

2947

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION PARCIAL DE LA
DNA POLIMERASA PRESENTE
EN EJES EMBRIONARIOS DE
SEMILLAS NO GERMINADAS
DE MAIZ

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

MARTHA PATRICIA CCELLO COUTINO

26 MAY 1989

NO ADEUDA LIBROS

EN BIBLIOTECA

CENTRAL

MEXICO, D.F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

ABREVIATURAS	pag.
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
Estructura de la Semilla	1
Germinación	2
Condiciones necesarias para la germinación	3
Aspectos Bioquímicos de la germinación	4
DNA polimerasas	8
DNA polimerasa alfa y delta	10
DNA polimerasa beta	15
DNA polimerasa gama	16
DNA polimerasas de Plantas Superiores	19
Antecedentes inmediatos del trabajo	23
MATERIAL Y METODOS	25
Material Biológico	25
Soluciones amortiguadoras y reactivos	25
Preparación de resinas	29
Obtención del extracto celular	30
Preparación del DNA activado	31
Determinación de la actividad de DNA polimerasa	31
Efecto de inhibidores	32
Determinación de la concentración de proteína	33
RESULTADOS	34
Actividad de DNA polimerasa en hojas de maíz	34
Purificación de DNA polimerasa de ejes embrionarios	37
Fraccionamiento	37
Cromatografía	39
Inhibidores	44
DISCUSION	52
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
ASB	albúmina de suero de bovino
BuAU	butilaminouracilo
CTC	cobre-tartrato-carbonato
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
ddNTP	didesoxinucleósido 5'-trifosfato
DEAE-Celulosa	dietilaminoetil-celulosa
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DOC	desoxicolato de sodio
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
NEM	N-etilmaleimida
PEG	polietilenglicol
PMSF	floruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	duodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético

RESUMEN

La DNA polimerasa es una enzima muy importante que actúa de forma coordinada con todo un complejo enzimático en el momento de la síntesis del DNA.

En ejes embrionarios de maíz, la DNA pol que actúa durante las primeras 24 horas de la germinación es esencialmente la misma (Vázquez, 1986).

En el presente trabajo puede observarse que en ejes embrionarios no embebidos se detectan dos tipos de actividades de DNA polimerasa a través de una columna de DEAE-Celulosa y otros dos picos de actividad a través de una columna de fosfocelulosa.

El análisis de estas actividades por medio de inhibidores confirman que a través de DEAE-Celulosa la respuesta a estas sustancias es claramente diferente: Sin embargo, a través de fosfocelulosa el resultado con inhibidores parecería indicar que se trata de la misma actividad enzimática.

Aunado a lo anterior, se puede observar que en hojas de plántulas de maíz parece existir un inhibidor de la DNA polimerasa.

INTRODUCCION

Las gramíneas son plantas de gran utilidad ya que constituyen una fuente importante de alimento y el maíz es un ejemplo de ello.

El conocimiento de los procesos bioquímicos que ocurren en las semillas de estas plantas durante las primeras horas de la germinación, permite establecer las condiciones necesarias para el buen desarrollo de la plántula. En semillas que han perdido viabilidad, estos estudios se hacen necesarios.

Es posible utilizar algunas enzimas que intervienen en la germinación como marcadores bioquímicos que nos permitan detectar los problemas que se presentan en semillas de éste tipo.

Estudios encaminados hacia esa línea son fundamentales.

ESTRUCTURA DE LA SEMILLA

La formación de la semilla es una etapa fundamental dentro del ciclo de vida de una planta. Además de ser una estructura de dispersión, le permite a la planta soportar condiciones adversas aumentando la probabilidad de establecimiento.

La semilla se deriva del óvulo fertilizado. En casi todos los casos es posible reconocer: 1) una testa, 2) el endospermo y 3) el embrión.

La testa es el producto de uno o ambos integumentos del óvulo. Desde el punto de vista fisiológico, su importancia puede ser muy grande, ya que la presencia de una cutícula externa e interna le confiere un cierto grado de impermeabilidad tanto al agua como a los gases, ejerciendo una influencia regulatoria

sobre el metabolismo y el crecimiento de tejidos internos y órganos de la semilla (Bewley and Black , 1978).

El endospermo se desarrolla como resultado de la fusión de los núcleos polares del saco embrional con un núcleo espermático del tubo polínico. El núcleo endospermico que resulta de ésta fusión es triploide.

Esta estructura sirve como tejido nutritivo del embrión y contiene sustancias diversas de reserva, sobre todo almidón y otros carbohidratos como polisacáridos y hemicelulosas (Roth, 1966).

El embrión generalmente se deriva de la fusión de los núcleos de los gametos femeninos y masculinos. Uno de sus extremos, la radícula, formará la raíz de la planta; el otro extremo, la plúmula, formará el tallo y las hojas. El embrión posee cotiledones u hojas seminales (uno en las monocotiledóneas) (Bidwell, 1979).

Una vez que la semilla se ha formado, se inicia una desecación progresiva de los tejidos. El contenido de humedad cae hasta un 10%. Aún en éste estado de extrema deshidratación, el embrión puede permanecer vivo durante mucho tiempo dependiendo de la especie. En muchos casos, el principal requisito para reanudar su crecimiento y desarrollo es la adición de agua.

GERMINACION

La germinación es el proceso que permite el establecimiento de la plántula a través de una sucesión de eventos que modifican a la semilla pasándola de un estado de reposo a uno metabólicamente activo.

Aunque el concepto de germinación no es fácil de definir, generalmente se dice que ha ocurrido una vez que una parte del embrión, normalmente la radícula, atraviesa por completo la cubierta de la semilla (Berrie, 1984).

Desde el punto de vista bioquímico, este proceso involucra toda una serie de eventos moleculares que suceden antes de la primera división celular (Brooker *et al.*, 1977).

*Condiciones necesarias para la germinación

Los factores más importantes que afectan comúnmente a la germinación de las semillas son: agua, temperatura, luz e intercambio de gases.

El agua es primordial pues las semillas están extremadamente deshidratadas. Normalmente sólo contienen del 5-20% de agua de su peso total y tienen que absorber una buena cantidad antes de que se inicie la germinación. Después de la imbibición, la absorción de agua decrece, la germinación prosigue y empiezan los procesos que llevan al crecimiento y desarrollo (Bidwell, 1979).

Una temperatura correcta es importante para la germinación. La temperatura óptima para el desarrollo del embrión varía de acuerdo con la especie. Para cada una existe una temperatura máxima y una mínima, por arriba o debajo de la cual la germinación no ocurre (Wilkins, 1969).

La germinación se ve influida por la cantidad de luz existente. Las semillas tienen sólo mínimas cantidades de alimento almacenado para el crecimiento del embrión, por lo que les es necesario volverse autótrofas cuanto antes. Si germinan en el

suelo muy profundamente pueden agotar sus reservas antes de alcanzar la superficie. La exigencia de luz no permite que esto ocurra ya que asegura que la germinación empiece solo en semillas que están en la superficie o muy cerca de ella (Bidwell, 1979).

El metabolismo durante los estadios iniciales de la germinación puede ser anaerobio cambiando a aerobio tan pronto como la testa se rompe y el oxígeno se difunde en su interior. En este momento, los requerimientos de energía son proporcionados por los procesos de oxidación, lo cual involucra un intercambio gaseoso, salida de bióxido de carbono y entrada de oxígeno (Wilkins, 1969).

La edad de la semilla es un factor de importancia en la germinación. Pocas son las que en realidad logran sobrevivir durante mucho tiempo (Bidwell, 1979).

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA GERMINACION

Síntesis de Proteínas y RNA_m

En el momento de la imbibición, la semillas inician su actividad metabólica; esto requiere de la acción de múltiples enzimas que necesitan ser sintetizadas en las primeras etapas de la germinación.

Se ha demostrado que en embriones secos de trigo existe la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas (Marcus *et al.*, 1970; Tarrago *et al.*, 1970) y que ésta se inicia dentro de los primeros minutos de imbibición (Osborne, 1982).

El conocimiento de que la síntesis temprana de proteínas es un

evento necesario en la germinación trae consigo la pregunta de si existe o no una concomitante síntesis de RNA_m.

Walers y Dure en 1966 y Klein *et al.*, en 1971 demostraron que la síntesis de proteínas en esa etapa de la germinación estaba guiada por RNA_m previamente sintetizado, esto es, RNA_m utilizado durante la embriogénesis y almacenado en el momento de la formación de la semilla.

Esta idea ha sido sustentada por varios estudios. Chen *et al.*, en 1971 indicaron que existía un nivel muy bajo de transcripción al inicio de la germinación de ejes aislados. Además, la observación de que la formación temprana de poliribosomas no era afectada por cordicepina y α -amanitina, dos inhibidores efectivos de la síntesis de RNA_m, indicaba claramente que la transcripción no era necesaria para la síntesis temprana de proteínas y que la traducción al inicio de la germinación funcionaba principalmente con RNA_m almacenado (Brooker *et al.*, 1977).

No obstante, en 1979 Cheung y colaboradores dieron evidencias de que en embriones de trigo, después de 40 minutos de imbibición la síntesis de proteínas era dirigida por RNA_m sintetizado *de novo* más que por el almacenado.

Aunado a esto, se ha encontrado que algunos RNA_m codifican para proteínas de reserva de la semilla (Bollini and Chispels, 1977; Mori *et al.*, 1978), lo que apoyaría la afirmación de que ese RNA_m no es importante en los primeros eventos de la germinación. Es difícil determinar con certeza, en el momento de la imbibición, si el RNA_m sintetizado *de novo* o el RNA_m de vida larga almacenado en las semillas son utilizados para la síntesis temprana de proteínas.

Es probable que el RNA_m almacenado sea el sobrante del proceso de embriogénesis y que las proteínas requeridas para la germinación provengan de RNA_m sintetizado *de novo*.

Aún cuando este punto no ha sido completamente esclarecido, información obtenida a partir de estudios de embriones procedentes de semillas que han perdido viabilidad y que no presentan síntesis de proteínas, no mostraron cambios en los patrones de RNA a través de un gradiente de densidad en comparación con semillas de alta viabilidad (90%) (Osborne, 1983).

Es improbable que la disponibilidad de RNA rico en poli A sea el factor que limite la síntesis temprana de proteínas (Bray and Smith, 1985).

La síntesis de RNA en semillas con baja viabilidad se ve reducida. Aún cuando en embriones de 0% de viabilidad exista síntesis de poliribonucleótidos de bajo peso molecular, éstos no son utilizados como moldes para la síntesis de proteínas (Osborne, 1977).

Si la ausencia de síntesis de proteínas en embriones de 0% de viabilidad se debe o no a un mal funcionamiento de los elementos involucrados en ese proceso, aún está en duda. Sin embargo, el hecho de que exista síntesis de poliribonucleótidos de bajo peso molecular es una cuestión que concierne directamente a la integridad del DNA, del cuál ese RNA fue transcrito (Osborne, 1983).

*Síntesis de DNA durante la germinación

En las gramíneas, la secuencia de algunos eventos en la germinación pueden dividirse en: 1) eventos tempranos;

hidratación , síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación de DNA y 2) eventos tardíos; expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas (Osborne, 1983).

