



00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

"CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA DNA PRIMASA
ASOCIADA A UNA DNA POLIMERASA DE TIPO
REPLICATIVO DE MAÍZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ

FALLA DE ORIGEN

México, D.F., noviembre de 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

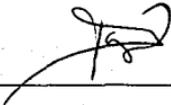
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. Jorge M. Vázquez Ramos y aceptado como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica) por el siguiente jurado:

PRESIDENTE: Dra. Victoria Chagoya Hazas
PRIMER VOCAL: Dra. Marina Gavilanez Ruiz
SECRETARIO: Dr. Rogelio Rogelio Rodríguez Sotres
PRIMER SUPLENTE: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Adriana Ortíz López

Asesor de Tesis: Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos



Tesista: Q.F.B. Elpidio García Ramírez.



**A MARIA DEL SOCORRO,
COMPAÑERA DE MI VIDA.**

Agradecimientos:

Al Dr. Jorge M. Vázquez Ramos, por la dirección de esta Tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 114.

Al S.T.I.A.S.R.M. por la beca otorgada.

**A la Organización de Estados Americanos (OEA)
Plant Biotechnology.**

**A la Comunidad Económica Europea
Proyecto CU.1CT94-0079.**

**Al CONACyT
Proyecto 3013-N.**

Indice

	Página
Abreviaturas	VIII
Resumen de Tesis	X
1. Introducción	1
1.1. Origen del maíz	1
1.2. Clasificación taxonómica del maíz	1
1.3. Anatomía de la semilla de maíz	2
1.4. Germinación de la semilla de maíz	3
1.4.1. Absorción de agua	4
1.4.2. Respiración y síntesis de ATP	4
1.4.3. Síntesis de RNA y proteínas	4
1.5. Síntesis de DNA y división celular	5
1.6. Descubrimiento de que la síntesis de DNA comienza con un cebador de RNA	6
1.6.1. Relevancia de la formación del cebador durante la síntesis de DNA	7
1.7. DNA primasa de <i>E. coli</i>	8
1.7.1. Primosoma de <i>E. coli</i>	10
1.8. DNA primasa de eucariontes	10
1.8.1. Requerimientos para medir actividad de DNA primasa	11
1.9. DNA primasa de plantas	12
2. Antecedentes experimentales	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos general	15
4.1. Objetivos particulares	15
5. Material y Métodos	16
5.1. Material biológico	16
5.2. Soluciones amortiguadoras y reactivos	16

5.3. Métodos	19
5.3.1. Preparación de protamina	19
5.3.2. Preparación de resinas	20
5.3.3. Imbibición de ejes embrionarios	20
5.3.4. Obtención del extracto celular	21
5.3.5. Activación del DNA	21
5.3.6. Determinación de actividad de DNA polimerasa	21
5.3.7. Determinación de actividad de DNA primasa utilizando poli-dT como molde	22
5.3.8. Determinación de actividad de DNA primasa utilizando ssDNA M13mp8 (+)	22
5.3.9. Electroforesis de productos sintetizados por la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i> teniendo como molde poli-dT	23
5.4. Caracterización de la DNA primasa	23
5.4.1. Temperatura	23
5.4.2. Magnesio	23
5.4.3. Manganeso	24
5.4.4. Cloruro de potasio	24
5.4.5. pH	24
6. Resultados	25
6.1. Determinación de las condiciones necesarias para medir actividad de DNA primasa	25
6.1.1. Utilizando el molde de ssDNA M13mp8 (+)	25
6.1.2. Utilizando el molde de poli-dT	26
6.2. Purificación parcial de la actividad de DNA polimerasa y medición de la actividad de la DNA primasa	31
6.2.1. DEAE-Celulosa	31
6.2.2. Heparina sefarosa	33
6.2.3. Superdex 200	34
6.2.5. Mono Q HR 5/5	34
6.3. Caracterización parcial de la DNA primasa	41
6.3.1. Temperatura	41
6.3.2. Magnesio	41
6.3.3. Manganeso	42

6.3.4. Cloruro de potasio	42
6.3.5. pH	42
6.4. Efecto de la acción de RNasas sobre el cebador formado por la primasa	49
7. Discusión	51
8. Conclusiones	55
9. Bibliografía	56

Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
ASB	Albúmina sérica bovina
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-Tris propano	1,3-Bis[tris(hidroximetil)metilemino] propano
Cl	Curie
CPM	Cuentas por minuto
CTP	Citosina trifosfato
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
DEAE-Celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
dAMP	Desoxiadenosina monofosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
EDTA	Acido etilén diamino tetra-acético
FHS	Fracción eluida de Heparina sefarosa con actividad de DNA polimerasa y primasa
GTP	Guanosina trifosfato
KDa	Kilodalton
MES	Acido 2-(<i>N</i> -morfolin)etanosulfónico
[metil- ³ H]-dTTP	Desoxitimidina trifosfato tritlada en el grupo metilo
NEM	N-etilmaleimida

NTP	Nucleósido trifosfato
OTI	Inhibidor de tripsina
PM	Peso molecular
Poli-dA	poli-desoxiadenosina
PolidT-oligo[dA]_n	polidesoxitimidina-oligo [desoxiadenosina]_n
POPOP	2,2'-p-fenilen-bis[5-feniloxazol]
PPO	2,5-difenil oxazol
Py	Pirimidina
RNA	Acido ribonucleico
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
rNMP	Ribonucleósido monofosfato
rNTP	Ribonucleósido trifosfato
SSB	Proteína de unión a cadena sencilla de DNA
TCA	Acido tricloroacético
TMP	Timidina monofosfato
Tris	Tris-hidroximetil aminometano
UTP	Uridina trifosfato

Resumen de Tesis

Caracterización parcial de una DNA primasa asociada a una DNA polimerasa de tipo replicativo de maíz

En ejes embrionarios de maíz se han identificado 3 actividades de DNA polimerasa que eluyen en un gradiente de fosfato de potasio a través de una cromatografía en DEAE-Celulosa y se han denominado DNA polimerasas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden en que eluyen. La DNA polimerasa 2 es una DNA polimerasa tipo replicativa y contiene asociada una actividad de DNA primasa. En el presente trabajo se caracterizó parcialmente la actividad de DNA primasa; ésta coeluye con la actividad de DNA polimerasa 2 a lo largo del proceso de purificación que involucra cromatografías a través de DEAE-Celulosa, Heparina sefarosa, Superdex 200 y Mono Q HR 5/5. Sin embargo, la actividad de DNA primasa se reduce notablemente después del paso de Heparina sefarosa, por lo que las fracciones con actividad de primasa que eluyeron de esta cromatografía fueron utilizadas para la caracterización parcial. Bajo las condiciones de reacción empleadas, la DNA primasa de maíz usa eficientemente un molde de DNA sintético: poli-dT, pero no puede usar poli-dA ni tampoco DNA de cadena sencilla (+) del fago M13; es muy sensible a N-etilmaleimida y a concentraciones mayores de 15 mM de KCl, requiere de cationes divalentes como Mg^{++} o Mn^{++} , teniendo un óptimo de actividad a concentraciones de 8.0 y 0.8 mM respectivamente. Funciona eficientemente a temperatura de 37 °C y a pH de 8.5 (óptimo), a pH menor de 7 la actividad de DNA primasa se inhibe notablemente. La DNA primasa de maíz incorpora ribonucleótidos durante la formación del cebador, aunque también puede incorporar desoxirribonucleótidos. El presente trabajo muestra evidencias de que la DNA polimerasa 2 de maíz contiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa, al igual que ocurre en la DNA polimerasa I en levadura y en la DNA polimerasa α en animales.

1. INTRODUCCION

1.1. Origen del maíz

El teocintle (*Zea mays* subespecie *parviglumis*), es considerado el ancestro del maíz (*Zea mays*, subespecie *mays*, [1]). Según Mangelsdorf [2], para que el maíz 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 maíz cultivado no puede subsistir sin el cuidado del hombre.

Estudios realizados en fósiles y demás objetos de interés arqueológico indican que el maíz empezó a domesticarse hace más de 6,000 años en el territorio de lo que hoy es Tehuacán, Puebla y el norte del estado de Oaxaca. Con la información disponible, el maíz primitivo debe haber tenido las siguientes características distintivas: mazorcas pequeñas de 2 a 6 cm de longitud y de 4 a 8 hileras de granos; en parte o totalmente cubiertas por brácteas, granos pequeños, palomeros, tunicados y de colores oscuros. Por la selección del hombre, muchas variedades evolucionaron hacia un mayor tamaño de semillas y/o mazorca. A la fecha, en el germoplasma reunido en los bancos genéticos se dispone de una gran variedad, desde granos muy pequeños (de menos de 5 mm), hasta granos muy grandes como la variedad "Cuzco gigante" del Perú, de alrededor de 2.5 cm de longitud.

En general, el maíz posee una diversidad genética que se adapta a muy variadas condiciones ecológicas y esto permite realizar su cultivo en muchas regiones agrícolas, lo que explica su gran importancia económica a nivel tanto nacional como mundial.

1.2. Clasificación taxonómica del maíz.

El maíz es un vegetal herbáceo cuya clasificación se muestra a continuación [3]:

Reino	vegetal
División	traqueofita
Subdivisión	pteropsida
Clase	angiosperma
Subclase	monocotiledónea
Grupo	glumifora
Orden	graminales
Familia	gramíneas

Tribu	maydeae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>
Subespecie	<i>mays</i>

1.3. Anatomía de la semilla de maíz

La semilla es el óvulo fecundado, transformado y maduro de las plantas fanerógamas; la semilla de maíz está constituida por las siguientes estructuras: 1) testa, 2) capa de células de aleurona, 3) endospermo, 4) capa de células epiteiliales, 5) escutelo, 6) coleóptilo, 7) plúmula, 8) nudo cotiledonar, 9) radícula y 10) coleorriza, ver fig. 1 [3].

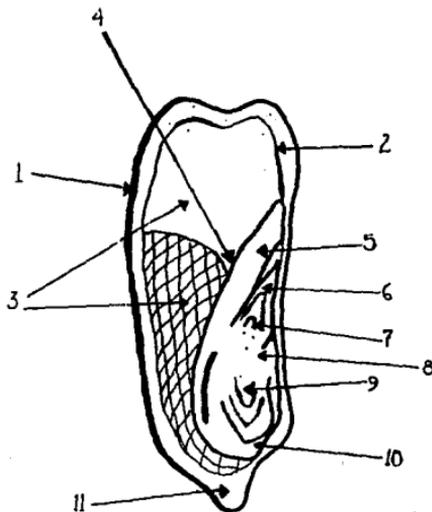


Figura 1. Anatomía de la semilla de maíz. Adaptado de Robles [3].

1.- La testa es la pared del ovario desarrollado y maduro que proporciona una barrera protectora entre el embrión y el medio externo. 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 impregnada de ceras y grasas, así como de células mucilaginosas que revientan en contacto con el agua, proveyendo 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 semilla.

2.- La aleurona es una capa de células vivas que rodea al endospermo, sintetiza α -amilasa y otras enzimas hidrolíticas que degradan almidón 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 es el maíz- es una estructura discoidea gruesa que se localiza entre el embrión y el endospermo, 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 tallo 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.

1.4. Germinación de semillas

Desde el momento en que termina la formación del embrión, las células suspenden la división celular y atenúan considerablemente sus funciones de respiración y nutrición iniciando

el período de vida latente que dura hasta el comienzo de la germinación [4].

La germinación en las semillas puede definirse como una secuencia de eventos morfogenéticos que resultan de la transformación de un embrión en la plántula [5]. Este patrón de cambios involucra procesos físicos, químicos, bioquímicos y genéticos coordinados muy finamente tanto anatómica como temporalmente. Desde un punto de vista bioquímico, se puede decir que la germinación es la reiniciación de la actividad metabólica y el crecimiento por parte de los tejidos que constituyen a la semilla; esto involucra una rehidratación, la utilización de reservas y el desarrollo gradual de sistemas sintéticos que transforman al embrión en una planta joven y capacitan a esta última para asumir una existencia autotrófica [6].

Durante la germinación, la secuencia de eventos fisiológicos y bioquímicos que parecen ser común a un gran número de semillas de gramíneas puede dividirse en i) Eventos tempranos, los cuales incluyen: hidratación, síntesis de ATP, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación del DNA; ii) eventos tardíos o secundarios: expansión celular, movilización de reservas y replicación del DNA. Cada evento representa un estado potencial en el cual un sistema de control puede operar en la germinación [7].

1.4.1 Absorción de agua

Para la activación del metabolismo y subsiguiente germinación, la hidratación es un evento 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 las semillas 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. Las proteínas constituyen el principal componente de las semillas en cuanto a absorción de agua; también participan en este proceso los mucílagos y sustancias pécticas; por el contrario, el almidón no interviene en este proceso porque sólo absorbe agua en condiciones ácidas y con altas temperaturas [7].

1.4.2. Respiración y síntesis de ATP

La respiración en las semillas maduras en el estado seco es extremadamente baja cuando se compara con semillas en desarrollo o en germinación. Durante la imbibición, la respiración se incrementa con el grado de hidratación de los tejidos. En esta fase ocurre un incremento en el consumo de oxígeno y la concentración de ATP también aumenta, lo cual parece deberse a la hidratación y activación de las enzimas mitocondriales [6,7].

1.4.3. Síntesis de RNA y proteínas

La síntesis de RNA es un evento temprano en la germinación [8]. Las RNA polimerasas-

DNA dependientes no son enzimas limitantes, ya que se han encontrado en trigo, cebada y soya en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de mRNA tan pronto como se inicia la germinación [7].

El rápido aumento que ocurre en la síntesis de proteínas durante las primeras etapas de la germinación es un evento independiente de la síntesis *de novo* de RNA mensajero [9]. En varias semillas de cereales se ha descrito la existencia de mensajeros almacenados [10] que se sintetizan durante la embriogénesis, pero no se expresan en ese período. Se ha sugerido que estos mensajes almacenados se requieren en las etapas tempranas de la germinación para una rápida reiniciación de la actividad metabólica [11].

Por otra parte, la síntesis de proteínas se restablece inmediatamente después de la imbibición, por lo que es probable que todos los factores necesarios para esta actividad ya se encuentren presentes en la semilla seca [12].

La estructuración de los ribosomas en polisomas es un indicio importante de la síntesis de las proteínas. En la semilla seca, la cantidad de polisomas es muy baja, pero conforme la germinación avanza, la cantidad aumenta notablemente en el embrión [13, 10].

Durante la fase temprana de la germinación, la síntesis de proteínas puede llevarse a cabo en ausencia de síntesis de RNA [8], pero en los tiempos posteriores, la síntesis de proteínas depende de los mensajes sintetizados *de novo* [14], y el patrón cambia a otro cuya expresión puede ser bloqueado con tratamientos de α -amanitina [15].

1.5. Síntesis de DNA y división celular

La síntesis de proteínas y RNA se reinicia tan pronto como los tejidos se embeben, pero la síntesis replicativa del DNA comienza más tarde. Este hecho se hace más evidente para la mayoría de las gramíneas [16].

