

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS  $\alpha$  y  $\delta$  DE MAÍZ DURANTE  
LA GERMINACIÓN

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

M. EN C. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por el siguiente jurado:

<b>Presidente:</b>	<b>Dra. Carmen Gómez Eichelmann</b>
<b>Primer vocal:</b>	<b>Dra Patricia Ostroski Shejet</b>
<b>Segundo vocal:</b>	<b>Dr. Alejandro Zentella Dehesa</b>
<b>Tercer vocal:</b>	<b>Dr. Mario Rocha Sosa</b>
<b>Secretario:</b>	<b>Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova</b>
<b>Primer suplente:</b>	<b>Dr. Roberto Coria Ortega</b>
<b>Segundo suplente:</b>	<b>Dr. Eleazar Martínez Barajas</b>

#### Reconocimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM

CONACYT 160065

Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado número 103309 y 203309

PAPIIT 202002 y 200706

## **Agradecimientos**

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por su asesoría en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por formar parte de mi Comité Tutorial.

Agradezco a todos los miembros pasados y presentes en el Laboratorio 114 del Edificio "E" de la Facultad de Química; Alberto, Alma, Edurne, Francisco, Luzma, Maritzel, Mary, Naty, Ruth y Yazmín.

A mis amigos que transitaron en el Lab. 114; José Juan, Dairo y Paco.

Al M.V.Z. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez por su ayuda en la obtención de anticuerpos en conejo.

A la M.V.Z Lucia Macias Rosales por su ayuda en la obtención de anticuerpos en rata y ratón.

A la M.C. Ma. Del Carmen Parra González por sus valiosos consejos.

Al Dr. Felipe Cruz García y al M.C. Gregorio Orozco Arroyo por su ayuda en el análisis filogenético.

## **Dedicatorias**

A mi padre (†) y a mi madre.

A mi esposa y a mis hijas.

A mis hermanas y hermanos.

# Índice

<b>Resumen</b>	i
<b>Abstract</b>	ii
<b>Capítulo I Introducción</b>	1
1.1. Ciclo de vida del maíz	2
1.2 Formación de la semilla de maíz	3
1.3 Anatomía de la semilla de maíz	3
1.4 Germinación de la semilla de maíz	4
1.4.1 Imbibición	5
1.4.2 Respiración y síntesis de ATP	6
1.4.3 Síntesis de RNA y proteínas	7
1.4.4 Síntesis de DNA y división celular	7
1.5 DNA polimerasas	9
1.5.1 Clasificación de las DNA polimerasas	10
1.5.2 Función de la pol $\alpha$	10
1.5.3 Estructura de la pol $\alpha$ , subunidades y funciones catalíticas	11
1.5.4 Propiedades básicas de la DNA primasa	11
1.5.5 Relevancia de la formación del cebador durante la síntesis del DNA	12
1.5.6 DNA primasa de <i>E. coli</i>	14
1.5.7 DNA primasa de eucariotes	14
1.5.8 Requerimientos para medir actividad de DNA primasa	15
1.5.9 DNA polimerasa $\alpha$ de plantas	16
1.5.10 DNA primasa de plantas	16
1.5.11 DNA polimerasa $\delta$	17
1.5.12 DNA polimerasa $\delta$ de plantas	18
<b>Antecedentes experimentales</b>	19
<b>Capítulo II Caracterización de la DNA primasa asociada a la DNA polimerasa 2 (tipo <math>\alpha</math>) de maíz</b>	20
2.1 Objetivos	21
2.2 Material y Métodos	22
2.3 Resultados	30
<b>Capítulo III Caracterización de la DNA polimerasa <math>\delta</math> de maíz durante la germinación</b>	46
3.1 Objetivos	47
3.2 Material y métodos	48
3.3 Resultados	53
<b>Capítulo IV Discusión</b>	65
<b>Capítulo V Conclusiones</b>	73
<b>Perspectivas</b>	75
<b>Referencias</b>	76
<b>Artículos</b>	

## Resumen

El DNA contiene la información biológica que instruye a la célula como existir en una forma ordenada; la replicación fiel y exacta del DNA es entonces una de los eventos más importantes en el ciclo de vida de una célula. En eucariotes, esta función es realizada por las DNA polimerasas replicativas  $\delta$  y/o  $\epsilon$  por la adición de residuos de nucleótido trifosfato al extremo 3' de la cadena de DNA, usando una cadena de DNA complementaria como molde. Moléculas pequeñas de RNA son usadas como cebadores para la iniciación de la síntesis del DNA, función realizada por la DNA primasa asociada a la DNA polimerasa  $\alpha$ . En este trabajo caracterizamos la actividad de DNA primasa libre de polimerasa  $\alpha$  a nivel bioquímico y su interacción con las DNA polimerasas 1 y 2 (tipo  $\alpha$  y  $\delta$  respectivamente); además, estudiamos a la DNA polimerasa  $\delta$  a nivel de expresión del mRNA, del comportamiento de la proteína y de la actividad durante las primeras 24 h de germinación.

La actividad de DNA primasa fue separada del complejo de la DNA polimerasa 2 mediante una cromatografía hidrofóbica en fenil sefarosa eluyendo con etilén glicol. La DNA primasa libre de polimerasa  $\alpha$  sintetiza cebadores de 8-34 nt de longitud, aunque predominantemente sintetiza de 15-17 nt. Las actividades de DNA polimerasas 1 o 2 fueron ensayadas después de la formación del cebador previamente sintetizado por la DNA primasa y ambas mostraron un uso diferencial de los moldes: mientras que la DNA polimerasa 2 utilizó más eficientemente un molde sintético de poli-dT<sub>1200</sub> que un molde natural, la DNA polimerasa 1 utilizó ambos pobremente. La DNA primasa tiene un peso estimado de 68 kDa de acuerdo a los resultados obtenidos en filtración en gel, western blot y por un ensayo denominado "DNA primase trapping".

En un trabajo separado, estudiamos la expresión de la DNA polimerasa tipo  $\delta$  de maíz (Zmpol $\delta$ ) durante la germinación de semillas y encontramos que ni la expresión del gen, ni la cantidad de proteína varían durante las primeras 24 de imbibición; sin embargo, la actividad de Zmpol $\delta$  tiene 2 picos de actividad, uno a las 6 h de germinación, tal vez relacionado con procesos de síntesis reparativa del DNA y un segundo pico cuando la replicación del DNA ya está en progreso (18-24 h), indicando que Zmpol $\delta$  es regulada a nivel postraduccional. Zmpol $\delta$  fue encontrada principalmente en tejidos proliferativos de tejidos de semilla y en plántula, aunque sorprendentemente, se encontró también en endospermo, junto con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de maíz.

## Abstract

DNA is the biological information that instructs cells how to exist in an ordered fashion: accurate replication is thus one of the most important events in the life cycle of a cell. This function is performed by replicative DNA polymerases  $\delta$  and/or  $\epsilon$  by adding deoxynucleotide triphosphate (dNTP) residues to the 3'-end of the growing chain of DNA, using a complementary DNA chain as a template. Small RNA molecules are used as primers for chain elongation, a function performed by the DNA polymerase  $\alpha$ -associated DNA primase. In this work, we have studied the activity of maize DNA polymerase  $\alpha$ -free DNA primase at the biochemical level and its interaction with maize DNA polymerases 1 ( $\alpha$ ) and 2 ( $\delta$ ) types; besides, we studied maize DNA polymerase  $\delta$  at the gene expression level and also following the behaviour of the protein and its activity during the first 24 h of germination. DNA primase activity was separated from the complex of DNA polymerase 2 (an  $\alpha$ -type DNA polymerase) by hydrophobic chromatography on phenyl sepharose by eluting with ethylene glycol. DNA primase synthesized primers that were 8-34 nt long, with predominant bands at 15-17 nt in length. DNA polymerases 1 or 2 were assayed after template-priming with purified DNA primase and showed a differential use of templates: whereas DNA polymerase 2 used a polydT<sub>1200</sub> template more efficiently than a natural template, DNA polymerase 1 used both of them poorly. The molecular size of DNA primase was estimated around 68 kDa by gel filtration, western blotting and by a DNA primase trapping assay. In a separate work, we studied the expression of a maize  $\delta$ -type DNA polymerase (Zmpol $\delta$ ) during seed germination. We found that neither the mRNA nor the protein levels changed during germination; however, Zmpol $\delta$  showed two peaks of activity, one during early germination, perhaps related to DNA repair processes and a second peak when DNA replication is already in progress, indicating that Zmpol $\delta$  is regulated at the post-translational level. Zmpol $\delta$  was found mainly in proliferative tissues in seeds and plantlets, although surprisingly, it was also present in seed endosperm, together with Zm proliferating cell nuclear antigen (ZmPCNA).

## **Capítulo I**

### **Introducción**

### 1.1 Ciclo de vida del maíz.

El maíz (como la gran mayoría de plantas con semillas), tiene 2 fases en su ciclo de vida, la etapa diplode esporofítica que termina en meiosis para producir células haploides y la fase haploide gametofítica, en la cual la proliferación mitótica produce una planta haploide que incluye la diferenciación de un subconjunto de células a gametos. Tanto la célula huevo (megagametofito) como la célula espermática (microgametofito) que produce la planta son genéticamente activas; por ello, el genotipo refleja el fenotipo y ambos se desarrollan en inflorescencias separadas (ver fig. 1, Walbot y Evans, 2003).

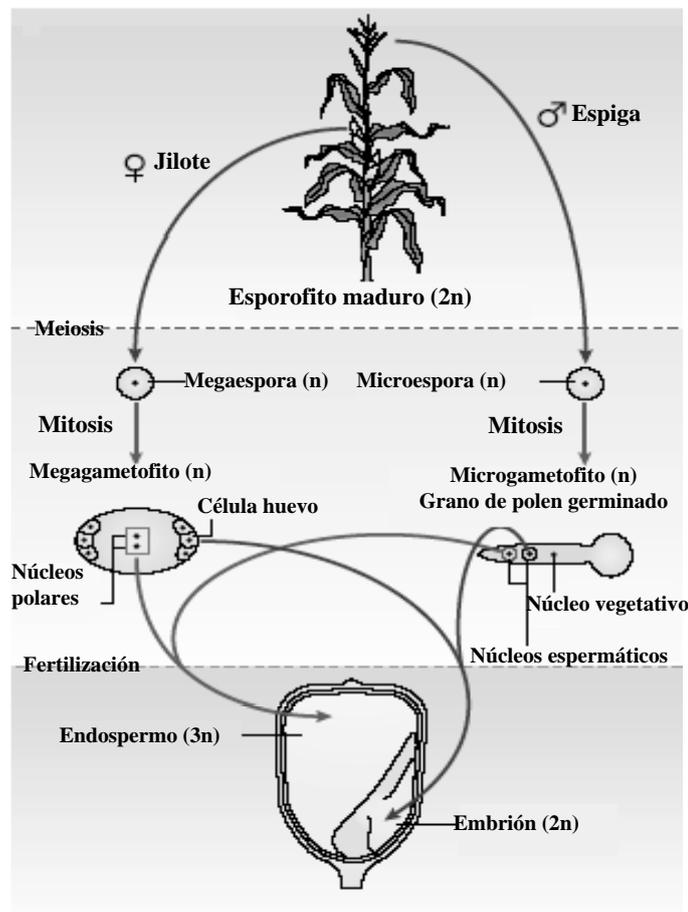


Figura 1. Ciclo de vida de la planta de maíz. La meiosis, seguida de las divisiones mitóticas produce 2 tipos de organismos haploides que son genéticamente activos, el megagametofito femenino y la microespora masculina (grano de polen). La división mitótica en los microgametofitos resulta en un par de células hermanas que se diferencian en esperma. En el megagametofito una célula huevo haploide se diferencia y es fertilizado por una célula espermática para producir el embrión y dos núcleos haploides se fusionan para formar una célula central diploide que es fertilizada por otra célula espermática para formar el endospermo triploide (Modificado a partir de Walbot y Evans, 2003).

## **1.2 Formación de la semilla de maíz.**

La reproducción sexual en maíz se caracteriza por un evento de doble fertilización. Una célula espermática se fusiona con la célula huevo para formar al embrión diploide, mientras que una segunda célula espermática se fusiona con una célula central binucleada para dar origen al endospermo triploide (Randolph, 1936). Aunque genéticamente las contribuciones materna y paterna son iguales, los programas de desarrollo del embrión y del endospermo difieren de manera muy considerable (ver fig. 1). Después del evento de doble fertilización, el proceso de formación del embrión es completado aproximadamente al día 40 y en los siguientes 10 a 20 días llega a la madurez y secado del grano (Vincent, 2002).

## **1.3 Anatomía de la semilla de maíz.**

Un grano maduro de maíz (cariopsis) está conformado por 3 partes principales: pericarpio, endospermo y embrión. El pericarpio es la capa externa transparente del grano, deriva de la pared del óvulo y por ello es genéticamente idéntico a la línea materna, está impregnado de ceras y grasas así como de células mucilaginosas que revientan en contacto con el agua, proveyendo así una barrera que retiene el agua alrededor de la semilla. En el pericarpio se distinguen el hilio y el micrópilo. El hilio es la cicatriz que corresponde a la inserción del funículo con la semilla. El micrópilo es un diminuto orificio, cerca del hilio o en otra zona, según sea la posición del óvulo con respecto al funículo y la forma de la semilla. El micrópilo permite el acceso del aire y del agua al embrión y es el orificio por donde sale la radícula al germinar la semilla. Adyacente al pericarpio se localiza la capa de aleurona, que consiste en una capa de células vivas que rodea al endospermo, sintetiza  $\alpha$ -amilasa y otras enzimas hidrolíticas que degradan almidón durante la germinación. La capa de aleurona es la única parte del endospermo que puede estar intensamente pigmentada (de azul o rojo). La pigmentación es visible a través del pericarpio transparente. El endospermo puede ser de color amarillo o blanco, constituye el 85-90% del peso de la semilla y contiene la fuente de reserva energética (en forma de carbohidratos y cuerpos proteicos), la cual se utiliza durante la germinación y en la formación de la plántula. El escutelo es una estructura discoide gruesa que se localiza entre el endospermo y el embrión, representa el cotiledón único, el cual actúa como órgano de succión a favor de la nutrición del embrión durante la germinación. El embrión contiene un eje embrionario y en éste se distinguen las siguientes estructuras: el coleoptilo que es la primera hoja del eje embrionario y sirve de protección a la plúmula durante el brote de la misma en la germinación; la plúmula es la yema del embrión en

una semilla que dará origen a la parte aérea de la plántula, el nudo cotiledonar se conoce también como corona y se encuentra entre la plúmula y la radícula y en esta estructura se localizan los primordios de raíces laterales, la radícula es el extremo del hipocotilo del cual se desarrolla la raíz primaria y ésta a su vez es protegida por la coleorriza (ver fig. 2, Vincent, 2002).

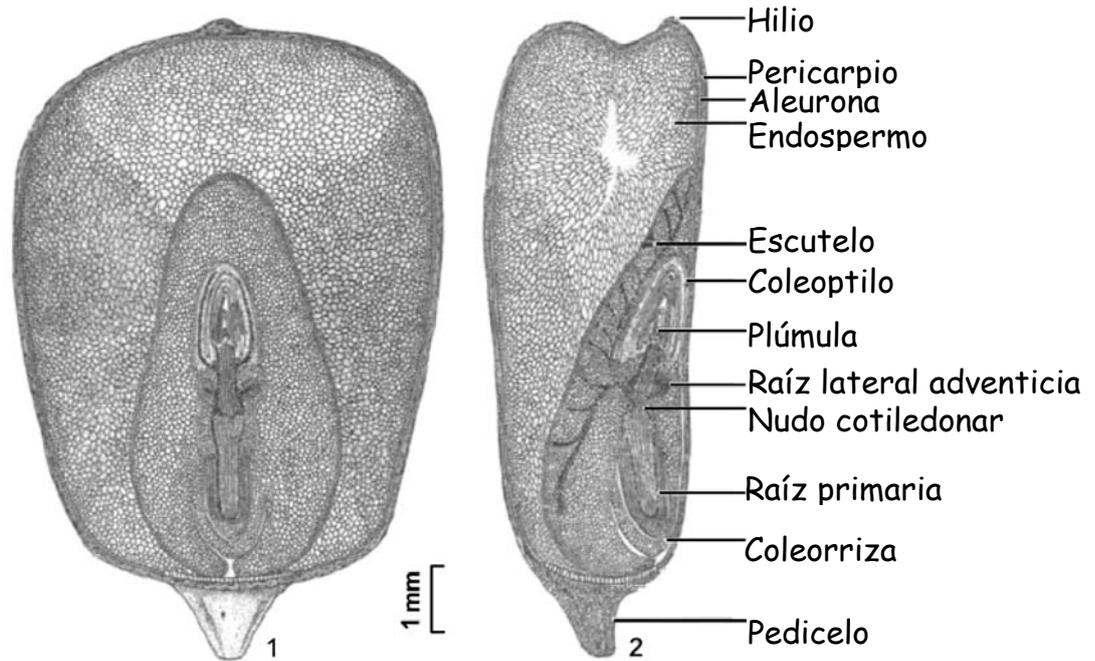


Figura 2. Estructura de una semilla de maíz madura: 1 y 2 son cortes de secciones verticales en dos planos de una semilla de maíz madura que muestran en detalle el arreglo de órganos y tejidos (Modificado a partir de Vincent, 2002).

#### 1.4 Germinación de la semilla de maíz.

La germinación comienza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula (Bewley y Black, 1994). Este evento involucra la activación de procesos físicos, químicos, bioquímicos y genéticos coordinados muy finamente tanto anatómica como temporalmente. Desde un punto de vista Bioquímico, se puede decir que la germinación es la reiniciación de la actividad metabólica y el crecimiento por parte de los tejidos que constituyen a la semilla; esto involucra una rehidratación, la utilización de reservas y el desarrollo gradual de sistemas sintéticos que transforman al embrión en una planta joven y que la capacitan para asumir una existencia autótrofa.

Durante la germinación, la secuencia de eventos fisiológicos y bioquímicos que parecen ser comunes a un gran número de semillas de gramíneas puede dividirse en i) Eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de proteínas, síntesis reparativa de DNA y síntesis de RNA; ii) Eventos tardíos: expansión celular, movilización de reservas y síntesis replicativa de DNA. Cada evento representa un estado potencial en el cual un sistema de control puede operar durante la germinación (Bewley y Black, 1994).

#### **1.4.1 Imbibición**

La toma de agua por la semilla madura es trifásica (ver fig. 3). El influjo inicial de agua (Fase I de la imbibición) es el resultado del bajo potencial de las matrices secas de la semilla (de las paredes celulares y de los componentes almacenados), los cuales rápidamente llegan a ser hidratados resultando en un plateau (fase II). Un mayor incremento en la toma de agua ocurre solo después de que la germinación ha terminado y comienza la formación de plántula (fase III). El influjo de agua hacia las células de la semilla seca durante la fase I causa temporalmente alteraciones estructurales, particularmente a las membranas, lo cual resulta en una rápida y temporal salida de iones y metabolitos de bajo peso molecular de la semilla.

La salida de solutos de las células de las semillas embebidas es indicativa de la transición de los componentes fosfolipídicos de la membrana durante la fase de gel que se originó durante la maduración y secado de la semilla, al estado de fase cristalina hidratada. Muy probablemente, en esta transición ocurre un proceso reparativo de las membranas celulares (Crowe *et al*, 1992).

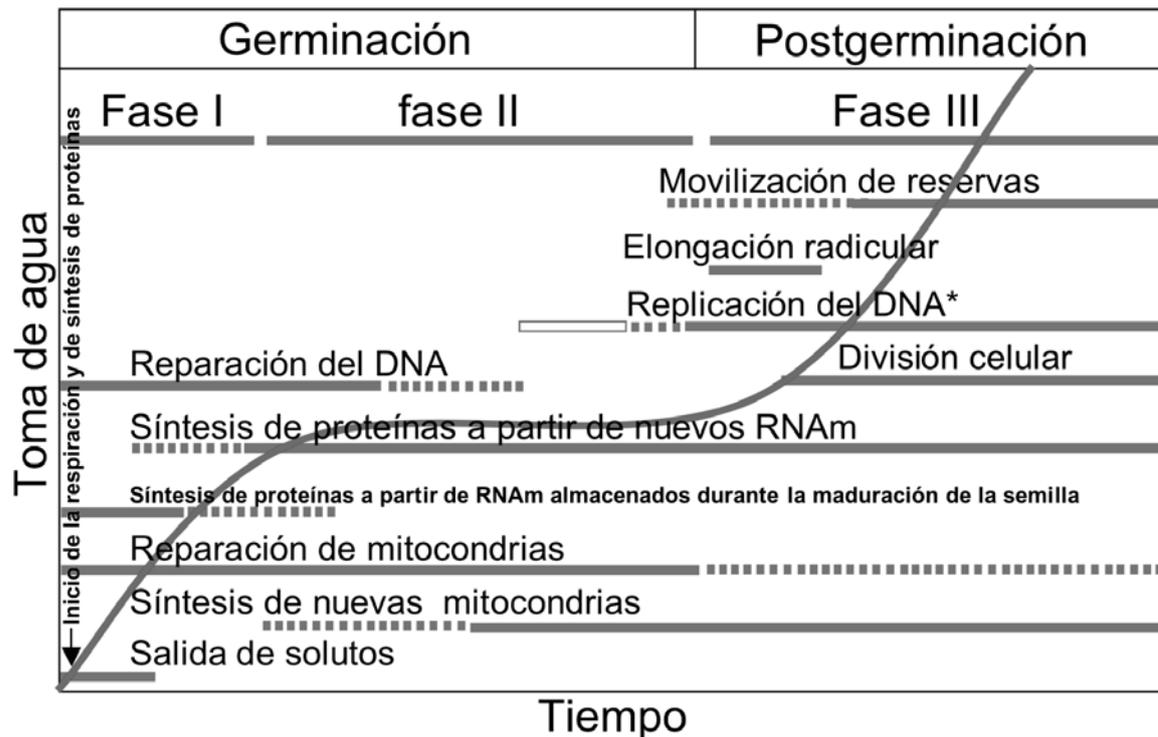


Figura 3. Curso temporal de eventos asociados a la germinación y postgerminación de semillas. El tiempo requerido para que los eventos sean completados varía desde algunas h a muchas semanas, dependiendo de factores genéticos inherentes y de factores ambientales prevalecientes, particularmente temperatura y disponibilidad de agua (modificado a partir de Bewley, 2001).

#### 1.4.2 Respiración y síntesis de ATP

Las semillas embebidas adecuadamente rápidamente reinician su actividad metabólica. Las enzimas y estructuras celulares esenciales para ello se establecieron durante la maduración de la semilla. Una de las primeras actividades que se reinician es la respiración, la cual puede ser detectada a los pocos min después de iniciada la imbibición (ver fig. 3). Las rutas glicolítica y de la vía oxidativa de las pentosas fosfato se reinician durante la fase I y las enzimas del ciclo de Krebs son reactivadas (Botha *et al*, 1992). Los tejidos de las semillas secas contienen mitocondrias y, aunque pobremente diferenciadas después de la maduración de las semillas, contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales para sintetizar cantidades adecuadas de ATP para mantener el metabolismo durante varias h en la imbibición.

### 1.4.3 Síntesis de RNA y proteínas

La síntesis de RNA es un evento temprano en la germinación (Datta *et al*, 1983). Las RNA polimerasas DNA dependientes no son enzimas limitantes, ya que se han encontrado en trigo, cebada y soya en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de RNAm tan pronto como se inicia la germinación (Bewley y Black, 1994).

El rápido aumento de la síntesis de proteínas durante las primeras etapas de la germinación es un evento independiente de la síntesis *de novo* de RNA mensajero (Spiegel y Marcus, 1975). En varias semillas de cereales se ha descrito la existencia de RNAm almacenados que se sintetizan durante la embriogénesis (Sánchez de Jiménez *et al*, 1981). Se ha sugerido que estos mensajeros almacenados se requieren en las etapas tempranas de la germinación para una rápida reiniciación de la actividad metabólica (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

### 1.4.4 Síntesis de DNA y división celular

La síntesis de proteínas y de RNA se reinicia tan pronto como los tejidos se embeben, pero la síntesis replicativa del DNA comienza más tarde. Este hecho se hace más evidente para la mayoría de las gramíneas; sin embargo, en centeno existe (desde los 15 min de imbibición) un bajo nivel de síntesis de DNA que precede a la síntesis replicativa, la cual se sugiere puede ser de tipo reparativo (Osborne *et al*, 1980/81).

Se ha sugerido que la síntesis de DNA en etapas tempranas de la germinación en semillas de centeno y maíz es el resultado de la replicación organelar (Meléndez *et al*, 1990) y/o de la síntesis reparativa del DNA nuclear (Osborne *et al*, 1984, Vázquez-Ramos y Osborne, 1986, Zaráin *et al*, 1987). La expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación de las células y su salida subsecuente podría o no estar acompañada por división celular. La replicación del DNA celular es un requisito indispensable para que la división celular proceda (Bewley y Black, 1994).

La síntesis replicativa del DNA requiere de la acción coordinada y concertada de múltiples factores proteicos y, propiamente, este evento inicia cuando el complejo de proteínas del mantenimiento de minicromosoma (MCM<sub>2</sub>-MCM<sub>7</sub>), con su actividad de helicasa dependiente de ATP, genera DNA de cadena sencilla al desenrollar al DNA de doble cadena, lo cual atrae a la proteína de unión a cadena sencilla de DNA (RPA). La RPA de células humanas es un complejo de tres proteínas (p70, p34 y p11) y tiene como función estabilizar el DNA de cadena sencilla. Posteriormente, el complejo DNA polimerasa  $\alpha$ -primasa (pol  $\alpha$ ; p180, p70, p58 y p48) sintetiza un oligorribonucleótido de 12-18 unidades incorporando luego unas 2-3 decenas

de desoxirribonucleótidos en el DNA de cadena sencilla (ver fig. 4, paso 1), posteriormente, el Factor de Replicación C (RFC; p120, p40, p38, p37 y p36), mediante un proceso dependiente de ATP, posiciona al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, p28, un homotrímico) en la estructura de DNA molde-cebador desplazando así a la pol  $\alpha$  (ver fig. 4, paso 2); luego, la pol  $\delta$  (p125, p60, p50 y p12) interacciona mediante la subunidad p50 con PCNA y continua la síntesis del DNA en una forma procesiva (ver fig 4, paso 3).

