

Nº 99
2.F.V.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION PARCIAL DE LAS DNA
POLIMERASAS PLASTIDICA Y MITOCONDRIAL
DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ EN GERMINACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
GLORIA ANGELICA MARTINEZ MUÑOZ



MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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

	PÁGINA
ABREVIATURAS	1
LISTA DE TABLAS	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ESQUEMAS	6
1. INTRODUCCION	
1.1 Justificación de la investigación	8
1.2 Antecedentes Teórico-Experimentales. Generalidades	
1.2.1 DNA polimerasas nucleares y de extracto total de maíz	10
1.2.2 DNA polimerasas organelares de maíz	11
1.2.3 DNA polimerasas organelares vegetales y animales	
A) DNA polimerasas mitocondriales	11
B) DNA polimerasas cloroplásticas	12
1.3 Problema de la investigación	12
1.4 Planteamiento de la Hipótesis	
A) DNA polimerasa mitocondrial de maíz	12
B) DNA polimerasa cloroplástica de maíz	13
1.5 Objetivos de la investigación	14
A) Objetivos generales a corto plazo	14
B) Objetivos generales a mediano plazo	14
C) Objetivos generales a largo plazo	14
D) Objetivos particulares	14
E) Objetivos específicos	15
2. FUNDAMENTOS TEORICOS	
2.1 Maíz e Investigación de Semillas	17
2.1.1 El maíz en la época prehispanica	17
2.1.2 Época actual	19
2.1.3 Investigación agrícola	20
2.2 El Maíz. Generalidades	
2.2.1 Clasificación Taxonómica del maíz	22
2.2.2 Usos del maíz	22
2.2.3 Origen, razas y adaptabilidad del maíz	
2.2.3.1 Origen citogenético	24
2.3 Semilla, maíz y germinación	28
2.3.1 Anatomía de la semilla	28
2.3.1.1 El embrión	30

2.3.2	Germinación de semillas	30
2.3.2.1	Fisiología de la germinación	32
	A) Absorción de agua	32
	B) Imbibición	33
	C) Respiración	33
	D) Síntesis de ácidos nucleicos y proteínas	34
	E) Síntesis de DNA	35
2.4	Principales propiedades de las DNA polimerasas animales y vegetales	36
2.4.1	DNA polimerasa alfa de animales	
2.4.1.1	Estructura y actividades catalíticas	
	A) Estructura	37
	B) Papel funcional de la DNA polimerasa alfa	39
	C) Actividad exonucleasa asociada	39
	D) Respuesta a inhibidores	39
2.4.2	DNA polimerasa alfa de plantas	40
2.4.3	DNA polimerasa beta de animales	40
2.4.4	DNA polimerasa beta de plantas	41
2.4.5	DNA polimerasa gama de animales	41
2.4.6	DNA polimerasa gama de plantas	42
2.4.7	DNA polimerasas delta y epsilon de animales	48
2.4.8	DNA polimerasa delta de plantas	49
2.4.9	DNA polimerasas epsilon de plantas	49
3.	MATERIALES Y REACTIVOS	
3.1	Material Biológico	51
3.2	Soluciones amortiguadoras y reactivos	
3.2.1	Soluciones stock	51
3.2.2	Solución de imbibición de ejes embrionarios	51
3.2.3	Solución de homogeneización de ejes embrionarios	51
3.2.4	Solución de resuspensión de botones organelares	52
3.2.5	Soluciones para gradientes de sacarosa	
	A) Solución de menor densidad	52
	B) Solución de mayor densidad	52
3.2.6	Preparación de templates natural y artificial	
	A) DNA activado	
	I Solución amortiguadora de activación	53
	II Activación del DNA	53
	B) PolirA-oligodT	53

3.2.7 Preparación de la columna cromatográfica	
A) Preparación de la resina de DEAE-celulosa	54
B) Montaje de la columna	54
3.2.8 Soluciones amortiguadoras de corrimiento cromatográfico	
A) Amortiguador de lavado de fosfatos	55
B) Amortiguador de gradiente de fosfatos	55
3.2.9 Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa	55
3.2.10 Líquido de centelleo	
A) Precauciones en la preparación del líquido de centelleo	56
B) Manejo del líquido de centelleo y de marca radiactiva	57
3.2.11 Reactivo A para cuantificación de proteínas	57

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1 Obtención del tejido embrionario y germinación de los embriones de maíz	59
4.2 Homogeneización del tejido embrionario	59
4.3 Técnica I aislamiento organelar	60
4.3.1 Aislamiento de los botones nuclear y plastídico-mitocondrial	60
4.4 Técnica II de aislamiento organelar	62
4.4.1 Purificación organelar a través de un gradiente discontinuo de sacarosa	
A) Plastidios	64
B) Mitocondrias	65
4.5 Lisis organelar y solubilización enzimática	
4.5.1 Lisis organelar	65
4.5.2 Digestión de ácidos nucleicos	65
4.6 Caracterización de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial	
4.6.1 Inhibidores	66
4.6.1.a Afidicolina	66
4.6.1.b 2', 3'-didesoxitimidina trifosfato (ddTTP)	67
4.6.1.c N-etilmaleimida (NEM)	67
4.7 Purificación enzimática	
4.7.1 Eliminación de los restos membranales organelares	68
4.7.2 Purificación a través de una columna de DEAE-celulosa	68
4.8 Ensayo de actividad de DNA polimerasa	69
4.9 Ensayo de cuantificación de proteínas	70
4.10 Ensayo de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (DNA)	71

5. RESULTADOS	
Presentación	73
5.1 Establecimiento de las técnicas de aislamiento y purificación organelar	74
5.1.1 Establecimiento de las técnicas de aislamiento organelar	
5.1.1.1 Antecedentes técnicos y criterios de evaluación	75
5.1.1.2 Técnica I de aislamiento organelar	75
a) Aislamiento nuclear	76
b) Aislamiento plastídico y mitocondrial	76
5.1.1.3 Técnica II de aislamiento organelar	78
5.1.2 Técnica de purificación organelar	82
5.2 Establecimiento de la técnica de ruptura organelar	85
5.3.1 Choque térmico	85
5.3.2 Choque térmico en presencia de EDTA	86
5.3.3 Tritón X-100	87
5.3.4 Sonicación	88
5.3.5 Tritón y nucleasa	88
5.3 Caracterización de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial	91
5.3.1 Efecto de inhibidores	91
5.3.1.1 Afidicolina	91
5.3.1.2 N-etilmaleimida	94
5.3.1.3 Didesoxitimidina-trifosfato	98
5.3.2 Actividad con templados (natural y artificial) y catión divalente	102
5.3.2.1 DNA activado versus polirA-oligodT	103
5.5 Purificación enzimática	105
5.5.1 Fracción mitocondrial	106
5.5.2 Fracción plastídica	108
6. DISCUSIÓN	
6.1 Actividad de las DNA polimerasas mitocondrial y plastídica durante las primeras horas de la germinación	111
6.2 Técnicas de aislamiento organelar y solubilización enzimática	112

6.3 Ruptura organelar y solubilización de las polimerasas plastidica y mitocondrial	115
6.4 DNA como marcador organelar	118
6.5 Caracterización enzimática	
A) Inhibidores de su actividad	119
B) Par: templado-cati3n divalente, preferido	121
6.6 Purificaci3n enzimática	123
6.7 Comentarios finales	125
7. CONCLUSIONES	126
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADP	Difosfato de adenosina
ASB	Albumina de suero bovino
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Citosina
Ci	Curies
CPM	Cuentas por minuto
CTP	Citidina 5'-trifosfato
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina 5'-trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótidos-trifosfato
ddTTP	2', 3'-Didesoxitimidina 5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	Desoxinucleótidos-trifosfato
dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato
DOC	Desoxicolato de sodio
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA pol.	DNA polimerasa
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
G	Guanina
GTP	Guanosina trifosfato
KDa	Kilodaltons

metil- ³ H-dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato tritiada en el grupo metilo
NEM	N-etilmaleimida
NTP	Nucleótido trifosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PolidA-oligodT	Polidesoxiadenilato-oligodesoxitimidina
PolidC-oligodT	Polidesoxicitidina-oligodesoxitimidina
PolirA-oligodT	Polirriboadenilato-oligodesoxitimidina
POPOP	2, 2' p-fenilen-bis [5-feniloxazol]
PPO	2, 5-difeniloxazol
Primer	Cebador
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
rNTP	Ribonucleótidos-trifosfato
T	Timina
TCA	Acido tricloroacético
Tris-HCl	Hidroximetil-aminometano
UTP	Uridin-trifosfato
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABLAS

No. Tabla	Leyenda	PÁGINA
2.1	Propiedades de las DNA polimerasas de células eucarióticas	38
2.2	Propiedades de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y γ -animales	43
2.3	Propiedades de las DNA polimerasas cloroplásticas vegetales y γ -animales	45
2.4	Cuadro comparativo de las propiedades de las DNA polimerasas gama de vegetales y animales	47
5.1	Valores de CPM y μ g de proteína de la Figura 5.1	78
5.2	Cuadro de comparación de actividad enzimática de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial de maíz de la fracción inicial a la fracción de gradiente de sacarosa	80
5.3	Valores de CPM de la Figura 5.3	81
5.4	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales frente a la afidicolina	93
5.5	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y cloroplásticas frente a la afidicolina	94
5.6	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales frente a la N-etilmaleimida	97
5.7	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y cloroplástica frente a la N-etilmaleimida	98

5.8	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales frente a la ddTTP	101
5.9	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica, cloroplásticas y cromoplástica frente a la ddTTP	101
5.10	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas organelares frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+}	102
5.11	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+}	103
5.12	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales animales frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mn^{2+}	104
5.13	Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas cloroplásticas y plastídicas frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+}	104
5.14	Cuadro de purificación de las DNA polimerasas organelares de maíz a través de una columna de DEAE-celulosa	105
5.15	Cuadro comparativo del comportamiento cromatográfico de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales a través de DEAE-celulosa como primera resina	107
5.16	Comparación del comportamiento cromatográfico de las DNA polimerasas cloroplásticas a través de DEAE-celulosa como primera resina	109

LISTA DE FIGURAS

No. Figura	Leyenda	PÁGINA
2.1	Una vasija para agua peruana representando una deidad del maíz con hijos -réplicas en miniatura de él mismo- que significa fertilidad. Las mazorcas de maíz parecen representar a la raza Cuzco.	18
2.2	Planta de maíz y sus diversos órganos	23
2.3	Mazorcas de maíz y espigas pistiladas de <i>Tripsacum</i> .	25
2.4	Variación en el tamaño, color y textura del endospermo de las mazorcas de maíz del Hemisferio.	27
2.5	Anatomía de la semilla de maíz	28
2.6	Germinación de una semilla de maíz	31
5.1	Cinética de actividad <i>in vitro</i> de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial a diferentes tiempos de germinación	77
5.2	Concentración del DNA plastídico-mitocondrial a dos diferentes tiempos de germinación	79
5.3	Actividad de DNA polimerasa total en diferentes diluciones de extracto crudo de ejes embrionarios de maíz	81
5.4	Actividad específica de la DNA polimerasa detectada en las fracciones soluble y membranal de la fracción plastídico-mitocondrial después de ser tratada con dos técnicas de ruptura-solubilización organo-proteica	89
5.5	Estructura química de la afidicolina	91
5.6	Efecto de la afidicolina sobre la actividad de ambas DNA polimerasas organelares	92

5.7	Estructura química de la N-etilmaleimida	94
5.8	Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad de ambas DNA polimerasas organelares	95
5.9	Estructura química de la 2'-3' didesoxitimidina trifosfato (ddTTP)	99
5.10	Efecto de la 2'-3' didesoxitimidina trifosfato sobre la actividad de ambas DNA polimerasas organelares	100
5.11	Perfil cromatográfico de la fracción mitocondrial a través de una resina de intercambio iónico	106
5.12	Perfil cromatográfico de la fracción plastídica a través de una resina de intercambio iónico	108

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA	TÍTULO	PÁGINA
A	Técnica I de Aislamiento organelar	61
B	Ensayos de Cuantificación	62
C	Técnica II de Aislamiento organelar	63

CAPITULO PRIMERO

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación de los mecanismos moleculares que hacen posible el desarrollo, proliferación y diferenciación celular en cualquier especie celular, es uno de los campos de estudio más apasionantes de la bioquímica actual (Wang, 1991).

Un caso concreto de lo anterior lo constituye el fenómeno de la germinación de semillas. Dicho fenómeno natural encierra aun múltiples interrogantes, principalmente, a nivel de los mecanismos celulares que desencadena; los procesos moleculares traen consigo la transformación del embrión en plántula llevándolo de un estado quiescente a un estado activo de crecimiento y proliferación celular.

Durante los últimos 20 años se han desarrollado -principalmente en los países del Primer Mundo- diversas líneas de investigación en germinación de semillas que han emergido como parte de la investigación biotecnológica mundial nacida, a su vez, de la problemática alimenticia mundial. Según Arias (1990), el problema alimenticio "ha llevado a la búsqueda del mejoramiento genético vegetal que se traduce en un mayor rendimiento agrícola".

Una línea de investigación interesante es la encaminada al desarrollo de las técnicas experimentales que hagan posible "el conocimiento del material genético de las semillas con miras a manipularlo y manejarlo a largo plazo" (Arias, 1990).

Las investigaciones realizadas en el laboratorio del Dr. Jorge Vázquez forman parte de dicha línea de investigación: se abocan al estudio del metabolismo de los ácidos nucleicos durante la germinación del maíz el cual, a su vez, incluye la participación de múltiples estructuras proteicas y celulares, siendo la DNA polimerasa una de las enzimas clave del metabolismo del DNA.

La DNA polimerasa es la enzima encargada de sintetizar el DNA de cualquier organismo; tal es la importancia biológica de su función que su actividad asegura, no solo la preservación de toda especie sobre la Tierra, sino también, la preservación de la integridad estructural del material genético de cualquier organismo a lo largo de toda su vida en el planeta.

A la fecha se dispone de un esquema de clasificación y caracterización de las DNA polimerasas eucarióticas que ha sido establecido gracias a la investigación realizada en levaduras y células animales. Por su parte, el conocimiento sistemático de las DNA polimerasas vegetales no ha llegado a su culminación. En dicho campo se requiere mayor evidencia experimental que lleve a la generalización de las características de dichas enzimas vegetales.

Uno de los sistemas biológicos vegetales más apropiados para la realización de este tipo de investigaciones en México lo constituye la semilla de maíz dado que es este cereal el que se consume en mayor proporción en México y es, en general, la base de la alimentación en América Latina (Montañez y Aburto, 1979).

La célula de maíz, como la de cualquier otra célula vegetal, contiene material genético en tres compartimentos celulares: el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto. Cada uno de los tres paquetes genómicos está acompañado de su propia DNA polimerasa encargada de la síntesis del DNA.

Sin embargo, las DNA polimerasas nucleares vegetales han sido, en general, mejor caracterizadas que ambas DNA polimerasas organelares (mitocondriales y cloroplásticas) y en lo que respecta a las enzimas de maíz, no existen reportes previos similares a la presente investigación.

La inquietud de investigar a las DNA polimerasas plástidica y mitocondrial surge principalmente de la necesidad de:

- i) tener un esquema completo de las DNA polimerasas de maíz y
- ii) conocer sus características básicas que permitan clasificarlas, provisionalmente, dentro de alguno de los grupos descritos para las DNA polimerasas animales.

La presente investigación aporta las técnicas básicas iniciales para el aislamiento de ambos organelos y la posterior solubilización de la DNA polimerasa así como una primera clasificación para ambas enzimas.

Finalizo haciendo referencia a lo que Arias, (1990), dice textualmente: "todo el conocimiento en el área bioquímica de semillas estará orientado al desarrollo de las técnicas necesarias para conocer nuestro material genético y mejorarlo, para tener la capacidad de manipularlo y transformarlo en el largo plazo".

1.2. ANTECEDENTES TEÓRICO-EXPERIMENTALES GENERALIDADES

1.2.1 DNA POLIMERASAS NUCLEARES

Y

DE EXTRACTO TOTAL DE MAÍZ

Como se mencionó brevemente en el apartado anterior, el grupo de investigación del Dr. Jorge Vázquez está interesado en la dilucidación de los tipos de DNA polimerasas presentes en maíz y sus diversas funciones durante la germinación de semillas.

En torno a este problema general, se han realizado algunas investigaciones abocadas al aislamiento y caracterización de las DNA polimerasas de embriones de maíz a tiempos variables de germinación.

Vázquez (1986) realizó la purificación parcial de la actividad de DNA polimerasa presente en extracto total de embriones de maíz. Estudió las características de las DNA polimerasas presentes a tiempos tempranos y tardíos de la germinación intentando encontrar diferencias entre ambas con base en su comportamiento cromatográfico e inhibidores de su actividad. Sin embargo, el comportamiento de ambas enzimas frente a los inhibidores de su actividad fue de una enzima replicativa (DNA pol α).

Meléndez (1990) realizó un segundo intento en la identificación de dos tipos diferentes de DNA polimerasas de embriones de maíz que llevaran a cabo la síntesis replicativa y reparativa respectivamente, es decir, α -like y β -like. Esta vez se provocó una respuesta diferencial: la actividad reparativa se buscó en semillas irradiadas con rayos X y la replicativa a los tiempos de germinación en los cuales se sabe existe síntesis replicativa del DNA. Sin embargo, tampoco se observó un comportamiento diferencial entre las actividades temprana y tardía de polimerización del DNA en lo que respecta a su respuesta a inhibidores de su actividad.

Finalmente, Meléndez (1990) caracterizó parcialmente la única actividad de DNA polimerasa nuclear detectada -según su técnica- a tiempos tardíos de síntesis de DNA. El conjunto de características que mostró dicha enzima fueron las de una enzima tipo γ .

Actualmente se ha logrado un avance significativo en la purificación y caracterización de una DNA polimerasa de extracto total de ejes embrionarios de maíz de 24 horas de germinación. Su caracterización ha mostrado que es una enzima tipo α .

García (1991) purificó y caracterizó parcialmente el primer pico de actividad que detecta -según su técnica- en el perfil de elución de extracto total de ejes embrionarios de maíz de 24 h de germinación a través de una resina de DEAE-celulosa.

1.2.2 DNA POLIMERASAS ORGANELARES DE MAÍZ

En lo que respecta a la investigación de la síntesis de DNA organelar (mitocondrial y cloroplástico), el primer trabajo lo realizó Ortega (1988), quien detectó síntesis de DNA organelar desde tiempos tempranos de la germinación (3 h), la cual aumenta de manera directamente proporcional hasta las 15 h de germinación. A las 24 h de germinación se observó un decremento de la incorporación específica de timidina tritilada al DNA organelar, lo cual Ortega (1988) supone que es consecuencia de la segregación organelar que toma lugar durante la división celular.

1.2.3 DNA POLIMERASAS ORGANELARES VEGETALES Y ANIMALES

A) DNA POLIMERASAS MITOCONDRIALES

Las enzimas γ -animales (nucleares y mitocondriales) han definido un grupo específico de enzimas con base en su comportamiento frente a inhibidores y a templados artificiales y son:

- a) susceptibles a ddTTP y NEM
- b) resistentes a afidicolina y
- c) son capaces de utilizar polirA-oligodT en presencia de Mn^{2+}

Por su parte, el estudio de las DNA polimerasas mitocondriales en trigo y soya han demostrado que ambas enzimas presentan un comportamiento diferencial frente a inhibidores y templados artificiales:

- La DNA polimerasa de trigo es una enzima considerada γ -like (Christophe et al., 1981). Las características que no encajan dentro del grupo γ es su resistencia a NEM y su incapacidad para utilizar polirA-oligodT; pero se considera γ por ser susceptible a ddTTP y resistente a afidicolina.

- La enzima de soya puede considerarse de tipo γ -like (Heinhorst et al., 1990). Es γ por su susceptibilidad a NEM, su resistencia a afidicolina y su actividad sobre polirA-oligodT; sin embargo, es una enzima resistente a ddTTP.

B) DNA POLIMERASAS CLOROPLÁSTICAS

Desde un principio se ha trabajado la hipótesis que supone que las DNA polimerasas cloroplásticas vegetales deben mostrar un comportamiento de tipo γ con base en el hecho inicial de que existe una gran similitud entre los mecanismos generales de síntesis del DNA mitocondrial y cloroplástico.

La similitud esperada entre ambas DNA polimerasas organelares ha sido comprobada solamente en un caso. Ambas enzimas de soya (Heinhorst et al., 1990) muestran virtualmente la misma respuesta frente a los inhibidores, templados artificiales y catión divalente clásicos; por lo que la hipótesis inicial ha sido reforzada experimentalmente.

Además de que, en general, las DNA polimerasas cloroplásticas resisten afidicolina y son inhibidas por NEM; características que hacen se les considere de tipo γ . Sin embargo, en tres de los vegetales estudiados se ha observado una característica peculiar: son enzimas resistentes a ddTTP por lo que se consideran en general de tipo γ .

1.3. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

El problema de la presente investigación se define de la siguiente forma:

Cuál es el comportamiento de ambas DNA polimerasas plastídica y mitocondrial frente a tres diferentes inhibidores de su actividad (afidicolina, NEM y ddTTP) y cuál su capacidad para utilizar dos templados, artificial y natural, en presencia de dos distintos cationes divalentes (DNA activado y polirA-oligodT/Mg²⁺ y Mn²⁺)?

1.4. HIPOTESIS

Con base en los argumentos presentados anteriormente se plantean las dos siguientes hipótesis:

A) DNA POLIMERASA MITOCONDRIAL DE MAÍZ

Puesto que el consenso en torno a las DNA polimerasas mitocondriales de animales muestra que son susceptibles a ddTTP y NEM y capaces de utilizar polirA-oligodT en presencia de Mn²⁺ e incapaces de utilizar DNA activado con dicho catión, y por otra parte, ambas DNA polimerasas mitocondriales vegetales estudiadas hasta el momento (soya, [Heinhorst et al., 1990] y trigo, [Christophe et al., 1981]) son altamente resistentes a la afidicolina, se espera que la DNA polimerasa mitocondrial de maíz presente el mismo comportamiento que dichas enzimas.

Si la DNA polimerasa mitocondrial de maiz presenta finalmente las características mencionadas podrá ser clasificada como de tipo γ .

Si no presenta alguna(s) de las mismas, será denominada: *γ -like-susceptible*, o *resistente a tal o cual inhibidor y/o incapaz de utilizar tal o cual templado/catión*.

Si la enzima no presenta ninguna de las características de las enzimas tipo γ pero si las de cualquier otro grupo, será clasificada dentro del mismo o como *like* del grupo más relacionado.

B) DNA POLIMERASA CLOROPLÁSTICA DE MAÍZ

Dado que las cuatro DNA polimerasas cloroplásticas estudiadas hasta la fecha (espinaca [Sala et al., 1980]; soya, [Heinhorst et al., 1990]; jitomate, [Serra y Carrillo, 1990] y chicharo, [Mckown y Tewari, 1984]) presentan varias características en común tales como: resistencia a la afidicolina y a ddTTP así como susceptibilidad a NEM; además de que la mayoría son capaces de utilizar polirA-oligodT en presencia de Mn^{2+} , se espera que la DNA polimerasa cloroplástica presente las mismas características frente a dichos reactivos y templados.

Si la DNA polimerasa plastídica de maiz presenta las características anteriormente mencionadas, podrá ser clasificada como de tipo γ .

En dado caso de que no presente alguna(s) de las características mencionadas será denominada *γ -like-susceptible* o *resistente a tal inhibidor y/o incapaz de utilizar tal o cual templado/catión*.

En el caso de que la enzima no muestre ninguna de las características de las enzimas tipo γ pero si las de cualquier otro grupo, se clasificará dentro del grupo correspondiente o como *like* del grupo más relacionado.

1.5 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN DE UNA DE LAS LÍNEAS DE TRABAJO DEL GRUPO DEL DR. JORGE VÁZQUEZ

A) OBJETIVOS GENERALES A LARGO PLAZO

- Movilizar genes que aporten a la semilla de maíz la capacidad de resistir condiciones adversas de almacenamiento y de , posteriormente, experimentar una germinación normal dando lugar a mejoras en el rendimiento de los cultivares.

B) OBJETIVOS GENERALES A MEDIANO PLAZO

- Evaluar la importancia de las DNA polimerasas dentro del fenómeno de envejecimiento de semillas expuestas a condiciones adversas de almacenamiento y comparar el grado de actividad enzimática de dichas enzimas entre semillas de alto y bajo vigor.

C) OBJETIVOS GENERALES A CORTO PLAZO

- Establecer las condiciones óptimas de ensayo de actividad enzimática y de purificación cromatográfica para cada una de las distintas DNA polimerasas de maíz, provenientes de los distintos compartimentos celulares.
- Identificar el probable papel fisiológico de las mismas en el metabolismo general de los ácidos nucleicos durante la germinación temprana y tardía del maíz.

D) OBJETIVOS PARTICULARES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

- Caracterizar a las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial de maíz activas en las primeras horas de la germinación frente a inhibidores de su actividad y preferencia del par templado/catión divalente.

E) OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

- Establecer una técnica de aislamiento organelar que ofrezca fracciones proteicas ricas en actividad de DNA polimerasa plastidica y mitocondrial.
- Establecer una técnica de purificación organelar y de solubilización de la DNA polimerasa que permita realizar una caracterización parcial confiable.
- Establecer las condiciones experimentales para llevar a cabo un primer paso de purificación enzimática a través de una resina de intercambio iónico.

CAPITULO DOS

FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1 MAIZ E INVESTIGACION DE SEMILLAS

2.1.1 EL MAÍZ EN LA ÉPOCA PRERISPÁNICA

Al ser las plantas la base de la cadena alimenticia en nuestro planeta el desarrollo de la agricultura ha sido, desde su descubrimiento, una actividad básica en el sostenimiento de las poblaciones humanas.

La dependencia humana hacia la agricultura se ve reflejada de manera particular en los cultos religiosos que nuestros antepasados mesoamericanos ofrecían a los fenómenos naturales los cuales, de alguna manera, se ofrecían con la esperanza de garantizar la permanencia y fructificación de su actividad agrícola. Adoraban, entre muchos otros, a los dioses de la lluvia, del sol, de la tierra y del maíz (Cinteotl para los aztecas); todos deidades de elementos agrícolas (Mangelsdorf, 1974).

El maíz ha sido el cereal más importante de América desde la época prehispánica. La importancia del maíz radica en que, no sólo incursionó fuertemente en las actividades económicas de las culturas Mesoamericanas sino también, en la vida religiosa y cultural de estos pueblos (Fig. 2.1).

La dependencia económica de América para con el maíz se remonta hasta la época prehispánica; el maíz fue el único cereal importante desarrollado en nuestro continente. Hay suficiente evidencia que indica que México fue el centro primario de origen, domesticación y dispersión del maíz - que ocurrió hace más de 6000 años -, y que las migraciones humanas lo llevaron a Sudamérica en donde tuvo lugar el centro secundario hace más de 5000 años (Robles, 1976).

Los indígenas domesticaron e iniciaron la selección del maíz contribuyendo de manera relevante a la formación de variedades y razas; los agricultores las han conservado por siglos y los científicos las han estudiado y clasificado para su conservación, mantenimiento y mejoramiento. Los indígenas americanos produjeron y mejoraron selectivamente el maíz desde 3400 años a.C. hasta 1500 d.C. y fueron los primeros criadores de plantas que trabajaron con el mismo (Robles, 1976).

En México se consumen desde aquella época, alimentos derivados del maíz tales como tortillas, tamales y atole los cuales constituyen, actualmente, parte esencial en la dieta de una gran parte de la población mexicana. Algunas poblaciones indígenas mexicanas preparan hoy en día bebidas a base de la fermentación del maíz tales como el pozol y el tesgüino que fueron en el pasado de uso ceremonial (Carrasco, 1977).



Fig. 2.1. Una vasija para agua peruana representando una deidad del maíz con *hijos* -réplicas en miniatura de él mismo- que significa fertilidad. Las mazorcas de maíz parecen representar a la raza Cuzco (Mangelsdorf, 1974).

Actualmente el maíz se cultiva en casi todas las partes del mundo como resultado de esfuerzos realizados por los genetistas para ampliar su adaptación. Hoy en día constituye un cultivo alimenticio de gran importancia extendido por todo el mundo (Robles, 1976).

2.1.2 EPOCA ACTUAL

Hoy en día el papel relevante de la agricultura en la vida económica de un país reside en las funciones que a ésta se le han asignado. "Además de cubrir las necesidades alimentarias de una población creciente, debe, entre otras cosas, producir materias primas con fines industriales y proporcionar recursos para el desenvolvimiento de 'otros sectores de la economía" (Montañez y Aburto, 1979).

Arias (1990) apunta que, durante el presente siglo el desarrollo de la agricultura a nivel mundial no ha sido uniforme en los diferentes países; la agricultura de los países subdesarrollados no ha cubierto cabalmente con sus funciones. En contraste con los países desarrollados que han logrado un estado de autosuficiencia alimentaria, las economías subdesarrolladas han ido perdiendo autosuficiencia. "Lo anterior se refleja en el volumen creciente de importación de alimentos y maquinaria de desarrollo agrícola. Los países subdesarrollados se convierten en países cada vez más dependientes por la gran tecnología desarrollada por los países denominados del Primer Mundo. Esta situación ha llevado a los primeros a una sumisión económica cada vez más grave" (Arias, 1990).

Nuestro país es un ejemplo de los anteriores. México ha tenido que importar granos básicos a lo largo de 20 años pues la producción nacional se ha mantenido muy lejana a los requerimientos internos. En el caso particular del maíz tan solo durante los dos últimos años (1990-1991) la producción nacional ha sido autosuficiente (3er. Informe Presidencial de Carlos Salinas de Gortari).

La baja productividad del maíz en el campo mexicano es resultado, entre otras causas, de las políticas seguidas. La producción de este cereal se ha concentrado a tierras de temporal cuyo rendimiento es inferior a los registrados en áreas de riego (Montañez y Aburto, 1979).