La aparición progresiva de ésta secuencia de eventos se ve afectada si la semilla sufre algún daño; sin embargo, aún cuando se retrase la germinación, ésto no previene el establecimiento de la planta.

La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por elongación celular y su subsecuente emergencia a través de la cubierta puede o no estar acompañada por división celular. La replicación del DNA es un requisito necesario para que la división ocurra (Bewley and Black, 1984).

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

En el caso particular del maíz, se sabe que la síntesis replicativa del DNA, medida como la incorporación de un nucleótido marcado, puede dispararse a partir de las 9 horas de imbibición (Vázquez y López, 1986). No obstante, en tiempos tempranos de la imbibición existe un pequeño incremento en la incorporación de la marca; se ha sugerido que ésta síntesis prereplicativa de DNA es de tipo reparativo (Zaraín *et al.*, 1987).

Mucha de la información concerniente a los mecanismos de reparación del DNA derivan del estudio de procariontes y algunos, pero no todos los mecanismos, parecen operar similarmente en eucariontes. En plantas superiores, las evidencias bioquímicas de la existencia de reparación de lesiones del DNA

son recientes (Veleminsky *et al.*, 1972; Osborne *et al.*, 1984). Además de las lesiones del DNA que permanecen sin reparar durante el desarrollo del embrión, otras lesiones se acumulan durante el periodo en el que la semilla permanece en estado seco. Esto requiere la reactivación del proceso enzimático de reparación en el momento de imbibición.

A menos que los daños ocurridos en el material genético del embrión se reparen por completo, los eventos subsecuentes no podrán operar adecuadamente.

La síntesis de DNA tanto en etapas tempranas como tardías, es un proceso fundamental para la germinación de la semilla. Este evento es dirigido gracias a la acción concertada de un gran número de enzimas, dentro de las cuales las DNA polimerasas juegan un papel fundamental.

DNA POLIMERASAS

Generalidades

La replicación, reparación y recombinación del DNA son procesos que requieren de la acción conjunta de muchas proteínas.

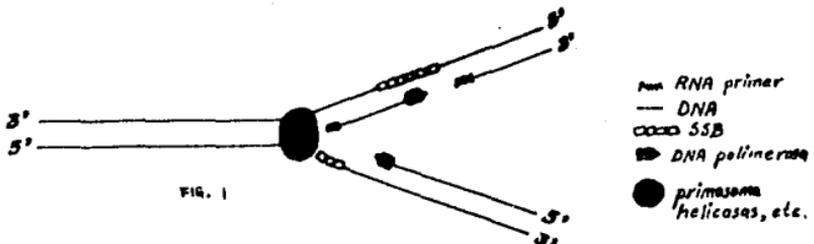
Sin embargo, en todos estos procesos una proteína, la DNA polimerasa, juega un papel central. Su función es asegurar la incorporación de los 4 desoxiribonucleótidos trifosfato sobre un molde de acuerdo a las reglas de apareamiento (A con T y G con C).

Desde el descubrimiento de la primera DNA polimerasa hace ya cerca de 30 años, tales enzimas han sido encontradas en todos

los organismos procariontes y eucariontes (HÜbscher, 1983).

Aunque difieren en propiedades químicas, físicas e inmunológicas, presentan algunas similitudes importantes: a) todas incorporan sobre un molde desoxiribonucleótidos trifosfatos como monofosfatos por hidrólisis del enlace fosfodiéster α - β , en presencia de cofactores (cationes divalentes) b) todos necesitan de una pequeña pieza complementaria de ácido nucleico (DNA o RNA), llamado "primer" con un grupo hidroxilo libre en el carbono en posición 3 de la desoxiribosa. c) Todos polimerizan en la dirección 5'-3' de la cadena en crecimiento.

Un esquema simplificado de la horquilla de replicación se presenta en la fig.1. La síntesis en la cadena continua procede en la dirección 5' - 3', antiparalela a la cadena molde y en la misma dirección en la que se va abriendo la horquilla. En la cadena discontinua, la síntesis ocurre en los fragmentos de Okazaki que son antecidos por la formación de un oligómero de RNA que le sirve de primer o cebador. Estos fragmentos son procesados y ligados para formar un DNA de alto peso molecular. El esquema se complica verdaderamente cuando se piensa en la interacción de todas las proteínas que intervienen: helicasas, proteínas que se unen a la cadena sencilla de DNA, el complejo primosomal, etc. Todo este complejo debe de actuar de manera coordinada para permitir la síntesis de ambas cadenas (Mc Henry, 1988).



En procariontes se sabe que existen tres tipos diferentes de DNA polimerasas, denominadas DNA pol I, II y III, de acuerdo al orden en que fueron descubiertas (Kornberg, 1980).

La posibilidad de obtener mutantes condicionales letales de los genes que codifican para cada una de ellas, ha sido fundamental para el conocimiento de sus funciones biológicas. En el cuadro I se muestran algunas de las características más importantes de estas polimerasas.

En células eucariontes, en particular mamíferos, su estudio se ha complicado por la imposibilidad de obtener células mutantes, no obstante a la fecha ya se cuenta con una gran cantidad de información que nos permite suponer ciertos papeles funcionales.

Son cuatro las DNA polimerasas que se han podido distinguir en este tipo de organismos; sin embargo han existido muchas dificultades para identificarlas porque en diferentes sistemas se han nombrado de forma distinta (Litvak y Castroviejo, 1987). En el presente trabajo utilizaremos la clasificación griega para identificarlas.

DNA polimerasas alfa y delta

La DNA polimerasa α fue la primera de las DNA polimerasas de mamíferos que se describió (Bollum, 1960). Se encontró que era una enzima de alto peso molecular, incapaz de corregir los errores de incorporación ya que no presentaba una actividad de exonucleasa 3' - 5' (So and Downey, 1988).

La DNA polimerasa α ha sido implicada en la replicación del DNA y mucha evidencia soporta este concepto: su actividad enzimática se correlaciona positivamente con la síntesis de DNA durante la

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

CUADRO I. Algunas propiedades de las DNA Polimerasas I, II y III de

Escherichia coli. Tomado de Kornberg, 1980

proliferación celular; todos sus inhibidores específicos también inhiben la replicación del DNA (Ikegami *et al.*, 1978).

Estudios recientes de replicación *in vitro* del DNA han corroborado éste concepto (Bialek *et al.*, 1988; Tamai *et al.*, 1988; Gassman *et al.*, 1988).

Esta enzima ha sido aislada generalmente en forma de un complejo polipeptídico (Wong *et al.*, 1988; So and Downey, 1988; Tamai *et al.*, 1988; Nasheuer and Grosse, 1988). En general consiste de: 1) un polipéptido catalítico que *in vitro* es un fosfopolipéptido que oscila entre de 125-180 kd ; 2) una fosfoproteína de 77 kd de función desconocida y 3) dos polipéptidos de 55 y 49 Kd asociados con la actividad de DNA primasa y en particular se ha visto que es el de 49 kd. quien posee tal actividad (Nasheuer and Grosse, 1988).

La DNA polimerasa δ difiere de otras DNA polimerasas de mamíferos, porque es la única que presenta una actividad exonucleasa 3'-5' (Crute *et al.*, 1986). Además de su actividad de exonucleasa en esa dirección, esta enzima puede distinguirse de la DNA polimerasa α por su comportamiento cromatográfico y la especificidad de utilización de moldes *in vitro*. Las DNA polimerasas δ prefieren copolímeros alternados tal como poli (dA-dT), mientras que su actividad sobre moldes de DNA activados con DNA³⁰ es muy baja.

DNA polimerasas tipo δ de mamíferos con una actividad exonucleasa 3'-5' asociada han sido aisladas de muchos tejidos, como por ejemplo, de timo de ternera (Lee *et al.*, 1980; Crute *et al.*, 1986; Wahl *et al.*, 1986), médula ósea de conejos (Gascin and Byrnes, 1982) y placenta humana (Lee and Toomey, 1987). Algunas de las propiedades de todas éstas enzimas, como peso molecular y utilización de moldes varían, aunque es posible que esto se deba al protocolo de purificación.

Una diferencia clara en las propiedades de las especies de DNA polimerasas δ que han sido aisladas en diferentes laboratorios, es su asociación con DNA primasa. Tanto la purificada a partir de timo de ternera como la de placenta humana carecen de tal actividad (Downey *et al.*, 1988; Lee and Toomey, 1987). Sin embargo, Crute *et al.*, en 1988 reportaron dos tipos de DNA polimerasa δ , I y II, la primera con una actividad de primasa asociada. No obstante, anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α inhiben a la DNA polimerasa δ I mientras que la DNA polimerasa δ II, que es donde se encuentra la actividad de exonucleasa 3'-5', no se ve afectada. Esto parecería indicar que la DNA polimerasa I es más bien una forma de DNA polimerasa α , en donde su asociación con la DNA primasa es fácilmente explicable.

Una propiedad común a todas las polimerasas δ es su poca inhibición por butilfenil-dGTP y butilanilino-dATP, que inhiben en mayor proporción a las DNA polimerasas α (Crute *et al.*, 1986).

Las DNA polimerasas α y δ comparten muchas similitudes; por ejemplo son enzimas de alto peso molecular y son proteínas ácidas sensibles a la inhibición por N-etilmaleimida. La síntesis de DNA con ambas enzimas es sensible a inhibidores de la replicación tales como afidicolina, y arabinosilnucleótidos y resistentes a dideoxinucleótidos (So and Downey, 1988). Con base a estas similitudes surge la duda de si la DNA polimerasa δ es solo una forma modificada de la DNA polimerasa α o viceversa.

A pesar de estas semejanzas, muchas evidencias han sugerido que son enzimas diferentes dadas otras características que no comparten: actividad exonucleasa (Downey, 1988); respuesta diferencial a la proteína PCNA, que regula el ciclo celular

(Tan *et al.*, 1986;); sensibilidad a inhibidores como butilfenil-dGTP y butiladenilo-dATP (Wahl *et al.*, 1986); anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α no inhibe la actividad de DNA polimerasa δ (Wahl *et al.*, 1986; ; Lee and Toomey, 1987); anticuerpos policlonales contra DNA polimerasa δ de timo de ternera no inhiben a la DNA polimerasa α de la misma especie; estudios de procesividad sobre moldes sintéticos muestran respuestas diferentes (Hohn and Grosse, 1987).

El papel funcional de estas enzimas ha sido muy difícil de determinar debido a la carencia de mutantes en eucariontes superiores. Sin embargo, se ha sugerido la posible función de ambas proteínas en la horquilla de replicación, esto es, la DNA polimerasa δ replicando la cadena continua y la DNA polimerasa α como una replicasa de la cadena discontinua (Focher *et al.*, 1988).

La DNA polimerasa α , enzima asociada con una actividad de primasa, con una procesividad moderada que le permite una síntesis discontinua, la hace un buen candidato para replicar la cadena discontinua en la horquilla de replicación.

Por otro lado, una enzima con mucha procesividad que le permita realizar una síntesis continua, capaz de llevar a cabo síntesis de desplazamiento de cadena, controlada por la proteína PCNA, involucrada en la regulación de la replicación-, y con actividad de exonucleasa, es requerida para sintetizar la cadena continua y estas características corresponden a las de la DNA polimerasa δ .

