

00528
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE PCNA RECOMBINANTE
DE MAIZ Y SU INTERACCION CON DNA POLIMERASAS"

Se autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Avalos Aguirrezabala
Francisco Javier
FECHA: 14/03/03
FIRMA: [Firma]

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
FRANCISCO JAVIER AVALOS AGUIRREZABALA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MEXICO, D. F.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE PCNA RECOMBINANTE DE
MAÍZ Y SU INTERACCIÓN CON DNA POLIMERASAS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER AVALOS AGUIRREZABALA

MÉXICO, D.F.

2003

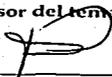
B

JURADO ASIGNADO:

Presidente Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos
Vocal M. en C. Elpidio García Ramírez
Secretario Dr. Francisco Ruiz Teran
1er. Suplente M. en C. Euclides Ávila Chávez
2ndo. Suplente M. en C. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 114, Departamento de Bioquímica, Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema



Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor técnico



M. en C. Elpidio García Ramírez

Sustentante



Francisco Javier Avalos Aguirrezabala

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos por darme la confianza, apoyo, consejos y la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

Al M. en C. Elpidio García Ramírez por toda su ayuda tanto teórica como experimental para el asesoramiento de este trabajo y por su paciencia. Gracias Pilo.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por todas sus enseñanzas como profesor y por el apoyo brindado en la revisión de este trabajo como sinodal.

A todos los compañeros del Laboratorio 114 del conjunto E de la Facultad de Química (Mary, Luz María, Dairo, Ruth, Gregorio, Doña Licha, Dario y Naty) por su amistad.

Al Biol. Carlos Mujica por el apoyo en el uso del HPLC.

DEDICATORIAS:

Especialmente a mis Padres, María Elisa y Javier, por todo su cariño, amor, apoyo, consejos y demás cosas que siempre me han brindado y me han ayudado a vivir.

A mi padrino Primitivo Avalos, quien es como un segundo padre para mí, por que siempre me dio un modelo a seguir.

A mis hermanas, Elizabeth y Lorena, por ser mi constante estímulo.

A toda la Familia Avalos Gutiérrez y los que dependen de ella por su apoyo, compañía y comprensión.

A Mariana López M. y a mis amigos más queridos y cercanos (Pepe señor, Julio, Toño, Fernando, Pepe hijo, y Marcela) por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis amigos (as): Mariana "chango", Beatriz "betyblue", Miguel "Ra", Mayra, Adriana R., Rosa, Carlos "fifu", Javier "vegeta", Beatriz "bulma", Armando "rudo", Jerson, el Patron, Karla, Vanesa, Lizbeth, Juan Carlos, el cometa, Saúl "yegros", etc; por su compañía, amistad y hacer mi estancia mucho más agradable en la Facultad.

A los compañeros de la Facultad de Química de la generación 98 y algunos de la 97 con los que pasé momentos inolvidables.

Y a todos los que alguna vez han formado parte de mi vida.

¡GRACIAS!

Recuerda, lo que hacemos en vida tiene eco en la eternidad...

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

E

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
➤ MAÍZ	1
➤ GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ	2
➤ REPLICACIÓN DEL DNA EN EUKARIOTES	3
➤ PROTEÍNAS PARTICIPANTES EN LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN	4
▪ PROTEÍNA DE REPLICACIÓN A (RPA)	5
▪ FACTOR DE REPLICACIÓN C (RFC)	5
▪ DNA POLIMERASAS	6
▪ ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)	8
▪ FEN1 Y RNasa H1	12
▪ DNA Helicasas	13
➤ MECANISMO DE SÍNTESIS DEL DNA EN UNA HORQUILLA DE REPLICACIÓN	14
▪ ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA	14
▪ INTERCAMBIO DE POLIMERASAS	14
▪ MADURACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE OKAZAKI	16
ANTECEDENTES	17
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	34
➤ AISLAMIENTO DE PCNA _r DE CUERPOS DE INCLUSIÓN Y GENERACIÓN DE ANTICUERPOS	34
➤ PURIFICACIÓN DE PCNA _r DE MAÍZ	40
➤ DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PCNA _r DE MAÍZ	44
➤ EFECTO DE PCNA _r DE MAÍZ CON DNA POLIMERASAS	47
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65

7

GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ

La germinación de las semillas comienza con la captación de agua (imbibición) y termina con el inicio de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Esto incluye muchos eventos como la hidratación de las proteínas, cambios en la estructura subcelular, respiración, síntesis de macromoléculas, y elongación celular, ninguno de los cuáles es único para la germinación, pero sus efectos combinados transforman a un embrión deshidratado con apenas un metabolismo detectable en uno que tiene un metabolismo vigoroso y que culmina con el crecimiento de la radícula. La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por la elongación celular y la subsecuente aparición a través de la semilla de una capa que puede o no ser acompañada por división celular. Durante la germinación ocurren muchos eventos, entre los cuales está el crecimiento de las células y por lo tanto su posterior división; para que una célula pueda dividirse y así pueda formar parte de los tejidos que constiuyen una planta madura, deben ocurrir una serie de pasos, que se conocen como fases del ciclo celular.

El ciclo celular en eucariotes ocurre en cuatro fases bien definidas. En la fase S (síntesis), el DNA es replicado para producir copias iguales para dos células hijas. Como en otras semillas, en el maíz se ha visto que la síntesis del DNA ocurre en diferentes tejidos de la semilla germinada [Bewley y Black, 1985]. En la fase G2 se sintetizan nuevas proteínas que preparan a la célula para su división. En la fase M (mitosis), la membrana nuclear se divide y los cromosomas combinados son colocados en polos opuestos de la célula, entonces cada juego de cromosomas es rodeado por la formación de una nueva membrana nuclear y poco después la célula se divide a la mitad, produciendo dos células hijas. En tejidos en donde se está desarrollando un embrión o en tejidos proliferantes, cada célula hija se divide

continuamente, pero sólo después de un periodo de "reposo" que se conoce como fase G₁, en el cual también se da la síntesis de RNA y de muchas proteínas, pero no del DNA. El hecho de que una célula pase de la mitosis y entre a la fase G₁ no significa que la célula va a seguir dividiéndose, pero tampoco que va a dejar de hacerlo. La célula puede entrar en una fase quiescente conocida como G₀, la cual puede durar unas pocas horas, días o tal vez el tiempo de vida de la célula. Cuando una célula se encuentra en la fase G₀ y se despiertan los mecanismos proliferativos, ésta entra nuevamente al ciclo celular desde la fase G₁. Uno de los periodos clave en el ciclo celular es la fase S, pues en esta fase se lleva a cabo la replicación del DNA, lo cual es fundamental para la multiplicación celular.

REPLICACIÓN DEL DNA EN EUKARIOTES

En una célula eucariótica en proliferación, la duplicación de su material genético ocurre durante cada fase S del ciclo celular y ésta debe darse con mucha precisión y fidelidad sólo una vez por cada ciclo celular. Además, la replicación del DNA en una célula debe estar coordinada con otros procesos del ciclo celular tales como la mitosis, la citoquinesis y con la replicación del DNA de las células que se encuentran a su alrededor [Difley 1996, Stillman 1996]. Una vez comenzada la replicación del DNA, el aparato de replicación copia cada replicón en un proceso altamente eficiente: la replicación del DNA en células eucarióticas debe darse al mismo tiempo en que ocurren otros procesos como la reparación del DNA y su arreglo en cromatina. Las proteínas de la horquilla de replicación juegan roles prominentes en el mantenimiento de la fidelidad de la replicación del DNA, coordinándose la replicación con la progresión del ciclo celular.

PROTEÍNAS PARTICIPANTES EN LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN

Mucho de lo que se sabe acerca de la replicación del DNA en eucariotes proviene de extensivos estudios realizados usando extractos celulares de células de mamífero que contienen la maquinaria completa para la replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación del DNA del virus 40 de simio (SV40 ori) [Li y Kelly 1984, Li y Kelly 1985]. En la tabla 1 se definen algunas de las proteínas que participan en la replicación del DNA.

Proteína	Funciones
RPA	Proteína de unión al DNA de cadena sencilla; estimula a las DNA polimerasas; facilita el posicionamiento de la helicasa.
PCNA	Estimula a las DNA polimerasas, factor de procesividad.
RFC	Posicionador de PCNA en el extremo 3' del molde-cebador; estimula las DNA polimerasas.
Pol α /primasa	Sintetiza el cebador de RNA-DNA.
Pol δ / ϵ	DNA polimerasa (elongación del DNA); exonucleasa 3'-5'.
FEN1	Nucleasa que remueve el cebador de RNA.
RNasa H1	Nucleasa que remueve el cebador de RNA.
DNA ligasa I	Ligación del DNA.
DNA helicasa	Proteína que separa la doble cadena de DNA permitiendo la acción de las demás proteínas.

Tabla 1. Función de algunas de las proteínas que participan en la horquilla de replicación del DNA.
[Waga y Stillman 1998]

Todas estas proteínas son importantes para que la replicación del DNA *in vivo* se lleve a cabo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTEÍNA DE REPLICACIÓN A (RPA)

La proteína de replicación A (RPA, antes reportada como RFA o HSSB) es una proteína que se une al DNA de cadena sencilla y existe como un complejo heterotrimérico consistente de subunidades con masas aparentes de aproximadamente 70, 34 y 11 KDa en todas las células eucarióticas examinadas [Hübcher et al. 1996, Wold, 1997]. RPA promueve la separación de las dos cadenas de DNA, estimula la actividad del complejo pol α / primasa bajo ciertas condiciones y es requerida por el factor de replicación C (RFC) y, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), de los cuales depende la DNA polimerasa δ para la síntesis del DNA [Tsurimoto y Stillman 1991, Kenny et al. 1989, Tsurimoto y Stillman 1989, Erdile et al. 1991, Braun et al. 1997].

FACTOR DE REPLICACIÓN C (RFC)

Una de las proteínas clave involucradas en el montaje de las polimerasas replicativas para crear la horquilla de replicación es RFC, la cual es un complejo de 5 subunidades y se encuentra muy conservado en todos los eucariotes [Hübcher et al. 1996]. El papel central de RFC es el de posicionar el trímero de PCNA, estructura similar a la de un anillo, sobre el DNA en la unión del molde con el cebador, o colocarlo sobre un sitio cortado de un DNA de cadena doble [Tsurimoto et al. 1990, Tsurimoto y Stillman 1991, Lee et al. 1991, Cai et al. 1996]. El posicionamiento de PCNA catalizado por RFC es un pre-requisito para el ensamblaje de pol δ sobre el molde de DNA para formar una holoenzima procesiva [Tsurimoto y Stillman 1991, Tsurimoto y Stillman 1990, Lee et al. 1991, Fien y Stillman 1992, Podust et al. 1992, Burguers 1991, Lee y Hurwitz 1990], la cual funciona durante la síntesis tanto de la cadena continua como de

la discontinua en la horquilla de replicación. La función de montaje del anillo hecha por RFC puede ser uno de los eventos clave en el metabolismo del DNA.

DNA POLIMERASAS

Las DNA polimerasas (pols) α , δ y ϵ presentes en eucariotes son las enzimas clave requeridas para la replicación del genoma, ya que éstas llevan a cabo la síntesis del DNA. Basándose en la homología de su secuencia y la similitud en su estructura, respecto a las polimerasas de *E. coli*, las polimerasas han sido agrupadas en 5 diferentes familias: A, B, C, X e Y [Braithwaite e Ito 1993, Ohmori et al. 2001]. Las polimerasas replicativas en eucariotes (pol α , pol δ y pol ϵ) pertenecen a la familia B y la polimerasa mitocondrial, pol γ , a la familia A. Las polimerasas en eucariotes son heteromultímeros compuestos por una subunidad de gran tamaño y una variedad de pequeñas subunidades.

Complejo DNA polimerasa α / DNA primasa

El complejo DNA polimerasa α (pol α)/ primasa es la única enzima capaz de iniciar la síntesis de DNA *de novo* sintetizando al principio un cebador de RNA para entonces extender este cebador por medio de la polimerización produciendo una extensión corta de DNA (cebador de RNA-DNA); el RNA-DNA corto sirve como un cebador para la extensión por otras polimerasas que llevan a cabo la síntesis de DNA tanto en la cadena continua (sintetizada continuamente), como para cada fragmento de Okazaki en la cadena discontinua (sintetizada discontinuamente) [Prelich y Stillman 1988, Lee et al. 1989, Weinberg y Kelly 1989, Tsurimoto y Stillman 1991, Waga y Stillman 1994]. El complejo pol α / primasa no es

capaz de llevar a cabo la síntesis procesiva del DNA y se disocia del molde de DNA tras haber sintetizado el cebador [Murakami y Hurwitz 1993].

DNA polimerasa δ (pol δ)

La pol δ fue la primera enzima a la que se le encontró una función para corregir desapareos de DNA debido a su actividad de exonucleasa 3'-5'. Esta polimerasa fue descubierta en 1976 [Byrnes *et al.* 1976] y tomó más de una década para confirmar su función de DNA polimerasa. En *S. pombe* se han identificado 5 subunidades para esta enzima (p125, p55, p54, p40 y p22) [Zuo *et al.* 1997], 4 en mamíferos (p125, p66, p50 y p12) [Mo *et al.* 2000] y 3 en *S. cerevisiae* (p125, p58 y p55) [Burguers y Gerik 1998]. La pol δ posee un amplio rango de funciones: es requerida en la replicación de la cadena continua y de la cadena discontinua del DNA (probablemente en cooperación con pol ϵ) en donde alargan y maduran los fragmentos de Okazaki del DNA y en varios eventos de reparación del DNA, como en la reparación de apareos incorrectos, reparación por excisión de bases y nucleótidos y reparación por rompimiento de dobles cadenas. Además, se piensa que esta involucrada en la regulación del ciclo celular.

DNA polimerasa ε (pol ε)

Esta es también una polimerasa que está involucrada en el control del ciclo celular y que puede tener alguna función en la horquilla de replicación del DNA para asegurar la correcta síntesis del DNA, quizá por un mecanismo de reparación post-replicativo u otro mecanismo [Navas et al. 1995, Navas et al. 1996]. También es posible que esta polimerasa participe en la replicación de los cromosomas como una enzima especializada para la iniciación de la replicación del DNA en sitios en donde la síntesis se ha detenido temporalmente. Se requieren más estudios acerca de la posible función de pol ε [Waga y Stillman 1998].

ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)

Quizá una de las proteínas del aparato de replicación más estudiadas sea el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el anillo móvil de la DNA polimerasa. Esta proteína no sólo tiene una función central en el metabolismo del DNA, sino que también se ha convertido en un marcador de diagnóstico clínico de proliferación [Waga y Stillman 1998].