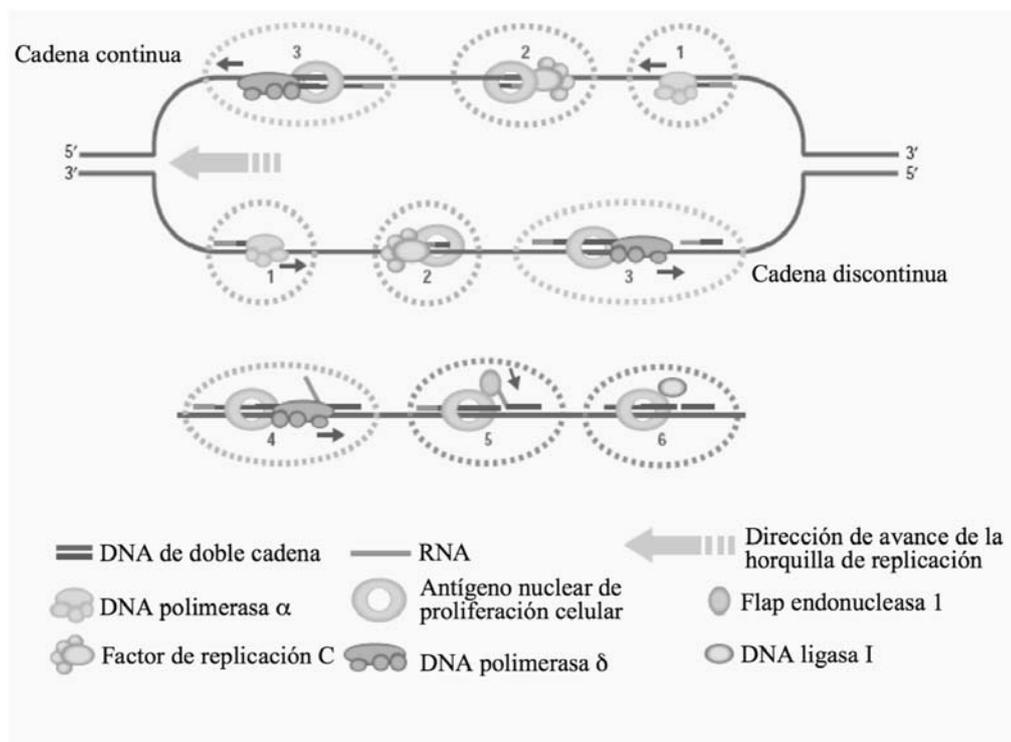


Figura 4. Replicación del DNA en eucariotes. Paso 1: Síntesis del cebador por la DNA polimerasa  $\alpha$  primasa; Paso 2: Desplazamiento de la DNA polimerasa  $\alpha$  primasa por el factor de replicación C y reclutamiento de PCNA; paso 3: Elongación de la cadena por la recién reclutada DNA polimerasa  $\delta$ ; paso 4: Desplazamiento de la cadena por la pol  $\delta$ ; Paso 5: Corte del RNA-DNA que sirvió como cebador por la Flap endonucleasa I; paso 6: Unión de los fragmentos de Okazaki por la DNA ligasa I (Modificado a partir de Heneke *et al*, 2003).

Mientras tanto, en la cadena discontinua el complejo PCNA-pol  $\delta$  se va reensamblando continuamente; este proceso involucra, primero, la extensión del cebador RNA-DNA que sintetizó la pol  $\alpha$  para generar los fragmentos de Okazaki. Posteriormente, cuando la pol  $\delta$  encuentra un cebador durante el paso de elongación, éste es desplazado, dejando así una estructura RNA-

DNA de cadena sencilla (ver fig 4, paso 4). Posteriormente, PCNA une a la proteína "flap" endonucleasa 1 (Fen 1; p46), enzima con actividad de exo/endonucleasa 5'-3' y ésta corta al cebador previamente desplazado por la pol  $\delta$  (ver fig 4, paso 5). Finalmente, PCNA recluta a la DNA ligasa I (lig I; p98) y ésta une a 2 fragmentos de Okasaki, con lo cual se "maduran" los fragmentos de Okazaki en un DNA de alto peso molecular (ver fig 4, paso 6). Debido a que la longitud de los fragmentos de Okazaki es de aproximadamente 200 bases, este proceso ocurre más de  $2 \times 10^7$  veces por evento de replicación en el genoma humano (Heneke *et al*, 2003).

### 1.5 DNA polimerasas

La noción de la complejidad de los muy variados procesos necesarios para replicar y mantener un genoma se ha evidenciado de manera muy considerable en los años recientes con el descubrimiento de nuevas DNA polimerasas que tienen características muy especiales. Históricamente, las DNA polimerasas de mamíferos han sido designadas con letras del alfabeto griego. Cuando la DNA polimerasa  $\alpha$  fue descubierta hace más de 40 años, se creía que ésta era la responsable de replicar todo el genoma humano (casi  $3 \times 10^9$  pb). Actualmente, y gracias a la secuenciación completa de varios genomas, se sabe que en las células de eucariotes superiores (como las de humano), existen al menos 14 DNA polimerasas diferentes, mientras que en *Arabidopsis thaliana* existen 12 (Burgers *et al*, 2001, Bebenek y Kunkel 2002). Todas las DNA polimerasas tienen la función de asegurar la incorporación de los 4 desoxinucleótidos (dAMP, dCMP, dGMP y dTMP) sobre un molde materno de acuerdo a las reglas de apareamiento de Watson y Crick. En todos los organismos eucariotes y procariotes estudiados se ha detectado actividad de DNA polimerasa y, aunque las propiedades físicas, químicas y biológicas varían de especie a especie, todas las DNA polimerasas comparten las siguientes características:

- 1.-Requieren de un cebador que proporcione un extremo 3'-OH, generalmente de naturaleza ribonucleica, el cual es sintetizado por un tipo especial de RNA polimerasa, denominada DNA primasa.
- 2.-Necesitan de un molde de DNA para la incorporación de los nucleósidos monofosfatos.

3.-Polimerizan en dirección 5'→3' y

4.-Requieren de un catión divalente,  $Mg^{++}$  o  $Mn^{++}$  (Kornberg y Baker, 1992).

Sin embargo, es muy poco lo que se sabe de la regulación de la replicación del DNA en plantas, y en particular durante la germinación. Bewley y Black (1994) sugieren que tanto la actividad como los niveles de DNA polimerasas pueden ser factores que controlen el proceso germinativo.

### 1.5.1 Clasificación de las DNA polimerasas

Las DNA polimerasas pueden ser clasificadas en 6 principales grupos basados en relaciones filogenéticas con las DNA pol I, II y III de *E. coli* (clases A, B y C respectivamente), Pol II Euriarqueótica (clase D), DNA polimerasa  $\beta$  de humano (clase X) y UmuC/DinB de *E. coli* (clase Y). Todas las enzimas eucariotas son de las clases A, B, X o Y (ver tabla I) y hasta ahora no se han encontrado polimerasas eucariotes de clase C o D.

Tabla 1. Ortólogos de DNA polimerasas (pols) de humano en 4 organismos eucariotes completamente secuenciados. Las pols son agrupadas por clase y por función (Tomado de Burguers *et al*, 2001).

Clase		H. sapiens No de acceso/ aa	D. melanogaster No de acceso/aa	C. elegans No de acceso/aa	S. pombe No de acceso/aa	A. thaliana No de acceso/ aa
B	$\alpha$	CAA29920/1462	AAB24152/1443	CAB97239/1443	Pol1/1465	BAB10944/1492
	$\delta$	AAA58439/1107	CAA61369/1092	CAB04077/1081	Cdc6/1086	BAA96899/1037
	$\epsilon$	AAC19148/2286	BAB17608/2220	CAB04263/2144	Cdc20/2199	AAC77870/2154
	$\xi$	AAB88486/3130	AAF59191/1869	AAK31564/1154	SPAC688/1480	AAG 52299/1871
X	$\beta$	BAA06099/335	-	-	-	-
	$\lambda$	CAB65074/575	-	-	-	CAC21394/529
	$\mu$	AAF26284/494	-	-	SPAC2F7.06c/506	-
	$\sigma$	BAA24434.2/542	AAF51794/1059 AAF54198/407	CAB02138/848	cid14/616 cid12/336 cid11/405 cid11/478	BAB09549/533
Y	$\eta$	BAA81666/713	AAF51794/885	AAB70988/603	Eso1/872	AAC79146/689
	$\iota$	AAD50381/715	AAF54198/737	AAA65458/598	SPCC553.07c/547	AAF76444/435
	$\kappa$	AAF02540/870	-	CAA86844/1027	SPBC215.16c/935	AAC79145/955
	Rev1	Rev1-bab21441250	AAF47401/995			
A	$\gamma$	BAA12223/1239	AAC47658/1145	CAB60771/1072	Mip1/1018	-
	$\theta$ otras pol	AAK39635/2724	AAF54858/2059	AAB93325/1208		CAB79987/1548 AAG50942/1067 BAB01162/1088

Las DNA pols  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  son esenciales para la replicación del genoma nuclear y la pol  $\gamma$  lo es para el genoma mitocondrial. Las demás pols descritas hasta ahora ( $\beta$ ,  $\xi$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\chi$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$  y Rev 1), son enzimas que participan en diferentes tipos de síntesis reparativa del DNA, por lo cual, en el presente capítulo el estudio se centrará en la pol  $\alpha$ , enzima que contiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa y la DNA pol  $\delta$ , enzima que se encarga de sintetizar la mayor parte del DNA genómico.

### 1.5.2 Función de la pol $\alpha$

La pol  $\alpha$  es la única pol que contiene asociada una actividad de DNA primasa, por ello es considerada la enzima que provee los cebadores para la iniciación de la síntesis de DNA en la cadena líder y en los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada (Foiani *et al*, 1997).

### 1.5.3 Estructura de la pol $\alpha$ , subunidades y funciones catalíticas

La pol  $\alpha$  tiene 4 subunidades: de 180 kDa (subunidad catalítica), de 70 kDa (Foiani *et al* 1994, Collins *et al* 1993), de 58 kDa, estas dos últimas sin actividad catalítica detectable y una subunidad de 48 kDa, responsable de la actividad de DNA primasa (Copeland y Wang 1993, Schneider *et al* 1998). En relación a la función de las subunidades de 70 y 58 kDa, Mizuno *et al*, mediante transfecciones triple y cuadruple de las subunidades que conforman a la pol  $\alpha$  en células de mamífero en cultivo, determinaron los dominios de interacción entre las 4 subunidades en detalle, estableciendo los dominios funcionales de la subunidad p180, lo cual les llevó a proponer un modelo de interacción estructural para el complejo de la pol  $\alpha$ -primasa (ver fig. 5); además, mostraron evidencia de que la subunidad p70 facilita la translocación de la subunidad p180 hacia el núcleo como un heterodímero p180-p70 y la subunidad p58 acarrea a p48 hacia el núcleo.

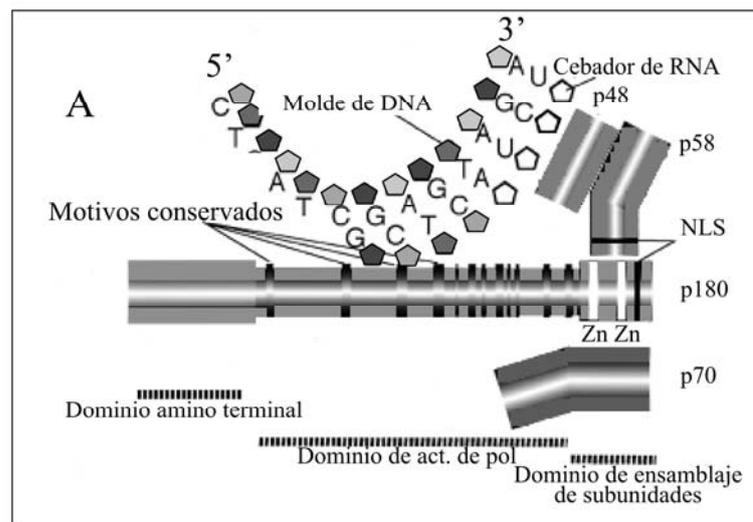


Figura 5. Arquitectura molecular del complejo DNA polimerasa  $\alpha$ -primasa de mamíferos. Interacción entre las subunidades que conforman al complejo de DNA polimerasa  $\alpha$ -primasa e interacción de p180 y p48 con el DNA molde-cebador (NLS; señal de localización nuclear, modificado a partir de Mizuno *et al*. 1999).

### 1.5.4 Propiedades básicas de las DNA primasas

Con la reciente explosión de la secuenciación de genomas de diferentes organismos se han descubierto una gran cantidad de proteínas que poseen una similitud significativa a las DNA primasas descritas hasta ahora. La

mayoría de las DNA primasas pueden ser clasificadas en uno de 2 grandes grupos. Un grupo contiene las DNA primasas de bacterias y sus fagos y el segundo grupo incluye a las DNA primasas de eucariotes. Todas las DNA primasas comparten muchas propiedades, pero las proteínas de las dos clases difieren tanto en estructura como en su relación con otras proteínas en el complejo de replicación. Las primasas de procariotes normalmente se encuentran asociadas con la DNA helicasa replicativa, mientras que las DNA primasas eucariotas son encontradas como complejos asociadas a la DNA polimerasa- $\alpha$ . La DNA primasa cataliza la síntesis de oligorribonucleótidos de 12 a 18 unidades, los cuales son a su vez utilizados como cebadores por las DNA pols replicativas (Frick y Richardson, 2001).

### **1.5.5 Relevancia de la formación del cebador durante la síntesis de DNA**

Una de las reglas básicas de la replicación es que las DNA polimerasas no pueden comenzar la síntesis del DNA *de novo*, a menos que exista un dispositivo de cebado. Cada evento de iniciación requiere de un cebador (Kornberg y Baker 1992).

Las polaridades opuestas de las dos cadenas del DNA duplex y la exclusividad en la dirección de síntesis (5'→3') por las DNA polimerasas implican un intrincado proceso que llevó a proponer un modelo de replicación del DNA de manera semidiscontinua (Ogawa y Okazaki, 1980). De acuerdo a este modelo, una cadena de DNA es sintetizada de manera continua mientras que la otra lo es en fragmentos de 1,000-2,000 nt en procariotes y de 100 a 200 nt en eucariotes, los cuales son subsecuentemente unidos para producir un DNA duplex completo (ver fig. 4); por lo anterior, el mecanismo usado para el cebado de la síntesis de la cadena continua podría diferir del de la cadena retrasada.

Los detalles del papel de la DNA primasa en la replicación en la cadena retrasada se muestran en la fig. 6.

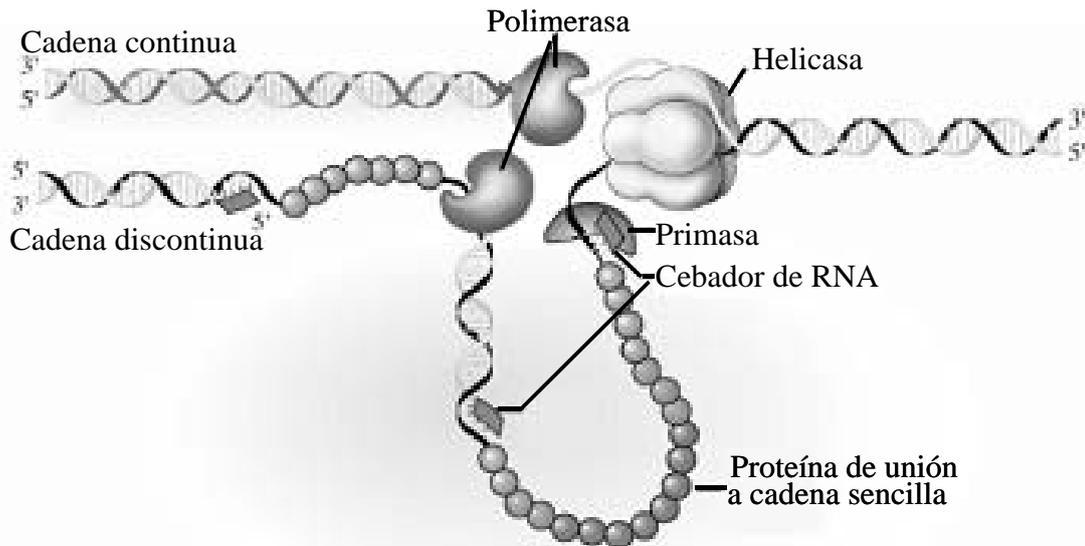


Figura 6. Papel de la DNA primasa en la replicación semidiscontinua del DNA. Se muestra una horquilla de replicación progresando de izquierda a derecha para copiar un DNA duplex (en negro/gris). Debido a que las 2 cadenas están orientadas en polaridades opuestas, solo la cadena líder (en rojo) es sintetizada en forma continua, mientras que la cadena retrasada (en amarillo) es sintetizada de manera discontinua. Si las dos DNA polimerasas requeridas mantienen contacto para coordinar sus actividades, se forma una estructura tipo asa en la cadena retrasada. La DNA helicasa (en gris) separa la doble hélice a cadena sencilla, la cual es estabilizada por proteínas de unión a cadena sencilla (en azul). La primasa (en morado), sintetiza los iniciadores en la cadena retrasada, los cuales son transferidos periódicamente a la DNA polimerasa (en rojo) (Modificado a partir de Frick y Richardson 2001).

La razón por la que las células utilizan RNA en lugar del DNA para comenzar la síntesis, podría ser debido a que de esta manera se logra una total fidelidad en la replicación dado que en, o cerca del inicio del origen de la replicación, la maquinaria diseñada para construir DNA a prueba de errores y, en su caso, corrección de los mismos puede no funcionar tan eficazmente como cuando lo hace durante la elongación de la cadena. Los RNA mensajeros son diseñados para ser transitorios, mientras que el DNA es esencialmente imborrable. Entonces, el comienzo de una cadena marcada por un híbrido RNA-DNA "extraño" puede ser fácilmente reconocido y eliminado, seguido de una replicación a prueba de error (Kornberg y Baker, 1992). Uno de los sistemas en donde se han estudiado extensivamente las características de la DNA primasa es *E. coli*, por lo cual en el siguiente punto se resumen las propiedades de esta enzima.

### 1.5.6 DNA primasa de *E. coli*

La DNA primasa de *E. coli* es codificada por el locus *dnaG*, es una enzima esencial para la replicación del DNA. Estudios de mutantes *dnaG* indican que la primasa participa en la iniciación de la síntesis de los fragmentos de Okazaki y en la replicación de varios cromosomas colifágicos, tales como  $\phi$ X174, T4 y fagos similares al G4. *In vitro*, la primasa sintetiza pequeños cebadores de RNA o híbridos RNA-DNA en ssDNA; es una enzima monomérica de 60 kDa, la cual ha sido purificada a homogeneidad. El gene *dnaG* ha sido clonado, la secuencia determinada y la enzima sobreexpresada por técnicas de DNA recombinante.

La conversión del cromosoma ssDNA del fago G4 (molde que tiene los requerimientos más simples para medir actividad de DNA primasa) a la forma replicativa (DNA duplex), provee un ensayo directo de la función de primasa *in vitro*, ya que es una reacción que requiere de la proteína de unión a cadena sencilla (SSB), los 4 rNTPs y  $Mg^{++}$ . En este molde, la primasa sintetiza un cebador de RNA de 26-29 nt de longitud en el origen de la cadena complementaria del fago G4. La DNA polimerasa III holoenzima, en una manera dependiente de ATP, se une al molde (previamente cebado) y extiende procesivamente el cebador a la forma replicativa. La relativa simplicidad para estudiar la replicación del fago G4 *in vitro* lo hace un sistema atractivo para estudiar los mecanismos de acción de la primasa (Kornberg y Baker 1992).

### 1.5.7 DNA primasa de eucariotes

La DNA primasa de eucariotes típicamente copurifica como un complejo de las 4 proteínas ya descritas arriba y se identifica con las 2 subunidades de 48 y 58 kDa. La subunidad más pequeña contiene el sitio activo para la síntesis del cebador. Los genes que codifican las 4 subunidades del complejo pol  $\alpha$  han sido identificados en humano, rata, ratón, *Drosophila*, levaduras y más recientemente en *A. thaliana* y arroz.

Experimentos de interrupción génica en los genes *pri1* y *pri2* de levadura (que codifican para las subunidades de 58 y 48 kDa respectivamente), han demostrado que estas mutaciones son letales (Francesconi *et al*, 1989; Lucchini *et al*, 1987; Foiani *et al* 1989). A pesar de la homología de los polipéptidos de primasa en levadura y ratón, estudios de complementación *in vivo* demostraron que ninguna de las dos subunidades silvestres de ratón son capaces de rescatar el fenotipo causado por mutaciones letales o temperatura-sensible en los genes *pri1* o *pri2* de levadura, indicando que estas proteínas (aún cuando son estructural y funcionalmente muy similares), podrían estar involucradas en interacciones específicas de

especie durante la replicación del DNA (Santocanale *et al*, 1992). Los genes que codifican para las subunidades de la primasa en levadura están presentes como copia única y son esenciales.

La primasa de *D. melanogaster* sintetiza oligorribonucleótidos de una longitud de  $12 \pm 2$  unidades, ya sea sola o como parte del complejo polimerasa-primasa, mientras que las primasas de levadura y ratón sintetizan oligorribonucleótidos de 8-12 unidades. Cuando la síntesis de DNA es bloqueada, ya sea por la ausencia de dNTPs o de la polimerasa, se generan multímeros de longitud característica (e.g. 24-36 unidades). La síntesis de multímeros (al menos para la primasa de levadura) requiere de la disociación y re-unión de la proteína al molde, seguido de una segunda ronda de síntesis de monómeros. Esto parece indicar que la DNA primasa de eucariotes, a diferencia de la de procariotes, "cuenta" la longitud del primer, más que reconocer una secuencia específica del DNA (Kornberg y Baker, 1992).

Los cebadores son iniciados con una purina, la  $K_M$  para esos sustratos es alta, variando de 1 a 5 mM para ATP y y cerca de 10 veces menos para GTP. El ATP es usado cerca de 4 veces más comunmente que el GTP, pero esta preferencia es influenciada por la concentración de los diferentes NTPs y por la secuencia del molde. La mayoría de las primasas pueden usar dNTPs en lugar de rNTPs en todas las posiciones, excepto en la posición inicial (Kornberg y Baker 1992).

**1.5.8. Requerimientos para medir actividad de DNA primasa**  
Generalmente, la actividad de DNA primasa es ensayada bajo condiciones diferentes a las de DNA polimerasa  $\alpha$ . La fuerza iónica que requiere la primasa es generalmente menor que la que requiere la polimerasa. El molde sintético preferido por la primasa es poli-dC (Yagura *et al*, 1982; Gronostajski *et al*, 1984), seguido por poli-dT (Plevani *et al*, 1984, Grosse y Krauss 1985, Yamaguchi *et al*, 1985). Poli-dG y poli-dA no son reconocidos por el complejo polimerasa-primasa (Sing y Dumas 1984). Holmes *et al* (1985) sintetizaron moldes de composición definida utilizando desoxinucleotidil transferasa terminal en los cuales se añadía oligo-dC u oligo-dT de longitudes variables, covalentemente unidas al extremo 5-'OH terminal de poli-dA o poli-dI respectivamente. Dado que el complejo polimerasa-primasa no se une ni a poli-dA ni a poli-dI, el oligo-dC y el oligo-dT representan la única parte relevante del molde para la unión del complejo polimerasa-primasa con el DNA. De esta forma, los autores pudieron definir la longitud mínima requerida de oligo-dC u oligo-dT para ser aceptada como sitio de iniciación; el complejo polimerasa-primasa requiere

de al menos un oligo-dT de 4 unidades unido covalentemente al poli-dI, mientras que requiere de un oligo-dC de al menos 8 residuos de longitud.

La afidicolina, inhibidor competitivo (por dCTP) de la DNA polimerasa  $\alpha$  (Tseng y Ahlem 1983, Spadari *et al*, 1983), tiene poco efecto inhibitorio sobre la incorporación de rNTPs en la reacción de cebado. Por otro lado, la actividad de primasa es muy sensible a N-etilmaleimida [(NEM), Wang *et al*, 1984; Yamaguchi *et al*, 1985]. La adición de dNTPs en la mezcla de reacción reduce la incorporación de rNTPs por el complejo polimerasa-primasa en un 50% (Wang *et al*, 1984). Ocasionalmente, dNMPs pueden ser incorporados en lugar de rNMPs en reacciones *in vitro* cuando el ribonucleótido necesario está ausente (Yamaguchi *et al*, 1985).

### 1.5.9 DNA polimerasa $\alpha$ de plantas

Se ha reportado la caracterización parcial de DNA polimerasas tipo  $\alpha$  de coliflor (Fukasawa *et al*, 1980), maíz (Coello *et al*, 1992; Coello *et al*, 1994; Coello y Vázquez-Ramos 1995), chícharo, (Chivers y Bryant, 1983; Bryant *et al*, 1992) *Vinca minor* (Gardner y Kado 1976), arroz (Amileni *et al*, 1979), espinaca (Misumi y Weisbach 1982), remolacha (Tymonko y Dunham 1977), nabo (Dunham y Bryant 1986) y trigo (Castroviejo *et al*, 1979; Graveline *et al*, 1984; Laquel *et al*, 1990; Laquel *et al*, 1994), pero solo algunos de éstos la ha reportado asociada con una actividad de DNA primasa.

### 1.5.10 DNA primasa de plantas

El conocimiento que se tiene sobre DNA primasas de plantas es muy limitado todavía; sin embargo, los pocos reportes que existen a la fecha indican que éstas tienen bastante similitud con las de su contraparte animal. El primer estudio que se publicó sobre DNA primasa de vegetales fue el de Graveline *et al* en 1984, donde reportaron el aislamiento de una primasa de trigo de peso molecular de 90 kDa, sin embargo, en una purificación más exhaustiva, posteriormente, Laquel *et al* (1994), obtuvieron un enriquecimiento de dos bandas de 60 y 50 kDa, pesos moleculares que son muy parecidos a los de las subunidades de DNA primasa de animales y levaduras. La enzima sintetiza preferencialmente oligonucleótidos de 8-12 unidades, no es inhibida por afidicolina y utiliza como molde poli-dT y DNA de cadena sencilla del fago M13, no utiliza poli-dC, poli-dA ni poli-dG; las mejores condiciones para el ensayo de primasa se obtuvieron a una concentración de 1-5 mM de  $Mg^{++}$ , 0-15 mM de KCl, 0.2 mM de  $Mn^{++}$ , pH 8.0 y temperatura de 37 °C. Por otro lado, Bryant *et al* (1992), demostraron que una actividad de DNA primasa asociada a un complejo de alto peso molecular en chícharo contenía tanto la actividad de la pol  $\alpha$  como de DNA primasa, sin embargo, no pudieron mostrar una evidencia directa de formación de

oligorribonucleótidos debido a la presencia de una ribonucleasa en el complejo multiproteico. Otro de los sistemas vegetales donde se ha detectado actividad de primasa ha sido en cloroplastos de chícharo (Nielsen *et al*, 1991), ésta presenta un peso molecular de 115-120 kDa, tiene afinidad por los moldes poli-dC, poli-dT y por DNA de cadena sencilla del fago M13, pero no tiene afinidad por los moldes de poli-dA ni de poli-dG. Las mejores condiciones para el ensayo se obtuvieron utilizando una concentración de 8-12 mM de Mg<sup>++</sup>, pH 8.0, 25-75 mM de NaCl, no es inhibida por afidicolina y sí lo es por NEM. Hasta ahora solo existe un reporte de purificación a homogeneidad de DNA primasa de plantas (en *N. tabacum*) y consta de 2 subunidades; de 53 y 63 kDa, pesos moleculares que son similares a los reportados en animales y levaduras. En moldes de poli-dT o de ssDNA del fago M13, la DNA primasa de tabaco cataliza principalmente la síntesis de cebadores de 8-14 nt. Las condiciones óptimas de ensayo de la DNA primasa de tabaco son: 10-50 mM de Mg<sup>++</sup>, 0-10 mM de KCl, pH 8.5 y 1 mM de ATP, es resistente a afidicolina y rifampicina, pero es fuertemente inhibida por NEM (García-Maya y Buck, 1998).