Por analogía con el modelo de replicación en procariontes, es posible que las DNA polimerasas α y δ sean componentes de un complejo multiproteico en la replicación, aun cuando hasta la

fecha no hay evidencia de tal complejo (So and Dowley, 1988).

DNA polimerasa beta

La DNA polimerasa β de mamíferos ha sido purificada de una variedad de organismos y en todos los casos se ha encontrado una enzima que consiste de polipéptido de alrededor de 40,000 de peso molecular. (Hübscher *et al.*, 1979; Tanabe *et al.*, 1981; Sakaguchi and Boyd, 1985; Wilson *et al.*, 1988).

Examinando la procesividad de la enzima, se ha llegado al acuerdo general de que en presencia de Mg^{2+} , es completamente distributiva, insertando solo un desoxinucleótido y disociándose del molde posteriormente (Wilson *et al.*, 1988).

La enzima purificada carece de actividad exonucleasa o reacciones reversas. Por tanto, es la enzima menos precisa de las DNA polimerasas; su frecuencia de inserción de una base equivocada es de 1/1000 a 1/6600 por nucleótido sintetizado.

La DNA polimerasa β no parece tener grupos sulfhidrilo en su sitio activo ya que su actividad no es inhibida por agentes bloqueadores de estos grupos y, a diferencia de lo que ocurre con la pol α , esta enzima es estimulada por altas concentraciones de cationes monovalentes; es fuertemente inhibida por ddNTP's e insensible a ara-NTP y afidicolina.

El papel fisiológico de la DNA pol β , hasta hace algún tiempo era muy oscuro. Era considerada una enzima reparativa, sin embargo las evidencias que existían eran muy circunstanciales: no presentaba fluctuaciones en el ciclo celular y un incremento en la cantidad de esta enzima coincidía con el pico de

reparación de DNA en los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (Hübscher, 1983). Sin embargo, a la fecha se han acumulado algunas otras evidencias consistentes en asignarle un papel en la reparación del DNA. Por ejemplo, una baja procesividad debe necesitarse en una polimerasa que va a realizar síntesis de DNA sobre fragmentos cortos, independientemente de que esta procesividad pueda incrementarse al estar presentes factores estimuladores. Además, la síntesis por desplazamiento de cadena puede ser una característica importante para una enzima reparativa (Wilson, *et al.*, 1988). Algunos estudios han indicado que la DNA pol β funciona solo en la reparación de tramo corto, pero tanto la α como la β están involucradas en la reparación de tramo largo. (Vázquez, 1986). Apoyando lo anterior, éstas dos enzimas parecen actuar conjuntamente en sitios dañados con dimetil sulfato y luz ultravioleta, pero la pol β parece actuar solo en sitios dañados con neocarzinostatina o bleomicina (Wilson, 1988).

DNA polimerasa gama

La DNA polimerasa γ se encuentra en la mitocondria en donde replica el genoma organelar (Hübscher *et al.*, 1979). Esta enzima ha sido también encontrada en la fracción nuclear, pero su función ahí es desconocida, ya que el papel propuesto para esta enzima en la replicación de adenovirus basada en los efectos de inhibición similares en ambas enzimas, ha sido descartado por el reciente conocimiento de una DNA polimerasa codificada por el mismo virus (Litvak and Castroviejo, 1987).

Al igual que la DNA polimerasa α , la pol γ muestra una naturaleza muy heterogénea en el momento de su purificación, su peso molecular va desde 110,000 hasta 300,000 en el caso de la

enzima humana. Debido a que la enzima es muy propensa a formar agregados bajo condiciones de baja fuerza iónica, es difícil darle sentido a las diferentes formas que han sido aisladas (Weissbach, 1977).

Recientemente se ha propuesto que la polimerasa γ de *Drosophila* es un heterodímero que consiste de una subunidad catalítica de 125,000 daltones y otra subunidad de 35,000 daltones de función desconocida (Wernette *et al.*, 1988).

La DNA pol γ puede copiar, además de moldes de DNA naturales y sintéticos, una variedad de ribohomopolímeros como poli (A), poli (C), etc. (Knopf, *et al.*, 1975). Tanto este tipo de enzimas, como las transcriptasas reversas de los virus, muestran la misma eficiencia para el uso de ribohomopolímeros como molde; sin embargo, las polimerasas γ no han sido capaces de copiar moldes naturales de RNA, además de que estudios inmunológicos han mostrado que el antisuero contra la transcriptasa reversa no inhibe a la polimerasa γ de humano (Weissbach, 1977).

Además de las características anteriores, es posible distinguirla de α y β , porque la pol γ es estimulada tanto por cationes monovalentes como por fosfato en presencia de KCl, cosa que no ocurre con pol α y pol β . La pol γ es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo y ddTTP, pero es insensible a afidicolina.

En el cuadro II se muestra un resumen de las propiedades más importantes de estas cuatro polimerasas.

PROPIEDADES	α	β	γ	δ
LOCALIZACIÓN	Nuclear	Nuclear	Mitocondrial Nuclear	Nuclear
FUNCIÓN	Replicación del DNA	Reparación del DNA	Repl. mitocondrial	Replicación del DNA
PM (kd)	150-1000	45	> 110	250-290
ACTIVIDAD RELATIVA				
Cel. en crecimiento	100	10	2	
Cel. en reposo	0-5	100	10	
Asoci. con primasa	si	no	si	no
TEMPERADOS				
DNA activado	si	si	si	si
RNA naturo. con primer de desoxinucleotidos	no	no	no	no
Molde de DNA con primer de RNA	si	no	si	no
INHIBIDORES				
NEM	si	no	si	si
ddTTP	no	si	si	
araCTP	si	si	no	
Afadcolina	si	si	no	si
butil-dGTP	si	no	no	no

CUADRO II. Propiedades de las DNA polimerasas de animales. Tomado de Litvak, 1987

DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES

Aún cuando las DNA polimerasas han sido estudiadas en múltiples organismos eucariontes, el conocimiento más amplio de estas enzimas proviene de células animales. Las DNA polimerasas aisladas tanto de eucariontes inferiores como de plantas no presentan el mismo comportamiento que las de su contraparte animal.

DNA polimerasa alfa

Todas las polimerasas tipo α descritas para sistemas vegetales presentan alto peso molecular (desde 100 hasta 230 kd) y son fuertemente inhibidas por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo (NEM) (Amileni *et al.*, 1979; Fukasawa *et al.*, 1980; Chiver and Bryant, 1983).

En los casos de trigo, espinaca, arroz y coliflor, la afidicolina, un inhibidor específico de DNA polimerasas α de animales, ha mostrado inhibir a la DNA polimerasa de alto peso molecular (Sala *et al.*, 1980/1981).

La DNA polimerasas α de animales no reconocen un molde de poli RA-oligo dT y resultados similares se han encontrado en el caso de las enzimas estudiadas en células vegetales. Sin embargo, en el caso de las DNA pol B y CII reportadas para trigo, pueden usar muy eficientemente éste si la temperatura de incubación decrece o se aumenta la estabilidad del molde (Litvak and Castroviejo, 1987). Es por ello que muchos parámetros deben de ser estudiados antes de concluir si un molde es o no usado por una polimerasa.

Mediante métodos autorradiográficos, se ha observado que una DNA polimerasa sensible a afidicolina se encuentra exclusivamente en el núcleo de células de arroz; iguales resultados se han obtenido en células de soya creciendo en cultivo (Sala, 1981; Litvak and Castroviejo, 1987).

Para trigo y arroz se ha reportado la presencia de actividad de exonucleasa asociada a la DNA polimerasa; sin embargo, el hecho de que no sean enzimas purificadas a homogeneidad, hace posible que esta actividad pueda deberse exclusivamente a una contaminación.

DNA polimerasas beta

Una de las características importantes de las polimerasas β en animales es que son proteínas de bajo peso molecular. Este tipo de enzimas han sido encontradas en tabaco, trigo, chicharo y remolacha (Litvak and Castroviejo, 1987). En el caso de coliflor, una polimerasa de 70 kd ha sido reportada (Fukasawa, 1980). No obstante, si un parámetro importante es el tamaño, es necesario considerar la actividad proteolítica que existe en los extractos de plantas. En el caso de trigo, se ha purificado una polimerasa de 50 Kd casi a homogeneidad y tanto el efecto de inhibidores como su especificidad de molde muestra claras diferencias comparándola con las dos DNA polimerasas tipo α obtenidas de esa misma planta. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos contra ésta enzima de bajo peso molecular presentan reacción cruzada con una de las dos tipo α (Castroviejo *et al.*, 1979).

Enzimas de bajo peso molecular en remolacha y chicharo sólo se inhiben a altas concentraciones de NEM, la polimerasa tipo β de chicharo se encuentra fuertemente unida a cromatina. No

obstante, se desconoce el papel funcional de ambas (Litvak y Castroviejo, 1979).

No se ha demostrado el papel de las DNA polimerasas tipo β en la reparación del DNA en plantas. Sin embargo, algunos resultados han mostrado que la síntesis reparativa de DNA inducida por luz UV en protoplastos de tabaco es resistente a afidicolina (Sala et al., 1982).

DNA polimerasa γ

La DNA polimerasa γ de animales se localiza tanto en el núcleo como en la mitocondria. Una enzima similar de 100 kd. fue caracterizada en trigo. Esta enzima llamada DNA polimerasa A (Castroviejo, 1979) se asemeja a la pol γ de animales en su eficiencia para sintetizar sobre moldes de poli rA-oligo dT; por su estimulación por KCl, por el fuerte efecto inhibitorio de ddTTP y breauro de etidio y por su resistencia a afidicolina. Sin embargo, esta enzima no se localiza en la mitocondria y es capaz de reconocer, a un nivel bajo, moldes naturales de RNA y pareciera tener una actividad de DNA primasa asociada (Litvak and Castroviejo, 1987).

La proteína aislada de cloroplasto de espinaca muestra características muy parecidas a las de las polimerasas γ de animales (Sala et al., 1980).

DNA polimerasas de cloroplasto y mitocondria

Recientemente, se han aislado y caracterizado las DNA polimerasas provenientes de cloroplastos de dos plantas diferentes. En el caso de la enzima proveniente de espinacas, se

ha clasificado como una pol tipo γ , dada su alta eficiencia con moldes de poli rA-oligo dT, peso molecular relativo de 105 Kd, inhibición por NEM y resistencia a afidicolina (Sala *et al.*, 1980).

De manera contraria, la DNA polimerasa proveniente de cloroplasto de chicharo no reconoce como molde poli rA-dT, pero es inhibida por NEM, bromuro de etidio y es resistente a afidicolina (Mc Kown and Tewari, 1984).

Realmente no es claro si esta diferencia en la utilización del molde se debe a propiedades intrínsecas de las enzimas o a una proteólisis parcial en los pasos de purificación que le haga perder esa capacidad de reconocimiento.

Por otra parte, se ha encontrado una DNA polimerasa con un peso molecular aparente de 180 Kd en mitocondrias purificadas de trigo. Esta enzima, a diferencia de la encontrada en animales, no puede sintetizar sobre un molde de poli rA-oligo dT en presencia de cationes divalentes. Debido a esto no puede clasificarse como una típica DNA pol tipo γ a pesar de localizarse en la mitocondria (Litvak and Castroviejo, 1987).

