

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

10  
2ef

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

ACTIVACION DE DNA POLIMERASAS 1 Y 2 DE MAIZ  
POR BENICILADENINA DURANTE LA  
GERMINACION

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
**EDURNE GOMEZ ROIG**

L

268445

MEXICO, D. F.

1998

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.

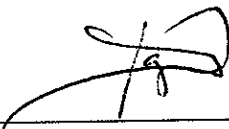
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Jorge M. Vázquez Ramos  
Vocal: Prof. Homero Hernández Montes  
Secretario: Prof. Ma. del Carmen Parra González  
1er Suplente: Prof. Marina Gavilanes Ruiz  
2º Suplente: Prof. Ma. Eugenia Torres Márquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto "E", Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica.

Asesor del Tema:



---

Dr. Jorge M. Vázquez Ramos

Supervisor Técnico:



---

M. en C. Elpidio García Ramírez

Sustentante



---

Edurne Gómez Roig

A mis papas por siempre esperar lo mejor de mi y haber aguantado paciente o impacientemente este momento.

A mi querida tía Nuri que me cuida y me quiere y que hay que ver que lata dio para que este suceso ocurriera.

A Nuri y Mario por haber sido parte vital de un proceso que comenzó en la prepa y terminará...

A mis queridos monstruos: María y Eugenio por hacer mi vida especial.

A mi hermano Isma, que aunque esté bien lejos se le quiere.

A mis abuelas que son maravillosas y fuertes mujeres.

A mi querida Camila que siempre me acompaña en los momentos de soledad.

A TODOS los personajes que han compartido sus vidas conmigo:

A mis cuates del Madrid: Pilar, Juan Manuel, Gabrielini, Sabina, Mariana, Aguilera, Juan Pablo, Héctor y Chayo que son una constante en mi vida a pesar del tiempo.

A los cuates de la Facultad: Chei, Tanya, Isa, Bernardo, Osvaldo, Rolando, Alito y Torres por haber roto la monotonía de tantas horas vividas en la Universidad.

A Augusto por esos tres maravillosos y exhaustivos años de compartir la vida.

Al fabuloso personal del "brillante laboratorio 114" y alrededores: Pilo, Mary, Faby, Maritzel, Dairo, Jose Juan, Alberto, Alma, Lahoucine, Ricardo y Rogelio simplemente por soportarme todos los ataques de histeria y porque ya convivo más con ustedes que con nadie.

A Jorge Vázquez y a Eduardo que son en gran medida responsables de que el milagro haya ocurrido.

## ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BA	Benciladenina
Butilfenil dGTP	Butilfenil desoxiguanosina trifosfato
cdks	Cinasas dependientes de ciclinas
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
DEAE-sefarosa	Dietilaminoetil-sefarosa
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
ddNTPs	Didesoxinucleósidos trifosfato
ddTTP	Didesoxitimidina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FEN-1	Endonucleasa de estructuras invertidas
kDa	Kilodalton
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mM	Milimolar
M	Molar
[metil- <sup>3</sup> H]dTTP	Desoxitimidina trifosfato marcada con tritio en el metilo
[metil- <sup>3</sup> H]dTMP	Desoxitimidina monofosfato marcada con tritio en el metilo
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NEM	N-etilmaleimida
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
pol1	DNA polimerasa 1 de maíz
pol2	DNA polimerasa 2 de maíz
polidA-oligodT	Polidesoxiadenina-oligodesoxitimidina
RF-A	Factor de replicación A
RF-C	Factor de Replicación C
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSB	Unión a cadena sencilla
SV40	Virus 40 de simio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ESTRUCTURA DE LAS SEMILLAS ANGIOSPERMAS	1
1.2 GERMINACIÓN	3
1.2.1 Bioquímica de la Germinación	3
1.2.2 Síntesis de Proteínas	4
1.2.3 Síntesis de RNA	5
1.2.4 Síntesis de DNA	6
1.3 FITORREGULADORES	6
1.3.1 Auxinas	7
1.3.2 Giberelinas	7
1.3.3 Etileno	7
1.3.4 Ácido abscísico (ABA)	8
1.3.5 Citocininas	8
1.3.5.1 Mecanismo de Acción	10
1.4 CICLO CELULAR	11
1.5 DNA POLIMERASAS DE EUCARIOTES	13
1.5.1 DNA polimerasa $\alpha$	13
1.5.2 DNA polimerasa $\delta$	14
1.5.3 DNA polimerasa $\epsilon$	15

