.

Las cisteínas involucradas en la coordinación del metal están presentes en plantas verdes y algas y están ausentes en TWINKLE de metazoos, que también presentes sustituciones de los residuos catalíticos putativos del dominio RPD (**Fig. 6**) [2]. Las principales diferencias entre los motivos conservados de las primasas helicadas de las plantas verdes y los bacteriófagos T-impar reside en la longitud y secuencia de sus respectivos ZBD. En plantas verdes, el ZBD es en promedio 10 aminoácidos más largo que sus contrapartes en bacteriófagos (**Fig. 6**).

Un modelo de homología del dominio de primasa, en comparación con la estructura cristalina de la primasa del bacteriófago T7, que incluye los dominios ZBD y RPD [21, 38, 39] predice que el dominio de primasas de AtTwinkle seguiría un arreglo estructural similar al de la primasa helicasa de T7 e ilustra la posible coordinación del átomo de Zn^{+2} mediante las cisteínas conservadas en su ZBD (Fig. 8).

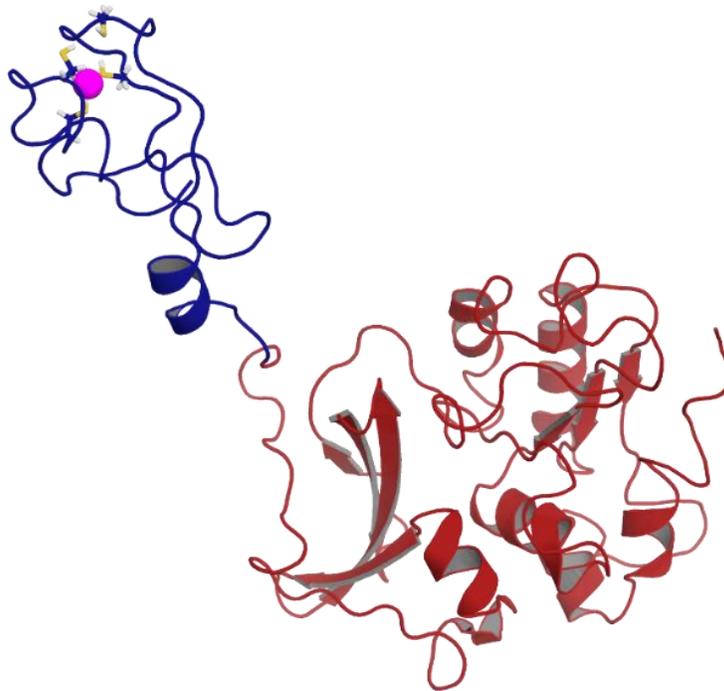


Figura 8. Modelo de homología del dominio primasas de AtTwinkle. El dedo de zinc esta coloreado en azul y el dominio RNAP en rojo. Las cisteínas conservadas que coordinan el átomo de zinc están representadas en forma de esferas y barras; el átomo de zinc se muestra en rosa.

4.2 AtTwinkle presenta baja actividad en un templado con el sitio de reconocimiento de la primasa del bacteriófago T7

Para elucidar bioquímicamente la secuencia de reconocimiento en un templado de ADN de cadena sencilla por parte de AtTwinkle, diseñamos dos construcciones, una en la que la proteína contiene los dominios tanto de primasa como de helicasa (residuos 92 a 709) y otra que solo contiene el dominio de primasa (residuos 92 a 410). De aquí en adelante estas construcciones se denominarán AtPrimasa-Helicasa y AtPrimasa respectivamente. Ambas proteínas recombinantes fueron purificadas hasta la homogeneidad después de 3 pasos cromatográficos con niveles similares de pureza que la primasa recombinante del bacteriófago T7 (residuos 1 a 262) usada como control durante este estudio (Fig. 9).

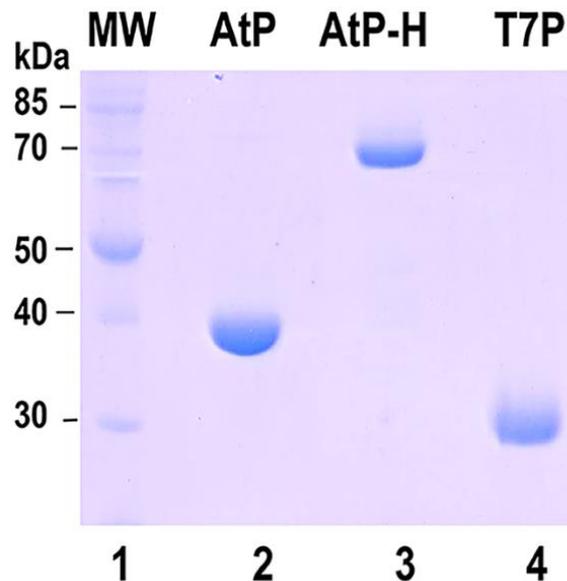


Figura 9. Purificación de proteínas recombinantes. El peso molecular teórico esperado para la AtPrimasa, AtPrimasa-Helicasa y T7 primasa son 36, 70 y 28 kDa, respectivamente. Muestras de proteína purificada fueron corridas en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% y tenido con azul brillante Comassie. Estas proteínas migran cerca de su masa molecular teórica esperada.

Caracterizaciones previas de AtTwinkle indicaron que esta proteína es activa sobre un templado del plásmido M13 de cadena sencilla [33, 37]. Para analizar si nuestra proteína recombinante presenta síntesis de oligorribonucleótidos usamos un heptaoligonucleótido aleatorizado como templado de ADN de cadena sencilla y ensayos los fragmentos AtPrimasa y T7 primasa. Usamos un oligonucleótido aleatorizado para evitar cualquier sesgo en las diferentes combinaciones de la secuencia del templado que pueden ocurrir en la secuencia de nucleótidos fija del templado de M13.

El producto más abundante sintetizado por la T7 primasa a partir de su secuencia de reconocimiento mínima, 5'-GTC-3', es el dirribonucleótido 5'-pppAC-3' [25]. En este sitio de reconocimiento mínimo, la citidina 3' es criptica, la timidina central conduce la unión del 5' ATP inicial y la guanósina 5' es usada como templado para la incorporación del 3' CMP [25].

La T7 primasa genera un producto que migra en el mismo peso molecular cuando las reacciones fueron etiquetadas con α -³²P rCTP o α -³²P-rATP, sugiriendo que este producto corresponde al dirribonucleótido 5'-pppAC-3' (**Fig. 10 carriles 7 a 10**). Sobre la base de un experimento control usando un templado sintético que contienen la secuencia 5'-GTC-3', inferimos que el principal producto de la T7 primasa presente en el heptámetro aleatorizado es de hecho el dirribonucleótido 5'-pppAC-3'.

Un experimento similar fue realizado con la AtPrimasa recombinante, pero con la adición de α -³²P rATP, α -³²P rCTP y α -³²P rGTP como ribonucleótidos etiquetados. En presencia de ATP radioactivo, solo una banda de producto tenue es observada en comparación a la reacción control cuando se añade AtPrimasa (**Fig. 10, carriles 1 y 2**). Sin embargo, en presencia de CTP o GTP marcados radioactivamente, AtPrimasa cataliza la síntesis de oligorribonucleótidos mayores a 5 bases. Una fuerte señal correspondiente a la migración de un dirribonucleótido se observa cuando solo CTP es usado como marca radioactiva, sugiriendo que la identidad de este producto es 5'-pppCC-3' (**Fig. 10, carriles 4 a**

A fin de identificar directamente los ribonucleótidos sintetizados por AtPrimasa-Helicasa, elucidamos la identidad de los ribonucleótidos sintetizados en los extremos 5' y 3' mediante la medición de la incorporación de los productos de ribonucleótidos radioactivos en reacciones individuales usando cada uno de los cuatro en presencia de los otros tres restantes rNTPs no radioactivos y un tratamiento con fosfatasa alcalina posterior. Dado que la fosfatasa alcalina remueve el 5' trifosfato, el único producto radioactivo corresponde al segundo o tercer enlace fosfodiéster. En este experimento, fuertes bandas de productos fueron observadas solamente en presencia de α - ^{32}P rCTP indicando que CMP es el principal ribonucleótido en la posición 3' (**Fig. 11, carril 3**).

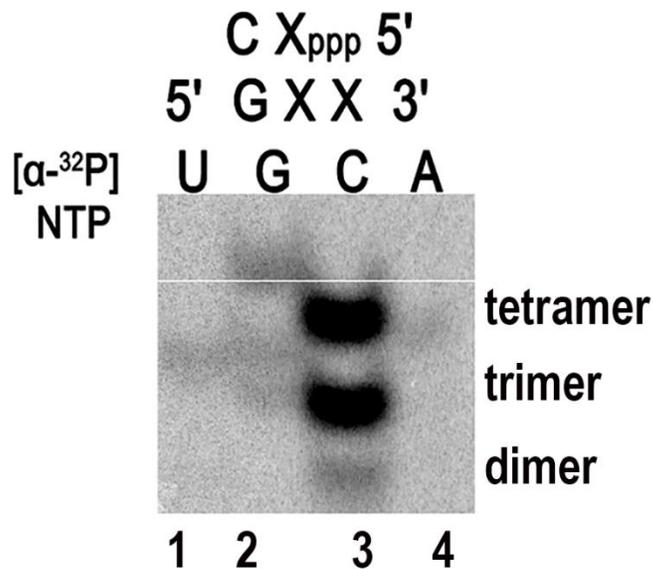


Figura 11. Identificación del nucleótido 3' sintetizado por AtPrimasa-Helicasa sobre M13. La identidad de cada uno de los cuatro α - ^{32}P rNTPs es indicada, el resto de rNTPs sin marcar fueron incluidos en la reacción. Después de una incubación durante 30 minutos, los productos fueron tratados con fosfatasa alcalina para eliminar la etiqueta correspondiente al nucleótido 5'.

La elucidación de CMP como el nucleótido preferido en la posición 3' permite la identificación del ribonucleótido 5' mediante la extensión por parte de la primasa en presencia de cada uno de los cuatro rNTPs no marcados radioactivamente en presencia de rCTP radioactivo; sorprendentemente, los productos marcados radioactivamente estaban presentes en los cuatro rNTPs (Fig. 12), sugiriendo que cuando rCTP es incorporado en la posición 3', AtTwinkle no es selectiva para la identidad del ribonucleótido 5'.

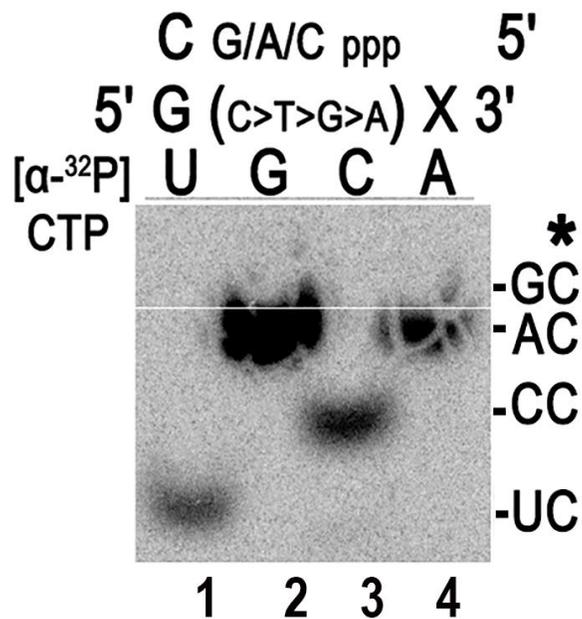


Figura 12. Identificación del nucleótido 5' sintetizado por AtPrimasa-Helicasa sobre M13. Conociendo que el nucleótido en la posición 3' es rCTP, en este experimento α - 32 P rCTP y solo el rNTP indicado fueron utilizados en una reacción de primasa y fueron tratados con fosfatasa alcalina y visualizados en un gel de poliacrilamida al 27%.

