

48
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE
UNA DNA POLIMERASA DE EJES EMBRIONARIOS
DE MAIZ PRESENTE A LAS 24 HORAS DE
GERMINACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ELPIDIO GARCIA RAMIREZ

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Pag.
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION	1
ESTRUCTURA Y FUNCION DE UNA SEMILLA ANGIOSPERMA	1
GERMINACION	2
ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION	4
SINTESIS DE PROTEINAS	5
SINTESIS DE RNA	6
SINTESIS DE DNA Y DIVISION CELULAR	6
DNA POLIMERASAS	8
GENERALIDADES	8
DNA POLIMERASA α	9
DNA POLIMERASA β	11
DNA POLIMERASA γ	12
DNA POLIMERASA δ	12
DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES	14
DNA POLIMERASA TIPO α	14
DNA POLIMERASA TIPO β	17
DNA POLIMERASA DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS	18
ANTECEDENTES FUNDAMENTALES DEL PRESENTE TRABAJO	20
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y METODOS	25
MATERIAL BIOLÓGICO	25
SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS EMPLEADOS	25
MÉTODOS	30
IMBIBICION DE EJES EMBRIONARIOS	30
OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR	31
PREPARACIONM DEL DNA ACTIVADO	31
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA DNA POLIMERASA	32
CARACTERIZACION	32
RESULTADOS	35
AISLAMIENTO DE LA ENZIMA	37
DEAE-CELULOSA	37
HEPARIN SEPHAROSE	38
SEPHACRYL-S300	41
DNA-CELULOSA	41
TEMPERATURA Y ESTABILIDAD TERMICA	44
pH	44
CONCENTRACION DE MAGNESIO	48
POLI rA OLIGO dT	48
INHIBIDORES	48
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS	61

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADP	Difosfato de adenosina
Afi	Afidicolina
ASB	Albúmina de suero bovino
ATP	Trifosfato de adenosina
BTP	2-[bis-(2-hidroxi-etil-amino)]- 2-(hidroximetil)propano-1,3 diol.
C	Citosina
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina 5'-trifosfato
ddTTP	2',3'-Didesoxitimidina 5'-trifosfato
DEAE-Celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA-Celulosa	Acido desoxirribonucleico de cadena sencilla unido a celulosa
DNA pol.	DNA polimerasa
dNMP	desoxinucleótido monofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Acido etilendiaminotetrácetico
G	Guanina
MES	Acido 4-morfolin-etanosulfónico
metil- ³ H-dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato tritiada en el grupo metilo
NEM	N'etilmaleimida
Oligo dT	Oligodesoxitimidina

PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
Pi	Fosfato inorgánico
P.M.	Peso molecular
poli rA	Polirriboadenilato
POPOP	2,2'-p-fenilen-bis[5-feniloxol]
PPO	2,5-difeniloxazol
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
T	Timina
TCA	Acido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3 diol

I N T R O D U C C I O N

La formación de una semilla es esencial para la supervivencia y dispersión de la mayoría de las especies vegetales, y aún para muchas especies animales que dependen de estas estructuras para su alimentación.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE UNA SEMILLA ANGIOSPERMA

El desarrollo de la semilla se inicia con la fertilización del óvulo. La semilla generalmente está constituida por tres partes: La cubierta de la semilla o testa, el endospermo y el embrión (también llamado gérmen) que llegará a ser una nueva planta.

Una vez formada la semilla se inicia una desecación progresiva de los tejidos. El contenido de humedad de la semilla completa cae desde 80-90% hasta un 10% en pocos días. A pesar de esta extrema deshidratación, un embrión puede permanecer vivo semanas, años o décadas. La desecación cambia profundamente la actividad enzimática de las células. La síntesis de macromoléculas, tales como DNA, RNA y proteínas se detiene y el embrión entra en un estado de mínima actividad metabólica.

Para la mayoría de las semillas el secado es el evento terminal en el desarrollo, guiando ésto a una fase de quiescencia metabólica. Antes de este suceso el metabolismo de la semilla está dirigido hacia la terminación de los eventos del desarrollo, en particular

la biosíntesis y depósito de reservas nutritivas.

Parece ser que el secado es de gran relevancia en los fenómenos iniciales del desarrollo de la semilla. Una evidencia que respaldaría lo anterior es que semillas inmaduras de algunas leguminosas y cereales (que han sido tomadas de la planta madre y por lo tanto no han sufrido deshidratación) no germinan (Misra et al., 1985).

GERMINACION

La semilla es una estructura en reposo, compuesta principalmente de tejido de reserva y rodeada por una cubierta esencialmente impermeable. Los procesos metabólicos están suspendidos o tienen lugar muy lentamente; la semilla está en una condición de vida latente, debido principalmente a su carencia de agua y oxígeno (Bidwell, 1979).

El concepto "germinación" desde el punto de vista bioquímico, se inicia cuando la semilla toma agua (imbibición), desencadenando una serie de eventos metabólicos que dan origen a que, después de un cierto tiempo, el embrión emerja de la semilla, generalmente la parte radicular; se dice entonces que la semilla ha germinado (Bewley y Black, 1978).

El proceso de la germinación lleva finalmente al embrión al desarrollo de una planta (Mayer, 1975).

Para que una semilla pueda germinar es necesario ponerla en un medio ambiente que reúna ciertas condiciones; entre las más importantes se encuentran el agua, la temperatura, el aire o composición gaseosa de la atmósfera, así como luz para algunas semillas (Mayer, 1975).

El agua es esencial para la rehidratación como paso inicial en la germinación. La cantidad de agua absorbida por la semilla depende de tres factores: la composición de la semilla, la permeabilidad de ésta y la disponibilidad de agua en forma líquida o gaseosa en el medio ambiente.

La temperatura es específica para cada especie y cada una tiene una temperatura mínima por debajo de la cual no germina, una máxima por arriba de la cual tampoco puede germinar y por supuesto una temperatura óptima de crecimiento (Bewley y Black, 1978b).

Los gases son necesarios para la respiración de las semillas como lo son para las plantas, ya que en una atmósfera carente de oxígeno no germinan.

No todas las semillas requieren de luz para germinar, algunas no son afectadas mientras que otras sí se ven inhibidas por la luz (Bidwell, 1979).

Los requerimientos anteriores cambian para diferentes variedades de cada especie y están determinados por las condiciones que

prevalecieron durante la formación de la semilla y por factores hereditarios.

Las semillas son resistentes a condiciones externas extremas si se encuentran en un estado de desecación; sin embargo, pueden presentar pérdida en su viabilidad y vigor cuando son almacenadas por tiempos muy prolongados y/o cuando las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas (Mayer, 1975).

En términos generales el vigor se define como la habilidad que tiene una semilla de crecer correcta y rápidamente. Una definición más amplia es la habilidad de una semilla para producir una planta bien formada capaz de incrementarse en tamaño y volumen mientras todavía dependa de sus propias reservas. El vigor de la semilla es usualmente caracterizado por el peso de la planta después de un período de crecimiento en un ambiente dado; en la cantidad de reservas que están presentes, la rapidez con la cual éstas son movilizadas y la eficiencia de su metabolismo (Roberts, 1972).

ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION

Se ha observado que la fase de hidratación de la semilla viene acompañada por una gran actividad metabólica y por la participación enzimática a velocidades crecientes en las primeras etapas de la germinación, lo que marca la movilización de reservas (Cordoba, 1976).

Durante la germinación, la secuencia de eventos que parece ser común a embriones de un buen número de semillas de gramíneas puede dividirse en i) eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de ATP, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación de DNA; ii) eventos tardíos o secundarios: expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas (Osborne, 1983). Cada evento representa un estado potencial en el cual un sistema de control puede operar en la germinación (Deltour, 1985).

SINTESIS DE PROTEINAS

La síntesis de proteínas ocurre en la semilla poco después de la imbibición (Fujisawa, 1966; Marcus, 1969). El tiempo exacto parece ser variable. Se tienen evidencias de que en embriones secos de trigo y de centeno (Marcus *et al.*, 1966; Roberts *et al.*, 1973, Sen *et al.*, 1975 y Osborne *et al.*, 1982) dicha síntesis comienza dentro de los primeros minutos de imbibición (15 a 30 minutos). También se ha observado que los polirribosomas se encuentran ausentes en las semillas secas y que durante la imbibición, la formación de estos se ve acompañada por la concomitante disminución en el número de ribosomas libres (Marcus y Feeley, 1964).

La capacidad de los tejidos imbibidos para sintetizar proteínas es medida proporcionándoles aminoácidos marcados radiactivamente y posteriormente se determina que proporción de estos aminoácidos se

ha incorporado a las proteínas. Para que la sustancia radiactiva penetre rápidamente a los tejidos vivos, por lo común se usan tejidos aislados, tales como embriones de cereales y ejes embrionarios de leguminosas. Estos tejidos aislados toman agua y sustratos más rápidamente que las semillas completas y quedan imbibidos totalmente (Murray, 1984).

SINTESIS DE RNA

Existe evidencia de que los embriones secos de trigo contienen una variedad diversa de RNA mensajeros y se ha especulado que probablemente existen dos clases de RNA: RNA_m residuales y RNA_m almacenados. Los primeros no son esenciales para los procesos de germinación y pueden ser degradados después de iniciada la imbibición. Por otra parte, la traducción a proteínas al inicio de la germinación de embriones se considera que puede estar programada por RNA_m almacenados en la semilla seca (Brooker et al., 1977).

SINTESIS DEL DNA Y DIVISION CELULAR

La síntesis de proteínas y RNA se reinicia tan pronto como los tejidos se imbiben, pero la síntesis replicativa del DNA comienza más tarde. Este hecho se más evidente para la mayoría de las gramíneas (Osborne, 1984).

La expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación de las células, y su salida subsecuente a través de la

cubierta de la semilla podrá o no estar acompañada por división celular (Bewley y Black, 1986). La replicación del DNA es un requisito necesario para que la división celular suceda (Bewley y Black, 1986).

El tiempo en el cual se inicia la síntesis replicativa del DNA es variable de acuerdo a la especie y va desde 4 hasta 12 horas después de iniciada la imbibición (Chen y Osborne, 1970; Buchowicz *et al.*, 1978; Baiza *et al.*, 1989).

Con respecto al maíz, se tiene evidencia de que la replicación del DNA (medida por la incorporación de un nucleótido marcado radiactivamente) puede dispararse desde las 9 horas de imbibición (Vázquez y López, 1986). Sin embargo, al comienzo de la imbibición existe un pequeño incremento en la incorporación de marca, y se supone que ésta síntesis prerreplicativa del DNA es de tipo reparativo (Zarain *et al.*, 1987).

Se ha encontrado que los embriones de las semillas poseen sistemas de reparación del DNA, los cuales actúan momentos después de que los tejidos se hidratan (Veleminsky y Gichner, 1978).

La síntesis del DNA tanto en las etapas iniciales como en las tardías de la germinación, involucra la concertada participación de un gran número de actividades enzimáticas diferentes, entre las cuales participan las DNA polimerasas que tienen una función fundamental.

DNA POLIMERASAS

Generalidades.