Los papeles fisiológicos de las DNA pol encontradas tanto en cloroplasto como en mitocondria no han sido elucidados. No obstante, es posible suponer que existe alguna relación entre la función de estas enzimas y la replicación y reparación de los genomas organelares.

*Antecedentes inmediatos del trabajo

En la gran mayoría de las semillas de gramíneas, la replicación del DNA es un evento tardío en la germinación. No obstante, se ha detectado un bajo nivel de síntesis de DNA en periodos prereplicativos tanto en embriones de centeno (Osborne *et al.*, 1980), como en embriones de maíz (Vázquez -Ramos y López, 1986).

Se ha considerado que dicha síntesis temprana pudiera ser de tipo reparativo de acuerdo a las evidencias obtenidas en embriones de centeno y maíz tanto normales como γ -irradiados (Vázquez-Ramos and Osborne, 1986; Zarain *et al.*, 1987).

Meléndez en 1987 encontró que en ejes embrionarios de maíz no imbibidos el DNA se encuentra fragmentado y conforme los ejes se embeben, este DNA cambia de bajo a alto peso molecular, indicando de alguna forma la reconstitución de la integridad del material genético.

Adicionalmente en estudios realizados en núcleos aislados a partir de ejes embrionarios de maíz se encontró que la síntesis de DNA es inhibida diferencialmente por diversos compuestos cuando estos son adicionados ya sea en etapas tempranas de imbibición (0-3 h) o bien en etapas tardías (15 h) (Vázquez - Ramos y López, 1986).

En plantas superiores se desconoce que tipo particular de DNA polimerasa está asociada a los procesos de reparación y replicación del DNA.

En el caso particular del maíz, la actividad de DNA polimerasa que se encuentra a 3 h y 24 h de imbibición ha sido purificada parcialmente y caracterizada (Vázquez and Vázquez - Ramos,

1987). Los resultados mostraron que no existían diferencias considerables entre las enzimas presentes a estos tiempos de imbibición y que en general, debido a sus respuestas a ciertos inhibidores, pH óptimo, efecto de fuerza iónica, etc., se asemeja a las DNA polimerasa α de animales.

Con base en estos resultados, el objetivo del presente trabajo es establecer los siguientes pasos de purificación para la DNA polimerasa a partir de la metodología reportada anteriormente, -que consistía en precipitación con sal, columna de intercambio aniónico y columna de exclusión molecular-, (Vázquez, 1986), utilizando como fuente para la extracción de la enzima, hojas de maíz.

MATERIAL Y METODOS

1.- Material Biológico

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

2.- Soluciones Amortiguadoras y reactivos

2.1 Solución Amortiguadora para homogenar ejes embrionarios

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
Cloruro de potasio		25 mM
2-mercaptoetanol		1 mM
Sacarosa		0.25 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)		0.3 mM
Cloruro de Magnesio		1 mM

2.2 Solución Amortiguadora para homogenar plántulas de maíz

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
Cloruro de Potasio		25 mM
2-Mercaptoetanol		1 mM
PMSF		0.3 mM
Cloruro de Magnesio		1 mM
Tritón X-100		0.5 %

2.3 Soluciones Amortiguadoras utilizadas en la purificación de la DNA Polimerasa

Los amortiguadores empleados en el procedimiento de purificación tienen los mismos compuestos, lo único que se modifica es la concentración de fosfato de potasio:

Fosfato de potasio	pH 7.5	
EDTA (Merck)		1 mM
Glicerol		10 %
2-Mercaptoetanol		1 mM
PMSF		0.3 mM

2.3.1 Solución Amortiguadora A:

Fosfato de potasio	10 mM
--------------------	-------

2.3.2 Solución Amortiguadora B:

Fosfato de potasio	60 mM
--------------------	-------

2.3.3 Solución Amortiguadora C:

Fosfato de potasio	400 mM
--------------------	--------

2.4 Solución Amortiguadora para activación de DNA

Tris-HCl	pH 7.5	5 mM
Cloruro de Magnesio		5 μ M
Albumina de suero de bovino (ASB, Sigma Chem. Co.)		0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera (Sigma Chem. Co.)		0.25 mg/ml

2.5 Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa

Tris-HCl	pH 7.6	25 mM
KCl		16 mM
MgCl ₂		6 mM
dATP	(Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
dCTP	(Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
dGTP	(Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
Glicerol		4 %
2-Mercaptoetanol		0.4 mM
DNA Activado		1 μ M
ATP	(Sigma Chem. Co.)	1 mM
(metil- ³ H) TTP	(57 a/mmol. Amersham)	5 μ Ci/ml

2.6 Líquido de Centelleo

2,2'-p-fenilbis (5- fenoxazol)		
(POPOP, Merck)		0.1 gr
2,5 -difenoxazol (PPO, Merck)		5.0 gr
Tolueno		1.0 lt

2.7 Reactivos usados para la cuantificación de proteínas totales por el método modificado de Lowry (Peterson,1977).

2.7.1 Solución stock CTC

Carbonato de Sodio (Na ₂ CO ₃)	10%
Sulfato de Cobre pentahidratado (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.1%
Tartrato de sodio y potasio	0.2%

Esta solución es estable por 2 meses a temperatura ambiente.

2.7.2 Reactivo A

Se mezclan partes iguales de una solución de hidróxido de sodio 0.8N, SDS 10%, agua destilada y solución stock CTC.

Esta solución es estable por dos semanas a temperatura ambiente.

2.7.3. Reactivo B

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.0 Vol
Agua destilada	5.0 Vol

2.7.4. Desoxicolato de sodio (DOC) 0.15%

2.7.5. TCA 72%

2.7.6. Solución proteica para la construcción de la curva patrón

Albumina de suero de bovino	1 mg/ml
-----------------------------	---------

2.8. Ac. Dietilditiocarbámico 5 mM

2.9. Proteinasa K (Sigma Chem. Co.) 1 mg/ml

3.0. Preparación de bolsas de diálisis

Las bolsas de diálisis se hierven dos veces con NaHCO_3 durante 10 minutos y dos veces con EDTA 5 mM por 10 minutos. Se guardan en refrigeración con EDTA 5mM y etanol al 10%.

En el momento de usarse las bolsas se enjuagan con agua desionizada.

3.1. Preparación de protamina

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

4.0. Preparación de resinas

4.1. Dietilaminoetil-Celulosa (DEAE-Celulosa, Sigma)

Se coloca 5g de DEAE-Celulosa en 75ml de HCl 0.5N agitando suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos a temperatura ambiente. La resina se colecta por filtración al vacío lavándola con agua destilada hasta llegar a pH 7.0.

La resina se resuspende en 80ml de KCl 0.05N y se lleva a pH 7.2 con HCl 0.05N. Se agita suavemente durante una hora, a intervalos de 15 minutos a temperatura ambiente. Se retitula a pH 7.2 y se agita cada 30 minutos por dos horas. Se retitula una vez más a pH 7.2 y se decanta eliminando los finos y materia particulada.

La resina se resuspende en solución amortiguadora A.

4.2. Fosfocelulosa (Whatman, P-11)

Se coloca 1g de fosfocelulosa en 35 ml de HCl 0.2N 1:1 en etanol al 95% durante 30 minutos agitando suavemente a temperatura ambiente. Se deja reposar y el sobrenadante se decanta eliminando los finos y materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío lavándola 3 veces con 175 ml de agua destilada.

Se lleva a pH 7.0 con NaOH 1N y se resuspende en 35ml de NaOH 0.1N agitando 30 minutos a temperatura ambiente. Se deja reposar y se decanta el sobrenadante eliminando los finos y materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío.

Se resuspende en 35 ml de EDTA 1mM agitando 30 minutos a temperatura ambiente. Se deja reposar y se decanta eliminando los finos y la materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío y se lava 3 veces con 175 ml de agua destilada. Se lleva a pH 7.0 con HCl 1N.

La resina se resuspende en la solución amortiguadora B.

4.3. Sefadex G-150 (Sigma Chemical, Co.).

El gel se pone a hinchar en agua desionizada a 4°C durante 48 horas. Se decantan los finos, se monta la columna y se equilibra con la solución amortiguadora B (2.2.2)

METODOS

1.0. Obtención del extracto celular

1.1. Extracto de hojas

Las semillas de maíz fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 0.01% y germinadas sobre un sostén de agrolita. Pasados 10 días de germinación, las hojas fueron removidas y trituradas con hielo seco. Se resuspendieron en 2.5 volúmenes de acuerdo al peso y se homogenaron en un Polytron por 25 segundos a máxima velocidad. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo a 4°C. El extracto se centrifugó a 7,000 x g durante 15 minutos. La pastilla obtenida de esta primera centrifugación fue resuspendida en 1.5 volúmenes de buffer (2.1a) y se homogenó con ayuda de un polytron a máxima velocidad durante 25 segundos. Se centrifugó a 7,000 x g por 15 minutos; el sobrenadante obtenido de esta segunda centrifugación se mezcló con el anterior y se

centrifugó por última vez a 7,000 x g durante 15 minutos.

El sobrenadante total obtenido se centrifugó a 100,000 x g durante 2 horas a 4°C. La pastilla se desechó y el sobrenadante fue utilizado como fuente enzimática.

1.2. Extracto de ejes embrionarios

Ejes embrionarios obtenidos manualmente de las semillas (aproximadamente 3 g), fueron resuspendidos en 2.5 volúmenes (relación del peso fresco de los ejes a volumen de solución amortiguadora) de solución amortiguadora (2.1).

Se homogenizó con la ayuda de un Polytron, durante 25 segundos a máxima velocidad siguiendo un protocolo idéntico al reportado en 1.1. El sobrenadante así obtenido se utilizó como fuente enzimática para los pasos posteriores de purificación (FRACCIÓN I).

2.- Preparación del DNA Activado (según Aposhian y Kornberg, 1962)

Se hacen reaccionar 0.25mg de DNA de timo de ternera (Sigma) disuelto previamente en 1ml de solución amortiguadora de activación (2.3) con 5×10^{-4} mg de DNase I (Sigma). Se incuba 15 minutos a 37°C y se calienta 5 minutos a 77°C; finalmente se pasa a un baño de hielo.

3.- Determinación de la actividad de DNA polimerasa

3.1. La actividad de DNA polimerasa fue ensayada en un volumen final de 100 μ l, que contenía la mezcla de reacción (2.4) y de

20-40 μ l del extracto proteico ó de las fracciones de la columna. Las muestras se incuban a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene agregando 100 μ l de una solución de DNA de esperma de arenque (2mg/ ml, Sigma Chem. Co) y 2ml de TCA frío al 10% . Se colocan en hielo durante 30 minutos.

La radioactividad en forma de TCA insoluble se colectó filtrando a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron primero con 5ml de TCA frío al 5% y luego con 5ml de etanol. Se secaron perfectamente y se transfirieron a frascos que contenían líquido de centelleo. La cantidad de radiactividad (cpm) se determinó en un contador de centelleo PACKARD TRI CARB.

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

3.2. Efecto de Inhibidores

Las fracciones se ensayaron como se describió anteriormente, adicionando las siguientes sustancias para observar su efecto.