4.3 AtPrimasa-Helicasa sintetiza ribonucleótidos mayores a 4 nts sobre 4 de 64 trinucleótidos

Para elucidar precisamente la identidad del trinucleótido que es reconocido por AtTwinkle, usamos un arreglo de 64 oligonucleótidos que corresponden a todas las posibles combinaciones de tres nucleótidos. Ensayamos reacciones de síntesis de oligorribonucleótidos etiquetados ya sea con α -³²P-rATP, α -³²P rCTP, α -³²P rGTP o α -³²P UTP. Estos experimentos muestran que AtTwinkle emplea eficientemente 5'-GGA-3' como la secuencia del trinucleótido preferido durante la síntesis de oligorribonucleótidos. Un resumen condensado de estos experimentos se muestra en la (Fig. 13, 14 y 15). En este experimento, la base central de la secuencia del trinucleótido sirve como templado para el α -³²P rNTP correspondiente. Este experimento muestra que AtTwinkle utiliza la secuencia 5'-GGA-3' para sintetizar productos mayores que 4 oligorribonucleótidos (Fig. 13 rCTP, carril 3) y en menor grado, extiende los trinucleótidos 5'-GTA-3' y 5'-CCC-3' (Fig. 13 rATP, carril 4 y figura 14 rGTP, carril 6). Los productos de reacción correspondientes a los dirribonucleótidos 5'-pppAC (Figura 13 rATP, carriles 3 y 7), pppCC (Fig. 13 rCTP, carril 7), pppGC (Fig. 14 rGTP, carriles 3, 7, 11 y 15) y pppUC (Fig. 14 UTP, carril 7) son abundantes, sin embargo, estos ribonucleótidos no son convertidos a oligómeros más largos.

Una comparación de la migración de los productos de ARN en los templados 5'-GTA-3' y 5'-GGA-3' (Fig. 13 rATP, carril 3 y Fig. 13 rCTP, carril 2) muestra que sus productos migran a la misma masa molecular, esta observación sugiere que en el templado 5'-GGA-3' existen dos bases que no están siendo transcritas hacia un oligorribonucleótido, puesto que AtTwinkle está sintetizando el dirribonucleótido 5'-pppCA y no 5'-pppCC como debería de esperarse.

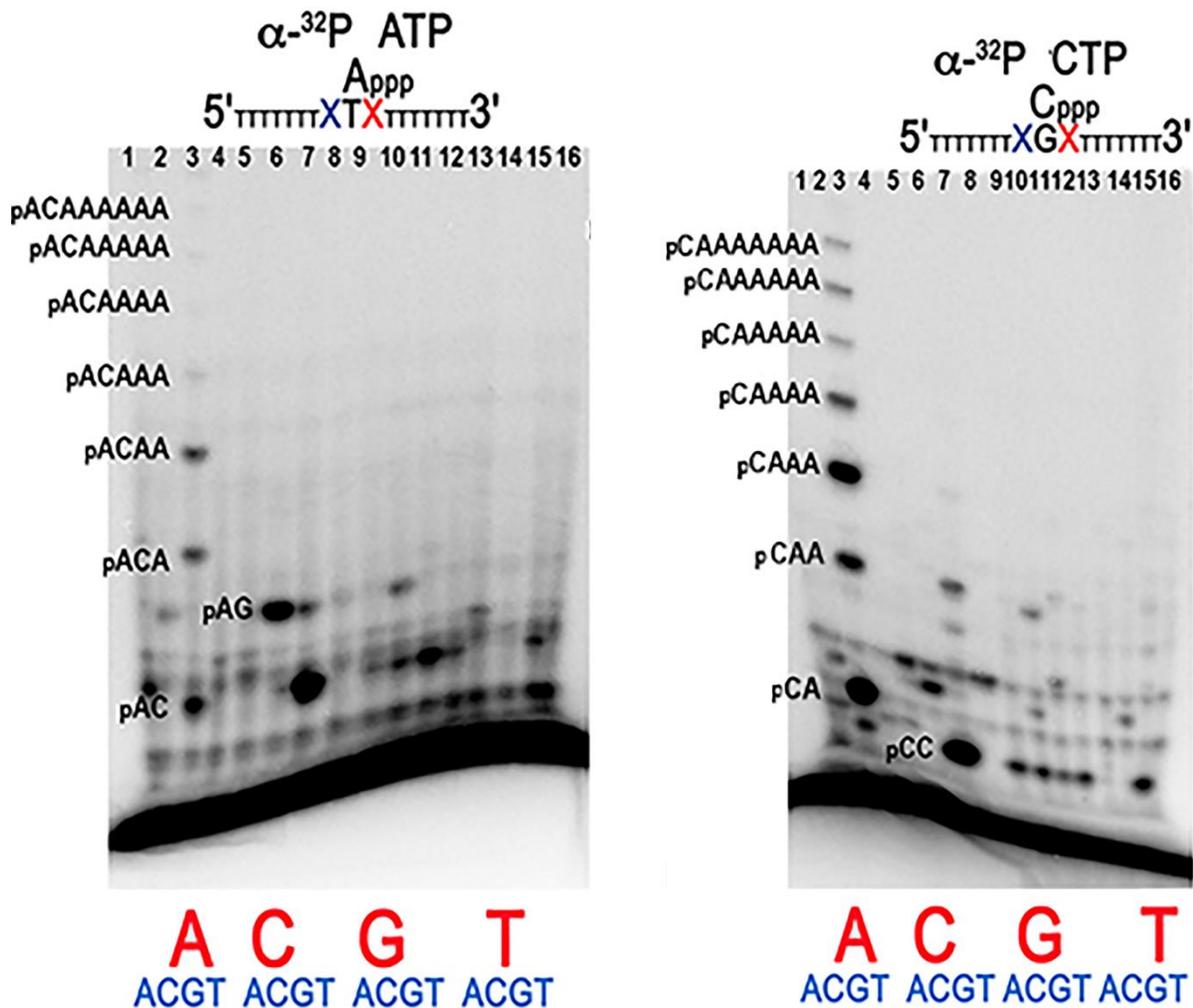


Figura 13. Síntesis de oligorribonucleótidos por AtPrimasa-Helicasa en 64 secuencias de trinucleótido marcados con $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -rATP, $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ rCTP. Se probaron las 64 combinaciones posibles de tres nucleótidos en un templado sintético. El ribonucleótido complementario a la base central de trinucleótido dicta la identidad de los productos marcados radioactivamente. La extensión de los oligorribonucleótidos ocurre vía el reconocimiento de siete timidinas después del triplete. Las reacciones contienen 5 μM de templado sintético y 2 μM de Enzima.

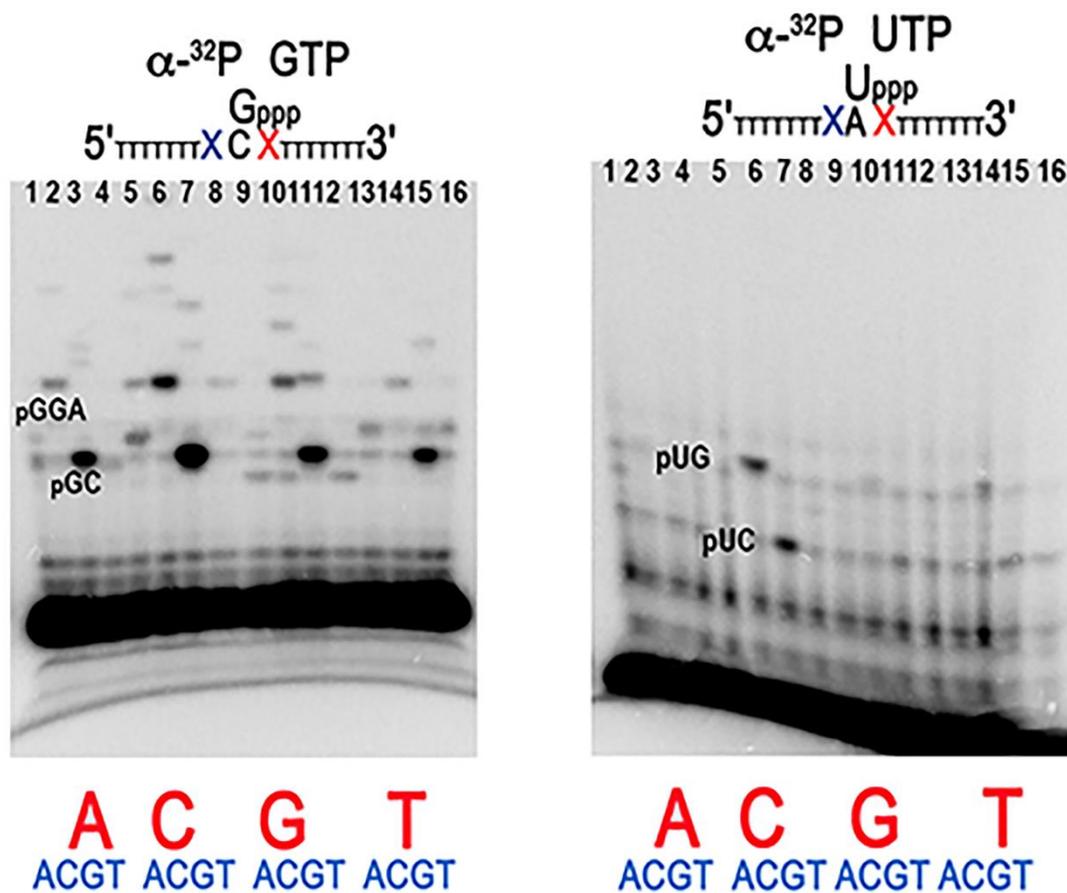


Figura 14. Síntesis de oligorribonucleótidos por AtPrimasa-Helicasa en 64 secuencias de trinucleótido marcadas $\alpha\text{-}^{32}\text{P rGTP}$ o $\alpha\text{-}^{32}\text{P UTP}$. Se probaron las 64 combinaciones posibles de tres nucleótidos en un templado sintético. El ribonucleótido complementario a la base central de trinucleótido dicta la identidad de los productos marcados radioactivamente. La extensión de los oligorribonucleótidos ocurre vía el reconocimiento de siete timidinas después del triplete. Las reacciones contienen 5 μM de templado sintético y 2 μM de Enzima.