El entendimiento del aparato de replicación en eucariotes ha tenido grandes avances. Uno de los más grandes ha sido el desarrollo de un sistema de estudio de la replicación del DNA *in vitro* con el DNA del virus 40 de simio (SV40) [Prelich y Stillman 1988, Challberg y Nelly 1998]. De esta manera se descubrieron diversos factores de la replicación. El primer factor que fue identificado tiene un peso molecular de 29 KDa y es requerido para la reacción de elongación del DNA [Prelich et al. 1987]; subsecuentemente se identificó a PCNA como una proteína reguladora del ciclo celular. Esta proteína también fue llamada ciclina debido a su periódica aparición en la fase S [Bravo y Celis 1980], pero desde que PCNA se identificó y

dilucidó [Mathews et al. 1984] se le ha dado este nombre para evitar confusiones con la familia de las proteínas ciclinas que interaccionan con las proteínas cinasas CDK.

Al comparar los procesos de elongación en *E. coli*, fagos y sistemas eucarióticos, se ha revelado que los aparatos de replicación están altamente conservados en términos de estructura y función [Kuriyan y O'Donnell 1993]. Los factores llamados "abrazaderas corredizas" del DNA existen en común en todos los sistemas y tienen una interesante característica que explica cómo las DNA polimerasas pueden sintetizar cadenas largas de DNA eficientemente. Esta característica le permite el deslizamiento estable, pero libre, a lo largo de la doble hélice del DNA en ambas direcciones. PCNA es una abrazadera eucariótica que funciona como un factor de procesividad para la pol δ por la unión de la polimerasa sobre el DNA [Kelman 1997]. Los estudios sobre los aparatos de elongación en procariotes y eucariotes han demostrado una sorprendente conservación estructural y funcional.

Estructura de PCNA

PCNA es funcionalmente análoga a la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli* (pol III) y a la proteína del gen 45 del fago T4. El nombre de abrazadera deslizante viene de un experimento que mostraba que la subunidad β se unía establemente con el DNA circular, pero se disociaba rápidamente ante la linearización del DNA [Stukenberg et al. 1991, Yuo et al. 1996] después de posicionarse. La cristalografía de PCNAs de levadura y humano reveló que es una estructura de homotrímeros [Krishna et al. 1994, Gulbis et al. 1996]. Dado que las secuencias peptídicas tanto de PCNA, la subunidad β y la proteína del gen 45 son diferentes, se sugiere que las estructuras tridimensionales pudieron haber sido adquiridas

independientemente durante la evolución, por presión selectiva, para lograr la misma función en la replicación del DNA en varios organismos. La característica común de los anillos deslizantes del DNA es que tienen seis estructuras de dominio repetidas formando anillos hexagonales.

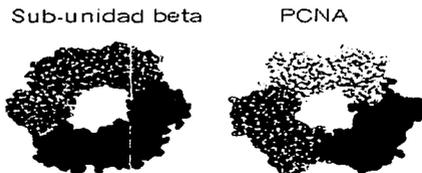


Figura 2. Comparación de los anillos deslizantes del DNA de *E. coli* (subunidad β) y eucariotes (PCNA de levadura). Configuraciones del dímero y trímero de la subunidad β y PCNA, respectivamente. Estructura en 3D. Los monómeros se distinguen por los tonos. [Tsurimoto 1998]

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Figura 3. Estructura tridimensional de PCNA vista de lado (arriba) y de frente (abajo). Localización de los dominios funcionales: el dominio central (Asp⁹⁷-His²⁴⁴), se encuentra de color verde; en café el dominio conector del interdominio (Leu¹²¹-Glu¹¹²), y en rosa el Asp⁹⁷ y la cola del C-terminal (Lys²⁴²-Glu²⁴⁶). La región en verde interactúa con la DNA pol δ y RFC. La región café y rosa interactúa con pol δ y RFC, respectivamente. [Tsurimoto 1998]

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Factor de procesividad para la pol δ

En una plantilla sintética de DNA, por ejemplo sobre un polidA/ oligodT, pol δ incorpora sólo unas cuantas decenas de nucleótidos a partir de los cebadores, pero la presencia de PCNA incrementa la procesividad de pol δ a más de 1000 nucleótidos. Esto significa que la interacción de la pol δ sola con el DNA es inestable para sintetizar DNA largo, pero la ayuda de la "abrazadera deslizante" (PCNA) sobre el DNA hace a esta interacción más estable. Esta característica implica que PCNA funciona como un factor de procesividad de las DNA polimerasas, de manera semejante a la subunidad β de la DNA polimerasa III de *Escherichia coli*. La completa omisión de PCNA en la reacción de replicación de SV40 da como resultado una acumulación de cadenas cortas de DNA específico en lugar de los productos completos, es decir, no se terminan de sintetizar las cadenas complementarias y quedan incompletas [Prelich et al. 1987].

La síntesis del DNA no inicia sin el complejo pol α/ primasa. En contraste, la omisión de pol δ, RFC o PCNA en ensayos *in vitro* resulta en un decremento de la síntesis del DNA a 1/3-1/5 del nivel completo de la reacción, correspondiendo a una síntesis del DNA limitada, quedando fragmentos de Okazaki cortos por la acción solitaria del complejo pol α/ primasa [Tsurimoto 1998].

PCNA, además de actuar como factor de procesividad puede estar implicado en otros procesos diferentes a la replicación. Por ejemplo, cuando el DNA es dañado, por sustancias químicas como nitrato de sodio, nitrato de sodio, nitrosamina, agentes alquilantes (adenosilmetionina, dimetilnitrosamina y dimetilsulfato) o agentes físicos del medio ambiente como la luz UV, producto del metabolismo celular, el DNA puede acumular errores durante su replicación y daños en el transcurso de los procesos metabólicos. Las

formas más comunes en que el DNA puede ser dañado son: delección de bases, alteración de bases, inserción de bases, adición de bases incorrectas, etc. Los daños del DNA pueden ser corregidos por diferentes mecanismos: reparación por escisión de nucleótidos, reparación por escisión de bases, reparación por mal apareamiento y otros mecanismos. En todos estos mecanismos se ha observado que PCNA es indispensable. En núcleos donde el DNA ha sido previamente dañado utilizando luz UV, se ha observado que al utilizar anticuerpos dirigidos contra PCNA existe inmunodetección en los sitios de reparación, aunque las células no se encuentren en la fase S. Esto sugiere que PCNA es una proteína que actúa tanto en la replicación como en la reparación del DNA [Celtis y Madsen 1986].

FEN1 Y RNasa H1

Varios estudios bioquímicos han mostrado que FEN1 tiene una función específica que consiste en remover el cebador de RNA unido al extremo 5' de cada fragmento de Okazaki [Waga y Stillman 1998, Turchi et al. 1994, Turchi y Bambara 1993, Murante et al. 1994, Huang et al. 1996, Murante et al. 1996]. Extensos estudios muestran que la remoción del cebador de RNA involucra a otras proteínas incluyendo una endonucleasa de unión a RNA-DNA, PCNA y a la helicasa Dna2 [Bambara et al. 1997]. Se considera que la RNasa H1 esta involucrada en la remoción de los cebadores de RNA durante la síntesis de los fragmentos de Okazaki [Bisen 1980, DiFranco y Lehman 1983, Hagemeyer y Grosse 1989].

DNA HELICASAS

Las DNA helicasas son enzimas que promueven la procesiva desunión del DNA de doble cadena, tal como ocurre en la horquilla de replicación para crear los moldes para las polimerasas. Muchas DNA helicasas han sido identificadas en células eucariotas incluyendo a las helicasas asociadas con pol δ/ϵ o RFC [Borowick 1996], pero sólo unas pocas han sido implicadas en la replicación del DNA: Helicasa Dna2; helicasa B de ratón, proteínas de mantenimiento del mini-cromosoma (MCMs). Las proteínas de mantenimiento del minicromosoma (MCMs) inicialmente fueron identificadas como proteínas requeridas para la replicación de plásmidos que contenían orígenes de replicación.

Seis MCMs han sido encontradas en todas las células eucarióticas que han sido examinadas hasta la fecha y algunos resultados recientes con estas proteínas sugieren que las proteínas MCM funcionan como una DNA helicasa replicativa en la horquilla de replicación celular [Waga y Stillman 1998].

Ya que hemos descrito de manera general, a algunas de las proteínas que participan en la horquilla de replicación del DNA, debemos describir el proceso mediante el cual interaccionan estas proteínas para llevar a cabo la duplicación del DNA

MECANISMO DE SÍNTESIS DEL DNA EN UNA HORQUILLA DE REPLICACIÓN

ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA

Uno de los primeros pasos después del reconocimiento del origen de replicación y la local desunión del DNA, es montar al complejo pol α / primasa sobre el DNA; a ésto se le conoce como el ensamblaje del primosoma. El ensamblaje del primosoma normalmente involucra una DNA helicasa interactuando con el complejo pol α / primasa [Waga y Stillman 1998].

INTERCAMBIO DE POLIMERASAS

Estudios bioquímicos usando el sistema reconstituido de replicación del DNA del SV40 con proteínas purificadas [Prelich y Stillman 1988, Tsurimoto et al. 1990, Waga y Stillman 1994, Tsurimoto y Stillman 1989, Weinberg et al. 1990, Eki et al. 1992] han mostrado que dos diferentes polimerasas, pol α / primasa y pol δ , están involucradas en la síntesis del DNA y que pol δ esta involucrada en la síntesis de ambas cadenas, la cadena continua y la discontinua. Después de sintetizar el cebador en la cadena continua [Tsurimoto y Stillman 1990] y sintetizar cada fragmento de Okazaki en la cadena discontinua [Waga y Stillman 1998], el complejo pol α / primasa se retira de la cadena de DNA para permitir el posicionamiento de pol δ sobre el molde de DNA, consiguiendo así una especie de estímulo sobre la pol δ , a lo que se le podría dar el nombre de intercambio de polimerasas. Los mecanismos de iniciación de la

síntesis de la cadena continua y la iniciación de cada fragmento de Okazaki son aparentemente muy similares: un cebador de RNA-DNA es producido por el complejo pol α / primasa y el extremo 3' del iniciador de DNA es reconocido por RFC y PCNA, expulsando al complejo pol α / primasa y montando a pol δ . El complejo pol α / primasa comienza la síntesis con un cebador de RNA-DNA sobre una cadena sencilla de DNA, estabilizada por la acción de RPA; entonces, RFC se une al extremo 3' del iniciador de DNA, desplazando al complejo pol α / primasa. La unión de RFC es acompañada con el montaje de PCNA y la subsecuente asociación de PCNA con pol δ . Entonces, la DNA pol δ se vuelve procesiva y completa la cadena de DNA [Matsumoto et al. 1990, Weinberg y Nelly 1989, Eki et al. 1992]. Para la iniciación de la replicación de la cadena continua, la síntesis hecha por el complejo pol δ / PCNA es entonces procesiva y continua, al menos por 5-10 Kb de DNA. Para la síntesis de la cadena discontinua, la síntesis de DNA de los fragmentos de Okazaki continúa hasta que la polimerasa se encuentra con los fragmentos de Okazaki previamente sintetizados; el cebador de RNA previamente sintetizado es entonces removido por la RNasa H1, el hueco remanente es llenado primero por una DNA polimerasa y las cadenas resultantes son selladas por la DNA ligasa I. Pol ϵ puede estar involucrada en la iniciación de la replicación del DNA. Una proteína clave en el cambio de polimerasas parece ser RFC y el montaje de PCNA realizado por RFC es un evento esencial para la transición de un modo de cebadores a un modo de extensión de la síntesis de DNA. No obstante, se requiere de más investigación de los mecanismos de coordinación para la síntesis de DNA de ambas cadenas en la horquilla de replicación del DNA de las células eucarióticas.

MADURACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE OKAZAKI

En la maduración de los fragmentos de Okazaki, los fragmentos sintetizados en el molde de la cadena discontinua son convertidos en productos de DNA largos covalentemente unidos. Esto involucra varios pasos diferentes, incluyendo la remoción del cebador de RNA, relleno de los huecos con dNMPs utilizando como sustrato dNTPs, y la unión de las dos cadenas de DNA. Estudios recientes y la observación de que muchas de las proteínas involucradas en estos procesos se unen a PCNA, sugieren que estos pasos pueden estar regulados coordinadamente con cada una de las proteínas con las que interacciona PCNA [Waga y Stillman 1998].

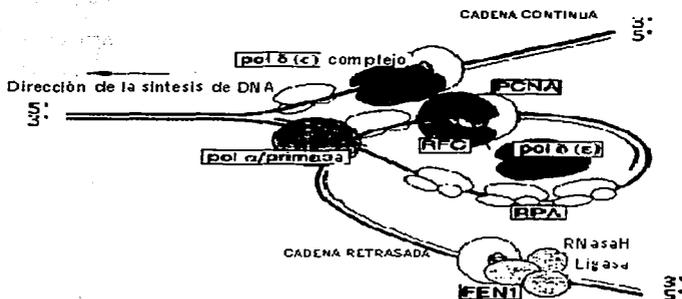


Figura 4. Modelo de una horquilla de replicación eucariótica con sitios de múltiples DNA polimerasas, situadas en la estructura hipotética de acuerdo a las explicaciones en el texto [Tsurimoto 1998].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES:

Anteriormente se ha estudiado el efecto *in vitro* de PCNA sobre la DNA polimerasa δ en eucariotes, observándose que PCNA estimula la actividad de esta polimerasa sin requerir la presencia de RFC; sin embargo, algunos reportes indican que para que haya un estímulo de PCNA hacia la DNA polimerasa δ se requiere de RFC [Zhang y Hurwitz, 1999, Tsurimoto y Stillman 1990, 1991 a y b; Tsurimoto et al. 1990, Zhang et al. 1998]. Acerca de PCNA y su interacción con las DNA polimerasas en plantas se sabe poco; existen reportes en donde se muestra que PCNA estimula la actividad de la DNA polimerasa δ en un sistema diferente al que proviene PCNA. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto de PCNA de timo de ternera sobre la pol δ de trigo y el de PCNA de arroz sobre la DNA polimerasa δ de humano [Laquel et al. 1993, Matsumoto et al. 1994], pero no hay hasta el momento ningún reporte en donde se muestre esta interacción en el mismo sistema en plantas.

En este grupo de trabajo se ha estudiado a PCNA de maíz y se determinó que existen dos genes que codifican para esa proteína [López et al. 1997]. La secuencia del marco de lectura abierta en ambos genes es virtualmente idéntica y sólo difiere en las regiones 3' y 5' no traducibles. El cDNA de uno de estos genes ha sido clonado en el vector de expresión pPROEX HTb (Gibco-BRL), utilizando las enzimas de restricción Bam HI y HindIII y la correspondiente proteína fue sobre-expresada. Este vector de expresión agrega seis histidinas en la región amino terminal de la proteína recombinante, lo cual facilita su purificación, debido a que las histidinas se unen coordinadamente al níquel de una columna de Ni-NTA que es utilizada para su purificación. Se cree que estas histidinas no afectan la funcionalidad de la proteína, aunque esto está por corroborarse. La proteína recombinante

se usó para obtener anticuerpos con los cuales se ha logrado determinar la ontogenia de PCNA durante la embriogénesis y la germinación del maíz. PCNA se encuentra presente durante las primeras etapas de embriogénesis y su cantidad decae a niveles muy bajos durante la maduración de la semilla; los niveles de PCNA se incrementan nuevamente durante la germinación. En plantas poco se sabe acerca de los complejos proteicos que forma PCNA; este grupo de investigación ha reportado que PCNA se asocia a una proteína tipo ciclina D, pero sólo durante las primeras horas de germinación [Herrera et al. 2000]; también, ha observado que PCNA interacciona con dos proteínas del tipo CDK (cyclin-dependent kinase; por sus siglas en inglés) con pesos aproximados de 32 y 36 KDa respectivamente, las cuales se piensa que son del tipo CDK-A pues contienen el dominio PSTAIRE en su secuencia primaria, típico de estas proteínas; se observó que ambas proteínas fosforilan tanto a la Histona H1 como a la proteína del retinoblastoma de maíz [Sánchez et al. 2002].