#### 1.5.11 DNA polimerasa delta (pol $\delta$ )

La pol  $\delta$  es una enzima que se describió inicialmente en 1976 por Byrnes *et al*. Este grupo de investigación purificó la enzima a partir de médula ósea de conejo como un complejo heterodimérico de 125 y 50 kDa (p125 y p50 respectivamente), con una actividad de exonucleasa 3'-5' asociada. Posteriormente, Goscin y Byrnes (1982) demostraron que la subunidad p125 es la responsable tanto de la actividad de pol como de exonucleasa. Es la más pequeña de las pols replicativas eucariotes (pols  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ). Estudios más recientes muestran que la pol  $\delta$  es un complejo heterotrimérico en *S. cerevisiae* (p125, p58 y p55, Burgers y Gerik, 1998), en mamíferos es heterotetramérico (p125, p66, p50 y p12, Mo *et al*, 2000), mientras que en *S. pombe* es heteropentamérico (p125, p55, p54, p40 y p22, Zuo *et al*, 1997). La comparación de la secuencia primaria de aminoácidos muestra que la pol  $\delta$  (entre las pols replicativas), es la más conservada (Chuen-Sheue y Lehman, 1995). La pol  $\delta$  de humano contiene un 93% de identidad respecto a la de ratón, mientras que con la de *S. cerevisiae* es de 49%. La pol  $\delta$  es la enzima responsable de llevar a cabo la síntesis de DNA en la cadena continua y en la discontinua en ensayos de replicación del DNA del virus SV40 (Waga y Stillman, 1994). La pol  $\delta$  *per se* es distributiva (incorpora solo unos cuantos dNMPs), sin embargo en presencia de PCNA, es altamente procesiva (incorpora hasta miles de dNMPs por evento de unión a DNA). Pol  $\delta$  participa además en procesos de reparación y recombinación del DNA. En todos estos eventos la pol  $\delta$  siempre interacciona físicamente con PCNA, ya

sea con la subunidad catalítica (Zhang *et al*, 1999), la subunidad p66 (Pohler *et al*, 2005) y/o con la subunidad p12 (Hao *et al* 2006), aunque existe también un reporte que indica que p50 interacciona directamente con PCNA (Lu *et al*, 2002). Durante la replicación del DNA, PCNA se sitúa detrás de la pol  $\delta$  (ver fig. 7) en la doble cadena, según el modelo propuesto por Mozzerhin *et al* (1999).

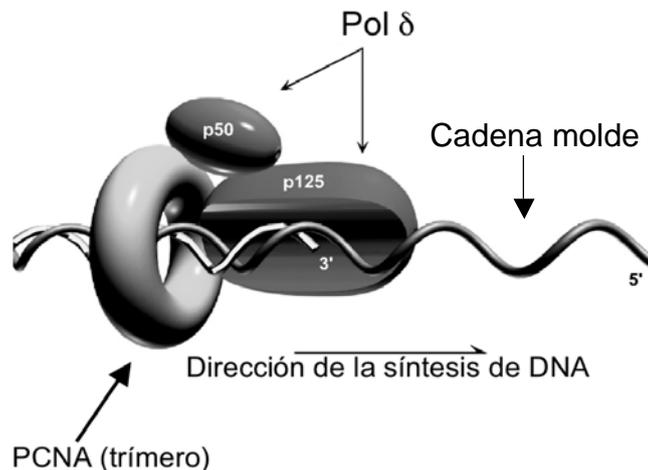


Figura 7. Modelo del complejo pol $\delta$ -PCNA-DNA presente durante la polimerización del DNA. En verde se muestra PCNA en su forma trimérica, en café a la cadena molde, en amarillo al cebador y en azul al "core" de la pol  $\delta$  de mamífero (Tomado de Mozzerhin *et al*, 1992).

#### 1.5.12 DNA Pol $\delta$ de plantas.

El conocimiento que se tiene de las DNA pols replicativas de plantas (comparado al de mamíferos) es muy reducido todavía, aunque en años recientes las secuencias nucleotídicas completas de pols tipo  $\delta$  de soya (*Glicine max*), arroz (*Oriza sativa*) y *Arabidopsis thaliana* han sido reportadas (números de acceso al banco de datos; AAC18443, BAA99573 y NP\_201201 respectivamente), mientras que para maíz (*Zea mays*) se reportó un cDNA con un marco de lectura abierto de 2072 pb del extremo 3'OH (número de acceso; AY109773). Los primeros estudios bioquímicos que reportaron la existencia de una pol tipo  $\delta$  en plantas se realizaron en trigo; esta enzima tiene un peso molecular de 124 kDa, comparte algunas características cinéticas de las pols  $\delta$  de animales y es estimulada por PCNA de origen humano (Richard *et al*, 1991; Laquel *et al*, 1993; Luque *et al*, 2000).

En el año 2002, Uchiyama *et al* reportaron la caracterización de la subunidad catalítica de la pol  $\delta$  de arroz (p124; Ospol $\delta$ 1) y de la subunidad p48 (Ospol $\delta$ 2). Los análisis de expresión por "northern blot" mostraron que la expresión de Ospol $\delta$ 1 y Ospol $\delta$ 2 es muy alta en tejidos proliferativos de

plántulas de arroz y también en hojas maduras sobreexpuestas a luz UV. Sin embargo, cuando buscaron la presencia de la proteína en los diferentes tejidos de la planta mediante inmunoensayos tipo "western blot" con anticuerpos policlonales generados contra 344 aa del extremo carboxilo de Ospol $\delta$ 1, no pudieron identificarla, probablemente debido a que la proteína se encuentra en muy baja proporción. El único tejido en donde fue posible detectarla fue en extractos crudos de cultivos de células en suspensión.

### **Antecedentes experimentales**

En nuestro laboratorio hemos descrito la existencia de 2 actividades de DNA pols organelares (Vázquez-Ramos y Martínez, 1994) y 3 DNA pols nucleares solubles en ejes embrionarios de maíz, a estas últimas se les denominó DNA polimerasas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden de elución en un fraccionamiento con un gradiente de fosfato de potasio en DEAE-celulosa (Coello *et al*, 1992). La actividad de la pol 1 no varía durante las primeras 24 h de imbibición de las semillas, fue purificada aproximadamente 5,000 veces y tiene características de pol tipo  $\delta$  (Zmpol $\delta$ ) dado que prefiere moldes sintéticos de polidA-oligodT<sub>12-18</sub> y es estimulada por ZmPCNA e inhibida por afidicolina y NEM (inhibidores típicos de las pols  $\delta$  y  $\epsilon$ ), mientras que la pol 2 fue purificada aproximadamente 8, 000 veces y tiene características de pol tipo  $\alpha$  (Zmpol $\alpha$ ) debido a que contiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa. La DNA pol 3 fue purificada aproximadamente 700 veces y tiene cierta similitud con la DNA pol tipo  $\beta$  (García *et al*, 1997). Zmpol $\alpha$  es la enzima que más se ha estudiado en nuestro laboratorio, su actividad se incrementa notablemente de 0 a 24 h de imbibición, es regulada por fosforilación durante la germinación y esto coincide con el incremento en actividad en la fase S del ciclo celular (Coello y Vázquez-Ramos 1995a, 1995b), la subunidad catalítica tiene un peso molecular aparente de 90 kDa, aparentemente la cantidad de ésta no varía durante la germinación y es parte de una holoenzima de aproximadamente 450 kDa (Coello-Coutiño *et al*, 1994).

La presente investigación representa una continuación de los estudios de las DNA polimerasas replicativas de maíz que nuestro grupo ha realizado ya por varios años. En particular, la caracterización de la actividad de DNA primasa como una parte de la pol 2 permitirá su clasificación inequívoca como una pol de tipo  $\alpha$ . Por otra parte, la pol 1 tiene características de pol  $\delta$ , sin embargo, se requiere un trabajo mucho más exhaustivo para poder definirla como tal de forma concluyente. De esta manera, este trabajo se divide en dos partes, una que representa los esfuerzos para determinar que a la Zmpol $\alpha$  se asocia una DNA primasa y su correspondiente caracterización, y la otra, los estudios de expresión del RNAm y de la

proteína de Zmpol $\delta$  en ejes embrionarios de maíz durante la germinación, así como la identificación de ésta en diferentes tejidos de semilla y de plántula de maíz.

## **Capítulo II**

**Caraterización de la DNA primasa asociada a la DNA pol 2 (tipo  $\alpha$ ) de maíz**

## Objetivos

### General

Determinar la asociación de una DNA primasa con la pol 2 (tipo  $\alpha$ ) de maíz y describir los parámetros bioquímicos que la definen. Describir la posible interacción de la DNA primasa con las DNA pols 1 (tipo  $\delta$ ) y 2 de maíz durante la síntesis de DNA.

### Específicos

- A) Establecer las condiciones bioquímicas para separar la actividad de DNA primasa de la actividad de pol 2.
- B) Identificar la subunidad de la pol 2 responsable de la síntesis del cebador.
- C) Determinar el tamaño del cebador sintetizado por la DNA primasa.
- D) Analizar el efecto de la interacción de las pols 1 y 2 con la DNA primasa sobre la longitud del oligorribonucleótido sintetizado.
- E) Determinar la capacidad de las pols 1 y 2 para utilizar el oligorribonucleótido sintetizado por la DNA primasa tanto en un molde de DNA sintético (polidA-oligodT<sub>11-18</sub>) como en un molde de DNA natural, circular, covalentemente cerrado y de cadena sencilla.

## **2.1 Material y Métodos**

### **Material biológico**

Las semillas de maíz variedad chalqueño utilizadas en este trabajo fueron obtenidas directamente de un agricultor del Valle de Chalco y presentaron una viabilidad mayor al 95%.

### **Soluciones amortiguadoras y reactivos**

#### **Solución amortiguadora para imbibición de ejes embrionarios**

Tris-HCl pH 7.4 50 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa 2%, cloranfenicol 10 μM.

#### **Solución amortiguadora para homogenar ejes embrionarios**

Tris-HCl pH 7.6 40 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.6 40 mM, KCl 15 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, sacarosa 250 mM, 1 tableta del cocktail inhibidor de proteasas (Roche)/50 mL.

#### **Soluciones amortiguadoras utilizadas en la purificación parcial de la pol 1 y de la DNA primasa**

##### **Solución amortiguadora A**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.6 40 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 1 mM, 1 tableta del cocktail inhibidor de proteasas (Roche)/200 mL.

##### **Solución amortiguadora B**

Igual que la sol. A, excepto que la concentración de fosfatos es de 400 mM.

##### **Solución amortiguadora C**

Igual que la sol. A, excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 150 mM.

##### **Solución amortiguadora D**

Igual que la sol. C, excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 1.5 M.

##### **Solución amortiguadora E**

Igual que la sol. A, excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 100 mM.

### **Solución amortiguadora F**

Igual que la sol. A, excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 1 M.

### **Solución amortiguadora G**

Igual que la sol. C, excepto que esta solución contiene una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0.5 M.

### **Solución amortiguadora H**

Igual que la sol. C, excepto que esta solución contiene una concentración de etilén glicol al 50% (v/v).

### **Solución amortiguadora para activación de DNA de timo de ternera de alto peso molecular**

Tris-HCl pH 7.4 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , BSA 0.5 mg/ml, DNA de timo de ternera 0.5 mg/ml.

### **Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa**

Tris-HCl pH 7.4 50 mM, KCl 15 mM,  $\text{MgCl}_2$  8 mM, dATP 0.1 mM, dCTP 0.1 mM, dGTP 0.1 mM, glicerol 5%, 2 mercaptoetanol 0.4 mM, DNA activado 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , [metil- $^3\text{H}$ ]-TTP (57 Ci/mmol) 5  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ .

### **Mezcla de reacción para el ensayo indirecto de DNA primasa, utilizando poli-dT como molde**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  8 mM, KCl 15 mM, glicerol 5%, DTT 1 mM, poli-dT 0.12  $A_{260}$  /ml, ATP 0.1 mM.

Complemento para la síntesis de DNA

[ $^3\text{H}$ ]-dATP 10  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ , DNA pol I de *E. coli* 20 u/mL.

### **Mezcla de reacción para determinar la longitud del cebador sintetizado por la DNA primasa utilizando poli-dT como molde ("mezcla de primasa")**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  8 mM, DTT 1 mM, poli-dT 0.5  $A_{260}$  nm/mL, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 10  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ .

### **Mezcla de reacción para determinar la síntesis de DNA en poli-dT**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  8 mM, DTT 1 mM, poli-dT 0.5  $A_{260}$  nm/mL, ATP 1 mM.

### **Complemento para la síntesis de DNA**

DNA pol I de *E. coli* (0.2-0.5 u), pol 1 (0.5-1 u) o pol 2 (0.5- 1 u)+ [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 10  $\mu$ Ci/mL.

### **Mezcla de reacción para determinar la síntesis de DNA en DNA circular de cadena sencilla, covalentemente cerrado (pWori)**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, DTT 1 mM, poli-dT 0.5 A<sub>260</sub> nm/mL, ATP, CTP, GTP yTTP 0.1 mM c/u + plásmido pWori 50  $\mu$ g/mL.

### **Complemento para la síntesis de DNA**

dCTP, dGTP yTTP 0.1 mM c/u, DNA pol I de *E. coli* (0.2-0.5 u), pol 1 (0.5-1 u) o pol 2 (0.5- 1 u)+ [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 10  $\mu$ Ci/mL.

### **Marcaje del oligo dT<sub>12-18</sub>, oligo<sub>8-32</sub> o DNA de alto peso molecular**

0.5-1.0 A<sub>260</sub> unidades de oligonucleótidos o DNA de alto peso molecular fueron previamente desfosforilados con fosfatasa alcalina y posteriormente, marcados en posición 5' -OH por la polinucleótido cinasa del fago T4 con 20  $\mu$ Ci de ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-ATP (Maniatis *et al*, 1983). Los productos marcados fueron separados de la marca no incorporada por filtración en columnas de 1 ml de sephadex G-25.

### **Líquido de centelleo**

2.2'-p-fenilen-bis[5-feniloxazol] (POPOP) 0.1 g, 2,5-difeniloxazol (PPO) 5 g, tolueno c.b.p. 1 Lt.

### **Gel de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturalizantes para deteminar la longitud del cebador**

Acrilamida:Bis acrilamida (30:0.8, 14%), Tris-borato pH 8.3 100 mM, EDTA 2 mM, urea 7 M.

### **Solución amortiguadora para aplicar la muestra de ácidos nucleicos al gel de poliacrilamida al 14%**

Azul de bromofenol 0.25% w/v, xilen cianol 0.25% w/v, sacarosa al 40% (peso/vol), formamida cbp 100 mL.

### **DNA polimerasa "trapping assay"**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM, DTT 20 mM, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 5 mM, glicerol 5%, BSA 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L, 5' BrdUTP 20  $\mu$ M, oligonucleótido-cebador:

5'-TCTCCATAATTTGACGGCCTGACTCACCAGGCCGTC<sup>OH</sup> 0.75  $\mu$ M u oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup> 0.75  $\mu$ M+ [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 10  $\mu$ Ci/mL.

### **DNA primasa "trapping assay"**

Tris-HCl pH 8.0 50 mM, DTT 2 mM,  $Mg(CH_3COO)_2$  8 mM, glicerol 5%, BSA 0.25  $\mu$ g/mL, 5' BrdUTP 20  $\mu$ M, oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup> 0.2  $\mu$ M, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP 10  $\mu$ Ci/mL.

## **Métodos**

### **Preparación de resinas**

Las resinas dietilaminoetil-sephacel (DEAE-sephacel), heparina HiTrap, fenil sefarosa HP, superdex 200 HR y Q-sefarosa fueron obtenidas de Pharmacia Biotech.

### **Imbibición de ejes embrionarios.**

Ejes embrionarios íntegros de las semillas de maíz fueron obtenidos manualmente (5-10 g peso seco), desinfestados con 30 ml de hipoclorito de sodio al 0.1 % durante 5 min, enjuagados con suficiente agua desionizada estéril, secados con un papel filtro estéril y colocados entre 2 discos de papel filtro Whatman # 1 en cajas petri, a manera de que quedara una capa homogénea. Se les colocó solución amortiguadora de imbibición a manera de que los discos de papel quedaran perfectamente humedecidos. La incubación se llevó a cabo en una estufa regulada a 25 °C durante 24 h.

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

### **Obtención del extracto celular**

Todas las operaciones en el proceso de purificación se realizaron a 4 °C en presencia de los inhibidores de proteasas recién preparados.

Los ejes embrionarios embebidos durante 24 h fueron resuspendidos en 2.5 volúmenes (relación peso fresco de ejes a volumen de solución), de solución amortiguadora de homogeneización. Se homogenaron un politrón PCU-2 por 2 veces por 30 seg a máxima velocidad en cada vez. El extracto se centrifugó a 7,500 x g durante 15 min. La pastilla obtenida de esta primera centrifugación fue resuspendida en 1.5 volúmenes de solución amortiguadora de homogeneización y se volvió a homogenar en el mismo politrón en las condiciones antes descritas. Se centrifugó a 7,500 x g durante 15 min, el sobrenadante obtenido de esta segunda centrifugación se mezcló con la anterior y a esta mezcla se le volvió a centrifugar a 11,500 x g durante 15 min. El sobrenadante total obtenido se centrifugó a 100,000 x g durante 2.5 h. La pastilla se desechó y al sobrenadante se le adicionaron lentamente 10

$\mu\text{L}/\text{ml}$  de una solución de protamina al 10% para precipitar los ácidos nucleicos. La suspensión resultante se agitó durante 30 min y el precipitado se colectó centrifugando a 11,500 x g. La pastilla se desechó y el sobrenadante fue utilizado como fuente enzimática para los pasos posteriores de purificación (Fracción 1).

#### **Activación del DNA de alto peso molecular**

Se hicieron reaccionar 0.5 mg de DNA timo de ternera (previamente disuelto en solución amortiguadora para activación del DNA con 0.01 mg de DNasa I (Sigma Co.), se incubó durante 15 min a 37°C y posteriormente, la DNasa se desnaturizó calentando a 77 °C durante 5 min, finalmente, se pasó a un baño de hielo. Este DNA activado fue utilizado posteriormente, como molde para la incorporación de los dNTPs en la mezcla de reacción para el ensayo de la DNA pol.

#### **Determinación de actividad de la DNA polimerasa**

La actividad de la DNA polimerasa fue ensayada en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  en un tubo de ensayo de 12x75 mm que contenía la mezcla de reacción para DNA pol y 5  $\mu\text{L}$  del extracto crudo o de las fracciones de los diferentes pasos cromatográficos. Los ensayos se realizaron a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 100  $\mu\text{L}$  de una solución stock de 2 mg/mL de DNA de esperma de arenque (Sigma Co) y 3 mL de TCA al 10%. Los tubos se colocaron en hielo durante 30 min y la radiactividad insoluble en TCA se colectó filtrando al vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron con 5 mL de TCA al 10% y luego con 5 mL de etanol al 96%. Los filtros se secaron en una estufa a 65 °C durante 20 min y se transfirieron a frascos viales que contenían 5 mL de líquido de centelleo. La cantidad de radiactividad incorporada al DNA retenido en el filtro se determinó en un contador de centelleo Beckman LS60001C.

Una unidad de actividad enzimática de DNA polimerasa fue definida como un pmol de desoxitimidina monofosfato incorporada a 37 °C durante 30 min.

#### **Determinación indirecta de la actividad de DNA primasa utilizando poli-dT como molde (síntesis del cebador)**

La determinación indirecta de la actividad de DNA primasa fue adaptada a partir de la reportada por Laquel *et al.* (1994); el ensayo se efectuó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  en un tubo eppendorf. A la mezcla de reacción para determinación indirecta de actividad de DNA primasa, se agregaron 2.5-5.0  $\mu\text{g}$  de proteína por ensayo, preincubando durante 15 min a 37°C. La reacción

de cebado se detuvo agregando NEM a una concentración final de 5 mM o calentando la mezcla a 85°C durante 5 min y posteriormente, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante 10-15 min.

### **Síntesis de DNA**

La síntesis de DNA se inició al agregar la solución "complemento para la síntesis de DNA" (DNA pol I de *E. coli* + [<sup>3</sup>H]-dATP) a la mezcla anterior; se incubó a 37°C durante 45 min y la reacción se detuvo agregando 50 µl de un concentrado de 2 mg/ml de DNA de esperma de arenque y 1 mL de TCA al 10%. El precipitado fue filtrado mediante filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C con lavados con 5 mL de TCA al 10% y finalmente, con 5 mL de etanol al 96%. Los filtros fueron secados y la radiactividad determinada como se indica en el ensayo descrito para la DNA pol.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida del cebador sintetizado por la DNA primasa teniendo como molde poldT (determinación de la longitud del cebador).**

La longitud del cebador sintetizado por la DNA primasa se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Laquel *et al* (1994), con las siguientes modificaciones: La fracción con actividad de DNA primasa obtenida de la cromatografía en fenil sefarosa (fracción III.3, 2.5-5.0 µg), se incubó con la "mezcla de primasa" (50 µL) durante 30 min a 37°C, la reacción se detuvo agregando EDTA a una concentración final de 20 mM. Las proteínas se extrajeron con 2.5 volúmenes de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, el RNA marcado fue precipitado (utilizando DNA de timo de ternera como acarreador), con 2 volúmenes de etanol absoluto y centrifugado durante 15 min a 12,000 rpm en una microcentrífuga. Posteriormente, la pastilla fue secada y redisuelta en "solución amortiguadora para aplicar la muestra de ácidos nucleicos". Los ácidos nucleicos fueron desnaturalizados a 85°C durante 1 minuto y las muestras se aplicaron a un "gel de poliacrilamida al 14% para determinar la longitud del cebador". Las dimensiones del gel fueron de 38 cm de largo, 40 cm de ancho y 0.4 mm de grosor. La electroforesis se llevó a cabo a 1,200 V durante 2 h o hasta que el azul de bromofenol migrara a una distancia de aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de la longitud del gel, después se removió una de las placas del gel y éste fue adherido a un papel filtro Whatman # 1 para removerlo de la otra placa de vidrio; posteriormente, fue secado y expuesto a una película para autorradiografía (Reflection NEF-495, Dupont) en una pantalla amplificadora a -80 °C.

### **Electroforesis de los productos sintetizados por las DNA polimerasas de maíz en poli-dT o pWori previamente cebados por la DNA primasa**

El cebado por la DNA primasa en poli-dT o pWori se realizó como se indicó anteriormente, excepto que en lugar de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP se utilizó ATP 0.1 mM (cuando se utilizó poli-dT) ó ATP, CTP, GTP y UTP cuando se utilizó pWori. Después de la reacción de cebado, se agregó 1U de DNA pol 1 (obtenida del fraccionamiento en Q sefarosa) ó 1U de DNA pol 2 (obtenida del fraccionamiento en Fenil-sefarosa) ó 1U de pol I de *E. coli* junto con 10  $\mu$ Ci/mL de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP (cuando se utilizó poli-dT) ó dCTP, dGTP, TTP y 10  $\mu$ Ci/mL de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP (cuando se utilizó pWori). Las muestras se incubaron por 5, 15 o 60 min a 37°C y fueron procesadas como se indica en el punto anterior.

### **Identificación de la subunidad catalítica responsable de la actividad de DNA pol mediante "DNA polimerasa trapping assay"**

La técnica fue adaptada de Insdorf y Bogenhagen (1989) y se efectuó de la siguiente manera: 20  $\mu$ g de proteína del extracto crudo o 10  $\mu$ g de proteína de la proteína obtenida de la cromatografía en Q-sefarosa (para pol 1) o 10  $\mu$ g del fraccionamiento en heparina HiTrap (para pol 2) se incubaron con 50  $\mu$ L de la mezcla de "DNA polimerasa trapping assay" en un tubo eppendorf por 10 min a temperatura ambiente y luego se colocaron en hielo por 15 min, posteriormente, se irradiaron con luz UV (6000 mW/cm<sup>2</sup>) a 10 cm de distancia durante 15 min. El DNA no unido a las proteínas fue digerido con 30 u de nucleasa de *Staphylococcus aureus* por ensayo. Las proteínas fueron concentradas con TCA al 10%. La pastilla se disolvió con 10  $\mu$ L de NaOH 1 M y 15  $\mu$ L de Solución amortiguadora de carga, las proteínas fueron aplicadas en un SDS-PAGE al 10%. Después de la electroforesis, el gel se secó y se expuso en una película XAR usando una pantalla amplificadora.

### **Identificación de la subunidad catalítica responsable de la actividad de primasa mediante DNA primasa "trapping assay"**

El ensayo se efectuó con 5  $\mu$ g de la fracción que eluyó de la cromatografía en fenil sefarosa de manera similar al descrito en el punto anterior, excepto que la mezcla de reacción utilizada fue la indicada para "DNA primase trapping assay".

### **Efecto de la temperatura sobre la actividad de la DNA primasa**

La actividad de la primasa se ensayó con la fracción obtenida en la cromatografía de fenil sefarosa variando las condiciones y/o las

concentraciones descritas a continuación. La fracción con actividad de primasa fue incubada con la mezcla de reacción ("mezcla de primasa") a 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37 y 42 °C por 30 min, posteriormente, los productos sintetizados se analizaron por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 14% como se indicó anteriormente.

## **2.3 Resultados**

Los resultados de este capítulo comprenden la metodología para separar la actividad de DNA primasa de la de DNA polimerasa, el montaje de la técnica de "DNA polymerase trapping" para determinar el tamaño de las subunidades catalíticas de las pols 1 y 2, la modificación de esta técnica para el marcaje de la subunidad responsable de actividad de DNA primasa, la determinación del tamaño de los cebadores que sintetiza la DNA primasa, su caracterización bioquímica y el estudio del efecto de la presencia de las DNA pols 1 y 2 sobre la actividad de la DNA primasa, todo esto utilizando como fuente enzimática ejes embrionarios de maíz.