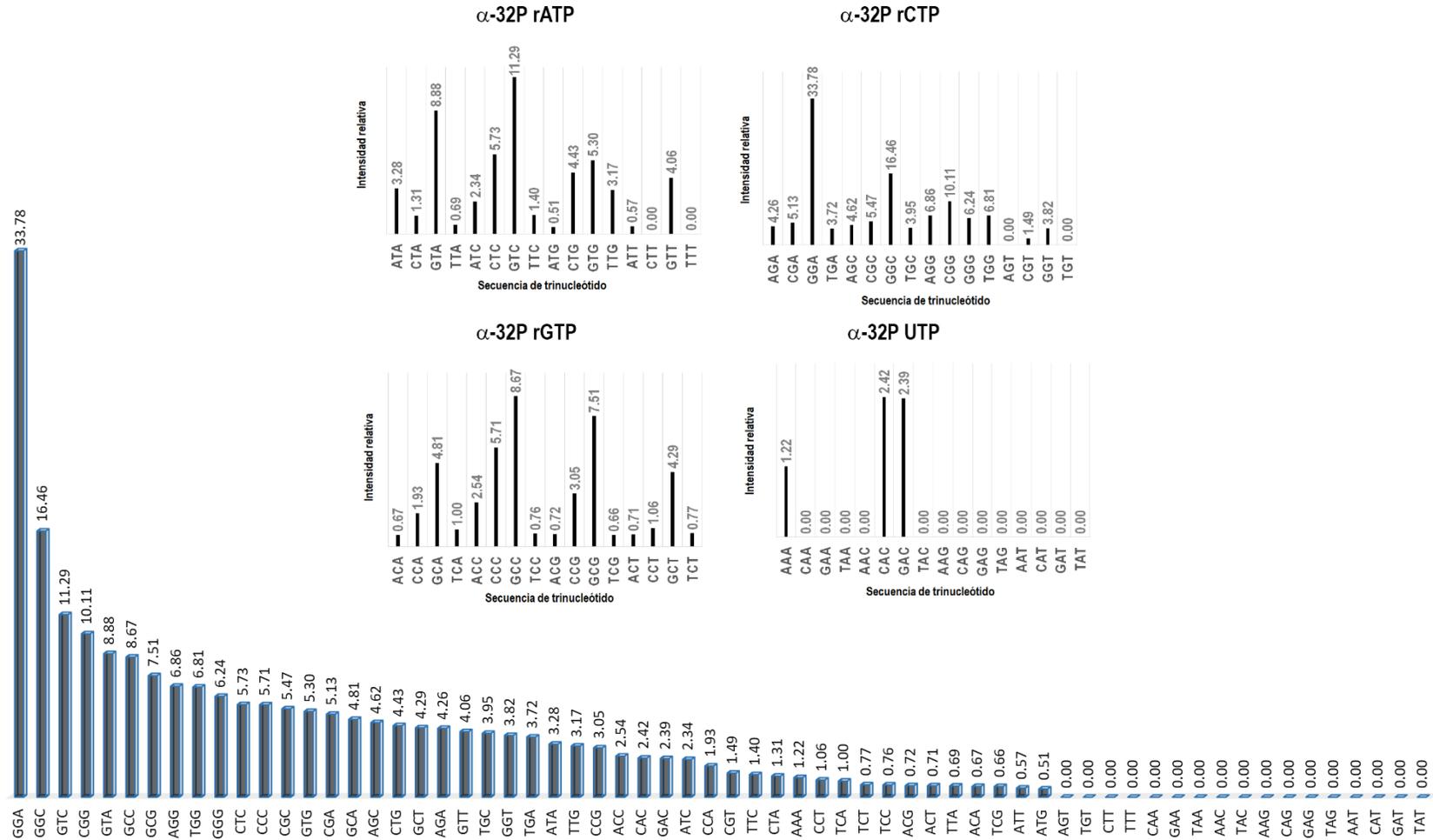


Figura 15. Cuantificación de productos sintetizados en los 64 trinucleótidos. Las bandas correspondientes a los productos de ARN de la reacción de primasa sobre los 64 trinucleótidos fue cuantificada usando el programa ImageJ y comparadas para determinar el trinucleótido sobre el cual AtTwinkle presentaba una preferencia. La intensidad relativa está determinada con la intensidad integrada en escala de grises de la suma de todas las bandas que aparecen en el carril del trinucleótido correspondiente.

Para evitar el sesgo de utilizar solo un NTP marcado para la reacción de primasa en grupos de 16 oligonucleótidos, se decidió realizar un experimento expandido en el cual los 64 oligonucleótidos fueron marcados con los cuatro NTPs radioactivos de forma individual (Fig. 16 y 17).

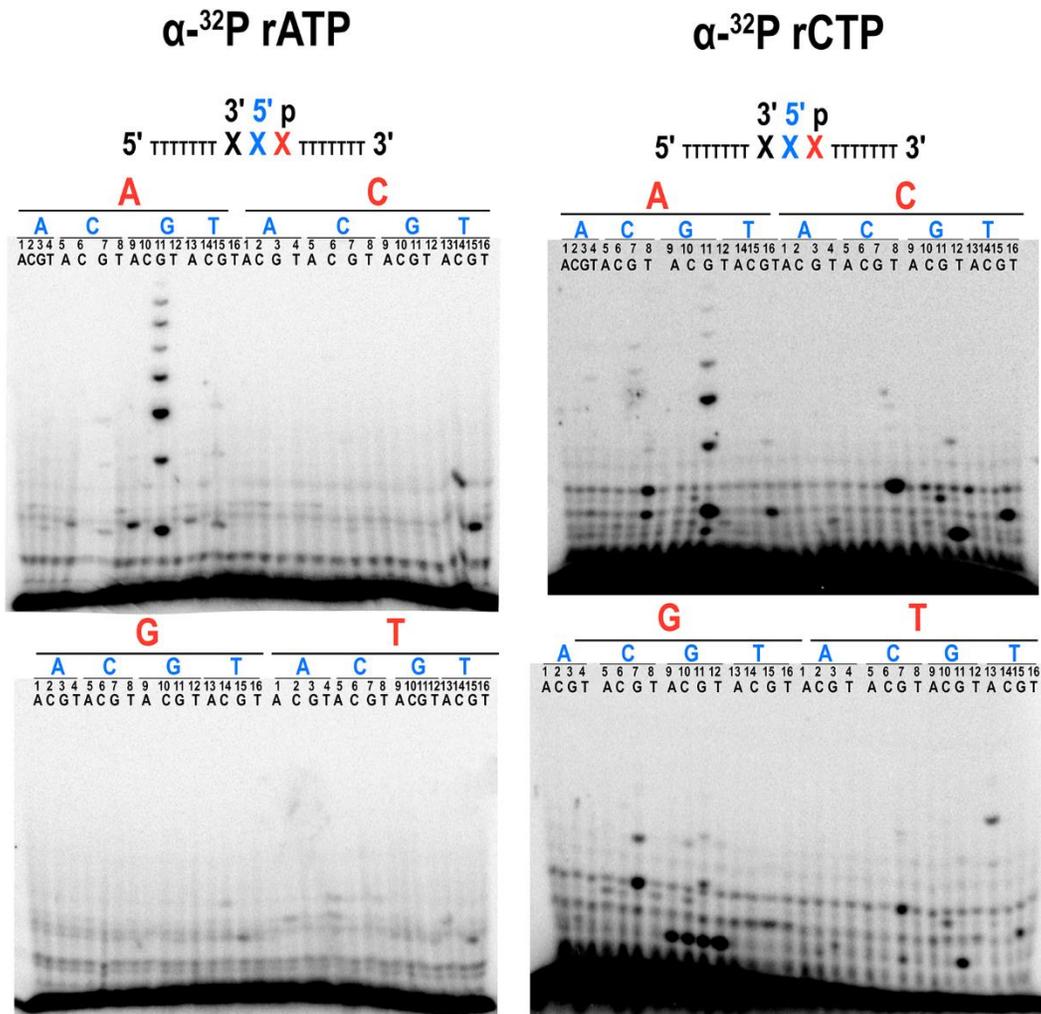


Figura 16. Reacción de 64 oligonucleótidos marcadas con α -³²P-rATP y α -³²P rCTP. Las 64 combinaciones posibles de tres nucleótidos fueron ensayadas con AtPrim y marcadas de forma individual tanto con α -³²P-rATP como con α -³²P rCTP. La cantidad de primasa usada fue de 2 μ M, con 5 μ M del oligonucleótido correspondiente (ANEXO III), resueltos en un gel de 27% de acrilamida y 3M urea.

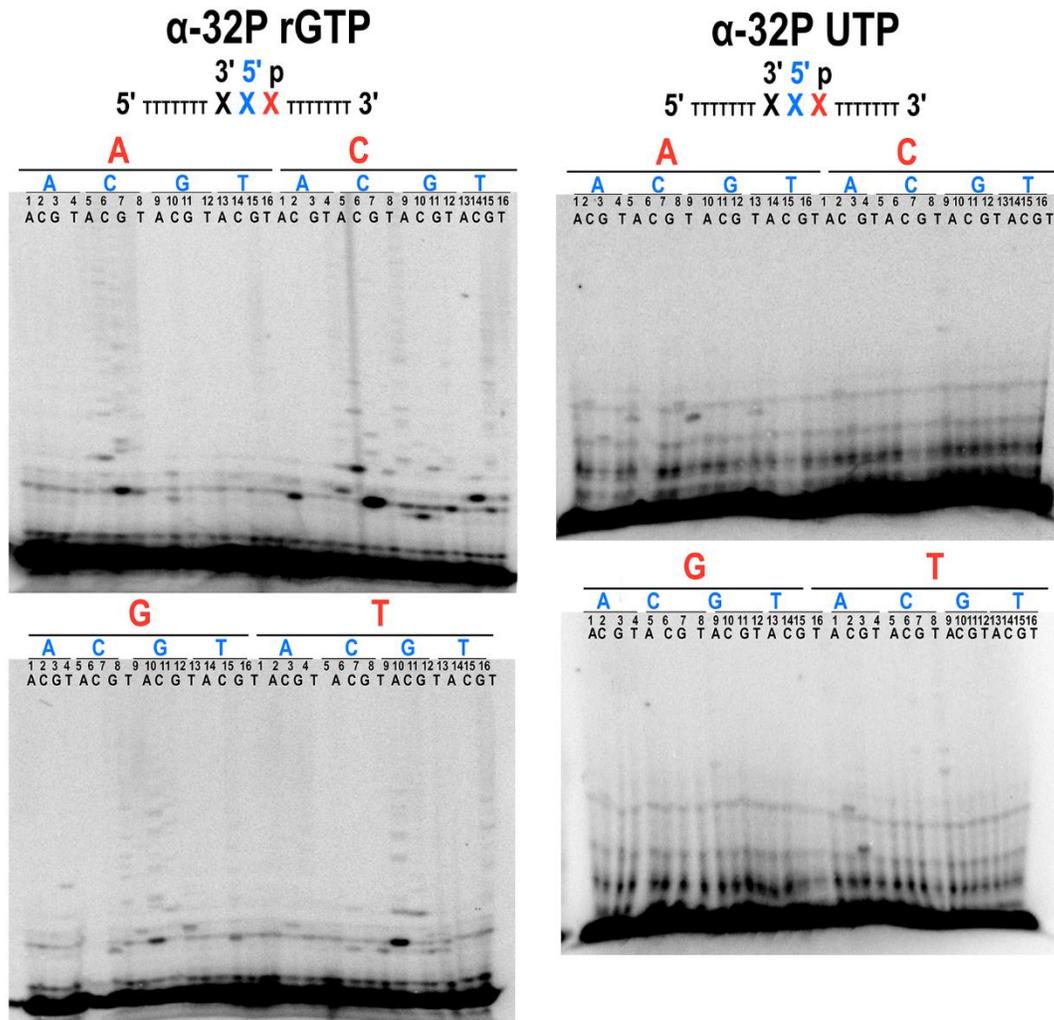


Figura 17. Reacción de 64 oligonucleótidos marcadas con α -³²P-rGTP y α -³²P UTP. Las 64 combinaciones posibles de tres nucleótidos fueron ensayadas con AtPrim y marcadas de forma individual tanto con α -³²P-rGTP como con α -³²P UTP. La cantidad de primasa usada fue de 2 μ M, con 5 μ M del oligonucleótido correspondiente (ANEXO III), resueltos en un gel de 27% de acrilamida y 3M urea.