La replicación, reparación y recombinación del DNA son procesos que requieren de la acción concertada de un gran número de proteínas, de entre las cuales, las DNA polimerasas juegan un papel preponderante. Su función es asegurar la incorporación de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) sobre un molde materno de acuerdo a las reglas de apareamiento de Watson y Crick (A con T y G con C), con la liberación de PPI.

Practicamente en todos los organismos eucariontes y procariontes estudiados se ha detectado actividad de DNA polimerasa, y, aunque las propiedades físicas, químicas e inmunológicas varían de especie a especie, todas las DNA polimerasas comparten las siguientes características: i) requieren de un iniciador o cebador que tenga un extremo 3'-OH libre, el cual puede ser RNA o DNA, para que sean capaces de ejercer su acción de polimerización. ii) Necesitan de un molde de DNA para la incorporación de los nucleósidos trifosfatados como nucleósidos monofosfatados, por la hidrólisis del enlace fosfodiéster en la posición α - β . iii) Polimerizan en dirección 5'-3' en la cadena patrón y iv) Requieren de un catión divalente: Mg^{++} o Mn^{++} .

En *E. coli* se ha demostrado la existencia de tres tipos diferentes de DNA polimerasa, denominadas I, II y III de acuerdo al orden en

que fueron descubiertas (Kornberg, 1980). Se ha podido estudiar a fondo las funciones de cada una de estas enzimas, debido principalmente a las siguientes características; i) la facilidad para manejar este tipo de organismos ii) tiempo de generación corto y iii) la posibilidad de obtener mutantes condicionales letales de los genes que codifican para cada una de estas enzimas.

En el cuadro I se resumen las principales características y propiedades más importantes de estas tres clases de DNA polimerasas.

En células eucarióticas (de mamíferos) son cuatro las DNA polimerasas que se han podido distinguir. Se han usado diferentes nomenclaturas para clasificarlas (Litvak y Castroviejo, 1987). En éste trabajo se utilizará la clasificación basada en el alfabeto griego para su identificación.

DNA polimerasa α

La DNA pol α fue la primera de las DNA polimerasas descritas (Bollum, 1960). Se encontró que era una enzima de alto peso molecular, incapaz de corregir los errores de incorporación (proofreading) ya que no presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' (Gross et al., 1983; Abbots y Lawrence, 1985; So y Downey 1988). Sin embargo, en células HeLa sí se ha encontrado dicha actividad (Skarnes et al., 1985).

Esta enzima ha sido aislada generalmente en forma de un complejo

CUADRO I: Algunas propiedades de las DNA polimerasas I, II y III de *E. coli*. Tomado de Kornberg, 1980.

		pol I	pol II	pol III
Funciones				
polimerización 5'--3'		+	+	+
Exonucleasa 5'--3'		+	-	+
Exonucleasa 3'--5'		+	+	+
Molde sintético				
Duplex intacto		-	-	-
Cadena sencilla cebada		+	-	-
Dúplex con cortes		+	-	-
Actividad				
Efecto de KCl % del óptimo	20 mM	60	60	60
	50 mM	80	100	50
	100 mM	100	70	10
	150 mM	80	50	0
Inhibición por 2'-desoxianálogos		-	+	+
Inhibición por ara-CTP		-	+	-
Inhibición por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo		-	+	+
Generales				
Tamaño (kd)		109	120	140

polipeptídico (Nashuer y Grosse, 1987; Cotterill et al., 1987; Wong et al., 1988). En general consiste de: i) un polipéptido catalítico que *in vitro* es un fosfopolipéptido que oscila entre 125 a 180 Kd, ii) una fosfoproteína de 77 Kd de función desconocida y iii) dos polipéptidos de 55 y 49 Kd asociados con la actividad de primasa. Se ha observado que el polipéptido de 49 Kd en particular es el que posee tal actividad (Nashuer y Grosse, 1988).

DNA polimerasa β

La DNA pol β es una enzima que consiste de un polipéptido cuyo peso molecular es de aproximadamente 40 Kd (Sakaguchi y Boyd, 1985). Examinando la actividad *in vitro* de la enzima, se ha observado que en presencia de Mg^{++} es completamente distributiva, insertando un solo desoxinucleótido y disociándose del molde posteriormente, lo cual no implica que sea necesariamente así *in vivo* (Wilson et al., 1988).

La DNA pol β no es inhibida por concentraciones de NEM a las cuales la pol α y la pol γ se inhiben fuertemente, lo que parece indicar que la pol β no tiene grupos sulfhidrilos en su sitio activo. Esta enzima es estimulada por altas concentraciones de cationes monovalentes, es fuertemente inhibida por ddTTP e insensible a ara-NTP y afidicolina (Af1).

Se ha demostrado que en cultivos de células de ovario de hamster y en fibroblastos humanos la DNA pol β es la enzima que participa en

la síntesis reparativa del DNA cuando éste es dañado por neocarzinostatina y bleomicina (Miller y Chinault, 1982).

DNA polimerasa γ

En células de mamíferos la síntesis del DNA mitocondrial es realizada por la DNA pol γ (Adler y Modrich, 1979). Esta enzima ha sido encontrada también en la fracción nuclear pero su función ahí es desconocida. Muestra una gran heterogeneidad al ser purificada, habiéndose reportado pesos moleculares que fluctúan entre 110 y 300 Kd (Spadari *et al.*, 1974; Kunkel y Mosbaugh, 1988; Wernet y Kaguni, 1986).

Además de las características anteriores es posible diferenciarla de la α y la β por que la pol γ es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilos y ddTTP, pero es insensible a afidicolina.

DNA polimerasa δ

Byrnes *et al.* (1976) reportaron por vez primera una enzima de alto peso molecular con alta especificidad de polimerización para el molde sintético de poli[d(A-T)] y baja para moldes de DNA activados con DNA_{ca}. Además de su actividad de polimerización demostraron que tenía actividad de exonucleasa 3'-5' lo cual no había sido reportado antes para ninguna DNA plimerasa de mamíferos, motivo por el cual la denominaron DNA pol δ . Esta actividad de nucleasa juega un importante papel en la fidelidad de la replicación y la prevención de mutaciones. Recientemente se ha

podido aislar de otras fuentes (Crute et al., 1986; Lee y Toomey, 1987), pero presentando algunas variaciones en cuanto al peso molecular y utilización del molde.

Se han reportado dos tipos de DNA pol δ denominadas DNA pol δ I y II respectivamente. La DNA pol δ I se asocia con una actividad de primasa la cual es inhibida por anticuerpos monoclonales contra la DNA pol α , mientras que la DNA pol δ II, que es la que presenta la actividad de exonucleasa 3'-5', no se ve afectada (Wahl et al., 1986). Lo anterior haría suponer que la DNA pol δ I es más bien una forma de la DNA pol α , lo cual podría explicar su asociación con la DNA primasa.

Si la DNA pol δ es un precursor de la DNA pol α o si es una enzima distinta que tenga una función especial aún no es claro, sin embargo la presencia de una DNA pol α asociada con una exonucleasa podría explicar la gran fidelidad en la replicación del DNA.

También se ha sugerido que las DNA pol α y δ actúan en la horquilla de la replicación, siendo la DNA pol α la enzima que replica la cadena discontinua y la DNA pol δ la continua (Focher et al., 1988).

La DNA pol δ presenta similitudes con la DNA pol α , entre las que se encuentran un alto peso molecular, (aproximadamente 125 Kd) y su coeficiente de sedimentación de 7 S; ambas son proteínas acídicas, tienen gran sensibilidad por NEM, Afi y

arabinosilnucleótidos, no son afectadas por ddNTP (So y Downey, 1988) y en su parte constitutiva del complejo presentan una actividad de DNA primasa (Wahl *et al.*, 1988b). Sin embargo a pesar de las similitudes que existen entre ellas, también se tienen evidencias que sugieren que se tratan de enzimas diferentes ya que la actividad de exonucleasa 3'-5' es intrínseca de la DNA pol δ . Anticuerpos monoclonales contra la DNA pol α no inhiben la actividad de la DNA pol δ (Wahl *et al.*, 1986; Lee y Toomey, 1987).

Ver resumen de algunas propiedades de estas cuatro DNA polimerasas en el cuadro II

DNA polimerasas de plantas superiores

Es difícil y controversial la tarea de clasificar a las DNA polimeras de plantas siguiendo el mismo criterio que se usa para clasificar a las de animales. Los cuatro tipos de DNA polimerasa (α , β , γ y δ) se han encontrado en un amplio rango de especies en el reino animal. Sin embargo las DNA polimerasas de eucariontes inferiores o plantas no presentan el mismo comportamiento que las de su contraparte animal.

DNA polimerasa tipo α

En general las DNA polimerasas tipo α descritas en sistemas vegetales presentan un alto peso molecular (desde 100 hasta 230 Kd) y son fuertemente inhibidas por NEM (Amileni *et al.*, 1979; Fukasawa *et al.*, 1980).

CUADRO II. Algunas propiedades de las DNA polimerasas de animales (Litvak y Castroviejo).

PROPIEDADES	α	β	γ	δ
LOCALIZACION	Nuclear	Nuclear	Mitocondrial Nuclear	Nuclear
FUNCION	REPLICACION DEL DNA	REPARACION DEL DNA	REPLICACION MITOCONDRIAL	REPLIC. Y REPAR. DEL DNA
P.M. (Pd)	150-1000	45	110	250-290
ASOCIACION CON PRIMASA	SI	NO	SI	NO
UTILIZACION DE TEMPLADOS				
DNA activado	SI	SI	SI	SI
Molde de DNA con primer de RNA	SI	NO	SI	NO
EFFECTO DE INHIBIDORES				
NEM	SI	NO	SI	SI
dITTP	NO	SI	SI	
ara-CTP	SI	NO	NO	
AFL	SI	NO	NO	SI
B. 111-JGTP	SI	NO	NO	NO

En sistemas como trigo, espinaca, arroz y coliflor, la afidicolina, un inhibidor de la DNA pol α de eucariontes inferiores y animales (Spadari *et al.*, 1982), es capaz de inhibir a la DNA polimerasa de alto peso molecular de plantas. Los mecanismos de inhibición por afidicolina parecen ser los mismos que en las células de animales: inhibición competitiva con dCTP y no competitiva con otros dNTP. Las DNA polimerasas de animales no reconocen un molde de precursores de poli rA oligo dT y resultados similares se han presentado en los sistemas de arroz, coliflor y tabaco; sin embargo la DNA polimerasa de trigo usa eficientemente dicho molde cuando la temperatura de incubación se disminuye. Por lo anterior, es importante el estudio de diferentes parámetros para concluir si un molde es o no usado por la enzima (Litvak y Castroviejo, 1987).

En general, es aceptado que la mayor actividad de la DNA polimerasa de animales está localizada en la fracción nuclear. El mismo tipo de estudios no se ha podido realizar en plantas debido a la dificultad de purificar núcleos con buen rendimiento.