3.2.1 N-etilmaleimida (NEM), concentración final 10 mM disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO).

3.2.2 Afidicolina (AFI) concentración final 50 μ g/ml disuelta en DMSO.

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

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

4.0. Determinación de la concentración de proteína

4.1. Método modificado del Lowry (Peterson, 1977)

Las muestras problema (de 10 a 20 μ l) se llevan a un volumen final de 1ml con agua destilada.

A cada una de las muestras se les agrega 0.1ml de DOC (2.6.4) mezclando y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado éste tiempo se le agrega 0.1 ml de TCA frío al 72% y se colocan en hielo durante 15 minutos.

Las muestras se centrifugan 15 minutos a 3,000 rpm, el sobrenadante se desecha y la pastilla se resuspende en 1 ml de agua destilada y 1ml de reactivo A (2.6.2), se mezcla y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se le adiciona 0.5ml del reactivo B (2.6.3) se agita y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 750nm.

A partir de la solución stock de albumina de suero de bovino (2.6.6) se preparan soluciones de diferentes concentraciones de albumina desde 0 hasta 200 μ g/ml, en un volumen final de 1ml. y se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente.

4.2. Método Espectrofotométrico

Se determinó la absorbancia de una solución diluida de proteína tanto a 280 nm como a 260 nm y se aplicó la siguiente formula.

Concentración de Proteína

$$(\text{mg/ml}) = 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$$

RESULTADOS

"Aislamiento de la actividad de DNA polimerasa de hojas de
maíz"

Los trabajos reportados anteriormente en el laboratorio, enfocados a la purificación de alguna actividad de DNA polimerasa, han partido de estudios realizados en ejes embrionarios de semillas de maíz. Sin embargo, la cantidad de ejes que se requiere para lograr varios pasos de purificación es grande y esto hace al trabajo lento y laborioso.

Con base en los fundamentos anteriores y dado que el objetivo final del trabajo es purificar la DNA polimerasa que esté presente en mayor proporción, se decidió usar como fuente para la extracción de la enzima a las hojas de plántulas de maíz, esperando no encontrar diferencias entre éstas y ejes embrionarios, ya que es un tejido que está en crecimiento y necesita de la acción de la DNA polimerasa.

El extracto de plántulas de maíz obtenido como se indica en Material y Métodos (1.1) fue ensayado para detectar actividad de DNA polimerasa. Los resultados en todos los casos fueron negativos, ya que nunca se observó algún tipo de actividad, tanto en extracto de hojas como en meristemas apicales y radicales. Estos resultados contrastan en gran medida con los encontrados anteriormente, ya que no se había reportado ningún problema para detectar actividad de DNA polimerasa ni aún en ejes embrionarios de semillas no germinadas, equivalente a un tejido que no se encuentra en proliferación.

Aun más, cuando el extracto proveniente de hojas era adicionado a extracto de ejes embrionarios de semillas no germinadas

(Cuadro III) en cantidades equivalentes de proteína, éste último se veía inhibido un 93%. Estos resultados sugerían la presencia de un inhibidor en el extracto de hoja o bien, una acción elevada de nucleasas y/o proteasas que hicieran imposible detectar la actividad de la DNA polimerasa en el ensayo.

Con el fin de conocer la naturaleza de la inhibición, se realizaron los siguientes experimentos:

Al extracto de hojas de maíz se le adicionó ac. acetilditiocarbámico (5 mM) antes de la centrifugación a 100,000x g, obteniéndose una fracción soluble clara libre de fenoles.

Los fenoles son compuestos que pueden inhibir la acción de muchas enzimas y se sabe que en plantas como espinaca (Misumi and Weissbach, 1982) cuyo contenido de fenoles es muy bajo, no ha habido dificultad para la purificación de la DNA polimerasa. La fracción soluble libre de estos compuestos fue ensayada y los resultados no mostraron actividad de DNA polimerasa.

Para descartar la posibilidad de que el inhibidor fuera de naturaleza orgánica, el extracto proveniente de hojas fue tratado con éter. La porción no etérea se mezcló con el extracto proveniente de ejes embrionarios agregando cantidades equivalentes de proteína. Los resultados encontrados (Cuadro IV) indican que existe una inhibición de un 80% del extracto de ejes embrionarios, lo que descarta la posibilidad de que la pérdida de actividad se deba a un compuesto de origen orgánico.

Experimentos realizados en el laboratorio en forma paralela, han demostrado que existe una gran actividad de nucleasas en el extracto de hojas. No obstante, el tratamiento de éste último con proteasa no es suficiente para impedir la inhibición del

	CPM	% DE INHIBICION
Extracto de ejes embrionarios	5030	--
Extracto de hoja	400	--
Extracto de ejes embrionarios + extracto de hoja	350	93

CUADRO III. Inhibición de la actividad de DNA Polimerasa en una mezcla de ext. de ejes embrionarios y ext. de hojas

	C P M	% DE INHIBICION
Extracto de ejes embrionarios	2537	--
Extracto de hoja tratada con éter	180	--
Ext. de ejes embrionarios + Ext. de hojas tratadas con éter	518	80

CUADRO IV. Inhibición de la actividad de DNA Polimerasa en una mezcla de ext. de ejes embrionarios y ext. de hojas tratadas con éter

extracto de ejes embrionarios al ensayarse con cantidades equivalentes de proteína (Cuadro V).

Lo anterior demuestra, que si bien las nucleasas pueden ser una causa importante que impida detectar actividad en el ensayo, no es posible descartar la presencia de un inhibidor fisiológico en la planta, cuya naturaleza no fue fácil de conocer.

Todos los resultados anteriores dan lugar a una serie de preguntas que tienen que ver con el mecanismo de regulación de la DNA polimerasa en maíz. Sería notable destacar la importancia que tendría la presencia de un inhibidor natural en ese estadio de desarrollo, así como las diferencias en los mecanismos de regulación entre plantas de distintas especies.

Sin embargo, dado que el objetivo principal de este trabajo es la purificación de la DNA polimerasa presente en mayor proporción, se procedió a usar el método previamente reportado para el aislamiento de la DNA polimerasa en maíz (Vázquez, 1986), utilizando ejes embrionarios de semillas no germinadas.

"Purificación de la DNA polimerasa de ejes embrionarios de semillas no imbibidas"

Todos los pasos de fraccionamiento y cromatografía se realizaron a 4°C y en presencia de PMSF (0.3mM) para evitar la pérdida de la actividad enzimática.

1.- Fraccionamiento

A la fracción I, obtenida como se indica en métodos (1.2), se le

% INHIBICION			
DEAE-Celulosa	ddTTP	NEM	Afidicolina
(I) lavado	0	19	16
(II) 100 mM	81	56	0
FosfoCelulosa	ddTTP	NEM	Afidicolina
(I*) lavado	37	0	0
(II*) 200 mM	38	52	0

CUADRO VIII. Efecto de los inhibidores en la actividad de DNA polimerasa obtenida en los diferentes pasos cromatográficos.

adiciona lentamente 10 μ l/ml de una solución de protamina al 10% (Materiales 3.0) La suspensión resultante se agita durante 30 minutos y la pastilla se colecta centrifugando a 15,000x g por 10 minutos.

El sobrenadante obtenido del paso anterior se precipita con 45% de sulfato de amonio (0.277gr/ml) adicionándolo lentamente y evitando un cambio en el pH. La solución se agita por 30 minutos y la pastilla se colecta centrifugando a 15,000x g durante 10 minutos.

El sobrenadante se elimina y la pastilla se resuspende en 2ml de la solución amortiguadora con la que se va a equilibrar la columna a utilizar.

Se dializa toda la noche contra un litro de la misma solución amortiguadora (Fracción II).

2.0 Cromatografía

Trabajos realizados anteriormente en el laboratorio nos han permitido conocer la secuencia en las columnas de cromatografía que permiten un grado satisfactorio de purificación y que conservan la actividad de la DNA polimerasa. Se ha visto que con la utilización de fosfocelulosa como primera columna de cromatografía no se detecta ninguna actividad de DNA polimerasa. La secuencia de DEAE-Celulosa y Sephadex G-150 permitió una buena purificación parcial (Vázquez and Vázquez-Ramos, 1988). Es por ello, que en el presente trabajo se utilizaron dichas columnas.

2.1 DEAE-Celulosa

La fracción II se coloca sobre una columna de DEAE-Celulosa (1 x 14cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La columna se lava con tres volúmenes de cama de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyen con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 10-400 mM de fosfatos, utilizando las soluciones amortiguadoras A y C respectivamente. A las fracciones obtenidas se les determina la cantidad de proteína y la actividad de DNA polimerasa.

La Fig. 1 muestra el perfil de elución de la DNA polimerasa después de su cromatografía sobre una columna de DEAE-Celulosa. El pico de máxima actividad se encuentra a una concentración de fosfatos de 120 mM. Las fracciones que mostraron actividad se juntaron y concentraron aproximadamente 25 veces, utilizando para ello polietilenglicol (PEG 20,000) en frío (Fracción III).

2.2 Sefadex G-150

La fracción III se coloca sobre una columna de Sephadex G-150 (0.7 x 20cm), equilibrada previamente con solución amortiguadora B. La columna se lava con 1.5 volúmenes de columna, colectando fracciones de 1 ml.

En la Fig. 2 se muestra el perfil de elución de la DNA polimerasa a través de una columna de Sefadex. El pico de máxima actividad sbarca de la fracción 3 a la 6.

Utilizando el mismo procedimiento para ejes embrionarios no imbibidos, hemos encontrado diferencias en los patrones cromatográficos, principalmente en DEAE-Celulosa. La enzima presente a 3 h y 24 h de imbibición se eluye a una concentración

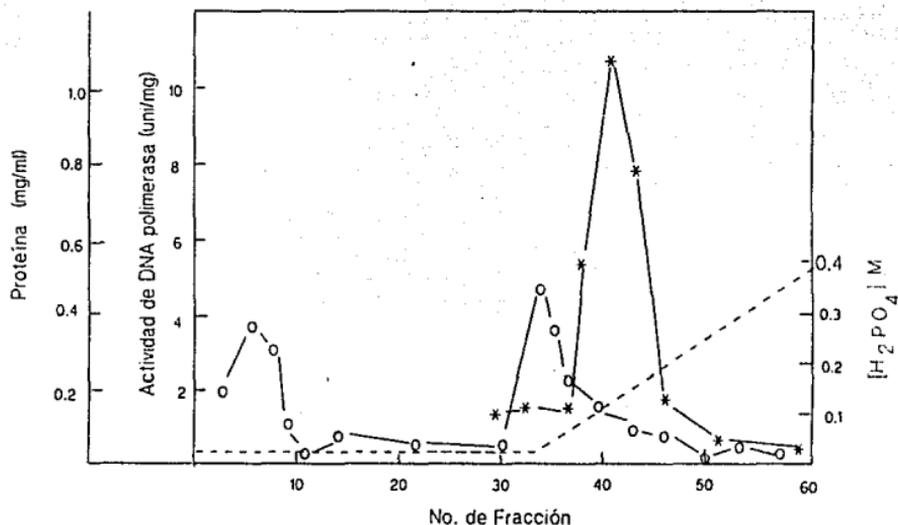


Fig. 1 Perfil de elución de la DNA polimerasa sobre una columna de DEAE-Celulosa. La fracción II se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (1 x 14 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora A (10 mM de fosfatos), se lavó con 3 volúmenes de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de una gradiente lineal de 10-400 mM de fosfatos. Se colectaron fracciones de 1ml, con un flujo aproximado de 15 ml/h. Proteína (o--); Actividad (*---*); Fosfato de Potasio (---).