Una comparación directa entre el patrón de migración de los productos de ARN sintetizados por la AtPrimasa y la T7 primasa sobre el templado sintético que contiene la secuencia 5'-GGA-3' y 5'-GTC-3', respectivamente, muestra que los ribonucleótidos sintetizados comparten el mismo patrón y que AtTwinkle es una ADN primasa eficiente con activada catalítica comparable a la T7 primasa (Fig. 18).

El patrón de migración de los oligorribonucleótidos sintetizados es independiente de la identidad del α -³²P rNTP etiquetado. Este experimento aporta más evidencia de que AtTwinkle reconoce dos nucleótidos, 5'-GA-3', como elemento crítico y comienza la síntesis de oligorribonucleótidos con 5' rCTP como el NTP inicial.

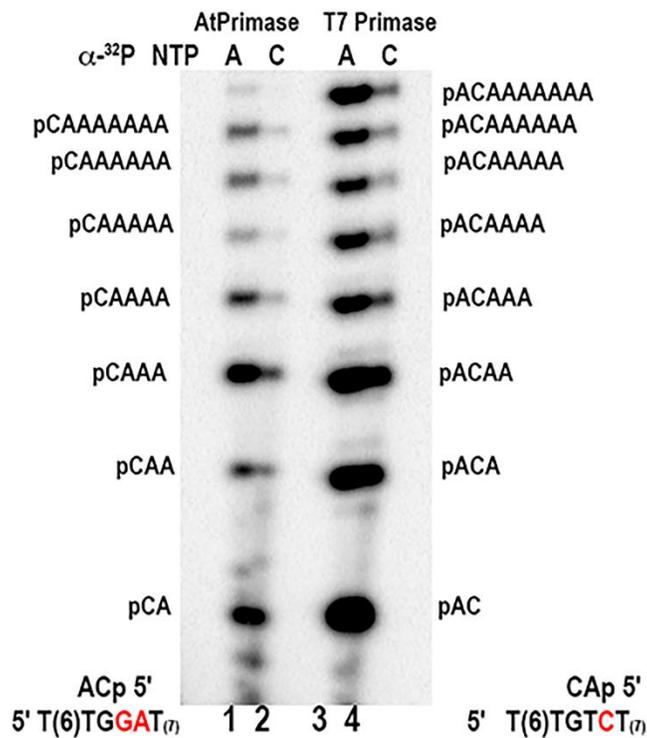


Figura 18. Comparación directa de la síntesis de ribonucleótidos entre la AtPrimasa y la T7 primasa. Un gel de secuenciación mostrando el patrón de migración de los productos de ARN sintetizados por la AtPrimasa y la T7 primasa ensayados sobre un templado que contienen las secuencias de reconocimiento 5'-GGA-3' y 5'-GTC-3' en un templado de ADN de cadena sencilla. En el caso de la T7 primasa, el producto de ARN con migración más baja corresponde al dirribonucleótido 5'-pppAC (**carriles 3 y 4**) que es extendido hasta nueve ribonucleótidos de acuerdo al templado de timidinas. En AtPrimasa (**carriles 1 y 2**) el producto con migración más baja corresponde al dirribonucleótido 5'-pppCA que es extendido con AMP siguiente el templado de timidinas. Los productos de reacción fueron marcados con α -³²P-rATP (**carriles 1 y 3**) y α -³²P rCTP (**carriles 2 y 4**). Las reacciones de primasas fueron hechas con 5 μ M de templado sintético y 1 μ M de AtPrimasa y T7 Primasa.

4.4 AtTwinkle reconoce 5'-GA-3' como bases crípticas

Para finalmente corroborar la característica única de reconocimiento del templado por parte de AtTwinkle, comparamos la síntesis de ribonucleótidos de la AtPrimasa usando la secuencia 5'-GGA-3' y secuencias ya caracterizadas que son reconocidas por diversas primasas usando ribonucleótidos marcados independientemente (**Fig. 19 carriles 5 y 6**)

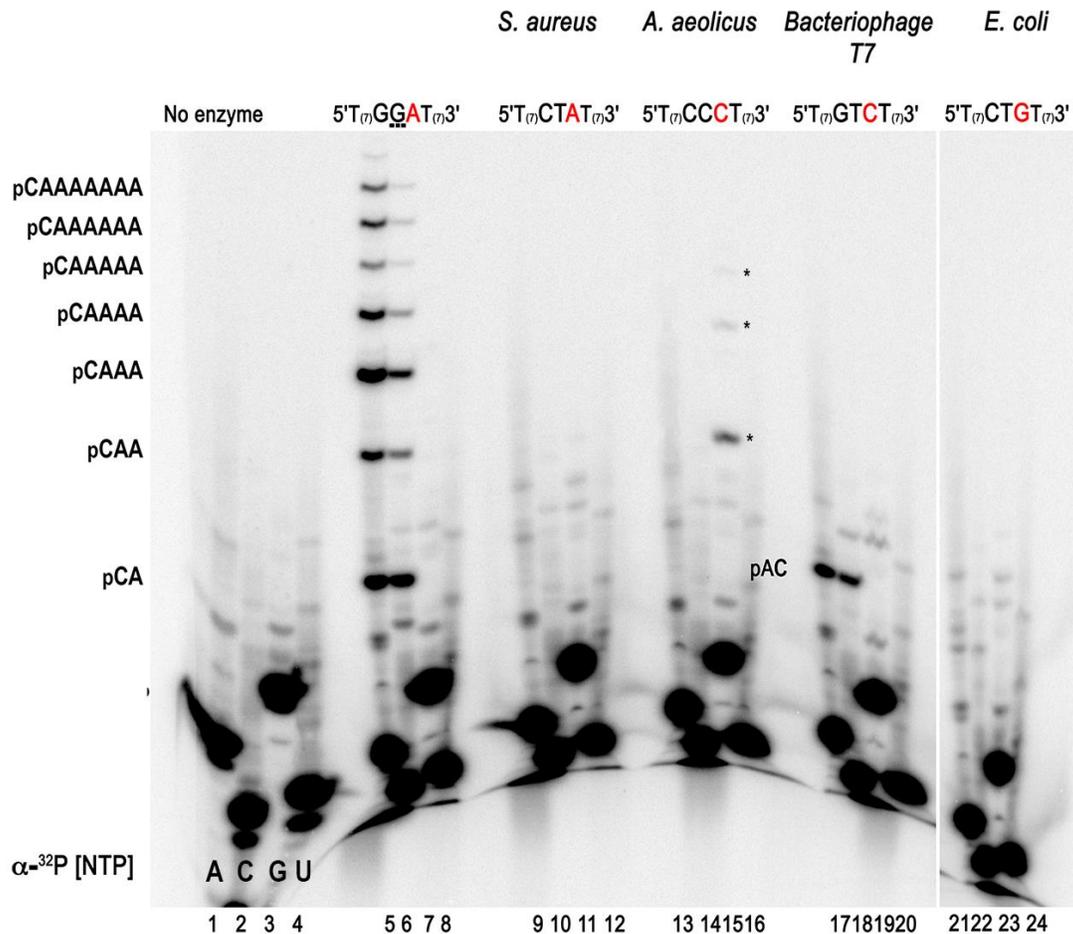


Figura 19. AtPrimasa reconoce un trinucleótido de reconocimiento novedoso. Síntesis de oligorribonucleótidos por la AtPrimasa sobre templados sintéticos con las secuencias de reconocimiento canónicas para las primasas de *S. aureus*, *A. aeolicus*, Bacteriófago T7 y *E. coli* en comparación con la secuencia 5'-GGA-3'. Los productos de ARN fueron marcados independientemente con α -³²P-rATP, α -³²P rCTP, α -³²P rGTP o α -³²P UTP. Las identidades de los productos de ARN están indicadas en el gel. Las reacciones contenían 5 μ M de templado sintético y 2 μ M de AtPrimasa.

El experimento confirma la identidad de que el primer ribonucleótido sintetizado es 5'-pppCA y que es extendido hasta nueve ribonucleótidos siguiendo el templado de timidinas (**Fig. 19, carriles 5 a 8**). Este experimento muestra que en la secuencia de reconocimiento de la T7 primasa, AtTwinkle sintetiza el ribonucleótido 5'-pppAC que no es extendido posteriormente (**Fig. 19, carriles 17 a 20**). De forma interesante, la síntesis de oligorribonucleótidos usando la secuencia de reconocimiento de la primasa de *A. aeolicus* (5'-CCC-3') solo es observada cuando es marcada con α -³²P rGTP (**Fig. 19, carriles 13 a 16**). Dado de que templado 5'-CCC-3' contiene siete timidinas que son complementarias para adeninas, la ausencia de un producto de ARN en presencia de ATP marcado indica que se está sintetizando poli-rG mediante un proceso iterativo, este proceso se asemeja a la síntesis de ARN abortiva iterativa por las ARN polimerasas bacterianas [40, 41].

Con el fin de evaluar las dos bases cripticas del sitio de reconocimiento de AtTwinkle, ensayamos sobre oligonucleótidos en los cuales, sistemáticamente, se modificó la adenina 3' y la guanosina central, las cuales fueron marcadas con los cuatro NTPs radioactivos (**Fig. 20**). La sustitución de cualesquiera de las dos bases cripticas por cualquier otra base resulto en una disminución considerable de la síntesis de ribonucleótidos (**Fig. 20, carriles 1 a 12**). En el experimento de síntesis de oligorribonucleótidos en el cual la adenina 3' fue modificada, se observó una débil formación de productos de ARN mayores a 4 nts cuando el templado contienen la secuencia 5'-GGG-3' y solo cuando CTP es usado como etiqueta radioactiva (**Fig. 20, carril 6**). La ausencia de productos radioactivos en las reacciones etiquetadas con ATP, indican que AtTwinkle interactúa con las secuencias homopoliméricas 5'-CCC-3' o 5'-GGG-3' en un proceso que dirige la síntesis iterativa de poli-rG o poli-rC. Este experimento indica que la identidad de la adenina 3' y la guanosina central son esenciales para la síntesis eficiente de ribonucleótidos.