Métodos autorradiográficos han mostrado en arroz que una DNA polimerasa sensible a afidicolina se encuentra exclusivamente en núcleo. Resultados similares se han encontrado en soya. La síntesis de DNA en núcleos de células de soya es resistente a ddTTP, inhibidor de la DNA pol β y γ , pero no de la DNA pol α (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA polimerasas con actividad asociada de exonucleasa se han

encontrado en trigo y arroz. Estas enzimas no han sido purificadas a homogeneidad, por lo que la presencia de la exonucleasa pudiera atribuirse a una contaminación (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA polimerasa tipo β

Existen muchas evidencias acumuladas en años recientes concernientes a la existencia de una DNA polimerasa tipo α en plantas, sin embargo, es difícil hacer tal afirmación para el caso de la DNA polimerasa tipo β .

Se ha definido a la DNA polimerasa β de animales como una enzima de bajo peso molecular confinada al compartamento nuclear y altamente resistente a NEM, capaz de usar un molde de poli rA oligo dT bajo ciertas condiciones, resistente a afidicolina e inhibida por ddTTP.

DNA polimerasas de bajo peso molecular han sido encontradas en remolacha, chícharo, tabaco y trigo (Litvak 1987). Las DNA polimerasas tipo β encontradas en plantas tienen un peso molecular aproximado de 50 Kd. En coliflor se encontró una enzima de 70 Kd con algunas propiedades de DNA polimerasa β . El parámetro de peso molecular debe considerarse con cuidado, ya que otro parámetro de importante consideración es la actividad proteolítica presente en los extractos de plantas. Para trigo, una DNA polimerasa de 50 Kd ha sido purificada casi a homogeneidad. El efecto de inhibidores de la actividad de DNA polimerasa y la especificidad de molde tuvieron claras diferencias comparándolas con las DNA polimerasas

tipo α purificadas de trigo. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos contra esta enzima de bajo peso molecular presentan reacción cruzada con una de las dos tipo α (Castroviejo *et al*, 1979, 1982).

DNA polimerasas de bajo peso molecular son inhibidas solo por altas concentraciones de NEM en remolacha y chícharo. En chícharo la DNA polimerasa tipo β está fuertemente unida a la cromatina, como en el caso de algunas DNA polimerasas β de animales, no obstante se desconoce su papel funcional (Litvak y Castroviejo, 1987).

EL papel de la DNA polimerasa tipo β de plantas en la reparación no ha sido comprobado, no obstante, algunos resultados reportan que la síntesis reparativa del DNA inducida por luz ultravioleta en protoplastos de tabaco es efectuada por una tipo β (Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA polimerasas de mitocondria y cloroplasto

La DNA polimerasa γ de animales se encuentra en la fracción nuclear y mitocondrial y tiene un peso reportado de más de 90 Kd. DNA polimerasas de 100 y 90 Kd han sido caracterizadas en trigo y soya respectivamente (Castroviejo, 1979, Heinshorst *et al*, 1990), las cuales se asemejan a la polimerasa γ de animales debido a su estimulación por KCl, por el fuerte poder inhibitorio de ddTTP y NEM, por su resistencia a afidicolina y por su eficiencia para sintetizar sobre moldes de poli rA oligo dT. Sin embargo la DNA polimerasa tipo γ de trigo no se localiza en mitocondria y su

papel funcional es desconocido, mientras que la DNA polimerasa de soya sí se localiza en mitocondria.

Por otra parte, se han aislado enzimas de peso molecular de 105 y 90 Kd de cloroplastos de espinaca y soya respectivamente, las cuales pueden utilizar eficientemente un molde sintético de poli rA oligo dT, son sensibles a NEM y resistentes a afidicolina (Litvai y Castroviejo, 1987; Heinshorst et al., 1990), sin embargo una DNA polimerasa parcialmente purificada a partir de cloroplastos de chicharo de aproximadamente 87 Kd no reconoce como molde poli rA oligo dT, es fuertemente inhibida por NEM e insensible a afidicolina (Mckown y Tewari, 1984).

Todavía no ha sido posible dilucidar el papel fisiológico de las DNA polimerasas de mitocondrias y cloroplastos. Aún así, es posible suponer que dichas enzimas tienen alguna relación con la duplicación y la reparación de los genómas organelares.

Como puede derivarse de esta breve revisión, aún son necesarios estudios exhaustivos en relación al tipo de DNA polimerasa presente en plantas superiores y la función que desempeñan cada una de ellas.

ANTECEDENTES FUNDAMENTALES DEL PRESENTE TRABAJO

La replicación del DNA es un evento relativamente tardío en el proceso de germinación en la gran mayoría de las semillas de gramíneas. No obstante, se ha detectado un bajo nivel de incorporación de metil-³H-dTTP tanto en embriones control como γ -irradiados de centeno (Osborne *et al.*, 1980, Vázquez-Ramos y Osborne, 1986) y maíz (Zarain *et al.*, 1987), en períodos previos a la replicación del DNA, por lo cual, dicha incorporación se ha interpretado como una síntesis del DNA de tipo reparativo. Meléndez López en 1987, encontró que el DNA de los ejes embrionarios no embebidos estaba fragmentado y que, cuando colocaba ejes embrionarios en imbibición, el DNA de estos cambiaba de tamaño conforme transcurría el tiempo de imbibición; de bajo a alto peso molecular, lo cual indicaba que de alguna forma se estaba recuperando la integridad del material genético por un sistema reparativo. Asimismo, en algunos estudios realizados en núcleos aislados a partir de ejes embrionarios de maíz se encontró que la síntesis del DNA es inhibida diferencialmente por diversas sustancias (inhibidores de la replicación del DNA) cuando éstas son añadidas ya sea durante las primeras horas de la germinación (0-3h), o bien a las 15 horas de iniciado este proceso (Vázquez-Ramos y López, 1986). En plantas superiores se desconoce aún que tipo de DNA polimerasa sea la responsable de los procesos de reparación y/o replicación del DNA. En maíz, la DNA polimerasa que se encuentra en forma predominante a las 3 y 24 horas de imbibición ha sido purificada parcialmente y

caracterizada (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988). Los resultados muestran que no existen diferencias considerables entre las enzimas presentes a estos tiempos de imbibición y que ambas se asemejan más bien a la DNA polimerasa α de animales debido principalmente a su respuesta a ciertos inhibidores, pH óptimo, fuerza iónica óptima, etc., lo cual parecía indicar que la DNA polimerasa encargada de la síntesis reparativa del DNA (a las tres horas) es la misma que la que se encuentra a períodos de síntesis replicativa del DNA (a las 24 horas). Mediante modificaciones en el esquema de purificación (mantenimiento del pH constante durante el proceso de purificación y uso de fosfoCelulosa como segunda columna), Coello Coutiño en 1989 encontró dos actividades de DNA polimerasa en ejes embrionarios no imbibidos (0 h), las cuales diferían de la anteriormente encontrada por Vázquez y Vázquez-Ramos en lo que se refiere a su comportamiento cromatográfico en DEAE-Celulosa y a su respuesta a inhibidores de la actividad de DNA polimerasa.

Por otro lado, Meléndez López (1990) aisló una DNA polimerasa de núcleos a diferentes tiempos de imbibición, encontrando que la enzima aislada a las 24 horas de imbibición presenta un patrón de inhibición semejante al de la DNA polimerasa γ de animales.

Con todas estas evidencias, el propósito del presente trabajo es purificar a una DNA polimerasa (la que eluye en primer lugar a través de un fraccionamiento en DEAE-Celulosa) de un extracto celular de ejes embrionarios imbibidos durante 24 horas, mediante

subsecuentes pasos cromatográficos, para después de una buena purificación, caracterizar de acuerdo a diferentes parámetros y posteriormente compararla con las DNA polimerasas anteriormente encontradas en nuestro laboratorio.

HIPOTESIS

DADO QUE EXISTEN 3 PICOS DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA AL FRACCIONAR UN EXTRACTO DE EJES EMBRIONARIOS A TRAVES DE DEAE-CELULOSA, SE SUGIERE QUE LAS CARACTERISTICAS DE LA DNA POLIMERASA QUE ELUYE EN PRIMER LUGAR SERAN DIFERENTES AL DE LOS OTROS DOS PICOS DE ACTIVIDAD DEL QUE ELUYEN POSTERIORMENTE EN EL GRADIENTE DE FOSFATO DE POTASIO.

OBJETIVOS

- ESTABLECER LA METODOLOGIA PARA PURIFICAR PARCIALMENTE UNA DNA POLIMERASA.
- ESTABLECER LAS CONDICIONES FISICO-QUIMICAS OPTIMAS DE LA MEZCLA DE REACCION PARA DETECTAR ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA.
- CARACTERIZAR A LA DNA POLIMERASA CON DIFERENTES INHIBIDORES TÍPICOS DE DNA POLIMERASAS DE ANIMALES.
- ESTUDIAR LA CAPACIDAD DE LA DNA POLIMERASA PARA UTILIZAR UN TEMPLADO DE poli rA oligo dT.

MATERIAL Y METODOS

1. Material Biológico.

Las semillas de maíz, variedad chalqueño utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de PRONASE (Productora Nacional de Semillas) de la SARH.

2. Soluciones Amortiguadoras y Reactivos.

2.1. Solución amortiguadora para imbibición de ejes embrionarios:

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
Cloruro de potasio		50 mM
Cloruro de magnesio		10 mM
Sacarosa		2%
Cloranfenicol		10 μ M

2.2. Solución amortiguadora para homogenar ejes embrionarios:

Tris-HCl	pH 7.6	40 mM
Cloruro de potasio		15 mM
2-mercaptoetanol		1 mM
Sacarosa		0.25 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)		0.3 mM
Cloruro de magnesio		1 mM

2.3. Soluciones amortiguadoras utilizadas en la purificación de la DNA polimerasa.

2.3.1. Solución amortiguadora A:

Fosfato de potasio	pH 7.6	10 mM
EDTA		1 mM
Glicerol		20%
PMSF		0.3 mM
2-Mercaptoetanol		1 mM

2.3.2. Solución amortiguadora B:

Igual que (2.3.1), excepto que la concentración de fosfatos es de 400 mM.

2.3.3. Solución amortiguadora C:

Igual que (2.3.1), excepto que esta solución contiene una concentración de cloruro de sodio de 150 mM.

2.3.4. Solución amortiguadora D:

Igual que (2.3.1), excepto que esta solución contiene una concentración de cloruro de sodio de 1.5 M.

2.3.5. Solución amortiguadora E:

Igual que (2.3.1), excepto que esta solución contiene una concentración de cloruro de sodio de 50 mM.

2.3.6. Solución amortiguadora F:

Tris-HCl	pH	7.4	20 mM
NaCl			50 mM
EDTA			1 mM
PMSF			0.3 mM
2-Mercaptoetanol			1 mM

2.3.7. Solución amortiguadora G:

Igual que (2.3.6) excepto que la concentración de cloruro de sodio es de 1.5 M.