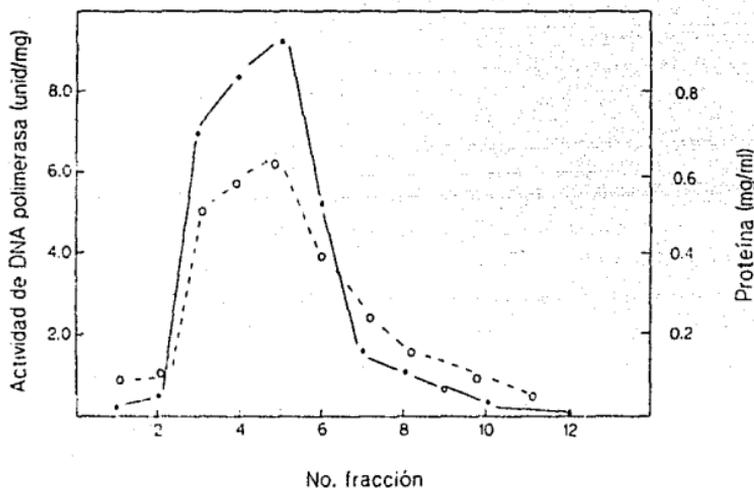


Fig. 2 Perfil de elución en Sefadex G-150 de la actividad de la DNA polimerasa. La fracción III (1 ml) se aplicó a una columna de Sefadex G-150, previamente equilibrada con solución amortiguadora B (60 mM de fosfato de potasio). Las proteínas se eluyeron con 1.2 volúmenes de columna de la misma solución amortiguadora, colectando fracciones de 1 ml con un flujo aproximado de 3 ml/hr. Proteína (o---o); actividad de DNA polimerasa (*---*).

de fosfatos de 240 ± 20 mM. En ejes embrionarios no imbibidos, la proteína eluye a una concentración de 100 ± 30 mM. El patrón obtenido en Sefadex G-150 es también diferente observándose un desplazamiento hacia pesos moleculares menores.

Con el fin de resolver éstas diferencias, se modificó el segundo paso de purificación del procedimiento I. Dicho cambio consistía en usar una columna de intercambio catiónico (Fosfocelulosa) en lugar de una columna de exclusión molecular (Sefadex G-150).

2.3 DEAE-Celulosa

La fracción II se coloca sobre una columna de DEAE-Celulosa (1 x 14cm) como se indicó previamente (2.1).

Para ejes embrionarios de 3h y 24h de imbibición se ha reportado que no existe actividad de DNA polimerasa en las fracciones de lavado, motivo por el cual no se ensayaron dichas fracciones en el procedimiento anterior (I). No obstante, dado que el comportamiento cromatográfico de la DNA polimerasa que se encuentra en ejes embrionarios no imbibidos difiere notablemente del reportado anteriormente, en éste paso de purificación se ensayaron todas las fracciones, tanto del lavado como del gradiente.

La Fig. 3 muestra el perfil de elución de la DNA polimerasa a través de la columna de DEAE-Celulosa. La actividad de la DNA polimerasa mostró dos picos, uno de mayor actividad específica en la fracción del lavado y otro de menor actividad específica que eluye entre 70-80 mM de fosfatos.

Las fracciones del pico II, - con una mayor actividad total y una mayor cantidad de proteína (Cuadro VII)-, se juntaron y

concentraron aproximadamente 20 veces con polietilenglicol (PEG 20,000). Fracción III'.

En la fig. 3a se observa la actividad de la DNA polimerasa expresada en actividad total. El pico II que eluye entre 80-90 mM de fosfatos es el que se utiliza para el siguiente paso de purificación, ya que es el que presenta una mayor actividad total y una mayor cantidad de proteínas.

2.4 FosfoCelulosa

La fracción III' se coloca sobre una columna de fosfoCelulosa (1 x 8cm.) previamente equilibrada con solución amortiguadora B. La columna se lava con 3 volúmenes de cama de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyen con 8 volúmenes de cama de un gradiente lineal de 60-400 mM de fosfatos.

El perfil de elución a través de esta columna (Fig. 4), mostró dos picos de actividad. Uno de ellos en la fracción de lavado y el otro que eluye a una concentración de 200 mM de fosfatos.

El esquema completo de purificación se muestra en el Cuadro VI.

2.5 Inhibidores

Los picos de actividad obtenidos tanto de DEAE-Celulosa como de fosfoCelulosa fueron sometidos a la acción de distintos inhibidores. La acción de estas sustancias sobre las diversas DNA polimerasas de animales han sido plenamente caracterizadas (Ikegami, *et al.*, 1978; Ohashi, *et al.*, 1978). Los resultados se muestran en el Cuadro VIII.

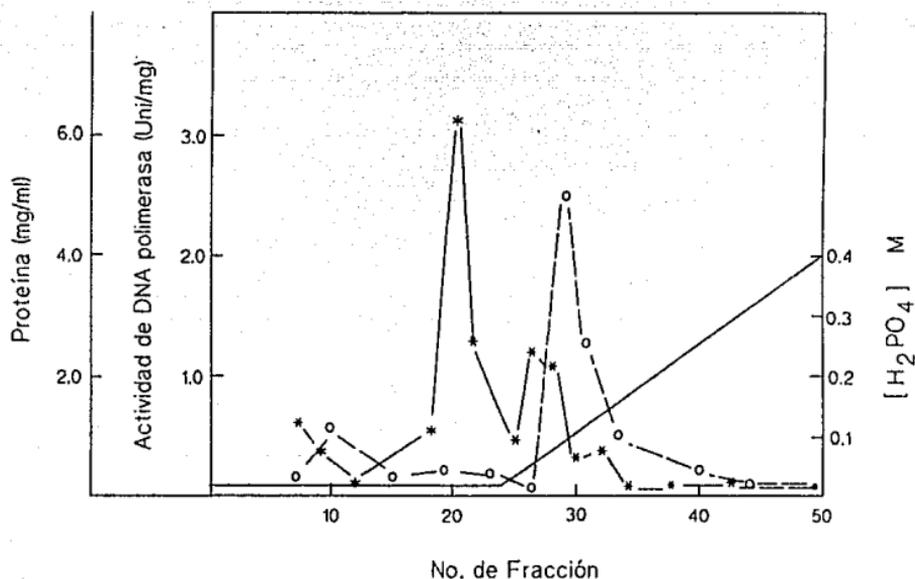


Fig. 3 Perfil de elución de la columna de DEAE-Celulosa de la actividad de DNA Polimerasa de ejes embrionarios no imbibidos. La fracción II (2ml) se aplicó a una columna de DEAE-Celulosa (1 x 14 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora A (10 mM de fosfatos), se lavó con 3 volúmenes de columna de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 10-400 mM de fosfatos. Se colectaron fracciones de 1 ml, con un flujo aproximado de 10 ml/h. (o--o) Proteína, (*--*) Actividad Específica, (---) Fosfato de potasio.

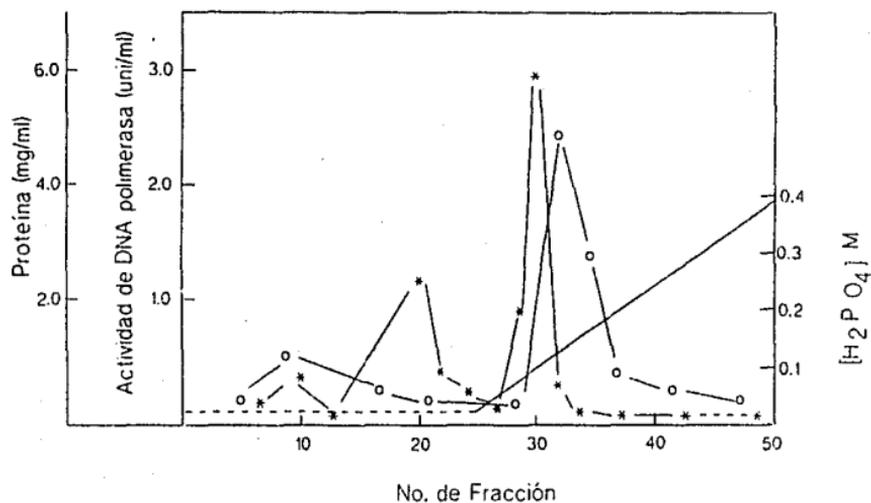


Fig. 3a. Actividad de la DNA polimerasa a través de una columna de DEAE-Celulosa representada en uni/ml. o---o Proteína, *---* Actividad, ---- Fosfato de Potasio.

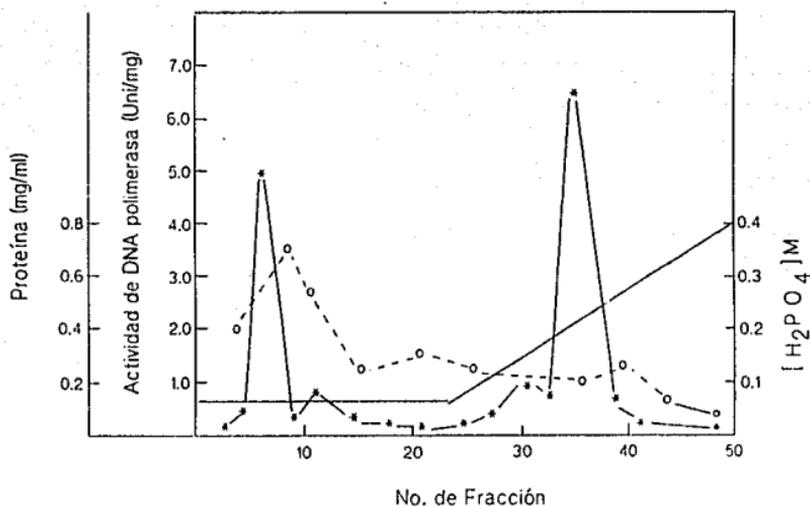
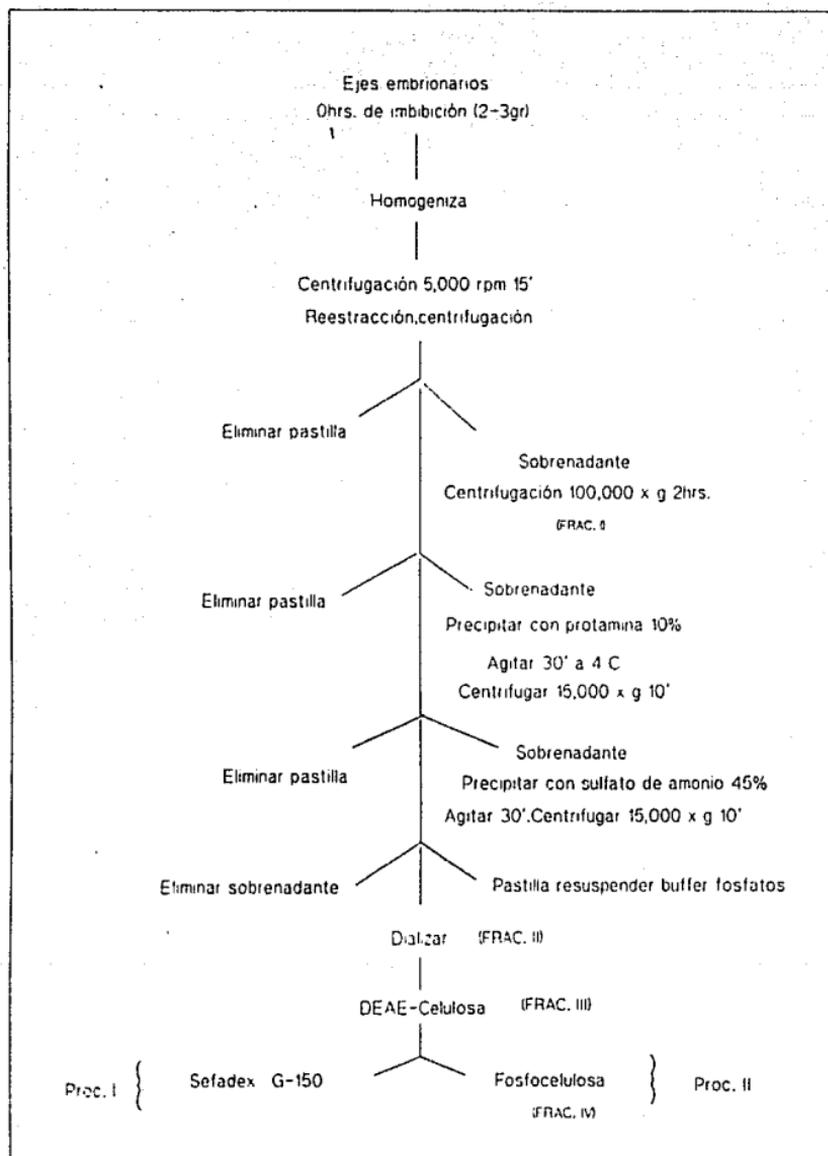