Otro motivo de estudio en este grupo es el metabolismo del DNA durante la germinación del maíz y PCNA se ha convertido en una proteína clave. Se ha estudiado el efecto de PCNA de maíz sobre dos DNA polimerasas de maíz que se conocen como 1 y 2. Se ha reportado que la DNA pol 2 de maíz es una DNA polimerasa del tipo α por el comportamiento observado durante los ensayos que se hicieron; también se reportó que la DNA pol 1 podría ser del tipo δ ya que fue ligeramente estimulada por PCNA [Garcla et al. 1997]; sin embargo, no se han optimizado las condiciones a las cuales PCNA estimula a la DNA pol 1 de maíz. Por otro lado, PCNA en las mismas concentraciones inhibía la actividad de la DNA pol 2. Estos ensayos se realizaron utilizando DNA activado y moldes de poli (dA)-oligo (dT₁₂₋₁₈).

HIPOTESIS:

El PCNA recombinante de maíz estimulará la actividad tanto de la DNA polimerasa δ de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), como de la DNA polimerasa I de maíz, demostrando así que la polimerasa de maíz es de tipo δ .

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Estudiar el efecto del PCNA recombinante de maíz sobre la actividad de la DNA pol δ de maíz.

OBJETIVO PARTICULAR:

- ❖ Sobre-expresar y purificar a PCNA de maíz.
- ❖ Generar anticuerpos dirigidos contra PCNA de maíz.
- ❖ Determinar la composición (monómero, dímero, trímero o multímero) de PCNA de maíz mediante cromatografía de exclusión molecular y/o con geles nativos.
- ❖ Determinar el efecto de PCNA de maíz sobre la actividad de la DNA pol δ de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), enzima utilizada como control de nuestra polimerasa tipo δ .
- ❖ Determinar el efecto de PCNA de maíz sobre la actividad de la DNA polimerasa tipo δ de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Para preparar el gel separador se mezclan 3.98 mL de una solución Acrilamida: bisacrilamida 30:08, 5 mL de buffer Tris pH 7.8 (0.75 M + SDS 02%), 50 μ L de persulfato de amonio 10% (iniciador), 5 μ L de TEMED (catalizador) y agua para completar un volumen final de 10 mL, se vierte esta solución en el molde y se deja polimerizar el gel. Mientras tanto, se prepara una mezcla con 05 mL de una solución Acrilamida: bisacrilamida 30:08, 1.5 mL de buffer Tris pH 7.8 (0.75 M + SDS 02%), 15 μ L de persulfato de amonio 10% (iniciador), 1.5 μ L de TEMED (catalizador) y agua para completar un volumen final de 3 mL para el gel apilador. Una vez polimerizado el gel separador, se coloca el peine con los pozos requeridos y se vierte la solución del gel apilador en el molde. Al término de la polimerización, el gel se coloca en la cámara de electroforesis donde se le añaden 700 mL del buffer de electrodos 0.7X (ver pie de página). Las muestras que se van a analizar por electroforesis se preparan mezclando 5 μ L del buffer de carga (Tris-HCl pH=6.8 100 mM, DTT 200 mM, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%) con 15 μ L de cada muestra, se calienta por 5 min a 95°C y se colocan en los pozos correspondientes. Uno o dos pozos deben contener las proteínas de pesos moleculares conocidos (marcadores) (BioRad o Gibco). El gel se corre a 100 voltios durante 90 min aproximadamente.

Pie de página: La preparación del buffer de electrodos a 10X requiere de disolver 30.2 g de Tris-base, 188 g de glicina y 100 mL de SDS 10% en 600 mL de agua, posteriormente, esta solución se afiora a 1 L.

WESTERN BLOT

Se realiza una electroforesis en gel (SDS-PAGE) con las muestras seleccionadas para posteriormente transferirlas a una membrana de Immobilon. Para la electrotransferencia, sobre el ánodo del aparato, LKB Bromma 2301 (parte inferior), se colocan 6 papeles Whatman 3MM del mismo tamaño del gel, se pone la membrana de Immobilon recortada al mismo tamaño, se coloca el gel y finalmente se ponen otros 3 papeles Whatman 3MM. Todo esto debe humedecerse previamente en la solución de transferencia (25 mM Tris-Cl pH 8.3, 190 mM Glicina y 20% metanol). Por último se coloca el cátodo y se deja transferir a 75 mA durante 1 h. Después de haber transcurrido este tiempo, se incuba la membrana de Immobilon con 10 mL de la solución de bloqueo (PBS 1X (ver pie de página), leche en polvo 5%, Tween 20 a 0.5%) durante 1 h. Se desecha esta solución y se agrega el primer anticuerpo (ver pie de página) mezclado con 10 mL de la solución de bloqueo dejándose en agitación durante toda la noche a 4°C, o bien a temperatura ambiente por dos horas. Una vez que la membrana se ha incubado con el primer anticuerpo, se lava con el amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X por 15 min dos veces e intermedio a estos lavados se hace otro lavado durante 15 min con PBS 1X + NaCl 0.5 M. La membrana se incuba con el segundo anticuerpo (anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa alcalina) por una hora a temperatura ambiente. Para evitar inespecificidad del segundo anticuerpo, después de la incubación se lava 3 veces con PBS 1x por 15 minutos.

Pie de página: Para preparar 500mL del amortiguador salino de fosfatos (PBS) a una concentración 10X se hace lo siguiente: se pesan 40g de NaCl, 1g de KCl, 13.6g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a esto se le agrega agua desionizada hasta un volumen aproximado de 400mL, se ajusta el pH a 7.4 y se afora con agua desionizada hasta el volumen final; finalmente la solución se esteriliza. La metodología antes mencionada se realizó en las mismas condiciones tanto para el anticuerpo α -PCNA (1:3000) como para el anticuerpo α -Histidinas (1:2500).

La identificación de las proteínas se realiza con el sistema de quimioluminiscencia ECL Amersham, se expone la película de rayos X por 3 min sobre la membrana, finalmente se sumerge la película en las soluciones de revelado y fijado Kodak GBX diluidas siguiendo las instrucciones del fabricante para visualizar las bandas, el tiempo de exposición de la película sobre la membrana puede ser variable desde 30 seg hasta 10 min.

TINCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL GEL CON AZUL DE COOMASIE

Se añade al gel la solución de azul de Coomassie (Coomassie G25 0.05%, HClO₄ 5.18%) y se deja en agitación por 20 min. Pasado este tiempo se elimina el colorante y se le agrega metanol 50% y se deja destiñendo hasta que se observen las bandas de interés.

INDUCCIÓN DE PCNA

Se aíslan colonias de células transformadas de *Escherichia coli* cepa BL21DE3 con el plásmido que contiene el gene para PCNA [Herrera et al. 2000]. Esta cepa permite una alta eficiencia de transformación y es comercializada por diferentes compañías; además, es deficiente en las proteasas OmpT y Lon con lo cual se disminuye la proteólisis de proteínas recombinantes. Esta cepa es utilizada para provocar altos niveles de expresión de genes clonados en vectores que contienen al promotor del bacteriófago T7 (p.e., las series pET). En este caso el vector utilizado es el pPROEX HTb. El gen del bacteriófago T7 que codifica para la RNA polimerasa fue llevado al bacteriófago λDE3, que está integrado al cromosoma de BL21 [Maniatis 1989]. Se toma una colonia aislada y se inocula en medio LB

líquido con 50 μg de ampicilina por μL de medio. Se incuba durante 12 h a 30°C. Al término de este tiempo se toman 1.5 mL del cultivo anterior y se transfieren a 1 L de medio nuevo con ampicilina. Se incuban por 2.5 h a 30°C para que se reproduzcan las bacterias. Se le agrega β -isopropil tiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM con el fin de inducir la transcripción del gene en cuestión. Se incuba el cultivo por 4 h a la misma temperatura y al finalizar se centrifugan las bacterias por 10 min a 5000 rpm a 4°C y finalmente se congelan a -70°C (de esta manera pueden ser almacenadas por un par de días).

Las células obtenidas se resuspenden en 20 mL de amortiguador de lisis (Tris pH=8.5 50mM, β -mercapto etanol 10 mM). Se adicionan 80 mg de lisozima y una tableta de inhibidores de proteasas y se deja incubar 1 h a 4°C, con agitación. Posteriormente, las células se sonicán a 25 Hz por periodos de 15 seg, dejando reposar unos cuantos segundos entre cada tiempo, hasta completar 2 min. Se centrifugan dos veces a 10000 rpm por 15 min a 4°C. Las proteínas solubles que serán purificadas se localizan en el sobrenadante.

AISLAMIENTO DE PCNA DE MAÍZ DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

PCNA se almacena en cuerpos de inclusión, gránulos que no están unidos por una membrana formados por las células durante la inducción con IPTG; estos cuerpos se hallan en el pellet residual de la inducción. Para purificar a PCNA el pellet se resuspende en 10 mL de buffer A (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 8.0), con lo cual se desnaturalizan todas las proteínas existentes, el lisado se centrifuga a 12000 rpm por 25 min y se colecta el sobrenadante; se equilibra la columna de níquel con 2 mL del buffer A.

previamente empacada, con ayuda de la bomba peristáltica haciendo pasar la solución a un flujo de 2 mL/min; hecho esto, se hace pasar la muestra proteica al mismo flujo, colectando la fracción no absorbida.

La resina se lava 2 veces cada una con 5 mL de buffer B (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 6.3) o hasta que la absorbancia a 280 nm sea cercana a cero. Para eluir a la proteína se hace pasar por la resina el buffer C (8 M Urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris-Cl, pH 4.5), aproximadamente 10-15 mL, o hasta que la absorbancia a 280 nm sea aproximadamente cero. Estas fracciones se concentran en tubos Centricon 10 y se guardan a -20 °C.

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PCNA_r DE MAÍZ

De las fracciones obtenidas en la purificación de PCNA de cuerpos de inclusión, se cargan dos geles de poliacrilamida con aproximadamente 0.4-0.5 mg de proteína cada uno, con los marcadores de PM en sus respectivos carriles y se corre una SDS-PAGE, como se indica en esta misma sección; la banda del peso molecular de aproximadamente 33 KDa correspondiente a la proteína recombinante se corta del gel, cabe mencionar que en este caso la acrilamida es el adyuvante, se agrega N_2 líquido y se muele. Esto se hace hasta que las partículas sean finas y homogéneas, se resuspende entonces en 5 mL de PBS 1X y se toman aproximadamente 2.5 mL de la suspensión para inyectar subcutáneamente a cada uno de dos conejos (raza Nueva Zelanda de 2 meses con 2 Kg, cada uno) una vez por semana durante 1 mes aproximadamente o bien inoculando refuerzos durante el tiempo que sea necesario para la generación de anticuerpos. Después de 3-4 refuerzos, con concentraciones de 0.2 mg de proteína recombinante aproximadamente, se hace una sangría

de prueba, se obtiene el suero y se hace un Western Blot con muestras de PCNA positivas y negativas, probando el suero pre-inmune y el suero inmune a una concentración 1:3000 para ver si se ha generado el anticuerpo anti-PCNA de maíz; es decir, si se reconoce o no a la proteína. De no ser así, se sigue con las inyecciones hasta obtener el resultado deseado.

INMUNOPURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO

Se prepara un gel SDS-PAGE para proteínas con un peine que tenga un pocillo central continuo de 6-7 cm y uno o dos pocillos pequeños a los lados para los marcadores de peso molecular. Se aplican de 0.2-1 mg de PCNA de maíz. El gel se transfiere a Immobilon y se tiñe reversiblemente con rojo de Ponceau S para detectar la banda, o bien, se hace uso de marcadores de peso molecular preteñidos, los cuales al hacer la transferencia del gel a Immobilon pueden visualizarse. Se recorta la banda y se coloca en un tubo con tapón hermético de 10-15 mL. Se bloquea con 2 mL de PBS 1X (1 hora a temperatura ambiente) agitando en posición horizontal en una plataforma basculante. Se toman de 0.5-1 mL de suero y se incuba con la tira de Immobilon durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Se lava 5 veces (5 minutos cada una) con 5 mL de PBS 1X y se aspira bien todo el líquido con una micropipeta de 1 mL, se eluye el anticuerpo purificado con 0.5 mL de medio de elusión (glicina 0.2M pH =2.7); tras incubar 15 minutos para eluir el anticuerpo, se neutraliza con Tris- base (aproximadamente 25 μ L de Tris 2M por cada 0.5 mL de suero inmune, comprobando el pH con una alícuota del medio de elusión). El anticuerpo purificado puede guardarse en alícuotas. Finalmente, se añade glicerol para que quede al 50% final y así no se congele a -20°C.

PURIFICACIÓN DE PCNAr DE MAÍZ

Preparación de la resina de Ni-NTA: esta resina contiene níquel, el cual es un catión que forma un complejo de coordinación con las histidinas que contiene la proteína recombinante en su extremo amino y nos ayuda a que la purificación sea más eficaz. Las histidinas tienen un grupo imidazol que se une fuertemente al níquel, logrando así que la proteína recombinante se una fuertemente a la resina. Posteriormente, se agrega un amortiguador que contiene una concentración elevada de imidazol y este grupo compite con el imidazol propio de las histidinas, desplazándolo para liberar a la proteína recombinante.

La resina de Ni-NTA es equilibrada con buffer de acoplamiento (Tris 20 mM pH=8.5, KCl 100 mM, β -mercapto etanol 5 mM, glicerol 10%). Se toma aproximadamente 1 mL de la resina y se resuspende en el buffer, después se empaqueta en una jeringa a la cual previamente se le ha colocado un poco de pelo de ángel y papel filtro, se conecta la columna a una bomba peristáltica y se pasan 5 mL del buffer cuidando que no queden burbujas de aire en la manguera y en la columna; el sobrenadante obtenido de la inducción que contiene a las proteínas solubles se hace pasar por la columna a un flujo de 2 mL/min. a continuación se lava la resina con 10 mL del buffer de acoplamiento. Posteriormente, se realizan 3 eluciones de 10 mL cada una con el buffer de acoplamiento, pero conteniendo 20, 50 y 100 mM de imidazol respectivamente. Finalmente se hace una elusión con el buffer conteniendo 250 mM de imidazol. Las fracciones obtenidas se guardan a -20°C . Estas fracciones se concentran en tubos Centricon 10 y se guardan a -20°C .