De esta situación es evidente que los científicos de los países en vías de desarrollo tienen la gran tarea de producir conocimientos encaminados con visión clara hacia la aplicación de los mismos. Esto nos capacitará como país para enfrentar la revolución científica y tecnológica importada del extranjero (Arias, 1990).

Sin embargo, estamos conscientes de que el solo desarrollo de la investigación científico-tecnológica así como la aplicación de técnicas biotecnológicas no serán la salvación de la agricultura ni del problema alimentario; si bien, el impulso a las actividades científicas tendrá que venir de las políticas gubernamentales que den apoyo a estas actividades y permitan abrir camino al desarrollo (Arias, 1990).

En el plano del incremento de la productividad agrícola se ha venido dando un movimiento científico denominado "biotecnología agrícola". En dicho campo los científicos de nuestras sociedades tienen mucho trabajo por hacer. "Contamos con un banco genético natural tan inmenso como diversificado además de ecosistema para producir grandes volúmenes de biomasa. A esto se debe añadir la capacidad científico-técnica de los mexicanos. Nuestra capacidad debe orientarse hacia el desarrollo de las técnicas necesarias para conocer el material genético de nuestros bienes y mejorarlo, para tener la capacidad de manipularlo y transformarlo en el largo plazo" (Arias, 1990).

2.1.3 INVESTIGACION AGRÍCOLA

Las investigaciones en biotecnología agrícola se encaminan principalmente al estudio de los mecanismos bioquímicos que ofrecen mayor potencial para el desarrollo de cultivos más productivos. Algunos de los campos más destacados se mencionan a continuación: (Molina *et al.*, 1990).

a) Mejoramiento nutritivo de la planta: fijación de nitrógeno, fotosíntesis, fotorespiración, síntesis de proteínas y carbohidratos.

b) Mejoramiento de la capacidad genética de las plantas frente a plagas, enfermedades, plaguicidas y herbicidas.

c) Resistencia de las plantas frente a condiciones adversas del medio ambiente: salinidad, sequía, exceso de humedad, heladas; en el caso de semillas, resistencia a condiciones no óptimas de almacenamiento.

A la fecha los fitomejoradores han utilizado únicamente características botánicas (marcadores visuales) de la planta y/o semilla tales como la altura de la planta y características morfológicas de la espiga y/o semilla para describir variedades. Estas características son altamente influenciadas por las condiciones ambientales y muchas veces son subjetivas. Así pues, se han venido generando técnicas bioquímicas de identificación de proteínas y ácidos nucleicos para la identificación de diversas propiedades de especies de cereales.

En los últimos años la investigación de semillas está dando un giro muy importante hacia la investigación de la dilucidación de mecanismos que toman parte durante la germinación de semillas hacia aspectos moleculares y el uso de la técnicas de biotecnología como es la clonación de genes importantes para el desarrollo de cultivares más productivos.

En el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, se desarrollan importantes investigaciones en torno de algunos de los mecanismos bioquímicos más sobresalientes que toman parte durante la germinación del maíz y en especial la actividad de enzimas que actúan en diferentes etapas del desarrollo de la plántula, a saber: la actividad de las ATPasas, la fosforilación de proteínas ribosomales, el metabolismo general de los ácidos nucleicos y otros.

A su vez, se realiza investigación en la planta de maíz estudiando la actividad de las enzimas relacionadas con la fotosíntesis como son: la Rubisco y la Fosfoenolpiruvato descarboxilasa. También existen estudios relacionados con la respuesta bioquímica al estrés hídrico y ambiental, biología molecular, resistencia a herbicidas y otros.

Las investigaciones realizadas en el grupo del Dr. Jorge Vázquez en torno al metabolismo del DNA durante la germinación del maíz es importante porque no sólo se estudia desde el punto de vista básico sino que también desde el punto de vista aplicativo ya que que se relaciona el metabolismo del DNA con el deterioro de semillas.

El grupo de investigación mencionado está interesado en la purificación de las distintas DNA polimerasas del maíz y conocer su localización celular así como la expresión de las mismas durante las diferentes etapas de la germinación y la función que cada una de las enzimas realiza en particular.

Se desea conocer el metabolismo del DNA durante la germinación y a mediano plazo lograr encontrar las diferencias entre una semilla resistente a las condiciones adversas de almacenamiento contra una semilla sensible y poder tomar como punto de referencia a las DNA polimerasas participantes. "Estas investigaciones serán capaces de proporcionar, a largo plazo, los conocimientos necesarios para poder transferir material genético de una semilla a otra con el objetivo de proporcionar a la segunda ciertas capacidades que la ayudarán a llevar a cabo una germinación más exitosa" (palabras del Dr. Jorge Vázquez).

2.2 EL MAÍZ. GENERALIDADES

2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MAÍZ

El maíz es un vegetal herbáceo cuya clasificación taxonómica se muestra a continuación: (Robles, 1976)

Reino.....vegetal
División.....traqueofita
Subdivisión....pteropsida
Clase.....angiosperma
Subclase.....monocotiledónea
Grupo.....glumiflora
Orden.....graminales
Familia.....gramíneas
Tribu.....maydeae
Género.....Zea
Especie.....mays

2.2.2. USOS DEL MAÍZ

El maíz tiene amplio aprovechamiento en el consumo humano y animal así como en la industria. La superficie dedicada al cultivo del maíz en México es ocho veces mayor que la que se destina al cultivo de trigo y hay cuarenta veces más productores de maíz que de trigo (Robles, 1976).

Es una planta muy útil pues de ella se aprovechan casi todas sus partes: tallos y hojas secos (rastrajo) como alimento del ganado; las hojas y brácteas secas para envolver tabaco y hacer cigarros así como envoltura de tamales. Las mazorcas tiernas (elotes), ya tostadas o cocidas, son apreciadas en la alimentación; los granos secos son utilizados para hacer tortillas, atoles, tamales, pinole, bebidas alcohólicas diversas y otros productos; las mazorcas desgranadas (olotes) se utilizan como combustible y los "cabellitos de elote" como diuréticos. La Fig. 2.2 muestra los diversos órganos de la planta de maíz (Robles, 1976).

El endospermo es rico en almidón y pobre en proteínas; el embrión contiene una proporción regular de grasas, más que otros cereales. Se utiliza en gran proporción para engorde de ganado pero por la

baja proporción de proteína debe suplementarse con productos ricos en ellas. Su harina, debido a la escasez de proteínas, tiene una panificación diferente a la del trigo, por ello los prehispánicos resolvieron este problema inventando la tortilla (Robles, 1976).

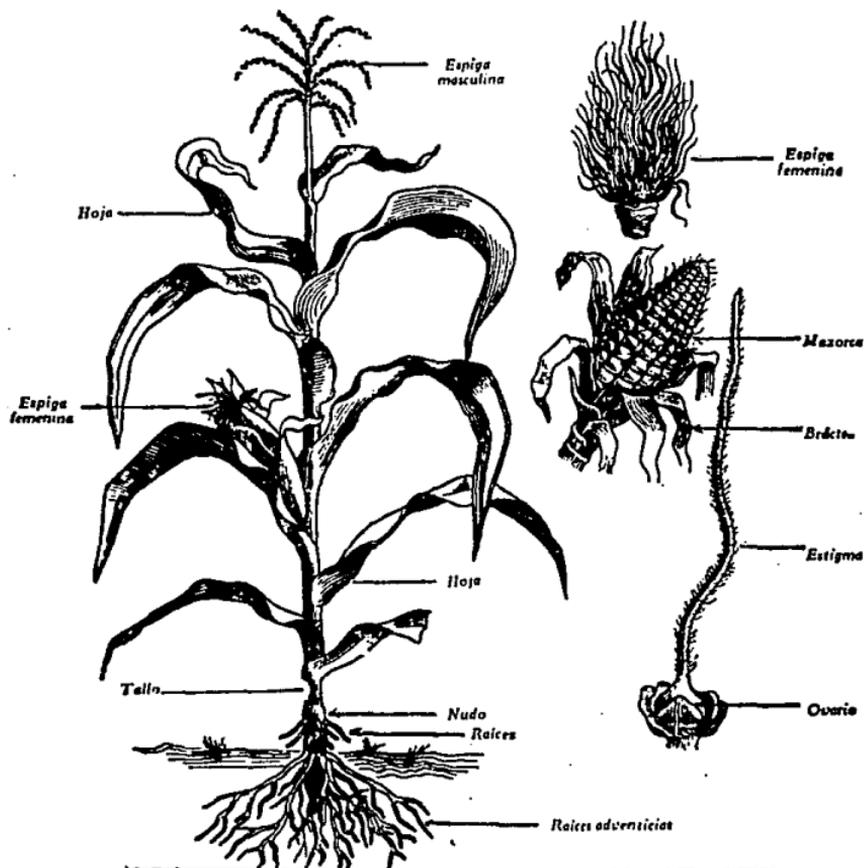


Fig. 2.2. Planta de maíz y sus diversos órganos. (Ruiz-Oronoz, et al., 1966).

2.2.3. ORIGEN, RAZAS Y ADAPTABILIDAD DEL MAIZ

2.2.3.1 ORIGEN CITOGENETICO

La palabra maiz proviene de una lengua del Caribe. Los españoles tomaron el vocablo de un dialecto de la isla de Haití cuyos aborígenes le llamaban "mahiz" (Robles, 1976).

Al principio de la conquista los españoles le llamaban "Panizo". Hasta mediados de 1700 se le dieron muchas denominaciones en Europa, por ejemplo: *Panicum*, *Triticum frumentum*, *Milium indicum*, entre otras. Hasta 1735, cuando Carlos Linneo lo describió y clasificó, fue conocida con el nombre de *Zea mays* L (Robles, 1976).

Con respecto a su origen citogenético los ancestros silvestres del maiz no se han encontrado pero su evolución se ha conocido a través de estudios arqueológicos y paleobotánicos. Se esgrimen diversas teorías que tratan de explicar el origen de esta especie vegetal. Al teocintle, vegetal nativo de la región del sur de México y en colindancia con Guatemala, se le considera como el pariente más cercano del maiz (Figura 2.3).

Según Mangelsdorf (1974), para que el maiz haya alcanzado la distribución geográfica que tiene actualmente y el grado de variación genética que observa desde su nivel silvestre (Teocintle) hasta su nivel cultivado, tuvieron que haber intervenido la migración, la mutación, la recombinación génica y la selección principalmente.

El teocintle al ser domesticado perdió sus defensas naturales, por lo que el maiz cultivado no puede subsistir sin el cuidado del hombre.

Estudios realizados en fósiles y demás objetos de interés arqueológicos informan que el maiz empezó a domesticarse aproximadamente hace 5-6 mil años en el territorio de lo que hoy es el valle de Tehuacán, Puebla y en el norte del estado de Oaxaca.

Con la información disponible, el maiz primitivo debe haber tenido las siguientes características distintivas: mazorcas pequeñas de 2 a 6 cm de longitud y de cuatro a ocho hileras de granos; en parte o totalmente cubierta por brácteas. Granos pequeños, palomeros, tunicados y de colores oscuros.

Muchas variedades evolucionaron hacia un mayor tamaño de semilla y/o mazorca. A la fecha, en el germoplasma reunido en los bancos genéticos, se dispone de una gran variabilidad desde granos muy

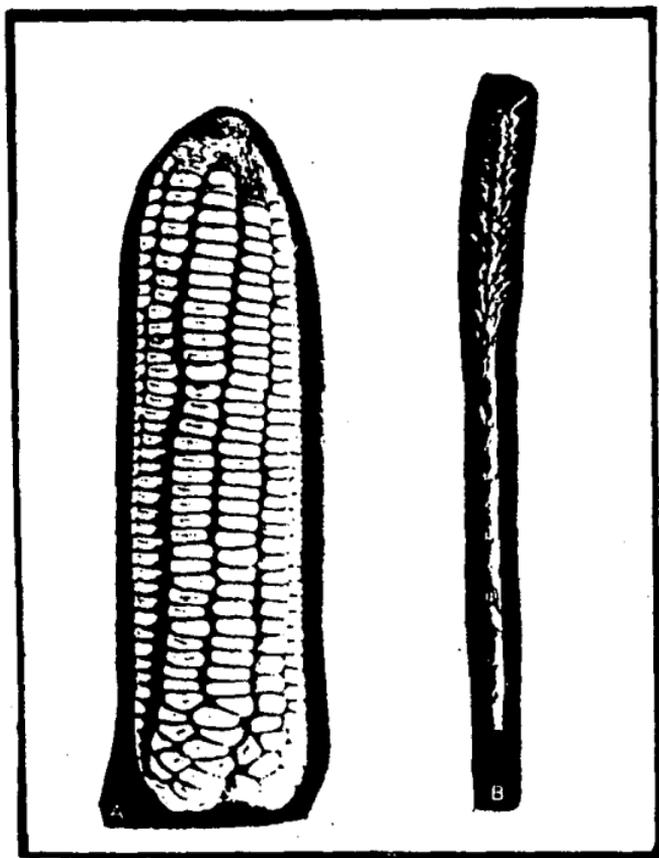
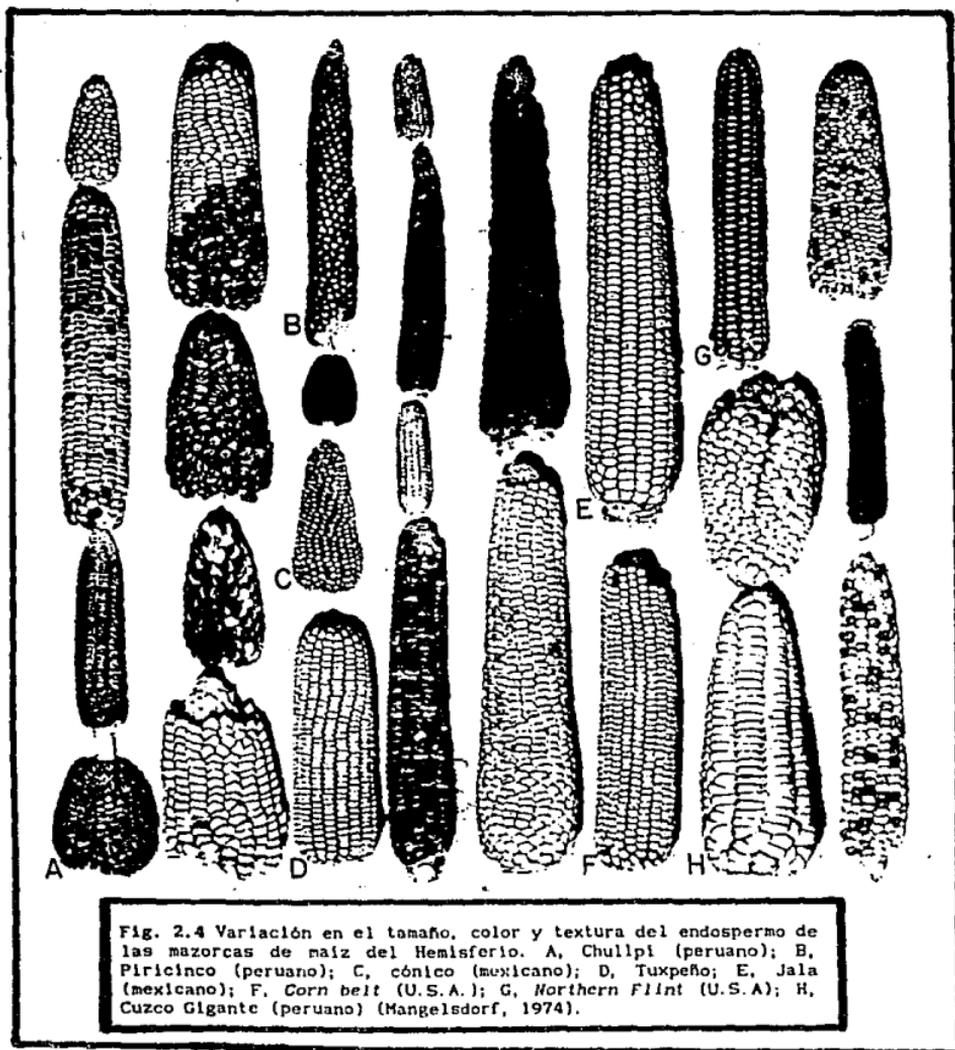


Fig. 2.3. (A) Mazorcas de maiz y (B) espigas pistiladas de Tribesacum. Adaptado de Mangelsdorf (1974).

pequeños (de menos de 5 mm), hasta granos muy grandes como la variedad "Cuzco gigante" del Perú, alrededor de 2.5 cm de longitud. Así, se podrán observar variedades que difieren entre sí en varios aspectos: tamaño de la mazorca, altura de la planta, número de mazorcas por plantas, color de grano; variedades adaptadas a baja temperatura o a regiones cálidas (Fig. 2.4) (Mangelsdorf, 1974).

En general, con una diversidad genética, que se adapta a muy variadas condiciones ecológicas. Todo lo anterior permite realizar su cultivo en muchas regiones agrícolas, lo que explica su gran importancia no sólo nacional sino mundial.

El maíz utilizado en la presente investigación pertenece al grupo de Razas modernas incipientes las cuales fueron desarrolladas después de la conquista y actualmente no han alcanzado uniformidad racial. Se han reconocido 4 razas: chalqueño, celaya, cónico norteño y bolita (Robles, 1976).



2.3 SEMILLA DE MAIZ Y GERMINACION

2.3.1. ANATOMÍA DE LA SEMILLA

La semilla es el óvulo fecundado, transformado y maduro de las plantas fanerógamas. Además, la semilla es la forma mediante la cual un nuevo individuo se dispersa teniendo a su cargo la función reproductora para perpetuar la especie (Fig. 2.5) (Robles, 1976).

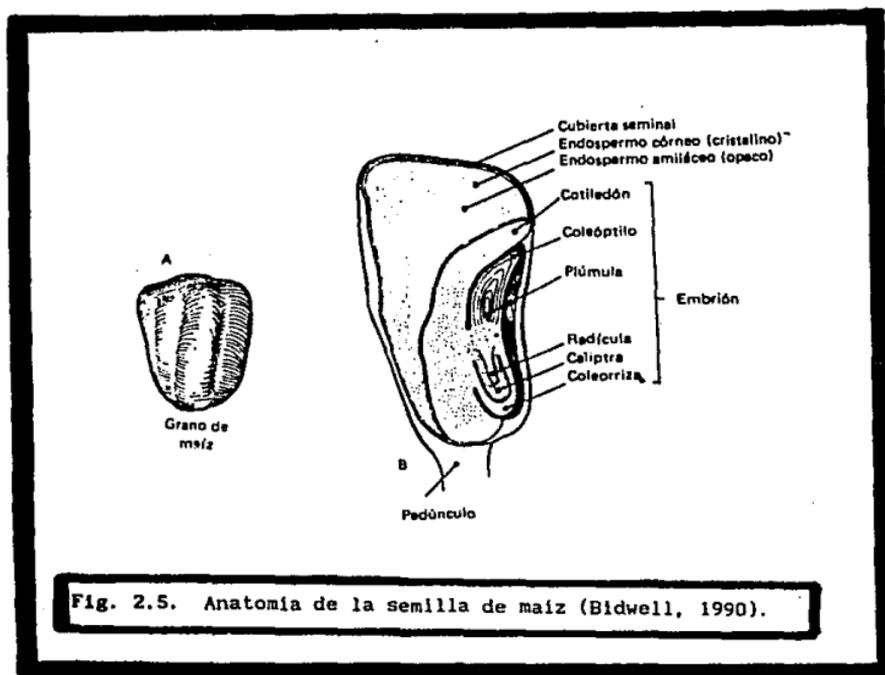


Fig. 2.5. Anatomía de la semilla de maíz (Bidwell, 1990).

La semilla de maíz está constituida por las siguientes estructuras: 1) testa, 2) capa de células de aleurona, 3) endospermo, 4) capa de células epiteliales, 5) escutelo, 6) coleóptilo, 7) plúmula, 8) nudo cotiledonar, 9) radícula y 10) coleorriza (Robles, 1976).

1. La testa es la pared del ovario desarrollado y maduro. En el maíz este tejido se presenta como una delgada película y por lo mismo, no se puede diferenciar en pericarpio, mesocarpio y endocarpio, constituyendo así una sola estructura. La testa está formada por dos capas: la más externa proviene de la primina y la interna - denominada tegmen -de la secundina; frecuentemente no es posible diferenciar ambas capas entre sí.

Existe una considerable variación en la anatomía de la testa la cual ha sido utilizada para distinguir taxonómicamente entre diferentes géneros y especies.

La testa es una parte de considerable importancia para la semilla ya que es la barrera protectora entre el embrión y el medio externo. La testa está impregnada de ceras y grasas así como de células mucilaginosas que revientan en contacto con el agua, proveyendo de una barrera que retiene el agua alrededor de las semillas.

En la testa 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 semillas.

2. La aleurona es una sustancia proteica en forma de pequeños granos que se encuentran en la capa externa del endospermo. Actúa como sustancia de reserva y se consume durante la germinación.

3. El endospermo es un tejido nutritivo que se produce en el saco embrionario y que persiste en la semilla madura como almacén de reservas las cuales se utilizan en el desarrollo del embrión y de la pequeña plántula durante la germinación.

4. El epitelio es un tejido que cubre la superficie externa del embrión formando una delgada capa protectora.

5. El escutelo en los frutos de las monocotiledóneas -como en el maíz- es una estructura discoidea gruesa que se localiza entre el embrión y el endospermo y que representa el cotiledón único el cual actúa como órgano de succión en favor de la nutrición del embrión durante la germinación.

6. El coleóptilo es una cubierta que rodea a la yema plumular y forma a la primera hoja por encima del cotiledón en las gramíneas y rodea el extremo del talluelo y a las hojas incipientes. Sirve como protección de la plúmula durante la germinación.
7. La plúmula es la yema del embrión en una semilla que dará origen a la parte aérea de la planta.
8. El nudo cotiledonar se conoce también como corona y se encuentra entre la plúmula y la radícula.
9. La radícula es el extremo del hipocotilo del cual se desarrolla la raíz primaria.
10. La coleoriza es una funda que rodea la raíz del embrión en las gramíneas.

2.3.1.1 EL EMBRIÓN

El embrión está constituido por el eje embrionario y uno o más cotiledones. El eje está formado por la raíz embrionaria (radícula), el hipocotilo (al cual los cotiledones están unidos) y el ápice de la raíz con la primera hoja verdadera (la plúmula) (Robles, 1976).

En una semilla monocotiledónea es difícil identificar cada una de estas partes. El cotiledón es muy reducido y se modifica en forma de escutelo; la cubierta basal del cotiledón es elongada y forma el coleóptilo cubriendo las primeras hojas y en algunas especies, como el maíz, el hipocotilo es modificado a formar mesocotilo. La coleoriza está guardada en la base de la cubierta del hipocotilo, la radícula.

2.3.2 GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Desde el momento en que termina la formación del embrión las células suspenden su división y atenúan considerablemente sus funciones de respiración y nutrición iniciando el periodo de vida latente que dura hasta que comienza la germinación (Bidwell, 1990).

Posteriormente, cuando una semilla de maíz se coloca bajo condiciones favorables de humedad y temperatura la actividad del crecimiento y desarrollo se reanuda en el embrión.

Desde el punto de vista botánico se dice que una semilla ha GERMINADO cuando la raíz se alarga y rompe la testa. A continuación, la plúmula y su vaina que la envuelve, el coleóptilo, empiezan a alargarse y también se abren paso a través de la testa.

Al principio el coleóptilo crece más rápidamente que la plúmula, pero cuando llega a la superficie del suelo y queda expuesta a la luz deja de crecer y la plúmula emerge a través de un ápice (Fig. 2.6) (Bidwell, 1990).

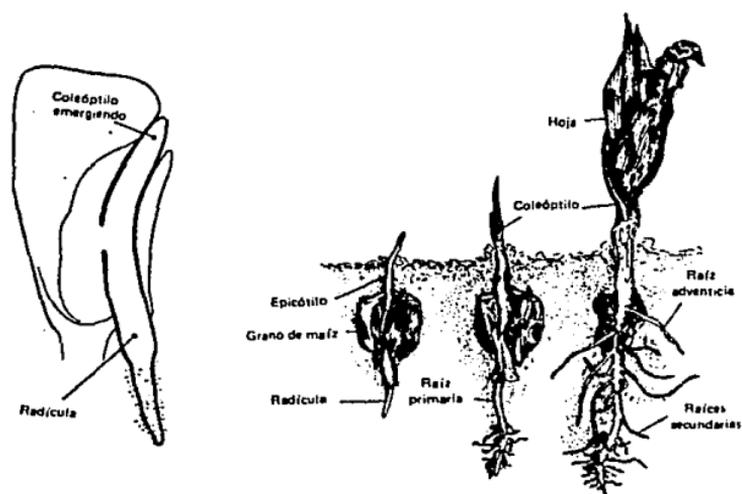


Fig. 2.6. Germinación de una semilla de maíz (Bidwell, 1990)

Cuando los estudios en semillas se refieren en este sentido con respecto a la germinación es porque el interés es el monitoreo del establecimiento de una planta vigorosa de valor agronómico.

Sin embargo, la germinación definida desde el punto de vista bioquímico se considera como el conjunto de eventos metabólicos que provocan en la semilla deshidratada la activación de un estado metabólico latente, apenas detectable, a un metabolismo vigoroso en el periodo de tiempo que comprende, desde la entrada de agua, hasta el inicio de la primera división celular (obsérvese que no se mencionó elongación celular la cual puede ocurrir sin ninguna división celular previa).

2.3.2.1 FISILOGIA DE LA GERMINACIÓN

Desde el punto de vista agronómico, la germinación comienza cuando, en la semilla aletargada o en reposo, se activa la maquinaria bioquímica conservada y se desencadenan los procesos metabólicos. El fin de la germinación coincide con la iniciación de la actividad fotosintética, lo que altera totalmente el metabolismo de la plántula nacida de la semilla.

Numerosos especialistas en fisiología vegetal fijan el momento de la germinación cuando la radícula rompe la testa. Los analistas de semillas toman como término germinación el momento, bastante impreciso, en que las plántulas surgidas de las semillas están completas y se puede apreciar la integridad de sus estructuras.

Se fijan dos fases en la germinación: la de iniciación, que termina con la salida de la radícula y la de movilización de reservas que termina con la nascencia o establecimiento de la plántula (Bewley y Black, 1986).

Sin embargo, desde el punto de vista bioquímico los eventos germinativos se dividen en:

i) **TEMPRANOS:** hidratación, producción de ATP, iniciación de la síntesis de RNA, síntesis de proteínas y reparación del DNA.

ii) **TARDÍOS:** expansión celular, replicación de DNA y movilización de reservas (Bewley y Black, 1986).

A) ABSORCIÓN DE AGUA

Para la activación del metabolismo y la subsiguiente germinación la hidratación es una condición indispensable en las semillas secas. La absorción de agua suele efectuarse en tres fases; una fase inicial de rápida absorción, una fase intermedia en la cual

el contenido de agua de la semilla permanece casi constante y una fase final de intensa absorción que está relacionada con el alargamiento de las células y la aparición de la radícula (Bewley y Black, 1986).

B) IMBIBICIÓN

Constituye un fenómeno físico que tiene también lugar en las semillas muertas o aletargadas y va acompañado por desprendimiento de calor. Esta es la primera fase. Está relacionada con la diferencia de potencial hídrico existente entre la semilla y el sustrato húmedo en el que éstas se encuentran.

Las proteínas constituyen el principal componente de las semillas que contienen coloides que absorben agua; también lo hacen los mucilagos y las sustancias pécticas; por el contrario, el almidón no interviene en este proceso porque sólo absorbe agua en condiciones ácidas y con altas temperaturas (Bewley y Black, 1986).

C) RESPIRACIÓN

Quando las semillas se humedecen se produce un rápido desprendimiento de los gases absorbidos por los coloides existentes en el grano.

A continuación comienza la respiración que, en chícharos, se detecta ya a los 15 minutos de haber comenzado la imbibición.

La respiración de las semillas secas es muy baja y apenas detectable. En maíz se han medido producciones de 0.7 mg de dióxido de carbono por cada 100 g de peso seco en 24 horas para una humedad del grano de 11 % ; esta cifra sube hasta los 60 mg cuando la humedad del grano alcanza 18 %.

Según Bewley y Black (1986) la respiración se desarrolla en tres fases en numerosas semillas, especialmente en las leguminosas.

En la primera fase existe una rápida absorción de oxígeno que, en el chícharo, dura unas diez horas desde el comienzo de la imbibición. A continuación, sobreviene una fase de meseta en la cual la cantidad de oxígeno absorbido no aumenta; sin embargo, sigue produciéndose dióxido de carbono como consecuencia de un fenómeno de respiración anaerobia o fermentación.

Una vez que la radícula ha abierto la testa, el aumento de la disponibilidad de oxígeno conduce, a su vez, a un aumento de la disponibilidad de respiración y de la actividad metabólica en general. Uno de los fenómenos observables es la movilización de

las reservas que suministran abundante sustrato para los subsiguientes procesos respiratorios, mucho más eficaces energéticamente que los anteriores.

D) SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

La síntesis de ácidos nucleicos y proteínas se inicia después de la imbibición de la semilla.

En embriones de centeno se ha detectado RNA nuclear a los 10 min de la imbibición. El tiempo de iniciación de la síntesis de proteínas en centeno es en 10-15 min después de la imbibición (Roberts *et al.*, 1973; Sen y Osborne, 1977) tiempo al cual se detecta RNA en el citoplasma.

Se ha reportado la existencia de RNAm en embriones de semillas quiescentes de cereales y se ha postulado que se requiere RNAm para la rápida actividad metabólica en la semilla durante la germinación.

La síntesis de proteínas comienza minutos después de iniciada la imbibición, cuando las células están completamente hidratadas, lo cual permite que los ribosomas se asocien al RNAm.

Se han encontrado dos tipos de RNAm en embriones de semillas:

1) Residuales: producidos durante el desarrollo de la semilla y que no se destruyeron durante la maduración tardía y la desecación y que pueden ser degradados después de iniciada la hidratación (Brooker *et al.*, 1977).