Se ha sugerido que la síntesis de DNA que se observa en las etapas tempranas de la germinación es el resultado de la replicación del DNA organelar [17] o de la reparación del DNA [18-22]; estas dos posibilidades no son excluyentes [23]. La expansión de la radícula en la semilla ocurre inicialmente por elongación de las células, y su salida subsecuente a través de la cubierta de la semilla podría o no estar acompañada por división celular. La replicación del DNA celular es un requisito indispensable para que la división celular suceda [7]; este proceso involucra la acción coordinada de múltiples actividades enzimáticas y factores proteicos. Un papel central en este evento es realizado por las DNA polimerasas, cuya función es asegurar la incorporación de los 4 desoxinucleótidos (dAMP, dCMP, dGMP y dTMP) sobre un molde materno, de acuerdo a las reglas de apareamiento de Watson y Crick. En todos los organismos eucariontes y procariontes estudiados se ha detectado actividad de DNA polimerasa y aunque las propiedades físicas, químicas e inmunológicas varían de especie a

especie, todas las DNA polimerasas comparten las siguientes características i) Requieren de un cebador que proporcione un extremo 3'-OH, generalmente RNA, el cual es sintetizado por un tipo especial de RNA polimerasa, denominada **DNA primasa** ii) Necesitan de un molde de DNA para la incorporación de los nucleósidos monofosfatos iii) Polimerizan en dirección 5'→3' en la cadena patrón y iv) Requieren de un catión divalente: Mg⁺⁺ o Mn⁺⁺ [24].

Sin embargo, poco se sabe de la regulación de la replicación del DNA durante la germinación. Bewley y Black [7] sugieren que tanto la actividad como los niveles de DNA polimerasas pueden ser factores que controlen este proceso.

El conocimiento que se tiene de la replicación del DNA y el papel que desempeña la **DNA primasa** en este evento provienen del amplio estudio que se ha realizado en procariontes, eucariontes inferiores y en células de animales; debido a ello se hará una breve descripción de las principales características de la DNA primasa de dichos organismos, para luego concluir comparando con la información disponible de células vegetales.

1.6. Descubrimiento de que la síntesis de DNA comienza con un cebador de RNA [24]

La primer evidencia de que el RNA participaba como cebador en la replicación del DNA provino de estudios del mecanismo de iniciación usando pequeños bacteriófagos de DNA cadena sencilla (ssDNA), tales como el fago M13 y el F1, con los cuales se demostró además que la iniciación de la replicación se originaba con un cebador en una única posición.

El esclarecimiento de los mecanismos de cebado del DNA con RNA en las cadenas de iniciación de los bacteriófagos ϕ X174, G4 y M13 ayudaron a revelar cómo la síntesis de las cadenas del cromosoma hospedero son iniciadas, primero en el origen de replicación y posteriormente en las horquillas de replicación.

Inicialmente, estudios con los fagos M13, G4, ϕ X174 y virus del poliooma aportaron los más claros ejemplos de cebado del DNA con RNA. Debido a que esos pequeños virus dependen virtualmente de toda la maquinaria sintética de la célula receptora, las proteínas usadas en la replicación viral son las mismas que la célula usa para replicar su propio DNA. La demostración de que el RNA es el cebador en los fragmentos nacientes durante la replicación de la cadena discontinua *in vivo* se logró realizando estudios con *E.coli*, fago T7, *B. subtilis*, SV40 y linfocitos. El cebado del DNA utilizando RNA es el mecanismo que más utiliza la célula para la iniciación de las cadenas del DNA [24]

1.6.1. Relevancia de la formación del cebador durante la síntesis de DNA [24]

Una de las reglas básicas de la replicación es que las DNA polimerasas no pueden comenzar la síntesis del DNA *de novo*, a menos que exista un dispositivo de cebado. Cada evento de iniciación requiere de un cebador [24].

Las polaridades de las dos cadenas del DNA dúplex y la exclusividad en la dirección de síntesis (5'→3') del mismo por las DNA polimerasas requiere de un mecanismo de replicación semidiscontinuo. Dos diferentes modos de cebado pueden operar para la síntesis de la cadena continua (líder), y la discontinua (retrasada). La cadena continua necesita solo un cebador, usualmente en o cerca del origen de replicación del cromosoma (la secuencia especial donde la replicación comienza). En contraste, la cadena discontinua debe ser cebada repetidamente para generar las cadenas nacientes pequeñas (fragmentos de Okasaki), las cuales son de 1,000 a 2,000 nucleótidos de longitud en procariontes, mientras que en eucariontes son de 100 a 200 nucleótidos. Por lo anterior, los mecanismos usados para el cebado de la síntesis de las dos cadenas podría diferir.

Los posibles medios por los cuales se podría presentar el cebado para la cadena continua revelan un conjunto de mecanismos muy diverso [24]:

- i) El cebador de RNA puede ser sintetizado por una DNA primasa o una RNA polimerasa.
- ii) Alternativamente, un cebador de DNA puede ser generado por alguno de los siguientes mecanismos adicionales: a) Una ruptura puede darse en un sitio específico en el DNA dúplex por una endonucleasa, b) Un extremo 3' OH terminal puede ser introducido hacia un DNA dúplex por recombinación para generar una asa D (D-loop), la cual pueda ser elongada, c) Una estructura tallo-asa al final del genoma puede proveer un extremo 3 OH'.
- iii) Un RNA preformado (tRNA), puede servir como cebador, como sucede en la iniciación de la replicación en algunos genomas retrovirales.
- iv) El extremo 3' OH puede ser donado por una serina de una proteína específica, mecanismo que utilizan ciertos virus dúplex lineares de *B. subtilis* (ϕ29), *E. coli* (PRD1) y de células eucariontes (adenovirus).

En contraste con los diferentes mecanismos de cebar el DNA para iniciar la replicación de la cadena continua, los múltiples cebadores en la cadena discontinua son invariablemente formados por primasas especializadas para esta función. Además de su capacidad para cebar, las primasas son parte integral de la maquinaria de replicación (replisoma) del DNA.

La razón por la que la célula utiliza RNA en lugar de DNA para comenzar la síntesis, podría ser porque de esta manera se logra una total fidelidad en la replicación debido a que en o cerca del inicio del origen de replicación, la maquinaria diseñada para construir DNA a prueba de errores y corrección de los mismos puede no funcionar tan eficazmente como cuando lo

hace durante la elongación de la cadena. Los RNA mensajeros son diseñados para ser transitorios, mientras que el DNA es esencialmente imborrable. Entonces, el comienzo de una cadena marcada por un híbrido RNA-DNA "extraño" puede ser fácilmente reconocido y eliminado, seguido de una replicación a prueba de error [24].

1.7. DNA Primasa de *E. coli* (producto del gen *dnaG*) [24].

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

La conversión del cromosoma ssDNA del fago G4 (molde que tiene los requerimientos más simples para medir actividad de DNA primasa), a la forma replicativa (DNA duplex), provee un ensayo directo de la función de primasa *in vitro*, ya que es una reacción que requiere de SSB, los 4 rNTPs y Mg⁺⁺; en este molde, la primasa sintetiza un cebador único de RNA de 28 nucleótidos de longitud en el origen de la cadena complementaria del fago G4. La DNA polimerasa III holoenzima, en una manera dependiente de ATP se une al molde (previamente cebado), y extiende procesivamente el cebador a la forma replicativa. Bajo condiciones que permiten tanto la síntesis del cebador como la subsecuente síntesis de DNA del ssDNA del G4 (reacción acoplada de síntesis de DNA), el cebador podría ser de solo 2 ribonucleótidos permitiendo así a la DNA polimerasa que reconozca el extremo 3'-OH y comience a sintetizar el DNA. La relativa simplicidad para estudiar la replicación del fago G4 *in vitro* lo hacen un sistema atractivo para estudiar los mecanismos de acción de la primasa.[24].

En la replicación de la mayoría de los moldes colifágicos, la primasa actúa en coordinación con otros factores proteicos; la interacción con la proteína DnaB (helicasa), es esencial para el cebado de la mayoría de los moldes. Para que la primasa actúe en el molde de ϕ X174, todavía más proteínas son requeridas; DnaC, DnaT, PriA y PriC; todos estos factores y el ATP se ensambalan en un complejo multiprotéico (el primosoma), sobre el DNA, permitiendo el subsecuente cebado por la primasa. Hasta la fecha no se sabe con certeza cuales factores permanecen establemente unidos al DNA y cual es su función específica durante el cebado.

Un análisis detallado del sitio de origen del G4 y de otros sitios donde se inicia el cebado podrían proveer pistas para entender como la DNA primasa reconoce el DNA.

La secuencia esencial, determinante en el origen de G4 es la que se localiza adyacente al sitio de iniciación del RNA cebador (ver tabla 1). Los nucleótidos 3'-GTC son requeridos en el origen para la iniciación del cebador de RNA (5'-AG), complementaria al TC.

Tabla 1. secuencias consenso de sitios de origen de diferentes bacteriófagos y plásmidos [24].

Molde	Secuencia	RNA		DNA	

		pppA G . . .			
		-11		-1+1	
G4	A A A C G T C A T C C C T G C C G C C G				
St-1, φK, α3	A A T C G T C C T C C C T T C C G C C G				
R100	G A C C G T C C C G A C C C C T A C G				
R1	G A C C G T C C C C G A C C C C T A C C				
Ff6	G A C C G T C C T C C G A C G C G T C A				
R6K oriα	G A C C G T C C C C C G C G T T C G C G				

Secuencia de moldes de DNA cadena sencilla alrededor del sitio de inicio y en el punto de transición RNA-DNA de los cebadores sintetizados por la primasa.

La replicación de la cadena continua del plásmido R1 es cebada solamente por la primasa de *E. coli*. La cadena naciente continua, tiene un único extremo 5' terminal que se inicia en un solo sitio de aproximadamente 380 pb hacia abajo del origen. Esta secuencia es funcionalmente análoga al origen de replicación del fago G4. Secuencias similares han sido detectadas en los plásmidos R100, R6K y φ, indicando que la secuencia específica de reconocimiento por la DNA primasa es más común de lo que se había creído en estudios anteriores.

La homología entre diferentes fagos de cadena sencilla y secuencias derivadas de plásmidos está restringida a una región adyacente al sitio de inicio de síntesis de RNA (ver tabla 1).

La secuencia 3'GTC está presente en el sitio de inicio del cebador y varios residuos A y C están similarmente localizados hacia arriba del origen.

La preferencia de la primasa por las secuencia 3'-GTC en el molde es también aparente cuando ésta es activada por la proteína DnaB. Durante la replicación del cromosoma de *E. coli* *in vivo* se sintetizan cebadores de 11 ± 1 nucleótidos de longitud, los que comienzan con una purina, siendo A 5 veces más frecuentemente usada que G, el segundo nucleótido es comúnmente también una purina. De los cebadores aislados, el 50% comienza con pppApG en su extremo 5' terminal, el complemento TC en la señal 3'-GTC (ver tabla 1).

La longitud de los cebadores (11 ± 1 nucleótido), se asemeja en tamaño a los sintetizados por la primasa de eucariontes (ver sección 1.7)

1.7.1. Primosomas de *E. coli*

La primasa de *E. coli* raramente actúa sola *in vivo*, generalmente se agrupa con la proteína multifuncional DnaB en la síntesis de cebadores para comenzar la síntesis de la cadena complementaria. El ensamblaje del complejo DnaB-primasa en el molde, ya sea ssDNA, cubierto con SSB o DNA duplex (e.g. pBR322 o el cromosoma de *E. coli*) requiere de proteínas adicionales "precebadoras" [24].

1.8. DNA Primasa de eucariontes [24]

En eucariontes, la actividad de primasa es comúnmente un componente de la DNA polimerasa α , enzima nuclear responsable de la replicación del cromosoma. La relativa baja procesividad de la polimerasa, además de la actividad de primasa que contiene asociada, la hacen un candidato plausible para la síntesis de la cadena discontinua durante la replicación del DNA duplex. La DNA polimerasa δ , que es muy procesiva en presencia del factor PCNA y que carece de actividad de DNA primasa, puede ser responsable de la síntesis de la cadena continua.

La polimerasa α ha sido purificada de muchas fuentes, incluyendo células de levadura y de humano y está compuesta de 4 subunidades; la de mayor peso molecular (≈ 180 kDa) tiene la actividad de DNA polimerasa, mientras que las dos subunidades más pequeñas (≈ 60 y 50 kDa) están asociadas con la actividad de primasa, existe una cuarta proteína de ≈ 70 kDa que no tiene actividad catalítica, pero que probablemente actúa en el anclaje del complejo al DNA [25]. La actividad de primasa de las subunidades pequeñas es evidente cuando están formando parte del complejo polimerasa-primasa y también cuando están separadas de los polipéptidos de 180 y 70 kDa. Las proteínas de 60 y 50 kDa parecen funcionar como unidad y no ha sido posible separar una de otra bajo condiciones que permitan que la actividad de

primasa se mantenga. Su coeficiente de sedimentación es consistente con un heterodímero de 110 kDa y son coprecipitadas por un anticuerpo dirigido contra el polipéptido más pequeño.

Mientras que el sitio de unión a rNTPs reside específicamente en la proteína de 50 kDa, análogos de ATP marcan ambas proteínas con eficiencia similar, lo que indica que ambas proteínas participan en la síntesis del cebador. Los genes que codifican para ambas proteínas en levadura y ratón han sido clonados y secuenciados. La comparación de éstos indica que la secuencia primaria de aminoácidos ha sido altamente conservada durante la evolución. Experimentos de interrupción génica en los genes *pri1* y *pri2* (que codifican para las subunidades de 58 y 48 kDa respectivamente en levadura), han demostrado que estas mutaciones son letales [26-28]. A pesar de la homología de los polipéptidos de primasa en levadura y ratón, estudios de complementación *in vivo* demostraron que ninguna de las dos subunidades silvestres de ratón son capaces de rescatar el fenotipo causado por mutaciones letales o temperatura-sensible en el gen *pri1* o *pri2* de levadura, indicando que estas proteínas (aún cuando son estructural y funcionalmente muy similares), podrían estar involucradas en interacciones específicas de especie durante la replicación del DNA [29]. Los genes que codifican para las subunidades de la primasa en levadura están presentes como copia única y son esenciales.

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

Los cebadores son iniciados con una purina, la K_m para esos sustratos es alta, variando de 1 a 5 mM para ATP y y cerca de 10 veces menos para GTP; el ATP es usado cerca de 4 veces más comúnmente que el GTP, pero esta preferencia es influenciada por la concentración de los diferentes NTPs y de la secuencia del molde. La mayoría de las primasas pueden usar dNTPs en lugar de rNTPs en todas las posiciones, excepto en la posición inicial [24].