2.3.8. Solución amortiguadora H:

Tris-HCl	pH 7.4	20 mM
NaCl		50 mM
Na ₂ EDTA		1 mM
2-mercaptoetanol		1 mM
Glicerol		10 %
ASB		100 μ M

2.4. Solución amortiguadora para activación del DNA:

Tris HCl	pH 7.4	5 mM
Cloruro de magnesio		5 μ M
Albumina de Suero Bovino (ASB, Sigma Chem. Co.)		0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera (Sigma Chem. Co.)		0.5 mg/ml

2.5. Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa:

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
KCl		15 mM
MgCl ₂		8 mM
dATP (Sigma Chem. Co.)		0.1 mM
dCTP (Sigma Chem. Co.)		0.1 mM
dGTP (Sigma Chem. Co.)		0.1 mM
Glicerol		5%
2-Mercaptoetanol		0.4 mM
DNA Activado		2 µg
ATP (Sigma Chem. Co.)		1 mM
(metil- ³ H) TTP (57 Ci/mmol Amershan)		5 µCi/ml

2.6. Líquido de centelleo:

2,2'-p-fenilen-bis[5-feniloxazol]	
(PDPFP, Merck)	0.1 gr
2,5-difeniloxazol (PPD Merck)	5 gr
Tolueno	1 lt

2.7. Preparación de protamina

Se prepara una solución al 10% disolviendo 10 g de protamina en 10 ml de agua, se le adiciona suficiente HCl 6N hasta obtener un pH de 7.8, se afora a 100 ml con agua desionizada.

3.0. Preparación de resinas.

3.1. Dietilaminoetil-Celulosa (Sigma Chemical Co.).

Se coloca 1 gr de DEAE-Celulosa en 75 ml de HCl 0.5 N agitando suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos a temperatura ambiente. La resina se colecta por filtración al vacío lavandola con agua desionizada hasta llegar a un pH de 7.0. La resina se resuspende en 80 ml de HCl 0.05 N y se lleva a un pH de 7.2 con HCl 0.05 N. Se agita suavemente durante una hora, a intervalos de 15 minutos a temperatura ambiente. Se retitula a pH 7.2 y se decanta eliminando los finos y materia particulada. La resina se resuspende en solución amortiguadora A (2.3.1), se monta la columna y se equilibra con (2.3.1).

3.2. Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals AB)

Se coloca 1 gramo de Heparin-Sepharose en 50 ml de agua destilada durante media hora. La resina se colecta por filtración al vacío, lavando con 200 ml de la solución amortiguadora C (2.3.3), se monta la columna y se equilibra con (2.3.3).

3.3. Sephadex G-150 (Sigma Chemical Co.).

Esta resina se pone a hinchar en agua desionizada a 4 °C durante 48 horas. Se decanta el sobrenadante eliminando los finos y materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío, se monta la columna y se equilibra con la solución amortiguadora A.

3.4. Sephadryl S-300 Superfine (Pharmacia Fine Chemicals AB).

Esta resina se provee ya hinchado en agua destilada conteniendo 0.01 % de merthiolate. Un volumen del gel es colocado en 4 volúmenes de solución amortiguadora E (2.3.5), se monta la columna y se equilibra con la solución amortiguadora E.

3.5. DNA-Celulosa (Sigma Chemical Co.).

1 gramo de DNA-Celulosa se pone a hinchar en 50 ml de la solución amortiguadora H (2.3.8), se monta la columna y se lava con 200 ml de (2.3.8). Posteriormente se equilibra la columna con la solución amortiguadora F (2.3.6).

M E T O D O S

1.0. Imbibición de ejes embrionarios.

Ejes embrionarios íntegros de las semillas de maíz fueron obtenidos manualmente (20 g), los cuales se lavaron con 200 ml de agua desionizada esteril y se colocaron entre dos discos de papel filtro Whatman # 1 o 2 en cajas petri, a manera de que quedase una capa homogénea. Se les colocó suficiente solución amortiguadora de imbibición (2.1) a manera de que los discos de papel quedaran perfectamente humedecidos. La incubación se llevó a cabo en una estufa regulada a 25 °C durante 24 horas. No son necesarias condiciones estrictas de esterilidad, solo la solución amortiguadora de imbibición, el agua desionizada, las cajas petri y los discos de papel fueron esterilizados previamente.

Al finalizar el tiempo de incubación los ejes embrionarios se procesaron de inmediato para obtener el extracto celular.

2.0. Obtención del extracto celular

Los ejes imbibidos durante 24 horas fueron resuspendidos en 2.5 volúmenes (relación peso fresco de los ejes a volúmen de solución amortiguadora) de solución amortiguadora de homogenización (2.2). Se homogenizó en un polytron PCU-2 durante 30 segundos a máxima velocidad. Todas las manipulaciones se realizaron a 4 °C. El extracto se centrifugó a 7,000 x g durante 15 minutos. La pastilla obtenida de ésta primera centrifugación fué resuspendida en 1.5 volúmenes de solución amortiguadora para homogenización (2.2) y se volvió a homogenizar en el mismo polytron por 30 segundos. Se centrifugó a 7,000 x g durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido de ésta segunda centrifugación se mezcló con el anterior y a ésta mezcla se le centrifugó por última vez a 7,000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante total obtenido se centrifugó a 100,000 x g durante 2 1/2 horas. La pastilla se desechó y el sobrenadante fué utilizado como fuente enzimática para los pasos posteriores de purificación, (FRACCION I).

3.0. Preparación del DNA activado (según Aposhian y Kornberg, 1962).

Se hicieron reaccionar 0.5 mg de DNA de timo de ternera (Sigma) (disuelto previamente en un ml de solución amortiguadora de activación; 2.4) con 0.001 mg de DNAasa I (Sigma). Se incubó 15 minutos a 37 °C y se calentó 5 minutos a 77 °C; finalmente se

paso a un baño de hielo. Este DNA activado fue posteriormente utilizado como molde para incorporación de los dNTP's en la mezcla de reacción para el ensayo de la DNA polimerasa (2.5).

4.0. Determinación de la actividad de DNA polimerasa

La actividad de DNA polimerasa fué ensayada en un volúmen final de 100 μ l, en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm que contenía la mezcla de reacción (2.5) y de 20 a 40 μ l del extracto proteínico ó de las fracciones de la columna. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 100 μ l de una solución de TCA de esperma de arenque (2 mg/ml, Sigma Chem. Co) y 2 ml de TCA al 10%. Los tubos se colocaron en hielo durante 30 minutos. La radiactividad en forma de TCA insoluble se colectó filtrando a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron primero con 5 ml de TCA frío al 10%, luego con 5 ml de TCA frío al 5% y por último con etanol al 96%. Los filtros se secaron perfectamente y se transfirieron a frascos que contenían 5 ml de líquido de centelleo (2.6). La cantidad de radiactividad (cpm) se determinó en un contador de centelleo PACKARD TRI CARB.

Una unidad enzimática fué definida como un pmol de desoxitimidina monofosfato incorporada a 37 °C durante 30 minutos.

5.0. Caracterización.

La actividad de la DNA polimerasa (fracción VII) se ensayó y se determinó en la forma antes descrita (4.0), sólo cambiando las

condiciones y las concentraciones descritas a continuación.

5.1. Temperatura y estabilidad térmica

Para observar el efecto de la temperatura, la incubación se llevó a cabo a 20, 25, 30, 34, 38, 43, 50 y 55 °C, mientras que para observar el efecto de la estabilidad térmica, se colocaron 20 μ l de la fracción VII y se incubaron a las temperaturas antes señaladas, transcurridos 30 minutos se les colocó 80 μ l de la mezcla de reacción y se incubaron inmediatamente a 37 °C 30 minutos.

5.2. pH.

El pH de la mezcla de reacción se ajusta a pH de 5.0, 5.5 y 6.0 (con MES), 6.0, 6.5 y 7.0 (con BTP), 7.0, 7.4, 7.8, 8.2 y 8.7 (con Tris-HCl).

5.3. Magnesio

La concentración de $MgCl_2$ de la mezcla de reacción se ajusta a 0, 5, 10, 25 y 50 mM.

5.4. poli rA oligo dT

Se disuelven el poli rA y el oligo dT por separado en una solución que contiene Tris 10 mM pH=7.5, $MgCl$ 50 μ M, ASB (albúmina sérica bovina) 0.5 mg/ml. Para preparar el molde sintético se mezclan volúmenes iguales de solución de poli rA y de solución de oligo dT, quedando ambos en una relación molar de 50:1 (esto es, 10 moles de A por un mol de dT). Cada 10 μ l de oligo dT (dT_s)

contiene 8.4×10^{-4} mg de éste, y cada 10 μ l de solución de poli rA contiene 5 μ g del mismo. La relación molecular final de poli rA oligo dT fue de una molécula del primero (poli rA, con una longitud aproximada de 400 nucleotidos) y 8 moléculas del segundo (dT). Para realizar el ensayo en la presencia exclusiva de este molde y en las proporciones antes estipuladas, se mezclan 10 μ l de la solución de poli rA y 10 μ l de la solución de oligo dT, por cada tubo en que se lleve a efecto la determinación de DNA polimerasa deberá agregarse 20 μ l de la mezcla anterior. Este molde fue preparado de acuerdo a la metodología reportada por Vishwanatha et al., (1986). El poli rA y el oligo dT se adquirieron de Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo. USA.

5.5. Inhibidores

5.5.1. N-etilmaleimida (NEM), concentración final de 10 mM disuelta en dimetil sulfoxido (DMSO)

5.5.2. Afidicolina (Afi), concentración final de 1.47×10^{-4} M disuelta en DMSO

5.5.3. 2'-3'-Didesoxitimidina 5'-trifosfato (ddTTP), a una concentración final de 3.12×10^{-8} M disuelta en agua.

Para el caso de NEM y afidicolina se incluyen controles con el disolvente utilizado (DMSO), a una concentración final de 5%.

6.0. Determinación de la concentración de proteína. (kalckar, H.M.

1947).

Se determinó la absorbencia de una solución diluida de proteína tanto a 280 nm como a 260 nm y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} &\text{Concentración de proteína} \\ &(\text{mg/ml}) = 1.45 \text{ A}_{280} - 0.74 \text{ A}_{260} \end{aligned}$$

R E S U L T A D O S

Todas las operaciones en el proceso de purificación se llevaron a cabo a 4 °C y en presencia de PMSF, con el fin de evitar al máximo la actividad proteolítica, y con ello la pérdida de la actividad de DNA polimerasa.

1.0. Fraccionamiento

Al extracto celular obtenido (FRACCION I, ver cuadro III) se le adicionó lentamente 10 $\mu\text{l/ml}$ de una solución de protamina al 10% (materiales 2.7) para precipitar los ácidos nucleicos, la suspensión resultante se agitó durante 30 minutos y el precipitado se colectó centrifugando a 15,000 \times g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido del paso anterior se precipitó con 45% de sulfato de amonio (0.277 g/ml) adicionándolo lentamente y evitando un cambio en el pH. La suspensión se agitó por 30 minutos y la pastilla se colectó centrifugando a 15,000 \times g durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 2 ml de la solución amortiguadora A (Fracción II).

CUADRO III: Purificación de la DNA polimerasa

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	VOLUMEN (ml)	ACTIVIDAD TOTAL (U)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)	VECES DE PURIF.	RENDI- MIENTO (%)
EXT. CRUDO FRACCION I	934	43	75	0.08		100
DEAE-CELULOSA FRACCION IV	104	7	222	2.13	27	296
HEPARIN-SEP. FRACCION V	22.4	5	564	25.05	313	752
SEPHACRYL-S300 FRACCION VI	14.7	8	1802	122.56	1532	2402
DNA-CELULOSA FRACCION VII	2.1	3	357	164.53	2054	475

2.0. Aislamiento de la enzima.

2.1. Sephadex G-150 (Sigma Chemical Co.).

La fracción II obtenida se colocó sobre una columna de Sephadex G-150 (2x10 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La columna se lavó con tres volúmenes de cama de la solución amortiguadora A, colectando fracciones de elución de 1.5 ml, (FRACCION III). Esta resina se utilizó para desalar a las proteínas, motivo por el cual no se calculó las veces de purificación.