2) RNAm almacenado, el cual es sintetizado durante el desarrollo de la semilla por lo que éstos están disponibles inmediatamente después de iniciada la hidratación y pueden ser traducidos a proteínas por ser parte integral de la germinación (Brooker *et al.*, 1977).

Los precursores ribonucleósidos trifosfatos ATP, GTP, CTP y UTP están presentes en cantidades pequeñas en embriones secos de trigo y aumentan rápidamente durante las etapas tempranas de la germinación (Bewley y Black, 1986).

En embriones secos de trigo existe la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas y ésta se inicia dentro de los primeros minutos de la imbibición.

Se ha demostrado que la síntesis de proteínas en esta etapa de la germinación está guiada por RNAm previamente sintetizado (RNAm almacenado) y que la síntesis temprana de proteínas no requiere de la transcripción temprana, funcionando principalmente con RNAm almacenado. Sin embargo, entre estos RNAm se encuentran aquellos que codifican para proteínas de reserva de la semilla lo que apoyaría la afirmación de que ese RNAm no es importante en los primeros eventos de la germinación.

E) SÍNTESIS DE DNA

La existencia de daños en la cromatina es muy conocida desde principios de siglo ya que se observaba un aumento en el número de aberraciones cromosómicas en plántulas procedentes de semillas viejas que frecuentemente daban lugar a una elevada proporción de plantas anormales. Se ha demostrado la existencia de estos daños del DNA mediante técnicas citológicas y bioquímicas.

Se ha reportado que la síntesis de DNA a tiempos tempranos de la germinación de maíz es de tipo reparativa (Zarain *et al.*, 1987) y en embriones de semillas se han descrito sistemas de reparación que actúan una vez que los tejidos se hidratan (Veleminsky y Gichner, 1978). Tiempo después se dispara la síntesis replicativa en maíz alrededor de las 15 h de la germinación (Baiza *et al.*, 1989) por lo que la síntesis reparativa es un fenómeno normal de la germinación temprana. No obstante, el inicio de la síntesis replicativa del DNA es variable entre especies vegetales y se ha observado desde las 4 h hasta las 12 h después del inicio de la imbibición (Chen y Osborne, 1970; Buchowicz *et al.*, 1978; Baiza *et al.*, 1989).

2.4. PRINCIPALES PROPIEDADES DE LAS DNA POLIMERASAS ANIMALES Y VEGETALES

Las células animales tienen, al menos, cinco distintas DNA polimerasas DNA-dependientes. Estas enzimas han sido denominadas con letras griegas de acuerdo al orden en que fueron descubiertas: α , β , γ , δ y ϵ . Todas están confinadas al núcleo, siendo la γ , la única que también se encuentra en mitocondrias. Es de hacer notar que en la fracción citoplásmica también se detecta actividad DNA polimerizante.

En el caso de las DNA polimerasas vegetales, se han descrito DNA polimerasas tipos α , β y γ . Las tres enzimas se encuentran en el núcleo, sin embargo la γ es también una enzima mitocondrial y cloroplástica. El citoplasma también presenta actividad polimerizante.

La distinción de las DNA polimerasas se ha llevado a cabo con base en sus diferentes propiedades: comportamiento cromatográfico, respuesta a inhibidores y actividad con diferentes templados.

Una limitación importante en el estudio de las distintas DNA polimerasas es la elección de las condiciones adecuadas de ensayo para cada una de ellas. Un ensayo enzimático de esta naturaleza incluye de manera importante la elección del templado: puede ser DNA nativo, DNA desnaturalizado, DNA con muescas, DNA cortado o una gran variedad de pares de homopolímero-primer que difieran en tamaño, pentosa y base.

Además, los componentes del extracto crudo tales como el DNA y RNA mensajeros, polianiones, sales y otros influyen sobre el templado-primer y las enzimas por lo que la caracterización de las enzimas en extractos crudos deben considerarse con gran cuidado.

El templado de uso más extendido es el DNA activado desarrollado por Kornberg en uno de los primeros trabajos con las DNA polimerasas de *E. coli* (Aposhian y Kornberg, 1962).

Posteriormente, el desarrollo de homopolímeros sintéticos como templados ofreció una gran ayuda a la investigación de nuevas DNA polimerasas: inicialmente y de forma importante hacia el conocimiento de las DNA polimerasas virales.

Un ejemplo notable lo constituye el descubrimiento de un tipo especial de DNA polimerasas-RNA dependientes a las cuales se les denominó transcriptasas reversas; dichas enzimas son capaces de

sintetizar DNA a partir de un templado de RNA. Actúan sobre templados sintéticos tales como polyx-oligoz (en donde x y z representan cualquier par de rNTP-dNTP capaces de aparearse en las cadenas de RNA-DNA según las reglas de Watson y Crick: G-C y U-A). La utilización *in vitro* de estos templados simula las condiciones en las cuales la enzima actúa *in vivo*.

Se ha observado que los diferentes grupos de DNA polimerasas presentan claras preferencias por algún templado en particular, lo cual ha sido una herramienta importante en su clasificación por lo que, al igual que la utilización de inhibidores, la utilización de templado por las enzimas es una característica importante de las mismas.

Asimismo, la capacidad de las DNA polimerasas para reconocer cierto tipo de secuencias y estructuras del templado-primer utilizado da la pauta para establecer algunas consideraciones acerca del probable papel funcional de la enzima dentro de la célula.

Existen una gran diversidad de templados naturales y artificiales que han sido diseñados con el objeto de establecer las mejores condiciones de ensayo para cada una de las DNA polimerasas estudiadas de las muy diversas fuentes: virus, bacterias, levaduras, animales, plantas superiores etc.

Aunado a lo anterior, es claro hoy en día que la naturaleza del catión divalente ejerce una gran influencia sobre la actividad DNA-polimerizante con cualquier templado.

La Tabla 2.1 presenta un resumen de las propiedades más importantes de cada uno de los cinco grupos descritos de DNA polimerasas de células eucarióticas.

2.4.1. DNA POLIMERASA ALFA DE ANIMALES

2.4.1.1 ESTRUCTURA Y ACTIVIDADES CATALÍTICAS

A) Estructura

Pol α está compuesta por cuatro subunidades: (Kornberg y Baker, 1992).

- Una subunidad grande de PM 165-180 KDa
- Tres subunidades de PM de 50, 60 y 70 cada una.

Tabla 2.1. Propiedades de las DNA polimerasas de células eucarióticas^a

	α	δ	ϵ	β	γ
Designación previa para mamíferos	α	δ, δ_1	$\delta, \delta_2, \delta_{11}, \delta^*$	β	γ
Designación en levaduras	pol I	pol III	polII		mitoc. ^b
Gene en levaduras	POL 1	POL3	POL2		MIP1
Peso molecular (KDa)					
Nativo	250	170	256	36-38	160-300
Centro catalítico	165-180	125	215	36-38	125
Otras subunidades	70, 60 ⁵⁰	48	55	ninguna	35-47
Localización	núcleo	núcleo	núcleo	núcleo	mitoc. ^b
Funciones asociadas					
Exonucleasa 3'-5' Primasa	no ^c	sí	sí	no	sí
	sí	no	no	no	no
Propiedades					
Respuesta a factores auxiliares de α	sí	no	no	no	no
Respuesta a PCNA	no	sí	no	no	no
Templado preferido	DNA activado	poli(dA-oligodT)	poli(dA-oligodT)	DNA activado	poli(rA-oligodT)
Catión divalente	Mg	Mg	Mg ⁺	Mg/Mn	Mn/Mg
Procesividad	Baja	Alta (d)	Alta	Baja	Alta
Fidelidad	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta
Inhibidores					
NaCl (0.15 M)	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	Resiste	Resiste
Afidicolina	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	Resiste	Resiste
N-etilmaleimida: NEM	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	Resiste	Inhíbe
Butilfenil dGTP	1 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	Resiste
Didemoxi-NTPs	Resiste	+/-Res.	+/-Res.	Inhíbe	Inhíbe
Replicación	sí	sí	sí	No	sí
Reparación	No			sí	No

a) Adaptado de Kornberg y Baker, 1992

b) mitoc. = mitocondria

c) Actividad críptica en *Drosophila*

d) En presencia de PCNA

e) +/- = medianamente resistente *

NOTA: Los datos no indicados se desconocen a la fecha.

La actividad de DNA pol α está asociada con la subunidad de 180 kDa. La DNA polimerasa α es la única enzima de mamíferos que es capaz de iniciar la síntesis de DNA *de novo* en ausencia de un extremo 3'-OH de un primer. Esta actividad reside en un heterodímero de 60 y 50-kDa (Kaguni et al., 1983; Suzuki et al., 1985; Plevani et al., 1985).

B) Papel funcional de la DNA polimerasa alfa

Muchas líneas de evidencia soportan un papel directo de pol α en la replicación del DNA cromosómico:

1) El nivel de pol α es más alto en los tejidos en rápida división celular y en linfocitos que han sido estimulados con mitógenos (Bertazzoni et al., 1976) siendo detectada en bajos niveles en células quiescentes (Craig et al., 1975).

2) Anticuerpos monoclonales dirigidos contra pol α inhiben la replicación del DNA celular en núcleos permeables o cuando se inyectan directamente al cultivo de células de mamíferos (Miller et al., 1985).

3) Extractos de células HeLa depletadas de pol α por inmunoprecipitación no realizan la replicación *in vitro* del DNA de SV40. La replicación se restaura por la adición de la pol α apropiada (Murakami et al., 1986).

Todas estas evidencias experimentales muestran que pol α se requiere en la replicación del DNA cromosómico.

Por su mediana procesividad se cree que toma parte en la síntesis de la cadena *lagging* o discontinua en la horquilla de replicación.

C) Actividad exonucleasa asociada

Solamente la pol α de *Drosophila melanogaster* ha presentado una actividad exonucleasa 3'-5' autocorrectiva que al parecer es exclusiva de este insecto porque no se ha encontrado en pol α humana ni otras (Wernette y Kaguni, 1986).

D) Respuesta a inhibidores

Es sensible a NEM (lo que implica grupos sulfhidrilo esenciales), a afidicolina y arabinosil-NTPs pero es resistente a ddNTPs. También se inhibe con bajas concentraciones salinas.

2.4.2. DNA POLIMERASA ALFA DE PLANTAS

Es una enzima de alto peso molecular y es la mayormente estudiada en vegetales. Las mejor caracterizadas son las enzimas de espinaca (Misumi y Weissbach, 1982), trigo (Castroviejo *et al.*, 1979), perivínica (Gardner y Kado, 1976), arroz (Amileni *et al.*, 1979) y maíz (Vázquez, 1986; Coello, 1989).

Se han descrito propiedades de las DNA pol α de coliflor (Fukasawa *et al.*, 1980), chícharo (Stevens y Bryant, 1978), soya (D'Allesandro *et al.*, 1989) y otros.

Sólomente en las enzimas de trigo, espinaca y arroz se ha utilizado afidicolina como inhibidor específico. Su mecanismo de acción parece ser el mismo que en animales: se observa inhibición competitiva con dCTP (Sala *et al.*, 1980).

Son incapaces de usar polirA-oligodT como templado al igual que las DNA pol α animales. Se inhiben con alta fuerza iónica y en el caso de trigo, la enzima es altamente resistente a ddTTP (Castroviejo *et al.*, 1982).

Su actividad se correlaciona directamente con la replicación cromosómica y la actividad mitótica.

2.4.3. DNA POLIMERASA BETA DE ANIMALES

La DNA polimerasa β aislada de todas las especies de vertebrados estudiadas es una proteína de bajo peso molecular, de aproximadamente 40 KDa (Sakaguchi y Boyd, 1985). No se ha encontrado una enzima homóloga en función en levaduras ni otros eucariotes inferiores.

Su mayor actividad coincide con el pico de reparación del DNA y mínima replicación del mismo. Participa en los mecanismos de reparación del DNA dañado con la luz UV. Su actividad en células en crecimiento es apenas del 1-10% del correspondiente a la DNA polimerasa α . Su punto isoelectrico básico evita su adsorción en DEAE-celulosa y tiende a permanecer unida a estructuras nucleares (Kornberg y Baker, 1992).

La polimerización que realiza es distributiva: inserta un solo desoxiribonucleótido y se disocia posteriormente del molde, sin embargo, el grado de procesividad depende del catión presente en la mezcla de reacción. Con Mg^{2+} es distributiva y con Mn^{2+} su polimerización es más procesiva insertando de 4 a 6 residuos por ciclo de interacción con el primer (Wilson *et al.*, 1988).

Su templado preferido es el DNA activado pero puede utilizar polirA-oligodT. Es sensible a iones fosfato. No presenta actividad exonucleasa intrínseca.

Con respecto a su respuesta a inhibidores, posee características únicas que la distinguen de las demás: es insensible a afidicolina, a agentes bloqueadores de sulfidrilo y a butil-fenil dGTP pero es sensible a ddNTPs. Su actividad es estimulada con sales (Kornberg y Baker, 1992).

2.4.4. DNA POLIMERASA BETA DE PLANTAS

No se ha encontrado hasta el momento en vegetales una enzima estrictamente similar a la DNA polimerasa β animal.

Se ha descrito una DNA polimerasa de bajo PM en remolacha (Tymonko y Dunham, 1977), chicharo (Chivers y Bryant, 1983) pero solamente en trigo ha sido aislada a pureza (Castroviejo *et al.*, 1990).

En el caso de trigo, la enzima de bajo PM comparte las características descritas para las DNA polimerasas β animales en cuanto a su resistencia a afidicolina, sensibilidad a ddNTP y bromuro de etidio, así como el reconocimiento parcial de polirA-oligodT pero en todos los casos de enzimas vegetales las DNA polimerasas β -like son muy sensibles a NEM en contraste con la gran resistencia de las DNA polimerasas β animales a concentraciones arriba de 20 mM.

El hecho de que este tipo de enzima no haya sido encontrada en otros especies vegetales se ha atribuido a la presencia de inhibidores de su actividad que eluyen junto con ella en la fracción de lavado en DEAE-celulosa. En el caso de trigo, éste inhibidor se eliminó mediante un paso cromatográfico por fosfocelulosa. Otra posibilidad es que la enzima se degrade si la actividad proteasa no se inhibe lo suficiente durante el proceso de purificación (Castroviejo *et al.*, 1990).

2.4.5. DNA POLIMERASA GAMA DE ANIMALES

La DNA polimerasa γ es requerida para la replicación del DNA mitocondrial pero es codificada en núcleo (Adler y Modrich, 1979).

Su estructura ha sido controversial debido a la poca cantidad de esta enzima y a la degradación proteolítica presente durante su purificación lo que hace difícil su estudio (Wernette y Kaguni, 1986).

- En embrión de pollo es un heterodímero de 47-kDa cada subunidad (Yamaguchi *et al.*, 1980 a ; Yamaguchi *et al.*, 1982).

- En *D. melanogaster* está compuesta por un polipéptido de 125-kDa (catalítico) y una subunidad adicional de 35-kDa (Wernette y Kaguni, 1986).

- La DNA polimerasa purificada de *Xenopus laevis* es solo un polipéptido de 104 KD asociado con la actividad catalítica (Insdorf y Bogenhagen, 1989).

- La DNA polimerasa mitocondrial de levaduras es una proteína de 143.5-kDa (Foury, 1989).

Es propensa a formar agregados, además de que muestra una naturaleza muy heterogénea al ser purificada. La enzima humana ha mostrado un PM que varía de 110 a 300-kDa.

Esta enzima no solamente está presente en mitocondria sino también en núcleo, con función desconocida; sin embargo, a pesar de encontrarse en ambos organelos, su concentración es mucho menor en comparación con las DNA pol α y β (Kornberg y Baker, 1992).

Se le denominó transcriptasa reversa de células animales al descubrir que prefiere ribohomopolímeros sintéticos como templados. Sin embargo, esta enzima difiere de la transcriptasa reversa viral en su incapacidad para utilizar templados de RNA natural así como en la ausencia de actividad RNasa asociada. Además, ambas enzimas son antigénicamente no relacionadas. En su actividad sobre polirA-oligodT se distingue de la DNA pol β en que no se inhibe con fosfato (Kornberg y Baker, 1992).

Las enzimas mitocondriales son insensibles a afidicolina pero sensibles a NEM y moderadamente inhibida por ddTTP. Se ha reportado como altamente procesiva en la síntesis de DNA.

2.4.6. DNA POLIMERASA GAMA DE PLANTAS

Con base en el criterio de que una DNA pol γ es una enzima que reconoce con mayor eficiencia polirA-oligodT que al DNA activado, se han estudiado tres de estas enzimas en plantas:

- a) La enzima cloroplástica de espinaca (Sala et al., 1980).
- b) Las DNA polimerasas organelares de soya (Heinhorst et al., 1990) y
- c) La DNA polimerasa γ nuclear de maíz (Meléndez, 1990).

A continuación se presentan algunos cuadros comparativos de las características más importantes de las DNA polimerasas mitocondriales y cloroplásticas de varios vegetales con respecto a las DNA polimerasas animales y otras.

La Tabla 2.2 muestra las características de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y se contrastan con el consenso establecido para la DNA polimerasa γ -animal.

TABLA 2.2. Propiedades de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y γ -animales.

PROPIEDAD	TRIGO	SOYA	γ ANIMALES
Peso Mol.	80-kDa	85-90-kDa	160-300
Subunidades	nd	nd	Multimero en <i>Drosophila</i> o único polipéptido.
Veces de purificación	1395	20	Homogeneidad
Actividad nucleasa	nd	nd	3'-5'
Templado preferido	poliA-oligodT	poliA-oligodT poliC-oligodG	poliA-oligodT
Utilización de poliA-oligodT	NO	SI con Mn^{2+}	SI con Mn^{2+}
Catión divalente	Mg^{2+}	Mg^{2+} y Mn^{2+}	Mg^{2+} 5-12 mM Mn^{2+} 0.1-0.6mM
Efecto de $KHPO_4$	nd	inhibe	no inhibe
KCl óptimo	nd	125 mM	100 mM
pH óptimo	8	nd	8-9
Temperatura óptima	35°C	nd	35-37°C
NEM	RESIST	INHIBE	INHIBE
AFIDICOLINA	RESIST	RESISTE	RESISTE
ddTTP	INHIBE	RESISTE	INHIBE
CLASIFICACIÓN FINAL	γ - que resist NEM	γ - que resiste ddTTP	γ -más susceptible a ddTTP que vegetales
REFERENCIA	Castro-viejo et al., 1981	Heinhorst et al., 1990	CONSENSO

nd= no determinado

La DNA polimerasa mitocondrial que se ha aislado con un mayor grado de pureza es la de trigo (1395 veces de purificación) (Christophe *et al.*, 1981) en comparación con la de soya (20 veces) (Heinhorst *et al.*, 1990). En ninguno de los dos casos se ha determinado el número de subunidades que las componen mientras que en animales tampoco hay consenso al respecto. El peso molecular de ambas es de aproximadamente la mitad del peso encontrado en animales.

Con respecto al templado preferido, la de trigo no utiliza polirA-oligodT mientras que la de soya sí lo utiliza; de manera similar a la γ animal. La enzima de soya es capaz de utilizar ambos cationes (al igual que en animales) mientras que la de trigo solamente es activa con Mg^{2+} .

La respuesta de las tres enzimas frente a la afidicolina es idéntica; las tres son resistentes. Frente a los otros dos inhibidores hay diferencias importantes: la enzima de trigo es resistente a NEM, mientras que la de soya lo es al ddTTP, en contraste con la γ -animal que es susceptible a ambos reactivos.

Finalmente, las enzimas γ de animales y soya se comportan de manera similar con respecto a su respuesta a los iones fosfato (ambas se inhiben) y a la concentración óptima de KCl (100 y 125 mM para la γ -animal y soya respectivamente). El pH y la temperatura óptimos son similares entre trigo y γ -animal (alrededor de 8 y 35°C aproximadamente).

La Tabla 2.3 muestra las características de las DNA polimerasas cloroplásticas estudiadas y también se contrastan con la γ -animal.

Las DNA polimerasas cloroplásticas han presentado un peso molecular entre 85 y 105 KDa contra un rango de 160-300 KDa en γ -animal. Solamente en el caso de soya se han obtenido dos picos de actividad a través de DEAE-celulosa (Heinhorst *et al.*, 1990). A su vez, solamente dos enzimas han sido purificadas a homogeneidad: la de chícharo (Mckown y Tewari, 1984) y la del segundo pico de soya siguiéndoles en orden de pureza de mayor a menor la del primer pico de soya (1388 veces), espinaca (Sala *et al.*, 1980) (100 veces) y jitomate (Serra y Carrillo, 1990) (gradiente de sacarosa).

Con respecto al templado preferido, solamente espinaca y soya responden de manera similar a la γ -animal utilizando polirA-oligodT. En tres enzimas se ha detectado actividad con Mn^{2+} (en jitomate no se ha determinado).

Frente a los diferentes inhibidores se observa una gran disimilitud con la γ -animal: todas se inhiben con afidicolina y tres de las cuatro enzimas han presentado resistencia al ddTTP; la γ -animal presenta una actividad contraria con ambos reactivos. Las cuatro enzimas cloroplásticas responden igualmente a NEM, único caso en el cual se comportan igual que γ -animal en lo que a inhibidores se trata.

TABLA 2.3. Propiedades de las DNA polimerasas cloroplásticas vegetales y γ -animales

PROPIEDAD	CHICHARO	ESPINACA	JITOMATE	SOYA	γ ANIMALES
Peso Molecular	90-kDa	105 kDa	88 KDa	I 85 KDa II 90 KDa	160-300
Subunidades	un polipéptido	nd	un polipéptido	I un polipéptido II más de un polip.	Multímero en <i>Drosophila</i> o único polipéptido.
Veces de purificación	Homogeneidad	100	Grad. de sacarosa	I 1388 II Homogeneidad	Homogeneidad
Actividad nucleasa	NO	nd	nd	nd	3' - 5'
Templado preferido	DNA nativo y DNA activado	PolirA-oligodT	DNA activado	PolirA-oligodT PolidC-oligodC	polirA-oligodT
Utilización de polirA-oligodT	NO	Sí con Mn ²⁺	nd	Sí con Mn ²⁺	Sí con Mn ²⁺
Catión divalente	Ni ²⁺ 12 mM Mn ²⁺ 0.5mM	Mn ²⁺ 0.1-1 mM	nd	Mn ²⁺ 0.25 mM	Mg ²⁺ 5-12 mM Mn ²⁺ 0.1-0.6mM
Efecto de KHPO ₄	nd	nd	nd	10 mM inhibe al 50%	no inhibe
KCl óptimo	120 mM	100-120mM	nd	estimula con 125mM	100 mM
pH óptimo	amplio rango	8 - 9	7.5-8.5	8	8-9
Temperatura óptima	nd	nd	30°C	nd	35-37°C
NEM	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	INHIBE
AFIDICOLINA	Resiste	Resiste	Resiste	Resiste	RESISTE
ddTTP	nd	Resiste	Resiste	Resiste	INHIBE
CLASIFICACIÓN FINAL	Datos insuficientes	γ -like resist. ddTTP	γ -like resist. ddTTP	γ -like resist. ddTTP	γ - más susceptible a ddTTP que vegetales
REFERENCIA	Mokown y Tewari, 1984	Sala et al., 1980	Serra y Carrillo 1990	Reinhorst et al., 1990	CONSENSO

nd= no determinado

La concentración de KCl óptimo es de 120, 100-120 y 125 mM para chicharo, espinaca y soya respectivamente, de manera similar a la γ -animal (100 mM). Lo mismo sucede con el pH óptimo: está en un rango de 7.5-9 incluyendo a las enzimas de espinaca, jitomate, soya y γ -animal. La temperatura óptima de la de jitomate es menor a la γ -animal: 30°C versus 35-37°C. Finalmente, la actividad de nucleasa ha sido escasamente ensayada y en el caso de la enzima de chicharo no fue encontrada, en contraste con la γ -animal que sí la presenta.

En resumen, las características de las DNA polimerasas vegetales difieren en gran medida en algunas de las características fundamentales propias de las γ -animales tales como su respuesta a inhibidores y la utilización de templados artificiales. Sin embargo, se ha observado ciertas características que son repetitivas en todos los casos: todas las enzimas son resistentes a afidicolina y, con la única excepción de la enzima mitocondrial de trigo, todas son susceptibles a NEM. La Tabla 2.4 es un resumen de las características de γ -animales y γ -vegetales.

TABLA 2.4. Cuadro comparativo de las propiedades de las DNA polimerasas γ de vegetales y animales

PROPIEDAD	γ -ANIMALES	γ -PLANTAS
Peso Molecular	160-300 KDa	88-180 KDa
Subunidades	Multimero en <i>Drosophila</i> o único polipéptido.	Un solo polipéptido
Veces de purificación	Homogeneidad	VARIABLE: 20, 1000, 1395 y Homogeneidad
Actividad nucleasa	3'- 5'	No hay consenso
Templado preferido	poliA-oligodT	VARIABLE: PolyrA-oligodT/Mg y/o DNA activado/Mg o PolydC-oligodC/Mg
Utilización de poliA-oligodT	Sí con Mn ²⁺	VARIABLE: algunas lo utilizan con Mn ²⁺ y otras no
Catión divalente	Mg ²⁺ 5-12 mM Mn ²⁺ 0.1-0.6mM	VARIABLE: Mg ²⁺ 5-12 mM y/o Mn ²⁺ 0.1-0.6 mM
Efecto de K ₂ HPO ₄	no inhibe	Inhibe al 50% a enzima de soya (10 mM)
KCl óptimo	100 mM	100-125 mM
pH óptimo	8-9	7.6 - 9
Temperatura óptima	35-37°C	30-37 C°
NEM	INHIBE	En general INHIBE
AFIDICOLINA	RESISTE	RESISTE
ddTTP	INHIBE	VARIABLES: Enzimas resistentes y susceptibles
CLASIFICACIÓN FINAL	γ -más resistente ddTTP que animales	VARIABLE: γ -resist. NEM o γ -resist. ddTTP γ -que no usa polyrA-oligodT

2.4.7. DNA POLIMERASAS DELTA Y EPSILON DE ANIMALES

El reconocimiento de las múltiples formas y función en la replicación de pol δ es uno de los avances más significativos en el campo de las polimerasas eucarióticas de la última década.

La DNA polimerasa δ se descubrió en timo de ternera y en médula ósea de conejo con hiperplasia (Byrnes et al., 1976; Goscin y Byrnes, 1982) como una polimerasa con actividad intrínseca de 3'-5' exonucleasa (actividad correctora) y se encontró semejante a α en su sensibilidad a afidicolina y NEM y su resistencia a ddNTP.

Una de las características importantes de la DNA polimerasa δ es su dependencia por PCNA. Se descubrió que la replicación de SV40 *in vitro* requiere PCNA (Wold y Kelly, 1988). El PCNA -*proliferating cell nuclear antigen*- es una proteína necesaria para el inicio de la replicación del DNA en el ciclo celular (Suzuka et al., 1989).

Por su parte, la DNA polimerasa ϵ , es una enzima independiente de PCNA pero muestra las mismas características que DNA pol δ frente a inhibidores y fuerza iónica.

Entre pol δ y ϵ existen muchas similitudes las cuales a su vez son características que las distinguen de pol α : exonucleasa 3'-5'; ausencia de actividad primasa, preferencia de templado-primer por polirA-oligodT, alta procesividad, relativa sensibilidad a ciertos inhibidores (ddTTP), una estructura de simple subunidad y especificidad inmunológica (Tsurimoto y Stillman, 1991).

La procesividad de pol δ ha hecho pensar que esta enzima está especializada en la replicación continua de la cadena *leading* y que pol α esté implicada en la replicación discontinua de la cadena *lagging* por ser menos procesiva (Tsurimoto y Stillman, 1991).

Pol δ de timo de ternera contiene dos subunidades de 125 y 48 KDa (Lee et al., 1984). La enzima equivalente en levaduras también contiene dos subunidades (125 y 55 KDa) (Burgers y Baver, 1988). Otra forma de DNA pol δ de mamíferos de placenta humana contiene un polipéptido de 170 KDa y algunos más pequeños (Lee y Toomey, 1987).

La DNA polimerasa ϵ de mamíferos ha sido aislada de varias formas:

1) DNA polimerasa ϵ de fibroblastos humanos contiene una subunidad de 215 KDa y posiblemente uno de 55 KDa (Syvaaja et al., 1990). Se le ha considerado como un factor necesario para llevar a cabo la síntesis reparativa de DNA en fibroblastos humanos irradiados con luz UV.

2) De médula ósea de conejo es un polipéptido simple de 122 KDa.

Finalmente, de cultivo celular de ratón (Goulian *et al.*, 1990) se aisló una DNA pol PCNA-independiente muy parecida a pol δ en varias de sus propiedades.

2.4.8. DNA POLIMERASA DELTA DE PLANTAS

Se ha reportado que la pol B de trigo conlleva, durante todos los pasos de purificación, la actividad de exonucleasa 3'-5'.

Comparando sus propiedades con las de la DNA polimerasas δ descritas, se observan varias similitudes: especificidad de templado, sensibilidad a inhibidores de la replicación y copurificación de nucleasa con DNA polimerasa. Este constituye el primer reporte de pol δ en plantas superiores (Castroviejo *et al.*, 1990).

2.4.9. DNA POLIMERASA EPSILON EN PLANTAS

Hasta la fecha no se ha reportado la caracterización de ninguna enzima en vegetales que muestre las características de la DNA polimerasa ϵ en animales.

CAPITULO TERCERO

MATERIALES Y REACTIVOS

3. MATERIALES Y REACTIVOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de maíz, variedad chalqueño, se obtuvieron de PRONASE (Productora Nacional de Semillas) de la SARH.

Los ejes embrionarios se extraen manualmente de las semillas de maíz con la ayuda de una navaja de un filo, procurando que éstos queden libres de escutelo pero sin alterar su estructura.

3.2. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS

3.2.1 SOLUCIONES STOCK

Se recomienda preparar las siguientes soluciones stock a partir de las cuales se preparan a su vez los amortiguadores.