1.8. Requerimientos para medir actividad de DNA primasa.

Generalmente, la actividad de DNA primasa es ensayada bajo condiciones diferentes a las de DNA polimerasa α . La fuerza iónica que requiere la primasa es generalmente menor que la

que requiere la polimerasa. El molde sintético preferido por la primasa es poli-dC [30,31], seguido por poli-dT [32-34]. Poli-dG y poli-dA no son reconocidos por el complejo polimerasa-primasa [35,36]. Holmes *et al.* [37] sintetizaron moldes de composición definida utilizando desoxinucleotidil transferasa terminal en los cuales se añadía oligo-dC u oligo-dT de longitudes variables, covalentemente unidas al extremo 5'OH terminal de poli-dA o poli-dI respectivamente. Dado que el complejo polimerasa-primasa no se une ni a poli-dA ni a poli-dI, el oligo-dC y el oligo-dT representan la única parte relevante del molde para la unión del complejo polimerasa-primasa con el DNA. De esta forma, los autores pudieron definir la longitud mínima requerida de oligo-dC u oligo-dT para ser aceptada como sitio de iniciación; el complejo polimerasa-primasa requiere de al menos un oligo-dT de 4 nucleótidos unido covalentemente al poli-dI, mientras que requiere de un oligo-dC de al menos 8 residuos de longitud.

La afidicolina, inhibidor competitivo (por dCTP) de la DNA polimerasa α [38-40], tiene poco efecto inhibitorio en la incorporación de rNTPs en la reacción de cebado. Por otro lado, la actividad de primasa es muy sensible a NEM [41,29,3740]. La adición de dNTPs en la mezcla de reacción reduce la incorporación de rNTPs por el complejo polimerasa-primasa en un 50% [41]. Ocasionalmente, dNMPs pueden ser incorporados en lugar de rNMPs en reacciones *in vitro* cuando el ribonucleótido necesario está ausente [41,42].

1.9. DNA primasa de plantas.

El estudio que se tiene sobre DNA primasas de plantas es muy pobre todavía; sin embargo, los pocos reportes que existen a la fecha indican que éstas tienen bastante similitud con las de su contraparte animal.

El primer estudio que se publicó sobre DNA primasa de vegetales fue el de Graveline *et al.* en 1984 [43], quienes reportaron el aislamiento de una primasa de trigo que coelúa con una DNA polimerasa tipo γ de animales, de peso molecular ca. de 90 kDa y un coeficiente de sedimentación de 5S; la enzima no era inhibida por afidicolina y utilizaba como molde poli-dT y DNA cadena sencilla de fago M13; no utilizaba poli-dC, poli-dA ni poli-dG. Posteriormente, Laquel *et al.* [44] obtuvieron una preparación homogénea de la enzima y la caracterizaron; las mejores condiciones para el ensayo de primasa se obtuvieron a una concentración de 1-5 mM de Mg^{++} , 0-15 mM de KCl, 0.2 mM de Mn^{++} , pH 8.0 y temperatura de 37 °C.

Otro de los sistemas vegetales donde se ha detectado actividad de primasa ha sido en cloroplastos de chícharo [45]; ésta presenta un peso molecular de 115-120 Kda, tiene afinidad por los moldes poli-dC, poli-dT y DNA cadena sencilla del fago M13, pero no tiene afinidad por los moldes de poli dA ni de poli dG. Las mejores condiciones para el ensayo se obtuvieron

utilizando una concentración de 8-12 mM de Mg^{++} , pH 8.0, NaCl 25-75 mM, no es inhibida por afidicolina y sí por NEM.

Recientemente se ha reportado en chícharo una actividad de DNA primasa asociada a una DNA polimerasa de alto peso molecular tipo α que coeluye a través de diferentes pasos cromatográficos; sin embargo, esta actividad no fue caracterizada [46].

Hasta la fecha y en una revisión exhaustiva no se logró obtener más información acerca de primasas en sistemas vegetales, lo que indica que se realiza una escasa investigación en esta área.

2. Antecedentes experimentales.

En nuestro laboratorio, trabajando con semillas de maíz se han encontrado varias enzimas que participan en la replicación del DNA: DNA topoisomerasas [47], DNA ligasa [48] y DNA polimerasas [49,50].

Existen al menos tres actividades de DNA polimerasa en extractos protéicos de ejes embrionarios de maíz a las 24 horas de germinación [50], las cuales se nombraron como DNA polimerasas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden de elución en una cromatografía en DEAE-Celulosa. La DNA polimerasa 2 (enzima que se estudió en el presente trabajo), ha sido purificada y presentó las siguientes características: la actividad de DNA polimerasa se encuentra presente en un complejo multiproteico de alto peso molecular, la K_m para los diferentes dNTPs es similar a la reportada para otras DNA polimerasas tipo α , la actividad se incrementa hasta 2 ordenes de magnitud entre las 0 y las 24 horas de germinación [50], el cambio en la actividad no se debe ni a variaciones en la cantidad del complejo multiproteico ni de las subunidades que la componen [51]. Anticuerpos policlonales dirigidos contra la DNA polimerasa de temera reconocen principalmente subunidades de 90 y 83 kDa [50], anticuerpos dirigidos contra el complejo de la DNA polimerasa 2 de maíz reconocen bandas de 90, 83, 70, 60, 55, 45 y 24 Kda [52]. Estas características han sugerido que la DNA polimerasa 2 es una DNA polimerasa tipo α [50,52].

3. Hipótesis

Con base en los antecedentes presentados, se establece la hipótesis de que la DNA polimerasa replicativa tipo α de maíz contiene asociada una actividad de DNA primasa.

4. Objetivo General

-Demostrar la existencia de una DNA primasa asociada a la DNA polimerasa 2 de maíz.

4.1. Objetivos particulares

- a) Montar el ensayo que permita determinar si existe actividad de DNA primasa asociada a la DNA polimerasa 2 de maíz y en su caso:
- b) Caracterizarla
- c) Compararla con DNA primasas de otros sistemas vegetales y animales

5. Material y Métodos

5.1. Material biológico

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

5.2. Soluciones amortiguadoras y reactivos

5.2.1. Solución amortiguadora para imbibición de ejes embrionarios

Tris-HCl	pH7.4	50 mM
Cloruro de potasio		50 mM
Cloruro de magnesio		10 mM
Sacarosa		2%
Cloranfenicol		10 μ M

5.2.2. Solución amortiguadora para homogenar ejes embrionarios

Tris-HCl	pH 7.6	40 mM
KH ₂ PO ₄	pH 7.6	40 mM
Cloruro de potasio		15 mM
2-mercaptoetanol		1 mM
Sacarosa		250 mM
TPCK		75 μ M
Benzamidina		10 mM
OTI		50 μ g/ml

5.2.3. Soluciones amortiguadoras utilizadas en la purificación de la polimerasa-primasa

5.2.3.1. Solución amortiguadora A

K ₂ HPO ₄		40 mM
EDTA		1 mM
Glicerol		20%
2-mercaptoetanol		1 mM
TPCK		50 μ M
Benzamidina		1 mM
OTI		10 μ g/ml

5.2.3.2. Solución amortiguadora B

Igual que 5.3.1., excepto que la concentración de fosfatos es de 400 mM.

5.2.3.3. Solución amortiguadora C

Igual que 5.3.1., excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 150 mM.

5.2.3.4. Solución amortiguadora D

Igual que 5.3.1., excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 1.5 M.

5.2.3.5. Solución amortiguadora E

Igual que 5.3.1., excepto que esta solución contiene una concentración de NaCl 50 mM.

5.2.3.6. Solución amortiguadora F

Tris-HCl	pH 7.4	20 mM
NaCl		50 mM
EDTA		1 mM
Glicerol		30%
TPCK		50 μ M
Benzamidina		1 mM
OTI		10 μ g/ml
2-mercaptoetanol		1 mM

5.2.3.7. Solución amortiguadora G

Igual que 5.3.6., excepto que la concentración de NaCl es de 1.5 M

5.2.4. Solución amortiguadora para activación de DNA de alto peso molecular de timo de ternera

Tris-HCl	pH 7.4	10 mM
MgCl ₂		50 μ M
BSA		0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera		0.5 mg/ml

5.2.5. Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa

Tris-HCl	pH 7.4	50 mM
KCl		15 mM
MgCl ₂		8 mM
dATP		0.1 mM
dCTP		0.1 mM
dGTP		0.1 mM
Glicerol		5%
2-mercaptoetanol		0.4 mM
DNA activado		10 µg/ml
ATP		1 mM
[metil- ³ H]-TTP (57 Ci/mmol)		5µCi/ml

5.2.6. Mezcla de reacción para el ensayo de DNA primasa**5.2.6.1. Utilizando poli-dT como molde****5.2.6.1.1. Solución amortiguadora para la síntesis del cebador**

Tris-HCl	pH 8.2	50 mM
MgCl ₂		8 mM
KCl		15 mM
Glicerol		5%
2 mercaptoetanol		1 mM
poli-dT		0.12 A ₂₆₀ nm/ml
ATP		1 mM

5.2.6.1.2. Complemento para la síntesis de DNA

{α- ³² P}-dATP (3.7X10 ⁻⁴ GBq/ml)	10 µCi/ml
DNA pol I de <i>E.coli</i>	20 u/ml

5.2.6.2. Utilizando ssDNA M13 mp8(+)**5.2.6.2.1. Solución amortiguadora para la síntesis del cebador**

Tris-HCl	pH 7.6	50 mM
MgCl ₂		8 mM
KCl		15 mM
Glicerol		5%

2-mercaptoetanol	1 mM
ATP	1mM
CTP	0.25 mM
GTP	0.25 mM
UTP	0.25 mM
ssDNA M13 mp8 (+)	1 µg/ml

5.2.6.2.2. Complemento para la síntesis de DNA

[metil- ³ H]-TTP (57 Ci/mmol)	25µCi/ml
dATP	0.25 mM
dCTP	0.25 mM
dGTP	0.25 mM
DNA pol I de <i>E.coli</i>	20 u/ml

5.2.7. Líquido de centelleo

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

5.2.8. Reactivos para el gel de poliacrilamida al 6%, urea 7M

Acrilamida		(6%T 2.7Bis)
Tris-borato	pH 8.3	100 mM
EDTA		2 mM
Urea		7 M

5.2.9. Solución amortiguadora para aplicar la muestra de ácidos nucleicos

Azul de bromofenol	0.25% w/v
Xilen cianol	0.25% w/v
Glicerol	50%
Formamida	c.b.p 100 ml

5.3. Métodos

5.3.1. Preparación de protamina

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

5.3.2. Preparación de resinas

5.3.2.1. Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) Sigma Co.

Se coloca un g de DEAE-celulosa en 75 ml de HCl 0.5 N agitando suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos. La resina se colecta por filtración al vacío lavándola con agua desionizada hasta llegar a pH 4.0 (sin permitir que la resina se seque). Posteriormente se agrega a la resina un volumen de 75 ml de KOH 0.5 N, se agita suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos y se lava con agua desionizada hasta llegar a pH 8.0, se resuspende en 80 ml de KCl 50 mM y se lleva a pH de 7.2 con HCl 50 mM. Se agita suavemente durante una hora, a intervalos de 15 minutos. Se retitula a pH 7.2 y se decanta eliminando los finos y materia particulada. La resina se resuspende en solución amortiguadora A (5.2.1) y se equilibra con 10 volúmenes de la misma.

5.3.2.2. Heparina sefarosa (Pharmacia BioTech)

Se hidrata un g de la resina en 50 ml de agua desionizada durante 30 minutos, se decanta eliminando los finos y materia particulada, se monta la columna y se equilibra con 10 volúmenes de la solución amortiguadora C (5.2.3.).

5.3.2.3. Superdex 200 (Pharmacia BioTech)

Esta resina se suministró ya empacada por el proveedor y solo se equilibró con 3 volúmenes de cama de solución amortiguadora E (5.2.5).

5.3.2.4. Mono Q HR 5/5

Esta resina se suministró ya empacada por el proveedor, solo se equilibró con 10 volúmenes de cama de solución amortiguadora F (5.2.6.).

5.3.3. Imbibición de ejes embrionarios.

Ejes embrionarios íntegros de las semillas de maíz fueron obtenidos manualmente (10 g peso seco), los cuales se desinfectaron con 30 ml de hipoclorito de sodio al 0.1% durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con suficiente agua desionizada estéril, se secaron con un papel filtro estéril y se les colocó entre 2 discos de papel filtro Whatman-# 1 en cajas petri, a manera de que quedara una capa homogénea. Se les colocó solución amortiguadora (5.2.1), a manera de que los discos de papel quedarán perfectamente humedecidos. La incubación se llevó a cabo en una estufa regulada a 25 °C durante 24 horas.

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

5.3.4. Obtención del extracto celular

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

Los ejes embudidos durante 24 horas fueron resuspendidos en 2.5 volúmenes (relación peso fresco de ejes a volumen de solución), de solución amortiguadora de homogeneización (5.2.2). Se homogenizaron 2 veces por 30 segundos a máxima velocidad cada vez en un polítron PCU-2. El extracto se centrifugó a 7,500 x g durante 15 minutos. La pastilla obtenida de esta primera centrifugación fué resuspendida en 1.5 volúmenes de solución amortiguadora de homogeneización y se volvió a homogenar en el mismo polítron en las condiciones antes descritas. Se centrifugó a 7,500 x g durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido de esta segunda centrifugación se mezcló con la anterior y a esta mezcla se le volvió a centrifugar a 11,500 x g durante 15 minutos. El sobrenadante total obtenido se centrifugó a 100, 000 x g durante 2 1/2 horas. La pastilla se desechó y al sobrenadante se le adicionó lentamente 10 µl/ml de una solución de protamina al 10% para precipitar los ácidos nucleicos, la suspensión resultante se agitó durante 30 minutos y el precipitado se colectó centrifugando a 11,500 x g. La pastilla se desechó y el sobrenadante fué utilizado como fuente enzimática para los pasos posteriores de purificación (Fracción I).

5.3.5. Activación del DNA de alto peso molecular

Se hicieron reaccionar 0.5 mg de DNA timo de ternera (previamente disuelto en solución amortiguadora para activación del DNA; 5.2.4), con 0.01 mg mg de DNasa I (Sigma Co.). se incubó durante 15 minutos a 37 °C y posteriormente la DNasa se desnaturalizó calentando a 77 °C durante 5 minutos; finalmente se pasó a un baño de hielo. Este DNA activado fue utilizado posteriormente como molde para la incorporación de los dNTPs en la mezcla de reacción para el ensayo de la DNA polimerasa (5.2.5).

5.3.6. Determinación de actividad de la DNA polimerasa

La actividad de la DNA polimerasa fué ensayada en un volumen final de 100 µl, en un tubo de ensayo de 12X75 mm que contenía la mezcla de reacción (5.5) y 20 µl del extracto crudo o de las fracciones de los diferentes pasos cromatográficos. Los ensayos se realizaron a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 100 µl de una solución stock de 2 mg/ml de DNA de esperma de arenque (Sigma Co.), y 3 ml de TCA al 10%. Los tubos se colocaron en hielo durante 30 minutos y la radiactividad insoluble en TCA se colectó filtrando al vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavaron con 5 ml de TCA al 10% y luego

con 5 ml de etanol al 96%. Los filtros se secaron perfectamente en una estufa a 65 °C durante 20 minutos y se transfirieron a frascos viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo (5.6.3). La cantidad de radiactividad se determinó en un contador de centelleo Beckman LS8000IC.

