



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

282
24

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGIA

UTILIZACION DIFERENCIAL DE MOLDES DE DNA POR LAS DNA POLIMERASAS 1, 2 Y 3 DE MAIZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

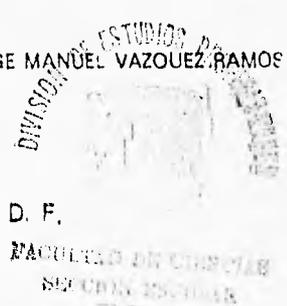
B I O L O G A

P R E S E N T A :

YOLANDA MARGARITA CAMACHO VILLASANA



DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS



CD. UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Utilización diferencial de moldes de DNA por las DNA polimerasas
1,2 y 3 de maíz.

realizado por
Yolanda Margarita Camacho Villasana
con número de cuenta 8830254-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos
Propietario	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Propietario	M en C. Víctor Manuel Valdés López
Suplente	Biol. Gabriel López Velázquez
Suplente	Biol. Jose Luis Busto Sánchez

Consejo Departamental de Biología

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

INDICE

Introducción	1
La semilla de maiz	2
Germinación del maiz:	
Aspectos bioquímicos	5
DNA polimerasas:	
Generalidades	7
Clasificación de las	
DNA polimerasas	12
Tipos de moldes	18
Antecedentes Inmediatos	23
Objetivos	27
Materiales y Métodos	29
Resultados	39
Purificación de las tres	
DNA polimerasas de maiz	37
Utilización de moldes	
naturales y artificiales	40
Actividad de primasa en	
las tres DNA polimerasas	
de maiz	55
Actividad de nucleasa	
en las fracciones con	
actividad de las diferentes	
DNA polimerasas	57
Discusión	59
Referencias	67

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
Cu	Curle
CPM	Cuentas por minuto
DEAE-Sephácel	Dietilaminoetil-sepácel
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
dNMP	Desoxinucleótido monofosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Acido etilén diamino tetra-acético
KDa	Kilodalton
µg	microgramos
mg	miligramos
NEM	N-etil maleimida
PolIdA-oligodT	Polidesoxiadentina-oligodesoxitimidina
PolirA-oligodT	Poliriboadenilato-oligodesoxitimidina
RNA	Acido ribonucleico
TCA	Acido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroxi metilpropano-1,3 diol

DEDICATORIAS

A MI MAMÁ Y PAPÁ, POR TODO EL APOYO QUE ME DIERON
DURANTE TODOS LOS AÑOS DE MI VIDA, SIN EL CUAL NO
HUBIERA SALIDO ADELANTE. GRACIAS ! ! ! !

A MIS HERMANOS MALENA Y ARMANDO.

A MIS ABUELITAS LUCY Y LIBRADA.

A MIS TIAS GINA, MECHE Y A PEPE.

A VALE.

A YURI :

GRACIAS POR TODO EL APOYO, CARIÑO Y ENSEÑANZAS YA
QUE ME HAS ESTIMULADO PARA SEGUIR SIEMPRE
ADELANTE Y SER TAN FUERTE Y OPTIMISTA COMO ERES TU.
ESTE TRABAJO TAMBIEN TE PERTENECE.
ESPERO QUE CAMINEMOS JUNTOS POR MUCHO TIEMPO,
TE AMO



AGRADECIMIENTOS

AL DR. JORGE VÁZQUEZ POR LA DIRECCION DE ESTA TESIS.

AL M. en C. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ POR SU PACIENCIA Y DEDICACIÓN EN LA ASESORIA DE ESTE TRABAJO. MUCHAS GRACIAS PILO.

A MIS SINODALES POR HABER ACEPTADO SER REVISORES DEL PRESENTE TRABAJO.

AL DR. YURIBALDO POR SUS CONSEJOS, POR LA COLABORACIÓN Y AYUDA PARA LA REALIZACIÓN DE LAS GRÁFICAS Y DIAPOSITIVAS.

A MAYTÉ POR SU APOYO Y SUS ACERTADOS CONSEJOS.

A JUANITO Y DAIRO, POR SER MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 114 DEL CONJUNTO 'E' DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM CON EL APOYO DE OEA PLANT BIOTECHNOLOGY Y EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY CII-CT94-0079

INTRODUCCIÓN.

LA SEMILLA DE MAÍZ.

La semilla es el óvulo fecundado de una planta angiosperma, en el cual se restablece la diploidia y funciona como el órgano de dispersión de la especie asegurando su reproducción (Fañn, 1978).

Dentro de las angiospermas se encuentran las plantas monocotiledóneas, que presentan una hoja embrionaria y las dicotiledóneas, las cuales presentan dos; esta clasificación está basada en el número de cotiledones, que son las hojas embrionarias de la semilla (Raven, 1992).

En la gran mayoría de las semillas maduras de las angiospermas encontramos tejidos vivos y tejidos muertos; entre los tejidos muertos se pueden considerar los siguientes (Bewley y Black, 1994). Ver figura 1:

La testa es la cubierta de la semilla, y se forma a partir de los tegumentos. En el caso del maíz se presenta como una película muy delgada a la que también se le denomina pericarpio.

El endospermo es el tejido nutritivo, se forma en el saco embrionario y se conserva en la semilla madura como tejido de reserva para el desarrollo del embrión.

El escutelo que en el maíz constituye el único cotiledón (hoja embrionaria), que actúa como órgano de succión en favor de la nutrición del embrión durante la germinación.

Entre los tejidos vivos de la semilla se pueden considerar:

La capa de aleurona que es una capa de células que delimitan al endospermo, y su función principal durante la germinación es la de secretar proteasas y amilasas que ayudan a la movilización de nutrientes desde los tejidos de reserva hacia el embrión en desarrollo.

El embrión o eje embrionario es el esporofito joven parcialmente desarrollado (Fañin, 1978). Está constituido por el coleóptilo que es la estructura que aloja a la plúmula (primeras hojas verdaderas), que juntos constituyen al meristemo apical, el cual formará la parte aérea de la planta. También se distinguen la coleorriza que envuelve a la cofla (primera raíz) y juntos constituyen al meristemo radicular; estas estructuras darán origen al sistema radicular del nuevo individuo.



Figura 1. Semilla de Maiz

GERMINACIÓN DEL MAÍZ: ASPECTOS BIOQUÍMICOS.

Después de que el embrión se ha terminado de formar las células suspenden su división celular y atenúan su actividad metabólica entrando a un estado de latencia que dura hasta que la semilla germina (Bldwell, 1979). Cuando la semilla se encuentra bajo condiciones favorables de luz, temperatura y humedad, el embrión reanuda su actividad metabólica.

En nuestro grupo definimos a la germinación como un proceso por el que las semillas cambian de un estado metabólico virtualmente detenido a uno muy activo en el que se desencadena la proliferación celular (Vázquez-Ramos, 1992).

Los fenómenos bioquímicos o moleculares ocurridos durante la germinación pueden dividirse en (Bewley y Black, 1994; Moñr, 1995):

1. Eventos tempranos, en los cuales están involucrados, la hidratación celular, la síntesis de proteínas, de RNA y de ATP, así como reparación de DNA.
2. Eventos tardíos o secundarios como son expansión celular, movilización de reservas y duplicación de DNA.

Dentro de los eventos involucrados en la germinación, el proceso que más nos interesa en este trabajo es la síntesis de DNA, ya sea del tipo reparativo o del tipo replicativo, ya que el presente trabajo se enfoca a las enzimas que sintetizan al DNA : las DNA polimerasas.

Síntesis de DNA: la síntesis de DNA es un proceso que ocurre poco tiempo después de la entrada de agua a la semillas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zarain et. al., 1987; Zlatanova et. al., 1987; Baiza et. al., 1989) y es un requisito indispensable para que la división celular suceda (Bewley y Black, 1994).

En el maíz, dentro de los varios eventos metabólicos que se disparan durante la imbibición de la semilla, se ha observado que existe síntesis de DNA desde los primeros minutos de la germinación. Datos de nuestro grupo han sugerido que en maíz no existe síntesis replicativa durante las primeras horas de la germinación. Los resultados obtenidos en investigaciones sobre la naturaleza y localización de la síntesis del DNA en etapas tempranas de la germinación de maíz en nuestro laboratorio dan una fuerte evidencia que el tipo de síntesis de DNA nuclear durante las primeras horas de germinación es de tipo reparativo, esto se demostró por la recuperación del peso molecular del DNA según transcurre el tiempo de germinación en células de embrionarios de semillas de maíz tanto control como deterioradas, en donde se demostró también que no existe duplicación de DNA

en los primeros momentos de la germinación. (Meléndez et. al., 1990).

DNA POLIMERASAS: GENERALIDADES.

La búsqueda de una enzima que sintetizara el DNA fue iniciada por Artúur Kornberg en 1955; su trabajo permitió la purificación y caracterización de una DNA polimerasa de Escherichia coli, una enzima que tiene un solo polipéptido y que actualmente es denominada DNA polimerasa I (Lehninger et. al., 1993). Los estudios realizados por Kornberg iniciaron la investigación para dilucidar los mecanismos de acción de estas enzimas tan importantes. A la fecha, en sistemas procariontes ya se han caracterizado a las DNA polimerasas responsables de la síntesis replicativa y reparativa. En eucariontes la investigación se ha dirigido fundamentalmente a sistemas animales más que a plantas, utilizando en muchos casos al virus SV40 como modelo de duplicación In vitro.

Las DNA polimerasas son las enzimas que se encargan de la síntesis de DNA; la reacción que catalizan es la incorporación de desoxinucleótidos monofosfato (dNMPs) en dirección 5'→3' utilizando las cadenas parentales de DNA como moldes. Estas enzimas utilizan desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) como sustrato liberándose pirofosfato en la reacción, y al mismo tiempo se forma el enlace fosfodiéster entre el dNMP y el extremo 3'OH del

nucleósido precursor.