### **Purificación parcial de las pols 1 Y 2 y separación de la actividad de primasa del complejo polimerasa-primasa (pol 2, tipo $\alpha$ )**

#### **Separación de DNA pols a través de una cromatografía en DEAE-sephacel**

Para separar a las DNA pols 1, 2 y 3, nuestro grupo de trabajo ha reportado previamente la utilización de la resina DEAE-celulosa (Coello *et al*, 1992), por lo cual, en el presente trabajo se utilizó como primer paso esta resina. La fracción I (ver obtención del extracto crudo en la sección de métodos), fue aplicada a una columna de DEAE-sephacel de 2.5x15 cm previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La columna se lavó con la misma solución hasta que no se detectó proteína a  $A_{280}$  nm. La proteína adsorbida se eluyó con 5 volúmenes de un gradiente lineal de 40 a 400 mM de fosfatos (soluciones amortiguadoras A y B respectivamente). La figura 8 muestra el perfil de elución de las actividades de pol y DNA primasa a través de esta columna. En esta cromatografía se pueden notar claramente 3 picos de actividad de DNA polimerasa, los cuales han sido nombrados como DNA polimerasas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden de elución (Coello *et al*, 1992). La DNA polimerasa 1 no se adsorbe a la resina en estas condiciones, la pol 2 necesita de una concentración de fosfato de potasio de  $100\pm 30$  mM de fosfatos para eluir y la DNA polimerasa 3 eluye a una concentración de fosfatos de  $200\pm 30$  mM. Lo anterior sugiere que la carga eléctrica neta de las isoenzimas (o de las proteínas con las que podrían estar asociadas), es diferente entre éstas, siendo positiva la carga eléctrica neta para la pol 1 y negativa para las polimerasas 2 y 3. En esta cromatografía se logró además eliminar una gran cantidad de proteínas al no ser adsorbidas por la resina, lo que implicó que la actividad específica de la DNA pol 2 (actividad de la enzima/mg de proteína), se incrementara notablemente. En relación a la actividad de la DNA primasa, se observó que ésta coelúa con la actividad de la DNA polimerasa 2. Las fracciones con actividad de polimerasa que no se

adsorbieron a la resina de DEAE-sephacel (pol 1, fracción 1.1) se mezclaron y lo mismo se hizo para las fracciones con actividad de polimerasa-primasa (Fracción 2.1) y se aplicaron por separado a una columna de HiTrap Heparin.

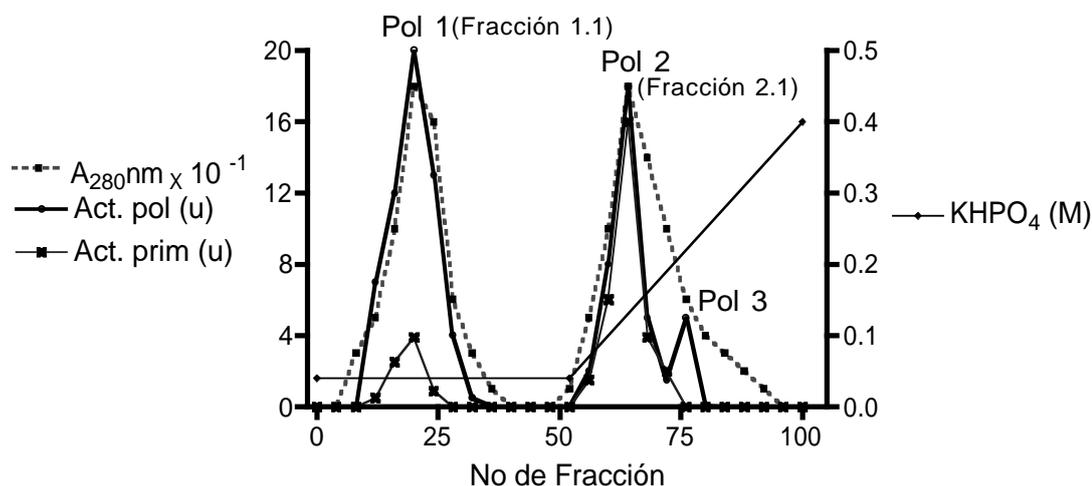


Figura 8. Perfil de elución de las actividades de DNA pol y DNA primasa a través de una columna de DEAE-sephacel. La fracción I (ver obtención del extracto crudo en la sección de material y métodos) fue aplicada a una columna de DEAE-sephacel previamente equilibrada con solución A. Se aplicó un gradiente lineal de 40 a 400 mM de fosfato de potasio.

### Cromatografía de la DNA pol 1 a través de HiTrap Heparin

La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado que consiste principalmente de secuencias repetidas del disacárido ácido  $\alpha$ -L-idopirano-2-sulfato y 2'-desoxi-2-sulfamino  $\alpha$ -D-glucopirano-6-sulfato unido en posición 1 $\rightarrow$ 4. Debido a su naturaleza polianiónica y la distribución regular de sus cargas negativas semejante a la de los grupos fosfatos en los ácidos nucleicos, la heparina interacciona con muchos compuestos biológicos y estas interacciones pueden ser usadas como base para una purificación por cromatografía de pseudoafinidad. La fracción 1.1 fue aplicada a una columna de HiTrap Heparin de 1.5 x 2.5 cm (5 mL) previamente equilibrada con solución amortiguadora C. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de cama con la solución C, se aplicó un gradiente de 0.15 a 1.5 M de NaCl (soluciones C y D respectivamente). La fig. 9 muestra el perfil de elución de la actividad de la pol 1, en donde se puede observar

que la enzima se pega con relativamente alta afinidad, ya que se requiere de una concentración de  $600 \pm 50$  mM de NaCl para despegarla, en este paso cromatográfico se logra purificar a la enzima aproximadamente 778 veces (García et al, 1997). Las fracciones con actividad de DNA pol se mezclaron (fracción 1.2) y se aplicaron a una columna de HiTrap Q-sefarosa.

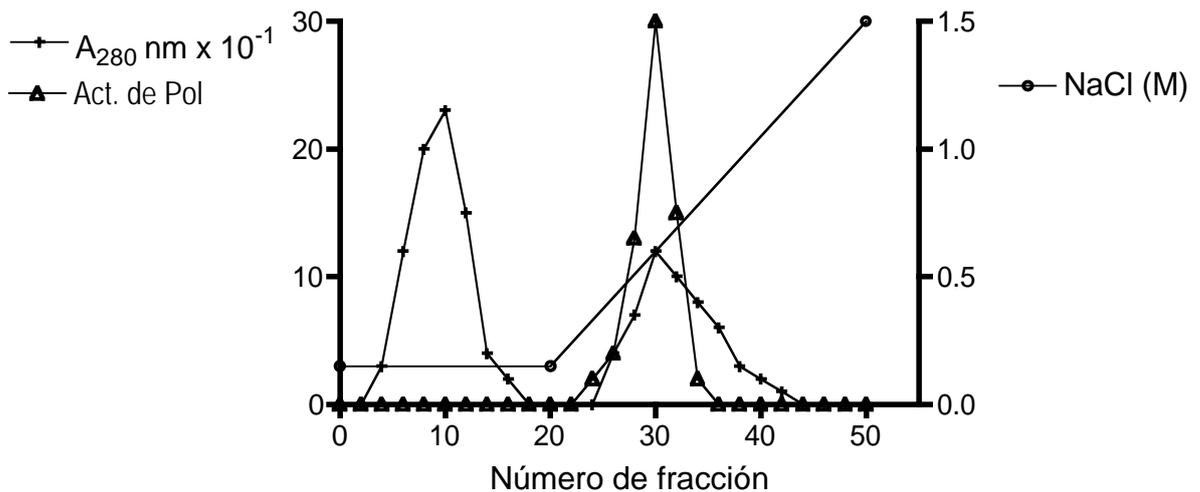


Figura 9. Perfil de elución de la actividad de DNA pol 1 a través de una columna de HiTrap Heparin. La fracción 1.1 fue aplicada a una columna de HiTrap Heparin previamente equilibrada con solución C. Se aplicó un gradiente lineal de 0.15 a 1.5 M de NaCl (soluciones amortiguadora C y D respectivamente).

### Cromatografía de la pol 1 a través de una cromatografía en Hitrap Q-sefarosa

La fracción 1.2 se desaló y se concentró en tubos Centricron 10 hasta llegar a un volumen de 1 mL, posteriormente, se diluyó la muestra 5 veces y se aplicó a una columna de HiTrap Q-sepharose de 0.7 x 2.5 cm (1 mL) previamente equilibrada con solución E, las proteínas adsorbidas fueron eluidas con un gradiente de NaCl de 0.1 a 0.5 M de NaCl, la actividad de polimerasa eluyó a una concentración de  $300 \pm 30$  mM de NaCl como se puede ver en la fig. 10, las fracciones con el pico de actividad de DNA pol fueron mezcladas y concentradas en tubos Centricron 50 y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Esta fracción se utilizó para identificar el tamaño de la subunidad catalítica, determinar el efecto de su presencia en la actividad de DNA primasa y para determinar su capacidad de elongación del cebador sintetizado por la DNA primasa tanto en un modo de polidT como en el

plásmido pWori.

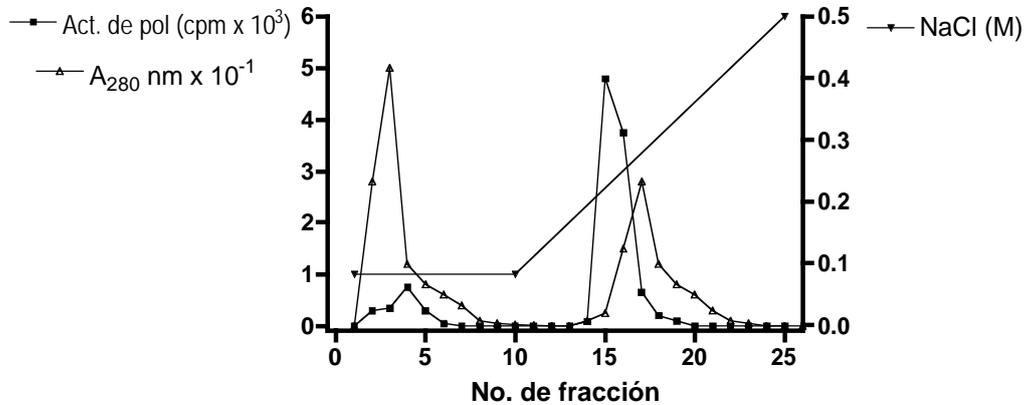


Figura 10. Perfil de elución de la actividad de DNA pol 1 a través de una cromatografía en HiTrap Q-sefarosa. La fracción 1.2 fue aplicada a una columna de Q-sefarosa previamente equilibrada con solución E. Se aplicó un gradiente lineal de 0.1 a 0.5 M de NaCl.

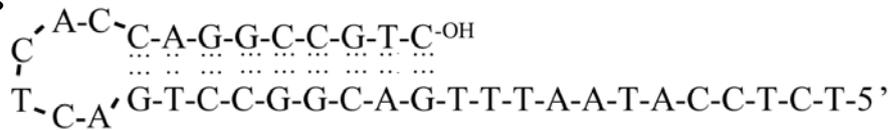
### Validación del ensayo "DNA polymerase trapping"

El ensayo "DNA polymerase trapping" fue reportado por InsdorfyBogenghagen en 1989 y éste consiste en proporcionar a las DNA pols un molde de DNA de cadena sencilla de 36 nt (ver fig. 11A) que forma un loop, generando (potencialmente) un fragmento de 9 pares de bases (ver fig. 11B) que, en presencia de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  y  $5'\text{Br-dUTP}$  las DNA pols pueden utilizarlo como molde, insertando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dAMP}$  enfrente de la dT y  $5'\text{Br-dUMP}$  enfrente de la dA, sin embargo, en presencia de dC la DNA pol no inserta el desoxinucleótido correspondiente debido a que en la mezcla de reacción no se agrega dGTP, lo cual permite que la pol se quede "atascada", situación que se aprovecha para irradiar la muestra con luz UV como se indica en Métodos, provocando con ello la unión covalente de la proteína al molde marcado. Para validar este método se utilizó pol I de *E coli* y pol  $\delta$  de *S. cerevisiae* (esta última parcialmente purificada a través de DEAE-sephacel y HiTrap Heparin, de acuerdo a lo reportado por Bauer *et al*, 1988). En la fig. 11C se puede observar que el ensayo realizado utilizando las enzimas antes mencionadas funciona muy bien, dado que las proteínas marcadas migran de acuerdo al peso molecular esperado.

11A



11B



+

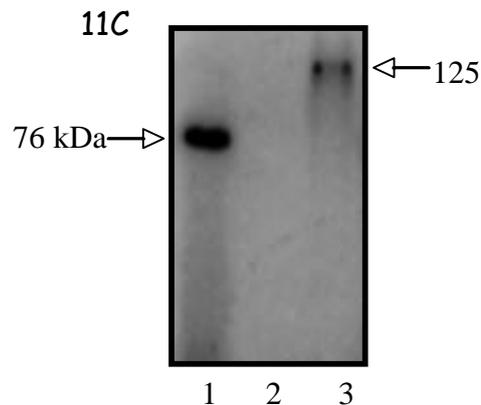


Figura 11. Molde de DNA de cadena sencilla utilizado para el ensayo "DNA polymerase trapping"; en forma lineal (11A) y formando un loop (11B) con potencialmente 9 pares de bases que generan un extremo 3'OH y una hebra molde. 11C; Exposición del gel desnaturalizante de poliacrilamida, carril 1, 0.5 u del fragmento Klenow de pol I de *E coli*; carril 2, 5  $\mu$ g de albúmina sérica bovina; carril 3, 0.5 u de pol  $\delta$  de *S. cerevisiae*.

### Identificación de la subunidad catalítica de la DNA pol 1 mediante la técnica "DNA polymerase trapping"

En un trabajo previo, mediante una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200, se reportó el tamaño de las DNA pols nativas 1 y 2 como de 350 y 450 kDa respectivamente (García *et al*, 1997), lo cual sugiere que las actividades catalíticas están asociadas a otras proteínas. El peso molecular de la subunidad catalítica de la pol 1, determinado en las fracciones obtenidas de la cromatografía en Q-sefarosa mediante la técnica "DNA polymerase trapping" es de 80 kDa, como se puede observar en la fig. 12, la proteína de 62 kDa que se identifica en los carriles 2 y 3 probablemente es

un fragmento proteolítico de la subunidad de 80 kDa o tal vez una de las múltiples polimerasas de tipo reparativo que existen en eucariotes superiores.

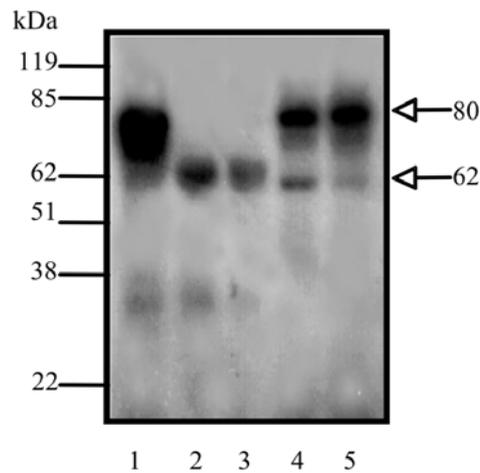


Figura 12. Marcaje de la subunidad catalítica de la DNA pol 1 mediante el "DNA polymerase trapping assay". Carril 1, Fracción aplicada a la columna de Q-sefarosa; carriles 2 y 3, fracciones no adsorbidas a la resina; carriles 4 y 5, fracciones 15 y 16 respectivamente.

### Purificación de la DNA pol 2. Cromatografía en HiTrap Heparin

La fracción 2.1 (obtenida de la cromatografía en DEAE-sephacel), fue dializada con 100 volúmenes de solución C toda la noche a 4°C y después de una segunda diálisis con 100 volúmenes de la misma solución, la muestra se aplicó a una columna de HiTrap Heparin de 1.5 x 2.5 cm (5 mL), previamente equilibrada con 5 volúmenes de cama con la solución C. La proteína adsorbida fue eluída con 10 volúmenes de un gradiente lineal de 0.15 a 1.5 M de NaCl (soluciones C y D respectivamente). La polimerasa-primasa se unió con gran afinidad a esta resina, ya que fue necesaria una alta concentración de NaCl,  $800 \pm 50$  mM para eluirla. En la figura 13 se puede observar cómo la actividad de DNA primasa coeluye con la actividad de DNA pol aún cuando se necesitó de una alta fuerza iónica para eluir ambas actividades, por lo que este resultado muestra que, al igual que sucede en otros sistemas eucariotes, la DNA pol 2 (homóloga a la pol  $\alpha$ ), contiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa. Las fracciones con actividad pol-primasa se mezclaron (fracción 2.2) y se utilizaron para los pasos siguientes

de purificación de la DNA primasa (fenil sefarosa HP y superdex 200).

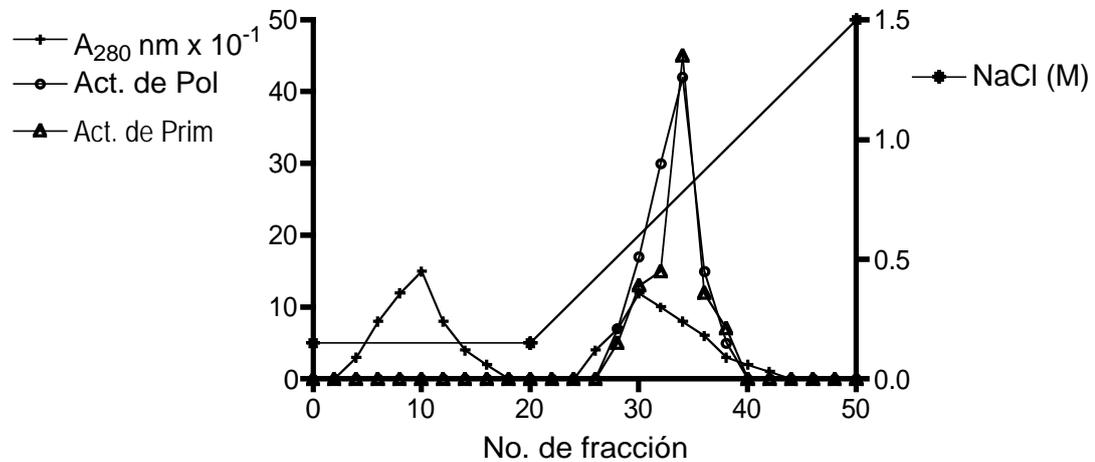


Figura 13. Perfil de elución de las actividades de DNA polimerasa y DNA primasa a través de una columna de HiTrap Heparin. La fracción 2.1 fue aplicada a una columna de HiTrap Heparin previamente equilibrada con solución C. Se aplicó un gradiente lineal de 0.15 a 1.5 M de NaCl (soluciones amortiguadora C y D respectivamente).

### Disociación de la actividad de DNA primasa del complejo de DNA pol 2. Cromatografía en fenil sefarosa HP

Las fracciones con actividad de polimerasa-primasa obtenidas en la cromatografía de HiTrap HP fueron mezcladas (fracción 2.2) y llevadas a una concentración de 0.5 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en solución amortiguadora C y aplicadas a una columna de fenil sepharose HP de  $0.7 \times 2.5$  cm (1 mL) previamente equilibrada con solución amortiguadora C + 0.5 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La columna se lavó con 5 volúmenes de cama con solución C, las proteínas adsorbidas fueron eluidas con 10 volúmenes de solución C + 50% de etilén-glicol (v/v); como puede observarse en la fig. 15, la actividad de DNA primasa se obtuvo en las fracciones que contenían etilén-glicol y el pico de actividad no coincide con el de actividad de DNA pol, por lo cual en esta cromatografía se obtuvo la disociación de las 2 actividades enzimáticas que contiene el complejo de la DNA pol 2. Las fracciones con actividad de DNA primasa (fracciones 21 y 22) se mezclaron y se concentraron en tubos Centricron 10 hasta tener un volumen de 1 mL (fracción 2.3), parte de esta

fracción se utilizó para determinar el peso molecular de la primasa mediante una cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75 y el resto para su caracterización bioquímica.

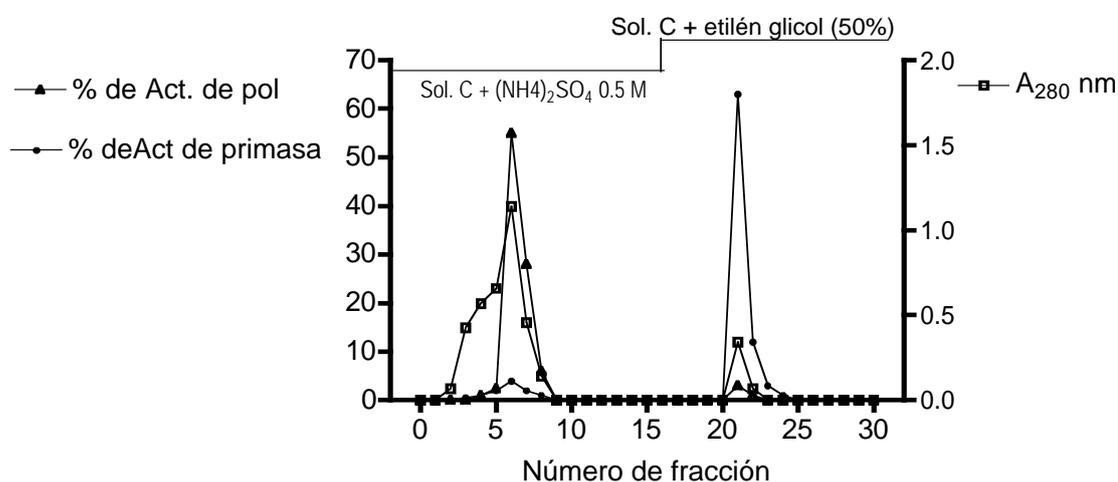


Figura 15. Perfil de elución de la actividad de DNA pol y de DNA primasa en la cromatografía de fenil sefarosa HP. La fracción 2.2 fue mezclada con solución C+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y aplicado a una columna de fenil sefarosa HP previamente equilibrada con la solución anterior. La actividad de DNA primasa fue aislada del complejo de la polimerasa con la solución C+ etilén glicol al 50%.

### Determinación del peso molecular de la DNA primasa sin actividad de DNA pol 2 en Superdex 75

Las fracciones con actividad de DNA primasa (fracción 2.3) se mezclaron y se concentraron en tubos Centricon hasta obtener un volumen de 1 ml y se aplicaron a una columna de Superdex 75 HR previamente equilibrada con 5 volúmenes de solución amortiguadora E. El perfil de elución se muestra en la fig. 16, en donde se observa que el pico de actividad corresponde a una proteína de 68 kDa, la actividad de DNA primasa recuperada en este paso fue de un 15-20% respecto a la que se aplicó inicialmente a la columna, esto podría deberse a que la primasa se inactiva rápidamente en ausencia de las subunidades que conforman a la pol 2.

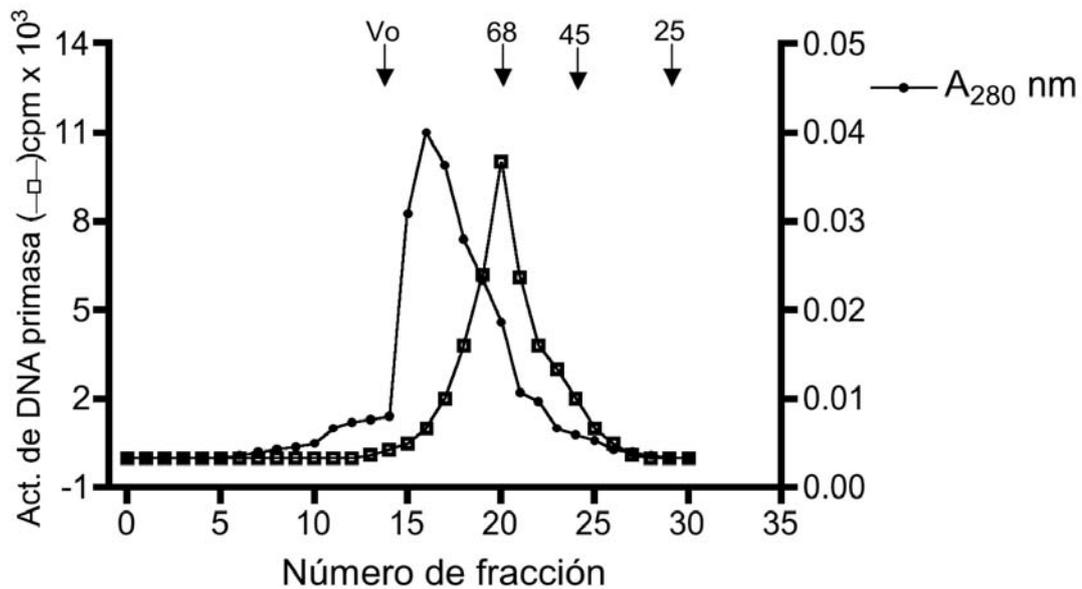


Figura 16. Perfil de elución de la actividad de DNA primasa sin polimerasa en Superdex 75. La fracción 2.3 se concentró en tubos Centricon 10 y se aplicó a una columna de Superdex 75 HR previamente equilibrada con 5 volúmenes de cama de "solución amortiguadora E".

### Identificación de la subunidad catalítica de la pol 2 mediante la técnica "DNA trapping assay" y capacidad de la enzima para utilizar un oligonucleótido de 13 unidades como molde (oligoT<sub>11</sub>-AT)

Para continuar con la caracterización de la subunidad catalítica de la pol 2 se utilizaron las fracciones con el pico de actividad de polimerasa-primasa que eluyeron de la columna de HiTrap Heparin (fracciones H35 y H36), utilizando el oligonucleótido de 36 unidades (oligo-cebador) y un oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup> como se indica en material y métodos. En la fig. 14 se puede observar una banda de 90 kDa tanto en la fracción H35 como en la H36 (carriles 2 y 4), que es mucho más intensa cuando se utiliza el molde de DNA de 36 nt que cuando se utiliza el oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup>. El fragmento Klenow (como se esperaba), no pudo utilizar el oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup> debido a que este molde es DNA de cadena sencilla y todas las DNA pols necesitan de un extremo 3'-OH complementario a la cadena molde. El hecho de que la DNA pol 2 utilice oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup> sugiere fuertemente que la actividad de DNA primasa está contenida en el complejo. La banda de 90 kDa coincide con el tamaño reportado previamente para la DNA pol 2 cuando se determinó por medio de un ensayo de "actividad *in situ*" (Coello *et al*, 1992). La banda de 28 kDa que se observa en los carriles 2 y 3 podría ser un fragmento

proteolítico de la banda de 90 kDa o una proteína de unión a DNA que haya interaccionado con el DNA después de que la DNA pol insertó el dAMP marcado radiactivamente.