- | | |
|---------------------------------|----------------------|
| 1) Tris-HCl | 1 M, pH=7.6 (100 ml) |
| 2) KCl | 0.5 M (50 ml) |
| 3) MgCl ₂ | 1 M (50 ml) |
| 4) Sacarosa | 20% (80ml) |
| 5) EDTA | 0.25 M (50 ml) |
| 6) PMSF | 1-10 mg/ml (15 ml) |
| 7) Albúmina sérica bovina (ASB) | 1 mg/ml (15 ml) |
| 8) Cloranfenicol | 10 mg/ml |

3.2.2 SOLUCIÓN DE IMBIBICIÓN

Tris-HCl	0.05 M , pH=7.6
KCl	0.05 M
MgCl ₂	0.01 M
Sacarosa	2 %
Cloranfenicol	10 µg/ml

3.2.3 SOLUCIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN

Tris-HCl	0.05 M, pH=7.6
Sacarosa	0.5 M
Glicerol	10 %
MgCl ₂	5.0 mM
Fluoruro de fenil-metil sulfonilo	0.2 mM (PMSF)
2-mercaptoetanol	1.0 mM

El PMSF y el β -mercaptoetanol se añaden a las soluciones al momento de utilizarlos.

3.2.4 SOLUCIÓN DE RESUSPENSIÓN DE BOTONES ORGANELARES

Tris-HCl	0.05 M, pH=7.6
MgCl ₂	0.01 M
EDTA	0.03 M
Glicerol	10 %
PMSF	0.2 mM
2-mercaptoetanol	1.0 mM

3.2.5 SOLUCIONES PARA GRADIENTES DE SACAROSA

A) SOLUCIÓN DE MENOR DENSIDAD

Tris-HCl	0.05 M, pH=7.6
MgCl ₂	0.05 M
Sacarosa (gdo. gradiente de densidad)	17% (0.5 M)
PMSF	0.2 mM
β -mercaptoetanol	1 mM

B) SOLUCIÓN DE MAYOR DENSIDAD

Tris-HCl	0.05 M, pH=7.6
EDTA	1 mM
Sacarosa (gdo. gradiente de densidad)	20.5% (0.6 M)
PMSF	0.2 mM
β -mercaptoetanol	1 mM

3.2.6 PREPARACIÓN DE TEMPLADOS NATURAL Y ARTIFICIAL

A) DNA ACTIVADO

I. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACTIVACIÓN

Tris-HCl	10 mM, pH=7.6
MgCl ₂	50 μM
Albumina sérica bovina	0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera	0.5 mg/ml

II. ACTIVACIÓN DEL DNA (Adaptado de Aposhian y Kornberg, 1962).

- 1.- Se prepara una solución de DNA de timo de ternera a una concentración de 0.5 mg/ml en la solución amortiguadora de activación descrita anteriormente.
- 2.- Se lleva a cabo la reacción de 1 ml de la solución de DNA de timo de ternera con 0.001 mg de DNasa I incubando: i) 15 min. a 37 °C y a continuación, ii) 5 min. a 77 °C.
- 3.- Finalmente la solución se pasa a un baño de hielo.

El DNA activado es utilizado como molde en la mezcla de reacción de la DNA polimerasa.

B) PolirA-oligodT

Se disuelven los reactivos a la concentración final indicada en la tabla siguiente:

Reactivo	Concentración sol. stock	Volumen para ensayo
- PolirA	0.5 mg/ml	10
OligodTs	0.084 mg/ml	10

Concentración final de PolirA-oligodT= 58.4 μg/ml

3.2.7 PREPARACIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

A) PREPARACIÓN DE LA RESINA DE DEAE-CELULOSA

- 1.- Resuspender 5 g de resina en 75 ml de HCl 0.5 M y agitar suavemente 45 min a intervalos de 15 min.
- 2.- Filtrar la resina al vacío y llevarla a pH de 7 con agua destilada (nunca dejar que se seque).
- 3.- Resuspenderla nuevamente en 80 ml de KCl 0.05 N y llevarla a pH de 7.2 con HCl 0.05 N.
- 4.- Agitar suavemente durante 1 h a intervalos de 15 min.
- 5.- Se verifica el pH con papel indicador, el cual debe ser de 7.2 y si no es así se retitula.
- 6.- Se agita durante 2 h a intervalos de 30 min.
- 7.- Se retitula una vez más a pH 7.2 y por último se decanta la resina eliminando los finos y la materia particulada.
- 8.- Finalmente, la resina se resuspende en el amortiguador de lavado de fosfatos (ver sección 3.2.8).

B) MONTAJE DE LA COLUMNA.

- 1.- Se lava perfectamente bien una columna de vidrio de 12 X 2 cm enjuagándola al final con agua destilada.
- 2.- Una vez seca la columna se empaca con pelo de ángel de tal forma que el flujo a través de éste sea rápido.
- 3.- Se colocan la manguera y la pinza de Mohr en la salida de la columna y se controla el flujo utilizando agua destilada. El flujo no debe ser muy rápido para evitar un empaque demasiado fuerte de la resina.
- 4.- Se carga la resina a la columna con la ayuda de un tubo de vidrio y se lleva al volumen deseado a flujo lento. Debe evitarse el secado de la columna.
- 5.- Una vez cargada, la resina se equilibra con el buffer de lavado (3 volúmenes de cama).
- 6.- La resina está lista para ser utilizada. A continuación se conecta al colector de fracciones y a la bomba peristáltica, todo lo cual debe estar en el cuarto frío a 4 °C.

3.2.8 SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE CORRIMIENTO CROMATOGRÁFICO

A) AMORTIGUADOR DE LAVADO DE FOSFATOS

K ₂ HPO ₄	10 mM, pH= 7.6
EDTA	1 mM
Glicerol	20%
PMSF	0.3 mM
2-mercaptoetanol	1 mM

B) AMORTIGUADOR DE GRADIENTE DE FOSFATOS

K ₂ HPO ₄	400 mM, pH= 7.6
EDTA	1 mM
Glicerol	20%
PMSF	0.3 mM
2-mercaptoetanol	1 mM

3.2.9 MEZCLA DE REACCIÓN PARA EL ENSAYO DE DNA POLIMERASA

REACTIVO	CONC. FINAL
dATP	0.1 mM
dGTP	0.1 mM
dCTP	0.1 mM
ATP	1.0 mM
DNA activado	0.1-0.2 mg/ml
Glicerol	4.0 %
Metil- ³ H TTP	0.06 μM, 5 μCi/ml (57 Ci/mmol)
β-mercaptoetanol	0.4 mM
SOL. AMORTIGUADORA	MgCl ₂ 0.01 M
	KCl 0.02 M
	Tris-HCl 0.05 M, pH=7.6

A continuación se propone un esquema que muestra la concentración de cada solución stock y el volumen a utilizar en un ensayo de DNA polimerasa a un volumen final de 100 μ l.

Reactivo	Concentración sol. stock	Vol. para ensayo (μ l)
Tris-HCl	0.42 M	12 (Estos tres reactivos se disuelven en una misma solución)
MgCl ₂	0.083 M	
KCl	0.17 M	
dATP, dCTP y dGTP	1 mM	1
Metil- ³ H TTP	82.8 Ci/mmol (2.5 mCi/ml)	0.2
ATP	1 mM	1
DNA activado	0.5 mg/ml	20-40
Glicerol	50%	8
β -mercaptoetanol	10 mM	4

3.2.10 LÍQUIDO DE CENTELLEO

2,5 fenoxazol	(POP)	5.0 g
2,2'-p-fenilbis (5-fenoxazol)	(POPOP)	0.1 g
Tolueno		1.0 l

A) PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DEL LÍQUIDO DE CENTELLEO

El POPOP se añade lentamente para facilitar su disolución completa.

- La solución de centelleo se agita por lo menos durante 1 h evitando su calentamiento. Su disolución se realiza en la campana para evitar la inhalación del tolueno.

- Se almacena en medio ambiente.

- Se prepara en grandes cantidades (2-3 litros).

B) MANEJO DEL LÍQUIDO DE CENTELLEO Y DE MARCA RADIACTIVA

Una vez leídas las cpm en cada vial se junta el líquido de centelleo de cada uno en una campana y con toda precaución se almacena en recipientes de plástico etiquetados que informen el tipo de marca utilizada y la cantidad aproximada de la misma en Ci totales así como el volumen y la fecha.

Estos recipientes se mantienen en el cuarto de radiactividad.

En caso de contaminación con marca radiactiva se recomienda lavar inmediatamente con detergente EXTRAN y dar aviso a un experto.

- Por otra parte, los filtros se desechan en papeles absorbentes y se depositan en el bote de material radiactivo correspondiente.

3.2.11 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE PETERSON.

REACTIVO A:

Se mezclan volúmenes iguales de cada uno de los reactivos siguientes, preparados a la concentración que se indica:

- NaOH	0.8N
- Sol. Cobre-Tartrato-Carbonato	
(Mezcla de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.1 %, tartrato de sodio-potasio al 0.2 % y Na_2CO_3 al 10 %)	
- Dodecilsulfato de sodio	10 %
- Agua destilada	

CAPITULO CUARTO

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO EMBRIONARIO Y GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES DE MAÍZ

1.- Los ejes embrionarios se desinfectan en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (4 g de ejes en 20 ml) por 30 seg en suficiente agua destilada estéril.

2.- Se colocan en una caja petri de vidrio, entre dos papeles filtro (todo el material debe estar estéril) y se embeben en la solución de imbibición en un volumen de : 4 g de ejes en 15 ml aproximadamente de amort. de imbibición procurando que todo el tejido quede humedecido.

3.- Se sella muy bien la caja petri con papel parafilm y se incuban los ejes en una estufa a temperatura controlada de 26-28°C durante el tiempo de germinación correspondiente: 3, 6, 15 y 24 h según el experimento por realizar.

Si los ejes embrionarios no son utilizados el mismo día de su extracción, se almacenan en seco y a 4 °C.

4.2. HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO EMBRIONARIO

1.- Los ejes embrionarios germinados se homogeneizan en un mortero preenfriado a 4 °C en hielo con la solución de homogeneización también preenfriada, en una relación de 4 g de ejes en 30-35 ml de amort. Se homogeneizan en el menor tiempo posible para preservar al máximo la actividad enzimática (4 g de ejes en 6 min).

Si los ejes embrionarios no se homogeneizan el mismo día que se germinaron, se almacenan a -70°C por no más de 24 horas.

2.- El homogeneizado celular se filtra a través de 3 capas de papel Miracloth limpias. El papel Miracloth se humedece con amort. y a continuación se realiza la filtración con ayuda del vacío, evitando al máximo la desnaturalización de las proteínas (formación de espuma).

(El lavado del papel Miracloth se realiza en caliente con el detergente "Extran" y a continuación se enjuaga con abundante agua destilada. Finalmente se secan en la estufa).

3.- El filtrado proteico se colecta en tubos corex de 15 ml preenfriados y se calcula el volumen final recuperado.

4.3. TÉCNICA I DE AISLAMIENTO ORGANELAR

4.3.1 AISLAMIENTO DE LOS BOTONES NUCLEAR Y PLASTÍDICO-MITOCONDRIAL

La siguiente técnica por describir consiste en la separación diferencial de núcleos por una parte y de plastidios y mitocondrias por otro (Esquema A).

Para llevar a cabo la técnica de aislamiento organelar I se extraen 0.7 g de ejes.

1.- Los núcleos celulares se separan centrifugando el filtrado a 1089 g (3000 rpm) durante 10 min, sin freno. El pellet de núcleos (pellet 1) se sedimenta en el fondo del tubo.

2.- Se recupera el sobrenadante 1 teniendo cuidado de no mezclarlo con los lípidos de la superficie.

NOTA A: Los lípidos se eliminan absorbiéndolos en algodón con la ayuda de una varilla de vidrio, después de lo cual se recupera el sobrenadante y el pellet de núcleos se elimina.

3.- El sobrenadante 1 se somete a la siguiente centrifugación: 17,400 g durante 20 min (12,000 rpm), con freno. El pellet formado en el fondo del tubo contiene los plastidios y mitocondrias (pellet 2).

4.- El sobrenadante 2 se elimina y el pellet 2 se resuspende cuidadosamente con 3 ml de amort. de resuspensión a 4°C sin mezclar con lípidos.

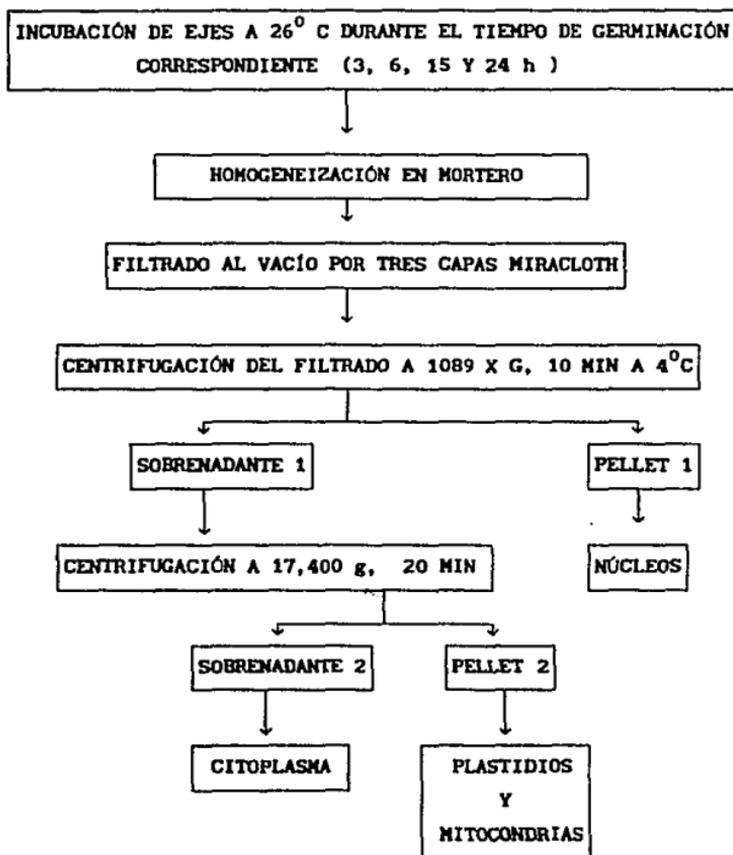
NOTA B: Para lograr una resuspensión homogénea se hace uso de una espátula que remueva el pellet del fondo del tubo. Si éste se encuentra muy adherido al vidrio, se somete a pequeños golpes en el vortex, evitando el máximo la formación de espuma y el sobrecalentamiento.

5.- Por último, se toman alícuotas para las siguientes determinaciones cuantitativas:

- 20-30 y 40 microlitros (por duplicado) para proteínas.
- 20-30 y 40 microlitros (por duplicado) para actividad de DNA polimerasa.
- 1 ml (por duplicado) para DNA.

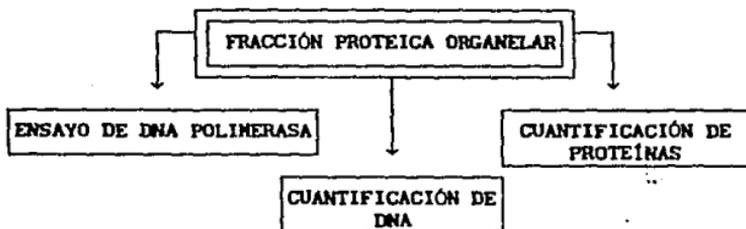
ESQUEMA A

TÉCNICA I DE AISLAMIENTO ORGANELAR



ESQUEMA B

ENSAYOS DE CUANTIFICACIÓN



4.4. TÉCNICA II DE AISLAMIENTO ORGANELAR

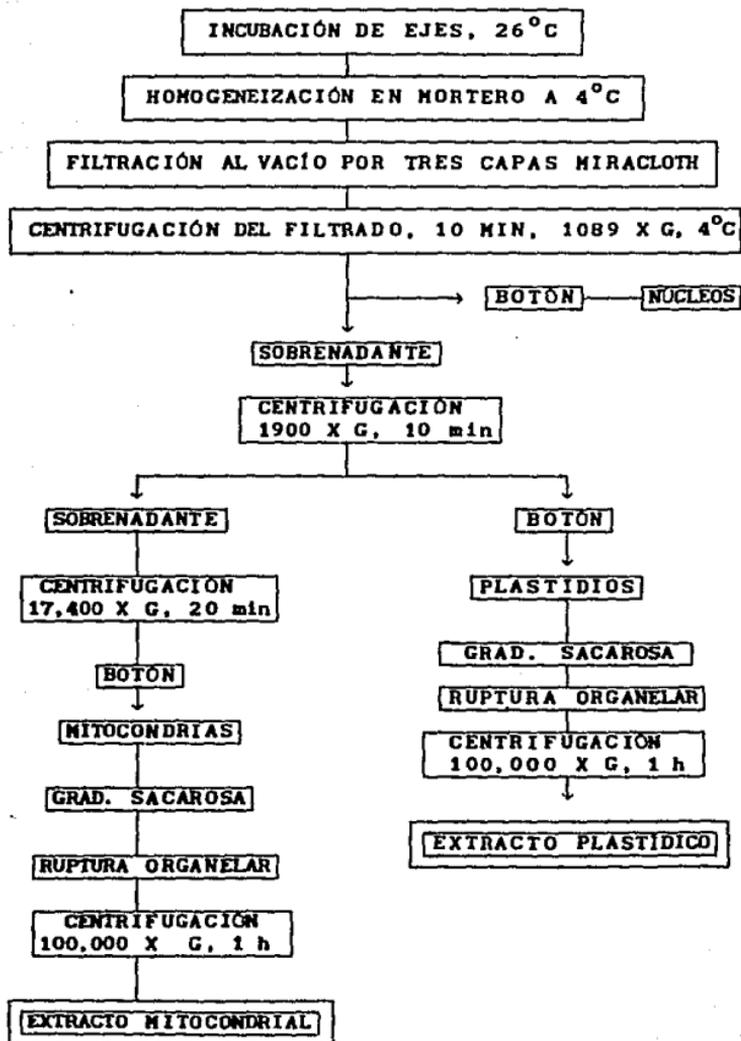
Para la técnica de aislamiento organelar II se utilizan, en la caracterización, 4 g de ejes y para la purificación enzimática, 6 g de ejes embrionarios.

La técnica de aislamiento diferencial de organelos ofrece, por separado, los botones plastídico y mitocondrial, por lo cual se incluye una corrida adicional (Esquema C).

Las corridas se realizan en las mismas condiciones descritas anteriormente.

- 1.- Una vez separados los núcleos (de la misma forma descrita en el apartado de "Aislamiento organelar I") el sobrenadante 1 se centrifuga a 1900 g (4000 rpm) durante 10 min con freno. En el fondo se forma el pellet 2 de plastidios.
- 2.- Se separa el sobrenadante 2 teniendo las precauciones descritas en la Nota A.
- 3.- El sobrenadante 2 se somete a centrifugación a 17,400 g (12,000 rpm) durante 20 min. Se forma el pellet 3 de mitocondrias. El sobrenadante 3 se elimina.
- 4.- Los pellets 2 y 3 se resuspenden en 2 y 3 ml respectivamente del amort. que contiene sacarosa 0.5 M; independientemente de la cantidad de ejes utilizados al inicio (entre 3 y 6 g, aproximadamente). Para lograr la mejor resuspensión tomar las precauciones de la Nota B.

ESQUEMA C
TECNICA II DE AISLAMIENTO ORGANELAR



- 5.- Para finalizar, se toman alicuotas de cada fracción organelar:
- 40 y 50 microlitros (por duplicado) para proteínas.
 - 40 microlitros (por duplicado) para actividad de DNA polimerasa.

En las técnicas de aislamiento organelar y de purificación organelar se utilizó la centrifuga marca Beckman J2-21, rotor JA20, con radio = 108 mm. La fórmula utilizada en la conversión de g a rpm es:

$$\text{rpm} = (g/1.12r)^{1/2} \times 1000$$

Todas las corridas se realizan a 4 °C con las correspondientes correcciones de temperatura y utilizando el rotor preenfriado.

Antes de cualquier corrida, los tubos corex se colocan dentro de sus camisas y se equilibran perfectamente en la balanza de dos platos.

4.4.1 PURIFICACIÓN ORGANELAR A TRAVÉS DE UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

A) PLASTIDIOS

1.- El gradiente de sacarosa diseñado para purificación plastídica, se prepara de la siguiente forma:

En un tubo de 15 ml (preenfriado) se estratifican las soluciones en el orden siguiente:

- En el fondo, 8 ml del amortiguador con sacarosa 0.6 M.
- Con la ayuda de una pipeta Pasteur se añaden 2 ml de la suspensión organelar (resuspendida en el amort. 0.5 M) lentamente a través de las paredes del tubo.

NOTA C: La adición de la suspensión organelar se realiza lo más rápidamente posible y en frío inmediatamente antes de la centrifugación, para evitar al máximo la lisis organelar.

NOTA D: Al equilibrar el tubo del gradiente discontinuo de sacarosa con su contrapeso, se evita al máximo la mezcla del mismo moviéndolo lo menos posible.

- El colchón se centrifuga a 1900 g (4000 rpm) durante 10 min, con freno.
- Al final de la corrida, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 2 ml de amort. de resuspensión a 4°C (ver Nota B).
- Se toman alicuotas de la suspensión de plastidios purificados:
 - 40 y 50 microlitros (por duplicado) para proteínas y
 - 40 microlitros (por duplicado) para actividad de DNA polimerasa.

B) MITOCONDRIAS

Para la purificación de mitocondrias se prepara el gradiente de sacarosa de la siguiente forma:

1.- En un tubo corex de 15 ml (preenfriado) se estratifican las dos siguientes soluciones:

a) En el fondo, 6 ml del amortiguador que contiene sacarosa 0.6 M.
b) Al igual que para plastidios, se estratifica la suspensión mitocondrial (3 ml en amortiguador de sacarosa 0.5 M) pasándola cuidadosamente por las paredes del tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur (ver notas C y D).

2.- El gradiente de sacarosa se centrifuga a 17,400 g (12,000 rpm) durante 20 min. con freno.

3.- Se desecha el sobrenadante y el pellet de mitocondrias se resuspende en 2 ml de amortiguador de resuspensión preenfriado.

4.- Se toman las mismas alícuotas que en el caso de plastidios:

a) 40 y 50 microlitros (por duplicado) para proteínas.
b) 40 microlitros (por duplicado) para actividad de DNA polimerasa.

4.5. LISIS ORGANELAR Y SOLUBILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La lisis organelar se logra mediante un tratamiento con detergente seguido de agitación vigorosa.

La solubilización de las DNA polimerasas organelares se logra mediante la digestión de los ácidos nucleicos, técnica que permite la separación de la DNA polimerasa de las membranas organelares. El procedimiento experimental es el siguiente:

4.5.1 LISIS ORGANELAR

1.- A cada suspensión organelar (2 ml c/u) se añaden 10 microlitros de Tritón X-100 al 20% (concentración final de 0.1%).

2.- Las suspensiones se homogeneizan en vortex y se mantienen durante 15 min en hielo.

3.- Finalmente, las suspensiones se homogeneizan nuevamente en vortex propiciándoles 5 golpes a mediana velocidad por cinco segundos cada uno, evitando el sobrecalentamiento.

4.5.2 DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1.- A cada suspensión organelar se añade una solución de CaCl_2 a una concentración final de 100 mM, procurando no diluir demasiado las fracciones organelares.

2.- A continuación se añaden 10 U de Nucleasa Micrococal.

3.- La mezcla de reacción se homogeneiza y se incuba a 20°C durante 30 min.

4.- La reacción se detiene añadiendo EGTA a una concentración final de 100 mM (se utiliza un stock concentrado para evitar la dilución de las fracciones proteicas).

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS PLASTÍDICA Y MITOCONDRIAL

La caracterización de ambas DNA polimerasas incluyó varios aspectos:

1) El primero fue su respuesta frente a tres de los inhibidores más ampliamente utilizados en la caracterización de las DNA polimerasas.

4.6.1 INHIBIDORES

- a) Afidicolina: inhibidor competitivo del precursor dCTP.
- b) 2'- 3' Didesoxitimidina-trifosfato (ddTTP): inhibidor competitivo del precursor dTTP.
- c) N-etilmaleimida (NEM): bloqueador de grupos sulfhidrilo.

Las concentraciones a las que se prueban dichos inhibidores se muestran en la siguiente tabla:

2) La segunda fue la respuesta de ambas DNA polimerasas organelares a un templado artificial.

4.6.1.a. AFIDICOLINA

1.- Se preparó una solución stock de afidicolina a una concentración de 1.47 mM (1 mg de afidicolina en 2 ml de disolvente al 50%). El disolvente utilizado es el dimetilsulfóxido (DMSO).

2.- Se añaden los microlitros necesarios de la solución anterior a la mezcla de reacción de la DNA polimerasa. El volumen de solución stock de afidicolina se resta al volumen de agua que normalmente se añade a la mezcla de reacción de la DNA polimerasa (ver apartado de reactivos).

La siguiente tabla muestra la concentración de afidicolina final (a un volumen de 100 μ l), la relación afidicolina/dCTP y los μ l de stock necesarios para alcanzar dicha concentración.

CONC. AFIDICOL.		RELACIÓN	MICROLITROS DEL STOCK
μ M	μ g/ml	Afid/dCTP	1.47 mM
50	16.90	0.5:1	3.4

PN de afidicolina = 338 g/mol

3.- Se preparan dos controles para este ensayo y cada uno por duplicado:

a) Un control sin inhibidor que corresponde la actividad de la enzima en condiciones normales. Contiene el volumen de afidicolina pero en agua.

b) Otro control que contiene el volumen correspondiente del disolvente de la afidicolina (DMSO). Se realiza para cada concentración de afidicolina.

4.- La actividad enzimática resultante en presencia del inhibidor se compara porcentualmente contra el control con DMSO que corresponde al 100%.

4.6.1.b. 2'-3' DIDESOXITIMIDINA 5'- TRIFOSFATO (ddTTP)

1.- Se preparó una solución de ddTTP a una concentración de 0.624 μM disolviendo con agua destilada estéril.

2.- Se añaden los microlitros correspondientes a la mezcla de reacción de la DNA polimerasa, restando el volumen de agua, según la concentración final deseada (cada ensayo por duplicado):

ddTTP μM	RELACIÓN ddTTP/dTTP	MICROLITROS DEL STOCK 0.624 μM
0.03	0.5:1	4.8

3.- Solamente se prepara un control (por duplicado) sin inhibidor con el volumen correspondiente de agua.

4.- La actividad enzimática en presencia de inhibidor se compara porcentualmente contra el control que corresponde al 100% de actividad.

4.6.1.c. N-ETILMALEIMIDA (NEM)

1.- Se prepara una solución de NEM a una concentración de 0.2 M disolviendo con DMSO.

2.- Se añaden 5 microlitros de la solución anterior a la mezcla de reacción de la DNA polimerasa, restando el volumen de agua.

NEM M	MICROLITROS DEL STOCK 0.2 M
10.0	5.0

3.- Se preparan dos controles (por duplicado) de la misma forma que para la afidicolina.

a) El primero corresponde a la actividad enzimática en condiciones normales. Se añade el volumen correspondiente de agua.

b) El segundo corresponde a la actividad enzimática en presencia del disolvente DMSO, del cual se añade el mismo volumen que inhibidor.

4.- La actividad enzimática en presencia del inhibidor se compara porcentualmente con respecto al control de DMSO que corresponde al 100% de actividad.

4.7. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

4.7.1. ELIMINACIÓN DE LOS RESTOS MEMBRANALES ORGANELARES

Una vez lisados los organelos y digeridos los ácidos nucleicos, se procede a la eliminación de los restos membranales de plastidios y mitocondrias con el objetivo de, posteriormente, purificar ambas DNA polimerasas organelares a través de una resina de DEAE-celulosa.

Se procede como a continuación se describe:

1.- Todos los extractos proteicos organelares se someten a una centrifugación a 100, 000 g durante 1 h a 4 °C.

2.- Se separa el sobrenadante y los botones organelares se resuspenden en 2-3 ml del amortiguador de resuspensión.

3.- Se toman alícuotas de 40-50 microlitros para la cuantificación de proteínas y actividad de DNA polimerasa.

4.7.2 PURIFICACIÓN A TRAVÉS DE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

Una vez montada y equilibrada la resina con el amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7.6, se procede a la carga de la fracción proteica por purificar como a continuación se indica.

1.- Se cargan 2 ml del extracto proteico con un flujo de 12 ml/hr.
2.- Se lava la columna con 3 volúmenes de lecho con el amortiguador de fosfatos de lavado 10 mM y con 5 volúmenes de lecho de un gradiente de fosfatos desde 10 mM hasta 400 mM, a pH 7.6.

3.- Se colectan 50 fracciones de 0.5 ml y con cada una se lleva a cabo el ensayo de la DNA polimerasa y la cuantificación de proteínas utilizando el mismo volumen de fracción proteica para ambas cuantificaciones.

4.- Se grafican los valores de actividad de DNA polimerasa (CPM) y de concentración de proteínas (ng/ml) y concentración del gradiente de fosfatos (mM) vs número de fracción con el fin de establecer el perfil de actividad enzimática y proteína a lo largo del flujo de la columna.

4.8. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA

La reacción consiste en incubar a la DNA polimerasa de las fracciones organelares en presencia de sus sustratos que son:

- 1.- Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (con uno de ellos marcado radiactivamente: metil ^3H -dTTP).
- 2.- Un templado o patrón de DNA sobre el cual serán incorporados covalentemente los cuatro reactivos anteriores (según la regla de apareamiento de bases: adenina:timina y guanina:citosina) y
- 3.- Un catión divalente indispensable para la reacción (Mn^{2+} ó Mg^{2+}).

Además de: ATP, solución amortiguadora de pH, β -mercaptoetanol (agente reductor) y glicerol.