La reacción general catalizada por la DNA polimerasa es:



Una regla básica para la duplicación de DNA es que la DNA polimerasa no puede comenzar la síntesis en ausencia de un cebador (Kornberg y Baker, 1992). Durante la duplicación del DNA in vivo el cebador es una secuencia corta, generalmente de RNA (15-50 nucleótidos de longitud) que se aparea con la cadena de DNA y provee un extremo 3'OH libre en el cual la DNA polimerasa comienza la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos (Lewin, 1994); sin embargo, in vitro un cebador puede originarse por diversas causas (Lewin, 1994):

1. Se pueden generar rupturas en el DNA de cadena doble por medio de la actividad de una endonucleasa y quedar un grupo 3'OH libre en alguna de las cadenas. La estructura de doble cadena con el corte resultante puede ser reconocida por algún tipo de DNA polimerasa y desde el punto de corte iniciar la incorporación de dNTPs.

2. Puede haber formación de estructuras secundarias en el DNA parental, que pueden originarse por apareamiento intracatenario en moldes lineales de cadena sencilla, dejando un extremo 3'OH libre que puede ser reconocido por la DNA

polimerasa como un cebador.

En procariontes, específicamente en E. coli otra importante función del cebador radica en que brinda a la DNA polimerasa la capacidad de autocorrección, es decir, la enzima detecta mediante contactos físicos en la doble cadena, errores debidos a un mal apareamiento de bases. Cuando esto sucede, el sitio catalítico pierde afinidad por la cadena que se está sintetizando y presenta actividad de exonucleasa en dirección 3'→5' para corregir los errores. Este mecanismo evita que la información genética sea alterada durante la replicación del DNA.

In vivo, tanto en procariontes como en eucariontes el cebador es sintetizado por enzimas llamadas DNA primasas (Lehninger et. al., 1993); en el caso de eucariontes la enzima está asociada a la DNA polimerasa α . En plantas, específicamente en maíz se ha reportado actividad de primasa para la DNA polimerasa 2, una polimerasa tipo α (García, 1995).

La actividad de las DNA polimerasas se puede generalizar en los siguientes puntos :

- Las DNA polimerasas son dependientes del uso de un molde, ya sea natural o artificial, para ambos moldes es necesaria la presencia de un cebador para que puedan ser susceptibles de duplicación por una DNA polimerasa.

- La polimerización consiste en la adición sucesiva en dirección $5' \rightarrow 3'$ de nucleótidos activados, los cuales presentan un grupo trifosfato en el extremo $5'$.

- Forman un enlace fosfodiéster, que une al monómero con la cadena, catalizando la reacción de un ataque nucleofílico del grupo $3' \text{ OH}$ libre del cebador a un átomo de fósforo en posición alfa del monómero activado con la eliminación de su pirofosfato terminal (los átomos de fósforo en posición β y γ).

- La polaridad de la cadena recién sintetizada es antiparalela y complementaria al molde.

- Se requiere del correcto apareamiento de las bases Adenina-Timina (A-T) y Guanina-Citocina (G-C), en el caso de no darse tal apareamiento, puede haber una actividad de exonucleasa en dirección $3' \rightarrow 5'$ en la misma DNA polimerasa como es el caso de la DNA polimerasa I de E. coli.

- La procesividad, es la sucesión de pasos de polimerización sin que ocurra la liberación de la enzima del molde; una polimerasa que se disocia después de la adición de cada nucleótido puede requerir de proteínas auxiliares que le confiera procesividad in vivo; tal es el caso de la subunidad β de la DNA polimerasa III holoenzima de E. coli ó PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) que se asocia a la DNA pol δ de animales.

- Cualquier secuencia en la hebra molde se copiará sin preferencia particular o especificidad, siempre y cuando posean la misma estructura secundaria, ya que la especificidad en cuanto al lugar y tiempo en el que inicia la duplicación no está controlada por las DNA polimerasas sino por el primosoma.

CLASIFICACIÓN DE LAS DNA POLIMERASAS.

Las DNA polimerasas en eucariontes se han clasificado según sus características y su respuesta o comportamiento a diferentes sustancias como inhibidores, sales, substratos, etc. A continuación en la tabla 1 se enumeran los inhibidores más usados en la caracterización de las DNA polimerasas y su mecanismo de inhibición.

AFIDICOLINA	Fuerte competidor de la incorporación de dCMP y de dTMP y menos competitivo de dAMP y dGMP
N(2)-(Butilfenil) dGTP (BuPdGTP)	Análogo de dNTPs, altamente selectivo de DNA pol α
Didesoxi nucleótidos trifosfato (ddNTP)	Análogos de dNTPs, no tienen un grupo 3'OH libre, bloquean la polimerización
N-etilmaleimida (NEM)	Bloqueador de grupos sulfhidrilo
NaCl	Compite con los cofactores que utilizan las enzimas

Tabla 1. Algunos inhibidores de las DNA polimerasas de Eucariontes. Basada en Kornberg y Baker, 1992

En sistemas animales, los diferentes tipos de DNA polimerasas caracterizados hasta ahora son los siguientes (ver tabla 2) :

La DNA polimerasa α es esencial para la duplicación; está constituida por 4 subunidades, un núcleo catalítico de aproximadamente 170 KDa, 2 subunidades con actividad de primasa de 50 y 60 KDa y un polipéptido adicional de 70 a 75 KDa de función desconocida. La enzima de células HeLa parece contener actividad de exonucleasa $3' \rightarrow 5'$. Es sensible a la afidicolina y al dGTP butilfenil pero no a didesoxi-NTPs. Al parecer está involucrada en la síntesis de la cadena discontinua (Kornberg y Baker, 1992).

La DNA polimerasa β está involucrada en reparación del DNA pero no en su duplicación; esta enzima está constituida por un polipéptido de 36-38 KDa, no tiene actividad de exonucleasa, no es afectada por los mismos inhibidores que afectan a la DNA polimerasa α , pero es sensible a didesoxi-NTPs (Kornberg y Baker, 1992).

La DNA polimerasa δ juega un papel muy importante en la duplicación, es altamente procesiva en presencia de PCNA, que es una proteína auxiliar en la duplicación de DNA. Esta polimerasa contiene una actividad de exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y carece de actividad de primasa; es menos sensible a dGTP butilfenil que la DNA polimerasa α . Se ha sugerido que esta enzima es la que

sintetiza la cadena continua (Kornberg y Baker, 1992).

La DNA polimerasa ϵ aparentemente actúa en los mecanismos de reparación, no es dependiente de PCNA, tiene actividad de exonucleasa 3' \rightarrow 5', carece de actividad de primasa, contiene una fracción polipeptídica de 215 kDa y probablemente una de 55 kDa (Kornberg y Baker, 1992).

La DNA polimerasa γ es una enzima mitocondrial, tiene una subunidad catalítica de 125 kDa con actividad considerable sobre moldes de RNA, tiene un polipéptido de 35 kDa de función desconocida y tiene función de exonucleasa 3' \rightarrow 5'. Es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilos y ddTTP, y es insensible a la afidicolina (Kornberg y Baker, 1992).

En plantas se han reportado tipos similares de DNA polimerasas, aunque solo en algunos casos las enzimas han sido altamente purificadas, por ejemplo:

Se ha reportado una DNA polimerasa tipo α de aparente alto peso molecular, entre 100 y 200 kDa, que puede ser inhibida por NEM y afidicolina (Litvák y Castroviejo, 1987). En trigo se ha reportado que existe una DNA polimerasa tipo α que trabaja eficientemente con el molde de polirA-dT cuando se baja la temperatura de incubación o cuando se utiliza algún agente que estabiliza el complejo cebador-molde, mientras que en animales la DNA pol α no utiliza este molde (Litvák y Castroviejo, 1987). En

maiz se reportó una DNA polimerasa tipo α a la que se le denominó DNA pol 2 (Coello et. al., 1992) la cual presenta actividad de primasa (García, 1995).

Existe una DNA polimerasa tipo β en trigo, al parecer tiene un peso molecular de 50 KDa, es inhibida por altas concentraciones de NEM, aparentemente tiene actividad reparativa aunque todavía no se ha comprobado. Se ha reportado que la actividad de síntesis reparativa inducida por luz UV en protoplastos de Nicotiana silvestris es resistente a la afidicolina, por lo cual no pudo haberse llevado a cabo por una DNA polimerasa tipo α . DNA polimerasas semejantes se han encontrado en chícharo, tabaco y trigo (Litvač y Castroviejo, 1987).

La DNA pol tipo δ , se ha reportado en trigo y aparentemente tiene varias similitudes con la de animales tales como su respuesta a inhibidores, la especificidad por el molde, estimulación por PCNA así como una actividad de exonucleasa 3' \rightarrow 5' (Castroviejo et. al., 1990).

La DNA polimerasa de cloroplastos comparte con la DNA polimerasa γ mitocondrial de animales las siguientes características: su preferencia por el uso de moldes de polrA-dT, una concentración óptima de manganeso 0.1-1mM, así como un óptimo de KCl 100mM, pH de 8-9, tamaño de 105 KDa, resistencia a la afidicolina y sensibilidad al NEM (Kornberg y Baker, 1992). Al

parecer en plantas también existe un tipo de DNA pol γ que tiene asociada una actividad de primasa, ya que en trigo hay evidencia de que la DNA pol A (tipo γ) es capaz de iniciar la síntesis de DNA en ausencia de un cebador exógeno. (Litvák y Castrovieio, 1987).