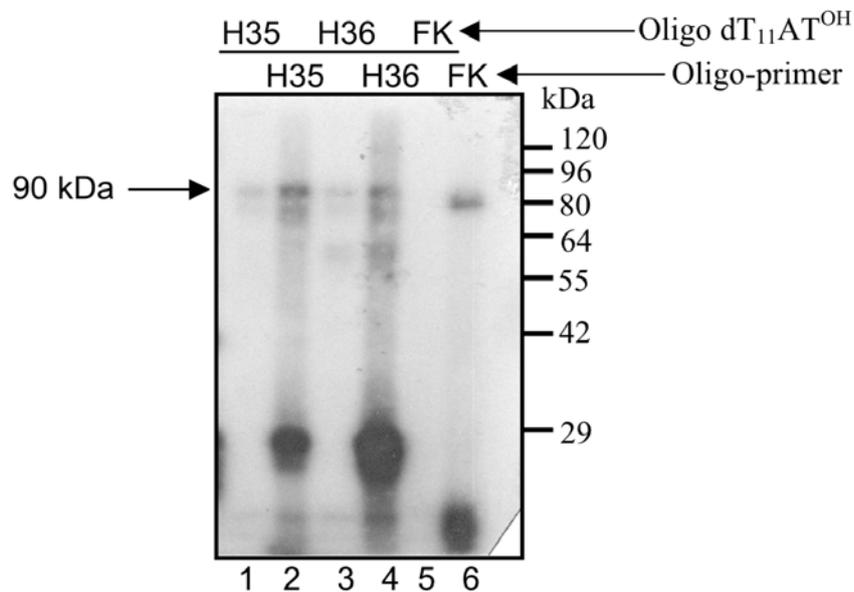


Figura 14. Identificación de la subunidad catalítica de la DNA pol 2 y capacidad de la misma para utilizar un oligonucleótido de 13 unidades como molde. Carriles 1, 3 y 5, fracciones 35, 36 de la cromatografía en HiTrap Heparin y fragmento Klenow (FK) utilizando el oligodT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup>; carriles 2, 4 y 6, igual que 1, 3 y 5 pero utilizando el oligonucleótido de 36 unidades.

### Inmunoreconocimiento de la subunidad de DNA primasa

Para determinar por "western blot" la subunidad de DNA primasa, se fraccionaron 5 mg de proteína de una mezcla de las fracciones 19-21 obtenidas en Superdex 75 mediante un SDS-PAGE al 12%, posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para el inmunoreconocimiento usando un anticuerpo anti-DNA primasa de trigo (Laquel *et al*, 1994). El anticuerpo reconoció una banda de 68 kDa (fig. 17, carril 2), peso molecular similar al obtenido mediante la cromatografía de exclusión molecular. La DNA primasa de trigo se observa como un doblete de 60-58 kDa (control positivo, fig. 17, carril 1).

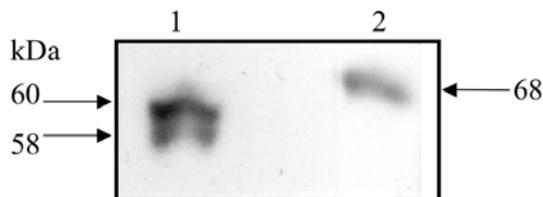


Figura 17. Inmunoreconocimiento de la subunidad de DNA primasa de maíz. El "western blot" fue realizado con un anticuerpo anti-DNA primasa de trigo. Carril 1, Extracto crudo de proteínas de trigo; carril 2, 5  $\mu\text{g}$  de proteína de la mezcla de proteínas de las fracciones 19-21 obtenidas en la cromatografía en Superdex 75 (ver figura 16).

### Identificación de la subunidad de DNA primasa mediante el ensayo "DNA primasa trapping"

Debido a que la DNA primasa que se obtuvo del fraccionamiento en Superdex 75 se inactiva rápidamente, se decidió trabajar con la fracción 2.3 (obtenida de lo cromatografía en fenil sefarosa) para los ensayos de "trapping" y para la caracterización bioquímica de la enzima.

Para el ensayo de "trapping" de DNA primasa se hizo una modificación a la técnica que originalmente reportaran Insdorf y Bogenhagen (1989), la cual consistió en cambiar el oligonucleótido de 36 unidades por un oligo de 13 unidades (oligo-dT<sub>11</sub>AT<sup>OH</sup>), que no puede formar un tallo-asa y en cambiar el  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  por  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Para este ensayo se utilizó la fracción 2.2 (DNA pol-DNA primasa) y la fracción 2.3, enriquecida en actividad de DNA primasa (carriles 1 y 2 respectivamente de la fig. 18A y 18B). La fig. 18A (utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  como sustrato), en el carril 1 muestra la presencia de una banda intensa de 91 y otra aún más intensa, de 73 kDa. En el carril 2 se observa que la banda de 91 kDa es considerablemente menos intensa que la banda de 73. El peso molecular que previamente se obtuvo para la subunidad de la primasa es de aproximadamente 68 kDa, ligeramente menor que el que se observa con la técnica de "trapping"; este cambio de migración podría ser debido a que la nucleasa que se agrega a la mezcla de reacción después del foto-entrecruzamiento no alcanza a degradar totalmente al oligo, tal vez debido a algún impedimento estérico. Las bandas de menor peso molecular podrían ser fragmentos proteolíticos de la DNA pol y/o de la DNA primasa. El marcaje de la subunidad catalítica de DNA pol en este ensayo (en que no se agrega dATP), podría ser debido a la fuerte interacción entre las subunidades de la pol 2 y a que existe un "switch" del

molde que primero debe reconocer la subunidad de primasa y posteriormente, debe pasar a la subunidad de DNA pol (Mizuno *et al*, 1999). Cuando en el ensayo se utilizó  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  (fig. 18B), en lugar de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , la fracción enriquecida en actividad de DNA primasa incorporó muy pobremente  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dAMP}$ , lo cual puede ser debido a que coeluye una actividad residual de polimerasa o tal vez a la capacidad que tienen ciertas DNA primasas a utilizar dNTPs cuando en el medio de reacción no existen NTPs (Kornberg y Baker, 1992), sin embargo, en la fracción que contiene la actividad de DNA pol y DNA primasa se observa más intensas las bandas de 91 y 73 kDa.

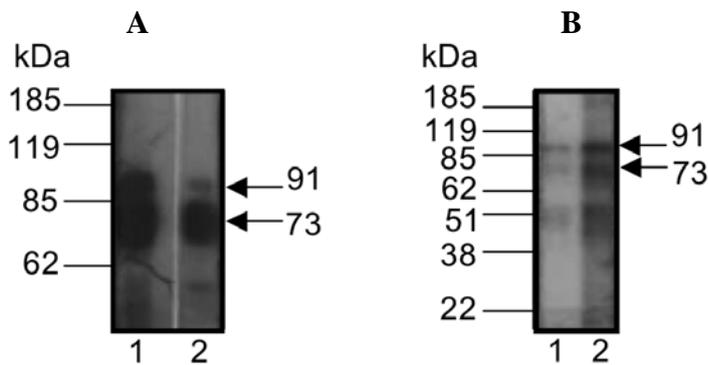


Figura 18. Identificación de la subunidad catalítica de DNA primasa que se obtuvo de la cromatografía Hitrap Heparin y de fenil sefarosa (figura 15 y 16 respectivamente), con la técnica "DNA primase trapping". 18A, utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  en la mezcla de reacción. Carril 1, complejo DNA pol-DNA primasa (fracción 2.2); carril 2, DNA primasa obtenida de la cromatografía en fenil sefarosa. 18B, igual que en 18A, pero utilizando  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  en la mezcla de reacción.

### Caracterización de la DNA primasa sin actividad de DNA pol

Determinación de la longitud de cebador sintetizado por la DNA primasa. La fracción 2.3 fue utilizada para determinar la longitud del cebador mediante geles de poliacrilamida como se indica en material y metodos. En la fig. 19 se puede observar que la longitud del cebador sintetizado por la DNA primasa es de 15 y 17 nt, aunque también se pueden observar productos de mayor longitud (25-34 nt) y de menor longitud (6-12 nt).

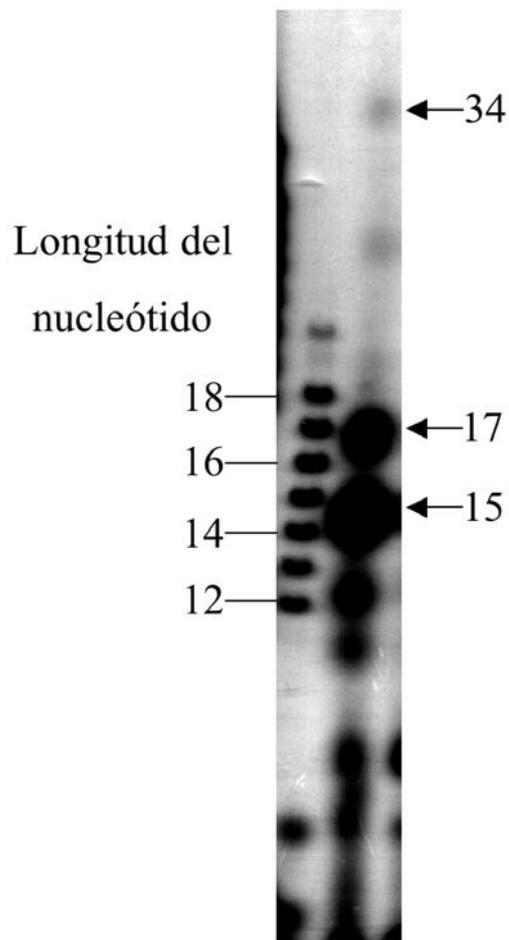


Figura 19. Determinación de la longitud del cebador sintetizado por la DNA primasa utilizando polidT<sub>1200</sub> como molde y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP como sustrato. Carril 1, escalera de DNA de 12-18 nt; carril 2, DNA primasa (fracción 2.3).

### Efecto de la temperatura sobre la actividad de DNA primasa

La temperatura es un factor de suma importancia sobre la actividad de cualquier enzima; en el caso de la DNA primasa se pudo observar (fig. 20) que la enzima, a temperaturas de 10–42 °C, sintetiza principalmente cebadores de 15 nt, aunque también se observan de 8, 10, 12, 15 y 24 nt; a temperaturas de 30-37°C se puede observar que la enzima sintetiza en mayor proporción cebadores de 15 y 17 unidades y también se observa que a estas temperaturas se produce un oligo de 34 nt, el cual no se observa a las otras temperaturas probadas.

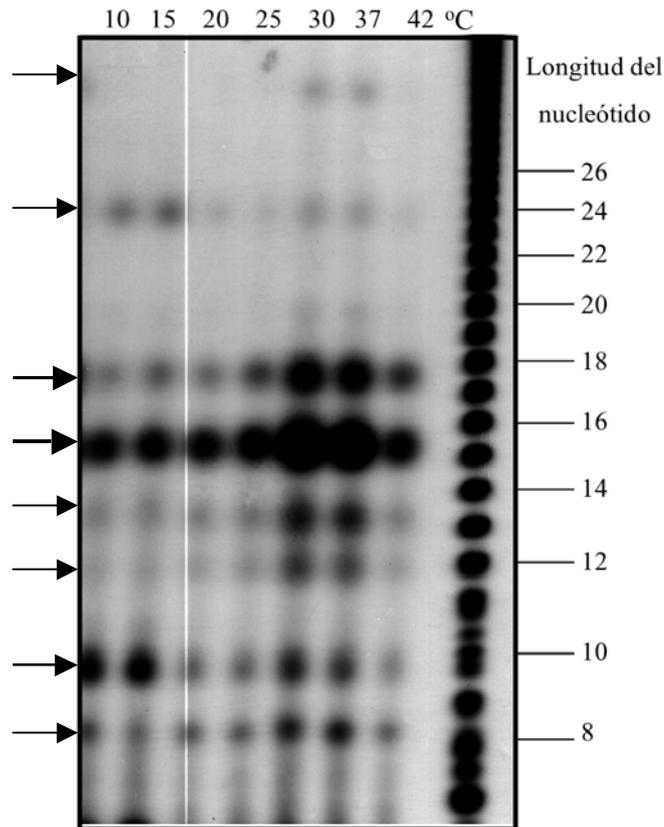


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad de DNA primasa. La fracción 2.3 se utilizó para determinar la actividad de primasa como se indica en la figura anterior.

**Síntesis de DNA por las DNA pols 1, 2 de maíz y DNA pol I de *E. coli* en un molde de poli-dT previamente cebado por la DNA primasa**

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ensayo de DNA primasa, se determinó la capacidad de síntesis de DNA por la DNA pol 1, DNA pol 2 (sin primasa) y la DNA pol I de *E. coli* en un molde de polidT<sub>1200</sub> previamente cebado por la primasa. La fig. 21 muestra que la DNA pol 1 solo sintetiza productos relativamente cortos (75-80 nt, carriles 1-3), mientras que la DNA pol 2 elonga los cebadores hasta el término del molde y esto lo logra en tan solo 5 min de incubación (carril 4). Para los 30 min se observa una mayor intensidad de las bandas (carril 5), sin embargo, a los 60 min se observa una disminución en la intensidad de las bandas, probablemente debido a una actividad asociada de nucleasa (carril 6). La DNA pol I de *E. coli* también sintetiza fragmentos largos y su actividad se incrementa conforme avanza el tiempo (carriles 8-10).

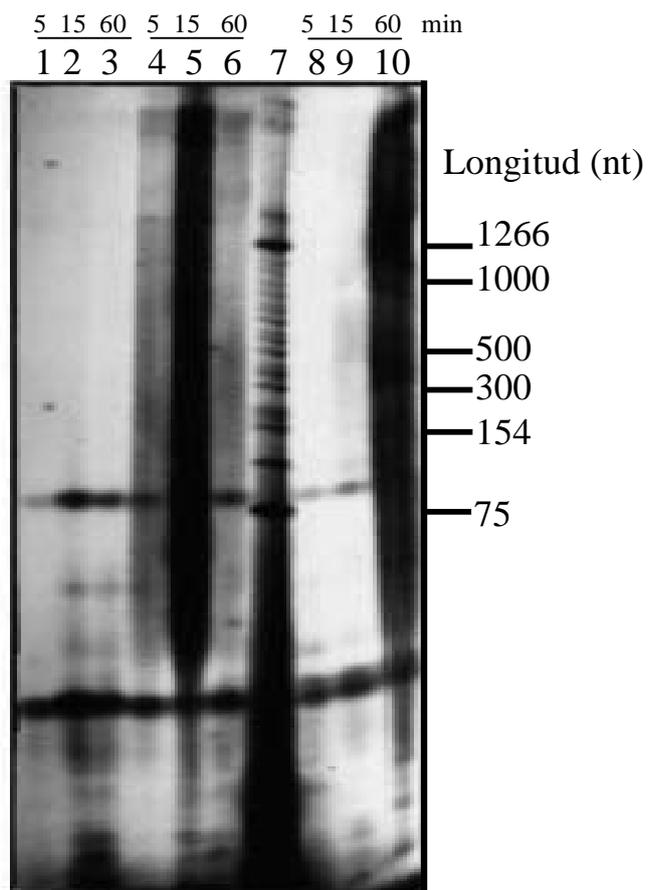


Figura 21. Síntesis de DNA en el molde polidT<sub>1200</sub> previamente cebado por la primasa. El cebado del molde se efectuó como se indica para la fig 19. Después de la reacción de cebado, la pol 1 (carriles 1, 2 y 3), La pol 2 (carriles 4, 5 y 6) o la Pol I de *E. coli* (carriles 8, 9 y 10) fueron añadidas junto con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] -dATP y las muestras fueron incubadas por 5 (carriles 1, 4 y 8), 15 ( carriles 2, 5 y 9) o 60 min (carriles 3, 6 y 10) a 37 °C. Carril 7, escalera de DNA de alto peso molecular.

### **Síntesis de DNA en un molde natural, cadena sencilla, circular y covalentemente cerrado**

Después de determinar la capacidad de utilización del cebador en el molde de polidT<sub>1200</sub> por las DNA pols 1 , 2 y pol I de *E. coli*, se procedió a estudiar la capacidad de éstas para sintetizar DNA en un molde natural de cadena sencilla, circular y covalentemente cerrado, para lo cual se utilizó el plásmido pWori (que contiene la mayor parte del genoma del geminivirus responsable del achaparramiento del trigo, donado por el Dr. Crisanto Gutiérrez, CBMSO, España), previamente cebado por la primasa. Las DNA pols 1, 2 (sin actividad de DNA primasa) y la pol I de *E coli* se añadieron y la reacción prosiguió por diferentes períodos de tiempo. En la fig. 22 se puede

observar que la actividad de las pols 1 y 2 fue muy baja en todos los tiempos, identificándose solo productos de 75 nt de longitud, mientras que cuando se utilizó la DNA pol I de *E. coli* se observaron, además, fragmentos mayores de 1200 nt de longitud. Este resultado sugiere que probablemente las pols 1 y 2 requieren de proteínas accesorias para poder utilizar este tipo de DNA como molde.

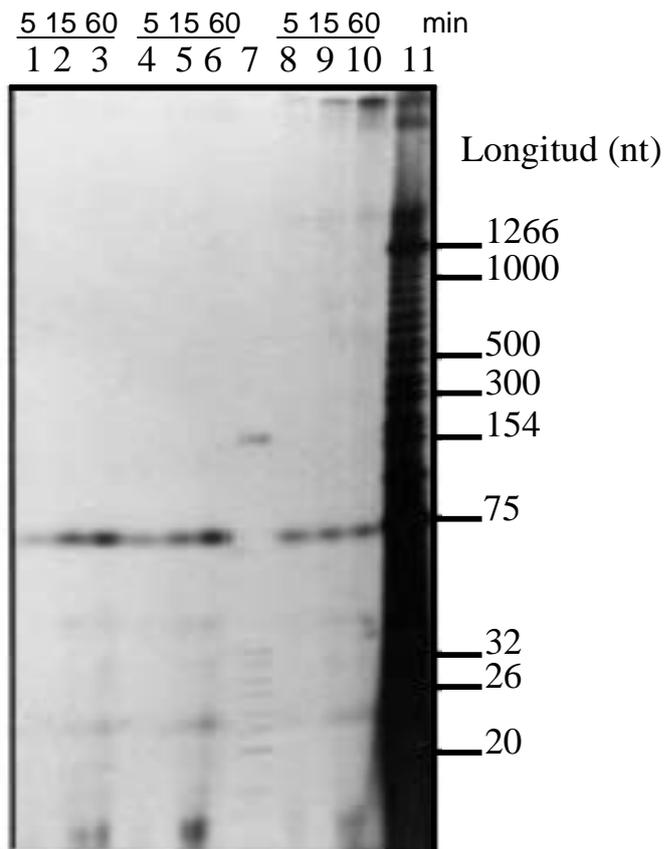


Figura 22.- Síntesis de DNA en un molde de DNA cadena sencilla, circular y covalentemente cerrado (pWori) previamente cebado por la DNA primasa. La síntesis del cebador fue realizada como se indicó anteriormente, después, la pol 1 (carriles 1, 2 y 3), la pol 2 (carriles 4, 5 y 6) o La Pol I de *E. coli* (carriles 8, 9 y 10) fueron añadidas junto con dCTP, dGTP, TTP y [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dATP. Las muestras fueron incubadas por 5 (carriles 1, 4 y 8), 15 (carriles 2, 5 y 9) o 60 min (carriles 3, 6 y 10) a 37 °C y procesadas como se indica en material y métodos. Carril 7 y 11, escalera de 13-32 nucleótidos y escalera de DNA de alto peso molecular respectivamente.

## **Capítulo III**

### **Caracterización de la DNA pol $\delta$ de maíz durante la germinación**

### 3.1 OBJETIVOS

#### **General**

Determinar la expresión de la pol  $\delta$  de maíz (Zmpol $\delta$ ) a nivel de RNAm, proteína y actividad durante la germinación.

#### **Específicos**

- A) Clonar el cDNA de Zmpol $\delta$ .
- B) Sobreexpresar el gene codificante de Zmpol $\delta$  en *E. coli*.
- C) Generar anticuerpos dirigidos contra la proteína Zmpol $\delta$  recombinante.
- D) Determinar los niveles de expresion del RNAm de Zmpol $\delta$  durante la germinación.
- E) Establecer los niveles de proteína de Zmpol $\delta$  durante la germinación.
- F) Determinar la actividad de Zmpol $\delta$  durante la germinación.
- G) Determinar la presencia de Zmpol $\delta$  en diferentes tejidos de la semilla.
- H) Determinar la presencia de Zmpol $\delta$  en diferentes tejidos de plántula.

## **3.2 Material y Métodos.**

### **Material biológico.**

Las semillas de maíz variedad Chalqueño fueron obtenidas directamente de un agricultor del Valle de Chalco y presentaron una viabilidad mayor al 95%. Las semillas de arroz (*Oriza sativa* L., variedad Superextra), fueron obtenidas directamente de un agricultor del Estado de Morelos y presentaron una viabilidad mayor al 90%.

### **Enzimas, plásmidos y kits**

Accuprime super mix II, EcoR1, BamH1, NotI, Superscript one-step RT-PCR with platinum Taq y el plásmido pProEx HTc se obtuvieron de Invitrogen, Rapid miniprep isolation plasmid kit, de Gibco-BRL, Ligafast rapid DNA ligation system y pGEM-T easy vector system I, de Promega, PCR cleanup kit, anticuerpo anti-cola de polihistidinas y Proteína A-agarosa, de Roche Applied Science.

### **Cepas**

E. coli DH5 $\alpha$ .

### **Soluciones amortiguadoras y reactivos**

#### **Solución amortiguadora para imbibición de ejes embrionarios**

Tris-HCl pH 7.4 50 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sacarosa 2%, cloranfenicol 10 mM.

#### **Solución amortiguadora para homogenar ejes embrionarios**

Tris-HCl pH 7.6 40 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.6 40 mM, KCl 15 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, sacarosa 250 mM, 1 tableta del cocktail inhibidor de proteasas (Roche)/50 mL.

#### **Obtención de los ejes embrionarios de maíz y embriones de arroz**

Los ejes embrionarios de maíz y los embriones de arroz fueron disectados a mano y utilizados inmediatamente o almacenados a 4 °C hasta su uso.

#### **Imbibición de los ejes embrionarios de maíz**

Los ejes embrionarios de maíz (1 g por tratamiento) fueron embebidos como se indica en Material y Métodos en la sección anterior.

#### **Imbibición de semillas de maíz.**

Las semillas de maíz fueron desinfectadas con NaClO al 0.5% por 5 min y luego enjuagadas 7 veces con 20-30 mL de agua desionizada estéril cada vez, posteriormente, se colocaron entre 2 toallas de papel, las cuales se enrollaron en forma de "taco" y se embebieron con agua desionizada estéril a 25 °C durante diferentes tiempos.

#### **Obtención de plántulas de maíz.**

Para la obtención de diferentes tejidos de plántula de maíz, las semillas se desinfectaron como se indicó previamente, posteriormente, se embebieron en vermiculita durante 7 días con ciclos de 12 h luz/12 h oscuridad a 25°C. La longitud de las raíces y tallos a este tiempo fue de 15-20 y 18-20 cm respectivamente.

#### **Obtención de extracto crudo de proteínas de ejes embrionarios, de endospermo y de diferentes tejidos de plántula de maíz**

La obtención del extracto crudo de proteínas de endospermo, escutelo y ejes embrionarios se hizo como se indica en Material y Métodos en la sección anterior. Para la obtención del extracto crudo de proteínas de embriones de arroz se obtuvieron 0.5 g de embriones de semilla seca y fueron homogenados en 1.5 mL de solución amortiguadora de homogeneización, posteriormente, fueron procesados de igual manera a como se indica para los ejes embrionarios de maíz. Para la obtención del extracto crudo de diferentes tejidos de plántula de maíz, ésta se disectó de la siguiente manera: se tomaron los 2 primeros cm de la coleorriza, 2 cm de la región central de la raíz primaria, 0.5 cm de la punta de la raíz, 2 cm de mesocotilo, 2 cm de coleoptilo (después del primer nodo) y 2 cm de la punta de la 1ª y 2ª hojas.

#### **Obtención de RNA total**

El RNA total fue obtenido a partir de 10 ejes embrionarios de maíz utilizando el reactivo trizol y siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen) de acuerdo al método de Chomczynski (1993). Brevemente, después del tiempo de imbibición, enjuagar los ejes embrionarios con agua desionizada estéril (previamente tratada con DEPC), posteriormente, homogenar con trizol (1.5 mL/100 mg de ejes embrionarios), centrifugar a 12,000 x g 10 min/4°C, eliminar la pastilla y al sobrenadante agregar 0.3 mL de cloroformo, agitar vigorosamente por 15 seg, incubar a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugar a 12,000 x g 15 min a 4°C, cambiar la fase acuosa a otro tubo estéril y agregarle 1 volumen de isopropanol, incubar la muestra 15 min a temperatura ambiente, centrifugar a 12,000 x g

10 min. Lavar la pastilla 2 veces con 1 mL de etanol al 75%, centrifugar a 12,000 x g y resuspender la pastilla en agua libre de RNasa.