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS O NO DESNATURALIZANTES

El gel separador se prepara mezclando 2 mL de buffer A (acrilamida: bisacrilamida 30:0.8), 2 mL de buffer B (Tris-Cl pH 8.9, TEMED 0.23%) y 4 mL de buffer C (persulfato de amonio 0.15%), esta mezcla se vierte en el molde previamente ensamblado y se colocan 0.5 mL de agua en la parte superior para linearizar el borde superior del gel separador. El gel apilador se prepara mezclando 2 mL de buffer D (acrilamida: bisacrilamida 5:1.25), 2 mL de buffer E (Tris- H_3PO_4 pH 7.3, TEMED 0.25%), 0.5 mL de buffer C y 0.5 mL de agua, esta mezcla se vierte en el molde y entonces se coloca el peine con los pozos requeridos cuidando de no formar burbujas de aire. Cuando el gel ha polimerizado se coloca en la cámara de electroforesis en donde se le añaden 700 mL de buffer de electrodos 0.7X (ver pie de página). Las muestras que se analizarán con la electroforesis se preparan adicionando 5-20 μ L de amortiguador de carga (1.25 mL de buffer E + 0.375 mL glicerol + 50 μ L de azul de bromofenol 1% y se afora a 5 mL). Se cargan 5-7 μ L de marcadores de PM para geles nativos (Amersham Pharmacia Biotech). La electroforesis se corre a 100 voltios por media hora o hasta que las muestras entren al gel separador, entonces el voltaje se incrementa a 150 voltios por 2 horas más aproximadamente.

Pie de página: La preparación del buffer de electrodos a 10X requiere de disolver 30.2 g de Tris-base y 188 g de glicina en 600 mL de agua, posteriormente, esta solución se afora a 1 L.

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PCNAr DE MAÍZ MEDIANTE LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN HPLC

Esta metodología se llevó a cabo en las siguientes condiciones: se preparó un buffer que contenía Tris 20 mM pH=8.5, KCl 100 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10%, se utiliza este buffer para no variar las condiciones en las cuales se tiene a la proteína recombinante pura; se equilibra la columna Superdex 200 HR 10/30 con 20 mL de este buffer en un cromatógrafo con las siguientes características (Waters 6000S Controller, Waters 996 Photodiode Array Detector, Waters 626 Pump), después se pasan por la columna los marcadores de peso molecular diluidos en el mismo buffer (Tiroglobulina 670 KDa, Gama globulina bovina 158 KDa, Ovoalbúmina 44 KDa, Mioglobulina 17 KDa y Vitamina B12 1.35 KDa) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; después de haber hecho esto, la columna es nuevamente equilibrada con aproximadamente 20 mL del buffer con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, enseguida se carga la muestra (aproximadamente 200 μ L \cong 0.12 mg de proteína recombinante) a la misma velocidad de flujo y se colectan las fracciones, una por minuto, hasta que pase toda la muestra, o sea, el mismo tiempo aproximadamente que se tardaron en pasar los marcadores de peso molecular.

PURIFICACIÓN DE LAS POLIMERASAS EN FPLC

La purificación tanto de la DNA polimerasa de levadura como de la DNA polimerasa de maíz se hicieron en forma separada en un FPLC Pharmacia LKB- Pump P-500.

Purificación de la DNA polimerasa δ de levadura [Bauer 1988].- Todos los pasos se realizan entre 0-4°C. Las levaduras (*S. cerevisiae*) se incubaron a 30°C hasta que se tuviera una densidad óptica de 0.8 a 660nm, de acuerdo al protocolo, estas fueron donadas generosamente por la M. en C. Norma Sánchez del Instituto de Fisiología celular de la UNAM. Las células se concentraron y se resuspendieron en un buffer de resuspensión (0.2 M Tris-Cl pH=8.1, 4mM EDTA, 10% de glicerol, una tableta con cóctel completo de inhibidores de proteasas marca Roche, 4 mM de benzamidina y 6 mM de DTT). Las células se rompieron usando el aparato BEAD-BEATER Biospec Products con perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro, a máxima potencia por 4 ocasiones con una duración de 1 minuto cada una; ésto se conservó a 4°C con hielo para poder transportarlas y seguir trabajando con este lisado. Por cada litro de lisado se adicionaron 47 mL de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ agitando, seguido de 45 mL de Polimin P, entonces la mezcla se agita durante 10 minutos. Las células no lisadas, la pared celular, mitocondrias y el DNA precipitado se separa por centrifugación a 25000 g por 1 hora y se separa en el pellet. Al sobrenadante se le agregan aproximadamente 150 mL de buffer PC (50 mM KH_2PO_4 , pH=7, 10% de glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT y 2 mM de benzamidina). Esto se dializa por 4 horas en aproximadamente 2 L de buffer PC con KH_2PO_4 a una concentración de 10 mM, seguido de 8 horas de diálisis en 2L del mismo buffer, pero conteniendo 25 mM de KH_2PO_4 , esta es la fracción 1. La columna de DEAE-Sephacel (volumen 30 mL) se equilibra con 300 mL de buffer DE (25 mM KH_2PO_4 a pH=7, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA, 5 mM DTT y 2 mM

de benzamidina), entonces la fracción 1 se carga a la columna dejando a reflujo por 2 horas a un flujo de 1 mL/ min.

La proteína se eluye con un gradiente lineal de KCl que va de 0- 500 mM de KCl en buffer DE. El flujo en el cual se eluye la proteína es el mismo de 1 mL/ min.

La actividad de polimerasa se mide a las fracciones, utilizando como molde el DNA activado (revisar la sección del ensayo de polimerasa). Por lo reportado en esta bibliografía [Bauer 1988], después de este paso de purificación se obtienen 3 picos correspondientes a pol δ (pico 1), pol α (pico 2) y pol ϵ (pico 3). En los ensayos para observar el efecto de PCNAr de maíz sobre la DNA pol ϵ , se colectaron las fracciones correspondientes al pico 3 y esto fue lo que se utilizó para dicho experimento.

Se colectan las fracciones del primer pico y ésto se toma como la fracción 2. La muestra se pasa por una columna de Heparin-Sepharose que es previamente equilibrada con 150 mL de buffer HEP (25 mM KH_2PO_4 a pH=7, 10% glicerol, 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM EDTA, 3 mM DTT y 2 mM de benzamidina). La columna se lava con aproximadamente 100 mL de buffer HEP y la proteína se eluye con un gradiente lineal de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que va de 25- 600 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en buffer HEP. Se mide la actividad de polimerasa de igual manera utilizando como molde DNA activado, las fracciones que tienen o presentan mayor actividad se mezclan y se guardan a -20°C para su conservación y posterior uso en los ensayos de actividad con PCNAr de maíz.

Purificación de la DNA polimerasa δ de maíz. - Se extraen 40 ejes embrionarios a mano de semillas de maíz, (*Zea mays* L.) variedad Chalqueño con un 95% de viabilidad, los ejes embrionarios se aíslan 3 a 4 horas previamente a su uso. Se preparan y esterilizan los siguientes buffers: buffer de imbibición (50 mM Tris-Cl pH=7.4, 50 mM KCl y 10 mM $MgCl_2$); buffer de homogenización (40 mM de Tris-Cl pH=7.6, 40 mM de KH_2PO_4 , 15 mM KCl y 1 mM de β -mercaptoetanol). Las condiciones en que se manejan los ejes embrionarios deben ser estériles, así como los recipientes en donde se depositarán. Los 40 ejes se colocan en toallas sanitarias esterilizadas humedecidas en buffer de imbibición y esto a su vez se coloca en una caja petri previamente esterilizada. Los ejes en estas condiciones se colocan en una incubadora a 25°C por el tiempo que se requiera poner a germinación, en este caso fueron 24 horas. A continuación, todo el proceso se lleva a cabo conservando una temperatura de entre 0-4°C; esto es muy importante para la conservación de la enzima y en parte para evitar la proteólisis. Los ejes embrionarios son molidos en un mortero con pistilo perfectamente limpio, agregando poco a poco y triturando los ejes con 2-3 mL de buffer de homogenización hasta la desaparición de grumos en la mezcla. Esta mezcla es entonces centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colecta y se centrifuga nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos; con esto se eliminan los restos celulares y los lípidos. Este sobrenadante es centrifugado a 100,000 g durante 1 hora, el sobrenadante contiene a las enzimas y es el que se utiliza para los ensayos de actividad de polimerasa.

Para poder cargar una cantidad adecuada de proteínas a la columna y obtener en mayor proporción a la enzima (pol δ), el extracto total se hizo a partir de 5 g de ejes para llevar a cabo el siguiente paso de purificación. El extracto total es cargado en una columna de

DEAE-Sephacel (1.6 cm x 15 cm) previamente equilibrada con buffer PD (KH_2PO_4 pH=7.5 40 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20% y una tableta de inhibidores de proteasas). La columna es lavada con el mismo buffer hasta que no se detecta ninguna proteína a una absorbancia de 280nm. Las proteínas son eluidas con un gradiente lineal de 40-400 mM de KH_2PO_4 en el mismo buffer. Se detectan 3 picos con actividad de DNA polimerasa. El primer pico, que corresponde a la DNA pol. 1 o δ eluye en el volumen de lavado, la DNA pol 2 o α eluye a una concentración de alrededor de 120 mM de KH_2PO_4 , correspondiente al segundo pico y se sugiere que el tercer pico, DNA pol 3, podría corresponder a la pol β , la cual eluye a una concentración de alrededor de 220 mM de KH_2PO_4 [Garcla et al. 1997].

ENSAYO DE DNA POLIMERASA UTILIZANDO DNA ACTIVADO O polidA-oligodT₁₂₋₁₈ COMO MOLDES

En el caso de la reacción con DNA activado, éste se lleva a cabo en un volumen final de 100 μL con un buffer que contiene: Tris-HCl 50 mM pH=7.6, KCl 15 mM, MgCl_2 8 mM, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 0.4 mM, DNA activado de timo de ternera: 10 μg , ATP 1mM, nucleótidos dGTP, dCTP, dATP, 0.1 mM/ cada uno, PCNA a diferentes concentraciones (dependiendo del ensayo): [^3H -metil]-dTTP 5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ y 20 μg de proteína total de la fracción con actividad. El DNA activado se preparó como se reporta en [Vázquez y Vázquez-Ramos 1988]

La reacción con polidA₃₀₀₀-oligodT₁₂₋₁₈ se lleva a cabo en un volumen final de 100 μL con un amortiguador que debe contener: Tris-HCl 50 mM pH=7.2, $(\text{AcO})_2\text{Mg}$ 12.5 mM, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 0.4 mM, polidA-oligodT₁₂₋₁₈ 10 μg , PCNA a diferentes

concentraciones (dependiendo del ensayo), [³H-metil]-dTTP 6 μ Ci/ mL, albúmina sérica bovina 40 μ g/ mL y 20 μ g de proteína total.

En ambos casos, la mezcla de reacción se preincuba por 15 minutos a 37°C con la cantidad correspondiente de PCNA, posteriormente a esta mezcla se le agregan 5 μ L de la enzima y se incuba a 37°C durante 30 min; la reacción se detiene con 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 4°C, posteriormente el precipitado se filtra al vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, los cuales se lavan primero con 5 mL de TCA al 2% y luego con 1 mL de etanol al 96%; estos filtros se secan en estufa a 70°C durante 15 min y posteriormente se colocan en frascos viales que contienen líquido de centelleo (0.1 g de 2,2'-p-fenilen-bis(5-feniloxazol) + 5 g de 2,5-difeniloxazol disueltos en 1L de tolueno); la radioactividad insoluble en TCA es cuantificada como cpm (cuentas por minuto) en un contador de centelleo Beckman LS 6000. Una unidad de actividad enzimática equivale a un picomol (pmol) de dTMP incorporado al DNA (cpm insoluble en TCA=23209) durante 30 minutos a 37°C.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE PCNA_r DE CUERPOS DE INCLUSIÓN Y GENERACIÓN DE ANTICUERPOS.

Durante la inducción de PCNA se observó que la mayor parte de la proteína recombinante se quedaba en los cuerpos de inclusión, por lo que se decidió seguir una metodología para purificarla y así intentar generar anticuerpos contra esta proteína, para identificarla en ensayos futuros. Ya que la proteína que puede obtenerse de los cuerpos de inclusión es proteína desnaturalizada y por lo tanto no funcional, no sería útil para realizar los ensayos de actividad de Polimerasa.

Después de intentar purificar a PCNA_r de maíz de los cuerpos de inclusión, en varias ocasiones, se obtuvieron las condiciones adecuadas para llevar a cabo este proceso, el cual se hizo de la siguiente manera: se prepararon todos los buffers cuidando que permanecieran al pH indicado; se colectaron fracciones de 2 mL tanto de los lavados como de las fracciones eluidas hasta que la absorbancia fuera cercana a cero a 280 nm; en la figura 5 se muestra el inmunoreconocimiento de la proteína recombinante utilizando el anticuerpo α -PCNA previamente obtenido en el laboratorio.

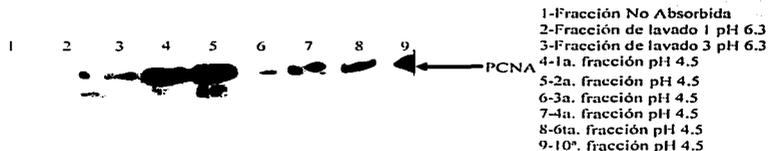


Figura 5 Western Blot, inmunoreconocimiento con el anticuerpo α -PCNA de maíz previamente obtenido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En esta purificación se logró separar mejor a la proteína de interés, ya que la mayor parte de esta proteína se obtuvo en las primeras fracciones (figura 5, carriles 4 y 5), aunque en las fracciones posteriores se siguió obteniendo proteína de interés (figura 5, carriles 6 al 9); en esta purificación se obtuvo proteína en los volúmenes de lavado y casi no se obtuvieron proteínas contaminantes. Por lo anterior, se consideró que tal vez no era tan importante obtener a la proteína totalmente pura, ya que para inyectarla a los conejos, se podría hacer un gel SDS-PAGE, se cortaría la banda correspondiente a la proteína recombinante y a su vez ésta se inyectaría a los conejos para obtener el anticuerpo, tal y como se menciona en la sección de materiales y métodos. Las fracciones que se mezclaron corresponden a todas las eluciones (carriles 4-9), la que se concentró en tubos Centricon 10.

Como la proteína obtenida no era suficiente para inyectar a los conejos semanalmente durante las cuatro semanas, se realizó una purificación más de la proteína recombinante. Para la siguiente purificación de PCNA de cuerpos de inclusión se utilizó la misma resina que para la purificación anterior, después de haber sido regenerada. De esta última purificación, tampoco se obtuvo totalmente pura a la proteína, pero como se ha mencionado, esto ya no era importante, ya que se cortaría la banda de un gel SDS-PAGE. De esta purificación se mezclaron las fracciones a partir de la primera elución y se concentraron en tubos Centricon 10.