Pollmerasa	α	δ	ϵ	β	γ
Designación					
Mamíferos	α	$\delta, \delta 1$	$\delta, \delta 2, \delta 11, \delta *$	β	γ
Levaduras	POL I	POL III	POL II		Mitocondrial
Gen De	Pol 1	Pol 3	Pol 2		Mip1
Levadura	(Cdc 17)	(Cdc 2)			
Propiedades					
Nativo	250	170	256	36-38	160-300
Subunidad Catalítica	165-180	125	215	36-38	160-300
Otras Subunidades	70,50,60	48	55	No tiene	45, 47
Localización	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Mitocondrial
Actividad					
Exonucleasa 3'→5'	No	Si	Si	No	Si
Primasa	Si	No	No	No	No
Factores					
Respuesta a Factores Auxiliares de α	Si	No	No	No	No
Respuesta a PCNA	No	Si	No	No	No
Molde Preferido	huecos	PolidA-oligodT	PolidA-oligodT	huecos	PolidA-oligodT
Catión Divalente	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺ /Mn ²⁺	Mg ²⁺ /Mn ²⁺
Procesividad	Baja	Alta	Alta	Baja	Alta
Fidelidad	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta
Inhibidores					
NaCl (0.15M)	Fuerte	Fuerte	Fuerte	No	No
Aldicolina	Fuerte	Fuerte	Fuerte	No	No
NEM	Fuerte	Fuerte	Fuerte	No	Fuerte
Butilfenil DGTP	1 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	No inhibe
Didesoxy-Ntp's	No	Débil	Débil	Fuerte	Fuerte
duplicación	Si	Si	Si	NO	Si
Reparación	NO			Si	No

TABLA 2. Características de las DNA polimerasas descritas en animales. (Kornberg Baker, 1992)

TIPOS DE MOLDES.

Como ya se explicó anteriormente, las DNA polimerasas requieren de cadenas de DNA parentales para sintetizar DNA nuevo; los moldes que utilizan estas enzimas pueden ser naturales o sintéticos, los moldes naturales pueden ser :

1.-DNA de cadena sencilla el cual es característico de algunos virus que presentan DNA lineal o circular. A estos tipos de DNA viral los duplica la maquinaria de duplicación de la célula huésped.

2.-DNA de cadena doble, presente en todos los procariontes y eucariontes.

En cuanto a los moldes sintéticos, generalmente son cadenas largas no ramificadas de polinucleótidos, que pueden ser de cadena doble o sencilla; en el caso de que sean de cadena sencilla están cebados por un oligonucleótido corto, que contiene la base complementaria del polinucleótido. Estos polinucleótidos están constituidos por alguna de las cuatro bases, por lo que se encuentran polidA, polidC, polidG ó polidT (Kornberg y Baker, 1992).

Los tipos de moldes se pueden clasificar con base en su susceptibilidad de duplicación según lo propuesto por Kornberg y Baker, 1992(ver fig. 2):

DNA intacto de doble cadena: el DNA de cadena doble circular covalentemente cerrado no tiene extremos 3'OH libres, por lo que es un sustrato inerte para todas las DNA polimerasas; es decir, no es un molde que se pueda replicar debido a la ausencia de un cebador; sin embargo, no es un sustrato inerte para una RNA polimerasa o una DNA primasa ya que éstas no requieren de un extremo 3'OH libre para poder iniciar la síntesis de un cebador o de una cadena de RNA.

DNA de cadena doble con cortes: el DNA de doble cadena intacto puede ser activado como un molde-cebador para DNA polimerasas por incisiones en una sola cadena, provocadas por una endonucleasa, como por ejemplo la DNasa pancreática de timo de ternera, la cual produce extremos 3'OH libres intercalados en las cadenas tratadas con esta endonucleasa.

DNA de cadena doble con huecos: este tipo de DNA es el mejor molde para medir actividad de DNA polimerasa in vitro, cuando se introducen huecos cortos, por ejemplo por la exonucleasa III, la cual degrada pequeñas porciones de una de las cadenas de la estructura de cadena doble en dirección 3'→5' .

DNA de cadena sencilla: el DNA de cadena sencilla es inerte como molde ya que no posee un extremo 3'OH libre, al menos que presente regiones de cadena doble en los extremos que funcionen como cebadores. Para activar a un molde de cadena sencilla se agrega un oligonucleótido que tenga las bases complementarias al molde de cadena sencilla que se desea activar. Al cebar un DNA de cadena sencilla se puede obtener un molde activo para algunas DNA polimerasas.

Juegos de molde-cebador y su uso por pol I de *E. coli*

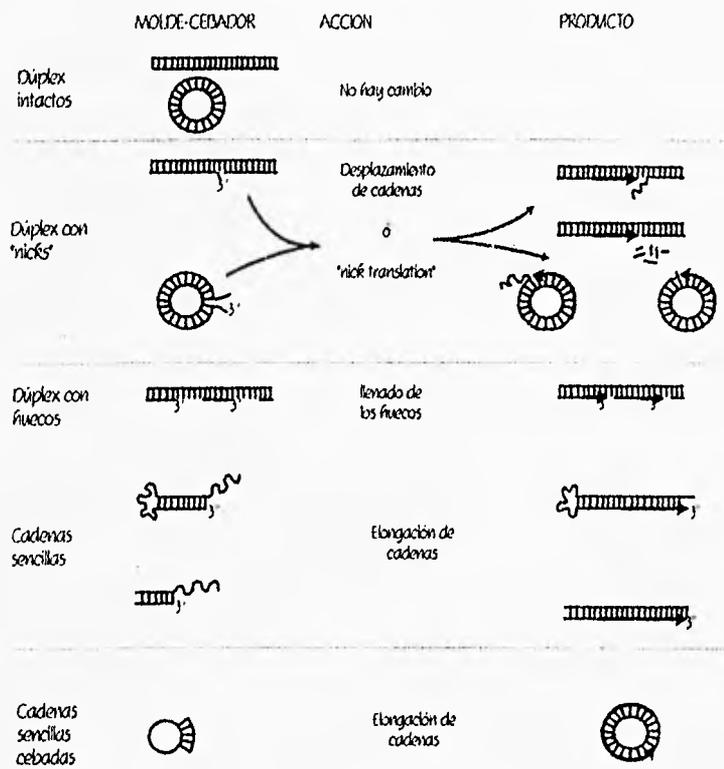


Figura 2. Diferentes tipos de moldes utilizados por las DNA polimerasas (Kornberg y Baker, 1992).

ANTECEDENTES
INMEDIATOS.

Una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio ha sido la purificación y caracterización de las distintas DNA polimerasas presentes en ejes embrionarios de maíz.

El presente trabajo se fundamenta en los estudios más recientes sobre estas enzimas. Inicialmente se purificó y caracterizó a una DNA polimerasa presente mayoritariamente a las 3 y 24 horas de germinación la cual seguía un comportamiento similar al de la DNA pol α de animales en cuanto a su respuesta a inhibidores, pHs y cofactores (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988). Posteriormente, para obtener a esta enzima con una mayor pureza se cambió el esquema de purificación fraccionando un extracto crudo de ejes embrionarios de maíz embebidos por 24 horas pasándolo a través de una columna de DEAE-Celulosa eluyendo con un gradiente de fosfatos de 40 a 400mM como primer paso de purificación. En el perfil de elución se detectaron 3 picos con actividad de DNA polimerasa; a estas enzimas se les denominaron DNA pol 1, 2 y 3 según su orden de elución (Coello et. al., 1992). Siguiendo este esquema la DNA pol 1 se purificó posteriormente unas 5000 veces. Esta enzima fue estudiada determinando las condiciones óptimas de actividad de polimerasa mediante la incorporación de timidina- ^3H a DNA activado de timo de ternera. El pH óptimo de catálisis es de 7-7.8, la temperatura óptima es de 30-38°C, la concentración de Mg^{2+} como cofactor es de 5-10mM. La actividad enzimática es inhibida por NEM, dTTP y afidicolina en

menor medida, mientras que es estimulada por DMSO (Garcia, 1991). Esta enzima presenta características que la clasificarían como una polimerasa de tipo δ (Garcia et. al. 1996, en prensa)

La DNA pol 2 ha sido la enzima mejor caracterizada, ya que se logró purificar alrededor de 5000 veces en cuatro pasos cromatográficos, y se establecieron las condiciones óptimas de actividad. Esta enzima requiere de Mg^{2+} como cofactor, el pH óptimo de catálisis es de 7 y la temperatura óptima es de 30-37°C, la actividad enzimática es estimulada por K^+ y es medianamente inhibida por afidicolina, NEM y ddTTP, presenta una masa molecular de aproximadamente 450KDa la cual fue calculada por western blot, utilizando un anticuerpo policlonal contra pol α de timo de ternera, los resultados obtenidos sugirieron que esta enzima forma un complejo multiproteico (Coello, 1992). La DNA pol 2 de maíz se continuó caracterizando, midiendo la procesividad de la enzima, la cual coincidió con la reportada para la DNA pol α de animales (Coello & Vázquez-Ramos, 1995). También se hicieron experimentos de inmunoprecipitación con el anticuerpo contra pol α de animales en fracciones con actividad de polimerasa, donde se logró una inmunoinhibición de hasta el 75%. Todos estos datos demostraron que la DNA pol 2 de maíz es una enzima tipo α y por lo tanto debe estar involucrada en la duplicación del DNA. Posteriormente se obtuvo un anticuerpo policlonal contra esta polimerasa de maíz, el cual reconoce siete subunidades; al realizar

los experimentos de inmunodetección se reconoció una subunidad de 90KDa, la cual se demostró por medio de geles de actividad que es el polipéptido que posee la actividad catalítica. Este anticuerpo no tuvo ningún efecto sobre las DNA pol 1 y 3 (Coello et. al., 1994). Posteriormente se encontró que junto con la actividad de polimerasa de esta enzima coelúa una actividad de primasa, la que se caracterizó, estableciendo las condiciones óptimas de actividad (García, 1995). Este trabajo corroboró que la DNA polimerasa de maíz es una enzima de tipo α , replicativa y que con ella se debe iniciar la síntesis de DNA, ya que tiene la capacidad de sintetizar su propio cebador de RNA.