1.6 DNA POLIMERASAS EN PLANTAS SUPERIORES	16
1.6.1 DNA polimerasa tipo $\alpha$	16
1.6.2 DNA polimerasa tipo $\delta$	17
1.7 MECANISMO DE REPLICACIÓN	17
II. ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO	22
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1 Material Biológico	28
2 Soluciones Amortiguadoras y Reactivos	28
3 Equipos	31
4 Metodologías	32
VI. RESULTADOS	37
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. REFERENCIAS	53

# I. INTRODUCCIÓN

La importancia de las semillas (como es el caso de los cereales) reside en las reservas de proteínas, almidón (azúcares) y aceites que se acumulan durante su desarrollo y maduración. Es gracias a estas reservas que se consideran productos de alto valor nutritivo y es por ello que son la base alimenticia de muchos pueblos.

El éxito en la viabilidad de una semilla depende en gran medida de factores fisiológicos y bioquímicos como: su tamaño, la permeabilidad de su testa, la asimilación de oxígeno, etc.

## 1.1 ESTRUCTURA DE LAS SEMILLAS ANGIOSPERMAS

El maíz es una planta monocotiledónea de la familia de las angiospermas. Las semillas de estas plantas se desarrollan a partir de un óvulo fecundado, que da lugar al embrión.

En el caso del maíz, el embrión está compuesto por el eje embrionario y un único cotiledón modificado al que se denomina escutelo; el escutelo se une a la parte más distal de la radícula, que es el hipocotilo. La envoltura del cotiledón se elonga y forma el coleoptilo, el cual recubre las primeras hojas (plúmula).

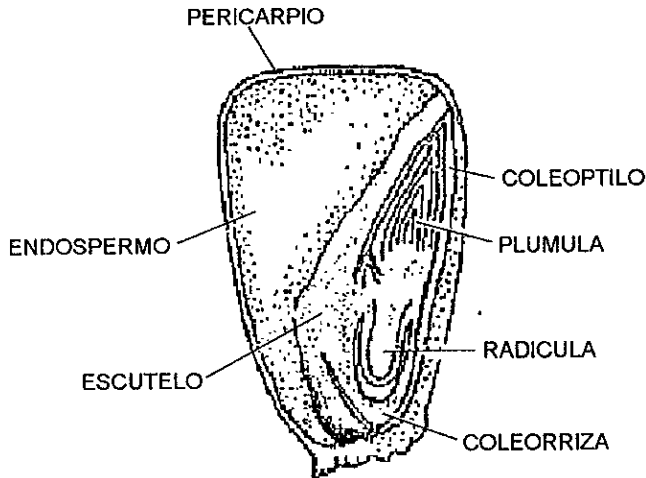
El escutelo contiene un gran porcentaje de aceites y sustancias importantes para la etapa inicial de la germinación. Sin embargo, la principal



fuente de reservas de la semilla madura es el endospermo.

En el endospermo encontramos principalmente: carbohidratos 80%, grasas y aceites 5% y proteínas 10%; en menores proporciones contiene también alcaloides, lectinas, inhibidores de proteasas y fitina. La mayor parte de las células de este tejido no son células vivas, ya que sus citoplasmas quedan ocluidos durante el desarrollo por sustancias de reserva. Sin embargo, en la parte externa del endospermo encontramos un tejido vivo que aunque no acumula muchas reservas, es el responsable de la liberación de enzimas para su movilización.