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

5.3.7. Determinación de la actividad de DNA primasa utilizando poli-dT como molde

5.3.7.1. Síntesis del cebador

La determinación indirecta de la actividad de DNA primasa fué adaptada a partir de la reportada por Laquel *et al* [44]. Inicialmente, el ensayo fue efectuado en las mismas condiciones en las que se determinó la actividad de DNA polimerasa (ver 6.2.8). Finalmente, el ensayo se efectuó en un volumen final de 50 µl en un tubo eppendorf en la mezcla de reacción que se indica en el punto 5.6.1.1, se agregaron 2.5-5.0 µg de proteína por ensayo, preincubando durante 15 minutos a 37 °C, la reacción de cebado se detuvo agregando NEIM a una concentración final de 5 mM o calentando la mezcla a 85 °C durante 5 minutos y posteriormente se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

5.3.7.2. Síntesis de DNA

La síntesis de DNA se inició al agregar la solución 5.6.1.2 (DNA pol I de *E.coli* + [α -³²P]-dATP) a la solución anterior, se incubó a 37 °C durante 45 minutos. La reacción se detuvo agregando 50 µl de un stock 2 mg/ml de DNA de esperma de arenque y 1 ml de TCA al 10%. El precipitado fué filtrado en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, lavados con 5 ml de TCA al 10% y finalmente con 5 ml de etanol al 96%. Los filtros fueron secados y la radioactividad determinada como se indica en el ensayo descrito para la DNA polimerasa.

5.3.8. Determinación de la actividad de DNA primasa utilizando ssDNA M13mp8 (+) como molde

5.3.8.1. Síntesis del cebador

La reacción fue adaptada a partir de la reportada por Laquel *et al* [44]. El ensayo se efectuó en un volumen final de 25 µl en la mezcla de reacción que se indica en el punto 5.6.2.1, se agregaron ≈2 µg de proteína por ensayo y se preincubó a 37 °C durante 30 minutos

5.3.8.2 Síntesis de DNA

La síntesis de DNA se originó al agregar la solución 5.6.2.2 a la solución anterior, se incubó 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 50 µl de un stock 2 mg/ml de DNA de esperma de arenque y 1 ml de TCA al 10%. El precipitado fué filtrado en filtros de fibra de

vidrio Whatman GF/C, lavado con 5 ml de TCA al 10% y finalmente con 5 ml de etanol al 96%. Los filtros fueron secados y la radiactividad determinada como se indica en el ensayo descrito para la DNA polimerasa.

5.3.9. Electroforesis de productos sintetizados por la DNA pol I de *E.coli*, teniendo como molde poli-dT.

La reacción para determinar la actividad de DNA primasa se realizó como se menciona en el punto 5.3.7., excepto que la reacción de síntesis de DNA se detuvo agregando EDTA a una concentración final de 20 mM. Las proteínas se extrajeron con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados a -20 °C con 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y mantenidos 30 minutos a -70 °C. Posteriormente la muestra se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm en una microcentrífuga. La pastilla se secó y fué redisuelta en la solución amortiguadora 5.2.9. Los ácidos nucleicos fueron desnaturalizados a 85 °C durante 3 minutos y las muestras se aplicaron a un gel de poliacrilamida al 6% (5.2.8.). Las dimensiones del gel fueron de 38 cm de largo, 40 cm de ancho y 0.4 mm de grosor. La electroforesis se llevó a cabo a 1,200 V durante 2 horas. Después de remover una de las placas del gel, éste fué adherido a un papel filtro Whatman # 1 para removerlo de la otra placa de vidrio, posteriormente fué secado y expuesto a una película para autorradiografía (Reflection NEF-495, DUPONT) en una pantalla amplificadora a -70 °C

5.4. Caracterización de la DNA primasa

La actividad de la DNA primasa (Fracción III) se ensayó en la forma descrita en el punto 5.3.7., variando las condiciones y/o las concentraciones descritas a continuación.

5.4.1. Temperatura

El complejo polimerasa-primasa fué preincubado a 4, 10, 25, 30, 37, 45 y 52 °C por 15 minutos, posteriormente se añadió $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, NEM y DNA pol I de *E. coli*; la reacción de síntesis de DNA se realizó durante 45 minutos a 37 °C y se detuvo como se indica en el punto 5.3.7.2.

5.4.2. Magnesio.

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado en presencia de 0, 2.5, 8, 12, 16 y 20 mM de Mg^{++} . Después de la preincubación se inactivó a la polimerasa-primasa desnaturalizándola a 85 °C por 5 minutos La concentración de Mg^{++} se ajustó a 8 mM (con EDTA cuando la

preincubación se efectuó a 12, 16 y 20 mM), con el objeto de que durante la posterior incubación con Pol I, esta trabajara a la misma concentración de Mg^{++} en todos los casos. Para descartar cualquier posible artefacto, se efectuó un control con DNA pol I utilizando poli-dT cebado con oligo[dA]₈ en presencia de 8 y 20 mM de Mg^{++} (éste último en presencia de EDTA 6 mM). Después de ajustar la concentración de Mg^{++} se procedió como se indica en el punto 5.3.7.2.

5.4.3. Manganeso

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado en presencia de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5 y 3 mM de Mn^{++} . La reacción de cebado se detuvo como se indica en el punto anterior y posteriormente se agregó Mg^{++} a una concentración final de 8 mM. Para descartar cualquier posible efecto artificial, se efectuó un control con DNA pol I utilizando poli-dT cebado con oligo[dA]₈ en presencia de las diferentes concentraciones de Mn^{++} y Mg^{++} 8 mM. La reacción de síntesis de DNA se inició al agregar DNA pol I + [α -³²P]-dATP, posteriormente la reacción continuó como se indica en el punto 5.3.7.2.

5.4.4. Cloruro de potasio

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado en presencia de 0, 7.5, 15, 20, 25, 50 y 150 mM de KCl. La reacción de cebado se detuvo como se indica en el punto anterior. La reacción de síntesis de DNA se inició al agregar DNA pol I + [α -³²P]-dATP, posteriormente la reacción continuó como se indica en el punto 5.3.7.2. Para observar el efecto del KCl sobre la DNA pol I se tuvo como control a la actividad que presentaba con poli-dT cebado con oligo-[dA]₈ a las concentraciones de KCl señaladas.

5.4.5. pH

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado variando los valores de pH, usando diferentes amortiguadores a una concentración final de 10 mM. Para los pHs 5.5, 6.0, 6.5 se utilizó MES, para los pHs de 6.5, 7.0 y 7.5 Bis-Tris, para los pHs de 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0 se utilizó Tris-HCl. Después de la preincubación e inactivación de la enzima, se agregó Tris-HCl pH 7.6 a una concentración final de 100 mM y el ensayo continuó como se indica en el punto 5.3.7.2.

6. Resultados

Para comprobar la hipótesis de que la DNA polimerasa 2 podría tener asociada una actividad de primasa se tenía necesariamente que montar el ensayo para detectarla. La DNA polimerasa 2 utilizada fué la proveniente de las fracciones con actividad de Heparina sefarosa ($\approx 2,000$ veces de purificación). A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron utilizando diferentes moldes para la DNA primasa.

6.1. Determinación de las condiciones necesarias para medir actividad de DNA primasa.

6.1.1 Utilizando el molde de ssDNA M13mp8 (+)

El ensayo para determinar actividad de DNA primasa requiere básicamente de un molde de DNA cadena sencilla, ya sea natural o artificial. El DNA del fago M13 de cadena sencilla (+) es uno de los moldes naturales que más ha sido utilizado [30,32,53]; en el presente trabajo también se utilizó este molde según se indica en Material y Métodos. Como se puede observar en la tabla 2, existe incorporación de [metil- ^3H]-dTTP durante la replicación del molde de DNA cadena sencilla cuando se agrega solamente la fracción de Heparina sefarosa que contiene actividad de DNA polimerasa (FHS); sin embargo, en un ensayo por separado, cuando se agregó DNA polimerasa I de *E. coli* (Pol I) a la mezcla de reacción (sin fracción proteica de maíz), se observó una incorporación mayor a la que efectuó la fracción FHS (DNA polimerasa endógena), por lo que este resultado parecía indicar que el molde de M13, podría estar contaminado con algún cebador endógeno o que probablemente se formara una estructura tallo-asa interna proporcionando así un extremo 3'-OH. Para descartar esta última posibilidad, se calentó el molde de DNA a 85 °C por 5 minutos seguido de un rápido enfriamiento en baño de hielo; sin embargo, los resultados que se obtuvieron fueron muy similares. Se utilizó el mismo molde de DNA, pero de otra casa comercial, con un lote diferente de Pol I; aún así, los resultados fueron semejantes.

Pol I fué utilizada en la reacción junto con la fracción FHS con el objeto de incrementar la incorporación del desoxinucleótido, siempre y cuando el molde de DNA tuviera un cebador que proporcionara el extremo 3-OH. La preincubación de la fracción de polimerasa y posterior adición de Pol I (FHS + Pol I), dió un valor superior al encontrado al solo utilizar Pol I en ausencia de cebador (tabla 2); no obstante, esta diferencia no era muy grande y junto con los resultados arriba mencionados dejaba duda de la presencia de una actividad de DNA primasa en nuestro ensayo.

Tabla 2. Determinación de actividad de DNA primasa con el molde ssDNA M13mp8 (+). Incorporación de [³H-metil]-dTTP a ssDNA M13mp8 (+).

Ensayo	Unidades incorporadas a ssDNA M13 mp8 (+) ⁽¹⁾
Blanco	0.05
FHS ⁽²⁾	30
Pol I	72
FHS + Pol I	120

⁽¹⁾ Una unidad de actividad de DNA primasa fue definida como la cantidad de enzima que induce la incorporación de un pmol de [³H-metil]-dTTP al molde ssDNA M13mp8 (+) a 37 °C durante 30 minutos.

⁽²⁾ Fracción de Heparina seferosa con actividad de DNA polimerasa

6.1.2. Utilizando el molde de poli-dT

Entre los moldes artificiales que más eficazmente son utilizados por las primasas de diferentes organismos se encuentran el poli-dT y el poli-dC; los moldes no utilizados son el poli-dA y el poli-dG [30,32,53]. Utilizando el molde de poli-dT sí fue posible observar una clara actividad de DNA primasa. En la tabla 3 se puede observar que la incorporación de [α -³²P]-dAMP por la Pol I en ausencia de un cebador es prácticamente cero (renglón 2). En la fracción FHS se observó incorporación de [α -³²P]-dAMP durante la síntesis de la cadena complementaria del poli-dT, lo cual indicó que la DNA polimerasa endógena del complejo multiproteico puede elongar el cebador formado por una presunta primasa (renglón 3), aunque no tan eficientemente como lo hace la Pol I cuando tiene un cebador previamente formado por esa misma primasa (renglón 4), o cuando se agrega exógenamente oligo[dA]_n (renglón 5)

La DNA primasa de maíz sintetiza cebadores de {rA}_n y aparentemente puede formar también cebadores de {dA}_n en ausencia de ATP, ya que se obtuvo una incorporación de [α -³²P]-dATP de ~19% (renglón 6) respecto al control (renglón 4). La DNA primasa de trigo presenta un comportamiento similar [44]. La adición de RNasa H a la mezcla de reacción, después de la síntesis del cebador, disminuye notablemente la síntesis del DNA (renglón 7). La inactivación de la DNA primasa, posterior a la síntesis del cebador, ya sea con calor o con NEM no afectó a la actividad de la DNA pol I (renglón 8 y 9 respectivamente), sin embargo, la actividad de DNA primasa se suprimió sí se le trataba a 85 °C 5 minutos o con NEM (renglones

10 y 11 respectivamente), antes de agregar el sustrato: ATP. Durante la caracterización de la DNA primasa se detuvo la reacción de síntesis del cebador con calor o con NEM.

En general, ninguna DNA primasa descrita hasta ahora utiliza eficientemente moldes polipurínicos: La DNA primasa de maíz tampoco fué capaz de utilizar un molde polipurínico: el poli-dA (no se muestra).

Tabla 3. Determinación de actividad de DNA primasa con el molde poli-dT. Incorporación de [α -³²P]-dAMP al molde poli-dT.

Ensayo	Unidades incorporadas
1. Blanco	0.05
2. Pol I	0.8
3. FHS	13
4. FHS + DNA pol I	41
5. DNA pol I+ oligo[dA] ₈	98
6. FHS, no rNTPs + pol I	7.8
7. FHS + RNasa + Pol I	4.9
8. FHS + Calor + Pol I	39
9. FHS + NEM + Pol I	39
10. Calor + FHS + Pol I	2
11. NEM + FHS + Pol I	2

¹Sin FHS ni DNA pol I.

²Control negativo de Pol I sin cebador.

³Sólo FHS (utilización del cebador por la de DNA polimerasa endógena).

⁴Formación del cebador por la primasa y síntesis de DNA por la DNA pol I.

⁵Control positivo de DNA pol I con el cebador de 8 nucleótidos.

⁶Síntesis de cebador de DNA por la primasa.

⁷Efecto de la acción de RNasa sobre el cebador sintetizado por la DNA primasa.

⁸⁹Efecto de la inactivación de la DNA primasa después de la formación del cebador sobre la síntesis de DNA.

¹⁰¹¹Inactivación de la DNA primasa, previo a la formación del cebador.

Después de que se observó actividad de DNA primasa en la DNA polimerasa 2, utilizando el molde de poli-dT, se procedió a buscar las condiciones bioquímicas necesarias para caracterizar a esta enzima. En primer lugar se determinó el tiempo óptimo de cebado del poli-dT; para ésto se preincubó la fracción de Heparina por diferentes tiempos con el ribonucleótido ATP y el molde, con el objeto de que se formara el cebador, el cual posteriormente sería elongado por la Pol I; en la figura 2 se puede observar que existe una relación directamente proporcional de síntesis de DNA con respecto al tiempo hasta los 20 minutos de cebado, por lo cual en los ensayos para la caracterización de la primasa se utilizó un tiempo de 15 minutos de preincubación.

Puesto que el ensayo para determinar la actividad de DNA primasa utilizado en el presente trabajo es indirecto, también se estudió la relación existente entre la síntesis de DNA por la Pol I con respecto al tiempo (después de preincubar por 15 minutos con la fracción de Heparina sefarosa). En la figura 3 se puede observar que la síntesis de DNA por la Pol I es directamente proporcional con respecto al tiempo al menos hasta los 60 minutos; por lo tanto, en los ensayos subsecuentes de caracterización se incubó a la enzima por 45 minutos, como se indica en Material y Metodos.

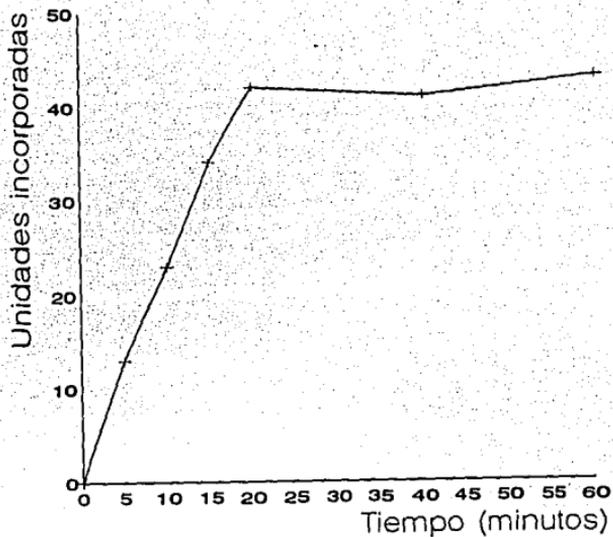


Figura 2. Determinación de la linealidad de la reacción de cebado frente al tiempo. Se incubaron 5 μg de la fracción FHS a 37 °C por diferentes tiempos en presencia de ATP y poli-dT. Después del tiempo indicado se añadió DNA pol I + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ y se incubó por 30 minutos a 37 °C.