Toda la proteína que se obtuvo de estas purificaciones se concentró en tubos Centricon 10 a 5000 rpm hasta obtener aproximadamente 1-2 mL de concentrado, esto se cargó a los geles de poliacrilamida en 5 ocasiones diferentes, con el criterio de cargar aproximadamente 0.5 mg de proteína total repartíendola en dos geles y posteriormente cortar las bandas correspondientes a la proteína recombinante, para poder inyectar la proteína a los conejos y

así generar los anticuerpos. Este criterio se basó en la lectura que se registró de las fracciones ya concentradas en el espectrofotómetro y se consideró que cada unidad de absorbancia era equivalente a 1 mg de la proteína. En la primera purificación se obtuvieron aproximadamente 2 mL de muestra concentrada con una absorbancia de 1.5; en la segunda purificación se obtuvieron 1.5 mL de muestra concentrada con una absorbancia de 1.62. Los conejos, identificados como 1 y 2 se inyectaron en 5 ocasiones; la primera inyección fue de 2 mL para cada uno de los conejos y las otras 4 inyecciones de 3 mL cada una; se inyectaron una vez por semana y antes de aplicar la primera inyección se les extrajo un poco de sangre para obtener el suero pre-inmune y posteriormente tomarlo como referencia. A la sexta semana de haber comenzado con las inyecciones se hizo una sangría de prueba y los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

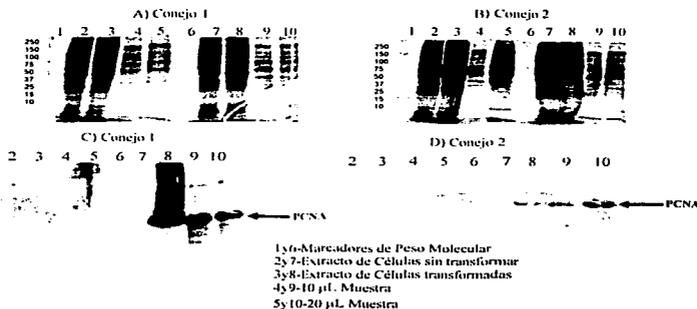


Figura 6. Generación de anticuerpos α -PCNA de maíz en dos conejos, a partir de PCNA de cuerpos de inclusión. A y B) Gel SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie; C y D) Western Blot, carriles 1-5 suero preinmune, carriles 6-10 suero inmune.

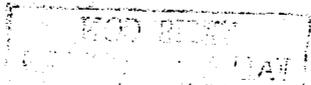
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los carriles 1 y 6 corresponden a los marcadores de peso molecular y no contienen PCNA; los carriles 2 y 7 corresponden a un extracto de células sin transformar, es decir, que no contienen el plásmido con el gen de PCNA y por lo tanto no se expresa esta proteína; los carriles 3 y 8 contienen un extracto de células transformadas con el plásmido que contiene el gen de PCNA de maíz y los carriles 4, 5, 9 y 10 son muestras a diferentes concentraciones de PCNA purificado. Cabe señalar que para este ensayo, después de hacer la transferencia del gel a la membrana de Immobilon, ésta fue cortada a la mitad para poder incubar con los diferentes sueros (preinmune, carriles 1-5 e inmune, carriles 6-10) cada una de las mitades de la membrana y al momento de revelar se volvieron a juntar para no desperdiciar más película de revelado de la necesaria.

Con el suero inmune del conejo 2 se reconoce únicamente a la proteína de interés (figura 6D, carriles 8, 9 y 10) y en el caso del suero inmune del conejo 1, se reconocen algunas bandas más, además de la proteína de interés (figura 6C, carriles 8, 9 y 10). Como ya se ha mencionado, estos carriles corresponden a muestras que contienen a PCNA de maíz. En el suero preinmune de los dos conejos (figuras 6C y 6D, carriles 1-5) no se reconoce ninguna banda, lo cual nos indica que no había anticuerpos generados por ninguno de los conejos contra proteínas de *E. coli* ni contra PCNA.

Para poder utilizar con mayor confianza este anticuerpo decidimos inmunopurificarlo, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos; esta inmunopurificación nos sirvió para eliminar las proteínas que se reconocían con el suero inmune del conejo 1, ya que de este suero fue del que se tomó para hacer dicha purificación.

El título del anticuerpo que se utilizó para incubar las membranas fue de 1:3000 (anteriormente se había manejado el título de 1:1500 para otro anticuerpo α -PCNA [Herrera



et al. 2000]), ya que se obtuvo una buena señal; aun así, se realizaron varios ensayos de Western Blot con proteína recombinante para obtener el título del anticuerpo probando varias diluciones, 1:500, 1:2500, 1:5000 y 1:10000. En estos ensayos se observó que el anticuerpo seguía reconociendo a la proteína recombinante aún en la dilución 1:10000; el mejor título, es decir, la dilución del anticuerpo a la cual se observaban bandas más nítidas, era la dilución 1:2500, por lo que se decidió utilizar una dilución 1:3000 para ensayos futuros; estos datos no se muestran.

Otro de los parámetros que teníamos que cuidar para validar este anticuerpo era confirmar si éste reconocía únicamente al PCNA de maíz, pues en los ensayos anteriores las muestras cargadas pertenecían a extractos proteicos de la bacteria transformada o de la proteína purificada, pero no de extractos de maíz. El título que se utilizó en los ensayos para verificarlo fue también de 1:3000. En la figura 7 se muestran los resultados de la validación de este anticuerpo:

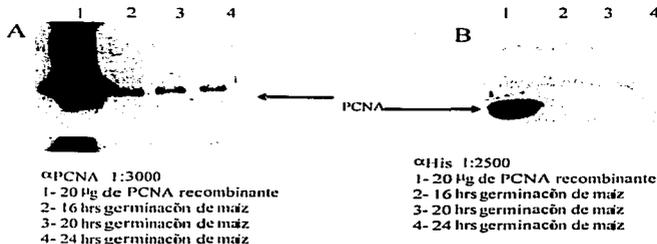


Figura 7. Validación del anticuerpo inmunopurificado.

- A) inmunoreconocimiento por el anticuerpo α -PCNA de maíz. B) inmunoreconocimiento por el anticuerpo α -Histidinas.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

En el primer carril de la figura 7A, que contiene proteína recombinante, se observa un barrido, el cuál podría significar formación de agregados que no se alcanzan a disgregar con SDS, quizá debido a un exceso de proteína cargada. En la misma figura, en los carriles 2-4, el anticuerpo generado reconoce sólo una banda por carril; cabe señalar que en estos carriles los ensayos se realizaron utilizando como muestra proteica extractos de maíz. Esto nos indica que el anticuerpo sólo reconoce a PCNA de maíz, ya que no se aprecia ninguna otra banda.

PCNA de maíz se caracteriza por tener en uno de sus extremos una cola de histidinas; esta cola puede ser también reconocida por un anticuerpo dirigido específicamente hacia ese péptido, con el uso de un anticuerpo α -Histidinas en los ensayos de Western Blot. En la figura 7B se reconoce solamente una banda (carril 1) correspondiente a la proteína recombinante; en los carriles 2-4 no se reconoce ninguna banda dado que se trata del extracto proteico de maíz; cabe mencionar que este Western Blot se realizó al mismo tiempo y en las mismas condiciones que el Western Blot de la figura 7A, con la única diferencia de que la membrana de este ensayo se incubó con el anticuerpo α -Histidinas. Lo que se demuestra con este Western Blot es que la proteína reconocida es PCNA de maíz, pues es la única proteína en los extractos que contiene esa cola de histidinas.

PURIFICACIÓN DE PCNAr DE MAÍZ.

Para cumplir con otro de los objetivos de este proyecto, se comenzó a purificar PCNAr de maíz, el cual como se ha mencionado, está clonado en una cepa de *E. coli*. Para las purificaciones se utilizó 1-2 mL de resina Ni-NTA, la que fue empacada en una jeringa para poder hacer pasar las muestras; a su vez, la jeringa se conectó a una bomba peristáltica con la que se hacían pasar las muestras siguiendo la metodología mencionada en la sección de materiales y métodos. Inicialmente, se hicieron algunos intentos por purificar a la proteína recombinante, pero prácticamente en todos estos experimentos la proteína se obtenía en los volúmenes de lavado y por lo tanto con muchas proteínas contaminantes. A continuación se muestra uno de estos resultados.

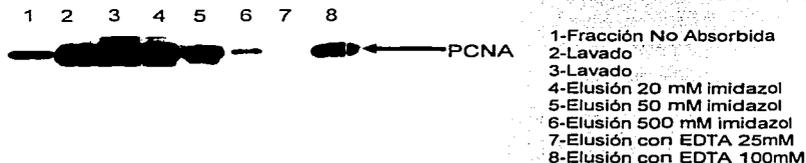


Figura 8. Intento de purificación de PCNA soluble, se muestra el Western Blot.

En la figura 8 se observa cómo gran parte de la proteína se encuentra en el volumen de lavado (carril 2 y 3), en los siguientes carriles se reconoce sólo una banda que corresponde a PCNAr.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En una segunda sobre-expresión se purificó a PCNA_r de maíz utilizando resina nueva, es decir, sin haber sido utilizada previamente. Los resultados se muestran en la figura 9.

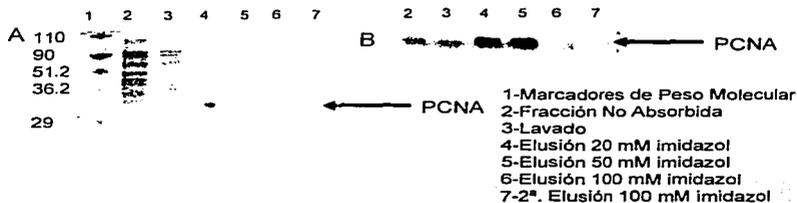


Figura 9. Purificación de PCNA soluble, se muestra el gel (A) y la película del Western Blot (B).

Como se observa en la figura 9, la proteína se purificó razonablemente bien y en buena cantidad; esto se debió a que se utilizó resina nueva, aunque se observan algunas bandas correspondientes a proteínas contaminantes (carriles 2-4). De esta purificación se mezclaron 3 fracciones de 5 mL cada una (carriles 4-6) ya que como se muestra en la figura 9B, estos carriles corresponden a las fracciones con PCNA que casi no presentan proteínas contaminantes. Este volumen se concentró en tubos Centricon 10 hasta un volumen aproximado a los 2 mL. Al ver los resultados obtenidos con estas condiciones se decidió hacer una sobre-expresión más con su correspondiente purificación, pero haciendo más lavados y eluciones.

En la purificación siguiente, figura 10, los resultados fueron más satisfactorios, ya que se pudo obtener a la proteína en mayor cantidad, aunque todavía con proteínas contaminantes (carriles 7-10), esto podría deberse a que el volumen de las muestras cargadas en este gel fue mayor (30 μ L) que en el gel de la figura 9 (20 μ L), lo cual permite visualizar más proteínas ya que, por lo tanto, la concentración es mayor. Con respecto a estas bandas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

correspondientes a proteínas contaminantes del extracto bacteriano que se encuentran presentes en las eluciones (carriles 7-10), éstas podrían contener en su estructura primaria conjuntos de histidinas y por eso es que se pegan a la resina, eluyendo después junto con la proteína de interés. Esta purificación se realizó utilizando de la misma resina pero nueva, es decir, sin haberse usado previamente y a diferencia de las demás purificaciones, en esta sí se colectaron fracciones de los lavados y de las eluciones hasta que se obtuvo una absorbancia igual a cero a 280 nm. De esta purificación se mezclaron todas las eluciones (carriles 5-10) y se concentraron en tubos Centricon 10; la mitad de esta muestra se utilizó nuevamente para realizar la determinación de la composición de PCNA mediante la columna de exclusión molecular; la otra mitad de esta muestra de PCNA soluble concentrada se utilizó para hacer geles nativos, cuyos resultados se muestran más adelante.

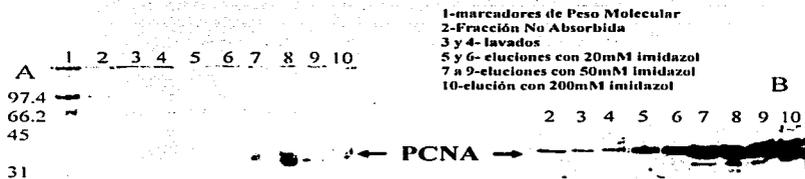


Figura 10. Purificación de PCNA soluble. se muestran el gel (A) y la película del Western Blot (B).

A partir de esta purificación se observó que éstas eran las condiciones más adecuadas para la purificación de la proteína de interés, ya que se obtenía en una buena cantidad y aunque no se obtenía totalmente pura, se pensaba que muy probablemente fuera funcional.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Se hizo una purificación más de PCNAr en la cual la proteína que se obtuvo no estaba totalmente pura, pero de acuerdo al criterio que se había tomado, era proteína que muy probablemente nos podría servir para realizar los ensayos de actividad de Polimerasa, por lo que ésta se conservó mezclando todas las eluciones y concentrándolas en tubos Centricron 10, guardándolas después a -20°C .

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PCNA_r DE MAÍZ

Se ha mencionado en la introducción que PCNA de eucariotes es una proteína en forma de anillo que consta de tres unidades de la misma proteína, un homotrímero, por lo que uno de los objetivos del proyecto fue estudiar, mediante la cromatografía de exclusión molecular y con ayuda de geles nativos, el comportamiento de la proteína recombinante, es decir, si PCNA_r de maíz, al ser sobre-expresada forma un homotrímero, un homodímero o si sencillamente se encuentra como monómero. Esta determinación se pensó hacerla mediante la cromatografía de exclusión molecular, ya que se perseguían dos objetivos con esta: purificar más a la proteína de interés y lograr separarla por su peso molecular; con esto se podría determinar el estado de asociación de PCNA, para así poder utilizar cada una de estas asociaciones por separado para ver si tenían algún efecto sobre la actividad de la DNA Polimerasa δ . Ante los problemas presentados inicialmente, al realizar esta determinación mediante la cromatografía de exclusión molecular, se optó por realizar geles nativos en los cuales también se podría tener una aproximación del estado de asociación de la proteína recombinante de maíz.