Finalmente está la testa o pericarpio que es la barrera que protege al embrión del medio exterior; generalmente se compone de una cutícula interna y otra externa impregnadas de ceras y grasas, y una o más capas de células muy compactas.



## 1.2 GERMINACIÓN

Durante la maduración, las semillas sufren un proceso de desecación en el que pierden entre 80-90% de agua y disminuyen su metabolismo prácticamente a cero. Es durante la germinación que estas semillas abandonan su estado de latencia y reanudan un metabolismo activo que las lleva a desarrollarse y formar una nueva planta.

Se pueden dar numerosas definiciones al proceso de la germinación, según sea el campo de trabajo. La definición fisiológica más aceptada es que la germinación comienza con la imbibición de la semilla y termina con el inicio de la elongación de los ejes embrionarios, lo cual se refleja con la protrusión de la radícula (Bewley y Black, 1994). En nuestro laboratorio definimos la germinación desde el punto de vista bioquímico, como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular, momento en el que termina el proceso de germinación y comienza el de desarrollo.

### 1.2.1 Bioquímica de la Germinación

La germinación puede dividirse en dos fases, la de eventos tempranos como: hidratación, producción de ATP, iniciación de síntesis de RNA total,, síntesis de proteínas y reparación del DNA; y la de eventos tardíos como: expansión celular, duplicación del DNA y movilización de reservas energéticas.

Para que una semilla germine se necesita que tenga integridad metabólica y genética. Cumpliéndose esto, generalmente sólo se requerirá de

la entrada de agua en condiciones externas adecuadas de temperatura, concentraciones de oxígeno y bióxido de carbono.

Bajo estas condiciones óptimas, se ha visto que la entrada de agua se da en tres fases:

La primera consiste en una entrada rápida que es dependiente del bajo potencial hídrico de la semilla (el metabolismo se reanuda desde estos primeros minutos).

La segunda es una entrada lenta y de mayor tiempo de duración, durante la cual ocurren importantes eventos metabólicos que preparan a las células para los posteriores eventos de la germinación.

La tercera es un incremento en la entrada de agua y se da por efecto de elongación celular, ya que la división celular puede o no ocurrir.

La duración de cada una de estas etapas depende de las propiedades de la semilla y de las condiciones ambientales externas (Bewley y Black, 1994).

El agua absorbida se distribuye diferencialmente en los tejidos de la semilla, para permitir que llegue antes o en mayor cantidad donde así se requiera.

### 1.2.2 Síntesis de Proteínas

Durante la germinación se da un aumento en la demanda de proteínas. En embriones de trigo y centeno se ha observado que la síntesis comienza dentro de los primeros 15-30 minutos de imbibición (Marcus et al., 1966; Sen y

Osborne, 1975). También se ha demostrado un incremento en el número de polisomas, así como una disminución en el número de ribosomas libres, durante los primeros minutos de la germinación (Marcus et al., 1966; Sánchez de Jiménez et al., 1981).

Aunque el metabolismo en las semillas secas es prácticamente nulo y la síntesis de proteínas no se lleva a cabo, se sabe que todos los elementos que se requieren para que esta ocurra están presentes en la semilla en cantidades suficientes y potencialmente activos: ribosomas, tRNA, factores de iniciación y elongación, aminoácidos, aminoacil-tRNA sintetasas (Simon, 1984; Bewley y Black, 1994) e incluso mRNAs (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984), de manera que la síntesis puede comenzar poco después de que los tejidos se hidratan.

### 1.2.3 Síntesis de RNA

Al menos durante las primeras horas de la germinación la síntesis *de novo* de las proteínas es independiente de la síntesis de mRNA debido a que los mensajes almacenados son los que se emplean para reiniciar la actividad. Esta síntesis proteínica se vuelve dependiente de la de mRNA de manera progresiva, conforme la cantidad de mensaje acumulado en la semilla seca se degrada y por tanto se emplean mRNAs sintetizados *de novo* (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984).