La DNA pol 3 de maíz no se ha estudiado de manera profunda, ya que se encuentra en menor proporción a las otras dos y presenta una gran inestabilidad aún a 4°C; algunos datos sugieren que puede ser de tipo reparativo (García et, al. 1996, en prensa)

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar a las DNA polimerasas 1,2 y 3 de ejes embrionarios de semillas de maiz embebidos 24 horas, por medio del uso diferencial de moldes de DNA tanto naturales como sintéticos. A futuro se pretenden ensayar condiciones bajo las cuales distintas combinaciones de DNA polimerasas puedan sintetizar DNA eficientemente.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Purificar parcialmente a las DNA polimerasas 1,2 y 3 de maiz mediante la metodología ya reportada.
- Comparar la actividad de las DNA polimerasas 1,2 y 3 para cada tipo de molde.
- Fijar las condiciones óptimas de actividad de las diferentes polimerasas sobre los distintos moldes, con el propósito posterior de establecer un sistema de duplicación in vitro.

MATERIALES Y
METODOS

Material biológico: las semillas de maiz (*Zea mays* L.) utilizadas fueron variedad Chálqueño con un 99% de germinación, las semillas fueron obtenidas de productores del Valle de Chálco. Los ejes embrionarios fueron extraídos a mano y se almacenaron a 4° C hasta su utilización.

Imbibición de ejes embrionarios: los ejes fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de Sodio al 0.5% por 5 min., posteriormente se lavaron con agua desionizada estéril 3 veces, se les quitó el exceso de agua con un papel filtro Whatman No.1, se pusieron a imbibir en un molde refractario con papel Whatman No. 1 con una solución que contenía: tris-HCl 50mM pH 7.6, KCl 50mM, MgCl₂ 10mM, Sacarosa 2% y cloranfenicol 10μM.

Obtención del extracto crudo: los ejes embrionarios (10 gramos) se homogenaron con 2.5 volúmenes de buffer que contenía tris-HCl 40mM pH 7.6, KCl 15mM, 2-mercaptoetanol 1mM, sacarosa 0.25M, MgCl₂ 1mM, KH₂PO₄ /K₂HPO₄ 40mM y una tableta que contiene una combinación de inhibidores de proteasas, COMPLETE de Boehringer Mannheim; se homogenó tres veces por 30 segundos en un polltrón PCU-2.

1.El homogenado se centrifugó a 10'000 r.p.m. por 10 min, se guardó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml aproximadamente de buffer de homogenado y se homogenó en el polltron, se centrifugó otra vez a 10,000 r.p.m. por 10 min.

2. Los sobrenadantes se juntaron y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. por 15 min en una centrifuga Sorvall Super T 21.

3. El sobrenadante se centrifugó a 40.000 r.p.m. durante 2.5 h en una ultracentrifuga Sorvall Ultra PRO 80.

4. Se precipitó el sobrenadante con protamina al 10% (10 µl/ml) durante 30 min.

5. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 r.p.m. 15 min. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

Purificación de las DNA polimerasas: en la purificación de las enzimas se utilizó un FPLC (Fine Performance Liquid Chromatography) de Pharmacia; el extracto crudo obtenido se cargó a una columna de intercambio iónico DEAE- Sephacel de aproximadamente 30ml de volumen de cama, la cual se lavó con el buffer A que contenía fosfato de potasio 40mM a pH 7.6, EDTA 1mM, glicerol al 20%, benzamidina 1mM, 2-mercaptoetanol 1mM; el buffer B contenía lo mismo que el A pero el fosfato de potasio se encontraba a una concentración de 400mM. La columna se equilibró previamente con buffer A, con este buffer se lavó la columna con dos volúmenes de cama y posteriormente se le aplicó el gradiente con el buffer B hasta que se lavara dos volúmenes con el buffer B al 100% dando un gradiente de concentración de fosfatos de 40 a 400mM, para despegar a las proteínas que se quedaron unidas a la matriz. Las fracciones que tuvieron actividad

de cada enzima (por separado) se mezclaron y las diferentes fracciones se cargaron a una columna de afinidad Heparina-Sepharosa; ésta columna tiene un volumen de cama de 1 ml. y se utilizó con los buffers C y D; el C contenía lo mismo que el A pero también incluía NaCl 0.5M, mientras que el buffer D contenía NaCl 1.5M. La columna se lavó con cinco volúmenes de buffer C y las proteínas que se quedaron unidas a la matriz se eluyeron con un gradiente de 0.5 a 1.5M de NaCl. Las fracciones que eluyeron de heparina y que tenían actividad se cargaron a una columna de exclusión molecular Superdex 200. Esta columna tiene un volumen de cama de 120ml; para esta columna se utilizó el buffer E el cual contenía lo mismo que el A pero a diferencia de este último contenía NaCl a 50mM, la columna se equilibró previamente en buffer E, antes de cargar las muestras se concentraron en tubos centricon AMICON de corte molecular de 10 KDa en una centrifuga intermedia a 4,000 r.p.m. durante 4.5 h; la muestra se eluyó en esta columna con 1.5 volúmenes de cama. El último paso de purificación fue otra columna de Intercambio iónico pero que fue Mono Q con volumen de cama de 1ml; la columna se lavó con cinco volúmenes de cama con solución C y después se hizo un gradiente de 0.15 a 1.5 M de NaCl para despegar a las proteínas que se quedaron unidas. Las fracciones con actividad fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

Cuantificación de Proteínas: se estimó la concentración de las proteínas en las fracciones que presentaron actividad de polimerasa por el método de Bradford; se utilizó este método porque su sensibilidad es de 0.2-20 μg aproximadamente; además de su sencillez.

El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera: 500mg de Azul de Coomassie G, ácido perclórico 0.6N en 1 litro de agua desionizada (Stostcneck, 1990).

Para medir la concentración de proteína, la metodología utilizada fue la siguiente :

1. Se utilizó 1ml del reactivo de Bradford y 50 μl de NaOH 1N por cada tubo y se mezcló bien.
2. Se le añadieron 10-15 μl de muestra.
3. Se incubaron las muestras 5 min a temperatura ambiente
4. Se midió la absorbancia a 590 nm en cubetas de poliestireno.
5. Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina de 0-15 μg .

Ensayo de DNA polimerasa; la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl . La mezcla de reacción contenía: tris-HCl 50mM pH 7.6, KCl 15mM, MgCl_2 8mM, 2-mercaptoetanol 0.4mM,

Glicerol 5%, desoxiribonucleótidos 0.1mM, ATP 1mM, dTTP ^3H 5 $\mu\text{Ci/ml}$, DNA activado de timo de ternera 5 $\mu\text{g/ensayo}$; esta mezcla de reacción se utilizó como control positivo. Para los ensayos con los moldes sintéticos se utilizaron dos concentraciones diferentes de MgCl_2 que fueron 8 y 20mM así como de MnCl_2 que fueron 0.8 y 2mM, los moldes sintéticos utilizados fueron polidA-oligodT de Pharmacia y polirA-oligodT de Boehringer Mannheim a 20 $\mu\text{g/ml}$ (Coello, 1994). Los moldes naturales utilizados fueron:

- a) DNA circular de cadena sencilla de $\phi\text{x-174}$ (Gibco) a una concentración de 0.15 μg por ensayo, el cual se utilizó cebado y sin cebar, el cebador utilizado fue un Random Primer de Gibco (para cebar al DNA de cadena sencilla se calentó a 85°C, se agregó el Random Primer y se incubó durante 5min., se dejó enfriar a temperatura ambiente).
- b) DNA activado de timo de ternera desnaturalizado (calentándolo a 85°C durante 5 min y enfriándolo inmediatamente a 4°C).
- c) DNA de timo de ternera no activado (no tratado con endonucleasa).

Se incubaron de 2-5 μg de enzima en 40 μl de mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos, la reacción se detuvo con 50 μl de DNA de esperma de salmón y 1ml de TCA (ácido tricloroacético) al 10% fríos, se incubó 15 minutos en hielo,

posteriormente la mezcla se filtró al vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, los cuales se lavaron con 2 ml de TCA al 10% y 1 ml de etanol al 96%, estos filtros se secaron en una estufa a 70°C durante 15 min y posteriormente se colocaron en frascos viales que contenían líquido de centelleo (0.1g de 2,2-p-fenileno-bis(5-feniloxazol) más 5g de 2,5-difeniloxazol disueltos en un litro de tolueno) y se contaron en un contador de centelleo.

Activación del DNA de timo de ternera; se disolvieron 0.5mg/ml de DNA de timo de ternera en una solución de albúmina sérica bovina 0.5mg/ml, Tris-HCl pH 7.4 10mM y MgCl₂ 5μM. Este DNA disuelto se hizo reaccionar con 1μg/ml de DNasa I (Gibco). Se incubó durante 15 minutos a 37°C y se detuvo la reacción a 77°C durante 5 minutos, después se pasó a un baño de hielo.

Ensayo de primasa: se midió actividad de primasa de manera indirecta utilizando como moldes el DNA de φX-174 o PolidT sin cebador, en una mezcla de reacción que contenía Tris 50mM pH 8.2, MgCl₂ 8mM, KCl 15mM, Glicerol 5%, 2-mercaptoetanol 1mM, ATP, CTP, GTP, UTP 1mM de cada uno, en el caso del molde natural DNA de φX-174 se usaron 0.15 μg por ensayo y para PolidT 0.12U A₂₆₀; cuando se utilizó polidT como molde solo se utilizó ATP.

La reacción de cebado se llevó a un volumen final de 50 μl en un tubo eppendorf y se utilizaron de 2-5 μg de proteína por

ensayo, se preincubó 15 minutos a 37°C, esta reacción de cebado se detuvo calentando las muestras a 85°C durante 5 minutos, se les dio un pulso en la microcentrifuga para bajar las gotas condensadas en la tapa y paredes del tubo y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente se hizo el ensayo de DNA polimerasa agregando a cada ensayo 0.5 U de DNA polimerasa I de E. coli y 5 μ Ci/ml de dATP 3 H en el caso de la utilización de polidT como molde, con el molde natural se agregaron los 4 desoxiribonucleótidos incluyendo dTTP 3 H.