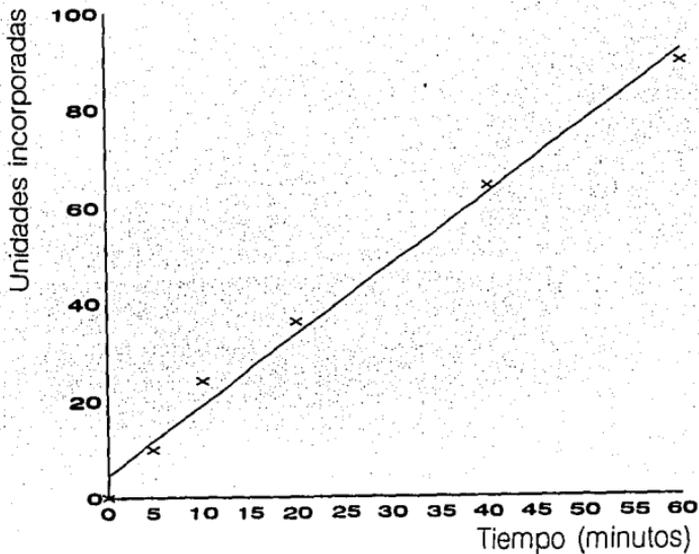


Figura 3. Determinación de la linealidad de la reacción de elongación del cebador frente al tiempo. Se incubaron 5 μg de la fracción FHS con actividad de DNA polimerasa-primasa a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos en presencia de ATP y poli-dT. Después de este tiempo se añadieron DNA pol I + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ y se incubó por diferentes tiempos a 37 $^{\circ}\text{C}$.

6.2 Purificación de la DNA polimerasa 2 y medición de la actividad de la DNA primasa.

Para determinar si la actividad de DNA primasa coelúa con la DNA polimerasa 2 a lo largo de todo el proceso de purificación, se montó un procedimiento de purificación modificado del reportado por Coello *et al* [50]. La variación consistió en adaptar las resinas de Superdex 200 y Mono Q HR 5/5 (resinas apropiadas para correrlas a una flujo relativamente alto en FPLC y con gran resolución). A continuación se presentarán los resultados que se obtuvieron en este objetivo.

6.2.1 DEAE-Celulosa

La fracción I (ver tabla IV), fué aplicada a una columna de DEAE-celulosa (2.5x15 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La columna se lavó con la misma solución hasta que no se detectó A_{280} . La proteína adsorbida se eluyó con 5 volúmenes de un gradiente lineal de 40 a 400 mM de fosfatos (soluciones amortiguadoras A y B respectivamente). A las fracciones eluidas se les determinó la concentración de proteínas y las actividades de DNA polimerasa y DNA primasa. La figura 5 muestra el perfil de elución del complejo polimerasa-primasa a través de esta columna. En esta cromatografía se pueden notar claramente 3 picos de actividad de DNA polimerasa, los cuales han sido nombrados como DNA polimerasas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden de elución [50]. La DNA polimerasa 1 no se adsorbe a la resina en estas condiciones, la DNA polimerasa 2 necesita de una concentración de 100 ± 30 mM de fosfatos para eluir y la DNA polimerasa 3 eluye a una concentración de fosfatos de 200 ± 30 mM. Lo anterior sugiere que la carga eléctrica neta de las isoenzimas (o de las proteínas con las que podrían estar asociadas), es diferente entre éstas, siendo positiva la carga eléctrica neta para la pol 1, y negativa para las polimerasas 2 y 3. En esta cromatografía se logró además eliminar un gran cantidad de proteínas al no ser adsorbidas por la resina, lo que implicó que la actividad específica de la DNA pol 2 (actividad de la enzima/mg de proteína), se incrementara notablemente. En relación a la actividad de la DNA primasa, se observó que ésta coelúa con la actividad de la DNA polimerasa 2. Las fracciones con actividad de polimerasa-primasa se reunieron (Fracción II) y se aplicaron a una columna de Heparina sefarosa.

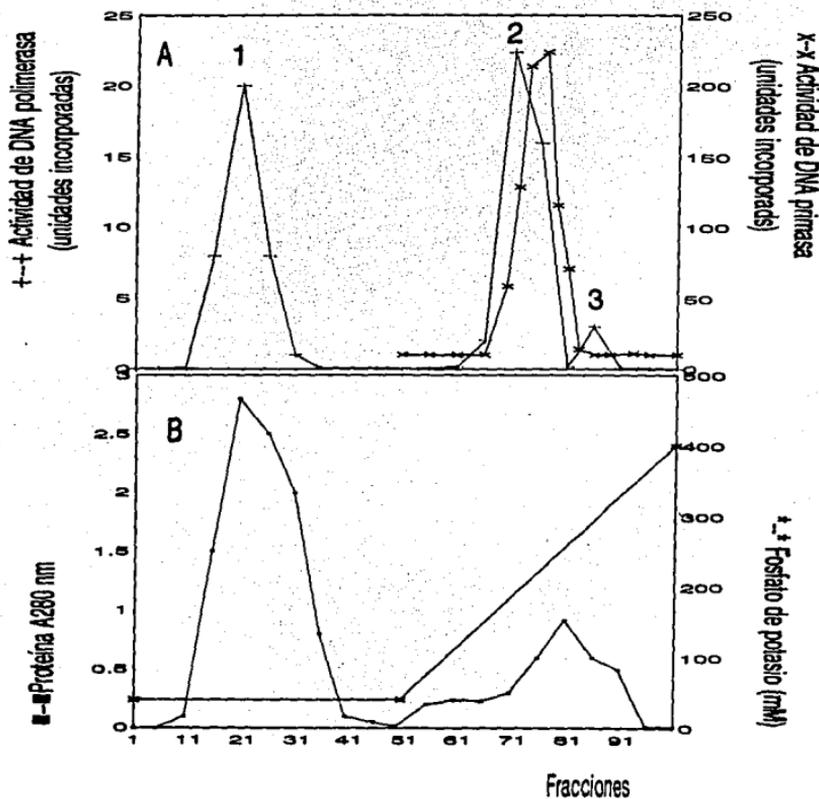


Fig. 4. Perfil de elución de las actividades de DNA polimerasa y primasa a través de una columna de DEAE-Celulosa.

La Fracción I (24 ml), fué aplicada a una columna de DEAE-Celulosa (2.5 x 15 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora A. Se aplicó un gradiente lineal de 40 a 400 mM de fosfatos a un flujo de 15 ml/hr. A: actividad de polimerasa (+---+) y primasa (X---). B: Fósforo de potasio (+---), Proteína A₂₈₀ (■---).

6.2.2. Heparina sefarosa

La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado que consiste principalmente de secuencias repetidas del disacárido ácido α -L-idopirranurónico-2-sulfato y 2'-desoxi-2-sulfamino- α -D-glucopirranosa -6-sulfato unido en posición 1 \rightarrow 4. La figura 5 muestra la estructura de la sal disódica del disacárido.

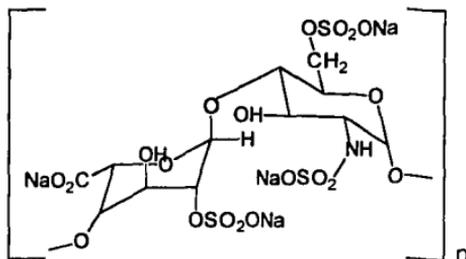


Figura 5. Estructura parcial de la heparina [54].

Debido a su naturaleza polianiónica, la heparina interacciona con muchos compuestos biológicos, y éstas interacciones pueden ser usadas como base para una purificación por cromatografía de afinidad en Heparina sefarosa CL-6B. [54]. La fracción II fue aplicada a una columna de Heparina sefarosa (1.5 x 5.5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora C. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de cama con la solución C, se aplicó un gradiente de 150 a 1,500 mM de NaCl (soluciones C y D respectivamente). La polimerasa-primasa se unió con gran afinidad a esta resina, ya que fue necesaria una alta concentración de NaCl: 800 ± 50 mM para eluir el complejo-polimerasa primasa. En la figura 6 se puede observar como la actividad de DNA primasa coeluye con la actividad de polimerasa, aún cuando se necesitó de una alta fuerza iónica para eluir ambas actividades, por lo que este resultado muestra que la DNA polimerasa 2 tiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa. Las fracciones con actividad de polimerasa-primasa fueron juntadas (Fracción III) y concentradas en tubos centrífugos (con corte molecular de 10 kDa), se centrifugó a 4,000 x g durante 4-5 horas con el objeto de aplicar un volumen pequeño de muestra a la siguiente columna: Superdex 200, para que de esta manera se lograra obtener una mayor resolución de la estimación del peso molecular del complejo polimerasa-primasa.

6.2.3. Superdex 200

La fracción III se aplicó a una columna de Superdex 200 (1.6 x 60 cm, esta columna se recomienda para separar proteínas que tienen un peso molecular entre 10 a 600 kDa), previamente equilibrada con solución amortiguadora E. Las proteínas aplicadas a esta columna fueron eluidas con 3 volúmenes de cama. En esta cromatografía se logró: 1) determinar el peso molecular del complejo polimerasa-primasa; ≈ 450 Kda, 2) obtener un paso más de purificación del complejo y 3) eliminar la alta concentración de sales con la que eluyó la proteína de Heparina sefarosa. Como se puede observar en la figura 7, la DNA primasa coeluyó con la actividad de DNA polimerasa en un complejo de alto peso molecular, según se demuestra por la comparación del patrón de elución que se obtuvo de marcadores de peso molecular que se corrieron en las mismas condiciones que la Fracción III.

6.2.4. Mono Q HR 5/5

Esta columna es un intercambiador aniónico fuerte y contiene permanentemente (a pH 2-12), carga eléctrica neta positiva donada por los grupos $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Las fracciones con actividad de polimerasa-primasa que coeluyeron en Superdex 200 fueron reunidas (Fracción IV) y aplicadas a una columna de Mono Q HR 5/5 previamente equilibrada con solución amortiguadora F. El complejo polimerasa-primasa se adsorbió a la resina y se eluyó con 5 volúmenes de cama de un gradiente lineal de 150 a 1,500 mM de NaCl (Soluciones amortiguadoras F y G respectivamente). La actividad de primasa coeluyó junto con la actividad de polimerasa a una concentración de 750 ± 30 mM de NaCl (ver figura 8). La ventaja que proporcionó la utilización de esta resina consistió en concentrar relativamente rápido a la proteína que eluyó diluida de la cromatografía anterior, a la vez que se logró purificar más al complejo polimerasa-primasa. Hasta este paso de fraccionamiento se logró purificar a la DNA polimerasa $\approx 9,000$ veces (ver tabla 4). La purificación de la DNA primasa que se describe en la tabla 5 es solo una estimación parcial y se basó en la actividad de primasa que se obtuvo en la Fracción II, ya que no se logró determinar la actividad en el extracto crudo; no obstante, si se hace una comparación del valor de purificación de la DNA polimerasa 2 tomando el mismo criterio que para la DNA primasa, las veces de purificación son semejantes: 150. Se estima por lo tanto, que el valor final de purificación de la DNA primasa se aproxima también a 9,000 veces, similar al de la DNA polimerasa 2. El esquema completo de purificación del complejo polimerasa-primasa se muestra en la figura 9 y las veces de purificación tanto para la polimerasa como para la primasa se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente.

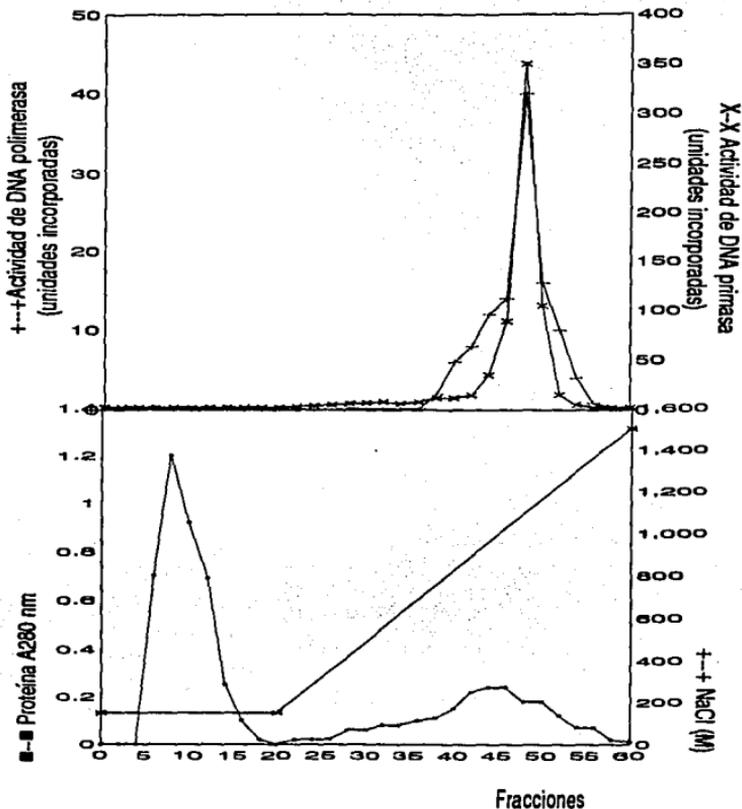


Figura 6. Perfil de elución de las actividades de polimerasa y primasa a través de una columna en Heparina sefarosa.

La Fracción II (22 ml), se aplicó a una columna de heparina sefarosa (1.5x5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora C. Se aplicó un gradiente lineal de 150 a 1,500 mM de NaCl a un flujo de 10 ml/hr. A: actividad de polimerasa (+-----+) y primasa (X-----X). B: NaCl (-----), Proteína A₂₈₀ (■-----■).