2.2. DEAE-Celulosa (Sigma Chemical Co.).

A las fracciones que eluyeron de Sephadex G-150 y que mostraron actividad de DNA polimerasa se aplicaron a una columna de DEAE-Celulosa (2.5x12.5 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La columna se lavó con tres volúmenes de solución amortiguadora A y la proteína retenida se eluyó con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 10 a 400 mM de fosfatos, (solución amortiguadora A y B respectivamente). A las fracciones eluidas se les determinó la concentración de proteína y la actividad de DNA polimerasa. La figura 1 muestra el perfil de elución de la DNA polimerasa después de su cromatografía a través de la columna de DEAE-Celulosa. Se observan claramente tres picos de actividad, el primero que eluyó en la fracción de lavado, (fracción IV), el segundo que eluyó a una concentración de fosfatos de 100 ± 30 mM y un tercer pico que eluyó a una concentración de fosfatos de 200 ± 30 mM. Aún cuando en esta

resina no se purificó bastante a la enzima, se logró en cambio distinguirla y aislarla de las otras dos actividades de DNA polimerasa, lo cual muestra indirectamente que la enzima que se estudió en el presente trabajo (la que eluye en primer lugar de ésta columna) no tiene el número de cargas negativas suficientes para retenerse en la resina, al menos a pH de 7.6.

2.3. Heparin-Sepharose CL 6B (Pharmacia Fine Chemicals).

Existen numerosos reportes en la literatura que señalan haber utilizado ya sea heparin-sepharosa o heparin agarosa en la cual se ha obtenido una buena purificación de DNA polimerasas, entre otros; Heinhorst *et al.*, 1990; Kunkel T y Mosbauough 1988; Nasheuer H. y Grosse F. 1987. Esta resina contiene una gran cantidad de grupos glicosulfatados lo cual tiene cierta similitud con los grupos fosfato unidos a las desoxirribosas del ácido nucleico. La FRACCION IV fue aplicada a una columna de Heparin Sepharose, (1x5) previamente equilibrada con solución amortiguadora C. La columna se lavó con 3 volúmenes de cama de la solución amortiguadora C. La proteína retenida se eluyó con 8 volúmenes de cama de un gradiente lineal de 150 a 1,500 mM de NaCl (soluciones amortiguadoras C y D respectivamente). El perfil de elución de la actividad de DNA polimerasa a través de ésta columna se muestra en la figura # 2, en donde se observa un pico de actividad que eluye a una concentración de NaCl de 800 ± 50 mM de NaCl (FRACCION V), lo cual quiere decir que la enzima tiene una gran afinidad por la resina, dando como consecuencia que se obtuviese una purificación de aproximadamente 340 veces.

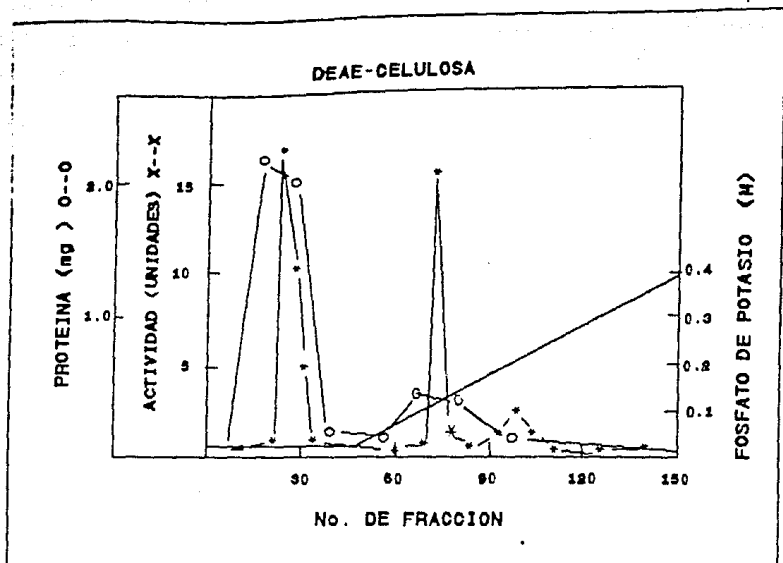
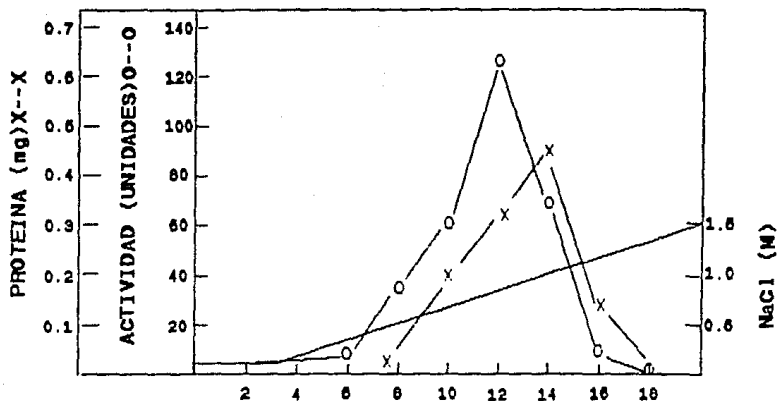


Fig. # 1. Perfil de elución de las DNA polimerasas sobre una columna de DEAE-Celulosa. La fracción III se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (2.5x12.5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora A, se lavó con 3 volúmenes de la misma. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 10-400 mM de fosfatos. Se colectaron fracciones de 1.3 ml con un flujo aproximado de 15 ml/h. Proteína (O--O): Actividad (X--X): Fosfato de potasio (—).

HEPARIN-SEFAROSA



No. DE FRACCION

Fig. # 2. Perfil de elución de la DNA polimerasa sobre una columna de Heparin-Sefarosa. La fracción IV se aplicó a una columna de Heparin-Sefarosa (1x5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora C, se lavó con 3 volúmenes de la misma solución. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 150-1 500 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo aproximado de 10 ml/h. Proteína (X--X): Actividad (o--o): NaCl (—).

2.4. Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals AB).

Dado que la FRACCION V contenía una gran cantidad de NaCl se procedió a utilizar una resina que permitiera eliminar a esta sal, a la vez que nos permitiera seguir purificando a la enzima, para lo cual se utilizó una cromatografía de exclusión molecular de alta resolución; Sephacryl S-300 (la cual permite tener un rango de fraccionamiento confiable de entre 10 y 1,500 KDa). La fracción V se aplicó a una columna de Sephacryl S-300 (1x32.5) y se eluyó con tres volúmenes de cama de la solución amortiguadora E. El perfil de elución de la actividad de la DNA polimerasa se muestra en la figura # 3, en donde se observa que la actividad de DNA polimerasa eluye en las primeras fracciones, lo cual es un indicio de que la enzima posee un alto peso molecular. En este paso se purificó a la enzima aproximadamente 1600 veces.

2.5. DNA-Celulosa (Sigma Chemical Co.).

La resina de afinidad de DNA celulosa de cadena sencilla ha sido ampliamente utilizada para el aislamiento de DNA polimerasas (Lee S. et al., 1989; Sakaguchi K. y Lu B.C., 1982; Shioda M. et al., 1982), por lo cual también se utilizó a esta resina para la purificación de la enzima. La FRACCION VI se cargó a una columna de DNA-Celulosa (1x4), se lavó la misma con tres volúmenes de cama de la solución amortiguadora F. la proteína retenida se eluyó con 5 volúmenes de cama de un gradiente lineal de 50 a 1,500 mM de NaCl. El perfil de elución se muestra en la figura # 4, en donde se observa un pico de actividad a una concentración de 350 ± 50 mM, lo cual indica que la enzima tiene (relativamente) baja

SEPHACRYL-S300

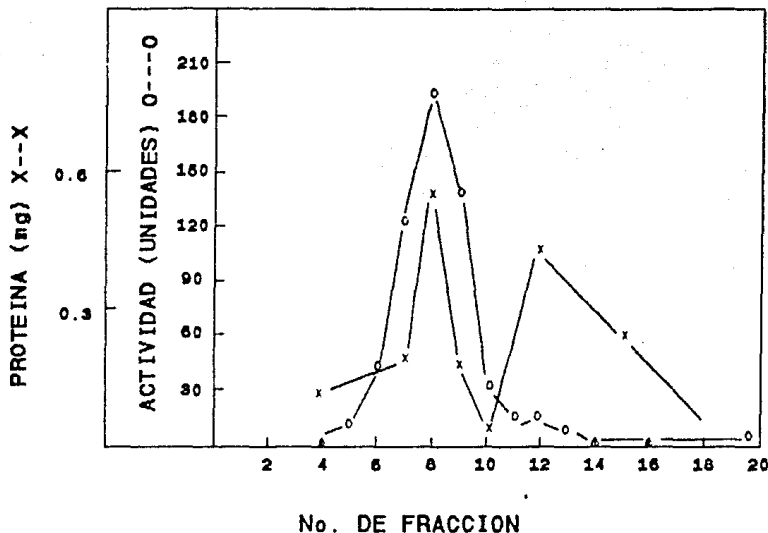
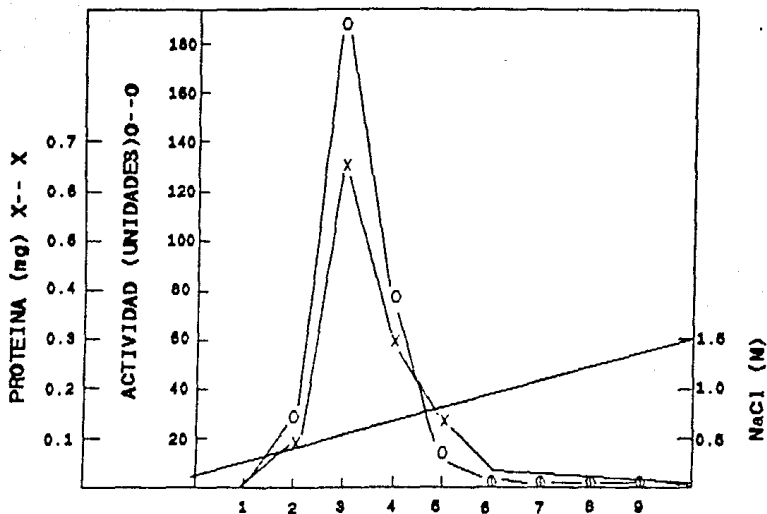


Fig. # 3. Perfil de elución de la DNA polimerasa sobre una columna de Sephacryl-S300. La fracción V se aplicó a una columna de Sephacryl-S300 (1x32.5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora E. La proteína cargada se eluyó con 3 volúmenes de solución amortiguadora E. Se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo aproximado de 5 ml/h. Proteína (X--X): Actividad (O--O).