Gel de Agarosa: este gel se preparó en una cámara para electroforesis sumergida horizontal, siguiendo la metodología reportada por Sambrook et. al. en 1989. Se preparó suficiente buffer de electroforesis (TAE 1x que contiene tris-acetato 40mM pH 8 y EDTA 1mM) para llenar el tanque de la cámara. Se disolvió agarosa a una concentración de 0.8%, en TAE calentando en un horno de microondas, se dejó que se enfriara la agarosa hasta que llegó a una temperatura aproximada de 50°C, se añadió bromuro de etidio 0.5 μ g/ml y se mezcló, se vació el gel dentro de la cámara de electroforesis y se le colocó el peine; cuando el gel estuvo totalmente polimerizado, se vació el restante de TAE hasta cubrir el gel totalmente. Posteriormente se cargaron las muestras. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 1.5 horas a 75 Voltios.

Las muestras que se cargaron fueron tratadas por el procedimiento siguiente; las DNA polimerasas 1, 2 y 3 de maiz se preincubaron por separado a 37°C con mezcla de reacción que contenía 0.2 µg/50µl de DNA del fago φX-174 y ribonucleótidos en lugar de desoxirribonucleótidos; la reacción se paró a 85°C y se le agregó proteínasa K (10µg/ml) y se incubó por 10min a 37°C; posteriormente se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 100% y un décimo de volumen de acetato de sodio 3M a pH 4.5, se dejaron las muestras a -70°C durante 30min, después se centrifugaron en la microcentrifuga 15 min a máxima velocidad y se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las muestras volumen/volumen en TE (tris 10mM pH 8 y EDTA 1mM pH 8) y buffer de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xilen cianol FF 0.25%, glicerol al 30% en TAE 1x).

RESULTADOS.

PURIFICACIÓN DE LAS TRES DNA POLIMERASAS DE MAIZ.

Para iniciar la investigación respecto a la utilización de los diferentes moldes por las 3 DNA polimerasas de maiz reportadas hasta la fecha, lo primero que se hizo fue la purificación de las enzimas por diferentes pasos cromatográficos.

La primera cromatografía utilizada fue una columna de intercambio iónico (DEAE-Sephácel —intercambio aniónico—), en este primer paso de purificación se resolvieron tres picos con actividad de polimerasa. El primer pico de actividad (DNA pol 1) se detecta en el lavado de la columna, es decir en buffer de fosfatos 40mM; el segundo pico (DNA pol 2) eluye alrededor de 100mM de buffer de fosfatos y el tercer pico (DNA pol 3), eluye aproximadamente a 200mM. Las distintas fracciones con actividad de cada enzima se mezclaron y se cargaron por separado a una columna de Heparina Hi Trap que es una columna de afinidad. La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado que imita a la estructura del DNA que es polianiónica. En esta cromatografía las tres DNA polimerasas tienen que ser eluidas de la columna aplicando un gradiente de 150mM a 1.5M de NaCl.

La DNA pol 3 eluye a 600mM, la DNA pol 1 eluye a 650mM y la DNA pol 2 eluye a 850 mM.

La DNA pol 3 no fue sometida a otro paso de purificación, debido a que es la enzima menos abundante y con poca estabilidad a la manipulación. Después de este segundo paso, la DNA pol 3 fue purificada alrededor de 600 veces, lo que permitió utilizarla en los ensayos con relativa confianza.

Las fracciones con actividad de DNA pol 1 y 2 que salieron de la columna de Heparina, se mezclaron por separado y se concentraron en tubos centrífuga de corte molecular de 10KDa, para cargarlas posteriormente a una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200). Fue necesario concentrar las muestras debido a que el volumen de cama (volumen que ocupa la resina en la columna), es de 120ml; la enzima se diluye en gran medida debido a que entre más grande es el volumen de cama las enzimas difunden más.

Nuevamente las fracciones con actividad de pol 1 y pol 2 se mezclaron y se cargaron a una cuarta columna cromatográfica (Mono Q) que es una cromatografía de intercambio iónico. La resina de Mono Q es un intercambiador aniónico fuerte y contiene carga neta positiva; en esta columna, las proteínas se eluyeron en un gradiente lineal de 150-1500mM de NaCl, la actividad de las DNA pol 1 y 2 se detectó alrededor de 700-800mM. Este fue el último paso de purificación al que fueron sometidas las dos enzimas. La DNA pol 1 quedó purificada alrededor de 5000 veces, la DNA pol 2 se purificó alrededor de 8000 veces. Esta purificación

se hizo en colaboración con el M. en C. Elpidio Garcia Ramirez y con el Q.F.B. Dairo Oriuela Henry.

UTILIZACION DE MOLDES NATURALES Y SINTÉTICOS.

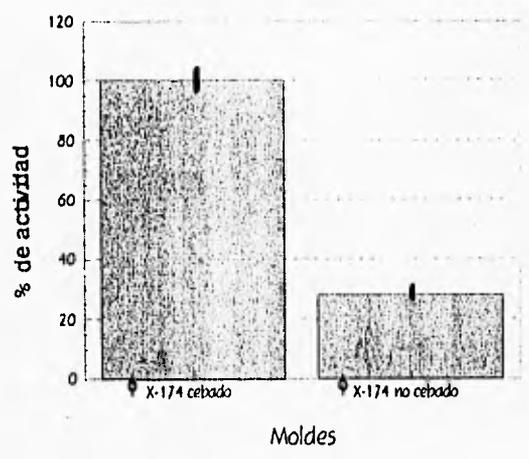
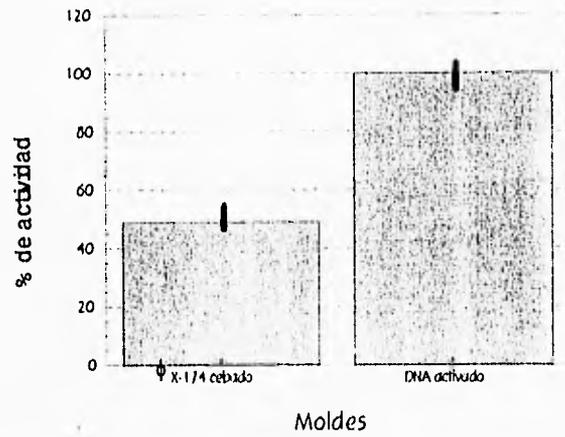
En el presente trabajo se utilizaron moldes sintéticos y naturales; los moldes sintéticos son moléculas de DNA o de RNA de cadena sencilla originadas por síntesis química; en el caso de polidA-oligodT se trata de un polidesoxinucleótido polladenilado que está cebado con un oligodesoxinucleótido de timidinas; este molde ha servido para la caracterización y la posterior clasificación de las DNA polimerasas de animales según lo reportado por Kornberg y Baker (1992). El otro molde artificial utilizado fue polirA-oligodT; este molde es un poliribonucleótido de adeninas cebado con un oligodesoxinucleótido de timidinas, y se utiliza principalmente para detectar actividad de transcriptasa reversa (RNA→DNA), característica principal de las DNA polimerasas y en animales.

En cuanto a los moldes naturales, se trata de moldes originados por síntesis biológica. Los moldes naturales utilizados fueron: DNA del fago ϕ X-174, que es circular de cadena sencilla de 5386 nucleótidos, DNA de alto peso molecular de timo de ternera

ya sea desnaturalizado, activado o no activado.

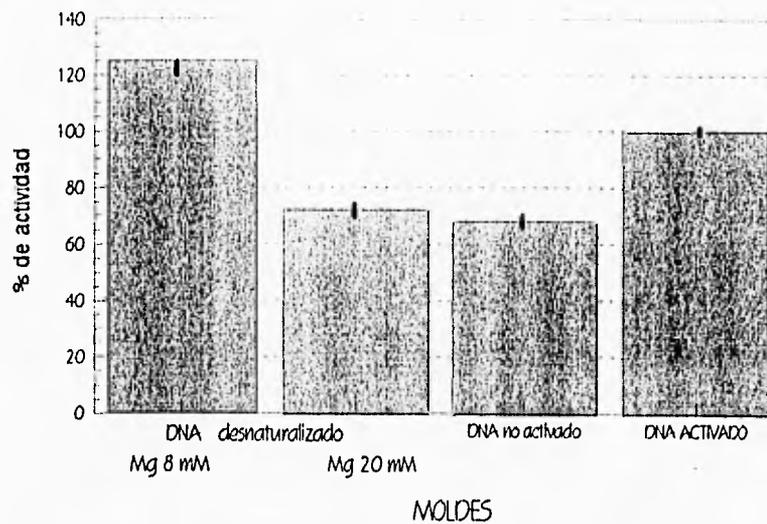
A continuación se presentan los resultados obtenidos para las tres diferentes actividades de DNA polimerasa de maiz con diferentes moldes naturales y sintéticos.

Actividad de DNA pol 1: la gráfica 1 muestra el comportamiento de esta enzima con el DNA circular de cadena sencilla de ϕ x-174 cebado y sin cebar ; el DNA activado de timo de ternera se tomó como el control positivo con respecto al DNA de cadena sencilla cebado, ya que los ensayos con DNA activado han sido estandarizados en trabajos previos. El porcentaje de actividad específica con el DNA de ϕ x-174 cebado es casi del 50% con respecto al porcentaje de actividad del DNA activado de timo de ternera que se consideró como el 100%. Se comparó entonces la actividad de polimerasa sobre el DNA de cadena sencilla cebado y no cebado; la DNA pol 1 utiliza poco al DNA no cebado con respecto al cebado.