Fig.4 Perfil de elución de la columna de FosfoCelulosa de la actividad de DNA Polimerasa de ejes embrionarios no imbibidos. La fracción III (2 ml) se aplicó a una columna de fosfoCelulosa (1 x 8 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora B (60 mM de fosfatos) se lavó con 3 volúmenes de columna de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 60-400 mM de fosfatos, Se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo aproximado de 15 ml/hr. (o--o) Proteína; (*--*) Actividad Específica; (---) Fosfato de Potasio.



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

FRACCION	PROTEINA (mg/ml)	ACT. TOTAL (uni/ml)	ACT. ESP. (uni/mg)	VECES PURIF.
Ext. crudo	31.7	2.09	0.07	
Precipitado (45% de Sulfato de Amonio)	21.9	4.29	0.19	2.7
DEAE-Celulosa				
I lavado	0.35	1.59	4.5	64.3
II (100 mM)	9.5	3.25	0.34	4.8
FosfoCelulosa (DEAE pica II)				
I* lavado	0.75	3.84	5.12	73
II* (200 mM)	0.25	1.67	6.7	100

CUADRO VII. Cuadro completo de purificación de la DNA Polimerasa obtenida a partir de ejes embrionarios no imbibidos.

Afidicolina, potente inhibidor de la DNA polimerasa α de animales muestra porcentajes distintos de inhibición en los dos picos de actividad obtenidos en DEAE-Celulosa. El pico de actividad en la fracción del lavado (I) se inhibe en un 16%, mientras que el que eluye a 100 mM de fosfatos (II) no presenta inhibición.

Los resultados obtenidos con NEM, agente bloqueador de los grupos SH que se encuentran en el sitio activo de las DNA polimerasas α , mostraron diferentes porcentajes de inhibición en ambos picos de actividad, siendo mayor en el II (56%) que en el I (19%).

En lo que respecta a ddTTP, que es un inhibidor característico de DNA polimerasa β en animales, éste muestra diferencias notables en la inhibición. El pico II presenta un 81% de inhibición, mientras que el I no se ve afectado.

El pico II de DEAE-Celulosa (100 mM) a través de una columna de fosfocelulosa se resuelve en dos picos de actividad, ambos con respuestas diferentes cuando se les adiciona un inhibidor específico; esto es, afidicolina no tiene ningún efecto y NEM en un caso no presenta inhibición (I^{*}) y en el otro inhibe en un 52% (II^{*}). Con ddTTP ambos picos muestran un valor de inhibición muy similar (38%), que no corresponde directamente con los resultados encontrados en la fracción II de DEAE-Celulosa.

	C P M	% DE INHIBICION
Extracto de ejes embrionarios	3750	--
Extracto de hoja tratada con proteasa	200	--
Ext. de ejes embrionarios + Ext. de hoja tratada con proteasa	720	80

CUADRO V . Inhibición de la actividad de DNA Polimerasa en una mezcla de extracto de ejes embrionarios y extracto de hojas tratadas con proteasa.

DISCUSION

Los intentos de purificar a la DNA polimerasa de los extractos provenientes de hojas resultaron fallidos; en ninguno de los casos fue posible detectar la actividad de esta enzima. Más aun, se demostró que este extracto presentaba un caracter inhibitorio, ya que al mezclarse con uno de ejes embrionarios, la actividad de DNA polimerasa de este último decaía notablemente (Cuadro III).

Algunos tratamientos en el extracto de hojas no evitaban la inhibición en el de ejes embrionarios (Cuadros IV y V).

No se ha reportado anteriormente ningún problema para detectar la actividad de DNA polimerasa en hojas (Mckown and Tewari, 1984; Misumi and Weissbach, 1982). Sin embargo, en el caso del maíz existe un inhibidor que no permite detectar su actividad y que además no se separa fácilmente de la enzima mediante distintos procedimientos.

Es notable destacar la importancia que tienen estos resultados en vías de elucidar un mecanismo de regulación de la DNA polimerasa en ese estadio de desarrollo.

Se ha reportado anteriormente la purificación parcial y caracterización de la DNA polimerasa que se presenta a 3h y 24h de imbibición en ejes embrionarios de maíz (Vázquez and Vázquez-Ramos, 1988). Utilizando un esquema de purificación que consistía en una columna de intercambio aniónico (DEAE-Celulosa) y otra de exclusión molecular (Sefadex G-150), los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas entre las enzimas encontradas a ambos tiempos de imbibición y en los dos casos las DNA polimerasas presentaban una gran densidad de cargas negativas, ya que era necesario utilizar una fuerza

iónica de 240 ± 20 mM de fosfatos para poder despegarlas de la resina.

El perfil de elución a través de Sefadex G-150 mostró que la actividad de DNA polimerasa se encontraba en las primeras fracciones tanto para la enzima de 3h como para la de 24h, indicando que eran proteínas de alto peso molecular (aproximadamente 90,000).

En el caso de los ejes embionarios no imbibidos, la actividad a través de una columna de DEAE-Celulosa eluye a una concentración de fosfatos de 100 ± 30 mM (Fig. 1). Este pico concentrado y aplicado a una columna de Sefadex G-150 (Fig. 2) mostró un amplio rango de actividad (fracción 3 a la 6).

Estos resultados contrastan notablemente con los obtenidos para ejes embrionarios imbibidos por 3h y 24h.

Cambios en el esquema de purificación permitieron obtener picos de actividad que no se habían detectado anteriormente.

A través de DEAE-Celulosa se observaron dos picos (Fig. 3), uno de ellos que se obtiene en el lavado y el otro a una concentración de 100 ± 30 mM de fosfatos.

El pico de mayor actividad total (II), a través de una columna de fosfocelulosa se resolvió en otros dos picos de actividad (Fig. 4).

La caracterización de estos picos se realizó en presencia de inhibidores específicos para DNA polimerasas de animales, como son afidicolina, NEM y ddTTP.

En el caso de las actividades encontradas en DEAE-Celulosa su respuesta a inhibidores es claramente diferente. La proteína que sale en las fracciones del lavado no muestra inhibición por ddTTP, pero el hecho de que afidicolina y NEM no presenten una

inhibición mayor, descarta la posibilidad de una polimerasa tipo α .

La enzima presente a 100 mM muestra una inhibición notable con ddTTP y ninguna con afidicolina, sin embargo, el hecho de que NEM inhiba más de un 50% no concuerda con las características que presenta una polimerasa β de animales.

En los picos de actividad obtenidos por fosfocelulosa, afidicolina no muestra ninguna inhibición y NEM inhibe un 52% a la proteína que eluye a 200 mM de fosfatos y no tiene ningún efecto en la enzima que se encuentra en las fracciones del lavado. Estas respuestas concuerdan con las características que presenta la proteína que se cargó a la columna. No obstante, la respuesta a ddTTP es difícil de explicar (Cuadro VIII). Si suponemos que la enzima se encuentra en forma de un complejo polipeptídico y que las diferentes subunidades le confieren características particulares, es posible pensar que al pasar por la columna perdió parte de la subunidad que le confería sensibilidad para este inhibidor. Si esto en particular ocurrió en la fracción I* de lavado, es interesante observar que podría tratarse de una DNA polimerasa tipo β .

La actividad total de la enzima aislada a partir de ejes embrionarios durante 3h, siempre es menor que la de la enzima aislada de ejes embebidos por 24h (Vazquez, 1986). Sin embargo, para el caso de ejes embrionarios de 0h de imbibición se observó que su actividad es aún menor que la de 3h (Cuadro IX).

Estos resultados muestran que durante la imbibición de 0 a 24 h, la actividad de la DNA polimerasa aumenta cerca de cinco veces.

Adicionalmente, se ha encontrado que la citocinina benciladenina

estimula la actividad de la DNA polimerasa y uno de los mecanismos propuestos es la fosforilación de la enzima (Vázquez-Ramos and Reyes, 1989 sometido).

	0 hrs.	3 hrs.	24 hrs.
ACTIVIDAD TOTAL			
(und/ml)	2.09	3.1	10.7

CUADRO 9. Actividad total de la DNA polimerasa durante la germinación.

Podemos suponer, dado que no existe ningún aumento considerable en la síntesis de DNA polimerasa en las primeras horas de imbibición (Vázquez Ramos *et al.*, 1988), que uno de los mecanismos que afectaría la actividad de ésta enzima sería la fosforilación, la cual además, cambiaría sus características cromatográficas.

Por otra parte, el aumento de hasta cinco veces en actividad de la DNA polimerasa para las 24 horas de imbibición puede deberse a la síntesis de nueva proteína más que a una modificación de la preexistente.

Para el caso de embriones de trigo, se ha propuesto que la síntesis de la DNA polimerasa comienza en las primeras horas de la germinación. Además, otros estudios indicaron que existe un incremento en la actividad de la DNA polimerasa en núcleos a lo largo de ésta (Castroviejo *et al.*, 1979).

La actividad encontrada en las fracciones del lavado a través de DEAE-Celulosa en ejes embrionarios no embebidos puede ser tentativamente explicada si asumimos que esta enzima es un vestigio del estado de embriogénesis durante el cual fue almacenada intacta a lo largo de la desecación de la semilla y degradada inmediatamente después de la imbibición.

Otra explicación posible, es que sea el resultado de la acción proteolítica.

Resultados similares han sido obtenidos para el caso de embriones de trigo (Castroviejo *et al.*, 1979).