DNA-CELULOSA



NO. DE FRACCION

Fig. # 4. Perfil de elución de la DNA polimerasa sobre una columna de DNA-Celulosa. la fracción VI se cargó a una columna de DNA-Celulosa (1x4 cm). previamente equilibrada con la solución amortiguadora F. La proteína retenida se eluyó con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 50 a 1 500 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo aproximado de 8 ml/h. Proteína (X--X); Actividad (O--O); NaCl (—).

afinidad por la resina. En este paso de purificación se logró obtener a la enzima 2050 veces purificada.

El esquema completo de purificación se muestra en el cuadro IV.

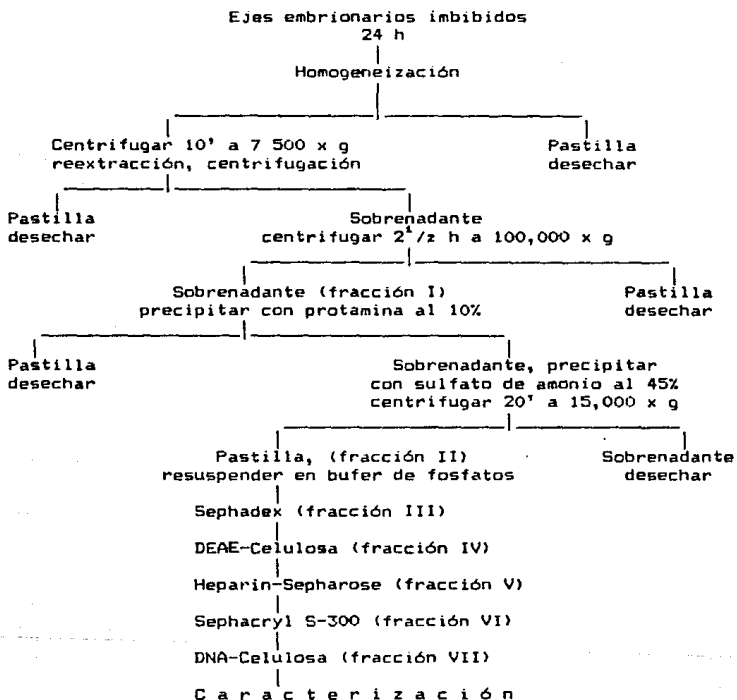
2.6. Temperatura y estabilidad térmica de la DNA polimerasa.

En la figura # 5 se observa el efecto de la temperatura sobre la DNA polimerasa notando que la actividad de ésta se ve favorecida a una temperatura de entre 30 y 38 °C y, a temperaturas menores de 25 o mayores de 40 °C la actividad de la DNA polimerasa se ve disminuida. Para determinar la causa de de la baja actividad de la DNA polimerasa a dichas temperaturas se procedió a estudiar su estabilidad térmica, notando que a temperaturas mayores de 40 °C la enzima empieza a desnaturalizarse, (ver figura # 5) y a temperaturas menores de 25 °C la actividad de la DNA polimerasa se restituye cuando se coloca a su temperatura óptima de actividad, no siendo así cuando se coloca a su temperatura óptima la enzima previamente incubada a 40 °C o a temperaturas mayores (ver métodos, 5.1).

2.7. pH óptimo de la DNA polimerasa.

En la figura # 6 se observa que la actividad de la enzima es óptima a pH entre 7.0 y 7.8, mientras que a pH menor de 6 o mayor de 8 la actividad disminuye, notándose además que la actividad se ve afectada por el tipo de amortiguador utilizado.

CUADRO IV. Esquema completo de purificación de la DNA polimerasa.



EFFECTO DE LA TEMPERATURA

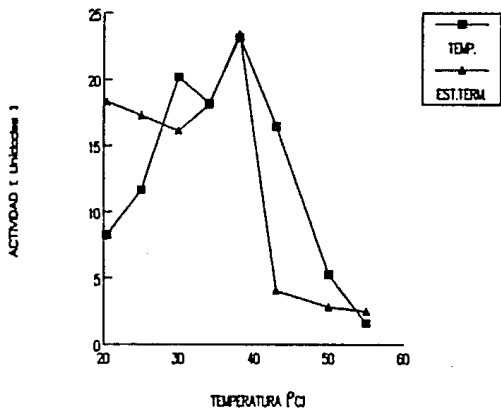


Fig. # 5. Efecto de la temperatura y estabilidad térmica de la DNA polimerasa.

EFECTO DEL pH

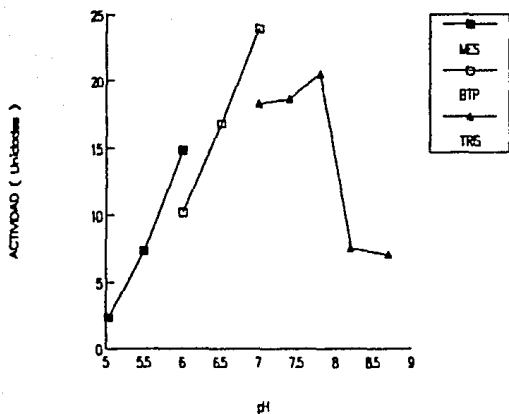


Fig. # 6. Efecto del pH sobre la actividad de la DNA polimerasa.

2.5 Concentración de magnesio

De las diferentes concentraciones de magnesio que se utilizaron se observa que la enzima tiene mayor actividad a concentraciones de entre 5 y 10 mM y que a concentraciones mayores existe una creciente inhibición de la actividad, como puede verse en la figura # 7.

2.6 poli rA oligo dT

Una de las principales características de la DNA polimerasa γ de animales es que puede utilizar un templado sintético de poli rA oligo dT como molde para la incorporación de los dNTP. En el caso de la DNA polimerasa estudiada en este trabajo se observa que, (ver figura # 8) al menos en las condiciones del ensayo, ésta es incapaz de utilizarlo.

2.7 Inhibidores

Por último se estudió el efecto de algunos compuestos que se sabe actúan sobre las DNA polimerasas de mamíferos. El efecto de éstas sustancias sobre las diversas DNA polimerasas de animales ha servido como una poderosa herramienta para poder clasificarlas. El efecto encontrado de los diferentes inhibidores sobre la actividad de la DNA polimerasa se observa en la figura # 9.

El 2',3'-didesoxítimidina 5'-trifosfato (ddTTP) es un inhibidor característico de la DNA polimerasa β y, en menor grado de la DNA polimerasa γ . Las DNA polimerasas δ y α no son inhibidas. Para la DNA polimerasa que se estudió en este trabajo el ddTTP ejerció una

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE MgCl

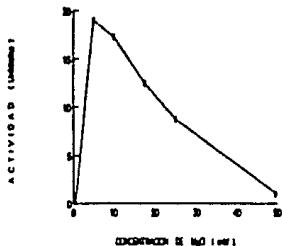


Fig. # 7. Efecto de la concentración de Mg^{++} sobre la actividad de DNA polimerasa.

Uso de poli rA oligo dT

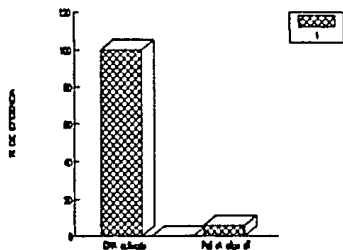


Fig. # 8. Porcentaje de eficiencia de utilización del templado sintético de poli rA oligo dT con respecto al DNA activado.

EFFECTO DE INHIBIDORES

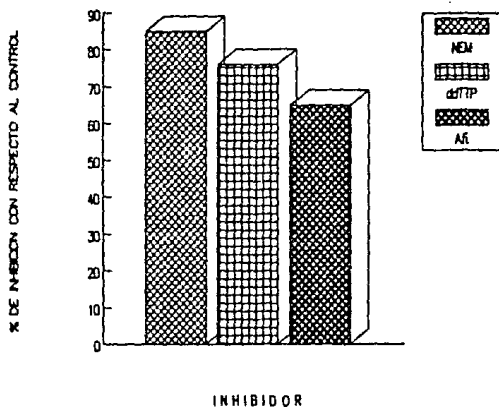


Fig. # 9. Efecto de varios inhibidores sobre la actividad de la DNA polimerasa.

inhibición de 73-5%, con lo cual tomando como base este criterio se podría decir de la enzima que dado su alto porcentaje de inhibición solo cabría esperar que la enzima fuera ya sea del tipo α o δ , por lo cual se procedió a seguir utilizando otros inhibidores.

NEM inhibe fuertemente a las DNA polimerasa α , γ y δ , pero no a la β . Este agente inhibió en un $83 \pm 5\%$ la actividad de la DNA polimerasa aislada en este trabajo por lo cual se podría descartar que ésta fuera tipo β .

El Afi inhibe fuertemente la actividad de las DNA polimerasas α y δ pero no inhibe a la β ni a la γ . Este agente inhibe en un $62 \pm 5\%$ la actividad de la DNA polimerasa parcialmente purificada en este trabajo.

Es importante hacer notar que en el control para Afi y NEM (que contenía DMSO, en el cual fueron disueltos), la enzima mostró una actividad 70% mayor que en control de ddTTP (disuelto en agua), lo cual parece indicar que a la enzima le favorece un ambiente hidrofóbico para aumentar su actividad. En la figura # 9 se muestra el porcentaje de inhibición de la enzima tomando como base 0% de inhibición de su respectivo control.

Por lo tanto, dado de que no se observa un patrón de comportamiento similar de la enzima estudiada en este trabajo a ninguna de las DNA polimerasas de animales en lo que se refiere a

respuesta a inhibidores, aunado a la incapacidad de la enzima de utilizar un molde de poli rA oligo dT sería muy comprometedor decir que la enzima estudiada en este trabajo es de determinado tipo.