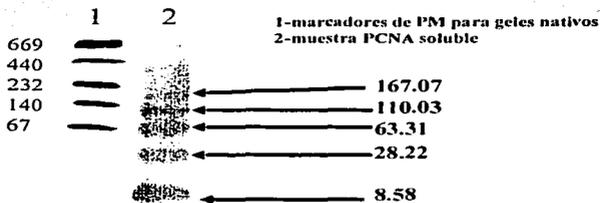


FIGURA 11. Gel Nativo, se muestra la película del Western Blot.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, ya que las bandas se visualizan con facilidad, apreciándose claramente los marcadores de peso molecular (figura 11, carril 1). Las diferentes bandas que pueden apreciarse en el carril 2, después de hacer los respectivos cálculos con ayuda de un software (Quantity One 4.2.1 de BioRad Laboratories), correspondían al monómero (28.22 KDa), dímero (63.31 KDa), trímero (110 KDa) y un multímero de aproximadamente 167 KDa, de abajo hacia arriba respectivamente. También se observó una banda de aproximadamente 8 KDa, la que podría ser un producto de degradación o bien fragmentos de la proteína ubicados en la región amino terminal, o sea, que están ligados a la cola de histidinas y que no se terminaron de sintetizar (productos truncados); también en la parte superior se observa un barrido del cual no estamos seguros de si se trata de la proteína recombinante en forma de agregados o si simplemente se había barrido la muestra, quizá por exceso de proteína cargada. En este gel también se observa que la cantidad del monómero es mayor que la del dímero y a su vez ésta es mayor que el trímero, basándonos en la intensidad de las bandas.

Uno de los objetivos del proyecto era hacer la determinación de la composición de PCNAr de maíz mediante la cromatografía de exclusión molecular, por los motivos previamente mencionados; esta se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 12 y en la tabla 2.

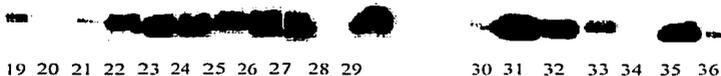


Figura 12. Western Blot del fraccionamiento de PCNAr de maíz por medio de la CEM.

Fracción	PM de PCNAr
20	964552.897
21	733668.714
22	563897.28
23	433411.07
24	333119.457
25	256035.391
26	196788.629
27	151251.608
28	116251.884
29	89351.1199
30	68675.2106
31	52783.7207
32	40569.5322
33	31181.7152
34	23966.2453
35	18420.44

Tabla 2. Peso Molecular correspondiente a cada fracción de PCNAr de maíz purificado con la CEM.

Se aprecian tres bandas intensas correspondientes a los carriles 29, 31 y 35, cada una de las cuales corresponden, aproximadamente, al trímero, dímero y monómero respectivamente, según puede notarse en la tabla 2 donde se reportan los pesos moleculares correspondientes a las diferentes fracciones, aunque, en el caso del monómero y dímero, es probable que la proteína en estas fracciones se haya barrido y por eso el tamaño no es exacto. Las bandas por encima del peso molecular esperado para el trímero podrían ser asociaciones de la proteína recombinante, es decir, multímeros (figura 12, carriles 19-27).

INTERACCIÓN DE PCNA_r DE MAÍZ CON DNA POLIMERASAS

Otro de los objetivos planteados era hacer interactuar a PCNA_r de maíz con la DNA polimerasa δ de levadura para corroborar que PCNA era funcional y que el sistema de ensayo servía de forma adecuada. Para esto era indispensable purificar a la DNA polimerasa δ . En la figura 13 puede observarse el perfil de elusión de la DNA pol δ de levadura después del primer paso de purificación, al fraccionar por DEAE-Sephacel.

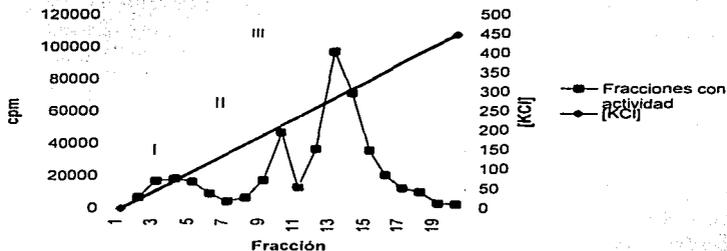


Figura 13. Purificación de la DNA polimerasa δ de levadura con la columna DEAE.

Como se observa en la figura 13, la actividad de DNA polimerasa se resuelve en tres picos de elusión correspondientes a tres diferentes polimerasas. Inicialmente, pensamos que el tercer pico era el correspondiente a la pol δ debido a que es el pico en el que se tiene la actividad más alta y por esto pensamos que se trataba de una enzima muy activa, como suelen serlo las DNA pol δ . Aunque, poco tiempo después, nos dimos cuenta de que el tercer pico era el correspondiente a pol ϵ y que el primer pico era el que corresponde a la

DNA pol δ , resultados que se muestran más adelante. Así, las enzimas estarían definidas como sigue, de acuerdo a la referencia [Bauer et al. 1988]: el primer pico corresponde a la DNA pol δ , el segundo pico a pol α y el tercer pico corresponde a pol ϵ . Habiendo realizado originalmente los ensayos con la actividad correspondiente a la DNA pol ϵ y al ver que no hubo ningún estímulo, se mezclaron las fracciones correspondientes al primer pico de purificación por la columna de DEAE-Sephacel y la proteína resultante se sometió a otro paso de purificación por medio de una columna de Heparina-Sepharsa. Los resultados de este segundo paso de purificación, ahora sí de la DNA pol δ de levadura, se muestran en la figura 14.

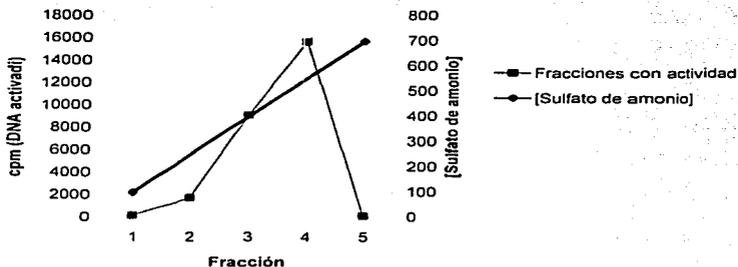


Figura 14. Purificación de la DNA polimerasa δ de levadura con la columna de Heparina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La DNA pol δ de levadura eluye en las fracciones 2-5, dando como resultado una alta actividad utilizando al DNA activado como molde. Dado que las polimerasas tipo δ utilizan eficientemente templados artificiales como el polidA- oligodT, se utilizó este templado en los ensayos siguientes. Los resultados mostrados en la figura 15 y en la tabla 3 describen el efecto del PCNAr de maíz sobre las DNA polimerasas δ y ϵ de levadura.

Ensayo	cpm	% de Actividad	% de Estímulo
DNA pol δ sin PCNA	2257.8	100	-----
DNA pol δ + 100 ng de PCNA	4071.45	162.95	62.95
DNA pol ϵ sin PCNA	31738.6	100	-----
DNA pol ϵ +100 ng de PCNA	30630.5	96.5	-3.5

Tabla 3. Efecto de PCNAr de maíz sobre dos DNA polimerasas de levadura utilizando polidA- oligodT como molde.

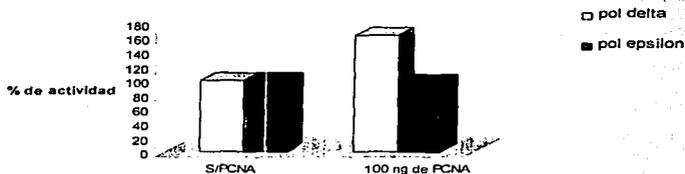


Figura 15. Efecto del PCNAr de maíz sobre dos DNA polimerasas de levadura utilizando polidA- oligodT como molde.

Se observa que el estímulo sobre la DNA pol δ de levadura es bajo, de tan sólo un 63%, utilizando 100 ng de PCNAr de maíz por ensayo. Estos datos pueden observarse en la tabla

3 y de manera gráfica en la figura 15 en las barras claras; el 100% de actividad está representado, para las dos polimerasas, por la actividad que se tiene con las DNA polimerasas sin PCNAr de maíz; este estímulo es pequeño pero suficiente para tomarlo como control y saber si la mezcla de reacción estaba funcionando correctamente. Se pensó que este estímulo tan bajo se debía a que tal vez a la enzima le faltaban unos pasos más de purificación, ya que la referencia de donde fue obtenido el método para purificar a la polimerasa de levadura indicaba otros 3 pasos más de purificación [Bauer et al. 1988], que ya no se realizaron por falta de las resinas que se utilizaban en dicha referencia; pero además podría estar indicándonos que el PCNAr de maíz no estimula en gran medida a la polimerasa de levadura o que las condiciones en que se realizó este ensayo no eran las adecuadas para observar dicho estímulo. Por otra parte, el efecto sobre la pol ϵ no es apreciable en estas condiciones, ya que por los datos mostrados en la tabla 3, contrariamente a lo que se podría pensar, se tiene una ligera disminución de la actividad. Tsurimoto [Tsurimoto 1998] menciona que la DNA pol ϵ sí es estimulada por PCNA, aunque no necesariamente requiere de este factor de procesividad para actuar. En este trabajo no se observó ningún estímulo, tal vez debido a que estas condiciones no eran las más adecuadas para dicha interacción, y como estudiar el efecto de PCNA sobre la pol ϵ no era nuestro objetivo, decidimos no continuar trabajando con esta enzima. Cabe mencionar que de los datos obtenidos al purificar a estas enzimas, pol ϵ fue la que mostró la actividad más alta utilizando DNA activado como molde.

En esta parte de la experimentación también se realizaron ensayos con las diferentes fracciones de PCNAr de maíz que se habían obtenido con la cromatografía de exclusión molecular (CEM), es decir, con las fracciones correspondientes al trimero o al monómero,

pero el estímulo fue demasiado pequeño por lo que se decidió no utilizar más estas fracciones; se prefirió utilizar a la proteína recombinante total, es decir, la proteína que no había sido purificada por la CEM, para todos los ensayos siguientes:

Antes de observar el efecto de PCNAr de maíz sobre la polimerasa de maíz semipurificada, se estudió el efecto sobre la actividad de DNA polimerasa total de maíz obtenida de un extracto crudo de ejes embrionarios de maíz germinados por 24 horas y utilizando los dos moldes de DNA. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 16.

Ensayo con DNA activado	cpm	% de actividad	% de estímulo
s/PCNA	5399.71	100	---
100 ng de PCNA	24694.51	457.3	357.3
Ensayo con polidA-oligodT	cpm	% de actividad	% de estímulo
s/PCNA	1153.58	100	---
100 ng de PCNA	3089.4	267.8	167.8

Tabla 4. Datos del efecto de PCNAr de maíz sobre la actividad de DNA polimerasa total de maíz obtenida de un extracto crudo de ejes embrionarios germinados por 24 horas.

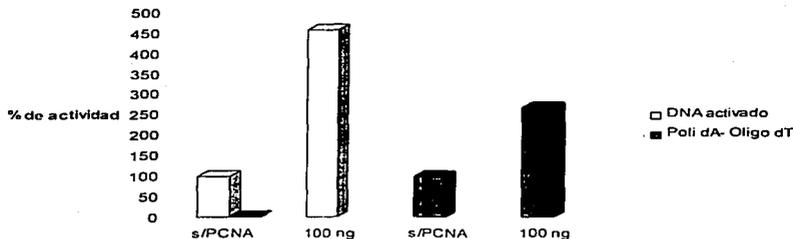


Figura 16. Efecto de PCNAr de maíz sobre la actividad de DNA polimerasa total de maíz obtenida de un extracto crudo de ejes embrionarios germinados por 24 horas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El extracto total de los ejes embrionarios se obtuvo de la forma en que se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos nos muestran un estímulo de PCNAr de maíz de 357% (tabla 4), sobre la actividad de DNA polimerasa total de maíz cuando el molde es DNA activado (figura 16, barras blancas) y de 168% de estímulo (tabla 4) cuando el molde es polidA-oligodT (figura 16, barras grises); ante esto, decidimos continuar con los ensayos pero ahora probando con la enzima parcialmente purificada. La enzima que se tenía en el extracto total de ejes embrionarios de maíz se purificó de la manera descrita en la sección de materiales y métodos y en los siguientes ensayos de actividad de polimerasa se probaron diferentes condiciones de reacción, como el pH, el tiempo de pre-incubado con el fin de permitirle a PCNA interactuar con el molde de DNA y consigo mismo, y el tiempo de incubación.

El perfil de elución de la DNA pol δ de maíz a través de la resina DEAE se muestra en la figura 17.

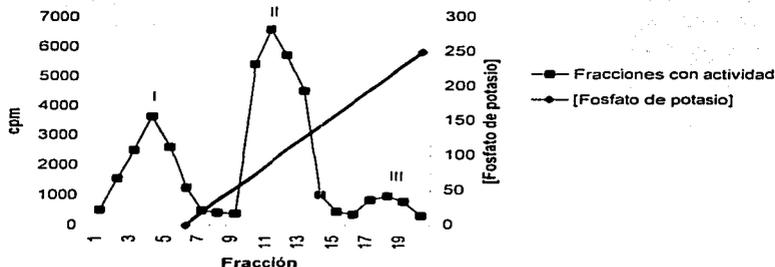


Figura 17. Perfil de elución de la DNA pol δ después de pasar por la columna de DEAE.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aquí, como en el caso de la purificación de la pol δ de levadura, se observa un perfil de elusión muy similar, ya que también se observan tres picos correspondientes a tres polimerasas. El primer pico corresponde a una DNA polimerasa de tipo δ , el segundo pico corresponde a la DNA polimerasa α y el tercer pico pertenece a otra DNA polimerasa aún por definir [García et al. 1997]. Después de purificar a la enzima aproximadamente unas 2500 veces con este protocolo, se probaron las condiciones antes mencionadas para optimizar la interacción con PCNA.

La primera condición que se probó fue el pH, para así obtener las condiciones a las cuales trabajaba mejor la enzima, manteniendo el pH cercano a la neutralidad, basándonos en algunas condiciones de reacción ya reportadas [Burguers and Gerik 1998, Adayabalam et al. 2001, Duong et al. 1999, Laquet et al. 1993].

ensayo	cpm	% de actividad	% de estímulo
pH 6.5 s/PCNA	4184.5	100	-----
pH 6.5 + 100 ng de PCNA	4810.5	114.96	14.96
pH 7.2 s/PCNA	4166.87	100	-----
pH 7.2 100 ng de PCNA	7817.06	187.6	87.6
pH 7.6 s/PCNA	4153.7	100	-----
pH 7.6 100 ng de PCNA	4132.93	99.5	-0.5
pH 8 s/PCNA	4166.85	100	-----
pH 8 100 ng de PCNA	4271.02	102.5	2.5

Tabla 5. Efecto del pH sobre la actividad de la DNA polimerasa δ de maíz por PCNA_r, utilizando polidA-oligodT como molde.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

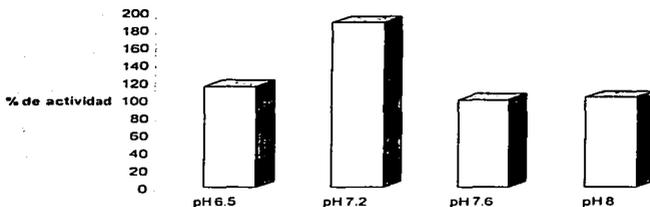


Figura 18. Efecto del pH sobre la actividad de la DNA polimerasa δ de maiz por PCNA, utilizando polidA-oligodT como molde.