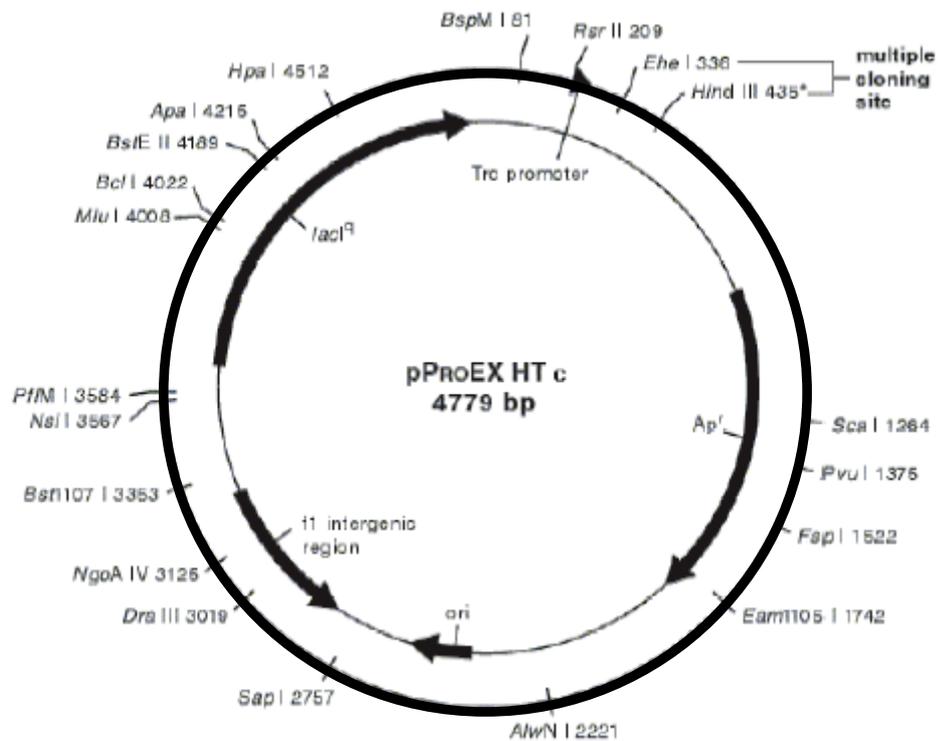
### **Clonación en marco de lectura de los fragmentos de 219 y 885 pb del extremo 3' de Zmpolδ.**

EL cDNA de Zmpolδ se obtuvo con el kit SuperScript II RNasa H-reverse transcriptase (Invitrogen), incubando a 55°C durante 50 min 1 µg de RNA total obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 24 h + 0.2 µM del cebador: 5'-TCAGAAGTCCCACCCGATCAAG-3' de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El cDNA se amplificó por PCR con el kit Accuprime Supermix II de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Invitrogen). La PCR se realizó con 2 µL de la reacción anterior + 0.2 µM de los siguientes cebadores:

"Forward" 5'-CCCGAATTCTTGCAAGGGAAGAGAAGCAGAGTTG-3',  
"Reverse" 5'-CCCGCGGCCGCTCAGAAGTCCCACCCGATCAAG-3'.

Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 5 min, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y 10 min de extensión final a 72°C.

Los productos de PCR de 219 pb se purificaron con el kit PCR clean up y se incubaron con 10 u de las enzimas EcoRI y NotI toda la noche a 37°C. Después de la reacción, los productos obtenidos con los extremos cohesivos se purificaron con el kit previamente descrito y luego fueron incubados con el vector de expresión pProEx Htc (previamente digerido con 10 u de las enzimas de restricción EcoRI + NotI), el cual tiene la característica de adicionar una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína clonada. La ligación de los productos de PCR se hizo con el kit Ligafast rapid DNA ligation system. La Fig. 23 muestra el esquema del vector pProExHTc, con este vector recombinante se transformaron células de *E. coli* DH5α. Para corroborar la presencia del fragmento del cDNA de Zmpolδ, se obtuvo el plásmido de las células transformadas y se secuenciaron ambas cadenas con los oligos que se utilizaron para la reacción de amplificación del cDNA. Para clonar el fragmento de 885 pb se siguió la misma metodología, pero utilizando el oligo 5'-CCCGAATTTCGAGCCGATTCTGAAGAATGCC-3'.



**pPROEX HTc multiple cloning site and primer binding region: 235-482**

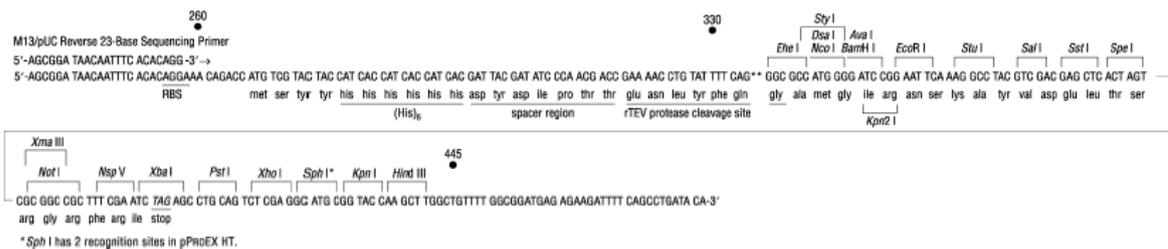


Figura 23. Vector de expresión pProEx HTc y sitio multiple de clonación que se utilizó para la clonación de los fragmentos de Zmpolδ y Ospolδ.

**Clonación en marco de lectura del fragmento de cDNA de Ospolδ que codifica para un polipéptido de 445 aa**

Se amplificó un fragmento de 1335 pb a partir de una PCR utilizando como molde el plásmido pBluescript conteniendo el cDNA completo de Ospolδ (donado amablemente por los Dres. Ukinobo Uchiyama y Kengo Sakaguchi),

con los oligos sentido: 5'-AGGCAAGGGCTGGATTTTATG-3' y antisentido: 5'-GTGGACCCTGATATTATTATTGG-3' bajo las siguientes condiciones: 94°C 5 min, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1.5 min a 72°C y 10 min de extensión final a 72°C. Posteriormente, se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

### **Sobreexpresión y purificación de polipéptidos de Zmpolδ**

Las células transformadas con los cDNA parciales del gene de Zmpolδ se cultivaron en medio LB con 50 µg/mL de ampicilina a 37°C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 595 nm, posteriormente, se adicionó 0.5 mM de IPTG para inducir la expresión de los polipéptidos codificados en los 2 cDNAs parciales de Zmpolδ. Las células se incubaron y se colectaron cuando éstas alcanzaron una densidad óptica de 0.8-0.9 a 595 nm. El paquete celular se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis que contenía tris pH 7.6 50 mM, β-mercaptoetanol 1 mM y una tableta de inhibidores de proteasas Complete (Boehringer); posteriormente, las células se lisaron por sonicación a 3 kHz durante 30 seg en un equipo ABZ. La presencia de la proteína se determinó en SDS-PAGE al 15% para el fragmento de 73 aa y de 12% para el fragmento de 295 aa, tiñendo con azul de Coomassie y por ensayos de western blot, utilizando un anticuerpo dirigido contra la cola de polihistidinas (Roche). Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad con una columna de níquel previamente equilibrada con solución amortiguadora de lisis + 10 mM de imidazol. Las proteínas recombinantes se eluyeron de la columna con el mismo amortiguador pero conteniendo 200 mM de imidazol.

### **Obtención de anticuerpos policlonales**

Después de purificar a las proteínas recombinantes con la resina de níquel, se procedió a efectuar geles de SDS-PAGE al 15% y 12% para los fragmentos de 73 y 295 aa respectivamente, la banda de proteína (aproximadamente 500 µg) se extrajo cortándola del gel de poliacrilamida, se homogeneizó con PBS hasta obtener una suspensión muy fina y se mezcló con 500 µL de adyuvante completo de Freund. Esta mezcla se utilizó para aplicar la primera inmunización. Una segunda inmunización se realizó 8 días después con el adyuvante incompleto. La inmunización se realizó en conejos de raza Nueva Zelanda vía intramuscular durante 7 semanas repitiendo el esquema anterior. Los anticuerpos fueron titulados por inmuno ensayo tipo "western blot" utilizando 2-5 µg de proteína recombinante y 20 µg de proteína total de ejes embrionarios de maíz.



### 3.3 Resultados

#### Comparación de secuencias primarias de DNA polimerasas $\delta$

La secuencia primaria de pols  $\delta$  se ha descrito para un gran número de especies, que incluyen desde levaduras hasta mamíferos. En el año 2003 se publicó la secuencia parcial de un cDNA de la DNA pol  $\delta$  de maíz (Zmpol $\delta$ , fragmento de 2072 pb, No. De acceso AY109773) con un marco de lectura abierto de 1563 pb (que genera un polipéptido de 523 aa). El fragmento de Zmpol $\delta$  se comparó con las secuencias primarias de las pols  $\delta$  de humano, vaca, ratón, mosca de la fruta, *Caenorhabditis elegans*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, soya, *Arabidopsis thaliana* y arroz, con el método clustal W 1.82. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de identidad de las proteínas entre las diferentes especies respecto al fragmento de Zmpol $\delta$  y en la figura 24 el árbol filogenético resultante, en donde se puede observar que existe una alta identidad con las pols  $\delta$  de *Schizosaccharomyces Pombe* y animales y en menor proporción con la pol  $\delta$  de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2. Porcentaje de identidad de Zmpol $\delta$  respecto a arroz (Os), soya (Gm), *A. thaliana* (At), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), Bovino (Bt), humano (Hs), ratón (Mm), *Candida albicans* (Ca), mosca de la fruta (Dm), *Caenorhabditis elegans* (Ce) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) obtenido con el programa clustal W versión 1.8.

Secuencia A/longitud (aa)	Secuencia B/longitud (aa)	Identidad A:B
Zmpol $\delta$ /521	Os/1061	93
Zmpol $\delta$ /521	Gm/1031	75
Zmpol $\delta$ /521	At/1037	72
Zmpol $\delta$ /521	Sp/1086	62
Zmpol $\delta$ /521	Bt/1106	61
Zmpol $\delta$ /521	Hs/1107	61
Zmpol $\delta$ /521	Mm/1105	61
Zmpol $\delta$ /521	Ca/1038	59
Zmpol $\delta$ /521	Dm/1092	59
Zmpol $\delta$ /521	Ce/1081	52
Zmpol $\delta$ /521	Sc/1097	49

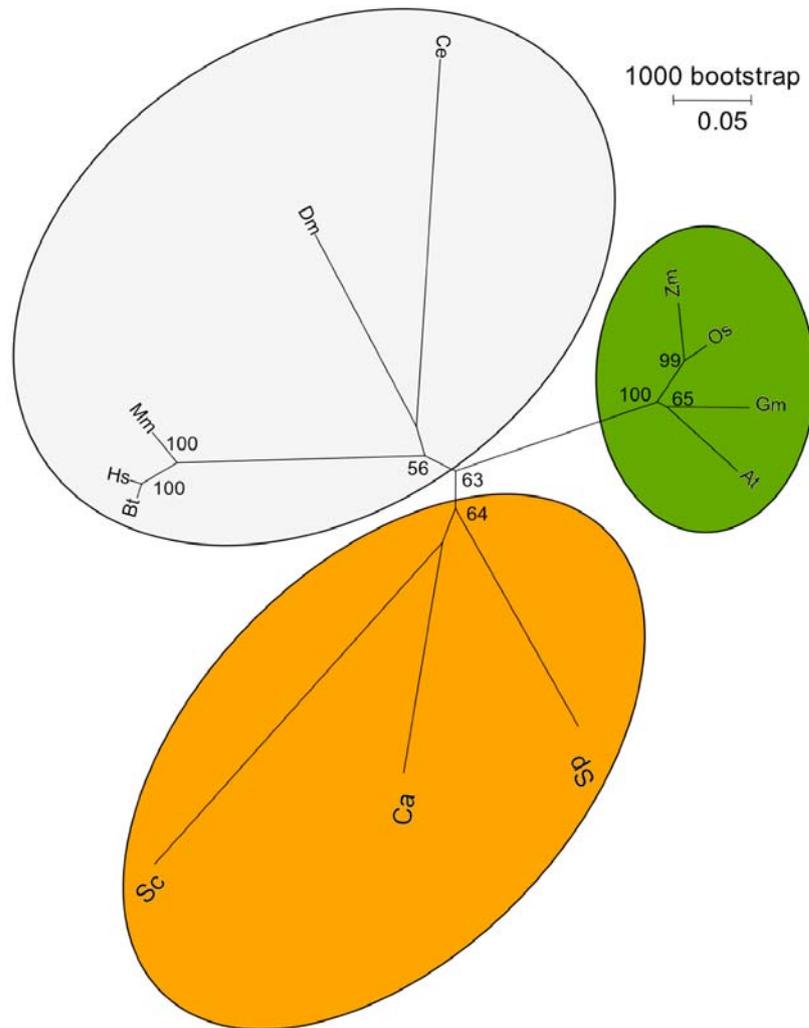


Figura 24.-Árbol filogenético de DNA Pols  $\delta$ . En verde, las pols de plantas: maíz (Zm), arroz (Os), soya (Gm) y *A. thaliana* (At); en gris, pols de mamíferos: bovino (Bt), humano (Hs) y ratón (Mm); insecto: *Drosophila melanogaster* (Dm); gusano: *Caenorhabditis elegans*; en naranja, levaduras: *Sacharomyces cerevisiae* (Sc) y *Schyzosaccharomyces pombe* (Sp) y hongo: *Candida albicans* (Ca).

### DNA pols $\delta$ de plantas

Se han descrito 6 regiones de similitud (numeradas por I-VI) que se encuentran en un subconjunto de DNA pols de la familia B. La región más conservada se encuentra en el motivo pol I y se caracteriza por contener un tetrapéptido con 2 aspartatos (GDTD) que tienen como función unir al ión  $Mg^{++}$  y son parte del sitio catalítico (Argos, 1988; Steitz, 1999). Cuando se compara con más detalle la secuencia del fragmento de Zmpol $\delta$  de 521 nt con las pols  $\delta$  de arroz, *A. thaliana* y soya, se puede observar (fig. 25) la alta identidad que existe entre éstas. Los números siguientes muestran la



proporción de identidad de la secuencia de aa de Zmpol $\delta$ /Ospol $\delta$  y pol  $\delta$  de soya (entre paréntesis) en los motivos: pol I 8/8 (8/8), pol II, 41/41 (41/41), pol III 39/39 (38/39), pol V 14/15 (14/15), pol VI 19/19 (18/19), CT1 20/20 (19/20), CT2 27/28 (26/28) y CT3 34/34 (31/34). La subunidad catalítica de casi todas las DNA pols  $\delta$  descritas hasta ahora contienen 2 dedos de zinc en su extremo Carboxilo Terminal (CT) y son esenciales para mantener la interacción con la subunidad p50 (Sánchez-García *et al*, 2004); estas secuencias también se encuentran en Zmpol $\delta$  y en Ospol $\delta$ , sin embargo y sorprendentemente, estos motivos se encuentran ausentes en las pols  $\delta$  de soya y *A thaliana* (ambas plantas dicotiledóneas), lo cual sugiere que la interacción entre la subunidad catalítica con la subunidad p50 podría presentarse por otros medios. Es de llamar la atención que en el motivo pol III se encuentra la secuencia LxCxE, la cual es un motivo de unión a la proteína de retinoblastoma (pRB). Las pols  $\alpha$  y  $\delta$  de humano también contienen esta secuencia y se ha demostrado que existe una interacción física entre estas proteínas (Takemura *et al*, 2001 y Krucher *et al*, 2000), lo cual sugiere que las pols  $\delta$  de plantas también podrían interactuar con pRb.

### Sitios potenciales de modificación postraducciona del fragmento de Zmpol $\delta$

Se tienen reportes de que la DNA pol  $\delta$  de humanos es fosforilada por cinasas dependientes de ciclina (Zeng *et al*, 1994; Ducuox *et al*, 2001 y Frouin *et al*, 2002), lo cual sugiere que las pols  $\delta$  de plantas lo sean también. La secuencia primaria del fragmento de 521 aa de Zmpol $\delta$  tiene potencialmente varios sitios de fosforilación, miristoilación, amidación, glicosilación y sulfatación (ver fig. 26).

```

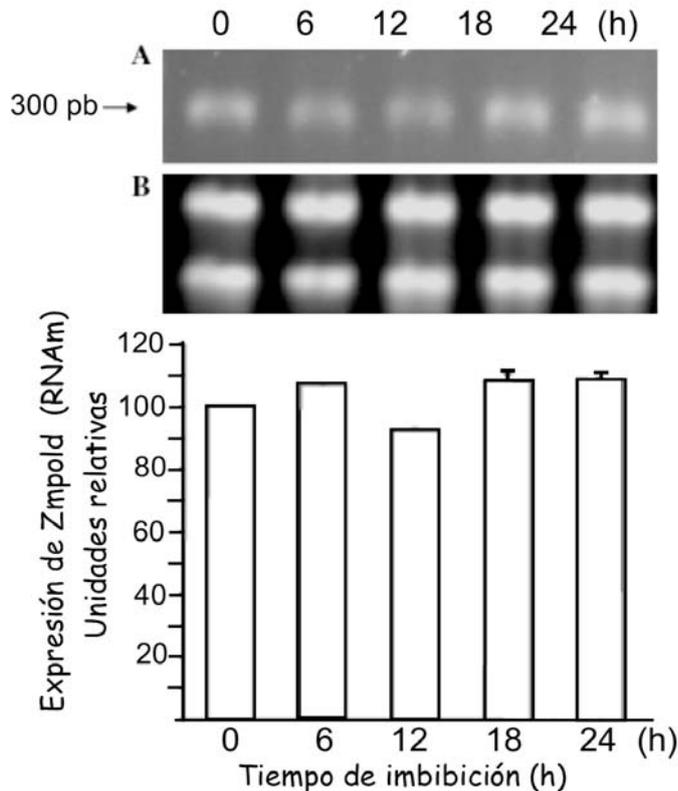
DTFEGATVLEARAGFYEKPIATLDFASLYPSIMMAYNLCYCTLVPPPEAR 50
KLNLPPEFVNKTPSGEIFVKPELQKGILPEILEELLAARKRAKADLKEAK 100
DPLERAVLDGRQLALKISANSVYGFTGATVGQLPCLEISSSVTSYGRQMI 150
EHTKKLVEDKFTTVGGYEHTAEVIYGDTDSVMVQFGVSTVEDAMKLGREA 200
ADYISGTFTTKPIKLEFEKVFYFPYLLISKKRYAGLYWTNPEKFDKMDAKGI 250
ETVRRDNCLLVKNLVTECLHKILVDRDVPGAVQYVKNTISDLLMNRVDLS 300
LLVITKGLTKTGEDYAVKAAHVELAERMRKRDPATAPTVGDRVPYVIIKA 350
AKGAKAYEKSEDPYVLDNNIPIDPQYYLENQISKPLLRIFEPILKnasq 400
ELLHGSHTRSVSISTPSNSGIMKFAKKQLTCLGCKAVISGASQTLCSHCK 450
GREAELYCKTVANvsdLEMLFGRLWTQCQECQGSLHQDVLCTSRDCPIFY 500
RRRKAQKDMTEARLQLDRWDF 521

```

Figura 26. Sitios potenciales de modificación postraducciona del fragmento de 521 aa de Zmpol $\delta$ . En rojo; fosforilación, subrayado; miristoilación, *en itálicas*; sulfatación de la tirosina, en minúsculas; glicosilación en asparagina, **en negritas**, **sumoilación**. Datos obtenidos con los programas scan prosite, NetPhos 2.0 server prediction y SUMOplot prediction.

### Expresión del RNAm de Zmpol $\delta$ durante la germinación

Para determinar los niveles de expresión del RNAm de Zmpol $\delta$  durante las primeras 24 h de imbibición se hicieron ensayos de northern blot, sin embargo, no fue posible determinar señal alguna, por lo cual se realizó por medio de ensayos de RT-PCR semicuantitativo (ver la sección de materiales y métodos). Antes de hacer los ensayos (y para evitar algún falso positivo debido a una posible contaminación de DNA genómico en el RNA total), se



hicieron previamente ensayos de PCR a partir de DNA

Figura 27.-Expresión de Zmpol $\delta$  durante la germinación. A) RT-PCR a partir de RNA total obtenido de ejes embrionarios embebidos durante 0, 6, 12, 18 y 24 h. B) Control de cargado con RNA ribosomal C) Densitometría por la relación intensidad de la banda en A: RNA ribosomal cargado.

genómico y de RNA total y en ningún caso se observaron bandas con los cebadores utilizados (datos no mostrados), por lo que con este resultado se descartó un posible resultado artefactual y, consecuentemente, se procedió a determinar la expresión del RNAm de Zmpol $\delta$  durante las primeras 24 h de imbibición. En la figura 27 se observa que no existen cambios significativos del mensajero durante las primeras 24 h de imbibición, por lo cual este resultado sugiere que no hay un cambio de la expresión de Zmpol $\delta$  a nivel transcripcional.

### Sobreexpresión de los diferentes fragmentos de Zmpolδ y de Ospolδ

La sobreexpresión de los fragmentos de 73 y 295 aa del extremo C-terminal de Zmpolδ, así como el de 445 aa (aa 594-aa 1039) de Ospolδ y la generación de anticuerpos se efectuó como se indica en la sección de materiales y métodos. En la figura 28A se muestra la sobreexpresión de los fragmentos de 73 y 445 aa de Zmpolδ y Ospolδ respectivamente, y en la figura 28B el inmunoreconocimiento de los anticuerpos a sus respectivos epítomos.

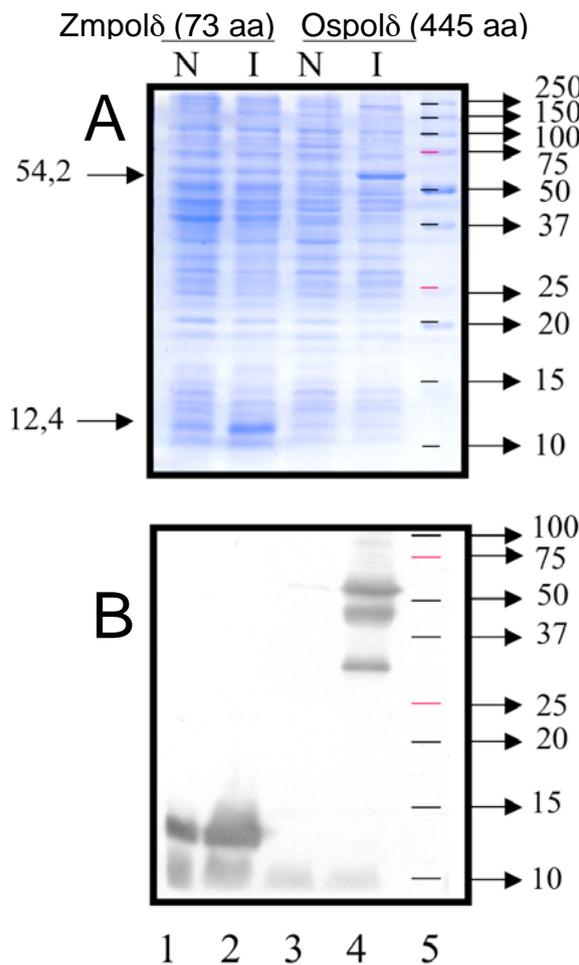


Figura 28. A) SDS-PAGE de los extractos crudos de *E. coli* no inducida (NI) e inducida (I), transformada con el plásmido pProEx HTc que contiene el inserto que codifica los 73 aa del extremo C-terminal (carriles 1 y 2), que contiene el inserto que codifica para un fragmento de 445 aa (aa 594 al aa 1039, carriles 3 y 4). El peso molecular esperado para los fragmentos híbridos de 73 y 446 aa son de 12,4 y 54,2 kDa respectivamente B) Inmuno reconocimiento tipo "western blot" con el anticuerpo anti-Ospolδ (Uchiyama *et al.* 2002).

### Anticuerpos anti Zmpol $\delta$ dirigidos contra el fragmento de 73 aa.

Históricamente se obtuvieron en primer lugar los anticuerpos dirigidos contra el fragmento de 73 aa, sin embargo, su caracterización fue difícil debido a que éstos, en un extracto crudo de ejes embrionarios de maíz, inmunoreconocían una gran cantidad de bandas de manera inespecífica. A condiciones altamente estrictas (incubación del 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> anticuerpo en solución de saturación + Tween 2% y lavados de los mismos con PBS + NaCl 2 M, ver fig. 29), se reconocían bandas de 215, 160, 60 y en menor proporción una banda del tamaño esperado, de 125 kDa. En un principio, este resultado sugería que las bandas de 215 y 160 kDa (carril 2, fig. 29) podrían ser modificaciones postraduccionales (PT) de Zmpol $\delta$ , aunque hasta la fecha no existe un reporte que indique que una modificación PT de pol  $\delta$  de ninguna especie pueda causar una alteración de peso molecular de tal magnitud; temiendo que la proteína sobreexpresada hubiese sido un polipéptido que tuviese una secuencia no esperada, se secuenció el fragmento peptídico y, al menos los primeros 12 aa, corresponden a la secuencia de la DNA pol (datos no mostrados).

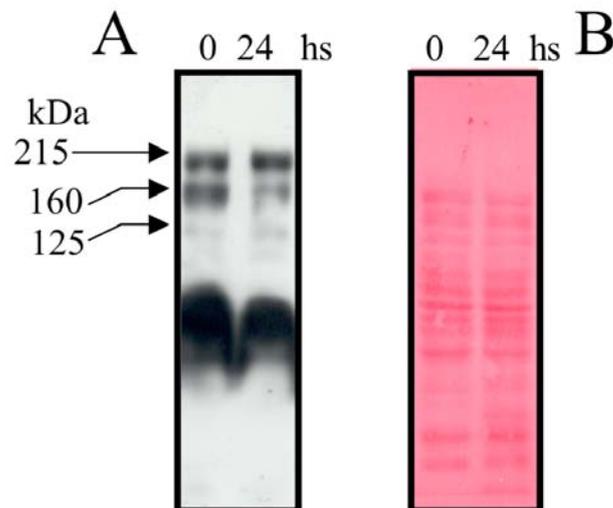


Figura 29. Caracterización de anticuerpos anti-Zmpol $\delta$  dirigidos contra los 73 aa del fragmento CT de la proteína Zmpol $\delta$ . A, western blot con el anticuerpo anti-Zmpol $\delta$  de extractos crudos de ejes embrionarios de maíz de 0 y 24 h de imbibición (carriles 1 y 2 respectivamente). B, membrana de immobilon teñida con rojo de ponceau utilizada para el "western blot".

**Anticuerpos anti-Ospol $\delta$  dirigidos contra el fragmento C-terminal (aa 598 al aa 1034)**

Posteriormente, apareció un reporte sobre la caracterización de la DNA pol  $\delta$  de arroz, en donde observaron una única banda de peso molecular de 125 kDa en un extracto crudo de células en suspensión de arroz (Uchiyama *et al*, 2002), por lo cual se decidió obtener nuevos anticuerpos contra un fragmento de Zmpol $\delta$  de 295 aa del extremo C-terminal y contra un fragmento de Ospol $\delta$  de 445 aa (aa 594 al 1039). Los anticuerpos anti-Ospol $\delta$  y anti-Zmpol $\delta$  se purificaron con proteína A-Agarosa; los anticuerpos anti-Ospol $\delta$  fueron los que inmunoreconocieron con mayor especificidad una banda del tamaño esperado tanto en extractos crudos de ejes embrionarios de maíz como de embriones de arroz, como se puede observar en la figura 30. La diferencia en intensidad de la banda inmuno reconocida no fue debida al cargado de proteína, ya que la correspondiente a maíz fue solo un octavo de la de arroz y aún así se observa mayor intensidad en el extracto crudo de maíz que en el de arroz, resultado que concuerda con lo reportado por Uchiyama *et al*, (2002) en el sentido de que Ospol $\delta$  se encuentra en muy baja proporción en los diferentes tejidos de la planta de arroz.