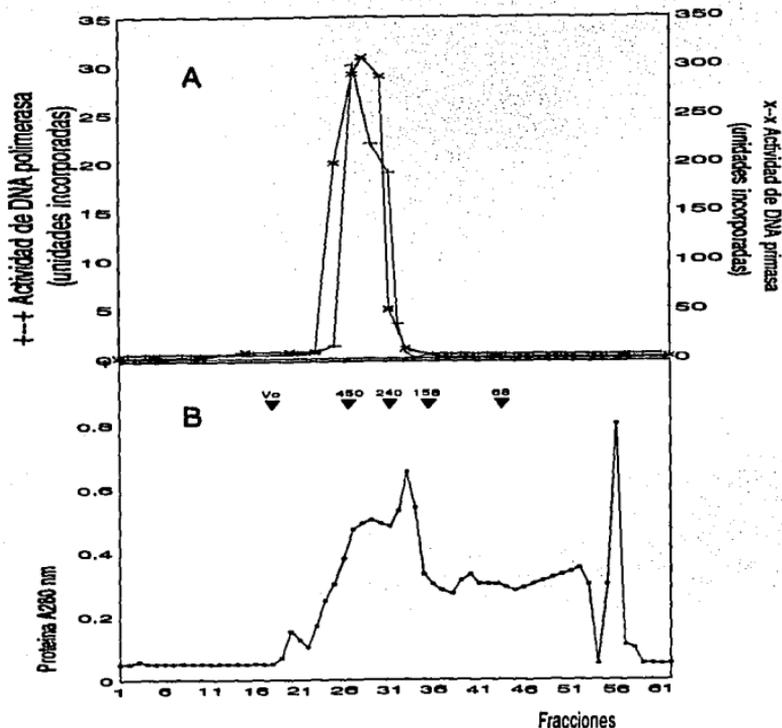


Fig. 7. Perfil de elución de las actividades de polimerasa y primasa a través de una columna en Superdex 200.

La Fracción III fué concentrada en tubos centrífuga hasta obtener 1 ml y se aplicó a una columna de Superdex 200 (1.6x60 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora E. Las proteínas aplicadas fueron eluidas con 3 volúmenes de la solución E a un flujo de 45 ml/hr. A: actividad de polimerasa (+---+) y primasa (X---X). B: Proteína A₂₈₀ (—). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Azul dextrán, 2 000 kDa; Ferritina, 450 kDa; catalasa, 240 kDa; Aldolasa, 158 kDa y Albúmina sérica bovina, 68 kDa.

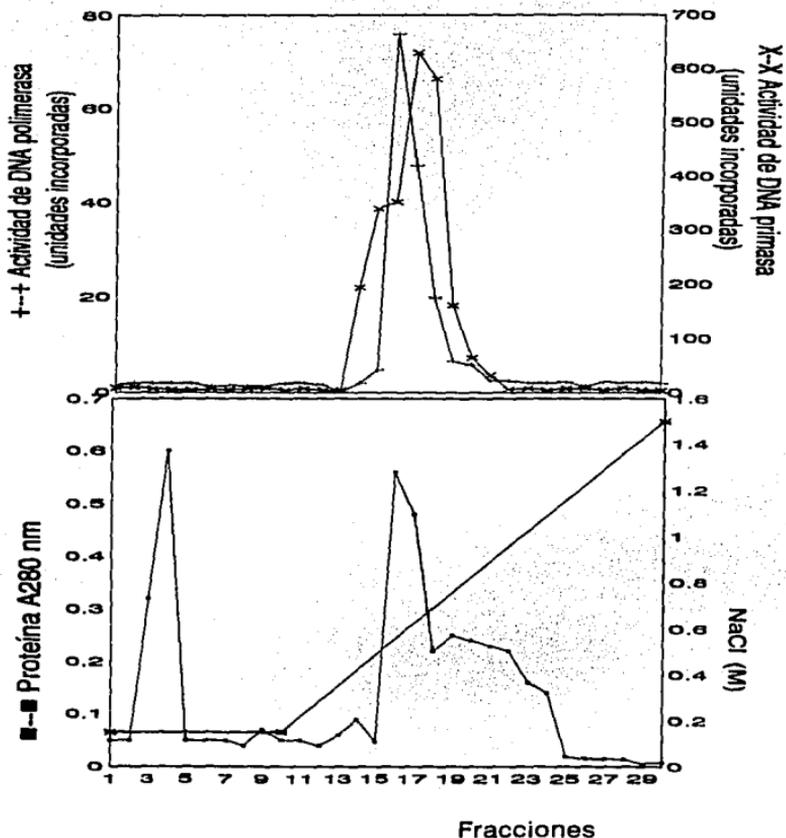


Fig. 8. Perfil de elución de las actividades de polimerasa y primasa a través de una columna en Mono Q HR 5/5.

La Fracción IV (14 ml), se aplicó a una columna de Mono Q HR 5/5 (0.5x5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora F. Se aplicó un gradiente lineal de 150 a 1,500 mM de NaCl a un flujo de 30 ml/hr. A: actividad de polimerasa (+-----+) y primasa (X-----X). B: NaCl (*-----*). Proteína A₂₈₀ (■-----■).

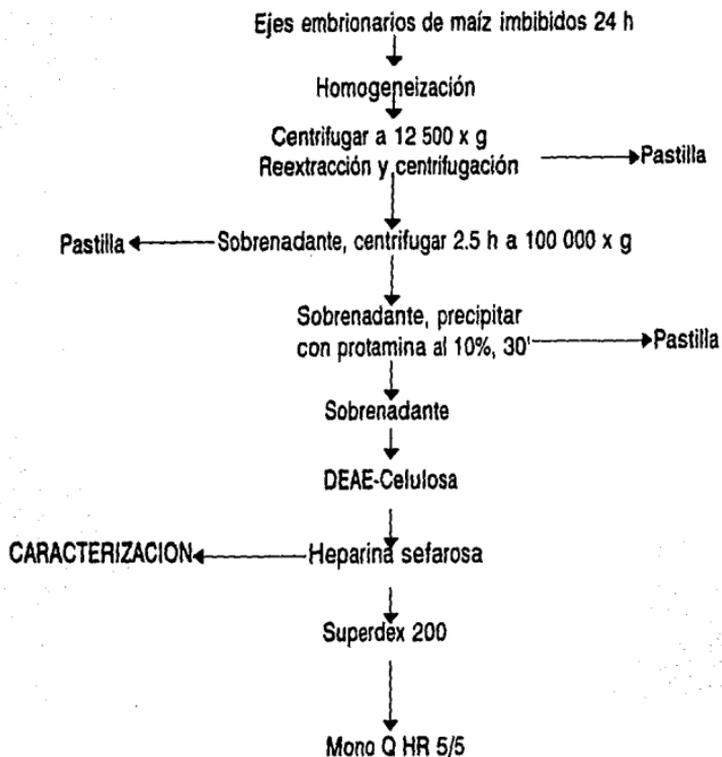


Figura 9. Esquema de purificación de las actividades de DNA polimerasa y DNA primasa

Tabla 4. Cuadro de purificación de la DNA polimerasa 2⁽¹⁾

Fracción	Proteína total (mg)	Volumen total (ml)	Act. total ⁽²⁾	Act. específica ⁽³⁾	veces de purif. ⁽⁴⁾
Extracto crudo					
Fracción I	332.5	24	51.7	0.155	---
DEAE-Celulosa					
Fracción II	29.96	22	261.7	8.73	56
Heparina sefarosa					
Fracción III	0.68	8	226.3	332	2140
Superdex 200					
Fracción IV	0.28	14	187.8	669	4308
Mono Q HR 5/5					
Fracción V	0.08	2.5	108.1	135.1	8710

⁽¹⁾ La actividad de polimerasa se determinó utilizando [metil-³H]-dTTP.

⁽²⁾ Una unidad de actividad de polimerasa fué definida como la cantidad de enzima que incorpora 1 pmol de [metil-³H]-dTTP a un molde de DNA activado, a 37 °C, 45 minutos.

⁽³⁾ Actividad total/mg. de proteína

⁽⁴⁾ Las veces de purificación se calcularon en base a la actividad de polimerasa que se cuantificó en la Fracción I.

Tabla 5. Cuadro de purificación de la DNA primasa asociada a la DNA polimerasa 2⁽¹⁾

Fracción	Proteína total (mg)	Volumen total (ml)	Act. total ⁽²⁾	Act. específica ⁽³⁾	veces de purif. ⁽⁴⁾
Extracto crudo					
Fracción I	332.5	24	-----	-----	-----
DEAE-Celulosa					
Fracción II	29.06	22	4,250	141	-----
Heparina sefarosa					
Fracción III	0.68	8	3,680	5,410	38
Superdex 200					
Fracción IV	0.28	14	2,300	8,200	59
Mono Q HR 5/5					
Fracción V	0.08	2.5	1,500	18750	132

⁽¹⁾ La actividad de primasa se determinó utilizando [α -³²P]-dATP.

⁽²⁾ Una unidad de actividad de primasa fué definida como la cantidad de enzima que incorpora 1 pmol de [α -³²P]-dAMP a un molde de poli-dT previamente cebado, a 37 °C, 45 minutos.

⁽³⁾ Actividad total/mg de proteína

⁽⁴⁾ Las veces de purificación se calcularon en base a la actividad de primasa que se cuantificó en la Fracción II.

6.3. Caracterización parcial de la actividad de DNA primasa

Después que se demostró que la DNA primasa coelúa con la actividad de la DNA polimerasa a través de los diferentes pasos cromatográficos, se buscaron las condiciones óptimas para medir dicha actividad a partir de la fracción III (Heparina sefarosa), ya que se ha demostrado [53, 54], que la actividad de la DNA primasa es mucho más lábil que la de DNA polimerasa conforme avanza la purificación, aunado a que en el presente estudio se obtuvo muy poca cantidad de proteína en el último paso de purificación (Mono Q HR 5/5).

Se estudió el comportamiento de la actividad de la DNA primasa a diferentes valores de temperatura y pH, así como también a diferentes concentraciones de magnesio, cloruro de potasio y manganeso. Los resultados que se obtuvieron en cuanto a este objetivo se muestran a continuación y se graficaron como % con respecto al pico de actividad (320 ± 50 u/ml).

6.3.1. Temperatura

El complejo polimerasa-primasa fué preincubado 15 minutos a diferentes temperaturas para la síntesis del cebador, transcurrido el tiempo antes señalado se inactivó a la enzima como se indica en 5.3.7.1. Posteriormente se agregó DNA pol I + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ para la síntesis de DNA. La reacción continuó a 37°C durante 30 minutos y se detuvo como se indica en 5.3.7.2. En la figura 10, se observa claramente que a la primasa le favorece trabajar a una temperatura de 37°C . Temperaturas menores de 20°C o mayores de 44°C inhiben en más de un 50% la actividad de la enzima.

6.3.2. Magnesio

El complejo polimerasa-primasa fué preincubado 15 minutos en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{++} . Después de la preincubación se inactivó a la polimerasa-primasa desnaturizándola con calor. Posteriormente la concentración de Mg^{++} se ajustó a 8 mM como se indica en 5.11.2 y se agregaron Pol I + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. Para descartar cualquier posible artefacto, se efectuó un control con DNA pol I utilizando poli-dT cebado con oligo[dA]₈ en presencia de 8 y 20 mM de Mg^{++} (éste último en presencia de EDTA 6 mM). La reacción de síntesis de DNA prosiguió como se indica en 5.3.7.2. En la figura 12 se puede observar que este ión divalente es esencial para que la primasa trabaje y que el óptimo está a una concentración de 8 mM. Concentraciones mayores de 16 mM inhibieron en más de 50% la actividad de la DNA primasa.

6.3.3. Manganeso

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado 15 minutos en presencia de diferentes concentraciones de Mn^{++} . La reacción de cebado se detuvo desnaturalizando a las proteínas con calor y posteriormente se agregó Mg^{++} a una concentración final de 8 mM. Para observar el efecto de ambos cationes sobre la actividad de la DNA pol I, se efectuó un control utilizando poli-dT cebado con oligo[dA]₆ con ambos cationes. La reacción de síntesis de DNA se inició al agregar DNA pol I + [α -³²P]-dATP, posteriormente la reacción continuó como se indica en el punto 5.3.7.2. En la figura 12 se puede observar que la DNA primasa puede utilizar Mn^{++} como cofactor. La primasa presentó actividad a concentraciones de entre 0.4 y 1.6 mM de Mn^{++} . El pico de actividad se presentó a una concentración de 0.8 mM. La actividad que dió como control la DNA pol I con el poli-dT cebado con oligo[dA]₆ fue 40% mayor cuando se utilizaron en la mezcla de síntesis Mn^{++} y Mg^{++} , a la que presentó la DNA pol I al trabajar sólo con Mg 8 mM (sin Mn^{++}); esto se podría deber a que la fidelidad de la DNA pol I es menor en presencia de Mn^{++} y a que puede incorporar rNTPs en lugar de dNTPs [24].

6.3.4. Cloruro de potasio

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado a diferentes concentraciones de KCl por 15 minutos para la reacción de cebado, posteriormente se inactivó al complejo multiprotéico con calor. La reacción de síntesis de DNA se inició al agregar DNA pol I + [α -³²P]dATP. En la figura 13 se observa que la DNA primasa trabaja eficientemente a concentraciones menores o iguales a 15 mM. Concentraciones mayores inhiben drásticamente a la actividad de primasa. La DNA polimerasa 2 puede trabajar eficientemente a 100 mM de KCl [50] lo cual concuerda con lo reportado previamente [53], en el sentido de que la DNA primasa de eucariontes es sensible a fuerzas iónicas en las que la DNA polimerasa no lo es. Para observar el efecto de las diferentes concentraciones de KCl sobre la actividad de la DNA pol I se utilizó poli-dT cebado con oligo[dA]₆ a concentraciones idénticas a las probadas en la reacción de cebado. La DNA pol I solo se inhibe en un 20% cuando la concentración de KCl es 150 mM, con lo cual se descarta un posible artefacto.

2.5. pH

El complejo polimerasa-primasa fue preincubado a diferentes valores de pH por 15 minutos para la reacción de cebado, posteriormente se desnaturalizó al complejo multiprotéico con calor. Se ajustó el pH a 7.6 y la reacción de síntesis de DNA se inició al agregar DNA pol I + [α -³²P]-dATP y ésta continuó como se indica el punto 5.3.7.2. En la figura 14 se observa que a la primasa le favorecen pHs ligeramente básicos. En general, en sistemas eucariontes la

primasa trabaja a pHs más básicos que a los que trabaja la DNA polimerasa con la que están asociadas [53]. El tipo de amortiguador influye sobre la actividad de la enzima, ya que a pH de 7.5 con Tris-HCl se presenta un $\approx 20\%$ más de actividad que al mismo pH con Bis-Tris.

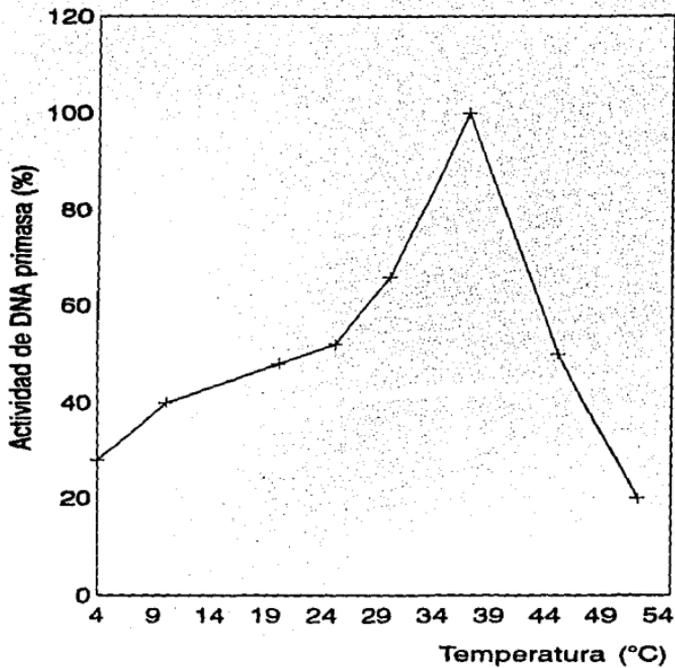


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de primasa.