En primer lugar se prepara el volumen necesario de la mezcla de reacción que contenga todos los reactivos antes mencionados y se procede como a continuación se indica:

- 1.-A cada tubo se le añade una cantidad igual de la mezcla de reacción y el volumen necesario de extracto proteico para alcanzar el volumen final de reacción (100 μl , generalmente) que dará las concentraciones finales de los reactivos antes mencionados.
- 2.-Se prepara un blanco de reacción, el cual no contiene ningún extracto proteico, sino el equivalente en volumen de agua destilada y el correspondiente volumen de mezcla de reacción.
- 3.- La reacción comienza al añadir el extracto enzimático; una vez añadido éste al tubo de reacción, empieza a correr el tiempo de incubación a 37°C durante 30 min.
- 4.-Se le da fin a la reacción enzimática con 100 μl de la solución de esperma de arenque a una concentración de 2 mg/ml y 2 ml de ácido tricloroacético al 10 % (reactivos fríos).
- 5.-A continuación los tubos se mantienen a 4°C durante 30 min. para que el DNA precipite.
- 6.- Los tubos se filtran al vacío por un filtro millipore a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A); los filtros se lavan con un volumen de 5 ml aproximadamente de TCA al 5% y al 10% y con etanol al 96% ; dichos lavados sirven principalmente para arrastrar la marca inespecífica de los filtros (es decir, no covalentemente unida al molde de DNA) y en ellos quedará solamente el DNA activado con marca radiactiva.
- 7.-Los filtros se secan en un horno a 60°C y se dejan enfriar; una vez secos se sumergen en viales con 5 ml de líquido de centelleo.
- 8.-La marca radiactiva del material insoluble es leída en un contador de centelleo que da lecturas en cuentas por minuto (cpm) y que son proporcionales a la actividad enzimática de la DNA polimerasa de cada extracto.

4.9. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se llevó a cabo el método de Peterson (1977) siguiendo el procedimiento experimental que a continuación se señala:

1.-Se prepara una solución estándar de albúmina (se recomienda a una concentración de 10 mg/ml) y se toman alícuotas con volúmenes ascendentes en un rango de 10 a 100 μ g de proteína para la realización de la curva patrón.

2.-Por otra parte, se toman alícuotas por duplicado de las fracciones organelares (de 30 a 50 μ l).

3.-Se añade a cada tubo 100 μ l de desoxicolato de sodio al 0.15 % (DOC) y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. Este tratamiento tiene por objetivo la remoción de los lípidos presentes en los "extractos problema" y evitar que interfieran en la cuantificación colorimétrica.

A la curva patrón se le da el mismo tratamiento que a los problemas para que sea lo más comparable posible con éstos.

4.-Después de la incubación con el detergente, se precipitan las proteínas con 100 μ l de ácido tricloroacético al 72 % (TCA) y se mantienen los tubos a 4°C durante por lo menos 30 min.

5.-Se realiza a continuación una centrifugación a 756 x G por 15 min a 4°C en una centrifuga preenfriada; con lo cual se logra la separación del botón de proteínas y se elimina el sobrenadante ácido que contiene impurezas de las fracciones subcelulares.

6 -Los botones se dejan escurrir un tiempo boca abajo y una vez secos se procede a desarrollar la reacción colorimétrica con los siguientes reactivos: 1 ml de agua destilada y 1 ml del reactivo A.

7.- Después de homogeneizar muy bien la mezcla anterior, los tubos se dejan a temperatura ambiente por 10 min.

8.- A continuación se añaden 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:6, se homogeneizan las mezclas de reacción y se incuban los tubos por 30 min a temperatura ambiente para que se desarrolle el color del complejo.

9.-La intensidad de la absorbencia de cada mezcla se lee a 750 nm en un espectrofotómetro contra un blanco que contiene solamente los reactivos para el desarrollo del color.

4.10. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

El método de Giles-Myers (1957) de la difenilamina, se basa en la formación de un complejo entre la difenilamina en medio ácido con la desoxirribosa del ácido desoxirribonucleico (DNA).

Al valor de absorbencia dada por el complejo colorido (595 nm) se le resta el valor de absorbencia dado por algunas de las impurezas presentes en el extracto proteico utilizado.

La curva patrón de DNA se realiza disolviendo DNA de esperma de arenque de alto peso molecular en agua a una concentración de 10 mg/ml.

La técnica es la siguiente:

- 1.- Se toman alícuotas de la solución estándar con volúmenes ascendentes hasta cubrir un rango de 10 a 100 µg de DNA.
- 2.-Por otra parte se toman alícuotas de 1 ml del extracto problema (la cantidad de DNA presente en los organelos es muy pequeña por lo que se necesita un volumen muy grande para que la cantidad de DNA sea detectable) cuantificado con precisión por este método colorimétrico.
- 3.-Se precipita el DNA de cada tubo con 1 ml de TCA al 20 % y se mantienen a 4°C durante 30 min.
- 4.-A continuación se centrifugan las mezclas a 756 x G durante 15 min. a 4°C en una centrifuga preenfriada.
- 5.-Se elimina el sobrenadante y se dejan secar los botones boca abajo.
- 6.-Antes de realizar la reacción colorimétrica, el DNA se hidroliza en medio ácido y a alta temperatura, añadiendo a cada tubo 1 ml de ácido perclórico al 10 % e incubándolos a 80°C durante 30 min.
- 7.-Una vez hidrolizado el DNA, se añade a cada tubo 1 ml de solución de difenilamina al 4 % (disuelta en ácido acético glacial) y se homogeneiza la mezcla perfectamente.
- 8.-Se añade a cada tubo 50 µl de acetaldehído a una concentración de 1.6 mg/ml en agua destilada.
- 9.-Los tubos se incuban a temperatura ambiente por 15 h para el completo desarrollo del color.
- 10.-Se lee la diferencia de absorbencias entre 595 nm y 700 nm contra un blanco que contiene: ácido perclórico, difenilamina y acetaldehído, habiéndose sometido al mismo tratamiento térmico.

CAPITULO QUINTO

RESULTADOS

5. RESULTADOS

PRESENTACIÓN

La primera parte de la presente investigación estuvo abocada al establecimiento de una técnica de aislamiento organelar tal que ofreciera extractos proteicos ricos en DNA polimerasa plastídica y mitocondrial.

La técnica de aislamiento organelar por establecer debería garantizar un rendimiento organelar aceptable -traducido en una alta concentración de proteína organelar- así como la eliminación de la mayor parte de los contaminantes presentes en las fracciones organelares. Asimismo, las técnicas de lisis organelar y solubilización enzimática deberían ofrecer, además de un buen rendimiento proteico, la preservación de la actividad de la DNA polimerasa organelar.

Una vez logrados los objetivos anteriores la última parte de la presente investigación consistió en la caracterización enzimática de las DNA polimerasas con el objeto de incluirías dentro del grupo correspondiente.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos haciéndose hincapié en los criterios seguidos a lo largo de la misma y contrastando los resultados obtenidos con investigaciones afines a la presente.

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION ORGANELAR

Los criterios fundamentales sobre los cuales se han diseñado las técnicas de aislamiento organelar se basan en el hecho de que los organelos subcelulares de la misma especie e, independientemente de su origen tisular, comparten ciertas características físicas y químicas tales como el tamaño, la forma y la densidad de flotación.

El aislamiento diferencial de cada una de las fracciones subcelulares realizado por medio de las técnicas de centrifugación toma en cuenta las propiedades físicas y químicas de las membranas u organelos celulares por purificar.

Se denominan "Técnicas de aislamiento diferencial organelar" a aquellas técnicas que separan cada una de las fracciones celulares del homogenado celular por medio de centrifugaciones secuenciales a velocidades cada vez mayores (Graham, 1979). Las fracciones celulares -de densidad cada vez menor- son obtenidas secuencialmente en forma de un sedimento denominado comúnmente pellet o botón organelar.

Uno de los organelos subcelulares de mayor tamaño (de 4 a 6 μ de diámetro) y que presenta una alta densidad de flotación (1.32 g/cm^3 en vegetales) es el núcleo. Sus características físicas dan la pauta para que el aislamiento de la fracción nuclear -tanto en tejidos vegetales como animales- se lleve a cabo a bajas velocidades de centrifugación siendo, generalmente, uno de los primeros pasos en las técnicas de fraccionamiento celular.

Le siguen en tamaño los cloroplastos (20-35 μ de largo y 3-6 μ de diámetro) y las mitocondrias (4-7 μ de largo y 0.5-1 μ de diámetro) con valores de densidad de flotación de 1.21-1.24 y 1.18-1.2 g/cm^3 respectivamente (en vegetales). Su aislamiento se realiza a velocidades y tiempos mayores de centrifugación que en el caso de núcleos.

Además de los aspectos anteriores deben considerarse cuidadosamente otros parámetros. Graham (1979) menciona que tres de los aspectos más importantes son: a) la técnica de homogeneización, b) la composición de la solución de homogeneización empleada y c) las condiciones de corrida centrifugacional.

5.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS TÉCNICAS DE AISLAMIENTO ORGANELAR

5.1.1.1 ANTECEDENTES TÉCNICOS Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN

De acuerdo a las diferencias existentes entre los diferentes organelos y los tejidos de los cuales proceden, las condiciones de aislamiento organelar varían, tales como: velocidad, tiempo, viscosidad del medio, variedad de centrifuga seleccionada, etc. deseado y del tejido del cual proceden.

El objetivo final de Ortega (1988) era la cuantificación de la síntesis del DNA organelar *in vivo* en contraste con el objetivo del presente trabajo el cual consistió en el establecimiento de una técnica de aislamiento organelar con miras a la determinación del grado de síntesis de DNA *in vitro*. Por esta y otras razones es de esperar que las técnicas descritas por Ortega (1988) hayan sido evaluadas con base en distintos criterios a los manejados en la presente investigación:

Los dos criterios básicos para la evaluación de las técnicas de aislamiento organelar fueron: 1) el grado de actividad de la DNA polimerasa y 2) la respectiva concentración de DNA y de proteína finalmente recuperados.

De acuerdo a los objetivos de la presente investigación el primer criterio fue indispensable. Por su parte, la cuantificación del DNA en las fracciones organelares fue seguida como indicativo de la efectividad de las técnicas de aislamiento organelar así como el rendimiento proteico que las mismas ofrezcan.

5.1.1.2 TÉCNICA I DE AISLAMIENTO ORGANELAR

Se estableció el primer método de aislamiento organelar (ver Esquema I en el Capítulo "Procedimientos Experimentales"). En dicha técnica se lleva a cabo, en primer lugar, el aislamiento diferencial de los núcleos celulares y a continuación, el aislamiento simultáneo de plastidios y mitocondrias.

A) AISLAMIENTO NUCLEAR

La técnica utilizada en el aislamiento nuclear fue una adaptación de las técnicas descritas por Cheah y Osborne (1978) y Ortega (1988). Ambos reportan el aislamiento nuclear bajo las siguientes condiciones: 625 g (2200 rpm en nuestras condiciones de corrida) por 15 min.

Sin embargo, Christophe et al (1981) reporta una velocidad mayor de aislamiento nuclear (2000 g durante 10 min) por lo que, con el fin de asegurar un aislamiento nuclear más eficiente, se decidió en este aspecto probar una mayor velocidad de corrida. Es de hacerse notar que la completa eliminación de los núcleos constituía un requisito indispensable para garantizar que el DNA de la fracción celular fuera exclusivamente de plastidios y mitocondrias.

Después de varias pruebas experimentales, se observó que la fracción nuclear aislada a 1089 g (3000 rpm) por 10 min era más rica en DNA y en actividad de DNA polimerasa en comparación con la obtenida en la corrida a 625 g de aquí que la primera corrida haya sido establecida como parte de la Técnica I.

Como se mencionó anteriormente, el DNA fue la molécula seleccionada como "marcador organelar". El problema de la contaminación de las preparaciones con DNA nuclear fue superado al eliminar los núcleos del extracto crudo en la primera centrifugación con lo que el DNA de la fracción "plastídico-mitocondrial" pudo ser considerado como marcador exclusivo de dichos organelos.

B) AISLAMIENTO PLASTÍDICO Y MITOCONDRIAL

Una vez eliminados los núcleos del extracto crudo se sedimentaron conjuntamente los botones plastídico y mitocondrial. Lo anterior se realizó haciendo uso de la técnica descrita por Ortega (1988) en el aislamiento diferencial de mitocondrias. Era de esperarse que los plastidios sedimentaran junto con las mitocondrias puesto que los plastidios, al ser de mayor tamaño que las mitocondrias, requieren de velocidades más bajas de sedimentación (1900 g). La sedimentación de las pequeñas mitocondrias a 17,400 g arrastra consigo a la fracción plastídica.

Una vez obtenida la suspensión plastídica-mitocondrial se ensayó la actividad de DNA polimerasa. Como se observa en la Figura 5.1 dicha actividad fue detectable desde las primeras horas de germinación.

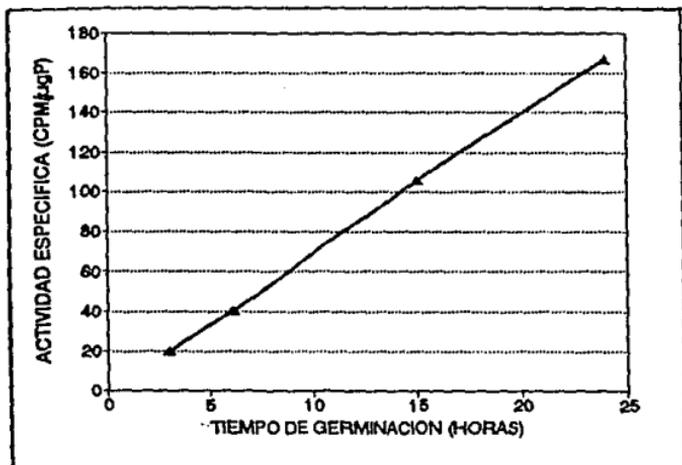


Fig. 5.1. CINÉTICA DE ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LAS DNA POLIMERASAS PLASTÍDICA Y MITOCONDRIAL A DIFERENTES TIEMPOS DE GERMINACIÓN. Se determinó la actividad específica enzimática como la cantidad de ³H-timidina incorporada al DNA activado por microgramo de proteína (CPM/μgP) por la fracción-mezcla de ambos organelos aislados diferencialmente de embriones de maíz germinados durante 3, 6, 15 y 24 h (ver técnica en el apartado 4.3).

La actividad específica detectada entre las 3 y 24 horas de la germinación muestra un comportamiento lineal con un aumento de aproximadamente 8.4 veces. Los valores de cpm y μg de proteína obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.

TABLA 5.1. Valores de cpm y μg de prot. de la Figura 5.1.

Horas de germinación	CPM	μg de prot.	cpm/ μg .prot.
3	2124	109	19.9 [±] 0.35
	2002	99	
6	2700	70	40.4 [±] 1.8
	2322	55	
15	4312	33.8	109.5 [±] 18.1
	4660	51.0	
24	6500	42.0	167.7 [±] 12.9
	6788	37.6	

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Ortega (1988). En dicha investigación se reporta que la síntesis de DNA organelar en ejes embrionarios de maíz es detectable desde tiempos tempranos de la germinación: desde las 4 h se observa la incorporación de una cantidad importante de marca radioactiva al DNA organelar. Dicha marca se incrementa hacia las 6 h de germinación haciéndose notable a las 20 h tiempo en el cual dicha incorporación específica se ha incrementado en un 50% aproximadamente con respecto a la marca inicial.

En la Figura 5.2 se muestra que la concentración del DNA organelar exhibe un comportamiento similar al de la actividad de DNA polimerasa dentro del mismo lapso germinativo: a las 3 h de germinación se detectaron 16.1[±] 1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA los cuales se incrementan notablemente hasta un valor de 70[±] 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 15 h de germinación.

5.1.1.3. TÉCNICA II DE AISLAMIENTO ORGANELAR

Se probó un segundo método de aislamiento organelar por medio del cual se obtuviera cada organelo por separado para lo cual, una vez eliminados los núcleos celulares, se incluyó una corrida centrifugacional a la Técnica I que hiciera posible la separación diferencial de los plastidios y las mitocondrias organelares.

Para llevar a cabo el aislamiento plastídico diferencial se modificaron las condiciones de corrida reportadas por Ortega

(1988) quien los aisla a 5900 g (7000 rpm) por 10 min y en su lugar se adaptó el método de Biggins (1971) quien reporta 1900 g (4000 rpm) por 10 min. Se observó que el extracto plastídico de 1900 g mostraba una actividad específica de DNA polimerasa del doble con respecto a la del extracto de 5900 g. Se hablará más al respecto en la Discusión.

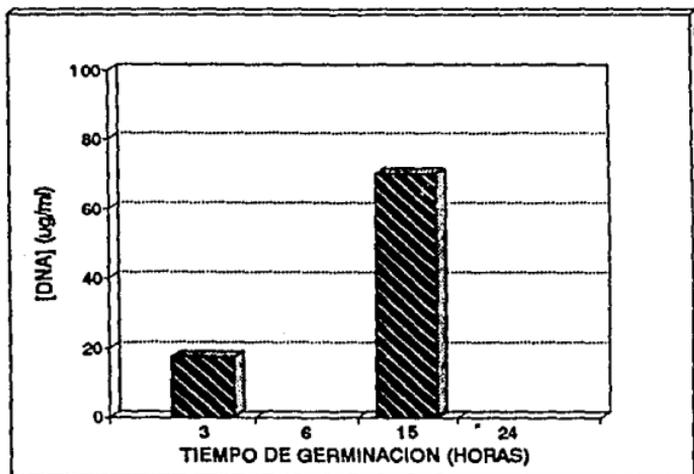


Fig. 5.2. CONCENTRACIÓN DEL DNA PLASTÍDICO-MITOCONDRIAL A DOS DIFERENTES TIEMPOS DE GERMINACIÓN. Se cuantificó la concentración de DNA en la fracción-mezcla de plastidios y mitocondrias de ejes embrionarios de maíz de 3 y 15 h de germinación. La cuantificación se llevó a cabo por la técnica de Giles y Myers (1957) (ver apartado 4.10).

En el caso del aislamiento mitocondrial sí se adaptó tal cual lo describe Ortega (1988): 17,400 g (12,000 rpm) por 20 min. Dicha técnica es una adaptación de la técnica reportada por Zelitch (1967): 10,000 g (9100 rpm) por 20 min.

Como se observa en la Tabla 5.2 las veces de purificación de la DNA polimerasa plastídica es muy buena (4.2 veces de purificación) en comparación con la actividad obtenida por Sala *et al.*, (1980), en la purificación de cloroplastos de hojas de espinaca (2 veces de purificación).

La pureza lograda en los plastidios mediante la centrifugación diferencial fue mayor aún a la del extracto-mezcla (3.2 veces de purificación) a pesar de que dicho extracto contiene ambas DNA polimerasas organelares. Al parecer, la actividad de las DNA polimerasas aisladas en el mismo extracto se encuentra parcialmente inhibida.

TABLA 5.2. TABLA COMPARATIVA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS DNA POLIMERASAS PLASTÍDICA Y MITOCONDRIAL DE MAÍZ EN EXTRACTOS-MEZCLA Y DE AISLAMIENTO DIFERENCIAL ORGANELAR.

Fracción aislada	CPM/ μ g.prot.	mg/ml prot	Veces de purificación	Técnica
EXTRACTO CRUDO	33.3 \pm 4.5	4.5 \pm 1.5	1.0	I y II
EXTRACTO-MEZCLA ^a	105.8 \pm 11.6	3.2 \pm 1.1	3.2	I
AISLAMIENTO DIFERENCIAL				
MITOCONDRIAS	42 \pm 8.6	2.14 \pm 0.36	1.3	II
PLASTIDIOS	141.3 \pm 41.2	1.7 \pm 0.99	4.2	II
GRADIENTE DE PURIFICACIÓN				
MITOCONDRIAS	96.2 \pm 25.6	1.38 \pm 0.38	2.9	II
PLASTIDIOS	340.5 \pm 99.3	0.4 \pm 0.22	10.2	II

a) Se denomina extracto-mezcla a la fracción de ambos organelos (plastidios y mitocondrias).

Observaciones adicionales ofrecieron algunas otras evidencias en torno a la probable existencia de algún inhibidor de la DNA polimerasa: al ensayar la actividad enzimática del homogenado celular inicial a diferentes concentraciones de proteína se observó con sorpresa que la actividad específica de los extractos diluidos 1:2 y 1:4 era mayor que la actividad enzimática del extracto concentrado (ver Figura 5.3). En la Tabla 5.3 se anexan

los valores de cpm y los promedios obtenidos de los duplicados de la Figura 5.3

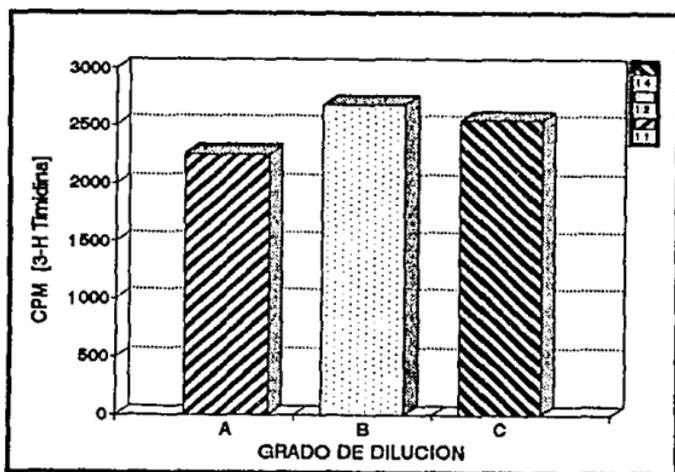


Fig. 5.3. ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA TOTAL EN DIFERENTES DILUCIONES DE EXTRACTO CRUDO DE EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ. Se cuantificó la actividad de DNA polimerasa en tres distintas diluciones: un extracto concentrado (1:1) y dos diluidos (1:2 y 1:4). La Tabla 5.3 muestra los valores obtenidos con sus respectivos promedios para cada duplicado.

TABLA 5.3.
Valores de cpm de la Figura 5.3

Dilución	CPM	Promedio
1:1	2482 2184	2333 [±] 149
1:2	2777 2589	2683 [±] 94
1:4	2430 2658	2544 [±] 144

Probablemente, la dilución de los extractos proteicos provoque, a su vez, la dilución de algún inhibidor de las DNA polimerasas organelares que probablemente exista en el extracto crudo; de manera similar a lo reportado por Coello (1989) en cuyo trabajo se propone la probable existencia de algún inhibidor de las DNA polimerasas en el extracto de hojas de maíz.

Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para probar las especulaciones hechas al respecto y es necesario realizar más investigaciones.

En el caso de la DNA polimerasa mitocondrial, las veces de purificación obtenida (1.3 veces) no es tan grande como el reportado por Christophe *et al.*, (1981) de 8 veces de purificación en mitocondrias de trigo.

Por otra parte, a diferencia de la DNA polimerasa plastídica, las veces de purificación lograda para la DNA polimerasa mitocondrial es menor que en el caso de la DNA polimerasa en el extracto-mezcla (ver Tabla 5.2). Seguramente esto se deba a que las condiciones de sedimentación de la fracción mitocondrial arrastra una gran cantidad de contaminantes que inhiben la actividad de la enzima mitocondrial.

Finalmente, con respecto al rendimiento organelar de esta técnica, el hecho de que la suma de las concentraciones individuales del DNA plastídico y mitocondrial fuera muy semejante a la cantidad de DNA del extracto-mezcla (no se muestran resultados) fue indicativo de que las técnicas de aislamiento organelar diferencial ofrecían un buen rendimiento, traducido en una mínima pérdida de proteína organelar.

Sin embargo, se consideró adecuado el establecimiento de una técnica de purificación organelar con el fin de obtener fracciones proteicas más limpias.

5.2 TECNICA DE PURIFICACION ORGANELAR

A pesar de que la técnica II ofrecía un buen rendimiento organelar, las fracciones organelares presentaban todavía un alto grado de contaminación, especialmente la fracción mitocondrial pues, a pesar de que en las técnicas de aislamiento diferencial gran parte del material contaminante es arrastrado mediante la centrifugación de lavado, generalmente se requiere un paso adicional de purificación organelar.

En la purificación de organelos de embriones de maíz, Ortega (1988) utilizó gradientes discontinuos de Percoll en la purificación mitocondrial. Sin embargo, los resultados fueron poco satisfactorios debido al bajo rendimiento organelar obtenido por lo que en dicho trabajo se optó finalmente por separar a los organelos únicamente por aislamiento diferencial sin realizar ninguna purificación organelar posterior.

En el presente trabajo se optó por llevar a cabo una purificación organelar posterior al aislamiento diferencial con el objetivo de que la caracterización de las DNA polimerasas organelares fuera más confiable.

La técnica desarrollada fue una adaptación de las técnicas reportadas por Pardo *et al.*, (1979) y Fuesler *et al.*, (1984). La adopción de dichas técnicas se consideró apropiada ya que fueron establecidas para la purificación de amiloplastos de cotiledones de pepino; es decir, fueron establecidas para el aislamiento de organelos en un grado de desarrollo similar al de los plastidios y mitocondrias de embriones de maíz.

Es muy común la utilización de una o dos capas de gradientes de sacarosa de diferente densidad a través de las cuales se distribuyen las diferentes partículas contaminantes que han sedimentado simultáneamente con las partículas de interés lo que finalmente permite aislar a la partícula con un mayor grado de pureza.

Los criterios fundamentales bajo los cuales se estableció la composición de los gradientes de sacarosa fueron: la actividad de la DNA polimerasa y la concentración de proteínas presentes en el botón organelar.

La Tabla 5.2 muestra las veces de purificación de ambas DNA polimerasas organelares a lo largo de la purificación plastídica y mitocondrial.

La actividad específica de la DNA polimerasa de organelos purificados aumenta en 2.4 y 2.3 veces en comparación con la actividad observada en plastidios y mitocondrias respectivamente aislados diferencialmente. Es probable que dicho aumento se alcance gracias a la eliminación de los contaminantes o de algún factor inhibitorio de la actividad polimerizante del DNA presente en los extractos organelares no purificados.

Sin embargo, nuevamente en el caso de mitocondrias la purificación obtenida (2.9 veces de purificación) no fue tan grande como la reportada por otros investigadores. En el caso de las mitocondrias de trigo Christophe *et al.*, (1981) reporta una purificación de 25 veces con respecto al extracto crudo. La diferencias entre ambas técnicas de purificación mitocondrial radica principalmente en la composición del gradiente de sacarosa.

En el caso del gradiente de plastidios, a pesar de que la técnica dio muy buenos resultados de pureza organelar (10.2 veces de purificación), no fue posible estandarizar una técnica reproducible ya que en todos los casos se observó una gran fluctuación en la cantidad de proteína organelar recuperada.

Existen otras técnicas de purificación cloroplástica que reportan la sedimentación organelar, a través de gradientes de sacarosa, a velocidades mayores que la utilizada en la presente investigación (Sala et al., 1980) así como la utilización de gradientes de sacarosa de diferente composición (Pardo et al., 1979). Por lo que, en primer término, consideraría la conveniencia de probar otras condiciones de aislamiento plastídico con el fin de mejorar el rendimiento de la técnica.

5.2 ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA DE RUPTURA ORGANELAR

La solubilización de las DNA polimerasas organelares fue el primer paso de la técnica encaminada de forma más directa a la purificación de la misma. Una vez establecida la técnica de aislamiento organelar se procedió a la evaluación de distintas técnicas de ruptura organelar y de solubilización enzimática mediante las cuales fuera posible obtener ambas fracciones proteicas organelares libres de membranas. La eliminación de las membranas organelares hace posible llevar a cabo una caracterización enzimática más reproducible ya que frecuentemente los restos membranales interfieren en el ensayo de las DNA polimerasas organelares.

En un gran número de investigaciones llevadas a cabo en mitocondrias y cloroplastos (Castroviejo *et al.*, 1979; Christophe *et al.*, 1981; Echeverría *et al.*, 1991; Knopf *et al.*, 1976 y Sala *et al.*, 1980) se reporta que la lisis organelar y la solubilización de las DNA polimerasas organelares se logra mediante la aplicación de técnicas similares a la que a continuación se describe: el extracto organelar se somete a un primer tratamiento con algún detergente (Digitonina, Tritón X-100 u otros) y a continuación a sonicación o a la acción mecánica de homogeneizadores eléctricos.

Sin embargo, en el presente trabajo se probó inicialmente la ruptura organelar mediante dos "técnicas alternativas" en las cuales se evitara el contacto de las enzimas con el detergente a fin de evitar cualquier interferencia que el mismo pudiera presentar sobre la actividad de la DNA polimerasa. Por otro lado, no se consideró adecuado trabajar con homogeneizadores eléctricos dada la baja cantidad de material vegetal del que se disponía.

En resumen, el establecimiento de una buena técnica de lisis-solubilización organo-proteica requirió de la evaluación de cinco diferentes técnicas que a continuación se describen; finalmente la quinta técnica fue la establecida en la presente investigación.

5.3.1. CHOQUE TÉRMICO

El choque térmico consiste en someter a la suspensión organelar a cambios bruscos de temperatura (de 20°C a -70°C tres veces) seguida de agitación breve y vigorosa (adaptación de Meléndez, 1990).

Se observó que dicho tratamiento térmico provocó un incremento en la actividad específica de la DNA polimerasa en ambas suspensiones organelares. Sin embargo, el problema surgió al tratar de obtener una fracción proteica más pura separando los restos membranales de la fracción soluble.

La separación del botón membranar (centrifugación postribosomal realizada a $100,000 \times g$ durante 1 h todos los casos) provocaba un descenso de aproximadamente el 50% de la actividad enzimática inicial puesto que los restos membranales arrastraban el otro 50% de la actividad DNA-polimerizante.

Finalmente, dado el bajo rendimiento que esta técnica ofrecía, se decidió proceder a la modificación de algunas de las condiciones manejadas en la misma.

5.3.2. CHOQUE TÉRMICO EN PRESENCIA DE EDTA

La segunda técnica de lisis organelar fue la adaptación de la técnica reportada por Meléndez (1990). En dicha investigación se reporta la lisis nuclear por choque térmico pero esta vez en presencia de altas concentraciones de EDTA (30 mM). El EDTA es un agente quelante que forma complejos con los iones calcio interfiriendo en la acción estabilizadora que dicho ión realiza sobre las membranas. La ruptura membranar se facilita al someterlas, en estado de baja integridad estructural, a cambios bruscos de temperatura.