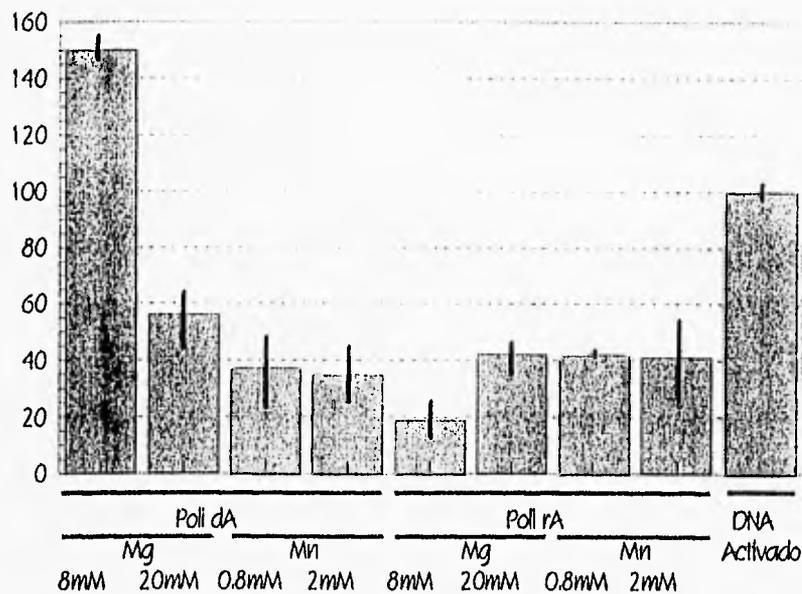
Gráfica 1. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 1 con DNA circular de cadena sencilla. La actividad específica promedio de la DNA pol 1 sobre el DNA activado fue de 5 millones de cpm/mg de proteína.

Los otros moldes naturales probados, fueron DNA activado desnaturalizado de timo de ternera más 8 y 20mM de Mg^{2+} , así como DNA no activado. En la gráfica 2 se observa que hay un incremento de alrededor del 25% de actividad con el DNA desnaturalizado más 8mM de Mg^{2+} , con respecto al DNA activado. A 20mM de Mg^{2+} el molde es usado menos eficientemente (aproximadamente un 70%). El DNA no activado es también usado, lo que podría indicar que presenta regiones de cadena sencilla con extremos 3'OH.



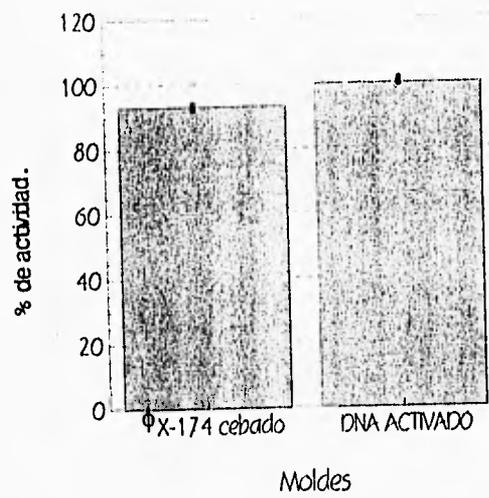
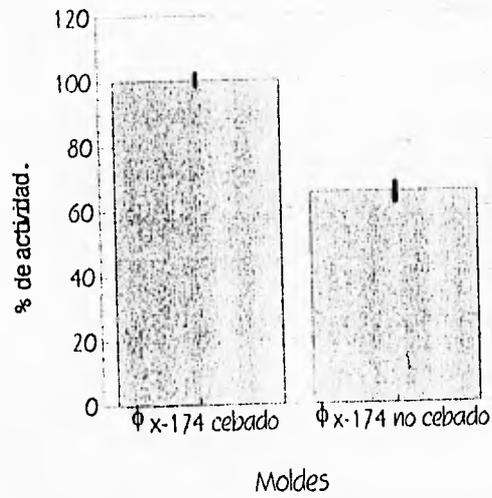
Gráfica 2. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 1 con moldes naturales de cadena doble. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de 5 millones cpm/mg de proteína

En cuanto a los moldes sintéticos (gráfica 3), se observa que el polidA-oligodT más 8mM de Mg^{2+} es utilizado de manera muy eficiente en comparación con DNA activado, ya que hay un incremento de 50% de actividad. Con 20mM de Mg^{2+} la actividad decae importantemente con respecto al control. La DNA pol 1 no usa Mn^{2+} eficientemente como cofactor cuando el molde es de tipo de DNA; tampoco puede utilizar eficientemente moldes de RNA, ya sea con Mg^{2+} o Mn^{2+} .



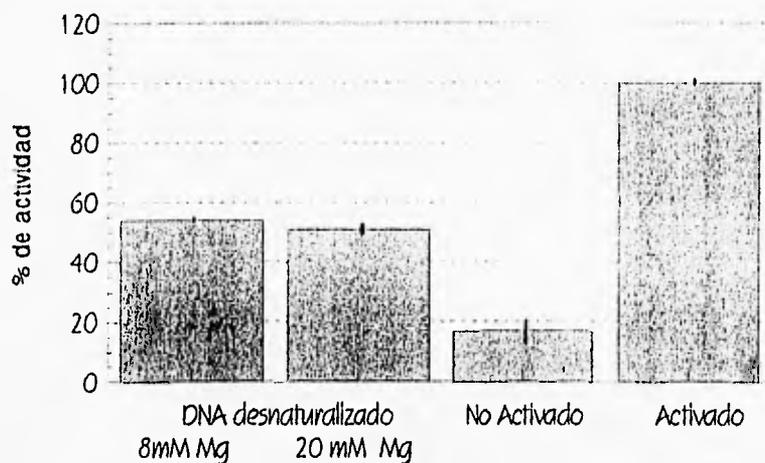
Gráfica 3. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 1 con moldes sintéticos de cadena sencilla. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de 5 millones de cpm/mg de proteína.

Actividad de DNA pol 2: esta enzima se ha identificado como una DNA pol tipo α (Coello et. al., 1992) y posee una actividad de DNA primasa (García, 1995). En la gráfica 4 se observa la comparación de la actividad sobre el DNA de ϕ x-174 cebado y sobre el DNA activado (control). Ambos moldes son usados en forma semejante por la DNA pol 2, por lo que se puede considerar que utiliza al molde de cadena sencilla de modo igualmente eficiente. El DNA de ϕ x-174 no cebado se comparó con el cebado, el cual se tomó como el 100% de actividad; a diferencia de la actividad observada con la DNA pol 1, la DNA pol 2 fue capaz de utilizar al DNA no cebado en un 65%.



Gráfica 4. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 2 con DNA circular de cadena sencilla. La actividad específica promedio de la DNA pol 2 sobre el DNA activado fue de 6.5 millones de cpm/mg de proteína.

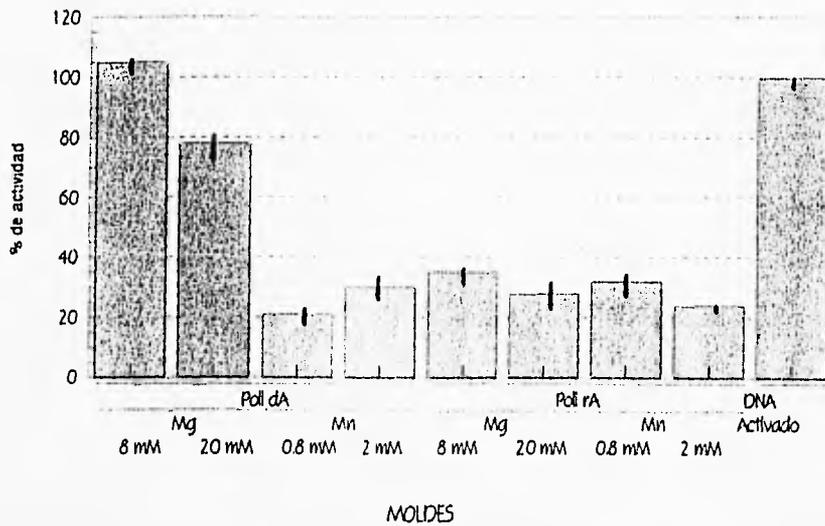
La respuesta de la DNA pol 2 al utilizar el DNA desnaturizado más 8 y 20mM de Mg^{2+} , se puede considerar como medianamente eficiente ya que el porcentaje de actividad con ambas concentraciones de Mg^{2+} es de alrededor de un 50%; por otro lado el DNA no activado es utilizado pobremente (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 2 con DNA de cadena doble. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de 6.5 millones cpm/mg de proteína

Entre los moldes sintéticos (gráfica 6), el mejor utilizado por la DNA pol 2 fue polidA-oligodT con 8mM de Mg^{2+} donde hay un ligero incremento de 5% en comparación con el DNA activado (100%), mientras que con 20mM de Mg^{2+} es utilizado casi en un 80%. El molde de RNA es poco utilizado con Mg^{2+} . La utilización de

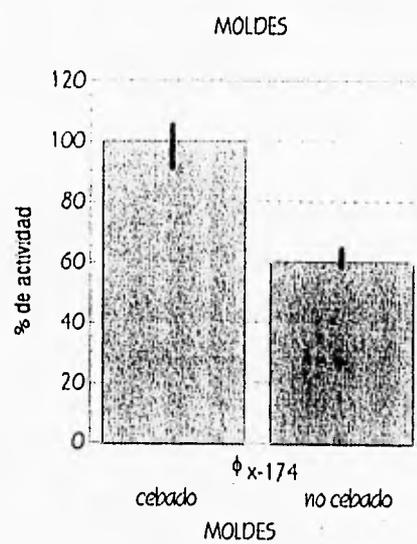
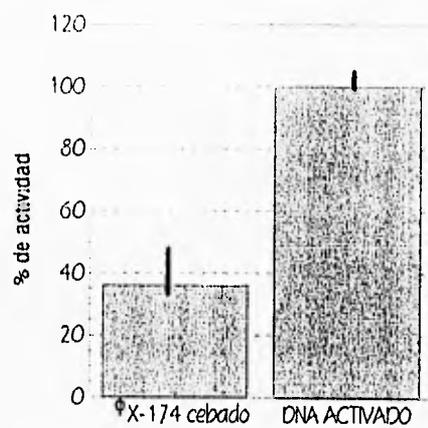
moldes tipo DNA o RNA con Mn^{2+} como catión es pobre, un resultado semejante al observado con la DNA pol 1.