La utilización de la columna de fosfocelulosa como segundo paso en el esquema de purificación también marca una diferencia muy importante con respecto a los resultados reportados anteriormente. En ejes embrionarios de 3h y 24h de imbibición la actividad no se conservaba al pasarla a través de una columna de este tipo.

Por otra parte, a través de esta columna se obtiene una purificación de la fracción II^a de 100 veces, que comparándola con la obtenida para ejes de 24h con el protocolo anterior, es más eficaz, ya que se partió de una actividad total y de una cantidad de proteína menor.

Finalmente, es necesario observar que las actividades de DNA polimerasa en plantas superiores en presencia de inhibidores específicos para polimerasas animales, no responden de forma similar y se hace necesaria la obtención de anticuerpos para poder detectar actividades diferentes de DNA polimerasa y descartar la posibilidad de que únicamente sean el producto de la actividad proteolítica.

CONCLUSIONES

- 1) Parece existir un inhibidor en semillas germinadas y plántulas de maíz que impide detectar la actividad de DNA polimerasa.
- 2) Fue posible separar, -mediante cambios en el esquema de purificación-, actividades diferentes de esta enzima.
- 3) Las DNA polimerasas en ejes embrionarios no embebidos (0h) presentan características diferentes, -en cuanto a su comportamiento cromatográfico y su respuesta a inhibidores-, en comparación con las que se encuentran tanto a 3h como a 24h de imbibición.
- 4) Las DNA polimerasas en plantas superiores parecen no responder de la misma forma que las DNA polimerasas de animales cuando se les adiciona inhibidores específicos para éstas últimas.

BIBLIOGRAFIA

- Amileni, A., Sala, F., Cella, R. and Spadari, S. 1979. The major DNA polymerase in cultured plant cell: partial purification and correlation with cell multiplication. *Planta*, 146, 521-527.
- Aposhian, H.V. and Kornberg, A. 1962. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 237, 519-525.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J. and Sánchez de Jiménez, E. 1989. DNA Synthesis and cell division in embryonic maize tissues during Germination. *J. Plant Physiol.* en prensa.
- Berrie, A.M. 1984. en Wilkins, M (ed). *Advanced Plant Physiology*. Pitman. Great Britain.
- Bewley, J. and Black, M. 1978. *Physiology and Biochemistry of seeds*. Vol. 1 Springer-Verlag. London.
- Bewley, J. and Black, M. 1984. *Seeds Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. New York. pp 168.
- Bialek, G., Nasherver, H., Goetz, H., Behnke, B. and Groose, F. 1988. DNA polymerase α -DNA primase from human lymphoblasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 951, 290-297.
- Bidwell, R.G. 1979. *Fisiología Vegetal*. AGT editor. México, D.F.
- Bollini, R. and Chrispeels, M. 1977. Germinating Kidney bean seeds synthesize vicilian and other seed protein utilizing preexisting mRNA. *J. Cell. Biol.* 75, 2part 2abst. RT 117.
- Bollon, F.J. 1960. Calf thymus polymerase. *J. Biol. Chem.* 235, 2399-2403.

Bray, C. and Smith, D. 1985. Stored polyadenylated RNA and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Plant Science*. 38,71-79.

Brooker, J., Cheung, C.P. and Marcus, A. 1977 en Khan, A (ed). *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. pp 347-356.

Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. 1978. Characterization of the early synthesized DNA in germinating *Triticum aestivum* embryos. *Phytochem*. 17, 1481-1484.

Castroviejo, M., Tharaud, D., Tarrago-Litvak, L. and Litvak, S. 1979. Multiple Deoxyribonucleic acid polymerases from quiescent wheat embryos. *Biochem. J.* 181, 183-191.

Chen, D. and Osborne, D. 1970. Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. *Nature*. 226; 1157-1160.

Cheung, C.P., Wu, J. and Suhadolnik, A. 1979. Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during early hours of germination of wheat embryos. *Nature*. 277, 66-67.

Chivers, H. and Bryant, J. 1983. Molecular weights of the major DNA polymerases in a higher plant, *Pisum Sativum* L. (pea). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 632-639.

Crute, J., Wahl, A. and Bambara, R. 1986. Purification and Characterization of two new high molecular weight forms of DNA polymerase δ . *Biochem.* 25, 26-36.

Dunham, V. and Cherry, J. 1973. Multiple DNA polymerase activity solubilized from higher plant chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 403-410.

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

Fukasawa, H., Yamaguchi, M., Chou, M., Matsumoto, H. and Matsukage, A. 1980. Characterization of two DNA Polymerases from cauliflower inflorescence. *J. Biochem.* 87, 1167-1175.

Gasman, M., Focher, F., Buhk, H., Ferrari, E., Spadari, S. and Hubscher, U. 1988. Replication of single-stranded porcine circovirus DNA by DNA polymerases α and δ .

Goecin, L. and Byrnes, J. 1982. DNA Polymerase δ : One Polypeptide, Two Activities. *Biochem.* 21, 2518.

Hohn, K. and Grosse, F. 1987. Processivity of the DNA Polymerase α -Primase Complex from Calf Thymus. *Biochem.* 26, 2870.

Hubscher, U., Kuenzle, C. and Spadari, S. 1979. Functional roles of DNA polymerases β and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 2316-2320.

Hubscher, U. 1983. DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action in biological implication. *Experientia.* 39, 1-26.

Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y 1978. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerases α . *Nature.* 275, 458-460.

Knopf, K., Yamada, M. and Weissbach, A. 1976. HELA Cell DNA Polymerase γ Further purification and properties of the enzyme. *Biochem.* 15, 4540-4546.

Kornberg, 1980. *DNA Replication*. W. H. Freeman and Company, San Francisco. pp. 167-229.

Lee, M. and Toomey, N. 1987. Human Placental DNA Polymerase δ : Identification of a 170- Kilodalton Polypeptide by Activity Staining and Immunoblotting. *Biochem.* 26, 1076-2001.

Lee, M., Tan, C., So, A. and Downey, K. 1980. Purification of Deoxyribonucleic Acid Polymerase δ from Calf Thymus: Partial Characterization of Physical Properties. *Biochem.* 19, 1096-2001.

Litvak, S. and Castroviejo, M. 1987. DNA polymerases from plant cells. *Mutat. Res.* 181, 81-91.

Marcus, A. Weeks, D.P. , Leis, J. P. and Keller, E. B. 1970. Protein chain initiation by methionyl-tRNA in wheat embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67, 1681-1687.

McHenry, Ch. 1988. DNA Polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 519-550.

Mckown, R. L. and Tewari, K. 1984. Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81.

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

Misumi, M. and Weissbach, A. 1982. The Isolation and Characterization of DNA Polymerase α from Spinach. *J. Biol. Chem.* 257, 2323-2329.

Nasheuer, H. and Grosse, F. 1988. DNA polymerase α -primase from calf thymus. Determination of the Polypeptide responsible for primase activity. *J. Biol. Chem.* 263, 8981-8988.

Ohashi, M., Taguchi, T. and Ikegami, S. 1978. Aphidicolin a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 1084-1090.

Osborne, D. 1982. DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. *Embryonic Development.* 577-592.

Osborne, D. 1983. Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Can. J. Bot.* 61, 3568-3577.

Osborne, D. J., Dell'Aquila, A. and Helder, R. H. 1984. DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *FEBS Symposium on DNA 1983. Folia Biologica (Praga) Special Publication.* 155-169.

Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of lowry et al which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.

Reyes, J. 1988. Estimulación de la Síntesis de DNA, durante las primeras horas de la germinación de *Zea mays.*, por bencil-adenina. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.

Roth, J. 1966. *Anatomía de las plantas superiores.* Ed. de la biblioteca. pp. 315-322.

Sakaguchi, K. and Boyd, J. 1988. Purification and characterization of a DNA polymerase β from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 260, 10406-10411.

Sala, F., Amileni, A., Parisi, B. and Spadari, S. 1980. A γ -like DNA polymerase in spinach chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 112, 211-217.

Sala, F. Galli, M., Levi, M. Burroni, D. and Parisi, B. 1981. Functional roles of the plant α -like and γ -like DNA polymerases. *FEBS letters.* 124, 112-118.

Sala, F., Parisi, B., Burroni, D., Amileni, A., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. 1980. Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the α -like DNA polymerase of plant cells. *FEBS letters.* 117, 93-98.

Sala, F., Magnien, E., Galli, M.G., Dalschaert, X., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. 1982. DNA repair synthesis in plant protoplast is aphidicolin resistant. *FEBS Lett.* 138, 213-217.

So, A. and Downey, K. 1988. Mammalian DNA polymerases α and δ : current status in DNA replication. *Biochem.* 27, 4591-4595.

Tamai, K., Kojima, K., Hanaichi, T., Masak., S., Suzuki, M., Umekawa, H. and Yoshida, S. 1988. Structural study of immunoaffinity-purified DNA polymerase α -DNA primase complex from calf thymus. *Biochim. Biophys. Acta.* 950, 263-273.

Tan, C., Castillo, C., So, A. and Downey, K. 1986. An auxiliary protein for DNA Polymerase- δ from fetal Calf thymus. *J. Biol. Chem.* 261, 12310.

Tarrago, A., Monasterio, D. and Allende, J. E. 1970. Initiator-like properties of a methionyl-tRNA from wheat embryos. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 41, 765-773.

Vázquez, A. 1986. Aislamiento y caracterización de la actividad de DNA polimerasa de Maíz. *Tesis Maestría. Fac. Química. UNAM.*

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

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

Vázquez-Ramos, J.M., López, S., Vázquez, E. and Murillo, E. 1988. DNA integrity and DNA Polymerase activity in deteriorated maize embryo axes. *J. Plant Physiol.* 133,600-604.

Vázquez-R., J. and Osborne, D. 1986. Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutat. Res.* 166, 39-48.

Vázquez-R, J. and Reyes, J. Stimulation of DNA Synthesis and DNA polymerase activity by benzyl adenine during early germination of maize axes. *Physiol. Plant.* sometido.

Velesinski, J., Zadrazil, Pokorny, V. and Gichner, T. 1977. DNA repair synthesis stimulated by mutagenic N-methyl-N-nitrosourea in barley seed and free embryos. *Mutat. Res* 44,43-51.

Wahl, A., Crute, J., Sabatino, R., Bodner, J., Marracino, R., Harwell, L., Lord, E. and Bambara, R. 1986. Properties of two forms of DNA polymerases δ from calf thymus. *Biochem.* 25,7821.

Weissbach, A. 1977. Eukaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Bioch.* 46,25-47.

Wernette, C., Conway, M. and Kuguni, L. 1988. Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: kinetics, processivity, and fidelity of DNA polymerization. *Biochem.* 27, 6046-6054.

Wilkins, M.B. 1969 *Physiology of plant growth and development*. Mc. Graw-Hill pp. 635-637.

Wilson, S., Abbott, J, and Widen, S. 1988. Progress toward molecular biology of DNA polymerase β . *Biochem. et Biophys. Acta.* 949,149-157.

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

Zarain, M., Bernal-Lugo, I. and Vázquez-Ramos, J. 1987. Effect of benzyl adenine on the synthesis of DNA during early germination of maize embryo axes. *Mut. Res.* 181, 103-110