Sin embargo, se observó el mismo problema que en el caso anterior. Mientras el extracto organelar tratado no se sometiera a la corrida centrifugacional de eliminación membranar, la actividad específica de la DNA polimerasa aumentaba en la fracción de lisis organelar con respecto a la suspensión organelar inicial; pero una vez "clarificada" la fracción después de la eliminación membranar, gran parte de la actividad enzimática era arrastrada con las mismas.

Además, la presencia de EDTA en alta concentración afectaba la actividad de la DNA polimerasa ya que este agente quelante forma complejos muy estables con los iones Mg^{2+} requeridos en el ensayo de DNA polimerasa.

Se intentó eliminar dicho agente quelante mediante la diálisis de la fracción proteica pero la actividad enzimática disminuía de manera considerable después de dicho tratamiento. Al parecer, al igual que otras DNA polimerasas, e.g. en mitocondrias de células HeLa (Knopf et al., 1976), y algunas enzimas solubles de maíz (García, 1991), las DNA polimerasas organelares de maíz no soportan la diálisis.

5.3.3. TRITÓN X-100

Un tercer método de lisis organelar fue la utilización del detergente Tritón X-100 al 0.1% con el cual cada suspensión organelar fue incubada a 4°C durante 15 min, después de la cual eran agitadas vigorosamente para proceder al ensayo de la DNA polimerasa.

Se realizó una observación interesante con respecto al efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de la DNA polimerasa organelar. En el ensayo de actividad de DNA polimerasa realizado a los pocos minutos después del tratamiento con tritón, se observaba que la presencia del detergente provocaba un efecto "activante" sobre la DNA polimerasa en ambas suspensiones organelares. Sin embargo, minutos más tarde se hacía necesario diluir las fracciones organelares ya que el contacto prolongado de las DNA polimerasas con el tritón provocaba el efecto contrario al inicialmente observado: la actividad de las enzimas se perdía paulatinamente. Y se encontró que al diluir al doble el volumen de la fracción soluble lo cual a su vez causaba la dilución del detergente se lograba conservar por más tiempo la actividad DNA-polimerizante.

Sin embargo, en este caso también se presentó el problema del arrastre de la actividad DNA-polimerizante en las membranas organelares detectándose en éstas la mayor parte de la actividad enzimática.

Las observaciones anteriores podrían ser explicadas al tomar en cuenta la naturaleza química del Tritón. El Tritón X-100 contiene, dentro de su estructura, una zona altamente hidrofóbica. Esta zona pudiera estar ofreciendo un ambiente adecuado para que la DNA polimerasa actúe de manera óptima. Sin embargo, este "efecto activante" se observa sólo en los primeros minutos de contacto del detergente con las enzimas, pues el contacto prolongado provoca una drástica disminución de la actividad enzimática probablemente por la desnaturalización de las proteínas: alteración de su conformación proteica y pérdida de su actividad enzimática.

Así pues, en vista de que con las técnicas anteriores no era posible provocar la completa solubilización de las DNA polimerasas organelares, se optó por probar la ruptura organelar a mayores concentraciones de detergente en un rango de 0.1 a 0.8% de Tritón X-100. Sin embargo, con ninguna de las diferentes concentraciones de detergente probadas se logró extraer totalmente la actividad de DNA polimerasa hacia la fracción soluble.

5.3.4. SONICACIÓN

El siguiente método ensayado fue la lisis organelar por medio de sonicación (5 golpes con duración de 10-15 seg cada 30 seg. evitando el sobrecalentamiento) en presencia y ausencia de Tritón X-100 al 0.1% ; pero aun con esta técnica altamente agresiva se obtuvieron los mismos resultados no satisfactorios que con los métodos anteriores.

5.3.5. TRITÓN Y NUCLEASA

Como quinto método de lisis-solubilización organo-proteica se adaptó la técnica descrita en Echeverría *et al.*, (1991), en la cual se reporta la digestión de los ácidos nucleicos de mitocondrias de trigo como paso fundamental en la solubilización de la DNA polimerasa mitocondrial.

Se llevó a cabo la técnica de lisis organelar descrita en el capítulo de "Procedimientos Experimentales" la cual consiste en:

- 1.- Ruptura organelar en presencia de Tritón y, a continuación
- 2.- Digestión de los ácidos nucleicos con nucleasa.

Echeverría *et al.*, (1991) reporta que la DNA polimerasa mitocondrial se encuentra en íntima relación con el DNA mitocondrial el cual, a su vez, se encuentra enclavado en la membrana de la mitocondria, por lo que, una vez digeridos los ácidos nucleicos, es posible liberar a la DNA polimerasa hacia la fracción soluble.

En la Figura 5.4 se observa la actividad de la DNA polimerasa del extracto-mezcla plastídica-mitocondrial a cada paso del tratamiento con Tritón-Nucleasa. Los valores son el promedio de dos ensayos idénticos.

La columna I representa la actividad específica inicial de la suspensión-mezcla de ambos organelos (25 cpm/ μ g prot.). Después de la ruptura con tritón se observa un incremento de la actividad enzimática total (suma de la segunda y tercera columnas) de la cual solamente una cuarta parte se libera hacia la fracción soluble (columna sobrenadante-T con 25 cpm/ μ g prot.) mientras que aproximadamente las otras tres cuartas partes de la actividad enzimática son arrastradas con las membranas organelares (columna botón-T con 75 μ g prot.).

El aumento en la actividad específica de la DNA polimerasa después de la ruptura organelar con tritón probablemente se deba a que dicha ruptura permite el establecimiento de un mayor contacto

entre la DNA polimerasa unida a membrana y el templado utilizado (DNA activado) en comparación al existente en lo organelos intactos. Por otra parte, a pesar de que la cantidad de DNA polimerasa que se solubiliza es menor a la que permanece enclavada a las membranas, dicha enzima se encuentra en un ambiente más puro que le permite actuar más libremente mostrando una actividad especifica casi idéntica a la del extracto inicial.

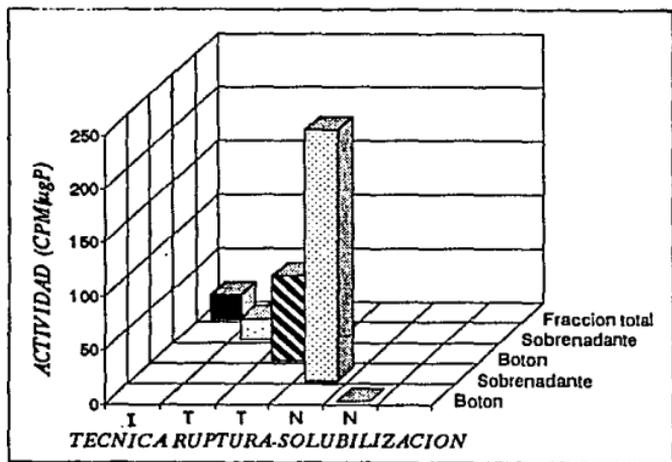


Fig. 5.4. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA DNA POLIMERASA DETECTADA EN LAS FRACCIONES SOLUBLE Y MEMBRANAL DE LA FRACCIÓN PLÁSTICO-MITOCONDRIAL DESPUÉS DE SER TRATADA CON DOS TÉCNICAS DE RUPTURA-SOLUBILIZACIÓN ORGANO-PROTEICA. La fracción mezcla inicial sin tratamiento (columna I) se sometió a dos diferentes técnicas de ruptura-solubilización organo-proteica: con tritón (T) y con tritón-nucleasa (N). A continuación se separaron el sobrenadante y el botón y se cuantificó en cada uno la actividad específica de la DNA polimerasa (CPM/μg proteína).

Es importante mencionar que, dada la gran heterogeneidad de la suspensión membranar, el ensayo de DNA polimerasa en los mismos es muy poco reproducible. Dicho extracto contiene una gran cantidad de restos membranales de diversos tamaños lo cual, aunado al hecho de que la DNA polimerasa se encuentra unida al DNA enclavado a la membrana provoca que la cantidad de enzima recolectada en cada alícuota varíe entre los ensayos y en consecuencia su actividad enzimática también varíe de un ensayo a otro.

Interesantemente, se observó que al degradar los ácidos nucleicos en el extracto de lisis organelar, el botón membranar presenta una actividad enzimática nula (columna botón-N) en comparación con la actividad de DNA polimerasa de la fracción soluble (columna sobrenadante-N) la cual se incrementa hasta 230 cpm/ μ g prot. en comparación con la actividad liberada con la sola ruptura organelar (70 cpm/ μ g prot.).

Estos resultados demostraron que las otras técnicas de solubilización enzimática son capaces de solubilizar sólo una pequeña parte de la DNA polimerasa total mientras que la mayor parte permanece unida a los restos membranales.

Lo anterior se comprueba al comparar las actividades enzimáticas del extracto soluble después de la lisis organelar con la del extracto soluble después de la digestión de los ácidos nucleicos en los organelos rotos.

El drástico incremento en actividad enzimática después del tratamiento con nucleasa es una prueba más de que la DNA polimerasa *in vitro* actúa más eficientemente al estar libre de los restos organelares que al estar unida a ellos. Esto ciertamente contrasta con lo que debiera ser su actividad *in vivo* en el cual el medio más propicio para su actividad se dará cuando la enzima interaccione con el DNA enclavado en las membranas del organelo correspondiente.

5.3 CARACTERIZACION DE LAS DNA POLIMERASAS PLASTIDICA Y MITOCONDRIAL

La caracterización de una enzima y el conocimiento de su mecanismo de acción implica la determinación de parámetros tales como: la especificidad de sustrato, la naturaleza de sus inhibidores y el análisis cinético de la actividad catalítica en función de diferentes condiciones de reacción (pH, fuerza iónica, presencia de ciertas sales, temperatura, etc.).

En la presente investigación se caracterizaron ambas DNA polimerasas en distintas condiciones de reacción, a saber: la presencia de inhibidores, la utilización de dos diferentes templados con dos cationes distintos.

5.3.1 EFECTO DE INHIBIDORES

Se cuantificó el porcentaje de actividad de ambas DNA polimerasas organelares frente a una sola concentración de los tres inhibidores que a continuación se mencionan.

5.3.1.1 AFIDICOLINA

Una de las características que distinguen a la DNA polimerasa α de las DNA polimerasas β y γ es la susceptibilidad de la primera al antibiótico antiviral afidicolina en contraste con las segundas que son totalmente resistentes.

Dicha droga -producida por *Cephalosporium aphidicola* con fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_6$, (ver Figura 5.5) - inhibe la replicación del DNA nuclear y viral en células animales (Brundret et al., 1972; Ohashi et al., 1978) así como la actividad de las DNA polimerasas δ y ϵ , ambas implicadas en la replicación nuclear (Kornberg y Baker, 1992).

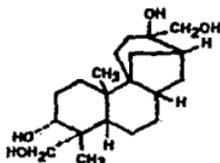


Fig. 5.5. Estructura química de la afidicolina.

Sin embargo, la afidicolina no inhibe la síntesis del DNA mitocondrial ni cloroplástico ni las actividades de la DNA polimerasa I de *E. coli* y de la transcriptasa reversa (Galli, 1982).

Por otra parte, se ha reportado que la afidicolina actúa como inhibidor competitivo del dCTP por lo que su acción depende estrictamente de las concentraciones relativas del sustrato e inhibidor a una concentración fija de enzima (Iwamura y Aoshima, 1985; Sala et al., 1980).

El comportamiento de las DNA polimerasas organelares de maíz frente a la afidicolina se muestra en la Figura 5.6.

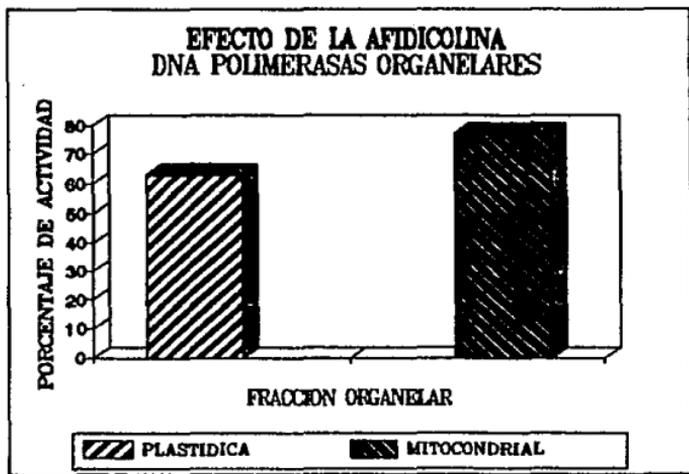


Fig. 5.6. EFECTO DE LA AFIDICOLINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMBAS DNA POLIMERASAS ORGANELARES. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial de maíz a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de afidicolina (relación 1:2 de afidicolina/dCTP). El control sin inhibidor se ensaya en presencia de disolvente (DMSO) (ver técnica en el apartado 4.6.1.1).

Puede observarse que ambas enzimas organelares son resistentes al inhibidor, sin embargo, la DNA polimerasa mitocondrial parece ser levemente más resistente a la afidicolina que la plastídica.

Al comparar el comportamiento de las distintas DNA polimerasas organelares vegetales y animales se observa que, en general, (ver Tablas 5.4 y 5.5)., ambas DNA polimerasas organelares de maiz son menos resistentes a la afidicolina que cualquier otra enzima organelar hasta ahora reportada.

Las DNA polimerasas mitocondriales de trigo y soya presentan un 100% de actividad hasta una relación de inhibidor/sustrato de 1.2:1 y 1.8:1 respectivamente; por su parte la DNA pol. mit. de células HeLa presenta solamente un 10% de inhibición aun siendo la relación inh/sust. mayor a la probada en la presente investigación (2.5:1).

TABLA 5.4. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales frente a la afidicolina.

T E J I D O	CONC. µg/ml	RELACIÓN	% DE ACTIVIDAD:
VEGETAL	AFIDICOLINA	AFID.: dCIP	TIPO DE ENZIMA
Maiz	50	0.5:1	77% : resistente
Trigo ^a	5 - 20	0.3:1 - 1.2:1	100% : resistente
Soya ^b	20	1.8:1	100% : resistente
ANIMAL			
Cél. HeLa ^c	25	2.5:1	90% : resist.

- a) Christophe *et al.*, 1981;
 b) Heinhorst *et al.*, 1990; (pico I de DEAE)
 c) Zimmerman *et al.*, 1980.

Las DNA polimerasas mitocondriales de trigo y soya son totalmente resistentes a una relación de 1.2:1 de inhibidor; mientras que la enzima de mitocondrias de células HeLa se inhibe en solo un 10% con una relación de 2.5:1.

Las DNA polimerasas cloroplásticas son también altamente resistentes a afidicolina a una relación inhibidor/sustrato entre 1.5:1 y 1.8:1 para espinaca y soya respectivamente.

TABLA 5.5 Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y cloroplásticas frente a la afidicolina.

T E J I D O VEGETAL	CONC. µg/ml AFIDICOLINA	RELACION AFID.:dCTP	% DE ACTIVIDAD: TIPO DE ENZIMA
PLASTIDIOS			
Maiz	50	0.5:1	63 [±] 13 resistente
CLOROPLASTOS			
Soya ^a	20	1.8:1	100% : resistente
Chicharo ^b	no ind	no ind.	100% : resistente
Espinaca ^c	50.7	1.5:1	100% : resistente
Jitomate ^d	40.6	no ind.	97% : resistente

a) Heinhorst et al., 1990; (pico I de DEAE);

b) Mckown et al., 1984;

c) Sala et al., 1980; d) Serra et al., 1990.

no ind.: dato no indicado en la referencia.

5.3.1.2. N-ETILMALEIMIDA (NEM)

Este reactivo es un inhibidor específico de las DNA polimerasas II y III en procariotes y de las DNA polimerasas α , γ y δ en eucariotes. La DNA polimerasas I de *E. coli* y β de animales son resistentes.

Este reactivo tiene la fórmula molecular $C_6H_7NO_2$ y la estructura química mostrada en la Figura 5.7:

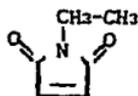


Fig. 5.7. Estructura química de la N-etilmaleimida (NEM).

Es un inhibidor que actúa bloqueando los grupos sulfhidrilo de la proteínas. Dependiendo de la localización de dicho grupo dentro de la secuencia aminoacídica y de la relevancia del mismo dentro de la actividad catalítica de la enzima será el grado de inhibición que ésta presente con NEM.

Las DNA polimerasas organelares de maíz fueron ensayadas en presencia de NEM 10 mM, obteniéndose los resultados de la Fig. 5.8.



Fig. 5.8. EFECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMBAS DNA POLIMERASAS ORGANELARES. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial de maíz frente a una concentración de 10 mM de NEM a pH 7.6. El control sin inhibidor se ensaya en presencia del disolvente (DMSO) (ver apartado 4.6.1.3).

La Figura 5.8 muestra que las DNA polimerasas plastídica y mitocondrial presentan un comportamiento diferencial frente a este inhibidor: mientras que la enzima mitocondrial es altamente susceptible, la enzima plastídica presenta una mediana resistencia a NEM.

A la misma concentración de NEM (10 mM) la enzima plastídica es activa en un 54% ± 4 mientras que la enzima mitocondrial es altamente inhibida presentando sólo un 9.3% ± 0.7 de actividad.

Por otra parte, al comparar el comportamiento de distintas DNA polimerasas organelares de otros vegetales y animales, se observa que es similar en la gran mayoría (ver Tabla 5.6).

Las tres DNA polimerasas mitocondriales animales que se presentan son altamente susceptibles ya que la NEM abate la actividad enzimática casi por completo y en el caso especial de la enzima de sinaptosomas neuronales de rata el efecto inhibitorio se observa a concentraciones tan bajas de NEM de 2 mM, todas ellas a un pH de entre 7 y 8. La DNA polimerasa mitocondrial de maíz es también altamente susceptible a la N-etilmaleimida.

Con respecto a las otras dos DNA polimerasas mitocondriales vegetales, se observa que la de soya también es altamente susceptible, pero el gran contraste lo constituye la enzima de trigo que a concentraciones tan altas como 12 mM, es altamente resistente.

Al comparar el comportamiento de la DNA pol. plastídica de maíz con las DNA pol. cloroplásticas y cromoplásticas de otros vegetales (Tabla 5.7) se observa que el porcentaje de actividad de la DNA polimerasa plastídica con NEM 10 mM (54%) es muy grande con respecto al que presentan las otras DNA polimerasas mencionadas en las mismas condiciones de pH y aun más, dicho valor se encuentra en el límite en el cual no se puede considerar como una enzima perteneciente, de forma neta, a ninguno de los dos tipos de enzimas: (susceptibles y resistentes) pero en vista de que dicha enzima conserva un gran porcentaje de su actividad en comparación con las DNA pol. de cloroplastos de otros vegetales, en el presente trabajo se le considerará como una "MEDIANAMENTE RESISTENTE A NEM".

Las DNA polimerasas cloroplásticas de soya, chícharo, espinaca y jitomate son claramente susceptibles a NEM. A concentraciones tan bajas de 1 mM, el porcentaje de actividad de las DNA pol. cloroplástica de soya y jitomate es de solo el 26 y 19% respectivamente y del 34% para la DNA pol. cromoplástica de jitomate. En el caso de las DNA polimerasas cloroplástica de espinaca y la cromoplástica de jitomate, se observa una inhibición casi total a una concentración tan baja de 2 mM de NEM con un

TABLA 5.6. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales frente a la N-etil-maleimida.

T E J I D O	CONC. NEM mM	% DE ACTIVIDAD: TIPO DE ENZIMA
VEGETAL		
Maíz	10	9.3 [±] 0.7 susceptible
Trigo ^a	2 - 12	90% : resistente
Soya ^b	no ind.	0% : susceptible
ANIMAL		
Cél. HeLa ^c	10	2% : susceptible
Hepatocitos de rata ^c	10	6% : susceptible
Sinaptosomas neuronales de rata ^d	2	1% : susceptible

a) Christophe *et al.*, 1981

b) Heinhorst *et al.*, 1990; (pico I de DEAE)

c) Bolden *et al.*, 1977;

d) Hubscher *et al.*, 1977

no ind.: dato no indicado en la referencia

porcentaje de actividad del 7% en ambos casos, en contraste con la DNA polimerasa plastídica de maíz con un porcentaje de actividad del 54% a 10 mM de NEM.

La mediana resistencia de la DNA polimerasa plastídica de maíz a NEM es semejante al comportamiento de la DNA polimerasa mitocondrial de trigo frente al mismo reactivo (Tabla 5.6); sin embargo, en este caso la enzima mitocondrial de trigo es totalmente resistente al reactivo en un rango de concentraciones de 2-12 mM de NEM mientras que la plastídica de maíz es solamente medianamente resistente.

TABLA 5.7. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica y cloroplástica frente a la N-etilmaleimida.

TEJIDO VEGETAL	CONC. NEM mM	% DE ACTIVIDAD: TIPO DE ENZIMA
Maíz	10	54 ± 4 medianamente resistente
Soya ^a	1	26% : susceptible
Chicharo ^b	no ind.	no ind.: susceptible
Espinaca ^c	2	7% : susceptible
Jitomate ^d	1	19% : susceptible
Cromoplastos de jitomate ^d	1 - 2	34 - 7% susceptible

a) Heinhorst et al., 1990;

b) Mckown y Tewari, 1984;

c) Sala et al., 1980; d) Serra y Carrillo, 1990.

no ind.: dato no indicado en la referencia.

5.3.1.3 DIDESOXITIMIDINA TRIFOSFATO (ddTTP)

La didesoxitimidina-trifosfato (ddTTP), al igual que la afidicolina, es un inhibidor competitivo. Este reactivo compite con el sustrato normal dTTP. Se ha reportado que en algunos casos (Sala et al., 1982) el ddTTP se combina reversiblemente con el centro activo de la enzima compitiendo por éste con el sustrato. Pero en otros casos su inhibición es irreversible (Fukuda y Komamine, 1981).

La velocidad de reacción con un inhibidor competitivo depende estrictamente de las concentraciones relativas de sustrato e inhibidor a una concentración fija de enzima.

En este caso, la única diferencia estructural entre el inhibidor y el sustrato es que el primero contiene un átomo de H en el carbono 3' en vez de un grupo -OH como en el dTTP. La estructura del ddTTP se observa en la Figura 5.9 y su fórmula molecular es $C_{10}H_{17}O_{13}N_2P_3$.

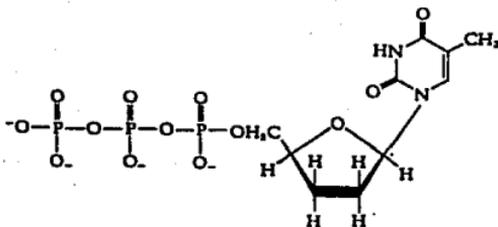


Fig. 5.9. Estructura química de la 3'-didesoxitimidina trifosfato (ddTTP).

La Figura 5.10 muestra el comportamiento de ambas DNA polimerasas organelares de maíz frente al ddTTP.

Ambas DNA polimerasas organelares son susceptibles a este inhibidor a una relación de 1:2 (ddTTP/dTTP) sin embargo, dentro de su susceptibilidad, la DNA polimerasa plastidica es más resistente que la mitocondrial con un 36.7% 3.4 de actividad, en contraste con la DNA polimerasa mitocondrial con un 16.2% 6.2 a esta misma concentración de ddTTP.

Al comparar el comportamiento de las DNA polimerasas organelares de maíz con el de otras DNA polimerasas de tejidos animales y vegetales, se observa lo siguiente:

La DNA polimerasa mitocondrial de soya es altamente resistente a este reactivo (ver Tabla 5.8): esta enzima soporta, con una actividad del 85-75%, una relación equimolar de ddTTP:dTTP y es más, a una relación de 10:1 su actividad se conserva del 50 al 30%. Por su parte, la enzima de trigo conserva su actividad en un 45% en un rango de 0.5:1 - 1:1; esta enzima es más resistente que la de maíz pero entra en el grupo de enzimas susceptibles.

En contraste con lo anterior, la enzima de maíz presenta una actividad del 16.2% 6.2 a una relación tan pequeña de 0.5:1.

La DNA polimerasa mitocondrial de maíz presenta un comportamiento frente a la ddTTP similar al de las DNA polimerasas de su contraparte animal: tanto las primeras como las segundas muestran ser más susceptibles a este inhibidor que las DNA polimerasas mitocondriales de trigo y soya.



Fig. 5.10. EFECTO DE LA 2'-3' DIDESOXITIMIDINA TRIFOSFATO (ddTTP) SOBRE LA ACTIVIDAD DE AMBAS DNA POLIMERASAS ORGANELARES. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastidica y mitocondrial de maiz frente a una concentración de 3.12×10^{-8} M de ddTTP (relación 0.5:1 ddTTP/dTTP). El control al 100% sin inhibidor se ensaya en presencia del disolvente (agua destilada) (ver técnica en el apartado 4.6.1.2).

Por su parte, las DNA polimerasas cloroplásticas de tejidos diferentes al maiz muestran, a su vez, una gran resistencia a dicho reactivo al igual que algunas DNA polimerasas mitocondriales vegetales. En el caso de la enzima cloroplástica de soya, al igual que la DNA polimerasa mitocondrial del mismo vegetal, resiste con un 50-30% de actividad una relación de ddTTP:dTTP tan alta de 10:1. Las DNA polimerasas de espinaca y jitomate resisten una relación equimolar de este inhibidor (ver Tabla 5.9).

TABLA 5.8. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales frente a la ddTTP

T E J I D O	CONC. M ddTTP	RELACIÓN ddTTP : dTTP	% DE ACTIVIDAD: TIPO DE ENZIMA
VEGETAL			
Maíz	3.12×10^{-6}	0.5 : 1	16.2% : susceptible
Trigo ^a	5×10^{-5}	1:2 - 1:1	45% : susceptible
Soya ^b	$3.3-33 \times 10^{-5}$	1:1 y 10:1	85-75% y 50-30% resistente
ANIMAL			
Cél. HeLa ^c	3×10^{-5}	1:1 ddCTP : dCTP	20% : susceptible

a) Christophe et al., 1981;

b) Heinhorst et al., 1990; (pico I de DEAE)

c) Zimmerman et al., 1980.

La causa de la gran disimilitud en el comportamiento de las DNA polimerasas organelares de maíz frente a la ddTTP en comparación con el de otros vegetales así como la gran similitud que presentan las primeras con las DNA polimerasas animales, es aun desconocida.

TABLA 5.9. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas plastídica, cloroplásticas y cromoplástica frente a la ddTTP

T E J I D O	CONC. M ddTTP	RELACIÓN ddTTP : dTTP	% DE ACTIVIDAD: TIPO DE ENZIMA
VEGETAL			
Maíz	3.12×10^{-8}	0.5 : 1	36.7% : susceptible
Espinaca ^a	1×10^{-4}	1:1	no ind: resistente
Soya ^b	$3.3-33 \times 10^{-5}$	1:1 - 10:1	85-75% y 50-30% resistente
Jitomate ^c	5×10^{-5}	1:1	no ind: resistente

a) Sala et al., 1980

b) Heinhorst et al., 1990

c) Serra y Carrillo, 1990

no ind: dato no indicado en la referencia

5.3.2. ACTIVIDAD CON TEMPLADOS (NATURAL Y ARTIFICIAL) Y CATION DIVALENTE

El ensayo de actividad enzimática de DNA polimerasa frente a diferentes templados es una herramienta importante en la caracterización de los distintos tipos de las mismas.

En el presente trabajo se realizó la caracterización parcial de ambas DNA polimerasas organelares frente a dos distintos templados: DNA activado y polirA-oligodT. A su vez, para cada templado fueron utilizados ambos cationes divalentes, magnesio y manganeso, a una sola concentración (12 mM y 0.1 mM respectivamente) de sus sales de cloruro correspondientes.

En el presente trabajo fue de gran utilidad el ensayo con el RNA templado - DNA primer (polirA-oligodT) en la caracterización de ambas DNA polimerasas organelares ya que, de acuerdo a la hipótesis de trabajo, si las enzimas estudiadas presentaban una actividad preferencial frente a dicho templado, sería un punto a favor de su clasificación como enzimas de tipo γ .

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

TABLA 5.10. Porcentaje de actividad enzimática de las DNA polimerasas organelares frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+} .

TEMPLADO/ORGANELO		MITOCONDRIAS	PLASTIDIOS
DNA ACTIVADO	Mg^{2+}	100	100
	Mn^{2+}	0	0
POLIR A-OLIGODT	Mg^{2+}	0	0
	Mn^{2+}	0	0

Según se muestra en la Tabla 5.10 ambas DNA polimerasas organelares de maíz presentan una clara preferencia por el DNA activado versus polirA-oligodT, además de ser absolutamente más activas con el primero en presencia de Mg^{2+} .

A continuación se presentan tres cuadros que comparan el porcentaje de utilización de ambos templados entre las distintas DNA polimerasas organelares de fuentes vegetal y animal.

5.3.2.1 DNA ACTIVADO VERSUS POLIRÁ-OLIGODT

En el caso de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales (Tabla 5.11) se tiene lo siguiente:

Las tres DNA polimerasas mitocondriales de trigo, soya y maíz utilizan DNA activado pero, mientras que las dos primeras pueden hacerlo en presencia de ambos cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} , la enzima de maíz solamente lo utiliza con Mg^{2+} , ya que con Mn^{2+} la enzima se inactiva.

Con respecto a las preferencias de templado, trigo y maíz utilizan más eficientemente DNA activado que polirÁ-oligodT, el primero con ambos cationes y el segundo sólo es activo con Mg^{2+} . Contrasta la enzima de soya que prefiere polirÁ-oligodT al DNA activado pero sólo en presencia de Mn^{2+} .