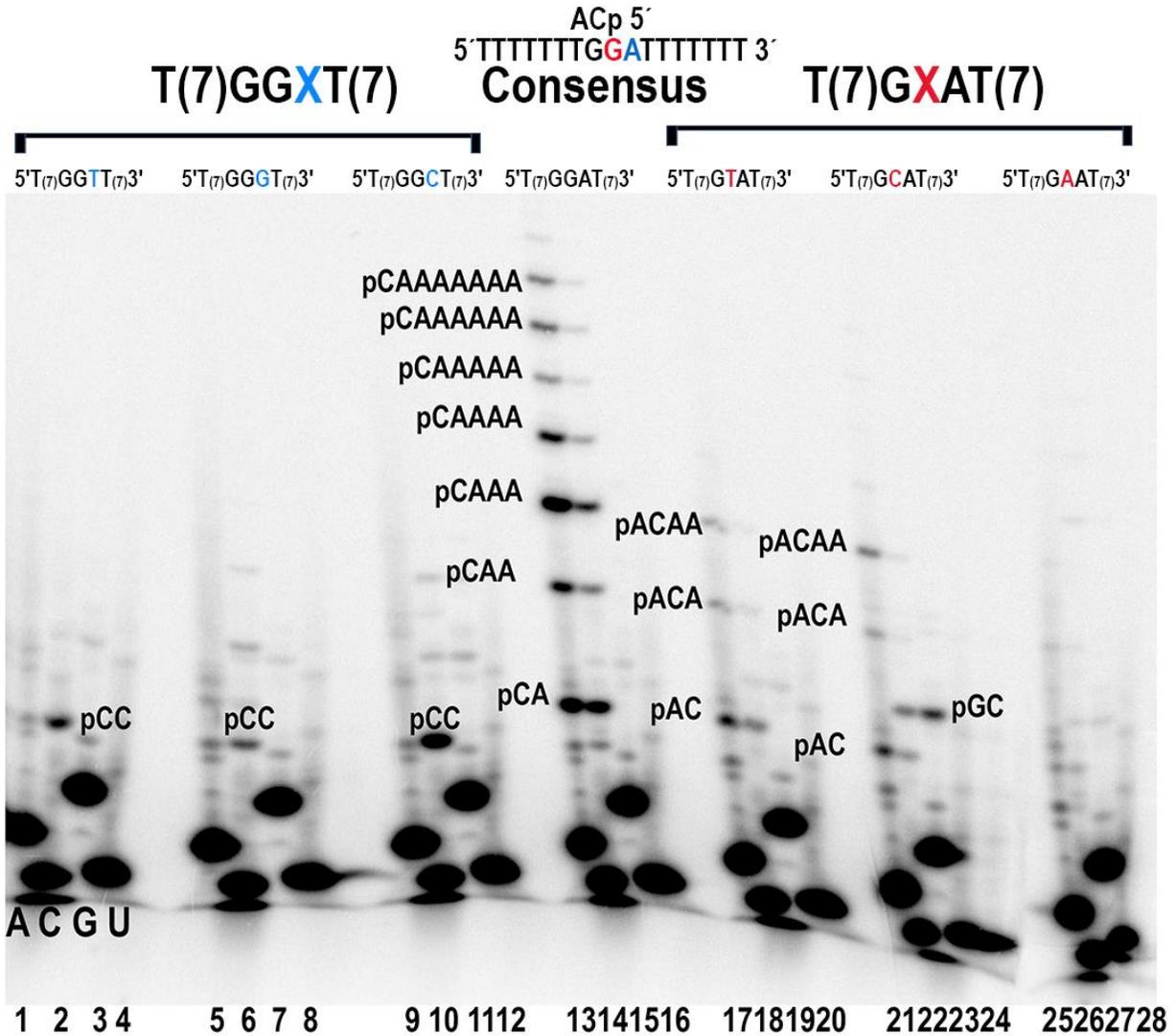


Figura 20. El reconocimiento del templado requiere del par críptico 5'-GA-3'. La identidad de la guanósina o adenina críptica en el par 5'-GA-3' son necesarias para la síntesis de oligorribonucleótidos. La síntesis de oligorribonucleótidos disminuye cuando la adenina críptica (**carriles 1 a 12**) o la guanósina (**carriles 17 a 28**) del par 5'-GA-3' son modificadas con cualquier otro ribonucleótido. Los productos fueron marcados de forma independiente con los cuatro nucleótidos radioactivos. Un experimento control con el trinucleótido canónica 5'-GGA-3' (**carriles 13 a 16**) se presenta y se identifican los productos de ARN que sintetiza.

4.5 AtTwinkle presenta baja selectividad para el ribonucleótido 3' después del trinucleótido de reconocimiento

Modificando la identidad de la base 5'-G en la secuencia 5'-GGGA-3' resulta en una secuencia de ADN de cadena sencilla que no es instruccional para la síntesis de primers por AtTwinkle. (**Fig. 13 carriles 9 a 12**), en suma, estos resultados indican que la identidad del 5' rNTP durante la síntesis de ribonucleótidos por AtTwinkle es CTP y que dos bases crípticas son requeridas para el reconocimiento del templado. Para probar la preferencia de incorporación del 3' NMP se usó un templado sintético que contiene la secuencia 5'-XGGA-3' en el cual X corresponde a cualquiera de los cuatro dNTPs que fueron variados en el templado. Una examinación de los productos de extensión por la AtPrimasa cuando dCMP o dGMP se encuentran en la posición 5' antes de la secuencia de reconocimiento GGA indica que la síntesis de ribonucleótidos es aproximadamente la misma (**Fig. 21**).

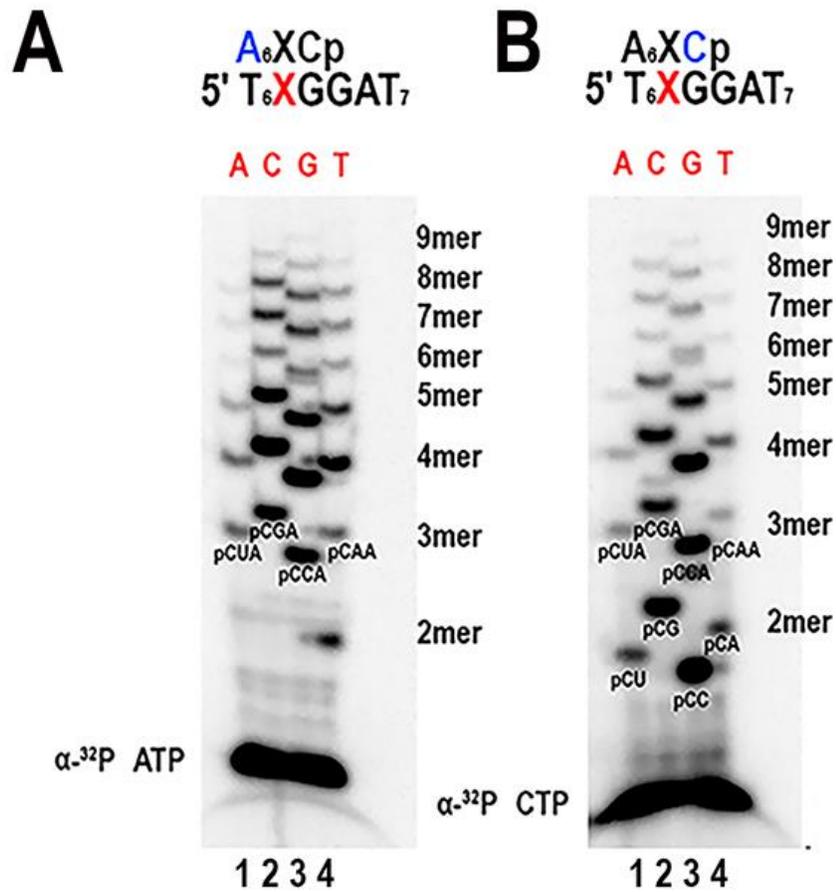


Figura 21. AtTwinkle no es selectiva para la incorporación de la base 3'. AtTwinkle presenta una preferencia para CTP como el NTP 5', para evaluar la especificidad de la base en el extremo 3', la identidad de templado 5'-XGGA-3' fue variada con cada uno de los cuatro de desoxirribonucleótidos. Las reacciones de síntesis de ribonucleótidos fueron marcadas con $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -rATP (**A**) o $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ rCTP (**B**), la identidad de la base variada en el templado fue adenina (**carril 1**), citosina (**carril 2**), guanosina (**carril 3**) o timidina (**carril 4**). La identidad de los productos se indica en el gel.

En comparación, la síntesis de ribonucleótidos decae cuando dAMP y dTMP se encuentran en esta posición del templado. Nuestros datos sugieren que cuando “G” es la base del 5' después del dinucleótido críptico, AtTwinkle usa 5'-GGGGA-3' y 5'-CGGGA-3' como templado; al mismo tiempo, usa 5'-TGGGA-3' y 5'-AGGGA-3' en menor medida. Esta carencia de selectividad para la incorporación del ribonucleótido 3' contrasta con la selectividad de la T7 primasa que preferencialmente se une a CTP en el dominio de unión del RNAP [25].

4.6 AtTwinkle realiza la síntesis de ribonucleótidos de forma eficiente

A fin de comparar la actividad enzimática de AtTwinkle y la T7 primasa, se ensayó la síntesis de ribonucleótidos con varias concentraciones de AtPrimasa (100 a 800 nM) sobre cuatro templados 5'-GGGA-3', 5'-GGA-3', 5'-GTA-3', 5'-GTC-3' en comparación a la actividad presente por la T7 primasa con concentraciones desde 6.25 a 400 nM en la secuencia canónica 5'-GGGTC-3'. A una concentración de 6.25 nM de T7 primasa la cantidad de productos de ARN sintetizados son comparables a los producidos con 800 nM de AtPrimasa (**Fig. 22, carriles 2 y 17**). Sin embargo, es interesante notar que AtPrimasa a una concentración de 100 nM sintetiza cantidades similares de un tetrarribonucleótido que la sintetizada por T7 a 200 nM (**Fig., 22, carriles 3 y 15**). Estos datos indican que la AtPrimasa es eficiente para la síntesis de productos de ARN de entre 3 y 5 ribonucleótidos. Una cuantificación de la cantidad de oligorribonucleótidos sintetizados por la T7 y At Primasas a una concentración de 100 nM indica que la T7 primasa es superior en síntesis total de productos de ARN, sin embargo, la AtPrimasa sintetiza aproximadamente 3 veces más tri y tetra ribonucleótidos que la T7 primasa.