I N T R O D U C C I O N

Trabajos anteriores con ejes embriones de maíz han sugerido que en las primeras horas de imbibición existe una síntesis del DNA de tipo reparativo (Zaraín et al., 1987). Por tal motivo se procedió a estudiar a la DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 3 horas, la cual se comparó con la que estaba presente a las 24 horas de imbibición, tiempo en el cual existe síntesis replicativa del DNA. (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988), encontrando que ambas se asemejaban a la DNA polimerasa α de células de animales, cambios en el esquema de purificación (control del pH durante la precipitación de ácidos nucleicos y proteínas, así como utilización de fosfoCelulosa como segunda columna, permitieron detectar dos picos de actividad de DNA polimerasa en ejes embrionarios de maíz no imbibidos, las cuales (por su comportamiento frente a inhibidores y comportamiento cromatográfico) eran diferentes de la DNA polimerasa anteriormente encontrada por Vázquez y Vázquez-Ramos, (Coello Coutiño, 1989). Estudios posteriores con ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 24 horas han permitido detectar tres actividades de DNA polimerasas (Coello, resultados no publicados) al fraccionar un extracto proteico a través de DEAE-Celulosa. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el pico de actividad que eluyó en primer lugar de esta columna. (Ver figura # 1). Esta resina de intercambio aniónico, al no retener a esta DNA polimerasa nos indicó de manera indirecta que dicha enzima no tiene el número de cargas negativas suficientes para retenerse a ella. Las fracciones

con actividad eluidas de DEAE-celulosa fueron aplicadas a una resina de Heparin-Sepharse, resina formada por glicosaminos altamente sulfatados y que, por la disposición de dichos grupos, pueden simular a los grupos fosfato del DNA. En esta resina se resolvió un solo pico de actividad que eluyó a una concentración de 850 ± 30 mM, lo que indicó que la enzima tiene una gran afinidad por la resina. Las fracciones con actividad fueron aplicadas a una columna de exclusión molecular de alta resolución, (Sephacryl S-300) en la cual, también solo se resolvió un pico, que empezó a definirse en las primeras fracciones, (fig. # 3), lo que hace indicar que la enzima posee un alto peso molecular. Es en esta resina en donde se obtuvo una gran cantidad de actividad total, que pudo ser debido a que la concentración de sales (50 mM de NaCl) haya ejercido un efecto estimulador en la actividad de la DNA polimerasa, ya que ésta eluyó a una concentración de 850 mM de la cromatografía anterior (Heparin-Spharose), lo cual es un indicio de que a fuerzas iónicas altas la actividad de la enzima disminuye. La cantidad de proteína que se recuperó de esta cromatografía fue casi la misma que la que se obtuvo de la cromatografía anterior (Heparin-Sepharse). Las fracciones con actividad que eluyeron de Sephacryl S-300 fueron aplicadas a una columna de afinidad; DNA-Celulosa, esta resina contiene un DNA de cadena sencilla y la enzima se pegó a ella un poco menos fuerte que cuando se cargó a la columna de Heparin-Sepharse puesto que la enzima eluyó a una concentración de NaCl de 350 ± 30 mM, como puede observarse en la figura # 4. Con este último paso de purificación se logró purificar a la enzima más de 2000 veces. Sin

embargo, es necesario tomar en consideración que la actividad total del extracto crudo es muy baja, lo cual da como consecuencia que en los valores obtenidos de los subsecuentes pasos cromatográficos se obtengan rendimientos mayores del 100% con respecto al inicial del extracto crudo. Este resultado puede deberse a que el amortiguador de homogenado (2.1) contenía una cantidad relativamente muy alta de sacarosa, provocando que se formaran agregados proteicos, los cuales al pasar por un gradiente de fosfatos (10 a 400 mM), estos agregados se disociaran, provocando una mayor actividad de DNA polimerasa. En las fracciones que se obtienen de Heparin-Sepharosa (eluidas a una concentración de 800 ± 50 mM de NaCl), muy probablemente los agregados se hayan disociado totalmente, provocando que se obtuviera una actividad total de DNA polimerasa muy alta, lo cual se observa también en las fracciones eluidas de Sephacryl-S300, resina. en la cual se obtiene el rendimiento más alto en el proceso de purificación. Después de haber utilizado la resina de DNA-Celulosa se completó el esquema de purificación parcial y se procedió a caracterizar a la enzima. Generalmente se reporta en la literatura en las condiciones de ensayo, una temperatura de 37 °C para medir la actividad de DNA polimerasa, para la enzima que se estudió en éste trabajo se observó que ésta funciona muy bien a temperaturas de entre 30 y 38 °C y que, a temperaturas mayores de 40 °C la enzima pierde actividad, por lo cual se estudió su estabilidad térmica; encontrándose que después de dicha temperatura la enzima pierde actividad por desnaturalización. Con respecto al pH, se ha reportado como óptimo 7.0, para trigo,

mientras que para tabaco se ha reportado como óptimo el de 8.3 (Litvak, S. y Castroviejo, M. 1987), lo cual nos hace ver que existe un amplio rango en cuanto a el pH óptimo para medir actividad de DNA polimerasa en las diferentes especies de sistemas vegetales; para la enzima que se estudió en este trabajo se observó que ésta funciona muy bien a valores de pH's de entre 7.0 y 7.8, notándose además que la actividad se ve afectada por el tipo de amortiguador aún a un mismo pH, así por ejemplo se observa que a pH de 6.0 existe un 33% más de actividad con el amortiguador MES que con BTP, lo cual es un indicio de que el BTP podría estar quelatando algunos sustratos y/o cofactores de la enzima. Esto podría suceder también con el Tris-HCl dado que éste tiene una estructura muy similar al del BTP. En cuanto al requerimiento de Mg^{++} se sabe que éste es indispensable para detectar actividad de las DNA polimerasas, sin embargo, el óptimo reportado varía de especie a especie. (Litvak y Castroviejo, 1987). La DNA polimerasa estudiada en este trabajo, a las concentraciones utilizadas tiene un óptimo entre 5 y 10 mM. Se estudió el uso del templado de poli rA oligo dT debido a que es una de las principales características que distinguen a la DNA polimerasa y de animales dada su alta eficiencia para utilizarlo como molde, DNA polimerasas tipo γ se han descrito en diferentes sistemas vegetales y su clasificación se basó principalmente en el uso eficiente de dicho templado (Graveline *et al.*, 1984; Castroviejo *et al.*, 1979). Fue por tal motivo que se estudió el uso de dicho templado por la enzima parcialmente purificada en este trabajo, notando que ésta es, (al menos en las condiciones del ensayo), incapaz de utilizarlo. Uno

de los criterios más fuertes para clasificar a las DNA polimerasas de animales se basa en el efecto que tienen ciertos inhibidores específicos sobre su actividad; por tal motivo se estudió el efecto de los inhibidores sobre la actividad de DNA polimerasa parcialmente purificada en el presente trabajo. La respuesta a los diferentes inhibidores es claramente diferente a las de su contraparte animal, ya que se observó una inhibición del 85% en presencia de NEM (inhibidor típico de las DNA pol α , γ y δ , pero no de la β), lo que hace suponer que en el sitio catalítico de la enzima existen grupos sulfhidrilo, por lo cual, tomando como base este criterio, (aunado al alto peso molecular de la enzima) se descarta la presencia de una enzima tipo β . En presencia de ddTTP (inhibidor de la DNA polimerasa β y γ pero no de la α) existe una inhibición del 75% y, en presencia de Afi₁ (inhibidor de la DNA polimerasa α y δ , pero no de la β ni de la γ), una inhibición de más del 65%. Estos resultados con inhibidores y uso de poli rA oligo dT no permitieron clasificar a la enzima parcialmente purificada en este trabajo ya que no se observó un patrón típico de inhibición semejante a ninguna de las DNA polimerasas de animales, lo cual no tenía que ser necesariamente así, ya que aún cuando estamos comparando enzimas que realizan las mismas actividades, éstas son de diferentes escalas evolutivas. Un dato que se desprende de este estudio y que resulta interesante consiste en el efecto estimulador que ejerce el DMSO en la actividad de la enzima, el cual también se ha visto que se presenta en el caso de la DNA polimerasa δ aislada a partir de placenta humana (Lee, et al, 1986). Dicho efecto estimulador

podría ser un indicio de que a la enzima le gusta trabajar en un ambiente hidrofóbico. Estudios encaminados a obtener la enzima a homogeneidad son recomendables, para poder determinar parámetros fisicoquímicos más precisos, es decir, sin que interaccione con otras proteínas no deseables. También, después de que la enzima sea obtenida a homogeneidad será recomendable obtener anticuerpos contra ella para poder rastrearla a lo largo de los diferentes tiempos de la germinación, y así, de esta manera utilizarla como un marcador bioquímico. Estudios que están fuera del alcance de los objetivos propuestos para el presente trabajo, pero que de alguna manera pueden contribuir a la realización de dichos estudios.

BIBLIOTECA CENTRAL

**TESIS NO DEBE
SER DA SISEL**

CONCLUSIONES

EN EL PRESENTE TRABAJO SE LOGRO ESTABLECER LA METODOLOGIA PARA OBTENER UNA BUENA PURIFICACION DE UNA DNA POLIMERASA.

SE LOGRARON ESTABLECER LAS CONDICIONES OPTIMAS DE LA MEZCLA DE REACCION PARA EL ENSAYO DE LA DNA POLIMERASA.

LA DNA POLIMERASA, AL SER INHIBIDA POR TODOS LOS INHIBIDORES ESPECIFICOS DE LAS DIFERENTES DNA POLIMERAS DE ANIMALES, NO PERMITE CLASIFICARLA SIGUIENDO EL MISMO CRITERIO QUE EL QUE SE USA PARA LAS DE SU CONTRAPARTE ANIMAL.

LA DNA POLIMERASA ESTUDIADA EN ESTE TRABAJO PARECE SER DIFERENTE DE LAS ANTERIORMENTE ESTUDIADAS (DE LA TIPO α Y LA TIPO γ) EN MAIZ.

REFERENCIAS

Abbotts, J., and Loeb, L. A. (1985). DNA polymerase α and models for proofreading. *Nucleic Acids Research*. 13: 261-274.

Aoshima, J., Kubota, M., Nishimura, T. and Iwamura T. (1984). DNA polymerases of *Chlorella*. II. Characterization to distinguish the two enzymes. *J. Biochem.* 96: 461-473.

Amileni, A., Sala, F., Cella, R., and Spadari, S. (1979). The major DNA polymerase in cultured plant cells: Partial purification and correlation with cell multiplication. *Planta*. 146: 521-527.

Aposhian, H.V. and Kornberg, A. (1962). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 237: 519-525.

Baíza, A.M., Vázquez-Ramos J. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embrionic maize tissues during germination. *J. Plant. Phisiol.* 135: 426-431.

Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A., and Spadari, S. (1976). Variation of DNA polymerase α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 785-789.

Bewley, J. D. and Black, M. (1978). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. I, Development, germination and growth. Springer-Verlag, Berlin, FRG., pp. 1-3, 7-17, 107, 115, 153-171.

Bewley J.D. and Black, M. (1978). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. II. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, FRG., pp. 17-21, 27-39.

Bewley J. D. and Black, M. (1984). Seeds.- Physiology of development and germination. Plenum press. New York, USA. pp: 89 171.

Bidwell, R.G., (1979). "Fisiología vegetal". AGT editor. México, D.F. PP. 75-77, 409-448, 569-598.

Blowers, L. E., Stormonth D., A., and Bray C., M. (1980). Nucleic acid and protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta*. 150: 19-25.

Bollum, F., J. (1960). Calf thymus polymerases. *J. Biol. Chem.* 235: 2399-2403.

Brooker, J.D., Cheung, C.P. and Marcus, A. (1977). In "Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination". North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp. 346-356.

Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L., and So, A.G. (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase δ . *Biochem.* 15: 2817-2823.

Byrnes J. J. (1984) Structural and functional properties of DNA polymerase delta from rabbit bone marrow. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 62: 13-24.

Castroviejo, M., Tharaud, D., Mocquot, B., and Litvak, S. (1979). Factors affecting the onset of deoxyribonucleic acid synthesis during wheat embryo germination. *Biochem. J.* 181: 193-199.

Castroviejo, M., Tharaud, D., Tarrago-Litvak, L., and Litvak, S. (1979). Multiple DNA polymerases from quiescent wheat embryos, purification and characterization of three enzymes from the soluble cytoplasm and one from purified mitochondria. *Biochem. J.* 181: 183-191.

Chang, L.M. Phylogeny of DNA polymerase- β . (1976). *Science* 191: 1183-1185.