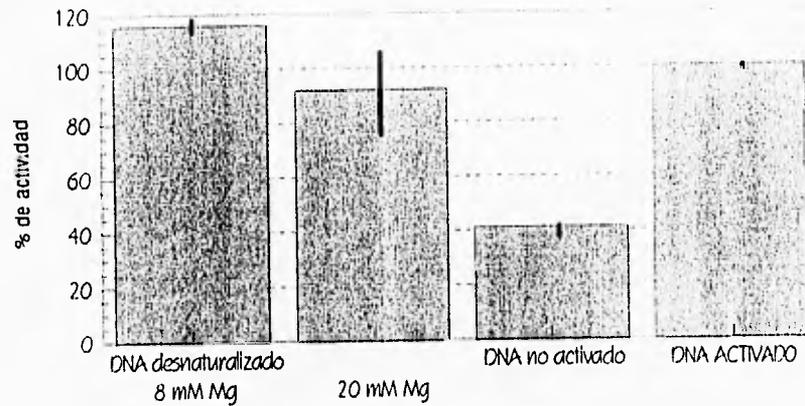
Gráfica 6. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 2 con moldes sintéticos de cadena sencilla. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de 6.5 millones de cpm/mg proteína.

Actividad de DNA pol 3: en la gráfica 7 se muestra que la DNA pol 3 utiliza casi en un 40% el DNA de ϕ x-174 cebado con respecto al DNA activado (100%); sin embargo, al comparar el uso del DNA de ϕ x-174, cebado y sin cebar, se observa una utilización de este último de un 60% de actividad con respecto al DNA cebado, actividad que se puede considerar como alta, ya que se partió del supuesto de que la DNA pol 3 de maíz no tiene asociada actividad de primasa.

Con los moldes de cadena doble (gráfica 8), la enzima utiliza el DNA desnaturizado más 8mM de Mg^{2+} tanto o más eficiente que el DNA activado; con 20mM de Mg^{2+} la enzima también trabaja bien. El molde menos utilizado fue el DNA no activado.

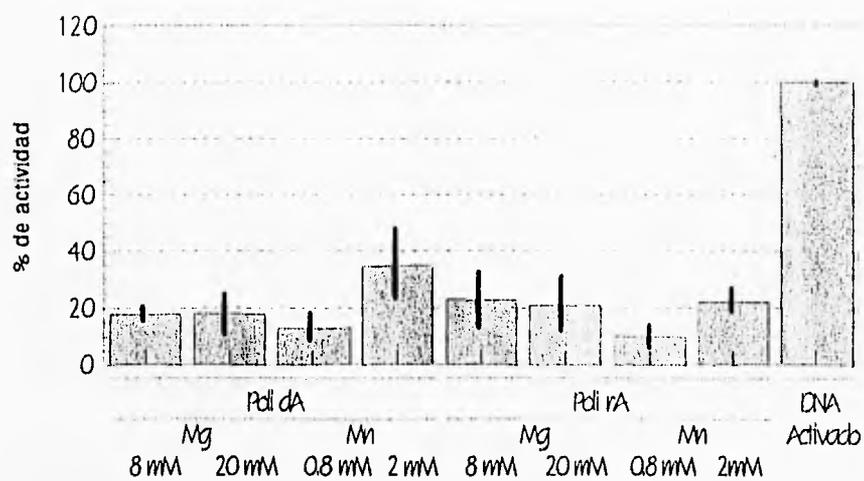


Gráfica 7. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 3 con DNA circular de cadena sencilla. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de aproximadamente 1 millón de cpm/mg de proteína.



Gráfica 8. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 3 con DNA de cadena doble. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de alrededor de 1 millón de cpm/mg de proteína

En la gráfica 9 se muestra el porcentaje de actividad con los diferentes moldes sintéticos, en la cual es evidente que la DNA pol 3 utiliza estos moldes pobremente, con respecto al DNA activado (100%), sea que se utilice Mg^{2+} o Mn^{2+} , y a cualquiera de las concentraciones probadas.



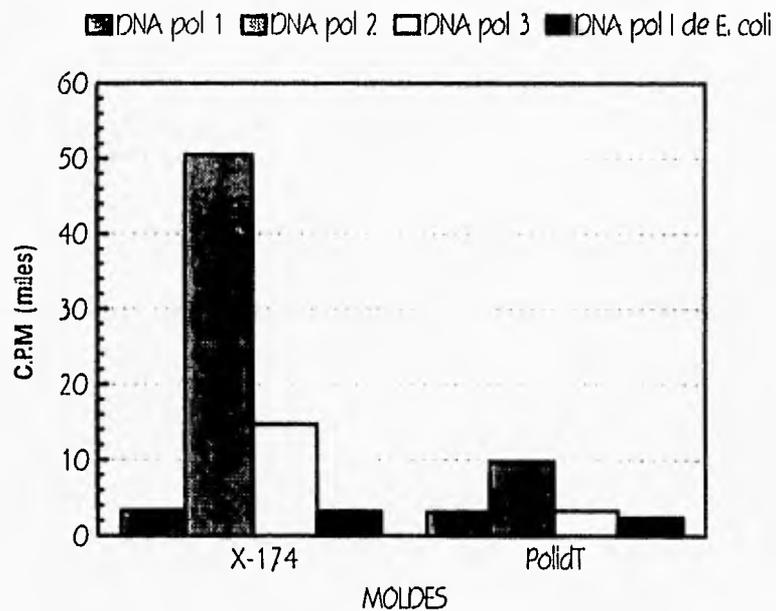
Gráfica 9. Porcentaje de actividad específica de la DNA pol 3 con moldes sintéticos de cadena sencilla. La actividad específica promedio sobre el DNA activado fue de aproximadamente de 1 millón de cpm/mg de proteína.

ACTIVIDAD DE PRIMASA EN LAS TRES DNA POLIMERASAS DE MAÍZ.

La función de la DNA primasa es sintetizar un cebador de RNA con un extremo 3'OH libre el cual reconoce la DNA polimerasa para empezar a replicar el molde de DNA tanto natural como artificial. Entre los moldes sintéticos más eficazmente 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 (Kornberg y Baker, 1992). En este laboratorio se ha reportado que utilizando el molde de poli-dT es posible observar una clara actividad de DNA primasa, que copurifica con la actividad de la DNA polimerasa 2 de maiz (Garcia, 1995).

Ya que se observó incorporación de dNMPs en el molde natural de cadena sencilla sin cebar con la DNA pol 3, se midió actividad de primasa a las tres DNA polimerasas de maiz, usando dos moldes: el poli-dT con el que ya se había reportado una clara actividad de DNA primasa en la DNA pol 2 y DNA del fago ϕ X-174 sin cebar, y se hizo una comparación entre las tres DNA polimerasas. Se usó el ensayo indirecto descrito en materiales y métodos. En la gráfica 10 se observa una gran actividad sobre ϕ X-174 de cadena sencilla de la DNA pol 1 de E. coli cuando se preincuba el molde con la DNA pol 2 de maiz; en cambio con la preincubación con DNA pol 1 se observa poca incorporación por la enzima de E. coli que puede considerarse como poco

significativa, mientras que con la DNA pol 3 si es evidente una pequeña actividad de primasa. Usando polidT como molde bajo las mismas condiciones, se observa muy poca actividad de la DNA pol I de E. coli, con respecto a cualquiera de las DNA polimerasas de maiz utilizadas en la preincubación. No obstante, en este caso habría que indicar que la DNA pol I de E. coli es Ineficiente en la utilización de este molde aún cebado con oligodA (2.5% con respecto al DNA activado).



Gráfica 10. Comparación de actividad de primasa de las DNA polimerasas de maiz.

ACTIVIDAD DE NUCLEASA EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD DE LAS DIFERENTES DNA POLIMERASAS.

Con el fin de comprobar que el molde de DNA circular de cadena sencilla del fago ϕ X-174 no se rompía como resultado de la acción de nucleasas presente en las fracciones con actividad de polimerasas, que produjera extremos 3'OH libres donde se pudieran engañar las DNA polimerasas, se realizó un gel de agarosa al 0.8% (figura 3), en el cual se corrió 0.2 μ g de DNA del fago preincubado con las 3 DNA polimerasas de maiz (una por carril) y la reacción fue detenida con calor; para que no se viera un barrido proteico en el gel, se degradaron con proteínasa K a las enzimas ya inactivadas.

El resultado mostró que no había presencia de nucleasas en las fracciones en las diferentes polimerasas de maiz utilizadas, ya que el DNA de ϕ x-174 no preincubado con enzimas mostró el mismo corrimiento electroforético con respecto al preincubado con las enzimas.



Fig. 2. Gel de agarosa al 0.8%: marcadores de peso molecular carril 1; DNA de ϕ x-174 preincubado con: DNA pol 1 carril 2, con DNA pol 2 carril 3, con DNA pol 3 carril 4, sin DNA polimerasa carril 5.

DISCUSIÓN.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Para facilitar la comparación entre la utilización de moldes naturales y sintéticos por las tres diferentes DNA polimerasas de maíz, los resultados se agruparon de acuerdo a la utilización de moldes naturales y sintéticos por las enzimas. Un punto de referencia que se considera útil para saber si los ensayos se realizan correctamente y los resultados son confiables, es usar simultáneamente alguna enzima conocida como es la DNA polimerasa I de E. coli, de la cual sabemos que no presenta actividad de primasa y que por lo tanto no puede incorporar desoxirribonucleótidos a moldes no cebados (en relación al uso de los moldes naturales).

A grandes rasgos se puede observar en la tabla 3 que de los moldes de cadena doble el mejor usado es el DNA desnaturalizado a 8mM de Mg^{2+} , a excepción de DNA pol 2. El DNA no activado es utilizado eficientemente por la DNA pol I de E. coli y en menor medida por las DNA pol 1 y 3 de maíz. Sin embargo, se puede considerar que los ensayos con estos moldes pueden ser azarosos debido a que, en el caso del DNA activado desnaturalizado de timo de ternera (a 8 y 20mM de Mg^{2+}), al desnaturalizar a este molde, es decir, al calentar a 85°C y enfriar rápidamente a 4°C, el DNA queda parcialmente alineado en algunas partes mientras que en otras no; por lo tanto, la acción de las enzimas sobre este molde no siempre será igual sino que dependerá de la alineación y de la formación de estructuras secundarias que presente el DNA

sometido al tratamiento. En cuanto al DNA no activado se puede considerar que aunque no se activó al DNA de timo de ternera con la endonucleasa, éste presentaba algunos extremos 3'OH libres, como lo demuestra el hecho de que fuera utilizado eficientemente por la enzima de *E. coli*. Esta enzima es particularmente eficiente con este molde, probablemente debido a que es capaz de incorporar dNMPs por "nick translation" (Kornberg y Baker, 1992), mecanismo quizás presente en algunas de las enzimas de maíz (como podría ser con las DNA pol 1 y 3).