TABLA 5.11. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales frente al DNA activado y el polirÁ-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+}

VEGETAL	DNA ACTIVADO		PolirÁ-OligodT	
	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}
TRIGO ^a	40	29.2	0	10.8
SOYA ^b	74	17	0	100
MAÍZ ^c	100	0	0	0

a) Los datos de trigo se dan con respecto al 100% de polidA-oligodT/ Mn^{2+} (Christophe et al., 1981)

b) Heinhorst et al., 1990; (pico I de DEAE)

c) Datos del presente trabajo

Por su parte, todas las DNA polimerasas mitocondriales animales (Tabla 5.12) utilizan activamente DNA activado pero sólo en presencia de Mn^{2+} ; sin embargo, todas prefieren utilizar polirÁ-oligodT al primero.

Las DNA polimerasas mitocondriales animales no utilizan eficientemente ningún templado en presencia de Mg^{2+} .

Finalmente, la Tabla 5.13 muestra que todas las enzimas cloroplásticas, con excepción de la de espinaca, utilizan DNA activado: las enzimas de soya y chicharo muestran una actividad mayor con dicho templado en presencia de Mg^{2+} que con Mn^{2+} ; en el caso del maíz es capaz de utilizarlo solamente con Mg^{2+} pues la enzima es inactiva con Mn^{2+} .

En el caso del polirA-oligodT, solamente lo utilizan las enzimas cloroplásticas de soya y espinaca en presencia de Mn^{2+} , mientras que las enzimas de chicharo y maíz son totalmente inactivas con este templado en presencia de ambos cationes.

Tabla 5.12. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas mitocondriales animales frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mn^{2+} (*)

TEJIDO	DNA ACTIVADO Mn^{2+}	PolirA-OligodT Mn^{2+}
CELULAS HELA ^a	100	446
HEPATOCITOS DE RATA ^b	100	265
SINAPTOSOMAS DE RATA ^c	100	515

a) Zimmerman et al., 1980

b) Bolden et al., 1977

c) Hubscher et al., 1977

* Ninguna DNA polimerasa mitocondrial animal es activa con Mg^{2+}

TABLA 5.13. Porcentaje de actividad de las DNA polimerasas cloroplásticas y plastídicas^a frente al DNA activado y el polirA-oligodT con Mg^{2+} y Mn^{2+}

VEGETAL	DNA ACTIVADO		PolirA-OligodT	
	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}
SOYA ^b	48/70 ^c	14/20	1/1	100
ESPINACA ^d	0.5	0	nd	100
CHÍCHARO ^e	100	20	1	0
MAÍZ ^f	100	0	0	0

a) Solamente la enzima de maíz

b) Heinhorst et al., 1990;

c) Valores de actividad de ambos picos, I y II respectivamente.

d) Sala et al., 1980

e) Mckown y Tewari, 1984

f) Datos del presente trabajo

5.5 PURIFICACION ENZIMATICA

Una vez establecidas las técnicas de solubilización de ambas DNA polimerasas, se procedió a purificarlas a través de una columna cromatográfica empacada con una resina de intercambio iónico (DEAE-celulosa).

Investigaciones anteriores realizadas en el laboratorio del Dr. Jorge Vázquez, lograron la separación de tres picos de actividad de DNA polimerasa del extracto total de embriones de maíz, por lo que en el presente trabajo se consideró que esta columna ofrecería una buena resolución de las diferentes actividades enzimáticas de las DNA polimerasas organelares.

Además, la columna de DEAE-celulosa forma parte de muchos de los esquemas elaborados de purificación de DNA polimerasas organelares de otras fuentes vegetales y animales, constituyendo ésta, el primer paso de purificación por columna (Helnhorst *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1980; McKown y Tewari, 1984; Castroviejo *et al.*, 1979; Bolden *et al.*, 1977., Hubscher *et al.*, 1977).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.14 Las gráficas de purificación de las fracciones mitocondrial y plastídica se muestran en las Figuras 5.11 y 5.12.

TABLA 5.14 Cuadro de purificación de las DNA polimerasas organelares de maíz a través de una columna de DEAE-celulosa

Fracción	CPM/ μ g. prot.	mg/ml prot.	Veces de purif.	Rendimiento (%)	Elución
EXTRACTO CRUDO	33.3	4.5	1.0	100	-
MITOCONDRIAS	Pico	0.70	2.1	1.7	65-66 mM 300-302 mM
	I 71.4	0.20	5.8	1.3	
	II 195				
PLASTIDIOS	672.2	0.12	20.2	2.7	135 mM

A) FRACCIÓN MITOCONDRIAL

La Figura 5.11 muestra el perfil de actividad y de proteína obtenido de la fracción mitocondrial.

Se separaron dos picos de actividad de DNA polimerasa de la fracción mitocondrial: un primer pico en las primeras fracciones del gradiente en aproximadamente 65 mM de K_2HPO_4 con una actividad específica de 71.4 cpm/ μ g prot. El segundo pico de actividad eluye a una concentración de K_2HPO_4 en aproximadamente 300 mM con una actividad específica de 195 cpm/ μ g prot.

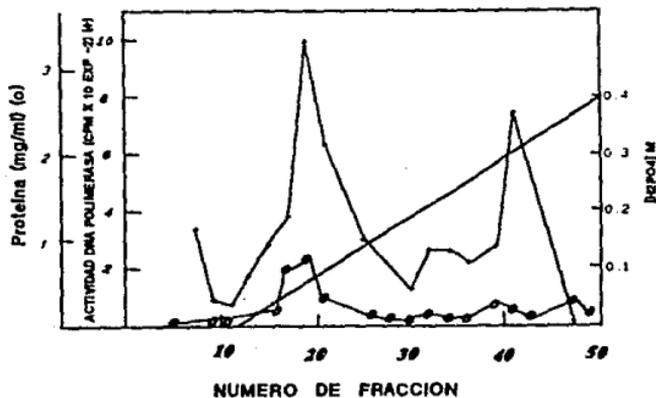


Fig. 5.11. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL A TRAVÉS DE UNA RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La Tabla 5.15 es un cuadro comparativo del comportamiento de las distintas DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales a través de una columna de DEAE-celulosa.

TABLA 5.15. Cuadro comparativo del comportamiento cromatográfico de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales a través de DEAE-celulosa como primera resina

TEJIDO	ELUCIÓN	VECES DE PURIFICACIÓN
VEGETAL		
Soya ^a	140 mM NaCl	3.8
Trigo ^b	300 mM K ₂ HPO ₄	no ind.
ANIMAL		
Hígado rata ^c	100-150 mM	1.6
HeLa ^c	150 mM K ₂ HPO ₄	16.2
Sinaptosomas de rata ^d	120 mM K ₂ HPO ₄	4.3

a) Heinhorst *et al.*, 1990; b) Castroviejo *et al.*, 1979
 c) Bolden *et al.*, 1977; d) Hubscher *et al.*, 1977.
 no ind. = dato no indicado en la referencia

La concentración salina de elución del primer pico de actividad de mitocondrias de maíz es menor que la concentración salina de elución de las enzimas mostradas en la Tabla 5.16. Las DNA polimerasas vegetales y animales -exceptuando la de trigo- eluyen en un promedio general de 134 mM de sal. Por su parte, el segundo pico de actividad de mitocondrias de maíz eluye a una concentración salina idéntica a la reportada para el de la enzima de trigo: 300 mM, una alta concentración salina.

El promedio de purificación de las DNA polimerasas mitocondriales vegetales y animales a través de DEAE-celulosa es de 3.2 (exceptuando las veces de purificación de la enzima de células HeLa cuya purificación es de 16.2 veces) por lo que en el caso del maíz las veces de purificación para el primer pico del extracto mitocondrial está cerca del promedio (2.1), mientras que el segundo pico muestra una mayor purificación.

5.5.2. FRACCIÓN PLÁSTICA

La actividad de DNA polimerasa plástica eluyó en un único pico con actividad significativa a una concentración de aproximadamente 135 mM de K_2HPO_4 con una actividad específica de 672.2 cpm/ μ g prot. Fig. 5.12.

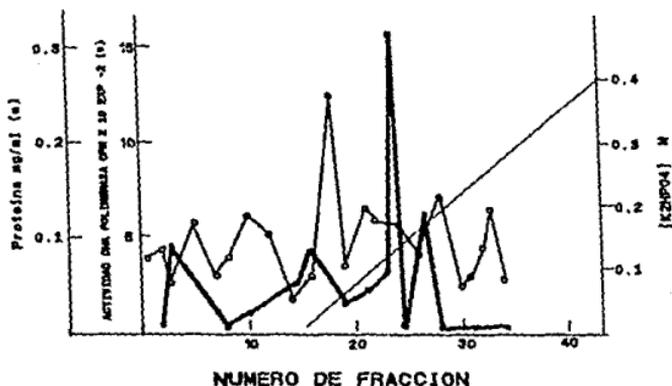


Fig. 5.12. PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA FRACCIÓN PLÁSTICA A TRAVÉS DE UNA RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Al comparar el comportamiento de la fracción plastídica en DEAE-celulosa con el de extractos de otros vegetales, se observa lo siguiente (Tabla 5.16).

TABLA 5.16. Comparación del comportamiento cromatográfico de las DNA polimerasas cloroplásticas a través de DEAE-celulosa como primera resina

TEJIDO	ELUCIÓN	VECES DE PURIF.
Soya ^a	Pico I 140 mM NaCl	5.4
	Pico II 250 mM NaCl	54.2
Espinaca ^b	200 mM KHPO ₄	3.5
Chicharo ^c	350 mM KHPO ₄	4.0

a) Heinhorst *et al.*, 1990;

b) Sala *et al.*, 1980;

c) Mckown y Tewari, 1984.

El rango de concentración salina en el cual eluyen las tres DNA polimerasas cloroplásticas purificadas hasta la fecha (soya, espinaca y chicharo) a través de una resina de DEAE-celulosa, es entre 140 y 350 mM.

La actividad eluida en el pico de actividad se purificó 20.2 veces con respecto al extracto crudo.

Sin embargo, uno de los mayores problemas en la purificación es la baja proteína plastídica que se logra aislar de los ejes embrionarios. En el mayor pico de actividad se detectó una concentración de 0.12 mg/ml de proteínas.

Desafortunadamente, el perfil de proteínas de la fracción plastídica no fue óptimo ya que el lavado de la resina no fue suficiente para eluir el pico de proteínas que se desea eliminar. Investigaciones posteriores deberán establecer las condiciones óptimas de corrida cromatográfica tal que favorezcan la eliminación de las proteínas contaminantes con el fin de lograr una mayor purificación del pico de DNA polimerasa plastídica.

CAPITULO SEXTO

DISCUSION

6. DISCUSION

6.1 ACTIVIDAD DE LAS DNA POLIMERASAS MITOCONDRIAL Y PLASTÍDICA DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ

Al cuantificar el grado de actividad de DNA polimerasa en la fracción plastídica-mitocondrial en varios tiempos de germinación en el período de 3 a 24 h, se detectó actividad enzimática desde tiempos muy tempranos (3 h). Esta actividad se incrementa linealmente y de forma paralela al avance de la germinación hasta las 24 h (Fig. 5.1).

Estos resultados coinciden con lo encontrado en algunas otras investigaciones que afirman que la síntesis del DNA organelar comienza desde tiempos muy tempranos de la germinación -de forma paralela a la síntesis reparativa del DNA nuclear- (Zlatanova et al., 1987; Zarain et al., 1987). Además, coinciden con lo obtenido por Ortega (1988) en su estudio realizado en ejes embrionarios de maíz, quien comprobó por autoradiografía que existe incorporación de marca específica al DNA organelar desde tiempos tempranos de la germinación (6 h), constituyendo ésta, una prueba indirecta de la síntesis del DNA organelar *in vivo*.

Al menos para el caso de cloroplastos, se pueden considerar dos procesos generales en los que participa la síntesis replicativa del DNA. Uno de ellos es el implicado en la multiplicación del número de moléculas de DNA dentro de cada organelo, y el segundo en el proceso de biogénesis de nuevos organelos.

El primero se realiza con el objetivo de dotar a cada uno de los cloroplastos con el número de genomas correspondientes a las de un organelo maduro (Kuroiwa et al., 1981) y el segundo con el de duplicar el número total de moléculas de DNA que serán repartidas entre los organelos nascentes que, a su vez, pasarán a formar parte de las nuevas células originadas por bipartición.

Se ha reportado que en el caso de cloroplastos de maíz (Kuroiwa et al., 1981), la multiplicación del genoma organelar se prolonga a todo lo largo del tiempo que requieren los organelos para alcanzar su completa madurez funcional (aparentemente, solamente los cloroplastos maduros poseen el máximo número de moléculas de DNA en comparación con las estructuras organelares aún inmaduras que les precedieron en el proceso de su maduración) (Kuroiwa et al., 1981; Bradbeer, 1981).

A su vez, la formación de los organelos completamente maduros se logra después de un complejo proceso de desarrollo que toma varios días, paralelamente al crecimiento y proliferación de las células del tejido embrionario vegetal (Kuroiwa et al., 1981).

En el caso del desarrollo mitocondrial, no existe mucha información acerca de la variación del número de moléculas de DNA durante su maduración en el tejido embrionario, pero es probable que, dadas la gran similitud entre ambos organelos en algunos aspectos básicos de la biogénesis cloroplástica y mitocondrial (Alberts, 1983), es probable que el DNA mitocondrial siga un proceso similar al del DNA plastídico dentro del tejido embrionario mostrando, por lo tanto, procesos de replicación de DNA implicados en dos distintos fenómenos organelares: la madurez y la biogénesis organelar.

Es posible explicar los resultados obtenidos con base en los procesos mencionados, por lo cual es de esperar que desde las primeras horas de la germinación exista síntesis de DNA la que, al menos en parte, podría considerarse como un tipo de síntesis replicativa que forma parte de los procesos de madurez y biogénesis organelar. Ambos se podrían estar llevando a cabo simultáneamente ya que se sabe que la síntesis del DNA organelar se puede realizar en cualquier momento del ciclo celular (Alberts, 1983).

En este aspecto se ha coincidido con lo que Ortega, (1988), ha propuesto acerca de la probable síntesis replicativa del DNA organelar durante las primeras horas de la germinación dado que desde periodos de tiempo cortos de germinación, es posible detectar una incorporación específica de marca radioactiva al DNA de plastidios y mitocondrias.

6.2 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO ORGANELAR Y SOLUBILIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS ORGANELARES

En el establecimiento de las técnicas de aislamiento organelar, uno de los puntos claves a considerar -con el objetivo de lograr un buen grado de confiabilidad a los resultados obtenidos- lo constituyó la eliminación completa de los núcleos celulares. Lo anterior es explicable por el hecho de que la eliminación incompleta de los núcleos daría lugar a una contaminación importante de las fracciones organelares con la actividad de DNA polimerasa nuclear, lo cual, muy probablemente, llevaría a errores graves de caracterización.

Se procedió entonces a la evaluación de varias condiciones de aislamiento nuclear por centrifugación, cuantificando en cada una la concentración de DNA y la actividad de DNA polimerasa en el botón nuclear que ofrecía cada técnica.

La técnica establecida se evaluó con base en las observaciones hechas al microscopio óptico de algunos frotis de la suspensión plastídica-mitocondrial (sobrenadante 1, esquema A) teñidos con azul de metileno.

Se recorrieron alrededor de 10 campos al microscopio óptico y en ninguno se observaron núcleos celulares ni células completas por lo que se consideró que las condiciones del aislamiento nuclear establecidas eran las más adecuadas.

Por otra parte, en el caso del aislamiento de plastidios se observó con sorpresa que al utilizar una menor velocidad (1900 g) que la reportada por Ortega, (1988), (5900 g), la actividad de DNA polimerasa del extracto plastídico era mayor. Lo anterior se atribuyó al hecho de que, con la aplicación de una menor velocidad en el aislamiento organelar, se arrastran menos contaminantes potencialmente factores inhibitorios de la actividad de la DNA polimerasa plastídica.

A pesar de que la adopción de una técnica de aislamiento organelar que aplicara una menor velocidad de centrifugación significara correr el riesgo de obtener un rendimiento proteico inferior, se prefirió ésta por la ventaja que ofrecía de proporcionar una fracción plastídica más limpia. Lo anterior favorecería, por una parte, la detección de una actividad enzimática específica mayor, así como la posibilidad de llevar a cabo una caracterización enzimática más confiable.

En el caso de las mitocondrias, la velocidad utilizada en su aislamiento fue la reportada por Ortega, (1988), y, en general, no presentó grandes desventajas. Sin embargo, al comparar las veces de purificación logradas en el caso de plastidios, se observa que es varias veces mayor que para el caso de mitocondrias, por lo que queda la posibilidad de aplicar grandes mejoras a las técnicas de aislamiento mitocondrial que hagan posible el aumento en la pureza de la DNA polimerasa correspondiente.

Considero que las condiciones técnicas en las que se realizó la purificación organelar a través de un gradiente de sacarosa, habría que optimizarlas con el fin de eliminar cualquier factor inhibitorio que muy probablemente esté presente en la fracción mitocondrial. A este respecto es de mencionar que, al igual que en el caso del extracto mezcla -cuya actividad de DNA polimerasa se ve incrementada al diluir el concentrado inicial-, la fracción mitocondrial presentó un efecto similar ya que en ésta también se detectó una mayor actividad de DNA polimerasa en las diluciones 1:2 y 1:4 con respecto a la detectada en la fracción no diluida, lo cual puede ser considerado como una evidencia más del efecto negativo que pudieran estar ejerciendo ciertos contaminantes presentes en las fracciones organelares impuras sobre la actividad de la DNA polimerasa mitocondrial.

De forma paralela al trabajo experimental realizado en ejes embrionarios, se intentó, en breve, hacer una evaluación de la eficiencia del trabajo en este tejido en comparación con la que se podía obtener de tejido foliar. Se procedió entonces a aplicar las mismas técnicas establecidas pero ahora en hojas de maíz y se cuantificó la actividad de DNA polimerasa organelar y la cantidad de proteína aislada (resultados no mostrados).

La fuente enzimática fueron hojas de maíz de 10 días de crecidas, de las cuales se aislaron diferencialmente núcleos, mitocondrias y cloroplastos que, posteriormente, fueron purificados a través de los mismos gradientes de sacarosa utilizados para los organelos de ejes embrionarios.

Anteriormente en el laboratorio del Dr. Jorge Vázquez, se había intentado la purificación de la DNA polimerasa de extracto total de hoja de maíz sin obtener resultados positivos ya que Coello, (1989), reportó la probable existencia de algún inhibidor de la DNA polimerasa presente en dicho extracto foliar lo que llevó nuevamente al manejo de los ejes embrionarios, que, a pesar del bajo rendimiento proteico que ofrecen, si es posible detectar una alta actividad de DNA polimerasa en el extracto total.

En los resultados obtenidos al cuantificar la actividad de DNA polimerasa en los distintos organelos de hoja, se observó con sorpresa un grado significativo de actividad específica de DNA polimerasa en las fracciones cloroplástica, mitocondrial y nuclear con valores de cuentas por minuto de 818, 1444 y 4539 respectivamente (se utilizaron alícuotas de 20 μ l de las fracciones obtenidas a partir de 2 g de hojas).

Fue interesante comprobar que si es posible detectar una significativa actividad de DNA polimerasa en las fracciones organelares aisladas de tejido foliar.

Estos primeros indicios de actividad de DNA polimerasa detectable en hojas de maíz, abren la posibilidad para buscar nuevas alternativas en la investigación de las DNA polimerasas organelares de maíz. Es posible que si se logra adaptar una técnica de aislamiento y purificación organelar de fuente foliar, la actividad de la DNA polimerasa sea detectada en un mayor grado que el hasta ahora detectado. Es probable que los factores inhibitorios que se supone están presentes en el extracto total de hoja pudieran ser eliminados al aplicar técnicas de fraccionamiento celular y de purificación organelar que ofrezcan fracciones proteicas más puras.

De ser posible lo anterior, la utilización de hojas de maíz como fuente de enzima ofrecería la gran ventaja de ser un tejido de más fácil adquisición que los propios de ejes embrionarios y se solucionaría en gran parte el problema de la disponibilidad de

tejido que, como es bien sabido, constituye uno de los aspectos claves en las investigaciones de purificación enzimática.

6.3 RUPTURA ORGANELAR Y SOLUBILIZACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS PLASTÍDICA Y MITOCONDRIAL

La caracterización con inhibidores realizada en organelos completos ofrecía resultados de ensayo poco reproducibles por lo que se consideró la necesidad de extraer la enzima a la fracción soluble.

Las cuatro primeras técnicas de ruptura organelar no ofrecieron los resultados esperados, ya que gran parte de la actividad de DNA polimerasa era invariablemente arrastrada al botón organelar. Esto llevó a la búsqueda de un método alternativo de solubilización.

Se adaptó entonces la técnica reportada por Echeverría *et al.*, (1991), quien estableció una técnica para el aislamiento de un complejo de mitocondrias de trigo formado por vesículas membranosas, proteínas de replicación y transcripción y ácidos nucleicos sometiendo a la fracción de lisis mitocondrial a un gradiente discontinuo de sacarosa.

En reportes anteriores se había mencionado la probable localización de la DNA polimerasa mitocondrial en la matriz organelar. Esta suposición había surgido a partir de observaciones experimentales como la que a continuación se describe: en el caso de mitocondrias de trigo (Christophe *et al.*, 1981) se observó la necesidad de someter a dichos organelos a un doble tratamiento con digitonina y sonicación, puesto que el tratamiento simple con dicho detergente -que provoca la eliminación de la membrana externa del organelo- no libera la actividad de la DNA polimerasa a la fracción soluble. Lo anterior torna indispensable la aplicación de un tratamiento adicional con sonicación que permite la solubilización de la enzima. Dado lo anterior, dicho autor supuso que la DNA polimerasa mitocondrial de trigo se encuentra en el interior del organelo, probablemente en la matriz soluble.

De manera similar, Bertazzoni *et al.*, (1977), afirma que la DNA polimerasa mitocondrial de embriones de pollo "parece estar asociada con la membrana interna o a la matriz de este organelo"; después de haber aplicado el mismo procedimiento experimental que describe Christophe *et al.*, (1981).

En el caso concreto de ambas DNA polimerasas organelares de maíz, las evidencias experimentales apuntan hacia la probable existencia de una íntima asociación entre dichas enzimas y el DNA organelar y, a su vez, hacia una estrecha relación estructural entre el DNA

y las membranas organelares. Y es probable que en mitocondrias de maíz, al igual que en trigo, también exista un complejo DNA polimerasa-DNA-membrana organelar como el descrito por Echeverría et al., (1991).

Si el esquema anterior fuera aplicable al maíz, sería ampliamente explicable el arrastre de la actividad de DNA polimerasa organelar hacia las membranas plastídicas y mitocondriales aún después de haber sometido a los organelos a tratamiento de lisis con Tritón X-100 y sonicación.

Por otra parte, considero que la pequeña cantidad de actividad de DNA polimerasa que se libera a la fracción soluble puede ser producto de la agitación vigorosa con detergente a la que se someten los organelos, la cual provoca una separación parcial de ambas DNA polimerasas de las membranas organelares.

Con respecto a la interacción de la DNA polimerasa con los ácidos nucleicos, se ha reportado que en el caso de la DNA polimerasa cloroplástica de chicharo (Mckown y Tewari, 1984) es posible eliminar a los ácidos nucleicos de la fracción organelar haciéndola pasar a través de una resina de intercambio iónico (DEAE-celulosa) y, en otros casos, después del tratamiento de la fracción de lisis organelar con una solución de alta fuerza iónica (Bolden et al., 1977; Hubscher et al., 1977).

Así pues, pareciera existir un parangón entre el papel funcional de las membranas en la replicación del DNA bacteriano y la replicación del DNA cloroplástico y mitocondrial de células eucariotas (Echeverría et al., 1991).

Algunas otras evidencias están dadas por el hecho de que, la precipitación del DNA organelar con protamina, arrastra, a su vez, la actividad de DNA polimerasa sin que la protamina en sí, no presente un efecto negativo sobre la actividad de DNA polimerasa (resultados no mostrados).

La probable estrecha interacción entre las DNA polimerasas organelares con sus respectivas moléculas de DNA se observó al ensayar la actividad de DNA polimerasa en las fracciones organelares intactas en ausencia de DNA exógeno (DNA activado); lo cual pudiera ser una prueba de que *in vivo* esta relación estructural entre la enzima y su sustrato tiene importancia funcional. El mismo hecho se ha descrito para el caso de la DNA polimerasa cloroplástica de chicharo (Mckown y Tewari, 1984); de hecho, tal será la actividad que la DNA polimerasa cloroplástica de chicharo presenta con el genoma endógeno que los autores describen una técnica de eliminación del genoma cloroplástico con el fin de evitar las posibles interferencias del mismo durante el ensayo de síntesis de DNA *in vitro*.

En lo que respecta a la probable interacción del DNA plastídico y mitocondrial con las membranas organelares correspondientes, es de hacerse notar que durante el ensayo de cuantificación del DNA organelar, principalmente en el extracto de organelos intactos, se observa frecuentemente la formación de múltiples partículas membranosas que adquieren el color azul característico del complejo formado entre el DNA y la difenilamina. Es probable que estas partículas membranosas reaccionen con la difenilamina debido a la presencia de moléculas de DNA anclado a las membranas, el cual haya resistido, de alguna forma, el tratamiento ácido y, por lo mismo, no se liberan a la fracción soluble.

Finalmente, habría que considerar lo que Echeverría *et al.*, (1991), apuntan al afirmar que "este complejo hace pensar en la importancia de la membrana mitocondrial como elemento de la maquinaria de replicación del DNA, de la misma forma que se ha comprobado en bacterias".

Considero que uno de los motivos principales por los cuales las investigaciones en torno de las DNA polimerasas organelares, en general, no requieran de la aplicación de un tratamiento tan fino de una digestión específica de los ácidos nucleicos para lograr la solubilización de la DNA polimerasa, es el hecho de que disponen de una gran cantidad de tejido como fuente enzimática; de esta forma, el bajo rendimiento proteico obtenido mediante las técnicas de solubilización mencionadas, se ve contrarrestada por la gran cantidad de tejido animal o vegetal del que se parte.

En el caso concreto de embriones de maíz, no es posible contrarrestar el bajo rendimiento proteico ya que, en general, se parte de una cantidad de tejido mucho menor que el utilizado de fuentes vegetales adultos o embriones animales.

6.4 DNA COMO MARCADOR ORGANELAR

En el curso del establecimiento de la mejor técnica de aislamiento organelar, la detección del DNA constituyó una útil herramienta en la evaluación de las mismas.

El marcador organelar que se requería, según los objetivos de la presente investigación, era una molécula cuya detección garantizara la presencia de los organelos de interés. En el caso concreto de plastidios y mitocondrias, una vez que se hubieron eliminado los núcleos del homogenado celular, la molécula de DNA se convirtió en el marcador específico de dichos organelos.

Sin embargo, en la elección de un buen marcador organelar, no es suficiente considerar el único criterio de que la molécula seleccionada sea específica para dichos organelos. Quail (1979), apunta que, en el curso del establecimiento de las técnicas de aislamiento organelar es importante elegir un marcador organelar que, además de constituir una prueba indirecta de la virtual presencia de los organelos que la contienen, también garantice la existencia de los mismos en un alto grado de integridad estructural; es decir, constituirá, a su vez, un importante parámetro en la evaluación de la eficiencia de las técnicas utilizadas; una técnica que favorece la preservación de la estructura organelar en el curso del fraccionamiento celular, es una técnica que ofrece un alto rendimiento.

En este sentido, si el marcador organelar seleccionado ha de satisfacer los criterios arriba mencionados, además de encontrarse de manera exclusiva en los organelos estudiados, debe ser una molécula soluble que fácilmente se libere al medio externo al ocurrir la ruptura organelar, de tal forma que su detección en la fracción soluble constituya un parámetro indirecto de que los organelos han sufrido una drástica alteración estructural.

En el caso concreto del DNA como marcador de plastidios y mitocondrias, el hecho de que esta molécula se encuentre, según las observaciones del presente trabajo, unida a la membrana interna y no a la matriz soluble de ambos organelos, conlleva a ciertas reconsideraciones en torno a la conveniencia de haberlo seleccionado como molécula marcadora. Satisface por completo el primer requerimiento de garantizar la presencia de ambos organelos mas no de la misma forma en torno a la evaluación del rendimiento organelar de las técnicas empleadas.

La determinación de su concentración en las fracciones organelares condujeron a la elección de ciertas técnicas de aislamiento organelar con base en el criterio de que, a mayor concentración de DNA, mayor rendimiento en el aislamiento organelar. Sin embargo, por el hecho de ser una molécula que es frecuentemente arrastrada con las membranas organelares y no una

molécula que se libere al medio soluble en la fracción de lisis organelar, implica que su detección no puede ser un parámetro confiable del grado de eficiencia de las técnicas de aislamiento organelar.

Investigaciones más rigurosas de aislamiento organelar requerirían del establecimiento de técnicas de ensayo para enzimas solubles de la matriz mitocondrial y estroma cloroplástico, de tal forma que su presencia en la fracción soluble organelar sea una evidencia confiable de que los organelos han sufrido una alteración estructural drástica y por otra parte, su detección en el botón membranal-organelar, garantice la integridad de los mismos.

Algunos ejemplos de enzimas utilizadas como marcadores de mitocondrias son: fumarasa, succinato deshidrogenasa (Christophe *et al.*, 1981) y citocromo c (Sala *et al.*, 1980).

Otra de las desventajas que el DNA presenta como marcador organelar, es su baja concentración en las fracciones organelares. Este hecho torna muy difícil y a veces imposible, llevar a cabo un constante monitoreo de la eficiencia de las técnica de aislamiento organelar, ya que su detección implica la utilización de un gran volumen de suspensión organelar según la técnica espectrofotométrica de de Giles y Myers.

A pesar de las inconveniencias mencionadas, fue posible, al menos parcialmente, utilizar al DNA como marcador específico de plastidios y mitocondrias principalmente en las primeras etapas del establecimiento de las técnicas de aislamiento organelar.