### 1.2.4 Síntesis de DNA

Se han detectado dos etapas de síntesis de DNA. Una primera etapa en tiempos tempranos de la imbibición que involucra la reparación del material genómico (Vázquez-Ramos y López, 1986; Zarán et al., 1987) y la síntesis de DNA mitocondrial, en la cual no hay un aumento de la cantidad total de DNA y otra etapa tardía, en la cual sí hay un aumento en la cantidad neta de DNA ya que es la etapa de replica del DNA (Zlatanova et al., 1987; Baiza et al., 1989).

### 1.3 FITORREGULADORES

Durante el proceso de germinación se requiere de condiciones externas propicias de temperatura, concentración de O<sub>2</sub>, cantidad de agua, minerales y luz entre otros, así como de factores internos que modulen las respuestas a los factores externos. Los principales factores internos que regulan el desarrollo de las plantas son las fitohormonas (Raven et al., 1992).

Las fitohormonas o fitorreguladores son sustancias químicas, activas en muy pequeñas cantidades y que pueden ejercer un efecto estimulante o inhibidor; la respuesta a su estímulo depende de la estructura química y de la "receptividad" del tejido (s) sobre el (los) que actúen (Raven et al., 1992).

Existen 5 tipos principales de fitohormonas que han sido ampliamente estudiadas: auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y citocininas. De estas las citocininas han sido motivo de nuestro estudio.

### 1.3.1 Auxinas

La única auxina natural que se conoce es el ácido indolacético (IAA), que se sintetiza a partir del triptofano en la punta del coleoptilo. En las plantas en desarrollo se sintetiza en la punta del tallo y en las plantas maduras en las hojas jóvenes. El IAA se transporta a través del sistema vascular de la planta hacia raíces, flores, frutos y semillas. Estimula la elongación celular debido a la liberación de conjugados gluco o ribosídicos (Cohen, 1982), la diferenciación del tejido vascular y la inducción de raíces adventicias; así mismo, ejerce efectos de inhibición sobre el florecimiento, el desarrollo de los frutos y el desprendimiento foliar, entre otros.

### 1.3.2 Giberelinas

Existen aproximadamente 78 hormonas aisladas y caracterizadas en este grupo, de las cuales la más estudiada es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Se sintetizan a partir del ácido mevalónico en los tejidos jóvenes y en las semillas en desarrollo y se transportan probablemente a través del xilema y el floema. Las giberelinas provocan la hiperelongación de los tallos estimulando tanto la elongación como la división celular. En las semillas, inducen la germinación y regulan la producción de enzimas que hidrolizan las reservas (Hill, 1977). Así mismo funcionan como factores desencadenantes del florecimiento y del desarrollo de los frutos.

### 1.3.3 Etileno

Este es el único hidrocarburo que ejerce efectos sobre las plantas. Se sintetiza a partir de la metionina, en tejidos que responden al estrés

(especialmente en maduración o envejecimiento); dada su naturaleza, se dispersa al resto de la planta por difusión. Provoca la maduración de los frutos (especialmente los climatéricos), el envejecimiento de hojas y flores y la caída de éstas últimas así como la de los frutos maduros.

#### 1.3.4 Ácido abscísico (ABA)

Este compuesto se sintetiza a partir del ácido mevalónico en las hojas maduras especialmente en respuesta al estrés hídrico. Es transportado a través del floema y se ha demostrado que en las plantas provoca el cierre de los estomas, mientras que en las semillas provoca inducción de síntesis de proteínas de reserva, inducción de la dormancia (Koorneef et al., 1984) y también detiene el crecimiento del embrión. Se le ha denominado como un modulador negativo de la germinación.