Chang, L.M. Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. *J. Biol. Chem.* 248: 3789-3795.

Chiu, R.W. and Baril, E.F. (1975). Nuclear DNA polymerases and the HeLa cell cycle. *J. Biol. Chem.* 250: 7951- 7957.

Chivers, H.J. and Bryant, J.A. (1983). Molecular weights of the DNA polymerases of a higher plant. *Pisum sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 632-639.

Collins, J.M., and Chu, A.K. (1987). Binding of the DNA polymerase α

DNA primase complex to the nuclear matrix in HeLa cells. *Biochemistry*. 26: 5600-5607.

Cordoba, C.C., (1975). "Fisiología vegetal". Edit. H. Blume, Madrid. pág. 5.

Cotterill, S., Chui, G., and Lehman, I.R. (1987). DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 262: 16105-16108.

Crute, J.J., Wahl, A.F., and Bambara, R.A. (1986). Purification and characterization of two new high molecular weight forms of DNA polymerases δ . *Biochem.* 25: 26-36.

D'Alesandro, M.M., Jaskot, R.H., and Dunham, V.L. (1980). Soluble and chromatin-bound DNA polymerases in developing soybean. *Biochem. Res. Commun.* 94: 233-239.

Do, U.H., Neftel, R.A., Spadari, S., and Hubscher, U. (1987). Beta-lactam antibiotics interfere with eucaryotic DNA-replication by inhibiting DNA polimerasa α . *Nucleic Acids Research*. 15: 10495-10506.

Dresler, S.L., and Kimbro, K.S. (1987). 2',3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate inhibition of DNA replication and ultraviolet-induced DNA repair synthesis in human cells: evidence for involvement of DNA polymerase δ . *Biochem.* 26: 2664-2668.

Edenberg, H.J., Anderson, S., and DeFamphilis, M.L. (1978). Involvement of DNA polymerase α in simian virus 40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 253: 3273-3280.

Focher, F., Ferrari, E. Spadari, S. and Hubscher, U. (1988). Do DNA polymerases δ and α act coordinately as leading and lagging strand replicases? *FEBS Letters*. 229: 6-10.

Fujisawa, H. (1966). Role of nucleic acid and protein metabolism in the initiation of growth at germination. *Plant Cell Physiol*. 7: 185-197.

Gardner, J.M., and Kado, C.I. (1976). High molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from crown gall tumor cells of periwinkle (*Vinca rosea*). *Biochemistry*. 15: 688-696.

Graveline, J., Tarrago-Litvak, L., Castroviejo, M., and Litvak, S. (1984). DNA primase activity from wheat embryos. *Plant Molecular Biology*. 3: 207-215.

Grosse, F., Krauss, G., Knill-Jones, J.W. and Fersht, A.R. (1983). Accuracy of DNA polymerase- α in copying natural DNA. *the EMBO Journal*. 2: 1515-1519.

Habara, A., Nagano, H., and Mano, Y. (1979) Identification of γ -like DNA polymerase from sea urchin embryos. *Biochimica et Biophysica Acta*. 561: 17-28.

Hanaoka, F., Sayato, J., Arai, H., Hasegawa, N., Inui, N. Mitsui, Y., and Yamada, M. (1983). Changes in DNA polymerases α , β and γ in mouse liver as a function of age. *Mechanisms of Ageing and Development*. 23: 315-327.

Hecker, M., Kohler, K. Wachlin G., and Bernhardt, D. (1982). Relation between DNA synthesis and germination of *Vaccaria pyramidata* seeds. *Phytochemistry*. 12: 1491-1494.

Heinhorst, S., Cannon, G.C., and Weissbach, A. (1990). Chloroplast and mitochondrial DNA polymerases from cultured soybean cells. *Plant Physiol*. 92: 939-945.

Ho., T.F., Gupta, J.S., and Faust, E. A. (1989). A novel primase-free form of murine DNA polymerase α induced by infection with minute virus of mice. *Biochemistry*. 28: 4622-4628.

Holmes, A.M., Cheriathundam, E., Bollum, F.J. and Chang, L.M.S. (1985). Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *J. Biol. Chem*. 260: 10840-10845.

Hohn, K., and Grosse, F. (1987). Processivity of the DNA polymerase α -primase complex from calf thymus. *Biochemistry*. 26: 2878-2878.

Kaiserman, H.B., and Benbow, R. (1987). Characterization of a stable, major DNA polymerase α species devoid of DNA primase activity. *Nucleic Acids Research*. 15: 10249-10265.

Kalcker, H.M. (1947) Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the

enzymes of purine metabolism. *J. Biol. Chem.* 167: 461-471.

Khan, N.N., Wright, G.E., Dudycz, L.W., and Brown, N.C. (1984). Butylphenyl dGTP: a selective and potent inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Nucleic Acids Research.* 12: 3695-3706.

Kornberg, A. (1980). DNA replication. Mechanism and operations in DNA replication. W.H. Freeman and Co. San Francisco. pp. 167-229.

Knopf, K. (1979). Properties of Herpes simplex virus DNA polymerase and characterization of its associated exonucleasa activity. *Eur. J. Biochem.* 98: 231-244.

Krokan, H., Schaffer, P., and DePamphilis, M.L. (1979). Involvement of eucaryotic deoxyribonucleic acid polymerases α and γ in the replication of cellular and viral deoxyribonucleic acid. *American Chemical Society.* 18: 4431-4443.

Kunkel, T.A., Sabatino, R.D., and Bambara, R.A. (1987). Exonucleolytic proofreading by calf thymus DNA polymerase δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4865-4869.

Kunkel, T.A., and Mosbaugh, D.W. (1989). Exonucleolytic proofreading by a mammalian DNA polymerase γ . *Biochemistry.* 28: 988-995.

Lee, S., Eki, T., and Hurwitz, J. (1989). Synthesis of DNA containing the simian virus 40 origin of replication by the combined action of DNA polymerases α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7361-7365.

Litvak, S., and Castroviejo, M. (1985). Plant DNA polymerases. *Plan Molecular Biology.* 4: 311-314.

Litvak, S., and Castroviejo, M. (1987). DNA polymerases from plant cells. *Mutation Research.* 181: 81-91.

Marcus, A., and Feeley, J. (1964). Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 51: 10075-1079.

Mayer, A.M., and Poljakoff-Mayber, A. (1975) The germination of seeds. Second edition. Pergamon Press. U.K. pp. 21-35.

Meléndez, S., (1987). Patrones de peso molecular del DNA, mediante gradientes alcalinos de sacarosa y geles de agarosa de semillas deterioradas de maíz. Tesis Licenciatura. Fac. Química, UNAM.

Meléndez S. (1990). Identificación de las DNA polimerasas nucleares presentes en ejes embrionarios de maíz durante las primeras horas de la germinación. Tesis Maestría. Fac. Química UNAM.

Miller, R.M., and Chinault D.N. (1982). The roles of DNA polymerases α , β , and γ in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. J. Biol. Chem. 257: 10204-10209.

Misumi, M. and Weissbach, A. (1982). The isolation and characterization of DNA polymerase α from spinach. J. Biol. Chem. 257: 2323-2329.

Murray, D.R. (1984). "Seed Physiology". Vol. II. Academic Press, Australia. pp. 77-115.

Nasheuer, H., and Grosse, F. (1987). Immunoaffinity-purified DNA polymerase α displays novel properties. Biochemistry 26: 8458-8466.

Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai. (1981) Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). Israel Journal of Botany. 29: 259-272.

Osborne, D.J. (1982) DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. In Embryonic development. Part B. Cellular aspects. pp: 577-592 (Allan R. Liss, Inc. 150 Fifth Ave. New York, N.Y. 1001.

Philippe, M., Rossignol, J. and De Recondo, A. (1985). DNA polymerase α associated primase from rat liver: physiological variations. Biochemistry. 25: 1611-1615.

Reyland, M.E., and Loeb, L.A. (1987). On the fidelity of DNA replication. J. Biol. Chem. 262: 10824-10830.

Roberts, B.E., Payne, F.I. and Osborne, D.J. (1973). Protein synthesis and the viability of rye grains: Loss of activity of

protein-synthesizing systems *in vitro* associated with a loss of viability. *Biochem. J.* 131: 275-286.

Sakaguchi, K., Hotta, Y., and Stern, H. (1980). Chromatin-associated DNA polymerase activity in meiotic cells of lili and mouse; its stimulation by meiotic helix-destabilizing proteins. *Cell Structure and Function*. 5: 323-334.

Sen, S., Payne, P., and Osborne, D.J. (1975). Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and relationship to early protein synthesis. *Biochem. J.* 148: 381-387.

Salazar, I., Tarrago-Litvak, L., Gil, L., and Litvak, S. (1982). The effect of benzo[*a*]pyrene on DNA synthesis and DNA polymerase activity of rat liver mitochondria. *FEBS letters*. 138: 45-49.

Skarnes, W., Bonin, P., and Baril, E. (1986). Exonucleasa activity associated with a multiprotein form of HeLa cell DNA polymerase α . *J. Biol. Chem.* 261: 6629-6636.

Shioda, M., Nelson, E.M., Bayne M.L., and Benbow, R.M. (1982). DNA primase activity associated with DNA polymerase α from *Xenopus laevis* ovaries. 79: (7209-7213).

Smith, H. C., and Berezney, R. (1982). Nuclear matrix-bound deoxyribonucleic acid synthesis: an *in vitro* sistem. *Biochem.* 21: 6751-6761.

Suzuka, I., Daidoji, H., Matsuoka, M., Kadowaki, K., Takasaki, Y., Nakane, P.K., and Moriuchi, T. (1989). Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3189-3193.

Vázquez, A, and Vázquez-Ramos, J. (1987). Characteristics of the major DNA polymerases found during early and late maize germination. *Can. J. Botany*. 66: 1186-1191.

Vázquez-Ramos, J. y López, M.S. (1986). Inhibición *in vitro* de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-CTP. *Revista de la Sociedad de Química de México*.

Vázquez-Ramos, J.M., and Osborne, D. J. (1986). Analysis of the

DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research*. 166: 39-47.

Velemiski, J., and Gichner, T. (1978). DNA repair in mutagen-injured higher plants. *Mutation Res* 55: 71-84.

Wahl, A.F., Crute, J.J., Sabatino, R.D., Bodner, J.B., Marraccino, R.L., Harwell, L.W., Lord, E.M., and Bambara, R.A. (1986). Properties of two forms of DNA polymerase δ from calf thymus. *Biochemistry*. 25: 7821-7827.

Wever, G., and Takats, S.T. (1969). DNA polymerase activities in *Tradescantia paludosa* pollen grain nuclei. *Biochimica et biophysica acta*. 199: 8-17.

Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, F., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M.W., and Wang T.S.F. (1988). Human DNA polymerase α gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *the EMBO Journal*. 7: 37-47.

Yoshida, S., Suzuki, R., Masaki, S., and Koiwai, O. (1985). Arabinosylnucleoside 5'-triphosphate inhibits DNA primase of calf thymus. *J. Biochem.* 98: 427-433.

Zarain, H.M., Bernal-Lugo, I., and Vázquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of Benzyladenine on the synthesis of DNA during early germination of maize embryo axes. *Mutat. Res.* 181:103-110.