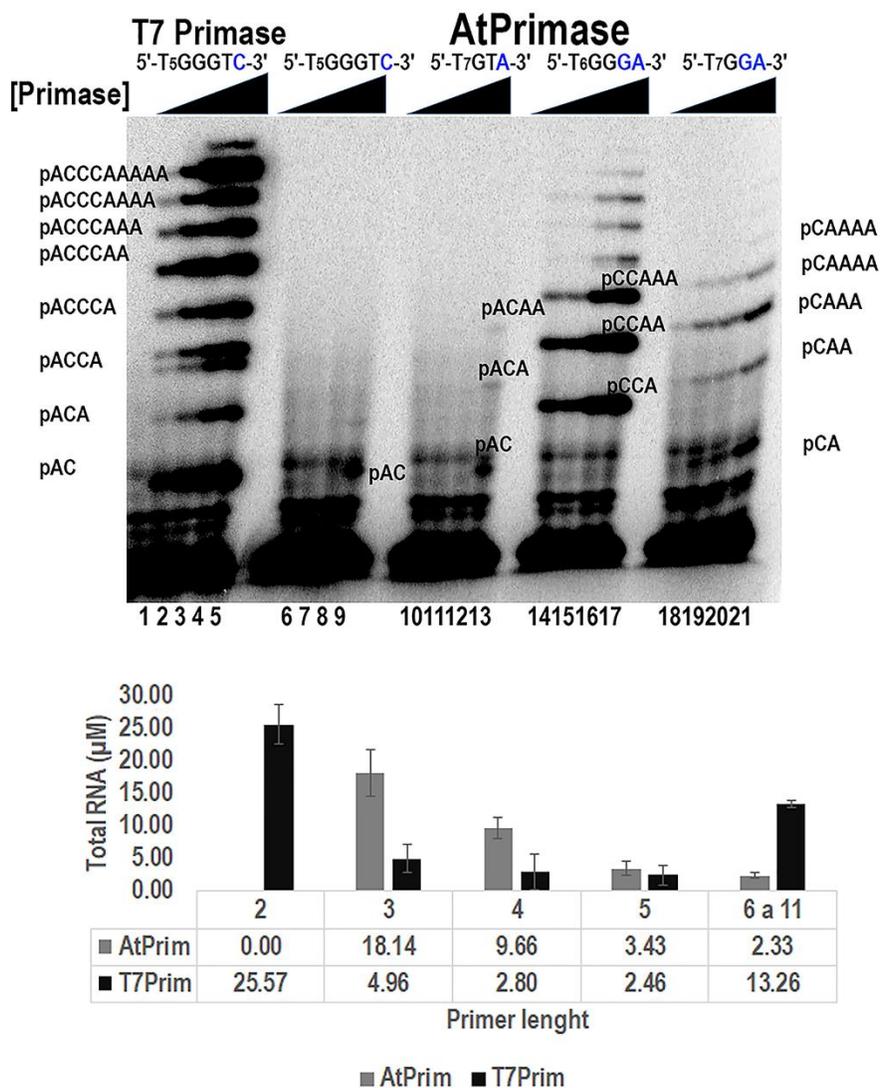


Figura 22. AtTwinkle sintetiza primers de ARN de forma eficiente. Comparación entre la síntesis de oligorribonucleótidos por la AtPrimasa sobre templados de ADN conteniendo la secuencia 5'-GGGA-3', 5'-GGA-3', 5'-GTA-3', 5'-GTC-3' (**carriles 6 a 21**) en comparación a los sintetizados por la T7 primasa (**carriles 1 a 5**) sobre un templado con la secuencia 5'-GGGTC-3'. AtPrimasa fue ensayada desde 100 a 800 nM, mientras que la T7 primasa estuvo presente desde 6.25 a 400 nM. Cada reacción fue marcada con α -³²P-rATP. La identidad de los oligorribonucleótidos sintetizados son indicado en el gel. La grafica muestra las cantidades molares de síntesis de oligorribonucleótidos por 100 nM de T7 y Arabidopsis primasas sobre los templados 5'-GGGTC-3' y 5'-GGGA-3', respectivamente. Para determinar las cantidades molares de productos de ARN la intensidad de cada banda radioactiva fue corregida con la cantidad de AMPs presentes en cada ribonucleótido.

4.7 AtTwinkle sintetiza primers para las ADN polimerasas organelares de plantas

A. thaliana codifica para dos ADN polimerasas señalizadas a organelos. Estas ADN polimerasas, AtPolIA y AtPolIB, son las únicas ADN polimerasas presentes en organelos de plantas y por lo tanto son las candidatas lógicas para extender los primers de ARN sintetizados por la primasa en la cadena discontinua durante la replicación del ADN organelar [42]. Un experimento control indica que a la concentración más baja de polimerasa esta extiende por completo un templado alineado con un primer de ADN en 10 min (Fig. 23).

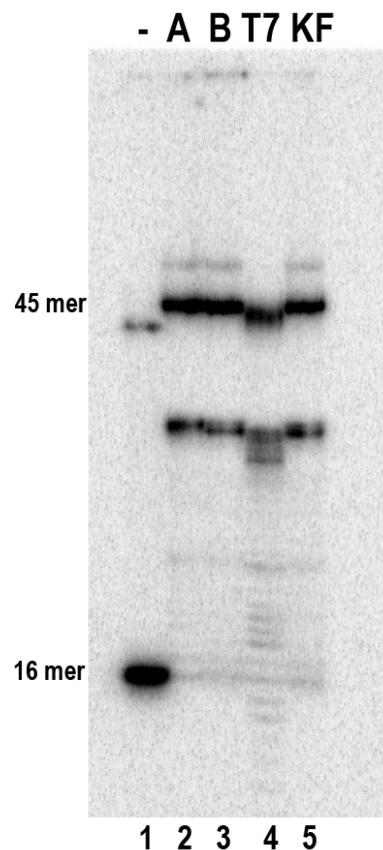


Figura 23. Ensayo de polimerización con un primer de ADN. Se utilizaron cuatro ADN polimerasas, AtPolIA y AtPolIB de *Arabidopsis thaliana* en su forma sin actividad exonucleasa; la T7 ADN polimerasa WT, y el fragmento Klenow de *E. coli* en su forma sin actividad exonucleasa. Se usaron 100 nM de polimerasa y 5 nM de sustrato de 16 mer que puede ser elongado hasta 45 mer marcado con γ -³²Fosfato. La reacción se realizó a 30 °C durante 10 min.

Con el fin de evaluar la capacidad de AtTwinkle para sintetizar primers funcionales para las AtPols, se evaluó la eficiencia de AtPolIA Y AtPolIB en comparación del fragmento Klenow de *E. coli* y la T7 ADN polimerasa para extender primers sintetizados por AtTwinkle. En este experimento, un templado de ADN de cadena sencilla conteniendo la secuencia 5'-T₇AT₆GGGGAT₅-3' fue ensayado en presencia de concentraciones creciente de ADN polimerasa en presencia de α -³²P-dATP, en la reacción acoplada de AtPrimasa y ADN polimerasas, solo se observaron productos con AtPolIA y AtPolIB (Fig. 24, carriles 2 a 7).

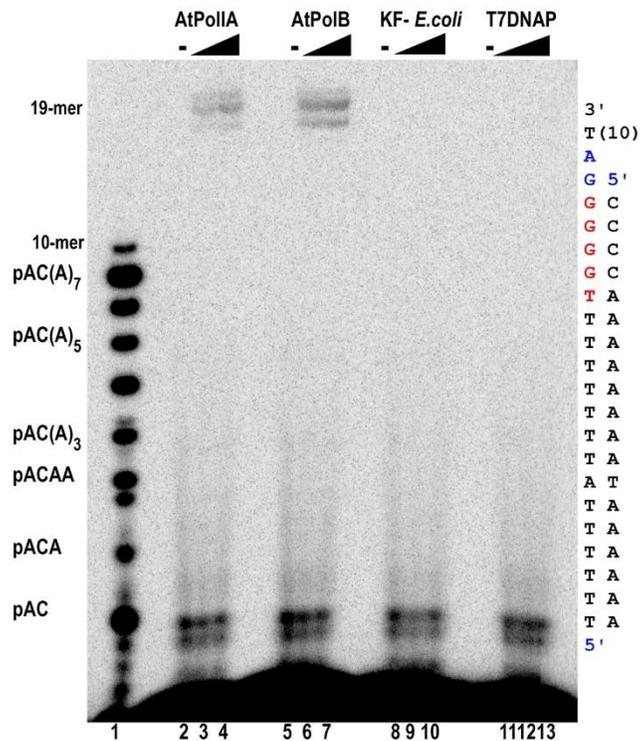


Figura 24. Las ADN polimerasas de *A. thaliana* extienden los primers sintetizados por AtTwinkle. Las ADN polimerasas de *A. thaliana* AtPolIA y AtPolIB extienden los primers de ARN sintetizados por la AtPrimasa (carriles 2 a 4 y 5 a 7). El fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (carriles 8 a 10) y la ADN polimerasa de T7 (carriles 11 a 13) son incapaces de realizar la extensión del primer. La migración del producto de ARN:ADN corresponde al peso esperado de 19-mer. Las reacciones acopladas de primasa-polimerasa fueron marcadas con α -³²P-dATP. La concentración de AtPrim fue de 150 nM, mientras que las polimerasas fueron usadas a 75 y 150 nM. El carril 1 muestra los productos de la T7 primasa marcados con α -³²P-ATP usados como marcadores de peso molecular.

V. DISCUSION

En este trabajo encontramos que la ADN primasa helicasa organelar de la planta modelo *A. thaliana* reconoce una secuencia específica de tres nucleótidos sobre ADN de cadena sencilla en la cual dos nucleótidos actúan como elementos crípticos y son necesarios para la eficiente síntesis de ARN. AtTwinkle sintetiza efectivamente ribonucleótidos largos sobre la secuencia 5'-GGA-3' (**Fig. 13 rCTP**). En este trinucleótido, las bases 5'-GA-3' funcionan como elementos crípticos, sustituciones ya sea de la base 5'-G o A-3' y sustituciones de la base 5'-G inicial, en el trinucleótido de reconocimiento, anula la síntesis de ribonucleótidos (**Fig. 20**). En templados sintéticos AtTwinkle sintetiza eficientemente los dirribonucleótidos pppAC, pppUC, pppGC, y pppCC, sin embargo, estos productos son extendidos a productos mayores (**Fig. 13 y 14**). La aparente falta de discriminación de la posición 5' observada en un ensayo de fosfodiesterasa usando el vector M13 de cadena sencilla como templado puede ser debida a la síntesis de estos dirribonucleótidos (**Fig. 11**). En templados sintéticos que contienen la secuencia 5'-GA-3' críptica, AtTwinkle presenta una alta selectividad por rCTP como el ribonucleótido 5', esta selectividad contrasta con la relajada selectividad para el ribonucleótido 3', en la cual la identidad del nucleótido de elongación puede ser cualquier NTP, sin embargo, CMP o GMP son incorporados preferencialmente en la cadena creciente de ARN (**Fig. 21**), nuestros datos indican que la secuencia preferida de reconocimiento sobre una cadena de ADN por AtTwinkle es 5'-GGGA-3' o 5'-CGGA-3', dentro de estas secuencias las dos bases subrayadas son los nucleótidos crípticos, por lo tanto nuestro estudio muestra que los productos de ARN sintetizados por AtTwinkle están preferencialmente compuestos de citosinas y guaninas, sugiriendo que las primasa de plantas seleccionan para incorporar estos ribonucleótidos en las regiones ricas en A/T en los genomas organelares [43]. Los ribonucleótidos sintetizados por AtTwinkle se asemeja a los sintetizados por *Aquifex aeolicus* [18] sugiriendo que las plantas han seleccionado un apareamiento de bases termodinámicamente estable durante la síntesis de primers. A pesar de la estabilidad conferida por estas

secuencias puede ser necesaria durante la transferencia de los primers a las ADN polimerasas, es posible que la selectividad para una secuencia de reconocimiento rica en G/C pueda jugar un rol en la determinación de la longitud de los fragmentos de Okazaki durante la replicación organelar.