	DNA Pol 1	DNA Pol 2	DNA Pol 3	DNA Pol 4
DNA desnaturizado 8 mM Mg ²⁺	125	54	116	103
DNA desnaturizado 20 mM Mg ²⁺	72	51	81	76
DNA no activado	68	17	41	92
DNA activado	100	100	100	100

Tabla 3. Porcentajes de actividad de las DNA polimerasas de maíz, con los diferentes moldes naturales.

Por los resultados obtenidos con el DNA de ϕ x-174 cebado y sin cebar, se observó que este molde es utilizado por la DNA pol 2 cuando está cebado, y también cuando no tiene cebador, ya que puede utilizarlo en un porcentaje considerable (65%); este

resultado puede explicarse debido a la actividad de primasa que presenta esta enzima y que además sugiere que la DNA primasa es capaz de formar un cebador en presencia de un ribonucleótido como es el ATP (el cual está presente en la mezcla de reacción para medir actividad de DNA polimerasa) y que posiblemente incorpore también dNMPs al elongar el cebador, como ocurre con algunas primasas de levaduras (Kornberg y Baker, 1992). Las DNA pol 1 y 3 utilizan menos el DNA de cadena sencilla cebado y en el caso de la DNA pol 1 esta es incapaz de incorporar dNMPs sin un cebador, mientras que se observó que la DNA pol 3 pudo sintetizar un cebador debido a que presentó un 60% de actividad con el DNA no cebado con respecto al DNA cebado (ver gráfica 7). Este resultado, sorprendente, es respaldado por los ensayos en los cuales se midió actividad de primasa en las tres enzimas y se observó una pequeña pero clara actividad en la DNA pol 3; una explicación a este fenómeno puede ser que al separar las fracciones con las diferentes actividades de DNA polimerasas que eluyen de DEAE-Sepharcel, algo de la actividad de DNA pol 2 se mezcle con la actividad de DNA pol 3, debido a que las actividades de estas dos polimerasas se sobrelapen en algún punto y así se contamine la actividad de DNA pol 3 con actividad de DNA primasa de la DNA pol 2; también es posible que pueda encontrarse actividad de primasa en ausencia de la DNA pol 2, y que casualmente copurifique en las fracciones en las que sale la DNA pol 3, sin ser parte de esta enzima. La respuesta se obtendrá

solamente cuando se logre una mayor purificación de la DNA pol 3.

Con respecto a los moldes sintéticos, DNA pol 1 utiliza muy eficientemente a polidA-oligodT con 8mM de Mg^{2+} , mientras que la DNA pol 2 lo utiliza tan bien como al DNA activado, la DNA pol 3 incorporó dNMPs en baja proporción en todos los moldes sintéticos (ver tabla 4). Lo anterior da evidencia de que la DNA pol 1 prefiere moldes de cadena sencilla cebados a los de doble cadena con huecos, característica presente en las DNA polimerasas replicativas.

La respuesta de las DNA polimerasas de maiz a polirA-oligodT sugiere que, las tres DNA polimerasas pueden presentar algo de actividad de transcriptasa reversa, aunque en general su actividad es mucho mayor con moldes de DNA.

	DNA POL. 1	DNA POL. 2	DNA POL. 3
PollDA-oligodT 8 mM Mg ²⁺	150	105	18
PollDA-oligodT 20 mM Mg ²⁺	56	78	18
PollDA-oligodT 0.8 mM Mn ²⁺	37	21	13
PollDA-oligodT 2 mM Mn ²⁺	35	30	35
PolrA-oligodT 8 mM Mg ²⁺	19	35	23
PolrA-oligodT 20 mM Mg ²⁺	42	28	21
PolrA-oligodT 0.8 mM Mn ²⁺	42	32	10
PolrA-oligodT 2 mM Mn ²⁺	41	24	22
DNA activado	100	100	100

Tabla 4. Porcentaje de actividad con respecto al DNA activado de las DNA polimerasas de maiz con los diferentes moldes sintéticos de cadena sencilla.

Aunque no es posible clasificar a estas DNA polimerasas dentro del esquema utilizado para la clasificación de enzimas de animales, basándose solo en la utilización de los moldes sintéticos y naturales, algunos de los resultados obtenidos son útiles para intentar una clasificación: la DNA pol 1 de maiz utiliza eficientemente el molde de pollDA-oligodT que es una característica de las DNA polimerasas tipo δ . La DNA pol 2 ya se había identificado como una DNA pol tipo α (Coello et. al., 1992).

lo que se corrobora al mostrar su actividad de primasa (Garcia, 1995) demostrada al ser capaz de utilizar el DNA circular de cadena sencilla no cebado. La DNA pol 3 tiene un comportamiento diferente y no es posible proponer mucho en cuanto a esta enzima, excepto que es la de menor actividad específica (ver gráficas 1-9), y que tiene preferencia por el DNA activado y utiliza pobremente el DNA de cadena sencilla cebado, característica que podría ser atribuida a una polimerasa tipo β .

La importancia de este trabajo es que se lograron estandarizar las condiciones para que las DNA pol 1 y 2 sean capaces de utilizar moldes de cadena sencilla. Con base en estos resultados existe la posibilidad de montar un sistema de duplicación in vitro usando como molde DNA de virus que afecten a la planta de maíz y así se logre estudiar el mecanismo de duplicación en plantas, ya que es poco conocido y estudiado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Baiza, A. M. y J. M. Vázquez-Ramos. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* Vol. 135: 581-585.
- Bewley, D. y Black, M.(1994). SEEDS. Plenum Press N.Y. and London.
- Bidwell, R. (1979). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, México.
- Castrovielo M., D. Tharaud, y S. Litvař. (1990). A low molecular weight DNA polymerase from wheat embryos. *Plant Molecular Biology* 15: 383-397.
- Coello, P., R. Rodriguez, E. Garcia, J.M. Vázquez-Ramos. (1992). A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Molecular Biology* 20: 1159-1168.
- Coello, P., E. Garcia y J. M. Vázquez-Ramos.(1994).Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase holoenzyme: identification of the polymerase catalytic subunit. *Can. J. Botany*, 72: 818-822.
- Coello, P. (1994). Purificación y caracterización de una DNA polimerasa replicativa en maiz. Estudios sobre su regulación durante la germinación. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM, México.
- Coello, P. y J.M. Vázquez-Ramos. (1995). Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *European Journal of Biochemistry* 231: 99-103.
- Deutscher, M.P. (1990). *Guide to Protein Purification*. Academic Press, Connecticut.
- Fahn, A. (1978). *Anatomía Vegetal*. H. Blume. Ediciones Madrid, España.
- García, E. (1991). Purificación parcial y caracterización de una

DNA polimerasa de ejes embrionarios de maiz presente a las 24 horas de germinación. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.

García, E. (1995). Caracterización parcial de una DNA primasa asociada a una DNA polimerasa de tipo replicativo de maiz. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

García, E., D. Orjuela, Y. Camacho, J.J. Zuñiga, J. Plascencia, J.M. Vázquez-Ramos.(1996). Comparison among DNA polymerases 1, 2 y 3 from maize embryo axes. A DNA primasa activity copurifies with DNA polymerase 2. En prensa

Kornberg, A. y T.A. Baker. (1992). DNA Replication. Second edition. W.H. Freeman Company, N.Y.

Leñinger, A., D. Nelson y M. Cox. (1993). Principles of Biochemistry. Worth Publishers N.Y.

Lewin, B. (1994). Genes V. Oxford University Press. U.K.

Litvak, S. y M. Castrovlejo.(1987). DNA polymerases from plant cells. Mutation Research 181: 81-91.

Meléndez, S. y J.M. Vázquez-Ramos. (1991). Nuclear DNA polymerase activities of germinating maize embryo axes. J. Plant Physiology 137: 581-585.

Meléndez, S., R. Ortega, S. López y J.M. Vázquez-Ramos. (1990). Estudios sobre la naturaleza y localización de la síntesis de ADN durante las etapas iniciales de la germinación de maiz. Rev. Soc. Quim. Méx. Vol. 34 No. 6.

Moñr, H., P. Schöpfer. (1995). Plant Physiology. Springer, Alemania.

Murray, B. (1984). Seed Physiology Vol. 2: Germination and reserve mobilization. Academic Press, Australia.

- Raven, P., R.F. Evert y S.E. Eichhorn. (1992). *Biology of Plants*. Worth Publisher, fifth Edition.
- Richard, M.C., S. Litvak y M. Castroviejo. (1991). DNA polymerase B from wheat embryos: A plant δ -like DNA polymerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 287: 141-150.
- Robles, S.R. (1976). *Producción de granos y forrajes*. Edit. Limusa, México.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vázquez-Ramos, J.M. y D.J. Osborne. (1986). Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-Cellulose chromatography. *Mutation Research*, 166: 39-47.
- Vázquez, A. y J.M. Vázquez-Ramos. (1988). Characteristics of the major DNA polymerases found during early and late maize germination. *Can. J. Botany* 66: 1186-1191.
- Vázquez-Ramos, J.M. (1992). Maize germination, DNA metabolism and cytokinins. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds*, Vol. 2 317-322.
- Zarain, M., I. Bernal-Lugo y J.M. Vázquez-Ramos. (1987). Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutation Research*, 181: 103-110.
- Zlatanova, J., et. al. (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Molecular Biology*, 10: 139-144.