La fracción FHS fué preincubada como se indica en Material y Métodos a las temperaturas señaladas. Se grafica el promedio de 3 experimentos.

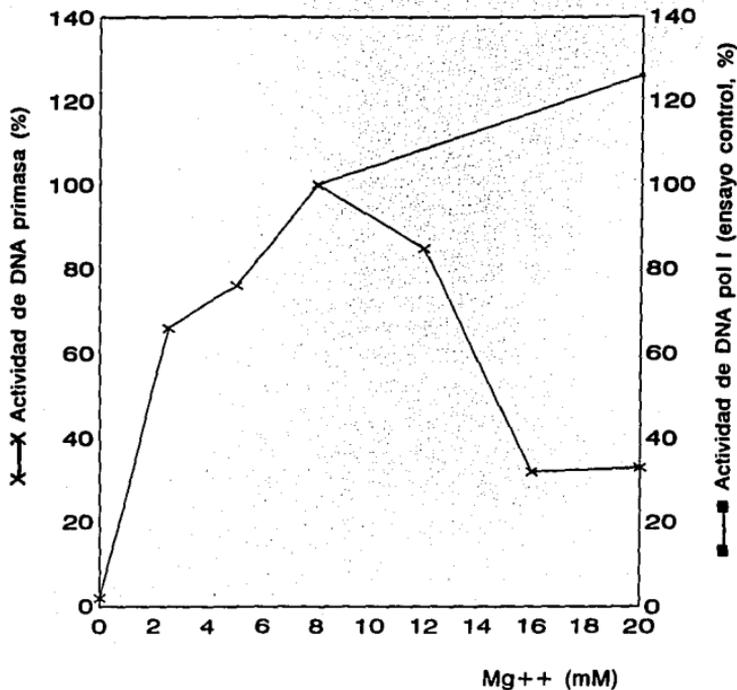


Figura 11. Efecto de la concentración de magnesio sobre la actividad de primasa

La fracción de FHS fué preincubada a las concentraciones de $MgCl_2$ como se indica en Material y Métodos. Primasa + DNA pol I (x—x); DNA pol I con poli-dT cebado con oligo[dA]₈ (■—■): Se grafica el promedio de 3 experimentos.

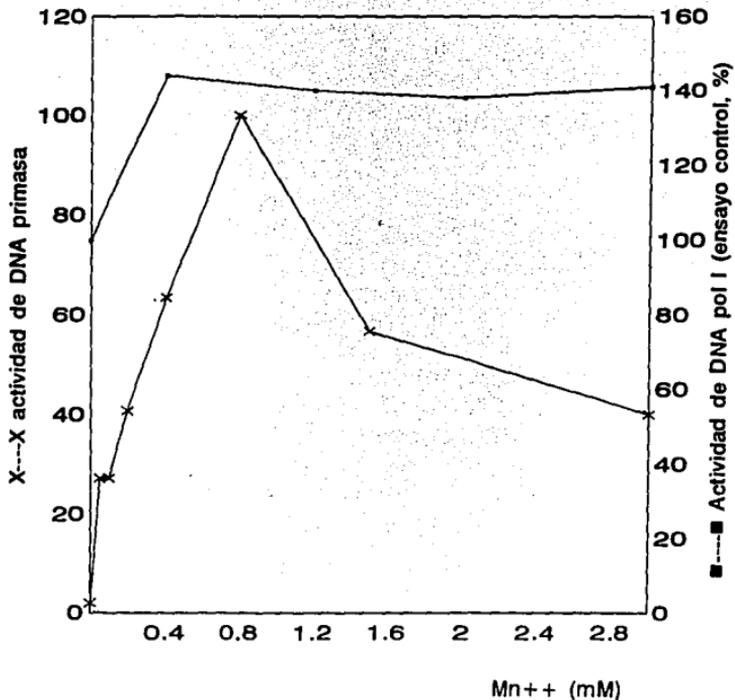


Figura 12. Efecto de la concentración de manganeso sobre la actividad de primasa

La fracción FHS fué preincubada a las concentraciones de $MnCl_2$ como se indica en Material y Metodos Primasa + DNA pol I (X---X); DNA pol I con poli-dT cebado con oligo[dA]₈ (■). Se grafica el promedio de 3 experimentos.

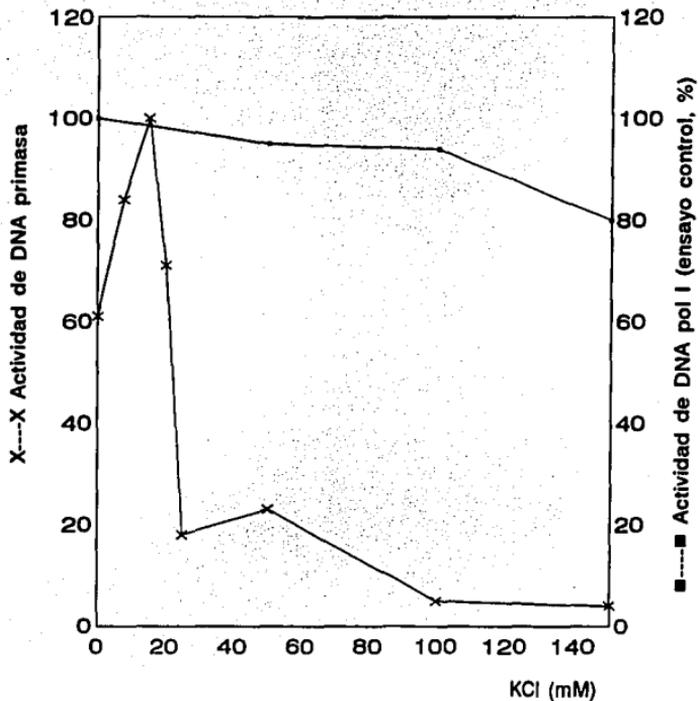


Figura 13. Efecto del cloruro de potasio sobre la actividad de primasa

La fracción FHS fué preincubada a las concentraciones de KCl como se indica en Material y Metodos. Primasa + DNA pol I (X---X); DNA pol I con poli-dT cebado con oligo[dA]₈ (■---■). Se grafica el promedio de 3 experimentos.

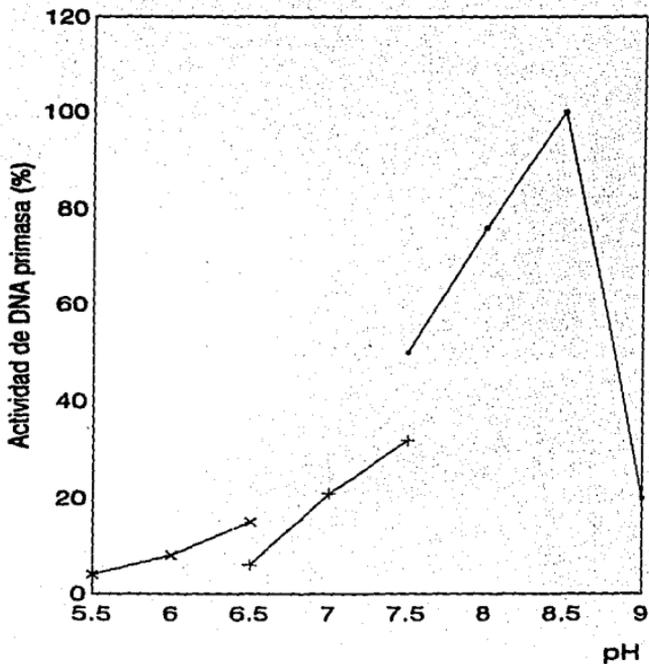


Figura 14. Efecto del pH y tipo de amortiguador sobre la actividad de la DNA primasa. La fracción FHS fué incubada como se indica en Material y Métodos con los siguientes amortiguadores: MES (X---X); Bis-Tris (+----+); Tris-HCl (•---•). Se grafica el promedio de 2 experimentos.

6.4. Electroforesis en geles de poli-acrilamida al 6% y urea 7 M de productos sintetizados por la DNA pol I de *E.coli*, utilizando como molde poli-dT. Efecto de la acción de RNasas sobre el cebador formado por la primasa

Con el objeto de tener una evidencia más de que se tenía una actividad de DNA primasa que coeluya con la actividad de DNA polimerasa 2, y de que sintetizaba oligo $-(rA)_n$ sobre un molde de poli-dT, se utilizó una metodología menos indirecta, que consistió en visualizar los productos derivados de la acción de la DNA pol I en geles de poli-acrilamida. En la figura 15, el carril 1 representa el control positivo en el que la Pol I sintetiza DNA sobre el molde de poli-dT, previamente cebado con oligo $[dA]_6$. En el carril 4 el DNA (de alto peso molecular), que sintetiza la Pol I cuando el molde es cebado por la primasa de maíz; en los carriles 2 y 3 se observa el efecto de la acción de RNasas (10 y 5 μg respectivamente), posterior a la preincubación de la primasa. En estos carriles disminuye notablemente la visualización de productos de síntesis de DNA por la polimerasa, esto como respuesta a la disminución o carencia de molde con cebador de RNA. El carril 5 representa una reacción en la que Pol I fue incubada en presencia de molde no cebado. De esta manera, se hace evidente la síntesis de un cebador por parte de la primasa que coeluye con la polimerasa 2 de maíz.

1 2 3 4 5

-



Figura 15. Efecto de la acción de RNasas sobre un cebador previamente formado por la primasa. Detección de los productos de reacción en un gel de poliacrilamida al 7%, urea 7 M. Se preincubaron 5 μ g de la fracción 18 que eluyó de Mono Q HR 5/5 con ATP + poli-dT, después de preincubar por 15 minutos se procedió a inactivar con calor a la primasa como se indica en Material y Métodos, posteriormente se trató el molde de poli-dT (previamente cebado), con diferentes concentraciones de RNasa y la reacción procedió como se indica en 5.3.7.2. Carril 1, Pol I + Poli-dT-oligo [dA]₆; 2, primasa + 10 μ g de RNasa; 3, primasa + 5 μ g de RNasa; 4, DNA primasa sin RNasa; 5, Pol I sin oligo [dA]₆.

7. Discusión

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio [49,50], habían propuesto que la DNA polimerasa 2 de maíz se podría clasificar como una DNA polimerasa tipo α . En animales, insectos y levadura, la DNA polimerasa α contiene fuertemente asociada una actividad de DNA primasa.

Para determinar si existía una actividad de DNA primasa que estuviese asociada con la actividad de la DNA polimerasa 2 de maíz se procedió en primer instancia a establecer el ensayo para detectar la actividad de DNA primasa utilizando el molde ssDNA M13 mp8 (+); sin embargo, la incorporación de [3 H-metil]-dTTP por la DNA polimerasa I de *E. coli per se*, sin la adición de cebador, fué relativamente alta comparada con la incorporación que presentó la enzima con cebador formado por una primasa putativa; esto se debió probablemente a que se estuviera formando en el molde una estructura tallo asa que le proporcionara un extremo 3'OH a la pol I, o bien a la presencia de fragmentos contaminantes de DNA; después de varios intentos, se descartó el templado de M13. Es probable que la DNA primasa requiera *in vivo* de algun(os) factor(es) que se pierden durante la separación cromatográfica, lo cual podría explicar la falta de reconocimiento de la enzima por este molde natural. Se probaron moldes de DNA sintéticos como son el poli-dT y el poli-dA. Este último, como era de esperarse, no fue reconocido por la DNA primasa de maíz. Con el molde de poli-dT sí fue posible detectar actividad de primasa, por lo que se utilizó para lograr una mayor purificación de la enzima, así como para determinar las condiciones *in vitro* con las que la enzima trabaja mejor. La DNA primasa de maíz, al igual que la DNA primasa de trigo, puede incorporar dNTPs en lugar de rNTPs [43]. El hecho de que la primasa utilice preferencialmente un molde pirimidico y no un molde purínico concuerda con lo reportado para todas las DNA primasas descritas hasta la fecha [53].

Habiendo determinado las condiciones mínimas necesarias para medir actividad de DNA primasa, se procedió a determinar si ésta coelufa con la DNA polimerasa 2 a lo largo del proceso de purificación. En DEAE-Celulosa se han logrado diferenciar (al menos cromatográficamente), 3 actividades de DNA polimerasa. La actividad de la DNA primasa coeluyó con la actividad de la DNA polimerasa 2 (DNA polimerasa tipo α), lo cual no implicaba necesariamente que estas estuvieran asociadas, ya que en esta cromatografía las proteínas se adsorben a la resina solo por la carga eléctrica neta; ello implica que la(s) enzima(s) tienen una carga eléctrica neta negativa. Podría ser el caso de que tanto la DNA primasa como la DNA polimerasa tuvieran la misma carga eléctrica; sin embargo, en la cromatografía en Heparina

sefarosa, la actividad de DNA primasa coeluyó con la actividad de DNA polimerasa 2 a una alta concentración de NaCl, y esta resina, al pH utilizado está cargada negativamente; en este caso, es probable que el complejo multiprotéico se adsorba a la resina por afinidad, ya que la estructura polianiónica conformacional de los grupos sulfatos se asemeja a los grupos fosfato del DNA [54]. lo cual sugirió que la actividad de la DNA primasa estaba asociada con la de DNA polimerasa. Aparentemente, a pesar de haber eluido a una alta fuerza iónica, las subunidades del complejo polimerasa-primasa no se separaron, ya que en la cromatografía de exclusión molecular; Superdex 200, se observó que las actividades de la DNA polimerasa y primasa coeluyeron en las primeras fracciones, presentando un peso molecular aparente de 450 Kda, lo cual concuerda con lo reportado por Coello *et al* [50]. Con la cromatografía en Mono Q HR 5/5 y la adaptación de las anteriores columnas cromatográficas al FPLC se logró obtener una purificación de la DNA polimerasa 2 de 8,710 veces que, comparada a la anteriormente reportada por Coello *et al* [50], fue superior en 3,000 veces. Debido a que el grado de purificación de esta enzima se cuantifica de acuerdo a la actividad medible (marca radiactiva incorporada), y a que la enzima es sumamente lábil, la purificación obtenida es muchas veces una subestimación. Al acelerar y hacer más eficiente la separación, se evita el desensamblaje enzimático o cualquier otra alteración que pudiera sufrir la enzima y por lo tanto se puede medir un grado mayor de purificación. La actividad de DNA primasa se purificó 132 veces en relación a la actividad que eluyó de la cromatografía en DEAE-Celulosa, ya que no fue posible determinar actividad de DNA primasa en el extracto crudo. Interesantemente, si se mide el grado de purificación de la DNA polimerasa empezando desde DEAE-Celulosa, se obtiene un valor semejante.