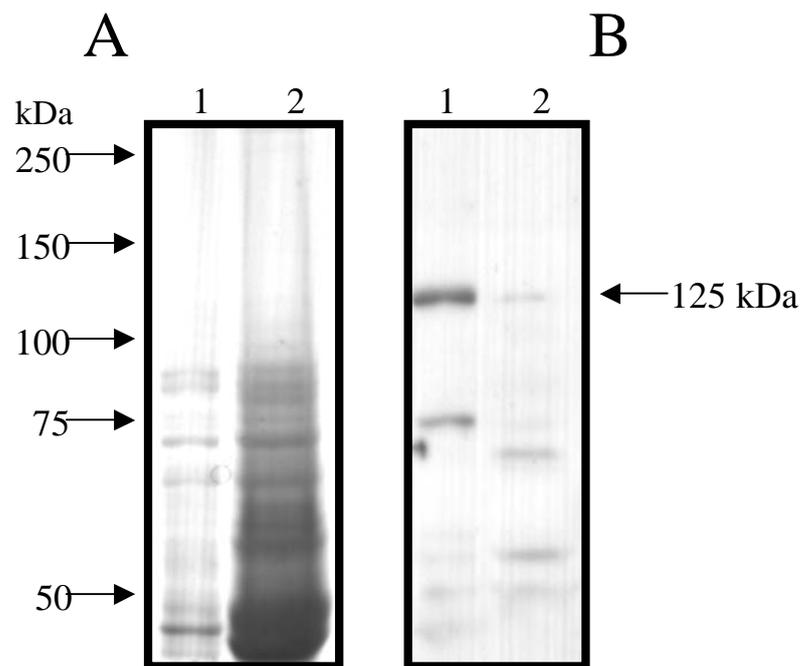


Figura 30. Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$  con el anticuerpo anti-Ospol $\delta$ . A, Tinción con azul de coomasie de proteínas de extracto crudo de ejes embrionarios de maíz y de embriones de arroz obtenidos de semilla seca (carril 1 y 2 respectivamente). B, Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$ , carril 1 y Ospol $\delta$ , carril 2.

### Zmpol $\delta$ durante la germinación (presencia de la proteína y actividad)

Zmpol $\delta$  está presente en ejes embrionarios de semilla seca y la cantidad de proteína no varía durante las primeras 24 h de imbibición (fig. 31), lo cual sugiere que tampoco es a nivel traduccional la regulación de Zmpol $\delta$ , por lo

cual se determinó la actividad de la proteína durante la germinación. Para medir específicamente la actividad de Zmpol $\delta$  y no la de otras DNA pols contaminantes, se efectuaron ensayos de "pull down" de Zmpol $\delta$  con el anticuerpo anti Ospol $\delta$ . En la figura 31 se observa una actividad basal en ejes embrionarios de semilla seca de maíz (0 h de imbibición), la cual se incrementa al doble a las 6 h de imbibición, a las 12 h los niveles de actividad son semejantes a los de embriones de semilla seca, posteriormente, a las 18 h de imbibición la actividad se incrementa al triple y se mantiene a las 24 h de imbibición. Este resultado sugiere que Zmpol $\delta$  se regula a nivel postraducional.

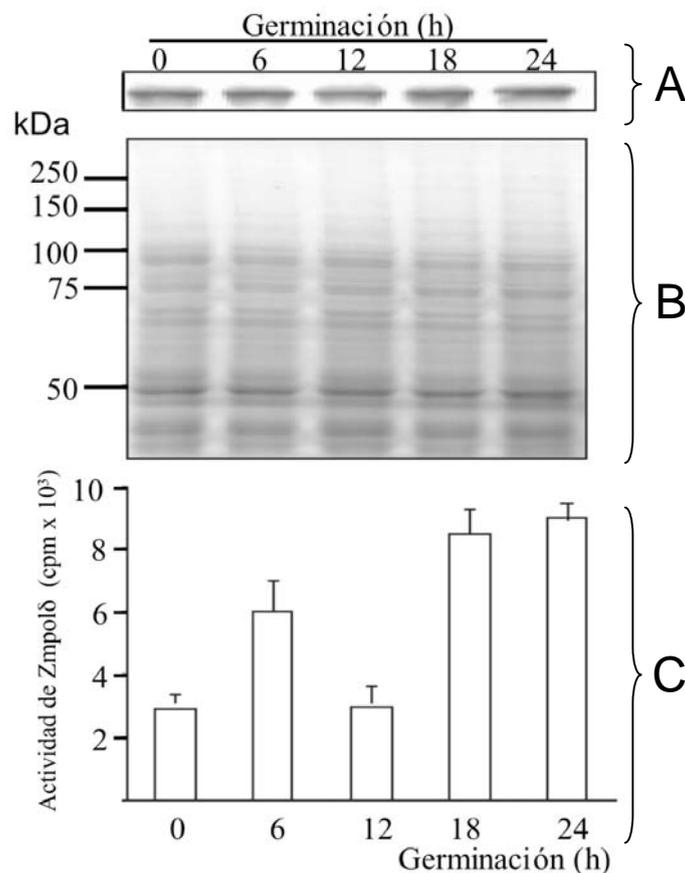


Figura 31. Inmunodetección y actividad de Zmpol $\delta$  durante la germinación. A) Inmunodetección de Zmpol $\delta$  en extractos crudos de ejes embrionarios embebidos durante 0, 6, 12, 18 y 24 h. B) Control de cargado; tinción de proteínas con azul de coomasie después de la SDS-PAGE C) Actividad de Zmpol $\delta$  durante la germinación.

### Expresión de Zmpol $\delta$ en los tejidos de semilla de maíz

La expresión a nivel de proteína de Zmpol $\delta$  se determinó en los diferentes tejidos de semilla de maíz tanto a 0 como a 24 h de imbibición. Zmpol $\delta$  se encontró en todos los tejidos del eje embrionario tanto a 0 como a 24 h de

imbibición y sorprendentemente, también en endospermo y en muy baja proporción en escutelo a 0 h de imbibición. A las 24 h de imbibición la expresión de Zmpol $\delta$  se incrementa notablemente en los meristemos laterales de los ejes embrionarios, mientras permanece constante en los demás tejidos de la semilla estudiados y desaparece en escutelo a las 24 h (figura 32). Paralelamente al estudio de Zmpol $\delta$ , también se estudió la presencia de ZmPCNA en los mismos tejidos; el resultado mostrado en la fig 32 indica que, a excepción de su incremento en endospermo a las 24 h, esta proteína tiene un comportamiento similar al de Zmpol $\delta$ .

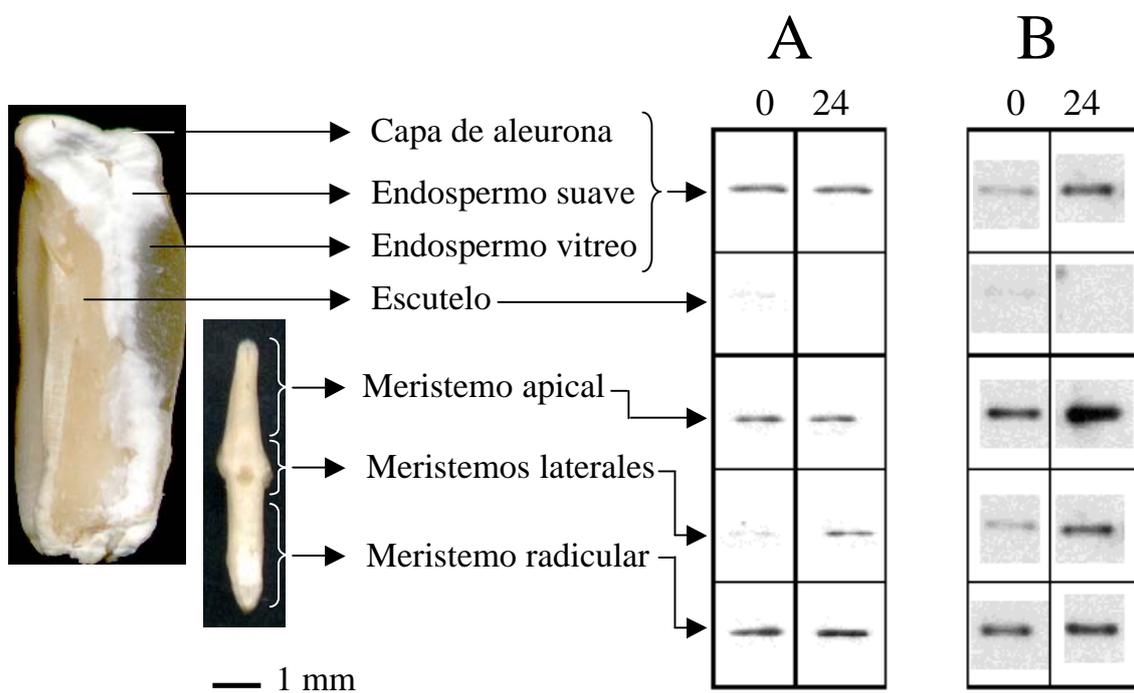


Figura 32. Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$  en diferentes tejidos de semilla de maíz. A) Western anti- Zmpol $\delta$  de extractos crudos de ejes embrionarios de 0 y 24 h de imbibición, B) Western anti- ZmPCNA de extractos crudos de ejes embrionarios de 0 y 24 h de imbibición.

### Expresión de Zmpol $\delta$ en endospermo durante las primeras 36 h de imbibición

Debido al resultado anterior, se decidió estudiar con mayor detalle la presencia de Zmpol $\delta$  y ZmPCNA en endospermo de 0 a 36 h de imbibición. Zmpol $\delta$  permanece constante durante las primeras 18 h, disminuye a las 24 h

y a las 36 h ya no es detectable; sin embargo, ZmPCNA no sigue el mismo patrón de expresión, ya que su presencia se incrementa desde las 12 h y su nivel de expresión se mantiene hasta las 36 h.

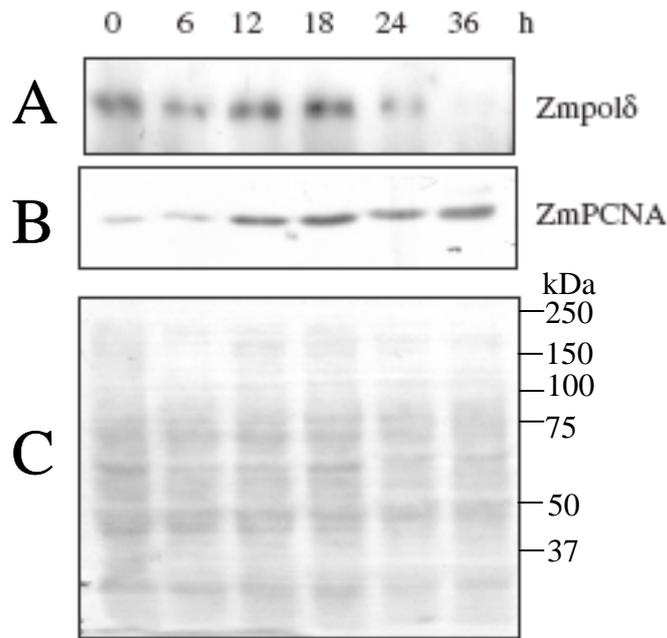


Figura 33. Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$  y ZmPCNA en endospermo durante 0 a 36 h de imbibición. A, Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$ ; B, Inmunoreconocimiento de ZmPCNA; C, Membrana de inmobilon teñida con rojo de ponceau.

### Expresión de Zmpol $\delta$ en tejidos de plántula de maíz

Se estudió la presencia de Zmpol $\delta$  en raíz, tallo y hojas de plántula de 7 días de edad. De todos los tejidos estudiados, sólo en meristemas de raíz se localizó claramente a la proteína y muy tenuemente en mesocotilo y coleoptilo, en los demás tejidos no se observó la presencia de la proteína. Un patrón similar se observó cuando se estudió la presencia de ZmPCNA en los mismos tejidos.

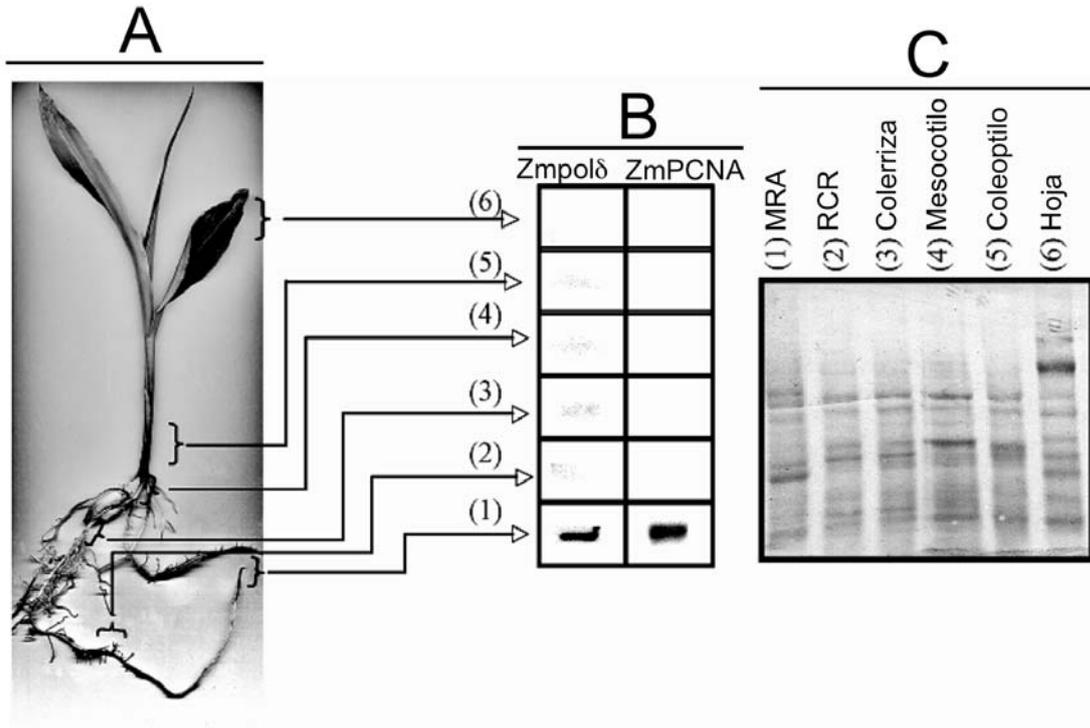


Figura 34. Inmunoreconocimiento de Zmpol $\delta$  en diferentes tejidos de plántula de maíz de 7 días de edad. A) Western anti-Zmpol $\delta$ , B) Western anti-ZmPCNA, C) Control de cargado, tinción con rojo de ponceau de la membrana de immobilon utilizada para el western de A y B; MRA, meristemo apical de raíz primaria; RCR, region central de raíz primaria.

## **Capítulo IV**

### **Discusión**

## Discusión

### Caracterización de la DNA primasa sin polimerasa $\alpha$ de maíz

El DNA contiene la información biológica que instruye a la célula como existir en un modelo ordenado, por lo tanto, es esencial que el DNA se mantenga íntegro y que su replicación se presente sin errores, es decir, que se obtenga una replica fiel del mismo para que se hereden las características de la célula materna a las células hijas. Para ello es necesaria la acción concertada de una gran cantidad de factores proteicos y actividades enzimáticas. Las enzimas involucradas directamente en la replicación del DNA son las DNA polimerasa replicativas. A excepción de la pol  $\alpha$ , ninguna DNA pol puede iniciar la síntesis de DNA *de novo*, y esto es debido a que solo esta enzima contiene asociada muy fuertemente una actividad de DNA primasa, que es la que se encarga de sintetizar el cebador, generalmente un oligorribonucleótido de 12-18 unidades (ver fig. 19). La DNA pol  $\alpha$  está clasificada (en base a su similitud en secuencia primaria, a la DNA pol II de *E. coli*) dentro de la familia B de las DNA pols. Todas las DNA pols eucariotes de mamíferos de la familia B contienen 6 regiones de similitud (numeradas del I al VI), la region más conservada (I) incluye un péptido de 4 aa con 2 residuos de aspartato (DTDS) esenciales para la catálisis debido a que estos unen  $Mg^{++}$ ; además, poseen muchos dominios funcionales: el dominio de elongación 5' -3', el de unión a DNA, el de unión a dNTPs, el de unión a pirofosfato y, en el caso de la pol  $\delta$ , el de exonucleasa 3' -5.

Debido a dificultades metodológicas inherentes a la estructura de las células vegetales, y a que son muy pocos los investigadores que han incursionado en el estudio de DNA pols de plantas, el avance que se ha obtenido respecto a la caracterización bioquímica de las DNA pols replicativas ha sido considerablemente menor comparado al que se tiene de células de mamíferos; sin embargo, y a pesar de ello, cada vez se logran más avances que ayudan a entender los mecanismos de replicación del DNA en sistemas vegetales.

La caracterización bioquímica de las DNA pols  $\alpha$  y  $\delta$  de maíz (2 de las 3 principales pols replicativas en cualquier sistema eucarionte) fue un objetivo a cubrir en el presente proyecto. Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó la existencia de DNA pols tipos  $\alpha$  y  $\delta$ , con pesos moleculares de las subunidades catalíticas de alrededor de 90 (Coello *et al*, 1994) y 80 kDa (Orjuela, 1998) respectivamente, mediante geles de actividad *in situ*. El cDNA de la subunidad catalítica de la DNA pol  $\alpha$  de arroz permite predecir

una proteína de 140 kDa (Yokoi *et al*, 1997), menor que el reportado para la enzima de mamíferos (180 kDa). EL tamaño de la subunidad catalítica de la DNA pol tipo  $\alpha$  de maíz coincide con el reportado para la DNA pol tipo  $\alpha$  de trigo (Luque *et al*, 2000). Anticuerpos policlonales dirigidos contra la holoenzima de la pol  $\alpha$  de maíz reconocen subunidades de 90, 70, 60, 55, 50 y 25 kDa (Coello *et al*, 1994); las subunidades de 70, 60 y 55-50 kDa coinciden con los pesos moleculares de las subunidades que componen a la pol  $\alpha$  de mamíferos; aunado a ello, una actividad de DNA primasa coeluye a través de diversos pasos cromatográficos (García *et al*, 1997). Previamente se hizo la caracterización bioquímica de la actividad de DNA primasa asociada a la DNA pol 2, la que mostró que la concentración óptima de  $MgCl_2$  es 8 mM, aunque también puede utilizar  $MnCl_2$  (0.8 mM); ésta enzima no utiliza moldes polipurínicos tales como polidA ya que siempre comienza la síntesis con A o G; es fuertemente inhibida por NEM y por concentraciones mayores de 15 mM de KCl, funciona eficientemente a 37 °C y a pH de 8.5 (García, 1995), propiedades que son muy similares a las reportadas para las DNA primasas de trigo y de *A. thaliana* (Laquel *et al*, 1994; García-MayayBuck, 1998), excepto que la DNA primasa de *A. thaliana* trabaja mejor a concentraciones altas de  $Mg^{++}$ ; (50 mM) y de KCl; (100 mM). La DNA primasa, en todos los sistemas eucariotes estudiados, se encuentra fuertemente asociada al complejo de la pol  $\alpha$ ; debido a ello, se requieren de condiciones muy estrictas para disociar las actividades enzimáticas, para lo cual se han utilizado tratamientos con: 1) urea 2.8-3.4 M en células de *D. melanogaster*, 1983); 2) sulfato de amonio 0.8 M en células HeLa (VishwanathayBaril, 1986); 3) KCl 2 M; 4, pH 11.5 en presencia de KCl 1 M en células de bovino (Holmes *et al*, 1987). Sin embargo, la utilización de altas cantidades de sales y/o pH muy alcalino, inactivaban rápidamente a la DNA primasa. Un método alternativo fue la utilización de etilén glicol al 50% en células FM3A de ratón, humano y *Drosophila melanogaster* (Suzuki *et al*, 1985, Murakami *et al*, 1986, Cotterill *et al*, 1987). Debido a estos antecedentes, en el presente trabajo se utilizó una cromatografía hidrofóbica empleando una columna de fenil sefarosa, con la cual se logró separar la actividad de DNA primasa del complejo de la DNA pol 2, usando etilén glicol al 50% (fig. 15). Esto sugiere que, tanto en *Drosophila*, como en mamíferos y maíz, la subunidad con actividad de DNA primasa se asocia al complejo de la pol  $\alpha$  principalmente mediante interacciones hidrofóbicas. La identificación de la subunidad responsable de la actividad de DNA primasa en el complejo de la pol 2 se determinó mediante 3 diferentes técnicas:

1.- Cromatografía de exclusión molecular en Superdex 75. Mediante esta técnica se pudo observar que la actividad de DNA primasa eluye como una proteína monomérica de 68 kDa (fig. 16).

2.- Inmuno ensayo tipo "western blot" utilizando anticuerpos anti-DNA primasa de trigo (Laquel *et al*, 1994). Debido a que las enzimas replicativas eucariotas están altamente conservadas, fue posible utilizar un anticuerpo heterólogo y demostrar que la primasa de maíz está inmunológicamente relacionada con la DNA primasa de trigo (fig.17).

3.- Ensayo de "DNA primasa trapping". Por esta técnica se determinó que el peso molecular de la subunidad responsable de la actividad catalítica de DNA primasa es de 68 kDa; este valor difiere del reportado para las DNA primasas de trigo (60 kDa, Laquel *et al*, 1994) y de *Nicotiana tabacum* (50 kDa, García-MayayBuck, 1998). La DNA primasa de animales muestra la presencia de 2 subunidades de peso molecular aproximado de 58 y 49 kDa (Lehmanykaguni, 1989; KornbergBaker, 1992); es probable que la diferencia en peso molecular observado para la DNA primasa de maíz sea debida a una modificación postraducciona de la proteína, o alternativamente a un corrimiento anormal dada su secuencia aminoacídica. El tamaño preciso lo sabremos solo cuando podamos clonar el gen respectivo. Los cebadores sintetizados por la DNA primasa sin polimerasa, cuando utiliza como molde polidT<sub>1200</sub>, tienen una longitud de 8-34 nt, aunque principalmente sintetiza cebadores de 15-17 nt (fig. 19), muy similar a aquellos sintetizados por DNA primasas de mamíferos (KornbergBaker, 1992) y por las DNA primasas de trigo y *N. tabacum* (Laquel *et al*, 1994 y García-MayayBuck, 1998) y puede sintetizar el cebador en un amplio rango de temperaturas (10-42 °C), aunque a temperaturas de 30-37 °C se observan cebadores de hasta 34 nt (19 y 20), de tal forma que, al igual que se presenta en metazoarios, pareciera que la DNA primasa de maíz sintetiza *in vitro* múltmeros del cebador, como si "contara" la cantidad de nucleótidos añadidos por evento de unión al DNA (KornbergBaker, 1992). La DNA pol 2 puede elongar eficientemente los cebadores previamente sintetizados por la DNA primasa de maíz cuando ésta utiliza como molde polidT<sub>1200</sub> (ver fig. 21); sin embargo, cuando se utiliza un molde natural, de cadena sencilla y covalentemente cerrado, la DNA pol 2 elonga el cebador solo hasta una longitud de 75 unidades. Con la metodología utilizada, no se puede saber si la elongación del cebador utilizando polidT<sub>1200</sub> se debe a una actividad procesiva o si es consecuencia de múltiples eventos distributivos. La baja eficiencia para sintetizar DNA en moldes naturales podría deberse a que la enzima no puede superar las estructuras secundarias que generalmente se forman en estos moldes, para lo cual se requeriría la presencia de proteínas auxiliares como RPA. Por otro lado, la DNA pol 1, una

enzima tipo  $\delta$  (García *et al*, 1997), es muy ineficaz al elongar el cebador formado por la DNA primasa de la DNA pol  $\alpha$ , ya sea en el molde polidT<sub>1200</sub> como en el pWori (figs. 21 y 22). Es probable que la pol 1 tenga problemas con las conformaciones topológicas adoptadas por estos moldes y que no los pueda superar. Por lo tanto, bajo estas condiciones, es muy probable que la pol 1 requiera de proteínas accesorias tales como RPA, RFC y/o PCNA para poder sintetizar el DNA de una manera procesiva.

### **Caracterización de la DNA pol $\delta$**

Debido a la relevancia de la pol  $\delta$  como enzima replicativa, se propuso caracterizar también a esta enzima y estudiarla durante la germinación del maíz. De la secuencia de Zmpol $\delta$  reportada en la base de datos, se predice un fragmento del extremo C-terminal de 521 aa que, al compararlo con las DNA pols  $\delta$  de mamíferos y de otras plantas, se puede observar que está altamente conservada (tabla 2). Zmpol $\delta$  es casi idéntica a Ospol $\delta$  (92%, ambas monocotiledoneas), mientras que la comparación con las pols de soya y *A. thaliana* (ambas dicotiledoneas), indica una identidad de 74 y 71% respectivamente; cuando se compara con las pols  $\delta$  de mamíferos la identidad es de 60% (tabla 2). Zmpol $\delta$  contiene en su extremo C-terminal 2 motivos de dedos de Zn<sup>++</sup>, los que en mamíferos parecen ser esenciales para la interacción con la subunidad p50 (Sánchez-García *et al*, 1994). Sorprendentemente, la secuencia primaria de las pols  $\delta$  de las 2 plantas dicotiledoneas aquí estudiadas no presentan estos motivos, por lo que es probable que las plantas dicotiledóneas hayan desarrollado otros mecanismos para asociarse con la subunidad p50. Otra característica importante que resultó del estudio de la secuencia primaria de las DNA pols  $\delta$  de plantas fue encontrar la secuencia LXCXE (en donde X puede ser cualquier aa), motivo que reconoce y al que se une la proteína pRb. Las pols  $\alpha$  y  $\delta$  de mamíferos son fosforiladas por cinasas dependientes de ciclina (Cdk's) en diferentes aminoácidos, dependiendo de la fase de ciclo celular en que se encuentren (Voitenleitner *et al*, 1999) y se ha demostrado que la interacción con pRb (fosforilada por CDK2-ciclina E), es capaz de estimular la actividad de la DNA pol  $\alpha$  de humano (Takemura *et al*, 2001), mientras que a la pol  $\delta$  la inhibe (Krucher *et al*, 2000), lo que sugiere que en maíz las dos DNA pols replicativas pudieran también ser reguladas por ZmRb. Otra posible forma de regulación podría ser mediante la fosforilación de la subunidad catalítica y/o de las subunidades accesorias de las DNA pols. Como se puede observar en la figura 26, Zmpol $\delta$  contiene varios sitios potenciales de fosforilación y de modificación por sulfatación, miristoilación, glicosilación y sumoilación. A la fecha, en sistemas vegetales no se ha encontrado que exista modificación postraducciona de DNA pols

tipo  $\delta$ , consecuencia del escaso estudio que se ha desarrollado en esta área. Por inmuno ensayos tipo "western blot" (fig. 30) se demuestra que Zmpol $\delta$  es una proteína de aproximadamente 125 kDa, peso molecular que tienen la mayoría de las pols  $\delta$  de mamíferos y también Ospol $\delta$ . Zmpol $\delta$  se encuentra en alta proporción en ejes embrionarios de semilla de maíz, mientras que Ospol $\delta$  se encuentra en muy baja proporción (7-10 veces menos) en embriones de arroz, lo cual explica por qué Uchiyama *et al* (2002) no pudieron detectarla por inmuno ensayos tipo western blot en ningún tejido de plántula de arroz.