El efecto del pH sobre el estímulo que pudiera mostrar PCNA de maiz con la DNA pol δ de maiz se muestra en la figura 18 de manera gráfica y los valores numéricos en la tabla 5; bajo estas condiciones se observa que el pH de 7.2 es el más adecuado para que trabaje la DNA polimerasa δ de maiz, ya que a este pH se tiene una estimulación del 87%. Como puede notarse, el estímulo en este ensayo fue menor si se compara con el obtenido en el ensayo de actividad realizado con la enzima en el extracto proteico total (Figura 16). Cabe mencionar que dicho ensayo se trabajó al mismo pH óptimo que se obtuvo con estas condiciones. Este resultado es interesante ya que en algunas referencias [Arroyo *et al.* 1996, Matsumoto *et al.* 1994] se menciona que el pH óptimo para que se dé el estímulo por PCNA es de alrededor de 6.7, mientras que en otra referencia este valor varía hasta 7.8 [Bauer *et al.* 1988, Tsurimoto and Stillman 1990, Laquet *et al.* 1993]. En lo que respecta a la disminución de la estimulación, ésta pudo deberse a que durante la purificación de la enzima se pierden muchos factores que son requeridos para la estimulación por PCNA de la DNA pol δ .

Para los siguientes ensayos, cabe mencionar que fue muy difícil mantener en buenas condiciones a la enzima ya que este tipo de proteínas son muy inestables y pierden su actividad con mucha facilidad; por lo que fue necesario trabajar todos estos ensayos con la enzima conservada en hielo mientras se tomaban las alícuotas y guardándola a -20°C cuando no se requería de ella.

La siguiente condición a probar fue el tiempo de preincubado; con ésta se pretendía que PCNA interactuara con el molde de DNA y consigo misma, dando oportunidad a que se formara el anillo y se posicionara sobre el DNA.

Ensayo (tiempo de pre-incubado)	cpm	% de actividad	% de estímulo
s/PCNA	4765.5	100	---
15 min	6978.5	146	46
30 min	4999	104.9	4.9
60 min	5022.8	105.4	5.4

Tabla 6. Efecto del tiempo de pre-incubado sobre la estimulación de la DNA polimerasa δ de maíz por PCNA, utilizando polidA- oligodT como molde.

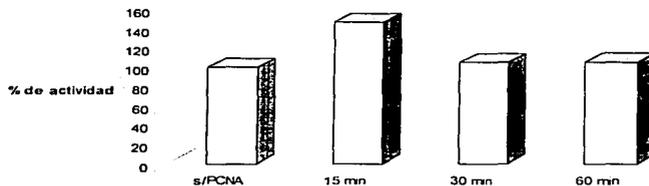


Figura 19. Efecto del tiempo de pre-incubado sobre la estimulación de la DNA polimerasa δ de maíz por PCNA, utilizando polidA- oligodT como molde.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 19 puede apreciarse que el tiempo de preincubado óptimo con 100 ng de PCNAr de maíz corresponde al de 15 minutos, ya que a este tiempo el estímulo es de casi un 50%, como se muestra en la tabla 6, a diferencia de los otros tiempos de preincubado en los cuales no se observa un estímulo considerable (tabla 6). Al parecer, PCNA requiere de un corto tiempo para poder formar el anillo y/o interactuar con el DNA, pues como se ve en la figura 19, a tiempos mayores de 15 minutos no hay un estímulo considerable.

El tiempo de incubado se refiere al tiempo que requiere la polimerasa para unir los nucleótidos a la cadena complementaria, que en este caso el nucleótido es la timidina tritiada (^3H - dTMP) pues el molde utilizado es poli dA- oligo dT.

Ensayo (tiempo de incubado)	cpm	% de actividad	% de estímulo
s/PCNA	4235.6	100	—
10 min	4345.7	102.6	2.6
30 min	6200.9	146.4	46.4
60 min	6039.9	142.6	42.6

Tabla 7. Efecto del tiempo de incubado sobre la estimulación de la DNA polimerasa δ de maíz por PCNAr, utilizando polidA- oligodT como molde.

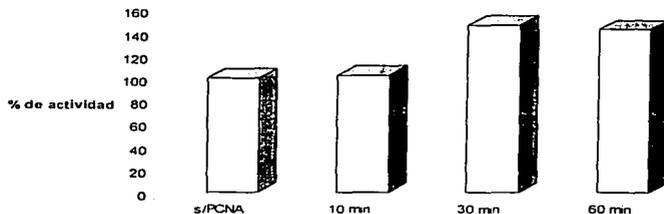


Figura 20. Efecto del tiempo de incubado sobre la estimulación de la DNA polimerasa δ de maíz por PCNAr, utilizando polidA- oligodT como molde.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este último experimento se observa que el tiempo óptimo de incubación es de 30 minutos (figura 20). ya que a este tiempo se aprecia un estímulo de 47% (tabla 7); se ve que el tiempo de 10 minutos no es suficiente para que la enzima se acople con PCNA durante la polimerización. A su vez, se observa que no es necesario dejar incubando por 60 minutos a la enzima con la mezcla de reacción y PCNA pues con esto no se aumenta la actividad de la polimerasa, ya que como se observa en la figura 20 y en la tabla 7, el valor es prácticamente el mismo que el valor del tiempo de 30 minutos de incubación que es considerado el óptimo.

DISCUSIÓN

Se purificó a PCNAr de maíz y, aún cuando se obtuvo con algunas proteínas contaminantes, sirvió para realizar los ensayos de actividad. Es importante mencionar que cuando se hicieron las eluciones con EDTA en este ensayo, la resina perdía su color característico (color verde, debido a la presencia del níquel) y tal vez su capacidad para retener a la proteína recombinante; esto pudo deberse a que el EDTA es un agente quelante el cual podría estar arrastrando al níquel de la resina. Después de varios intentos fallidos, nos dimos cuenta de que es importante utilizar resina nueva; también se decidió por no hacer más eluciones con EDTA al ver que este arrastraba consigo el níquel y provocaba que la resina no retuviera la proteína de interés, además se observó que es muy importante realizar los lavados con la cantidad de buffer necesaria para eliminar a toda la proteína contaminante que se pega inespecíficamente a la resina y las eluciones hacerlas de la misma forma para así eluir con el imidazol a la proteína de interés. Obteniendo así las condiciones óptimas para la purificación de esta proteína.

También se aprovechó la proteína recombinante que se va a los cuerpos de inclusión durante la sobreexpresión para generar un anticuerpo específico dirigido contra PCNAr de maíz y así poder detectar su presencia en ensayos de Western Blot; cabe mencionar que el anticuerpo con el que se contaba en el laboratorio se había generado a partir de proteína recombinante en su forma soluble, es decir, la proteína que es purificada en condiciones no desnaturalizantes.

Por los resultados obtenidos en la generación del anticuerpo, se considera que el anticuerpo que se obtuvo es bastante bueno. Las bandas que se reconocían con el suero inmune del

conejo 1 y que no correspondían a PCNA se eliminaron con la purificación del anticuerpo, como se muestra más adelante. En el suero preinmune de los dos conejos (figuras 6C y 6D, carriles 1-5) no se reconoce ninguna banda, lo cual nos indica que no había anticuerpos generados por ninguno de los conejos contra proteínas de *E. coli* ni contra PCNA, ya que en las muestras cargadas a los geles son las únicas proteínas que podrían estar presentes.

El obtener tanto a la proteína recombinante en forma soluble purificada, así como el obtener el anticuerpo a partir de la proteína de cuerpos de inclusión, sirvió para llevar a cabo la determinación de las asociaciones de PCNA de maíz. En esta determinación se vio que PCNA de maíz se encuentra presente en diferentes estructuras, las cuales corresponden al monómero, dímero, trímero y asociaciones de mayor peso molecular, según los resultados obtenidos tanto por cromatografía de exclusión molecular como por geles nativos; es bien conocido que PCNA en eucariotes forma un anillo homotrímérico [Tsurimoto 1998] que es la forma funcional. Nuestros resultados también muestran la presencia de multímeros con pesos moleculares de 167 KDa y superiores, los cuales son difíciles de explicar, debido a que la columna que se estuvo utilizando en el HPLC (sección de materiales y métodos) tiene un rango de separación confiable de 50-450 KDa y por lo tanto, los datos mayores a 450 KDa son teóricos, considerando que se hizo una regresión lineal de los resultados; lo anterior podría deberse, en gran parte, a que la proteína recombinante tuvo un corrimiento irregular con respecto a los marcadores de peso molecular o bien que se cargó una cantidad mayor de proteína para realizar esta determinación. Las asociaciones en fracciones con pesos moleculares mayores a 100 KDa (trímero) podrían ser agregados de la proteína, las cuales son difíciles de explicar. Una de las posibles explicaciones a que nos lleva esta determinación es que la cola de histidinas

que PCNA tiene en el extremo amino no le impide el formar estas asociaciones, aunque esta podría ser una de las causas por las cuales el PCNA de maíz no estimulara de una forma considerable a las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo, como se muestra en la sección de resultados, pues aunque la cola de histidinas no impida la formación de estas asociaciones, podría interferir con la formación de una estructura plenamente funcional. Sin embargo, resultados con PCNA de chícharo fusionado con GST (Glutathion S-transferasa), la cuál es una protefna de aproximadamente 30 KDa, muestran un estímulo de hasta 28 veces sobre la actividad de polimerasa en un extracto nuclear de chícharo en presencia de PCNA [Duong 1999].

Como se mencionó arriba, la interacción de PCNA de maíz con la DNA polimerasa δ de maíz no fue lo satisfactoria que se esperaba, ya que la estimulación fue menor, comparada con lo que se reporta en la literatura [Tsurimoto and Stillman 1990, Zhang P. et al. 1998] en donde se observan estímulos de hasta 15 veces. Al caracterizar bioquímicamente esta interacción se observa que bajo las condiciones utilizadas el pH 7.2 es el óptimo para que se dé el estímulo de la DNA pol δ de maíz, aunque como ya se mencionó, el pH reportado para la interacción en otros sistemas es variable; esto podría sugerir que la cola de histidinas que tiene PCNA se afecta por el pH, modificando con esto la estructura que adquiere la proteína. Al estudiar el tiempo de preincubado, se encuentra que el tiempo óptimo es de 15 minutos; la disminución de la actividad a los tiempos de 30 y 60 minutos posiblemente se deba a una interacción transitoria entre PCNA y el DNA en ausencia de la polimerasa lo que ocasiona que PCNA se desensamble del DNA; otra posible razón es la ausencia de RFC en la mezcla de reacción, la que estabilizaría esta unión; otra posibilidad sería que las

proteínas que co-eluyen con la polimerasa después de su purificación, podrían bloquear, de manera inespecífica, el posicionamiento de PCNA sobre el DNA.

Los resultados del tiempo de reacción (tiempo de incubado) muestran que la DNA polimerasa que interacciona con PCNA^r presenta un pico de actividad al tiempo de 30 minutos (figura 20), viéndose que al incubarse a las proteínas con la mezcla de reacción por un tiempo mayor (60 minutos, figura 20) no se observa ningún cambio apreciable; esto podría deberse a que el mecanismo de recambio, tanto de la polimerasa como de PCNA, para posicionarse nuevamente sobre otros templados, requiere de un tiempo mayor o bien que al terminar de polimerizar una de las cadenas de DNA, PCNA y/o la polimerasa no se despegan rápidamente y por lo tanto la síntesis no continúa. También se observa en estos resultados que 10 minutos no son suficientes para que la enzima complete el molde artificial (poli(dA- oligodT), tal vez porque la enzima en este tiempo ha utilizado poco sustrato del contenido en la mezcla de reacción y/o porque la interacción PCNA-DNA es todavía débil.

Al comparar la actividad de DNA polimerasa obtenida en extractos proteicos con la actividad de DNA polimerasa presente en fracciones semipurificadas, se observa una disminución que pudo deberse, por ejemplo, a que en el ensayo con el extracto proteico total estaban presentes una cantidad mayor de polimerasas a las cuales PCNA^r de maíz pudo también estar estimulando, aumentando así la actividad total observada. El someter a un proceso de purificación adicional a la DNA pol δ de maíz, ocasionó la pérdida de las otras polimerasas. A últimas fechas se ha visto que PCNA no sólo interacciona con la DNA pol δ , sino que interactúa con otras DNA polimerasas [Tsurimoto 1998], que no hemos mencionado y que hasta el momento no se sabe con exactitud cual es su función.

Adicionalmente, la disminución del estímulo sobre la actividad de la DNA polimerasa δ semipurificada comparada con los resultados obtenidos con el extracto proteico podría deberse a que la enzima de maíz es muy inestable, es decir, es una enzima lábil que, posiblemente, va perdiendo algunas de sus subunidades durante la purificación y/o comienza a perder su conformación funcional con el transcurso del tiempo, por lo que su actividad y su capacidad para interactuar con PCNA disminuirían. La DNA pol δ es una enzima conformada por 5 subunidades en *S. pombe* [Zuo et al. 1997] y muy probablemente en maíz y al pasar el tiempo, es probable que las interacciones por las cuales están unidas sus subunidades se debiliten. Otra de las posibilidades por las cuales pudo darse la disminución del estímulo observado es que en el extracto proteico total de ejes embrionarios pudieron haberse encontrado otros factores (proteínas) requeridos para la interacción entre el DNA, la DNA polimerasa y PCNA, factores que ayudan a esta proteína a posicionarse sobre el molde de DNA correctamente, que se perderían al purificar la enzima por la columna de DEAE, como serían RFC, RPA y tal vez otros más.

Esto se observa cada vez con mayor frecuencia en los reportes científicos; en algunos casos se necesita sólo de RFC [Zhang G. et al. 1999, Eissenberg J.C. et al. 1997] para observar el estímulo de PCNA sobre la DNA polimerasa δ , pero en otros se requiere de la presencia de proteínas como RPA [Zhang P. et al. 1998, Gibas E. et al. 1997] y tal vez otras proteínas, todas participantes en la horquilla de replicación. Además, podría requerirse de otras condiciones específicas para llevar a cabo los ensayos con las proteínas de maíz. En este laboratorio todavía no se cuenta con las proteínas RFC y RPA de maíz para poder hacer interactuar todas estas proteínas, es decir, toda la mobiliaria de la horquilla de replicación de maíz. Esto es uno de los objetivos que se desea cubrir en el futuro en este grupo de investigación.

A partir de este trabajo, podría proponerse para confirmar estas suposiciones, el clonar, sobreexpresar y purificar a RFC de maíz para hacerlo interactuar con el PCNA de maíz, bajo las condiciones que se estudiaron en este proyecto, para ver si el estímulo es entonces mayor, demostrando así que RFC es requerido para este tipo de ensayos. Además, obtener de igual forma a RPA, aunque esta no sería útil para los ensayos en donde se utiliza polidA-oligodT como templado pero si en ensayos en donde se tenga toda la maquinaria para la replicación *in vitro*. Adicionalmente sería conveniente el cortar la cola de histidinas de PCNA de maíz, con la proteasa rTEV (Tobacco Etch Virus) para la cual el plásmido utilizado, pPROEX HTb, codifica la secuencia de corte [invitrogen.com/content/vectors/pproexhtb], para ver si este es uno de los factores que impide una mayor estimulación de esta proteína sobre la DNA polimerasa δ de maíz.