A pesar del grado de purificación obtenido de la DNA polimerasa y DNA primasa, todavía se observaron 14 polipéptidos en un SDS-PAGE teñido con plata; una réplica de las proteínas de este gel fue obtenida en un filtro de Immobilon-P y tratada con el anticuerpo policlonal dirigido contra el complejo de la DNA polimerasa 2, el cual reconoció bandas semejantes a las ya reportadas previamente por Coello *et al* [52]. El mismo filtro de Immobilon fué tratado con un anticuerpo policlonal dirigido contra la subunidad de 58 kDa de la primasa de levadura (donado amablemente por el Dr. Paolo Plevani). El anticuerpo reconoció tenuemente una banda de peso molecular de ≈ 58 Kda tanto en un control de extracto crudo de levadura como en las fracciones con actividad que eluyeron de Mono Q HR 5/5 (resultados no mostrados); es probable entonces que la DNA primasa de maíz comparta algunas similitudes estructurales con la DNA primasa de levadura. Estos datos tendrán que corroborarse.

La drástica disminución de productos sintetizados por la DNA pol I (ver fig. 15) en moldes de poli-dT cebados con la DNA primasa de maíz, y posteriormente tratados con RNasa, demostró que la DNA primasa sintetiza cebadores de RNA que, cuando son tratados con

RNasa, eliminan la posibilidad de que la DNA pol I tenga un extremo 3'OH sobre el que pueda sintetizar la cadena complementaria. La DNA primasa sintetiza cebadores de RNA.

En la planta de maíz, los iones Mg^{++} , Mn^{++} y K^+ se encuentran a una concentración de ≈ 75 , 6 y 200 mM respectivamente [56], valores muy por encima de los calculados como óptimos para que la DNA primasa trabaje *in vitro* con el molde de poli-dT. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la concentración de iones en los diferentes organelos puede ser muy diferente [57], y que es muy probable que la concentración intranuclear de estos iones esté altamente regulada.

La DNA primasa de maíz tiene características similares a la DNA primasa de trigo, enzima que hasta ahora es la única que ha sido purificada a homogeneidad [43] y caracterizada en sistemas vegetales [44]; ambas utilizan eficientemente el molde poli-dT, no utilizan poli-dA, utilizan Mg^{++} eficientemente a una concentración de 2.5-8 mM, la temperatura óptima para el ensayo es de 37 °C y son totalmente inhibidas a concentraciones mayores de 15 mM de KCl. Sin embargo, también existen características de la primasa de maíz que la distinguen de la de trigo; concentraciones mayores de 0.2 mM de Mn^{++} son inhibitorias para la primasa de trigo, mientras que el óptimo para la de maíz es de 0.8 mM; la primasa de maíz tiene un 40% actividad a 10 °C, mientras que la de trigo es activa solo a temperaturas mayores de 25 °C. Otro de los sistemas vegetales donde se ha reportado la caracterización de una actividad de DNA primasa es en cloroplastos de chícharo [45], la cual presenta algunas similitudes con la de maíz: utiliza eficientemente el molde de poli-dT, no así el de poli-dA, la concentración óptima de Mg^{++} está entre 8-12 mM, el pH óptimo está a un valor relativamente muy básico: ≥ 8.5 y es inhibida por NEM. También se ha reportado una actividad de DNA primasa de chícharo que coeluye con un complejo multiprotéico de alto peso molecular, similar al de la DNA polimerasa α [46]; sin embargo, esta actividad no fue caracterizada. En la tabla 6 se resumen algunas características de las DNA primasas caracterizadas en sistemas vegetales, así como también de la primasa de ratón y levadura

Tabla 6. Cuadro comparativo de las propiedades de algunas DNA primasas aisladas a partir de diferentes fuentes¹.

Fuente	NEM ²	pH	Mg ⁺⁺ (mM)	Mn ⁺⁺ (mM)	KCl (mM)	T °C
Maíz ³	Si	8.5	8	0.8	15	37
Trigo ⁴	N.R	8	5	0.2	N.E.	37
Chicharo ⁵	Si	8-8.5	8-12	N.R.	50	37
Ratón ⁶	Si	7,6	2-15	N.R	N.E.	37
Levadura ⁷	Si	8.0	4-10	N.R.	N.E.	37

N.R.=No reportado.

N.E.=No estimula.

¹Condiciones en las que se observa mayor actividad de DNA primasa.

²Inhibición mayor de 75% a una concentración de 5-10 mM.

³Caracterizada en el presente trabajo.

⁴[43,44], ⁵[45], ⁶[38], ⁷[32].

Como se puede observar en la tabla anterior, existen varias características similares en cuanto a requerimientos bioquímicos de las DNA primasas de maíz con respecto a primasas de otros organismos.

Este trabajo forma parte de un proyecto general en el que se busca conocer a las DNA polimerasas que participan en la replicación del DNA en plantas. Después de la DNA polimerasa, la DNA primasa es la segunda enzima clave en la replicación del DNA [53], por lo que será necesario saber cuantos polipéptidos la forman (si más de uno, como sucede en eucariontes) y como se acopla su actividad a la DNA polimerasa con la que se asocia (tipo α). A futuro se tratarán de responder estas preguntas, a la vez que se tratará de encontrar el (los) gene(s) que la codifica(n).

8. Conclusiones

Se logró establecer las condiciones mínimas de medición de la actividad de DNA primasa, teniendo como molde poli-dT.

Este es uno de los primeros estudios en sistemas vegetales en que se correlaciona una actividad de DNA primasa con una DNA polimerasa.

La DNA polimerasa 2 de maíz contiene fuertemente asociada a la actividad de DNA primasa

En base a datos previos y a su asociación con la actividad de DNA primasa, se aporta una fuerte evidencia de que la DNA polimerasa 2 de maíz es una enzima tipo α .

9. Bibliografía

- 1.-Raven, P. H., Evert R.F., and Eichhorn, S.E. (1992). *Biology of plants*. Fifth edition. Worth Publishers. USA. 693 pp.
- 2.- Mangelsdor, P.C. (1974) Corn. Its origin, evolution and improvement. The Belknap Press of Harvard University Press. 2nd edition. USA 262 pp.
- 3.-Robles, S.R. (1976). *Producción de granos y forrajes*. Edt. Limusa, México. 9-31 pp.
- 4.-Bidwell, R.G.S. *Fisiología Vegetal*. (1990) AGT Editor. México. 784 pp.
- 5.-Berlin, G. (1972) Seed germination and morphogenesis. In: *Physiological Ecology*. Vol 1. USA 223-312 pp.
- 6.- Street, H.E., and Opik, H. (1984). The physiology of flowering plants. Their growth and development. 3rd. de. Contemporary Biology. U.K. 4-25 pp.
- 7.- Bewley, J.D., and Black, M. (1986) *Seeds. Physiology of development and germination*. Plenum Press. N.Y. 376 pp.
- 8.-Datta, K., Marsh, L., and Marcus, A. Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology*. 72, 394-397.
- 9.-Spiegel, S., and Marcus, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadeylation. *Nature* 256, 228-230.
- 10.-Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R., and López, S. (1981) Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 99, 445-450.
- 11.- Sánchez de Jiménez, E., and Aguilar, R. (1984) Protein synthesis patterns. Relevance of old and new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiology*. 75, 231-234.
- 12.-Simon, E.W. (1984) Early events in germination. In *Seed Physiology*. Vol 2, 77-115 pp.
- 13.-Marcus, A., Feeley, J., and Volcany, A. (1966) Protein synthesis in imbibed seeds. III Kinetics of aminoacid incorporation, ribosomal activation and polysome formation. *Plant Physiology*. 41, 1167-1171.
- 14.-Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1989) *The germination of seeds*. 4rd. ed. Pergamon Press. U.K. 1-22 pp.
- 15.-Thompson, E. W., and Lane, B.G. (1980) Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translation capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryo. *Journal of Biological Chemistry*. 225, 5965-5970.
- 16.- Osborne, D.J., Sharon, R., and Ben-Ishal, R. (1980/1981) Studies on DNA integrity and DNA repair in germinatin embryos of rye (*Secale cereale*). *Israel Journal of Botany*. 29, 259-272.
- 17.- Ortega, R. (1988). Localización del ADN sintetizado durante las primeras horas de la

germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM.

18.- Osborne, D.J., Dell'Aquila, A., and Elder, R.H. (1984) DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *Folia Biologica. Proc. FEBS Symposium on DNA. Spe. Publ.* 155-166 pp.

19.-Vázquez-Ramos, J.M., and Osborne, D. (1986) Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research.* 166, 39-47.

20.- Zaráin, M., Bernal-Lugo., and Vázquez-Ramos, J.M. (1987) Effect of benzyl adenine on DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Research.* 181, 103-110.

21.- Zlatanova, S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V., and Stanchev, B.S. (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Molecular Biology.* 10, 139-144.

22.- Tamariz, A. (1990) Metabolismo de DNA en ejes embrionarios de semillas de maíz deterioradas durante las primeras horas de la germinación. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM.

23.- Vázquez-Ramos, J.M. (1992) Maize germination, DNA metabolism and citokinins. *Proc. of the fourth International Workshop on seeds.* 2, 317-322.

24.- Komberg, A., and Baker, T.A. (1992) DNA replication. W.H. Freeman and Co. 2nd. ed. 275-306 pp.

25.- Collins, K.L., Russo, A.A.R., Tseng, B.Y. and Kelly, T.J. (1993) The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase α in DNA replication. *The EMBO Journal.* 12, 4555-4566.

26.- Francesconi, S., Longhese, M.P., Piseri, A., Santocanale, C., Lucchini, G., and Plevani, P. Mutations in conserved yeast DNA primase domain impair DNA replication *in vivo*. (1989) *Proceedings of National Academy of Sciences USA.* 88, 3877-3881.

27.- Lucchini, G Francesconi, S., Foiani, M., Badaracco, G., and Plevani, P. (1987) Yeast DNA polymerase-DNA primase complex: cloning of *PR1*, a single essential gene related to DNA primase activity. *EMBO J.* 737-742.

28.- Foiani, M., Santocanale, C., Plevani, P., and Lucchini, G. (1989) A single essential gene *PR2* encode the large subunit of DNA primase in *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular and Cellular Biology.* 9, 3081-3087.

29.- Santocanale, C., Locali, F., Falconi, M.M., Piseri, A., Tseng, B.Y., Lucchini, G., and Plevani, P. (1992). Overproduction and functional analysis of DNA primase subunits from yeast and mouse. *Gene.* 113, 199-205.

30.- Yagura, T., Kozu, T., and Seno, T. (1982) Mouse DNA replicasa. *Journal of Biological Chemistry.* 257, 11121-11127.

- 31.- Gronostajski, R.M., Field, J., and Hurwitz, J. (1984) Purification of a primase activity associated with DNA polymerase α from HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 9479-9486.
- 32.- Plevani, P., Badaracco, G., Augli, C., and Chang, L.M.S (1984) DNA polymerase I and DNA primase complex in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 7532-7539.
- 33.- Grosse, F., and Krauss, G. (1985) The primase activity of DNA polymerase α from calf thymus. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 1881-1888.
- 34.- Yamaguchi, M., Hendrickson, E.A., and DePamphilis, M.L. (1985) DNA polymerase-DNA primase from simian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 6254-6263.
- 35.- Singh, H., Dumas, L.B. (1984) Association of DNA primase with the β/γ subunit of DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 7936-7940.
- 36.- Kaguni, L.S., Rossigol, J.M., Conaway, R.C., Banks, G. R., and Lehman, I.R. (1983) Association of DNA primase with the β/γ subunit of DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos. *Journal of Biological Chemistry*. 258, 9037-9039.
37. Holmes, A.M., Cheriathundam, E., Bollum, F.J., and Chang, L.M.S. (1985) Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 10840-10846.
- 38.- Tseng, B.Y., and Ahlem, C.N. (1983) A DNA primase from mouse cells. *Journal of Biological Chemistry*. 258, 9845-9849.
- 39.- Spadari, S., Sala, F., and Pedrali-Noy, G. (1982) Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eucaryotes. *Trends in Biochemistry. Sci.* 7, 29-32.
- 40.- Graveline, J.G., Tarrago-Litvak, L., Castroviejo, M., and Litvak, S. (1984) DNA primase activity from Wheat embryos. *Plant Molecular Biology*. 3, 207-215.
- 41.- Wang, T. S. F., Hu, S.Z., and Korn, D. (1984) DNA primase from KB cells. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 1854-1865.
- 42.- Yamaguchi, M., Hendrickson, E.A., and DePamphilis, M.L. (1985) DNA polymerase-DNA primase from simian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 6254-6263.
- 43.- Graveline, J.G., Tarrago-Litvak, L., Castroviejo, M., and Litvak, S. (1984) DNA primase activity from Wheat embryos. *Plant Molecular Biology*. 3, 207-215.
- 44.- Laquel, P., Castroviejo, M., and Litvak, S. (1990) Further biochemical characterization of wheat DNA primase: possible functional implication of copurification with DNA polymerase A. *Nucleic Acids Research*. 18, 4667-4876.
- 45.- Nielsen, B.L., Rajasejhar, V.K., and Tewari, K.K. (1991) Pea chloroplast DNA primase: characterization and role in initiation of replication. *Plant Molecular Biology*. 16, 1019-1034.
- 46.- Bryant, J.A., Fitchet, P.N., Hughes, S.G., and Sibson, D.R. (1992). DNA polymerase α in

- pea is part of a large multiprotein complex. *Journal of Experimental Botanic*. 43, 31-40
- 47.- Castellanos, L.C. (1986) Aislamiento y caracterización de la actividad de DNA topoisomerasa de maíz. Tesis Maestría. Fac. de Química, UNAM.
- 48.- Vázquez, E., Montiel, F., and Vázquez-Ramos, J.M. (1991) DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss germinability. *Seed Sciences Research*. 1, 269-273.
- 49.- 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 Lic., Fac. de Química, UNAM.
- 50.-Coello, P., Rodríguez, R., García, E., and Vázquez-Ramos, J.M. (1992) A DNA polymerase from maize axes: Its purification and possible role. *Plant Molecular Biology*. 20, 1159-1168.
- 51.-Coello, P. and Vazquez-Ramos J.M. (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *European Journal of Biochemistry*. 231, 99-103.
- 52.- Coello-Coutiño, P. García-Ramírez, E., and Vázquez-Ramos, J.M. (1994) Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase holoenzyme: Identification of the polymerase catalytic subunit. *Canadian Journal of Botany*. 72, 818-822.
- 53.- Roth, Y. (1987) Eucaryotic primase. *European Journal of Biochemistry*. 165, 473-481.
- 54.- Heparina-sepharose for affinity chromatography. (1979) Pharmacia Fine Chemicals Co.
- 55.- Ledwith, B.J., Manham, S., Glenn, C. and Tuyle, V. (1986). Characterization of a DNA primase from rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 261, 6571-6577.
- 56.- Armas, U.,R., Ortega, D.E. and Rodés, G.R. (1988) *Fisiología Vegetal*. Ed. Pueblo y Educación. La Habana,Cuba.
- 57.- Lehninger A., L., Nelson, D., L. and Cox, M.C. (1993) *Biochemistry*. 2nd. Ed. Worth Publishers. New York, N.Y.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**