El mecanismo preciso mediante el cual el templado de ADN de cadena sencilla es reconocido por una primasa no está completamente entendido. Evidencia bioquímica y estructural sugiere que una interacción entre el ZBD y el dominio RNAP dirige el reconocimiento del templado que guía la síntesis del dirribonucleótido inicial [25, 44-47]. Los residuos del ZBD involucrados en la coordinación del metal solo estas compuestos de cisteínas (motivo Cys4) en primasas de bacteriófagos, mientras que en la mayoría de bacterias una histidina reemplaza una de estas cisteínas (motivo Cys-His-Cys2). El motivo altamente conservado CXXC(H)(X₁₅₋₁₈)CXXC del ZBD en primasas procariotas se pliega en una estructura denominada listón de zinc [48], que puede ser dividido en dos repetidos conservados CXXC(H), dentro de estos repetidos, los residuos de cisteínas o histidina involucrados en la coordinación del Zn²⁺ están separados por dos aminoácidos no conservados. La diferencia más notable entre las primasas de bacteriófagos y plantas es la variación en los residuos cerca de las cisteínas conservadas que coordinan el átomo de cinc, en primasas de plantas terrestres, el primer repetido CXXC esta conservado, mientras que el segundo repetido CXXC es sustituido por una secuencia CXRXKC (**Fig. 7**). Un modelo computacional del ZBD de AtTwinkle sugiere que las cadenas laterales de Arg166 y Lys168 en el elemento CXRXKC y un residuo de triptófano conservado (Trp 164) están en una orientación similar a la His33 y Lys70 de la primasa de T7 y *Clostridium difficile*, sugiriendo que estos residuos pueden jugar un papel importante en el reconocimiento del templado. La secuencia CXRXKC también está presente en primasa de *C. botulinum* y bacteriófago VpV262 [49] sugiriendo que, si este elemento juega un papel en el templado de reconocimiento, la necesidad de dos bases cripticas no sería única de plantas. El genoma nuclear de *Arabidopsis* codifica para una proteína organelar que solo contiene el dominio primasa de

AtTwinkle (At1g30660) esta primasa también contiene una secuencia que se asemeja al elemento CXRXKC [33]. A pesar de que estudios de estructura-función son necesarios para elucidar el mecanismo por el cual se requieren dos bases cripticas para reconocer un templado de ADN de cadena sencilla, se puede especular que las diferencias de aminoácidos en el ZBD con primasas helicadas procariotas puede ser relevante para la selectividad del templado.

Entender el reconocimiento de secuencia de AtTwinkle es un primer paso hacia la caracterización bioquímica del replisoma de organelos de plantas. Encontramos que los productos de ARN sintetizados por AtTwinkle son eficientemente usados como primers por las ADN polimerasas organelares de plantas. En el replisoma análogo del bacteriófago T7, la T7 ADN polimerasa utiliza tetrarribonucleótidos sintetizados por la T7 primasa helicada como primers vía un mecanismo de entrega, este mecanismo implica un interacción precisa entre la primasa y la polimerasa [50, 51]. Es interesante notar que AtTwinkle sintetiza abundantes productos de ARN de 3 a 5 ribonucleótidos, dado que estos oligorribonucleótidos cortos son fácilmente disociados de un templado de ADN, es posible que las primasa y polimerasa organelares interactúan físicamente durante la extensión de los primers. A pesar de que la longitud e identidad precisa de los oligorribonucleótidos sintetizados aun no son identificados, este trabajo demuestra que AtTwinkle es una primasa funcional selectiva para AtPols. Nuestros estudios sugieren que el mecanismo de replicación organelar se asemeja a la replicación del genoma del bacteriófago T7. Este proceso contrasta con la replicación del ADN mitocondrial en metazoos en la cual la RNAP sintetiza los primers para la ADN polimerasa gamma. Este trabajo también muestra que una primasa helicada de organelos de plantas derivada del bacteriófago T7 hace primers para ADN polimerasas derivadas de bacterias, ilustrando la coevolución de dos enzimas con orígenes evolucionarios distintos.

VI. PERSPECTIVAS

- Determinar la secuencia del primer que es elongado por las ADN polimerasas de *Arabidopsis thaliana*
- Evaluar la actividad helicasa
- Determinar el papel de AtTwinkle en la replicación por recombinación homóloga
- Determinar la estructura tridimensional de AtTwinkle, del dominio primasa y el dominio helicasa

VII. CONCLUSIONES

- AtTwinkle reconoce un trinucleótido mínimo de 5'-GGA-3' sobre un templado de ADN de cadena sencilla sobre el cual sintetiza de forma eficiente oligorribonucleótidos.
- A diferencia de otras ADN primasa, AtTwinkle reconoce dos elementos críticos en el trinucleótido preferencial (5'-GA-3').
- AtTwinkle discrimina la base del templado en la posición 5' +1 del sitio de reconocimiento 5'-GGA-3', en la cual, polimeriza preferentemente GMP o CMP.
- En comparación a la primasa del bacteriófago T7, AtTwinkle produce una menor cantidad de productos de ARN, sin embargo, la cantidad total de ribonucleótidos sintetizados de tamaño 3 a 5 es mayor al menos 2 veces a la sintetizada por la gp4 primasa, indicando la posibilidad de que sean estos primers los usados por las ADN polimerasas de organelos.
- AtTwinkle sintetiza oligorribonucleótidos que pueden ser usados por las ADN polimerasas de plantas de forma específica.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Shutt, T.E. and M.W. Gray, *Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins*. Trends Genet, 2006. **22**(2): p. 90-5.
2. Shutt, T.E. and M.W. Gray, *Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes*. J Mol Evol, 2006. **62**(5): p. 588-99.
3. Masters, B.S., L.L. Stohl, and D.A. Clayton, *Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7*. Cell, 1987. **51**(1): p. 89-99.
4. Hamdan, S.M. and C.C. Richardson, *Motors, switches, and contacts in the replisome*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 205-43.
5. Lee, S.J. and C.C. Richardson, *Choreography of bacteriophage T7 DNA replication*. Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(5): p. 580-6.
6. Gualberto, J.M., et al., *The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance*. Biochimie, 2014. **100**: p. 107-20.
7. Gissi, C., F. Iannelli, and G. Pesole, *Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species*. Heredity (Edinb), 2008. **101**(4): p. 301-20.
8. Christensen, A.C., *Plant mitochondrial genome evolution can be explained by DNA repair mechanisms*. Genome Biol Evol, 2013. **5**(6): p. 1079-86.
9. Frick, D.N. and C.C. Richardson, *DNA primases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 39-80.
10. Arezi, B. and R.D. Kuchta, *Eukaryotic DNA primase*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(11): p. 572-6.
11. Yoda, K. and T. Okazaki, *Specificity of recognition sequence for Escherichia coli primase*. Mol Gen Genet, 1991. **227**(1): p. 1-8.
12. Nakai, H. and C.C. Richardson, *Leading and lagging strand synthesis at the replication fork of bacteriophage T7. Distinct properties of T7 gene 4 protein as a helicase and primase*. J Biol Chem, 1988. **263**(20): p. 9818-30.
13. Kusakabe, T. and C.C. Richardson, *Template recognition and ribonucleotide specificity of the DNA primase of bacteriophage T7*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5943-51.
14. Mendelman, L.V. and C.C. Richardson, *Requirements for primer synthesis by bacteriophage T7 63-kDa gene 4 protein. Roles of template sequence and T7 56-kDa gene 4 protein*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23240-50.
15. Tseng, T.Y., D.N. Frick, and C.C. Richardson, *Characterization of a novel DNA primase from the Salmonella typhimurium bacteriophage SP6*. Biochemistry, 2000. **39**(7): p. 1643-54.
16. Cha, T.A. and B.M. Alberts, *Studies of the DNA helicase-RNA primase unit from bacteriophage T4. A trinucleotide sequence on the DNA template starts RNA primer synthesis*. J Biol Chem, 1986. **261**(15): p. 7001-10.

17. Koepsell, S.A., et al., *Staphylococcus aureus* helicase but not *Escherichia coli* helicase stimulates *S. aureus* primase activity and maintains initiation specificity. *J Bacteriol*, 2006. **188**(13): p. 4673-80.
18. Larson, M.A., et al., *Hyperthermophilic Aquifex aeolicus* initiates primer synthesis on a limited set of trinucleotides comprised of cytosines and guanines. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(16): p. 5260-9.
19. Kulczyk, A.W., et al., *An interaction between DNA polymerase and helicase is essential for the high processivity of the bacteriophage T7 replisome*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(46): p. 39050-60.
20. Zhang, H., S.J. Lee, and C.C. Richardson, *Essential protein interactions within the replisome regulate DNA replication*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(20): p. 3413-4.
21. Kato, M., et al., *Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis*. *Mol Cell*, 2003. **11**(5): p. 1349-60.
22. Sanchez-Sandoval, E., et al., *Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences*. *Mitochondrion*, 2015. **24**: p. 22-31.
23. Cupp, J.D. and B.L. Nielsen, *Minireview: DNA replication in plant mitochondria*. *Mitochondrion*, 2014. **19 Pt B**: p. 231-7.
24. Korhonen, J.A., et al., *Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro*. *EMBO J*, 2004. **23**(12): p. 2423-9.
25. Kusakabe, T., et al., *The Cys4 zinc finger of bacteriophage T7 primase in sequence-specific single-stranded DNA recognition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4295-300.
26. Spelbrink, J.N., et al., *Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria*. *Nat Genet*, 2001. **28**(3): p. 223-31.
27. Wanrooij, S., et al., *Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(32): p. 11122-7.
28. Seow, F., et al., *The plastidic DNA replication enzyme complex of *Plasmodium falciparum**. *Mol Biochem Parasitol*, 2005. **141**(2): p. 145-153.
29. McKinney, E.A. and M.T. Oliveira, *Replicating animal mitochondrial DNA*. *Genet Mol Biol*, 2013. **36**(3): p. 308-15.
30. Ramachandran, A., et al., *The Yeast Mitochondrial RNA Polymerase and Transcription Factor Complex Catalyzes Efficient Priming of DNA Synthesis on Single-stranded DNA*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(32): p. 16828-39.
31. Ling, F., et al., *Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(11): p. 5799-816.
32. Kaguni, L.S. and M.T. Oliveira, *Structure, function and evolution of the animal mitochondrial replicative DNA helicase*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016. **51**(1): p. 53-64.