6.5 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

A) Inhibidores de su actividad

La DNA polimerasa mitocondrial de maíz presentó el comportamiento clásico de las DNA polimerasas γ frente a los inhibidores. Sin embargo, en el caso de la enzima cloroplástica, es interesante observar que resultó ser medianamente resistente a NEM en contraste con las DNA polimerasas γ clásicas que son altamente susceptibles a dicho reactivo.

Con respecto a la respuesta a afidicolina de otras DNA polimerasas de maíz, es de hacer notar que, en el caso de la DNA polimerasa γ -nuclear de maíz, se observa un aumento en el grado de resistencia de dicha enzima frente a la afidicolina, paralelamente al tiempo de germinación de los ejes embrionarios.

Una cuestión similar podría estar sucediendo con las enzimas organelares de maíz germinados por 15 h, cuyo grado de resistencia es menor que el generalmente observado para las DNA polimerasas γ -animales, mitocondriales y cloroplásticas vegetales, las cuales presentan un alto grado de resistencia.

Es decir, tal vez existe un factor muy importante relacionado con el tiempo de germinación de las semillas a la cual se esté aislando y caracterizando a las DNA polimerasas de maíz, el cual provoque un efecto directo sobre la respuesta de las mismas frente a los distintos inhibidores utilizados.

Con base en los argumentos anteriores, considero que lo más conveniente es realizar la caracterización de las DNA polimerasas de maíz a distintos tiempos de la germinación, de tal forma que sea posible el establecimiento de un esquema más claro de las características particulares de la misma y detectar si en realidad existe alguna relación entre el tiempo de germinación y la respuesta de las DNA polimerasas frente a los diferentes inhibidores.

En el caso de la respuesta a NEM, se observa que la enzima plastídica es medianamente resistente, de forma similar con la enzima mitocondrial de trigo, que es altamente resistente (Christophe *et al.*, 1981).

Sin embargo, existen algunas cuestiones importantes con respecto al ensayo de actividad de la enzima con NEM. Algunos autores reportan la que el ensayo en presencia de este inhibidor no requiere la presencia de ningún agente reductor (β -mercaptoetanol o ditiotreitol) o, en otros casos, lo realizan utilizando una concentración menor a la propia del ensayo enzimático sin inhibidor (Christophe *et al.*, 1981).

Es probable que los agentes reductores provoquen alguna interferencia significativa en la acción de la N-etilmaleimida sobre los grupos sulfhidrilo de las DNA polimerasas susceptibles por lo que considero importante averiguar qué tan significativo es el efecto de la concentración de β -mercaptoetanol sobre la acción normal de la N-etilmaleimida.

También existe variación en las condiciones de ensayo de las DNA polimerasas en presencia de este mismo inhibidor: Christophe *et al.*, (1981) llevan a cabo una breve preincubación en frío de la fracción enzimática con la N-etilmaleimida, para posteriormente añadir los reactivos de la reacción enzimática de la DNA polimerasa.

Puesto que NEM es un agente bloqueador de grupos sulfhidrilo, es probable que requiera de cierto tiempo de reacción para establecer cierto tiempo de reacción para establecer los enlaces

correspondientes con dichos grupos antes de que la enzima comience a actuar sobre el templado.

Con el fin de eliminar la posibilidad de que la enzima de plastidios esté presentando un comportamiento alterado con este reactivo debido a las condiciones de reacción manejadas, considero necesario realizar el ensayo en condiciones de reacción variadas tales como las anteriormente mencionadas, de tal forma que la acción del inhibidor no se vea afectada por otros factores y por lo mismo no sea capaz de inhibir a la enzima.

Ambas DNA polimerasas organelares de maíz son altamente susceptibles a ddTTP en contraste con las DNA polimerasas cloroplásticas de otros vegetales que han presentado, en general, una alta resistencia a este reactivo.

Finalmente, es interesante hacer notar que el grupo de las DNA polimerasas cloroplásticas vegetales han mostrado, en general, una alta resistencia a ddTTP, lo cual pudiera comenzar a considerarse como una característica propia de las DNA polimerasas cloroplásticas vegetales que en un futuro daría lugar a la formación de un nuevo grupo de DNA polimerasas, distinto al de tipo γ descrito para células animales.

La DNA polimerasa plastídica de maíz mostró una alta susceptibilidad a dicho reactivo. Podría pensarse nuevamente en la posibilidad de la existencia de modificaciones estructurales de la enzima presente en organelos inmaduros en comparación con las enzimas de cloroplastos maduros.

Sin embargo, el esquema es aún controversial y no hay un consenso general debido, probablemente a que solamente dos enzimas organelares, cloroplastos de chícharo (Mckown y Tewari, 1984) y píco II de cloroplastos de soya (Heinhorst et al, 1990), han sido purificadas a homogeneidad.

B) Par: templado-cación divalente

Por otra parte, la utilización del templado artificial se observa muy variable entre las distintas especies vegetales.

En el caso de mitocondrias, la enzima de maíz ha coincidido totalmente con la de trigo en su imposibilidad por usar dicho templado tanto con Mg^{2+} como con el Mn^{2+} así como DNA activado con Mn^{2+} . Lo anterior no va de acuerdo con lo observado para las DNA polimerasas γ de animales cuyo par predilecto es el polirA-oligodT/ Mn^{2+} .

Para el caso de los cloroplastos, la enzima de maíz coincide con la DNA polimerasa de chicharo: no es capaz de utilizar polirA-oligo dT con ningún catión y al DNA activado sólo lo utiliza con Mg^{2+} .

Una cuestión importante es el hecho de que, en el caso de algunas DNA polimerasas cloroplásticas (Heinhorst et al., 1990; Sala et al., 1980) y mitocondriales (Heinhorst et al., 1990), que presentan actividad frente a dicho templado artificial, se observa un detalle importante: la mezcla de reacción enzimática contiene la concentración óptima de KCl para cada caso. Esto hace pensar en la posibilidad de que las DNA polimerasas organelares de maíz requieran de una concentración mayor a 20 mM de KCl (concentración utilizada presente trabajo) para ser capaces de reconocer al polirA-oligodT.

Asimismo, en algunos casos se ha observado que ciertas enzimas, tales como la DNA polimerasa γ -nuclear de maíz (Meléndez, 1990), reconoce al polirA-oligodT de manera óptima si se cumplen cualquiera de las dos siguientes condiciones: que haya sido purificada a través de la resina de intercambio iónico y/o que sea la enzima aislada a las 6 h de la germinación. En ambas condiciones el porcentaje de actividad de la enzima frente al polirA-oligodT es del 90% en comparación con su actividad frente al DNA activado. De cualquier forma, si la enzima es ensayada en la fracción no purificada o en la purificada, su actividad enzimática es mayor a las 6 h que a las 24 h de la germinación.

Este hecho es una evidencia más de los múltiples factores que pueden estar influyendo en la respuesta de las DNA polimerasas organelares frente al templado artificial y que, por lo tanto, la clasificación que este trabajo pueda ofrecer deberá considerarse dentro de las limitaciones que presenta.

Las limitaciones del presente trabajo están dadas por la parcialidad de la caracterización enzimática. Este trabajo cubrió sólo algunos de los aspectos más importantes en la caracterización de las DNA polimerasas organelares, pero han quedado sin determinar algunos de los parámetros que han sido considerados como indispensables en la clasificación de las DNA polimerasas mitocondriales y cloroplásticas tales como: la respuesta de las mismas a distintas concentraciones de sales (KCl, NaCl y/o K_2HPO_4), así como el pH óptimo y la concentración óptima del catión divalente preferido.

Sería importante completar el esquema de caracterización de ambas DNA polimerasas en diferentes condiciones de ensayo variando los parámetros anteriormente mencionados, ya que no conviene descartar la posibilidad de que ambas enzimas sean capaces de utilizar dicho templado, no solo por el hecho de que la caracterización no ha sido completa sino, además, porque la mayoría de las DNA

polimerasas vegetales caracterizadas hasta la fecha han resultado capaces de reconocerlo como templado.

Por otra parte, al comparar entre sí el comportamiento de ambas DNA polimerasas organelares de maíz, se observa que comparten la mayor parte de las características estudiadas.

Ambas enzimas son resistentes a afidicolina y susceptibles a ddTTP pero la plastidica es resistente a NEM. Ambas prefieren utilizar DNA activado con Mg^{2+} que polirA-oligodT con Mg^{2+} ó Mn^{2+} ; a diferencia de lo reportado en el caso de las DNA polimerasas organelares de soya (Heinhorst et al., 1990), cuyo comportamiento es casi idéntico, las DNA polimerasas organelares de maíz difieren marcadamente en su sensibilidad a NEM.

Finalmente, al comparar los porcentajes de actividad de ambas DNA polimerasas mitocondrial y γ -nuclear frente a los tres inhibidores utilizados, se observa que comparten el mismo comportamiento.

En el caso del trabajo realizado en células HeLa (Bolden et al., 1977), se llevó a cabo la caracterización simultánea de las DNA polimerasas γ citoplásmica y mitocondrial. Se observó un comportamiento muy semejante entre las dos enzimas, difiriendo entre sí solamente en la concentración de KCl óptima para su actividad. Es de nuestro interés observar que ambas enzimas son capaces de reconocer polirA-oligodT y que son inhibidas con NEM.

El otro par de DNA polimerasas γ citoplásmica y mitocondrial que presentan características similares, es el proveniente de células murinas (Bolden et al., 1977), las cuales también son inhibibles por NEM y utilizan polirA-oligodT con alta eficiencia.

Por lo anterior, es de esperar que el comportamiento de las DNA polimerasas mitocondrial y γ -nuclear también presenten el mismo comportamiento, sin embargo, poco es sabido con respecto a la relación que pudiera existir entre ambas enzimas en vegetales.

6.6 PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

La DNA polimerasa mitocondrial presentó un comportamiento cromatográfico similar al de las otras DNA polimerasas mitocondriales animales y vegetales reportados.

El principal pico de actividad de la enzima mitocondrial eluye en las primeras fracciones del gradiente; presenta por tanto una carga negativa que es contrarrestada en aproximadamente 65 mM de K_2HPO_4 . Es interesante observar la elución de un segundo pico de menor actividad en aproximadamente 300 mM de K_2HPO_4 , semejante al

pico de la DNA polimerasa mitocondrial de trigo que eluye a 300 mM de la misma sal (Christophe et al., 1981).

No se ha reportado otro caso similar a la DNA polimerasa mitocondrial de maíz en el cual también eluyan dos picos de actividad, por lo que considero que uno de los dos picos es producto proteolítico del otro: este puede ser el caso del segundo pico de actividad, ya que este presenta una menor actividad enzimática que el primero. Este primer intento de purificación cromatográfica es prometedor porque, junto al primer pico de actividad, eluye un pico de proteínas.

La DNA polimerasa γ -nuclear purificada por Meléndez, (1990), eluye también en las primeras fracciones del gradiente, lo cual es una evidencia más de la probable relación existente entre esta enzima y la DNA polimerasa mitocondrial.

En el caso de la DNA polimerasa plastídica de maíz, se observa un perfil de actividad parcialmente similar al de la DNA polimerasa de soya (Helnhorst et al., 1990). En el caso de la enzima de soya se reporta la elución de dos picos de actividad, mientras que en la fracción plastídica solamente un pico presentó una actividad significativa. Pero por otro lado, es sorprendente que la concentración salina de elución del pico de plastidios sea muy parecida a la concentración salina de NaCl a la que eluye la enzima plastídica de maíz: 135 vs 140 para maíz y soya respectivamente.

La DNA polimerasa plastídica de maíz, de forma similar a la enzima mitocondrial, también presenta carga negativa. El pico de plastidios eluye a una concentración salina mayor que el primer pico de la mitocondrial.

Finalmente, considero que en investigaciones posteriores en torno a la purificación cromatográfica de ambas DNA polimerasas organelares, habrá que considerar el bajo rendimiento que ofrece la técnica establecida en la presente investigación si se parte de organelos que fueron aislados diferencialmente.

Por lo que es posible que, una vez que en el presente trabajo se hubieron identificado las características básicas de ambas DNA polimerasas, incluyendo su comportamiento cromatográfico, se pueda proceder con más confianza a la purificación de las mismas partiendo del extracto-mezcla de ambos organelos.

Los conocimientos adquiridos en la presente investigación abren la posibilidad de realizar, en un futuro, un primer paso de purificación simultánea para ambas DNA polimerasas a partir de la fracción mezcla, a través de la resina de intercambio iónico utilizada. Esta técnica tendría la ventaja de ofrecer un mayor rendimiento proteico que posibilitaría la realización de pasos cromatográficos posteriores.

6.7 COMENTARIOS FINALES

Al analizar los resultados experimentales obtenidos por los distintos grupos de investigación, se observa que, a pesar de la inexistencia de un esquema único que describa las características de las DNA polimerasas organelares vegetales, es posible vislumbrar la existencia de algunas características comunes entre las DNA polimerasas de ambos organelos. Este hecho abre la posibilidad de empezar a manejar hipótesis que difieran de las hasta ahora manejadas.

En la mayoría de las investigaciones se ha manejado como hipótesis -a veces implícita y otras explícita- la suposición de que las DNA polimerasas organelares vegetales deben mostrar características similares a las correspondientes en su contraparte animal. Considero que el criterio anterior es justificable en los casos en que, al no existir un esquema que funja como un patrón directo de comparación, las investigaciones en sistemas biológicos diferentes deben partir de los esquemas establecidos en los sistemas biológicos mejor estudiados, a pesar de que la lejanía filogenética sea muy grande.

Sin embargo, es mi impresión que, al menos en el caso de las DNA polimerasas cloroplásticas, es tiempo de empezar a considerar la conveniencia de diseñar una nueva nomenclatura que sea apropiada a las características de dichas enzimas.

Estas enzimas se comportan de manera particular frente a los inhibidores clásicos de las DNA polimerasas: son a) resistentes a ddTTP y a afidicolina, b) susceptibles a NEM y c) la gran mayoría son capaces de utilizar polirA-oligodT en presencia de Mn^{2+} .

El diseño de una nueva nomenclatura específica para aquel grupo de DNA polimerasas que hasta ahora son denominadas γ -resistentes a ddTTP pudiera ser sustituido por la denominación γ -cloroplástica, lo cual abriría el paso al inicio de una esquematización más formal de las características de algunas de las DNA polimerasas vegetales.

7. CONCLUSIONES

En general, fue posible cumplir con los tres objetivos específicos y el objetivo particular de la presente investigación.

Las conclusiones más importantes derivadas del trabajo experimental se enumeran a continuación.

1.- La actividad de ambas DNA polimerasas plastídica y mitocondrial de ejes embrionarios de maíz se detectó desde las primeras horas de la germinación (3 h) y muestra un incremento lineal en las primeras 24 horas de la germinación.

2.- La completa solubilización de ambas DNA polimerasas plastídica y mitocondrial requiere de un primer paso de lisis organelar, seguido de la digestión de los ácidos nucleicos. Lo anterior constituye una fuerte evidencia de una probable estrecha relación estructural entre las membranas organelares, las moléculas de DNA y ambas DNA polimerasas plastídica y mitocondrial *in vivo*.

3.- La purificación de las fracciones plastídica y mitocondrial de maíz a través de una resina de DEAE-celulosa resulta en la separación de picos definidos de actividad de DNA polimerasa, constituyendo, en principio, una buena elección dentro del esquema de purificación de las DNA polimerasas organelares de este cereal.

4.- El esquema experimental establecido para la purificación de ambas DNA polimerasas organelares ofrece un buen grado de purificación (2.1 y 5.8 veces de purificación para los picos I y II de la fracción mitocondrial y de 20.2 para la fracción plastídica a través de una columna de DEAE-celulosa) pero el rendimiento es sumamente bajo (1.7 y 1.3 % para los picos I y II de la fracción mitocondrial y de 2.7% para la plastídica) tornándose una técnica difícil si ha de formar parte de un esquema más completo de purificación para ambas DNA polimerasas organelares de maíz.

En ninguno de los dos casos, las hipótesis planteadas inicialmente se cumplieron cabalmente:

5.- La DNA polimerasa mitocondrial de ejes embrionarios de maíz presentó las características propias de una enzima de tipo γ , excepto en su capacidad para reconocer a polirA-oligodT como molde por lo cual puede ser considerada como una DNA polimerasa tipo γ -incapaz de utilizar el par polirA-oligodT/Mn²⁺.

6.- La DNA polimerasa plastídica de ejes embrionarios de maíz se comportó como una enzima de tipo γ excepto por su resistencia a NEM y su incapacidad para reconocer a polyrA-oligodT como molde, por lo cual es clasificada como una DNA polimerasa tipo γ -resistente a NEM e incapaz de utilizar el par polirA-oligodT/Mn²⁺.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aposhian, H.V. and Kornberg, A. (1962). *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid*. J. Biol. Chem. 237: 519-525.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1983). *Biología Molecular de la Célula*. Edt. Omega, USA.
- 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.
- Arias, P.S. (1990). *Biotecnología. Amenazas y perspectivas para el desarrollo de América Central*. Edt. Cadesca. Costa Rica. 280 pp.
- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J. y Sánchez de Jiménez, E. (1989). *DNA synthesis and cell division in embrionic maize tissues during germination*. J. Plant. Physiol. 135: 426-431.
- Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedralli-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falachi, A. and Spadari, S. (1976). *Variations of DNA polymerase α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 785-789.
- Bewley, J.D. y Black, M. (1986). *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press. New York.
- Bidwell, R.G.S. (1990). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor. 1era. ed. español. México. 784 pp.
- Biggins, J. (1971). *Protoplasts of algal cells*. Methods in Enzymology. Vol. XXIII. Photosynthesis Part. A. San Pietro, A. Eds. pp. 209-211.
- Bolden, A., Pedralli-Noy, G. and Weissbach, A. (1977). *DNA polymerase of Mitochondrial Is a γ -Polymerase*. J. Biol. Chem. 252: 3351-3356.
- Bradbeer, J.W. (1981). *Development of Photosynthetic Function during Chloroplast Biogenesis*. Biochemistry of Plants. 8: 423-453.
- Brooker, J.D., Cheung, C.P. y Marcus, A. (1977). *Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Brundret, K.M., Dalziel, W., Hesp, B., Jarvis, J.A.J and Nieldle, S. (1972). *X-Ray Crystallographic Determination of the Structure of the Antibiotic Aphidicolin: a Tetracyclin Diterpenoid Containing a new Ring System*. J. Chem. Soc. D. Chem. Commun. 1027-1028.

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

Burgers, P.M.J. and Baver, G.A. (1988). *DNA polymerase III from Saccharomyces cerevisiae. II. Inhibitor studies and comparison with DNA polymerases I and II*. *J Biol. Chem.* 263: 925-930.

Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L. y So, A.G. (1976). *A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase δ* . *Biochemistry* 115: 2817-2823.

Carrasco, P. *La sociedad mexicana antes de la conquista. Historia General de México*. (1977). Tomo I. 2da. ed. El Colegio de México. México.

Castroviejo, M., Tharaud, D., Tarrago-Litvak, L. y Litvak, S. (1979). *Multiple deoxyribonucleic acid polymerases from quiescent wheat embryos*. *Biochem. J.* 181: 183-191.

Castroviejo, M., Fournier, M., Gatius, M., Gandari, J.C., Labouesse, B. y Litvak, S. (1982). *Tryptophanyl tRNA synthetasa is found closely associated and simulates DNA polymerase alpha-like activity from wheat embryos*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107:294-301.

Castroviejo, M., Gatius, M.T. and Litvak, S. (1990). *A low molecular weight DNA polymerase from wheat embryos*. *Plant Mol. Biol.* 15: 383-397.

Coello, P. (1989). *Purificación parcial de la DNA polimerasa presente en ejes embrionarios de semillas no germinadas de maíz*. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias, UNAM.

Craig, R.K., Costello, P.A. y Keir, H.M. (1975). *Deoxyribonucleic acid polymerases of BH K-21/c13 cells. Partial purification and characterization of the enzymes*. *Biochem. J.* 145: 215-240.

Cheah, K.S.E. y Osborne, D.J. (1978). *DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed*. *Nature* 272:593-599.

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

Christophe, L., Tarrago-Litvak, L., Castroviejo, M. y Litvak, S. (1981). *Mitochondrial DNA polymerase from wheat embryos*. *Plant. Science. Letters* 21: 181-192.

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

- Echeverría, M., Robert, D., Carde, J.P. and Litvak, S. (1991). Isolation from wheat mitochondria of a membrane-associated high molecular weight complex involved in DNA synthesis. *Plant. Mol. Biol.* 16:301-315.
- Foury, F. (1989). Cloning and Sequencing of the Nuclear gene *NIPI* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 264: 20552-20560
- 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.
- Fukuda, H. and Komamine, A. (1981). Relationship Between Tracheary Element Differentiation and Synthesis in Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans* - Analysis by inhibitors of DNA synthesis. *Plant. Cell. Physiol.* 22(1): 41-49.
- Fufsler, T.P., Castelfranco, P.A. y Wong, Y.S. (1984). Formation of Mg-Containing Chlorophyll Precursors from Protoporphyrin IX, δ -Aminolevulinic Acid, and Glutamate in Isolates, Photosynthetically Competent Developing Chloroplasts. *Plant. Physiol.* 74: 928-933.
- Galli, M.G. (1982). Aphidicolin and ethidium bromide as tools to verify dependence of early post-germinative growth on nuclear and organellar DNA synthesis. *Physiol. Plant.* 56: 245-250.
- García, R.E. (1991). Purificación parcial y caracterización de una DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz presente a las 24 horas de germinación. Tesis Licenciatura. Fac. Química, UNAM.
- Gardner, J.M. y Kado, C.I. (1976). High molecular weight DNA polymerase from crown gall tumors cells of periwinkle. *Biochemistry* 15: 688-697.
- Giles, K.W. y Myers, A. (1957). An improved diphenylamine method for the estimation of DNA. *Nature (Lond).* 206: 93
- Goscin, L.P. y Byrnes, J.J. (1982). DNA polymerase δ : One polypeptide, two activities. *Biochemistry* 21: 2513-2518.
- Goulian, M. and Grimm, S.L. (1990). Three Cytoplasmic DNA polymerases that utilize poly(rA)-oligo(dT). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 170: 627-634.
- Graham, J. (1979). Isolation of Subcellular Organelles and Membranes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30: 485-531.
- Heinhorst, S., Cannon, G.C. y Weissbach, A. (1990). Chloroplast and Mitochondrial DNA Polymerases from Cultured Soybean Cells. *Plant. Physiol.* 92: 939-945.

- Hubscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1977). Identity of DNA polymerase from synaptosomal Mitochondrial and rat-Brain Nuclei. *Eur. J. Biochem.* 81:249-258.
- Hubscher, U. (1983). DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action and biological implications. *Experientia* 39 (1): 1-126.
- Insdorf, N.F., Bogenhagen, D.F. (1989). DNA polymerase γ 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.
- Iwamura, T. and Aoshima, J. (1985). A compilation of Analytical Data from Inhibition Studies on DNA polymerases and some of its Implications *J. Biochem.* 97: 1101-1110.
- Kaguni, L.S., Rossignol, J-M., Conaway, R.C. and Lehman, I.R. (1983). Isolation of a intact DNA polymerase-primase from embryos of Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2221-2225.
- Knopf, K-W., Yamada, M. and Weissbach, A. (1976). HeLa cell DNA polymerase γ : Further purification and properties of the enzyme. *Biochem.* 15: 4540-4548.
- Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992). DNA Replication. 2nd. edition. W:H: Freeman and Company, New York.
- Kuroiwa, T., Suzuki, T., Ogawa, K. y Kawano, S. (1981). The Chloroplast Nucleus: Distribution, Number, Size and Shape and a Model for the Multiplication of the Chloroplast Genome during Chloroplasts Development. *Plant and Cell Physiol.* 22 (3): 381-396.
- Lee, M.Y.M.T., Tan, Ch-K., Downey, R.M. and So, A.G. (1984). Further studies on calf thymus DNA polymerase δ purified to homogeneity by a new procedure. *Biochem.* 23: 1906-1913.
- Lee y Toomey, (1987). Human placental DNA polymerase δ : Identification of 170-kilodalton polypeptide by activity staining and immunoblotting. *Biochemistry* 26: 1076-1085.
- Lehman, I.R. and Kaguni, L.S. (1989). Minireview. DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* 264: 4265-4268.
- Mangelsdorf, P.C. (1974). *Corn. Its Origin, Evolution and Improvement.* The Belknap Press of Harvard University Press. 2nd. ed. EVA. 262 pp.
- Mckown, R.L. y Tewari, K.K. (1984). Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 2354-2358.

- Meléndez, L.S. (1990). *Identificación de las DNA polimerasas nucleares presentes en ejes embrionarios de maíz durante las primeras horas de la germinación*. Tesis Maestría. Fac. Química, UNAM.
- Miller, R.M. and Chinault, D.N. (1982). *The roles of DNA polymerases α , β and γ in repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents*. J. Biol. Chem. 257: 10204-10209.
- Misumi, M. and Weissbach, A. (1982). *The isolation and characterization of DNA polymerases alpha from spinach*. J. Biol. Chem. 257: 2323-2329.
- Molina, M.J., Estrada, J.A., Livera, M., González, H. (1990). *Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México*. SOMEFI. Chapingo, México. 208 pp.
- Montañez, C., Aburto, H. (1979). *Maíz. Política Institucional y crisis agrícola*. Edt. Nueva Imagen. México. 249 pp.
- Murakami, Y., Wobbe, C.R., Weissbach, L., Dean, F.B. and Hurwitz, J. (1986). *Role of DNA polymerase alpha and DNA primase in Simian virus 40 DNA replication in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 2869-2873.
- 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.
- Ortega, R. (1988). *Localización del DNA sintetizado durante las primeras horas de la germinación de maíz*. Tesis Licenciatura. Fac. Ciencias, UNAM.
- Pardo, A.D., Chereskin, M. y Castelfranco, P.A. (1979). *ATP Requirement for Mg Chelatase in Developing Chloroplasts*. Plant Physiol. 65: 956-90.
- Peterson, G.L. (1977). *A simplification of the protein assay method of Lowry et al wich more generally applicable*. Anal. Biochem. 83: 346-356.
- Plevani, P., Folani, M., Valsasnini, P., Badaracco, G., Cheriathundam, E. y Chang, L.M.S. (1985). *Polypeptide structure of DNA primase from a yeast DNA polymerase-primase complex*. J. Biol. Chem. 260: 7102-7107.
- Quail, P.H. (1979). *Plant Cell Fractionation*. Ann. Rev. Plant. Physiol. 30: 425-484.
- Roberts, E.H. y Osborne, D.J. (1973). *Protein synthesis and loss of viability in rye embryos. The viability of transferasa enzymes during senescence*. Biochem. J. 135: 405-410.

- Robles, S.R. (1976). Producción de granos y forrajes. Edt. Limusa, México, pp. 9-31.
- Ruiz-Oronoz, M., Nieto, R.N. y Larios, R.I. (1966). Tratado Elemental de Botánica. Edt. ECLALSA, 9na. edición, México.
- Sakaguchi y Boyd, (1985). Purification and characterization of a DNA polymerase β from *Drosophila*. J. Biol. Chem. 260: 10406-10411.
- Sala, F., Amileni, A.R., Parisi, B. y Spadari, S. (1980). A γ -like DNA Polymerase in Spinach Chloroplasts. Eur. J. Biochem. 112: 211-217.
- Sen, S. y Osborne, D.J. (1977). Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (*Secale cereale* L.) embryos. Biochem. J. 166: 33-38.
- Serra, E.C. and Carrilo, N. (1990). DNA polymerase activity of tomato fruit chromoplast. FEBS. 275: 102-106.
- Stevens, C., Bryant, J.A. and Wyvill, P.C. (1978). Chromatin bound DNA polymerase from higher plants. Plant. 143:113-120.
- Suzuka, I., Daidoji, H., Matsvoka, M., Kadowaki, K.I., Takasaki, Y., Nakane, P.K., Moriuchi, T. (1989). Gene for proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3189-3193.
- Syvaoja, J., Susmensaari, S., Nishida, C., Golsmith, J.S., Chiu, G.S.J., Jain, S., Linn, S. (1990). DNA polymerases α , δ and ϵ three distinct enzymes from HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 6664-6668.
- Tsurimoto, T., y Stillman, B. (1990). Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: Functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1023-1027.
- Tymonko, J.M., Dunham, V.L. (1977). Evidence for DNA polymerase alpha and beta activity in sugar beer. Physiol. Plant. 40: 27-30
- Vázquez, (1986). Aislamiento y caracterización de la actividad de DNA polimerasa de maíz. Tesis Maestría. Fac. Química, UNAM.
- Veleminsky, J. and Gichner, T. (1978). DNA repair in mutagen-injured higher plants. Mut. Res. 55: 71-84
- Wang, F., Salas, T. (1991). Eukariotic DNA polymerases. Annu. Rev. Biochem. 60: 513-552.
- Wernette, C.M., and Kaguni, L.S. (1986). A Mitochondrial DNA polymerase from Embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure and partial characterization. J. Biol. Chem. 261: 14764-14770.

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

Wold, M.S. y Kelly, T.J. (1988). *Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of Simian virus 40 DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2523-2527.

Yamaguchi, M., Matsukage, A., Takahashi, T. (1980). *Chick embryo DNA polymerase γ* . Purification and structural analysis of nearly homogeneous enzyme. J. Biol. Chem. 255: 7002-7009.

Yamaguchi, M., Tanabe, K., Takahashi, T., Matsukage, A. (1982). *Chick embryo DNA polymerase α* . Polypeptide components and their microheterogeneity. J. Biol. Chem. 257: 4484-4489.

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

Zelitch, I. (1967). *Mitochondria from spinach leaves*. Methods in Enzymology. Vol. X. Oxidation and phosphorylation. R.W. Estabrook and M.E. Pullman. Eds. pp. 133-135.

Zimmermann, W., Min-Chen, S., Bolden, A and Weissbach, A. (1980). *Mitochondrial DNA replication does not involve DNA polymerase alpha*. J. Biol. Chem. 285: 11847-11852.

Zlatanova, J.S., Ivanov, P.V. et al. (1987). *DNA repair precedes replicatives synthesis during early germination in maize*. Plant. Mol. Biol. 10: 139-144.