Los niveles del RNA mensajero y de la proteína de Zmpol $\delta$  no varían en el período 0-24 h de germinación, fenómeno que también se presenta con la DNA polimerasa tipo  $\alpha$  de maíz (CoelloyVázquez-Ramos, 1995<sup>a</sup>); esto sugiere que ambas proteínas son remanentes de la maduración de la semilla y que son muy estables, lo cual pareciera muy conveniente ya que la semilla tendrá que desarrollar todo su potencial germinativo tan pronto se presenten las condiciones apropiadas para la germinación. Zmpol $\delta$ , al igual que Zmpol $\alpha$ , presenta una regulación a nivel postraducciona, ya que ambas pols incrementan su actividad conforme avanza la germinación aunque no se observe un incremento en cantidad de las proteínas respectivas; lo anterior podría deberse a la asociación con otras proteínas auxiliares y/o a modificaciones postraduccionales de algunas de las subunidades que las conforman. Las DNA pols  $\alpha$  y  $\delta$  de mamíferos son heterotetrámeros y su actividad depende de la presencia de todas las subunidades (Kornberg y Baker, 1994); para el caso de Zmpol $\delta$  se requiere, además de las subunidades que la conforman, de ZmPCNA.

En la primer parte de resultados se indicó que la DNA pol 1, por ensayos de actividad *in situ*, mostraba un peso molecular aparente de 80 kDa, el cual difiere notablemente del tamaño que predice el anticuerpo usado contra Zmpol $\delta$ . Lo anterior podría deberse a que en los extractos proteicos usados, la enzima sufriera un proceso proteolítico, que aún dejara una enzima activa; alternativamente, la DNA pol 1 podría ser una de las múltiples pols que contienen los organismos pluricelulares, que funcionan preferentemente en la reparación de DNA (Bebenek y Kunkel, 2002). Nuevos experimentos tendrán que diseñarse para poder esclarecer que tipo de DNA pol es la pol 1.

La actividad de Zmpol $\delta$  se incrementa entre las 0 y las 6 h de imbibición, para decaer hacia las 12 h; lo anterior podría indicar que esta enzima participa también en síntesis reparativa del DNA, como ha sido sugerido para Ospol $\delta$  (Uchiyama *et al*, 2002). En tiempos posteriores, a las 24 h, tiempo en que la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran en la fase S (Baiza *et al*, 1989 y Georgieva *et al*, 1994), la actividad se

incrementa aproximadamente 3 veces, valor que es muy similar (2.6 veces) al reportado para la pol tipo  $\delta$  de trigo durante la fase de replicación del DNA en la germinación (Benedetto *et al*, 1996).

Zmpol $\delta$  no solo se encuentra en ejes embrionarios, ya que se puede inmunodetectar también en endospermo, tejido que contiene el material de reserva que será utilizado después de la germinación y hasta que la planta puede ser capaz de realizar la fotosíntesis. El endospermo no contiene células vivas, por lo cual es probable que la proteína que se observa sea un remanente de los procesos endoreduplicativos que se presentan en endospermo en los primeros 21 días después de la fertilización (YoungyGallie, 2000; Larkins *et al*, 2001) y que la proteína "se proteja" de la degradación por quedar en los cuerpos proteicos y/o en los gránulos de almidón; sin embargo, en escutelo, un tejido compuesto de células vivas y que contiene las enzimas necesarias para degradar y transportar el material de reserva al eje embrionario, Zmpol $\delta$  se presenta en muy baja proporción a las 0 h de imbibición, mientras que a las 24 h prácticamente es indetectable. Este hecho curioso no solo es exclusivo de Zmpol $\delta$ , ya que ZmPCNA también presenta el mismo patrón de expresión. En plántulas Zmpol $\delta$  se encuentra principalmente en los meristemos de la raíz y en menor proporción en las zonas diferenciadas de la raíz y fue prácticamente indetectable en tallo y en hojas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sumado al trabajo previo sobre la caracterización de la actividad de DNA pol tipo  $\alpha$  (Coello *et al*, 1992, Coello *et al*, 1994, CoelloVázquez-Ramos 1995<sup>a</sup> y 1995<sup>b</sup>, García *et al*, 1997) y de PCNA (Herrera *et al*, 2000), realizado en nuestro laboratorio, nos permiten ampliar y proponer un modelo experimental sobre la participación de la DNA polimerasa  $\alpha$ -primasa, PCNA y pol  $\delta$  de maíz durante la germinación (fig. 35). La cantidad de las subunidades catalíticas tanto de la DNA pol tipo  $\delta$ , como de la DNA pol tipo  $\alpha$ , no varían durante la germinación, sin embargo, su actividad se incrementa notablemente hacia las 24 h de imbibición (fase S del ciclo celular) y, en el caso de la DNA pol tipo  $\alpha$ , el pico de actividad coincide con la fosforilación de la subunidad catalítica de la holoenzima (Gómez y Vazquéz-Ramos, 2003). Esto indicaría que durante la germinación existe un control de la replicación del DNA a nivel postraduccional; es probable que la modificación por fosforilación de estas proteínas permita su mejor integración como holoenzimas o bien, su asociación con otras proteínas auxiliares como PCNA, RFC o RPA, como sucede en metazoarios (Henneke *et al*, 2003).

La caracterización de la actividad de DNA primasa, libre de DNA polimerasa, permitió encontrar varias características similares a las de su

contraparte en mamíferos, por lo cual en el presente modelo se sugiere que la actividad de DNA primasa es concomitante con la actividad de la DNA pol tipo  $\alpha$ . En el presente trabajo no se estudió la posible fosforilación de la subunidad catalítica de Zmpol $\delta$ ; sin embargo, el incremento en su actividad específica en o posterior a la fase G1 sugiere fuertemente que la enzima (ya sea la subunidad catalítica y/o alguna de las subunidades que la conforman) presenta una modificación postraduccional.

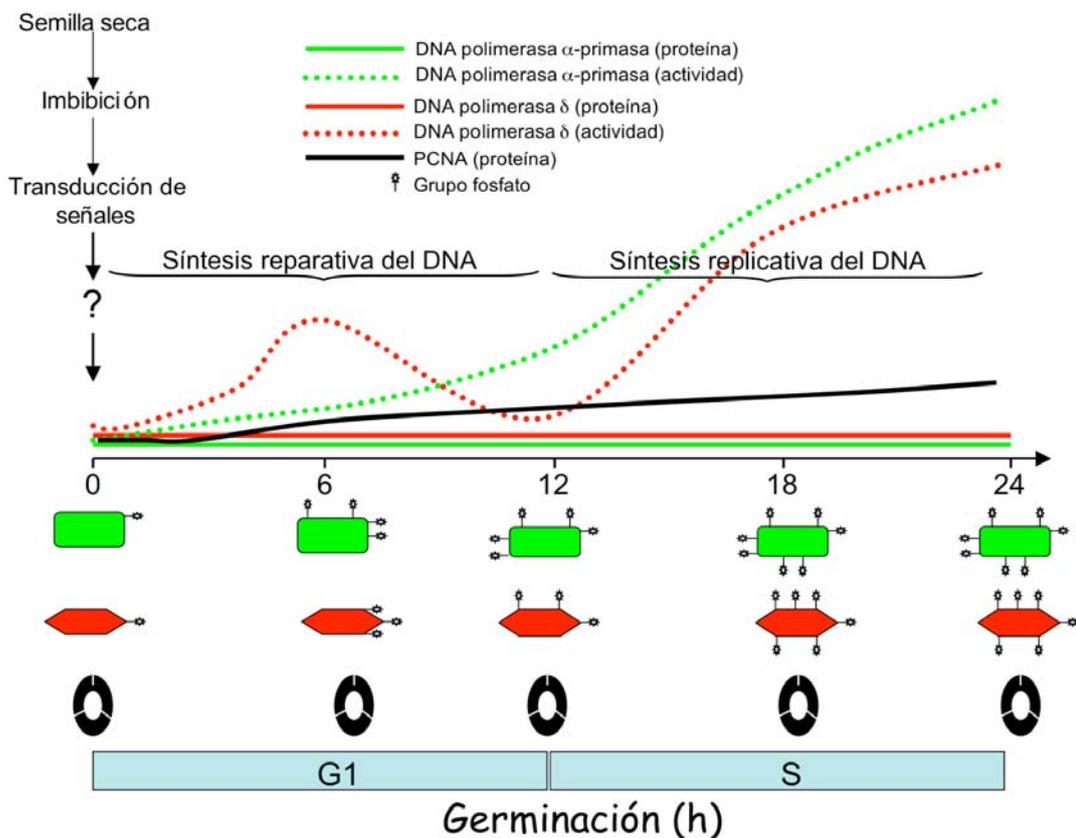


Figura 35. Modelo de participación de la DNA pol  $\alpha$ -primasa, PCNA y DNA pol  $\delta$  durante el ciclo celular en la germinación de semillas de maíz.

El presente trabajo amplía el conocimiento de algunas proteínas (ZmPCNA, Zmpol $\alpha$ -primasa y Zmpol $\delta$ ) que participan en la horquilla de la replicación y su posible papel durante la fase S de los primeros ciclos celulares, lo cual es esencial para poder entender mejor el proceso de la germinación en semillas de maíz.

## **Capítulo V**

### **Conclusiones**

## Conclusiones

La DNA primasa asociada a la DNA polimerasa tipo  $\alpha$  de maíz es funcionalmente similar a las DNA primasas de mamíferos.

La DNA primasa de maíz, al igual que sucede en metazoarios, puede disociarse del complejo de la DNA pol  $\alpha$  con etilén glicol al 50%.

La DNA primasa sin actividad de DNA polimerasa puede trabajar en un amplio rango de temperaturas (10-42 °C).

El cebador sintetizado por la DNA primasa, (cuando ésta utiliza como molde sintético polidT<sub>1200</sub>), es elongado eficientemente por la DNA pol 2 (tipo  $\alpha$ ), sin embargo, cuando el cebador es sintetizado en un molde natural, la pol 2 lo elonga pobremente.

La DNA pol 1 no es capaz de elongar eficientemente el cebador sintetizado por la DNA primasa ni en molde sintético ni en molde natural.

Desconocemos que tipo de DNA polimerasa es la DNA pol 1, si es un producto proteolítico de la DNA pol  $\delta$ , o es una pol diferente de Zmpol $\delta$ .

A nivel de secuencia primaria de aa, Zmpol $\delta$  está altamente conservada.

La expresión de Zmpol $\delta$  y la cantidad de proteína no varían durante las primeras 24 h de imbibición, pero sí su actividad, lo cual sugiere que es regulada por modificación postraduccional.

Zmpol $\delta$  se localiza en todos los tejidos de semilla de maíz y en tejidos proliferativos de plántula.

## Perspectivas

Clonar la secuencia completa del cDNA de Zmpol $\delta$ .

Identificar a las subunidades que componen a la holoenzima Zmpol $\delta$ .

Clonar los cDNAs de las subunidades acompañantes de Zmpol $\delta$ .

Obtener anticuerpos que reconozcan a cada una de las subunidades que componen a Zmpol $\delta$  para determinar los niveles de las proteínas en diferentes tejidos del maíz.

Sobreexpresar a la holoenzima Zmpol $\delta$  en un sistema de baculovirus.

Purificar a la holoenzima recombinante Zmpol $\delta$  y hacer estudios de los factores proteicos necesarios para montar un sistema de replicación del DNA *in vitro*.

## Referencias

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

Argos P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9909-9916.

Bauer GA., Heller HM y Burguers PMJ (1988). DNA polymerase III from *Saccharomyces cerevisiae* I. Purification and characterization *J. Biol. Chem.* 263: 917-925.

Bebenek K y Kunkel TA (2002). Family growth: the eukaryotic DNA polymerases revolution. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:54-57.

Bewley JD y Black M (1994). In *Seeds, physiology of development and germination*. Ed Plenum Press, N. Y. Plenum Press.

Bewley JD (2001). Seed germination and reserve mobilization. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. Páginas: 1-7.

Botha FC, Poteiter GP y Botha AM (1992). Respiration metabolism and gene expression during seed germination. *J. Plant Growth Reg.* 11: 212-224.

Bryant JA, Fitchett PN, Hughes SG y Sibson DR (1992). DNA polymerase- $\alpha$  in pea is part of a large multiprotein complex. *J. Exp. Bot.* 43: 31-40.

Burgers PMJ, Koonin EV, Bruford E, Blanco L, Burtis KC, Christman MF, Copeland WC, Friedberg EC, Hanaoka F, Hinkle DC, Lawrence CW, Nakanishi M, Ohmori H, Prakash L, Prakash S, Reynaud A, Sugino A, Todo T, Wang Z, Weil J y Woodgate R (2001). Eukaryotic DNA polymerases: Proposal for a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 276: 43487-43490.

Burgers PM y Gerik KJ (1998). Structure and processivity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 273: 19756-62.

Byrnes JJ, Downey KM, Black VL y So AG (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta. *Biochemistry.* 15: 2817-2823.

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

Chivers HJ y Bryant JA (1983). Molecular weights of the major DNA polymerases in a higher plant, *Pisum sativum* L. (pea). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 623-629.

Chuen-Sheue C y Lehman IR (1995). Isolation and sequence determination of the cDNA encoding DNA polymerase d from *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 166: 236-242.

Coello-Coutiño P, García-Ramírez E y Vázquez-Ramos JM (1994). Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase holoenzyme: identification of the polymerase catalytic subunit. *Can. J. Bot.* 72: 818-822.

Coello P y Vázquez-Ramos (1995a). Studies on the processivity of maize DNA polymerase 2, an  $\alpha$ -type enzyme. *Plant Physiol.* 109: 645-650.

Coello P y Vázquez-Ramos (1995b). Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* 231:99-103.

Coello P, Rodríguez R, García E y Vazquez-Ramos JM (1992). A DNA polymerase from maize axes: Its purification y possible role. *Plant Mol Biol.* 20: 1159-1168.

Collins KL, Russo AA, Tseng BY y Kelly TJ (1993). The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication. *EMBO J.* 12:4555-4566.

Copeland WC y Wang TS (1993). Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 268:26179-26189.

Cotteril SM, Reyland ME, Loeb LA y Lehman IR (1987). A cryptic proofreading 3'-5' exonuclease associated with the polymerase subunit of the DNA polymerase-primase from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 56-35-5639.

Datta K, Marsh L y Marcus A (1983). Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol.* 72: 394-397.

Ducoux M, Urbach S, Baldacci G, Hubscher U, Koundrioukoff S, Christensen J y Hughes P (2001). Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase  $\delta$ . *J. Biol. Chem.* 276, 49258-49266.

Dunham VL, Bryant JA (1986). DNA polymerase activities in healthy and cauliflower mosaic virus-infected turnip (*Brassica nap*a) plants. *Ann. Bot.* 57: 81-89.

Foiani M, Lucchini G, y Plevani P (1997). The DNA polymerase  $\alpha$ -primase complex couples DNA replication, cell-cycle progression and DNA- damage response. *Trends Biochem Sci.* 22:424-427.

Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G y Plevani P (1994). The B subunit of the DNA polymerase  $\alpha$ -primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial. *Mol Cell Biol.* 14: 923-33.

Foiani M, Santocanale C, Plevani P y Lucchini G (1989). A single essential gene *PRI2* encode the large subunit of DNA primase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3081-3087.

Francesconi S, Longhese MP, Piseri A, Santocanale C, Lucchini G y Plevani P (1989). Mutations in conserved yeast DNA primase domain impair DNA replication *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 3877-3881.

- Frick DN y Richardson CC (2001). DNA primases. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 39-80.
- Frouin I, Montecucco A, Biamonti G, Hübscher U, Spadari S y Maga G (2002). Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins. *EMBO J.* 21: 2485-2495.
- Fukasawa H, Yamaguchi MY, Chou MY, Matsumoto H y Matsukage A (1980). Characterization of two DNA polymerases from coulfiflower inflorescence. *J. Biochem.* 87: 1167-1175.
- Gardner JM y Kado CI (1976). High molecular weight DNA polymerase from crown gall tumor cells of periwinkle. *Biochem.* 15: 688-696.
- García E, Orjuela D, Camacho Y, Zúñiga JJ, Plasencia J y Vázquez-Ramos JM (1997). Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes . A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.* 33: 445-455.
- García Ramírez E. (1995). Caracterización parcial de una DNA primasa asociada a una DNA polimerasa de tipo replicativo de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.
- Gómez R y Vázquez-Ramos JM (2003). Maize DNA polymerase alpha is phosphorylated by a PCNA-associated cyclin/Cdk complex: effect of benzyladenine. *J. Plant Physiol.* 160:983-990.
- Goscin LP y Byrnes JJ (1982). DNA polymerase delta: one polypeptide, two activities. *Biochem.* 10: 2513-2518.
- Graveline J, Tarrago-Litvak L, Castroviejo M y Litvak S (1984). A DNA primase activity from wheat embryos. *Plant Mol Biol* 3: 207-215
- Gronostajski RM, Field J y Hurwitz J (1984). Purification of a primase activity associated with DNA polymerase a from Hela cells. *J. Biol. Chem.* 259: 9479-9486.
- Grosse F y Krauss G (1985). The primase activity of DNA polymerase  $\alpha$  from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 260: 1881-1888.
- Hinkle DC y Richardson CC (1975). Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication in vitro. Purification and properties of the gene 4 protein of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.* 250: 5523-5529.
- Holmes AM, Cheriathundam E, Bollum FJ y Chang LMS (1985). Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *J. Biol. Chem.* 260: 10840-10846.
- Insdorf NF y Bogenhagen DF (1989). DNA polimerasa  $\gamma$  from *Xenopus laevis*. I. The identification of a high molecular weight catalytic subunit by a novel DNA polymerase photolabeling procedure. *J. Biol. Chem.* 264: 21491-21497.

Kaguni LS, Rossignol JM, Conaway RC y Lehman IR (1983). Isolation of an intact DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. PNAS. 80: 2221-2225.

Kornberg A y Baker TA (1992). DNA replication. WH Freeman and Co. 2<sup>nd</sup> Ed. 275-306.

Laquel P, Castroviejo M y Litvak S (1990a). Further biochemical characterization of wheat DNA primase: possible functional implication of copurification with DNA polymerase A. Nucleic Acids Res. 18: 4867-4876

Laquel P, Sallafranke-Andreola ML, Tarrago-Litvak L, Castroviejo M y Litvak S (1990b). Wheat DNA polymerase A reverse transcribes natural and synthetic RNA templates. Biochemical characterization and comparison with animal DNA polymerase  $\gamma$  and retroviral reverse transcriptase. Biochim Biophys. Acta. 1048: 139-148.

Laquel P, Litvak S y Castroviejo M (1994). Wheat DNA primase. RNA primer synthesis *in vitro*, structural studies by photo-chemical cross-linking, and modulation of primase activity by DNA polymerases. Plant Physiol. 105: 69-79.

Li H, Xie B, Zhou Y, Rahmeh A, Trusa S, Zhang S, Gao Y, Lee EYC y Lee MYWT (2006). Functional roles of p12, the fourth subunit of human DNA polymerase  $\delta$ . J. Biol. Chem. 281: 14748-14755.

Lu X, Tan CK, Zhou JK, Carastro LM, Downey KM, y So AG (2002). Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta. J. Biol. Chem. 27: 24340-24345.

Lucchini G, Francesconi S, Foiani M, Badaracco G y Plevani P (1987). Yeast DNA polymerase-DNA primase complex: cloning of PRI1, a single essential gene related to DNA primase activity. EMBO J. 6: 737-742.

Maniatis T, Fritsch EF y Sambrook J (1982). Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

Mizuno T, Yamagishi K, Miyazawa H y Hanaoka F (1999). Molecular Architecture of the Mouse DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase complex. Mol. Cell. Biol. 19: 7886-7896.

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

Mo JY, Liu L, Leon A, Mazloun N y 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. Biochem. 39:7245-7254.

Murakami Y, Wobbe CR, Weissbach L, Dean FB y Hurwitz J (1986). Role of DNA polymerase alpha and Role of DNA primase in simian virus 40 DNA replication *in vitro*. (1986). Murakami Y, Wobe CR, weissbach L, Dean FB y Hurwitz J. PNAS 83: 2869-2873.

Ogawa T y Okasaki T (1980). Discontinuous DNA replication. Annual Review of Biochemistry. 49: 421-457.

Orjuela Henry DJ (1998). DNA polimerasa 1 de maíz. Caracterización y estudios de composición. Tesis de Maestría. Facultad de Química-UNAM.

Osborne DJ, Sharon R y Ben-Ishai R (1980/81). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). Israel J. Bot. 29:259-272.

Osborne DJ, Dell'Aquila A y Elder RH (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. Folia Biologica. Proc. FEBS symposium on DNA. Spe Pub. 155-156 pp.

Pohler JRG, Otterlei M y Warbrick E (2005). An *in vivo* analysis of the localisation and interactions of human p66 DNA polymerase  $\delta$  subunit. BioMed Center Mol. Biol. 6: 17-30.

Plevani P, Badaracco G, Augi C y Chang LMS (1984). DNA polymerase I and DNA primase complex in yeast. J. Biol. Chem. 260: 7532-7539.

Randolph LF (1936). Developmental morphology of the caryopsis in maize. J. Agric. Res. 53: 881-916.

Richard MC, Litvak S, Castroviejo M (1991). DNA polymerase B from wheat embryos: a plant delta-like DNA polymerase. Arch Biochem Biophys. 287: 141-150.

Rowe JH, Hoekstra FA, y Crowe LM (1992). Anhydrobiosis. Ann. Rev. Physiol. 54: 579-599.

Samuel Meléndez López, Raquel Ortega, Sergio López y Jorge M Vázquez Ramos. (1990). Estudios sobre la naturaleza y localización de la síntesis de ADN durante las etapas iniciales de la germinación de maíz. Rev. Soc. Quím Méx. 34:354-359.

Sánchez de Jiménez E y Aguilar R (1984). Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. Plant Physiol. 75:231-234.

Sánchez de Jiménez E, Aguilar R y López S (1981). Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. Biochem. Biophys. Res. Comm. 99: 445-450.

Sanchez-García J, Ciufo LF, Yang X, Kearsey SE, MacNeill SA (2004). The C-terminal zinc finger of the catalytic subunit of DNA polymerase  $\delta$  is responsible for direct interaction with the B subunit. Nucleic Acids Res 32: 3005-3016

Santocanale C, Locati F, Falconi MM, Piseni A, Tseng BY, Lucchini G y Plevani P (1992). Overproduction and functional analysis of DNA primase subunits from yeasts and mouse. Gene. 113: 11121-11127.

Schneider A, Smith RWP, Krautz AR y Weissbart HP (1998). Primase activity of human DNA polymerase  $\alpha$  primase. Divalent cations stabilize the enzyme activity of the p48 subunit. J. Biol. Chem. 273: 21608-21615.

Sing H, y Dumas LB (1984). Association of DNA primase with the  $\beta/\gamma$  subunit of DNA polymerase  $\alpha$  from *Drosophila melanogaster* embryos. J. Biol. Chem. 259: 7936-7940.

Spadari S, Sala F y Pedraly-Noy G (1982). Aphidicolin, a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends in Biochemistry Sciences*. 7: 29-32.

Spiegel S y Marcus A (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of either transcription or polyadenylation. *Nature*. 256: 228-230.

Steitz TA (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274: 17395-17398.

Suzuki M, Enomoto T, Hanaoka F y Yamada M (1985). Dissociation and reconstitution of a DNA polymerase alpha-primase complex. *J. Biochem.* 98: 581-584.

Takemura M, Yamamoto T, Kitagawa M, Taya Y, Akiyama T, Ashara H, Linn S, Suzuki S, Tamay K y Yoshida S (2001). Stimulation of DNA polymerase alpha activity by cdk2-phosphorylated Rb protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 984-990.

Tseng BY y Ahlem CN (1983). A DNA primase from mouse cells. *J. Biol. Chem.* 258: 9845-9849.

Tsurimoto T y Stillman B (1991). 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: 1961-68.

Tymonko JM y Dunham VL (1977). Evidence for DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$  activity in sugar beet. *Physiol. Plant.* 40: 27-40.

Vázquez-Ramos JM y Martínez G (1994). A partial purification and characterization of organellar DNA polymerases in germinating maize. *Seeds Science Res.* 4: 43-48.

Vázquez-Ramos JM y Osborne D (1986). Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutat. Res.* 166:39-47.

Vincent PLD (2001). *Zea mays* (maize, corn). In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons. 1-7.

Vishwanatha JK y Baril EF (1986). Resolution and purification of free primase activity from the DNA primase-polymerase  $\alpha$  complex of HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 14:8467-8487.

Voitenleitner C, Rehfuess C, Hilmes M, O' rear L, Liao P, Gage DA, Ott R, Nasheuer H y Fanning E (1997). Cell cycle-Dependent regulation of human DNA polymerase  $\alpha$ -primase activity by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 646-656.

Waga S, Stillman B (1994). Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature*. 369:207-12.

Walbot V y Evans MMS (2003). Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nature Rev. Gen.* 4: 369-379.

Wang TSF, Hu SZ y Korn D (1984). DNA primase from KB cells. *J. Biol. Chem.* 259: 1854-1865.

Yagura T, Kozu T y Seno T (1982). Mouse DNA replicasa. *J. Biol. Chem.* 257: 1121-1127.

Yamaguchi M, Hendricson EA y DePamphilis ML (1985). DNA polymerase-DNA primase from simian cells. *J. Biol. Chem.* 260: 6254-6263.

Zaraín M, Bernal-Lugo y Vázquez-Ramos JM (1987). Effect of benzyl adenine on DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutat. Res.* 181: 103-110.

Zeng XR, Hao H, Jiang Y y Lee MY (1994). Regulation of human DNA polymerase  $\delta$  during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 269: 24027-24033.

Zuo S, Gibbs E, Kelman Z, Wang TSF, O' Donnell M, MacNeill SA y Hurwitz J (1997). DNA polymerase  $\delta$  isolated from *Schizosaccharomyces pombe* contains five subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11244-11249.