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró sobreexpresar y purificar a PCNAr de maíz.
- ❖ Se purificó a PCNAr de maíz de los cuerpos de inclusión y se obtuvo un anticuerpo dirigido contra esta proteína, observándose que este anticuerpo reconoce únicamente a PCNA en extractos proteicos de ejes embrionarios germinados a diferentes horas de maíz.
- ❖ La Cromatografía de Exclusión Molecular y los geles nativos mostraron que la proteína recombinante, al purificarla en estas condiciones, no sólo se encuentra presente en forma de monómero, dímero y/o trímero, sino que también forma algunos agregados los cuales podrían ser multímeros de PCNA.
- ❖ Se observó que el PCNAr de maíz estimula en forma considerable a la DNA polimerasa δ en extractos proteicos totales de maíz, lográndose obtener las condiciones adecuadas para dicho efecto, las cuales son: pH=7.2, tiempo de pre-incubado = 15 minutos y tiempo de incubación = 30 minutos.
- ❖ Con los resultados obtenidos se logró avanzar aun más en la caracterización de la DNA polimerasa I de maíz, obteniendo datos para considerarla como una DNA polimerasa de tipo δ .

BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo MP., Downey KM., So AG. And Wang T., (1996), Schizosaccharomyces pombe Proliferating Cell Nuclear Antigen mutations affect DNA polymerase δ processivity, *J. Biological Chemistry*, Vol. 271, 27: 15971-15980.
2. Bambara R. A., et al., (1997), MINIREVIEW: Enzymes and Reactions at the Eukaryotic DNA Replication Fork, *J. Biol. Chem.*, 272: 4647-4650
3. Bauer Glenn, et al., (1988) DNA polymerase III from Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, No.2, pp. 917-924.
4. Bewley, J.D., and Black, M. (1994). SEEDS, Physiology of development and Germination, Plenum Press, New York, 1985, pp 1-2, 168-169.
5. Borowiec JA. (1996), DNA replication in eukaryotic cells, Cold Spring harbor laboratory, Cold spring harbor, NY, pp.545-574
6. Braithwaite DK, Ito J. (1993), *Nucleic Acid Research* 21: 787-802.
7. Braun KA, Lao Y, He Z, Ingles CJ, Wold MS, (1997), Role of Protein-Protein Interactions in the Function of Replication Protein A (RPA): RPA Modulates the Activity of DNA polymerase α by Multiple Mechanisms, *Biochemistry* 36:8443-8454.
8. Bravo R., J.E. Celis, A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells, *J. cell. Biol.* 84 (1980) 795-802.
9. Burgers PMJ. (1991), Saccharomyces cerevisiae replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon, *J. Biol. Chem.* 266: 22698-22706.
10. Burgers PMJ., DNA polymerase from Saccharomyces cerevisiae, *Methods Enzymol.* 262 (1995) 49-62.
11. Burgers PM. Gerik KJ, (1998). Structure and processivity of two forms of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 273:19756-19762.
12. Büsen W, (1980), *J. Biol. Chem.* 255: 9434-9443.
13. Byrnes J.J., K.M. Downey, V.L. Black, A.G. So, A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta. *Biochemistry. Biochemistry* 15 (1976) 2817-2823.

14. Cai JS, Uhlmann F, Gibbs E, Flores Rozas H, Lee C-G, et al., (1996), Reconstitution of human replication factor C from its five subunits in baculovirus-infected insect Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12896-12901.
15. Celis, J.E., Madsen, P. (1986), Increased nuclear cyclin / PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair, FEBS lett., 209: 277-283.
16. Challberg M.D., K. J. Kelly, Animal virus DNA Replication, Annu. Rev. Biochem. 58 (1989) 671-717.
17. DiFrancesco RA, Lehman IR, (1985), Interaction of ribonuclease H from *Drosophila melanogaster* embryos with DNA polymerase-primase, J. Biol. Chem. 260: 14764-14770.
18. Diffley JFX, (1996), Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic Cells, Genes dev. 10: 2819-30.
19. Duong Van Hope, et al., (1999), Suppression of pea nuclear topoisomerase I enzyme activity by pea PCNA, The Plant Journal, 19: 153-162.
20. Eissenberg JC., ayyagari R., Gomes XV. And burgers PMJ., (1997), Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ , Mol. Cell. Biology, 17: 6367-6378.
21. Eki T, Matsumoto T, Murakami Y, Hurwitz J, (1992), The replication of DNA containing the simian virus 40 origin by the monopolymerase and dipolymerase systems, J. Biol. Chem. 267: 7284-7294.
22. Erdile LF, Heyers W-D, Kolodner R, Kelly TJ, (1991), Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA Replication, J. Biol. Chem. 266:12090-12098.
23. Fien K, Stillman B, (1992), Identification of replication factor C from *Saccharomyces cerevisiae*: a component of the leading-strand DNA replication complex., Mol. Cell. Biol. 12: 155-163.
24. García E., Orjuela D., Vázquez J. M., et al., (1997), Comparison among DNA Polymerases 1, 2 and 3 from Maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2, Plant Molecular Biology, 33: 445-455.
25. Gibbs E., Kelman Z., Gulbis JM., O'Donnell M., Kuriyan J., Burgers PMJ. And Hurwitz J., (1997), The influence of the proliferating cell nuclear antigen-interacting domain of p21^{Cip1} on DNA synthesis catalyzed by the human and *S. cerevisiae* polymerase δ holoenzymes, Journal of Biological Chemistry, 272: 2373-2381.

26. Gulbis J.M., Z. Kelman, J. Hurwitz, M. O'Donnell, J. Kuriyan, Structure of the C-terminal region of p21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA, *cell* 87 (1996) 297-306.
27. Hagermeier A, Grosse F. (1989), A distinct form of ribonuclease H from calf thymus stimulates its homologous DNA-polymerase-alpha-primase complex, *Eur. J. Biochem.* 185: 621-628.
28. Herrera I., Sanchez MP., Molina J., Plasencia J. and Vázquez-Ramos JM., (2000), Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins, *Physiol. Plant.* 110: 127-134.
29. Hübscher U, Maga G, podust VN, 1996, DNA replication in eukaryotic cells, Cold Spring harbor laboratory, Cold spring harbor, NY, (1996), pp.525-543
30. Huang L, Rumbaugh JA, Murante RS, Lin RJR, Rust L, Bambara RA, (1996), Role of calf RTH-1 nuclease in removal of 5'-ribonucleotides during Okazaki fragment processing, *Biochemistry* 35: 9266-9277.
31. Kellman Z., PCNA: structure, functions and interactions, *Oncogene* 14 (1997) 629-640.
32. Kenny MK, Lee S-H, Hurwitz J, (1989), Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases alpha and delta, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9757-9761.
33. Krishna T.S., X.P. Kong, S. Gary, P.M.J. Burgers, J. Kuriyan, Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA, *Cell* 79 (1994) 1233-1243.
34. Kuriyan J., M. O'Donnell, Sliding clamps of DNA polymerases, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 915-925.
35. Laquel, P., Litvak, S. and castroviejo, M. (1993), Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases, *Plant Physiol.*, 102: 107-114.
36. Lee S-H, Eki T, Hurwitz J, (1989), Synthesis of DNA containing the simian virus 40 origin of replication by the combined action of DNA polymerases alpha and delta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7361-7365.
37. Lee S-H, Hurwitz J, (1990), Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5672-5676.

38. Lee S-H, Kwong AD, Pan Z-Q, Hurwitz J, (1991), Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta, *J. Biol. Chem.* 266: 594-602.
39. Li JJ, Kelly TJ, (1984), Simian virus 40 DNA replication in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6973-6977.
40. Li JJ, Kelly TJ, (1985), Simian virus 40 DNA replication in vitro: specificity of initiation and evidence for bidirectional replication, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1238-1246.
41. López I., Khan Z., Vázquez J., Hussey P. (1997). The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea Mays* is composed of two members that have similar expresión programmes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1353: 1-6.
42. Maniatis T., Sambrook and Frisch, E-F, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, (1989), Cold Spring Harbor.
43. Manju M. Hingorani and Mike O'Donnell (2000), Sliding Clamps: A (tail)ored fit, *Current Biology*, 10:R25-R29
44. Mathews M.B., R.M. Bernstein, B.R. Franza Jr., J.I. Garrels, Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin, *Nature* 309 (1984) 374-376
45. Matsumoto T, Eki T, Hurwitz J, (1990), Studies on the initiation and elongation reactions in the simian virus 40 DNA replication system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9712-9716
46. Matsumoto T, et al., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 223: 179-187.
47. Mo JY, Liu L, Leon A, Mazloum N, Lee MY, (2000). Evidence that DNA polymerase delta isolated by immunoaffinity chromatography exhibits high-molecular weight characteristics and is associated with the KIAA0039 protein and RPA, *Biochemistry*, 39:7245-7254.
48. Murakami Y, Hurwitz J., (1993), DNA polymerase alpha stimulates the ATP-dependent binding of simian virus tumor T antigen to the SV40 origin of replication, *J. Biol. Chem.*, 268: 11008-11017.
49. Murante RS, Huang L, Turchi JJ, Bambara RA. (1994), The calf 5'- to 3'- exonuclease is also an endonuclease with both activities dependent on primers annealed upstream of the point of cleavage, *J. Biol. Chem.* 269: 1191-1196.
50. Murante RS, Rumbaugh JA, Barnes CJ, Norton JR, Bambara RA, (1996), Calf RTH-1 nuclease can remove the initiator RNAs of Okazaki fragments by endonuclease activity, *J. Biol. Chem.* 271: 25888-25897.

51. Navas TA, Zhou Z, Elledge SJ, (1995), DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint, *Cell* 80: 29-39.
52. Navas TA, Sanchez Y, Elledge SJ, (1996), RAD9 and DNA polymerase epsilon form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.* 10: 2632-2643.
53. Ohmori H, Friedberg EC, Fuchs RPP, Goodman MF, Hanaoka F, et al. (2001). The Y-family of DNA polymerases, *Mol. Cell.* 7:7-8
54. Podust VN, Georgaki A, Strack B, Hübscher U, (1992), Calf thymus RF-C as an essential component for DNA polymerase delta and epsilon holoenzymes function, *Nucleic Acids Research* 20: 4159-4165.
55. Prelich G., M. Kostura, D.R. Marshak, M.B. Mathews, B. Stillman, Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein, *Nature* 326 (1987) 471-476.
56. Prelich G, Stillman B. (1988), Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA, *Cell* 53: 117-126.
57. QIAGEN, "Ni-NTA Spin Handbook, for Ni-NTA Spin kit and columns". January (2000)
58. Raven, P., Evert, R.F. and Eichorn, S.E. (1992), *Biology of Plants*. Worth Publishers, inc. New York; N.Y. 5th edition.
59. Sambrook J., et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2a. ed. CSH, USA. (1989), tomo3.
60. Sánchez MP., Torres A., Boniotti MB., Gutierrez C. and Vázquez-Ramos JM., (2002), PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology*, 50: 167-175.
61. Sheerbakova PV, Pavlov YI, (1996) 3'→5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 142: 717-726.
62. Stillman B. (1996), Cell cycle control of DNA replication, *Science* 274: 1659-1664
63. Stillman B., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5 (1988) 197-245.
64. Stukenberg P.T., P.S. Studwell-Vaughan, M. O'Donnell, Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 11328-11334.

65. Tan C.-K., C. Castillo, A.G. So, K.M. Downey, An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 12310-12316.
66. Tsurimoto T, Stillman B, (1989). Simian virus 40 DNA replication in vitro: identification of multiple stages of initiation, *EMBO J.*, 8: 3883-3889.
67. Tsurimoto T, Stillman B, (1990), Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1023-1027.
68. Tsurimoto T, Melendy T, Stillman B, (1990), Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature* 346: 534-539.
69. Tsurimoto T, Stillman B, (1991a), Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins, *J. Biol. Chem.* 266: 1950-1960.
70. Tsurimoto T, Stillman B, (1991b), Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis, *J. Biol. Chem.* 266: 1961-1968.
71. Tsurimoto, T. (1998), PCNA, a multifunctional ring on DNA, *BBA*, 1443, 23-39.
72. Turchi JJ, Bambara RA, (1993), Completion of mammalian lagging strand DNA replication using purified proteins, *J. Biol. Chem.* 268: 15136-15141.
73. Turchi JJ, Huang L, Murante RS, Kim Y, Bambara RA, (1994), Enzymatic completion of mammalian lagging-strand DNA Replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9803-9807
74. Ulrich Hübscher, Giovanni Maga and Silvio Spadari (2002), Eukaryotic DNA Polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 71:133-63
75. Vázquez A., Vázquez-Ramos JM., (1988), Characteristics of the major DNA Polymerases found during early and late Maite germination. *Can. J. Botany* 66: 1186-1191.
76. Waga, Stillman B, (1994), Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro, *Nature* 369: 207-212.
77. Waga S. and Bruce Stillman (1998), The DNA Replication Fork in Eukaryotic Cells, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:721-51

78. Wang T.S.F., in: M.L. De Pamphilis (Ed.), DNA replication in eukaryotic cells, Cold Spring harbor laboratory, Cold spring harbor, NY, (1996), pp. 461-493.
79. Weinberg DH, Kelly TJ. (1989), Requirement for two DNA polymerases in the replication of simian virus 40 DNA in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9742-9746.
80. Weinberg DH, Collins KI, Simancek P, Russo A, Old MS, et al., (1990) Reconstitution of simian virus 40 DNA replication with purified proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8692-8696.
81. Wold MS, (1997), Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism, Annu. Rev. Biochem. 66:61-92.
82. Yao N., J. Turner, Z. Kelman et al., Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, E. coli and T4 replicases, Genes Cells 1 (1996) 101-113.
83. Yoder BL, Burgers PMJ. (1991), Saccharomyces cerevisiae replication factor C. 1. Purification and characterization of its ATPase activity, J. Biol. Chem. 266: 22689-22697.
84. Zhang S.J., X.R. Zeng, P. Zhang, N.L. Toomey, R.Y. Chuang, L.S. Chang, M.Y. Lee. A conserved region in the amino terminus of DNA polymerase delta is involved in proliferating cell nuclear antigen binding, J. Biol. Chem. 270 (1995) 7988-7992.
85. Zhang G., J. Hurwitz, et al., (1999), Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1869-1874.
86. Zhang P., et al., (1998), The interdomain connector loop of human PCNA is involved in a direct interaction with human polymerase δ , Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 2, pp 713-719.
87. Zuo S, Gibbs E, Kelman Z, Wang TS, O'Donnell M, et al., (1997), DNA polymerase delta isolated from Schizosaccharomyces pombe contains five subunits, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11244-11249.
88. <http://invitrogen.com/content/vectors/pproexhtb>