33. Diray-Arce, J., et al., *The Arabidopsis At1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities*. BMC Plant Biol, 2013. **13**: p. 36.
34. Towle-Weicksel, J.B., et al., *Chimeric proteins constructed from bacteriophage T7 gp4 and a putative primase-helicase from Arabidopsis thaliana*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(12): p. 7783-95.
35. Carrie, C., et al., *Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis*. Plant J, 2009. **57**(6): p. 1128-39.
36. Leipe, D.D., et al., *The bacterial replicative helicase DnaB evolved from a RecA duplication*. Genome Res, 2000. **10**(1): p. 5-16.
37. Cao, Y., *A bifunctional mitochondrial DNA primase/helicase (AMH) identified in Arabidopsis thaliana: Preliminary biochemical characterization of its functions*, in Department of Chemistry and Biochemistry. 2012, Clark University.
38. Toth, E.A., et al., *The crystal structure of the bifunctional primase-helicase of bacteriophage T7*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1113-23.
39. Sawaya, M.R., et al., *Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7*. Cell, 1999. **99**(2): p. 167-77.
40. Guajardo, R., et al., *NTP concentration effects on initial transcription by T7 RNAP indicate that translocation occurs through passive sliding and reveal that divergent promoters have distinct NTP concentration requirements for productive initiation*. J Mol Biol, 1998. **281**(5): p. 777-92.
41. Pal, M. and D.S. Luse, *The initiation-elongation transition: lateral mobility of RNA in RNA polymerase II complexes is greatly reduced at +8/+9 and absent by +23*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5700-5.
42. Moriyama, T., K. Terasawa, and N. Sato, *Conservation of POPs, the plant organellar DNA polymerases, in eukaryotes*. Protist, 2011. **162**(1): p. 177-87.
43. Smith, D.R., *Updating our view of organelle genome nucleotide landscape*. Front Genet, 2012. **3**: p. 175.
44. Kusakabe, T. and C.C. Richardson, *The role of the zinc motif in sequence recognition by DNA primases*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19563-70.
45. Corn, J.E., et al., *Crosstalk between primase subunits can act to regulate primer synthesis in trans*. Mol Cell, 2005. **20**(3): p. 391-401.
46. Zhou, Y., et al., *Structural Insight into the Specific DNA Template Binding to DnaG primase in Bacteria*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 659.
47. Lee, S.J., et al., *Mechanism of sequence-specific template binding by the DNA primase of bacteriophage T7*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(13): p. 4372-83.
48. Krishna, S.S., I. Majumdar, and N.V. Grishin, *Structural classification of zinc fingers: survey and summary*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 532-50.
49. Hardies, S.C., et al., *The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting vibrio parahaemolyticus indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment*. Virology, 2003. **310**(2): p. 359-71.

50. Kato, M., et al., *A complex of the bacteriophage T7 primase-helicase and DNA polymerase directs primer utilization*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21809-20.
51. Kato, M., et al., *A molecular handoff between bacteriophage T7 DNA primase and T7 DNA polymerase initiates DNA synthesis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30554-30562.

IX. APÉNDICES

ANEXO I

Secuencia optimizada del gen AtTwinkle de *Arabidopsis thaliana*

CATATGACCCCGGTTGATACCGAAGTTGAAGCAGATAAACGTGTTGTTCTGAGTCGTCTGGTTACCCTGCGCCGCAAACTGGCTGAACAGGGCGTGGATGCTGA
 AAATGTCCGCCGGGCCAGCATAGTGGCCTGATTTGCCCGACCTGCGAAGGTGGTAATAGTGGCGAAAAATCACTGTCTCTGTTTATGCCCGGATGGTTCTA
 GTGCAACCTGGAATTGCTTTCGCGGTAAATGTGGTCTGAAAGGTGGCGTTTCGTGCCGATGGCGGCTGGCCTCAGCAGATCCGATTGAAAAAGTTGAACGCAAA
 ATTACCCTGGAAGGTATGAACTGGAACCGCTGTGCGATGAAATTCAGGATTATTTTGTCTGCTGCGATTAGCCGTAAAACCCCTGGAACGTAATCGCGTTAT
 GCAGAAACGTATTGGTATGAAATGTTATTGCGTTTACCTATTGGCAGCGCGGCGAACTGGTGTCTTGTAATATCGCAGTCTGACCAAAAATGTTTTTCAGG
 AACGCAAAACCCGCGCATCTGTATGGCCTGGATGATATTGAAAAAACCGCAAGTATTATTGTTGAAGGCGAAAATGATAAACTGGCCATGGAAGAAGCC
 GGCTTCTGAATTCGCTGAGTGTGCCGGATGGCGCACCGGCTAAAGTGAGTAGCAAAGAAAATCCGAGTGAAGATAAAGATACCAATATAAATTTCTGTGGAA
 TTGTAATGATTATCTGAAAAAGCAAGCCGATTGTTATTGCCACCGATGGTGTGGTCCGGTCAAGCCATGGCTGAAGAAAATGCCCGCGTCTGGGTAAAG
 AACGCTGCTGGCGTGTAAATGGCCGAAAAAATCTGAAGATGAACATTTTAAAGATGCCAATGAAGTCTGATGAGCAAAGGTCCGCATCTGCTGAAAGAAGCC
 ATCTGGATGCTGAACCGTATCCGATTCTGGGCCTGTTAGCTTTAAAGATTTTTTGTGATAAATGATGCGTATTATGATCGTACCATGGCCATGAATATGG
 TGTCTTACCAGTTGGAAAAATCTGGATAATCTGTATAGTGTGGTGGCGGCGAACTGACCGTGGTGACCGGCATTCGGAATAGTGGTAAATCTGAATGGATTG
 ATGCTATGCTGTGCAATCTGAATCATCTGTGGGCTGGAATTTGCGCTGTGTAGCATGGAAAAATAAAGTTCGTGATCATGCACGTAACCTGCTGGAAAAACAT
 ATTAACCAACCGTTTTTGTGATGCAGATTATGGTCTGCTGTGCAGCGCATGTGAGTGAAGAAAAAGATGAAGGCAAAAAATGGCTGAATGATACCTTTTATCC
 GATTCGTTGCGAAATGGATCTCTGCCGTCTATTGATTGGGTGCTGGAACGTGCGAAAGCTGCGGTTCTGCTTATGGCATTCCGGTCTGGTATTGATCCGT
 ATAATGAACCTGGATCATCAGCGCACCCCGCGCCAGACCGAAACCGAATATGTTAGCCAGATGCTGACCAAAATTAACGCTTTAGCCAGCATCATTGATGTCAT
 GTTTGGTTTTGTTGCACATCCGAAACAGCTGCAGCATTGGGATGGTGGTGCGCCAATCTGTATGATATTCAGGCAGCGCGCATTTTATTAATAAATGTGATAA
 TGCCATTATTGTGATCGTAATCGTGTGATAAATGCGGGCCCGCTGGATCTGGTTCAGATTGGTGTGCGCAAAAGTTCGTAATAAAGTGGCGGGTCAGATTGGTG
 ATGCATATCTGTGTTATGATCGTACCACCGGTAGCTATTGAGATTACCGGTGACCCCGGGTATGCCGGAACGTCGTTACCCGAAACGCTATTAAGGATCC

ANEXO II

Oligonucleótidos y condiciones de reacción de PCR

Construcción	Oligonucleótidos	Condiciones de reacción	Producto esperado
AtPrimHel	Nprimasa AAAGGAAAcatatgACCCCGGTTGATACC Cthelicase AAGAAGggatccTTAATAGCGTTTTCGG		1869 pb
AtPrim	Nprimasa AAAGGAAAcatatgACCCCGGTTGATACC Ctprimasa CTCTTCCggatccTTAATCGGATACGGTTCAGCATC		963 pb

ANEXO III

Oligonucleótidos usados para el reconocimiento de secuencia

1U-AAA TTTTTTAAATTTTTT	28C-TGC TTTTTTTGCTTTTTTT	55G-GCT TTTTTTTGCTTTTTTTT
2U-CAA TTTTTTCAATTTTTTT	29A-ATC TTTTTTATCTTTTTTT	56G-TCT TTTTTTCTTTTTTTTT
3U-GAA TTTTTTTGAATTTTTTT	30A-CTC TTTTTTCTCTTTTTTT	57C-AGT TTTTTTAGTTTTTTTTT
4U-TAA TTTTTTTAATTTTTTT	31A-GTC TTTTTTTGCTTTTTTT	58C-CGT TTTTTTCGTTTTTTTTT
5G-ACA TTTTTTTACATTTTTTT	32A-TTC TTTTTTTTCTTTTTTT	59C-GGT TTTTTTTGGTTTTTTTTT
6G-CCA TTTTTTCCATTTTTTT	33T-AAG TTTTTTAAAGTTTTTT	60C-TGT TTTTTTTTGTTTTTTTTT
7G-GCA TTTTTTTGCATTTTTTT	34T-CAG TTTTTTTCAGTTTTTTTT	61U-ATT TTTTTTATTTTTTTTTT
8G-TCA TTTTTTTTCATTTTTTT	35T-GAG TTTTTTTGAGTTTTTTTT	62U-CTT TTTTTTCTTTTTTTTTT
9C-AGA TTTTTTTTAGATTTTTTT	36T-TAG TTTTTTTTAGTTTTTTTT	63U-GTT TTTTTTTGTTTTTTTTTT
10C-CGA TTTTTTTTCGATTTTTTT	37G-ACG TTTTTTTACGTTTTTTTT	64U-TTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT
11C-GGA TTTTTTTGGATTTTTTTTT	38G-CCG TTTTTTTCCGTTTTTTTT	
12C-TGA TTTTTTTTGATTTTTTTTT	39G-GCG TTTTTTTGCGTTTTTTTT	
13A-ATA TTTTTTTATATTTTTTTTT	40G-TCG TTTTTTTTCGTTTTTTTT	
14A-CTA TTTTTTTCTATTTTTTTTT	41C-AGG TTTTTTTAGGTTTTTTTT	
15A-GTA TTTTTTTGTATTTTTTTTT	42C-CGG TTTTTTTCCGGTTTTTTTT	
16A-TTA TTTTTTTTTATTTTTTTTT	43C-GGG TTTTTTTGGGTTTTTTTT	
17T-AAC TTTTTTTAACTTTTTTTTT	44C-TGG TTTTTTTTGGTTTTTTTT	
<u>18T-CAC TTTTTTTCACTTTTTTTT</u>	45A-ATG TTTTTTTATGTTTTTTTT	
19T-GAC TTTTTTTGACTTTTTTTTT	46A-CTG TTTTTTTCTGTTTTTTTT	
20T-TAC TTTTTTTTACTTTTTTTTT	47A-GTG TTTTTTTGTGTTTTTTTT	
21G-ACC TTTTTTTACCTTTTTTTTT	48A-TTG TTTTTTTTTGTTTTTTTT	
22G-CCC TTTTTTTCCCTTTTTTTTT	49U-AAT TTTTTTTAATTTTTTTTT	
23G-GCC TTTTTTTGCCTTTTTTTTT	50U-CAT TTTTTTTCATTTTTTTTT	
24G-TCC TTTTTTTTCCTTTTTTTT	51U-GAT TTTTTTTGATTTTTTTTT	
25C-AGC TTTTTTTAGCTTTTTTTTT	52U-TAT TTTTTTTTATTTTTTTTT	
26C-CGC TTTTTTTTCGCTTTTTTTTT	53G-ACT TTTTTTTACTTTTTTTTT	
27C-GGC TTTTTTTGGCTTTTTTTTT	54G-CCT TTTTTTTCCCTTTTTTTTT	