#### 1.3.5 Citocininas

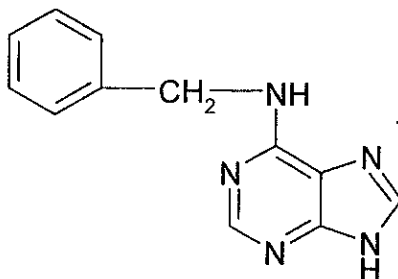
Es el grupo menos conocido en cuanto a su efecto. Se trata de compuestos N6 derivados de la adenina.

La primera noción de estos compuestos se tuvo en 1941, cuando Van Overbeek observó que la leche de coco estimulaba el desarrollo de embriones de plantas y la división celular en tejidos. Posteriormente, Miller y Skoog aislaron uno de estos compuestos a partir de productos de la hidrólisis del DNA, al que llamaron cinetina. Se producen en la punta de las raíces y se transportan por el xilema hasta los retoños. Se han descrito como estimulantes de la germinación de semillas (Van Staden, 1983).

Las citocininas ejercen efectos a nivel metabólico y en consecuencia también a nivel fisiológico. Promueven la división y diferenciación en cultivos de tejidos vegetales al incrementar el ritmo de la mitosis y retrasar el envejecimiento de las hojas, como consecuencia del incremento en la cantidad total de proteínas y particularmente la actividad específica de algunas enzimas como: endopeptidasas, pirofosfatasa, fosfoenol piruvato carboxilasa, RNA polimerasa (Kulaeva, 1981) y DNA polimerasas (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990)..

En el maíz se encontró una citocinina a la que se denominó zeatina, esta es la hormona aislada más activa de este grupo.

La benciladenina (BA) o 6-bencilaminopurina empleada en los experimentos del presente trabajo es un fitorregulador sintético que pertenece a este grupo.





### 1.3.5.1 Mecanismo de Acción

Aunque se han realizado múltiples estudios sobre el modo en que las citocininas ejercen sus efectos, aún no se han obtenido resultados concluyentes de estos mecanismos.

Experimentos en los que se han empleado inhibidores de la transcripción y de la traducción, demuestran que estas moléculas suprimen la síntesis de DNA estimulada por BA, por lo que la transcripción y la traducción parecen estar implicados como parte del mecanismo por el cual esta hormona estimula la replicación del DNA (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).

Otros estudios han sugerido que las citocininas participan en la síntesis de proteínas a nivel de traducción, dado que se les ha encontrado asociadas a los t-RNA cerca del anticodón (Thomas, 1977; Hill, 1977).

Por otra parte también se ha sugerido que los efectos de estas fitohormonas puedan deberse a sistemas de transducción de señales de dos componentes: una proteína His-cinasa (HPK) que posee un dominio sensor y otro transmisor con actividad de cinasa y otra proteína reguladora de la respuesta (RR) que posee además de un dominio receptor, un dominio efector. La transducción de señales ocurre mediante el siguiente mecanismo: el módulo receptor de la HPK recibe la señal y la transduce a su dominio traductor, el cual se autofosforila en una histidina y posteriormente transfiere el fosfato a un residuo de aspártico (muy conservado) en la RR; esta proteína se activa y su dominio efector funge como factor promotor de la transcripción de genes (en la mayoría de los procariotes), o bien como activador de otro sistema de transducción como el de cinasas de proteínas activadoras de mitógenos (MAPK) (en el caso de eucariotes inferiores y plantas superiores).

En el maíz se ha reportado un gen de una proteína RR que se induce por concentraciones nanomolares de t-zeatina y que puede estar involucrado en la señalización por nitrógeno (Sakakibara et al., 1998)

#### 1.4 CICLO CELULAR

El ciclo celular tiene como fin la división de una célula para originar dos células hijas que serán genéticamente idénticas a la progenitora, para lo cual el material genético debe duplicarse.

Basados en el ciclo cromosómico de los eucariotes, se ha dividido al ciclo celular en un estadio inicial de latencia denominado G<sub>0</sub> y cuatro etapas o fases subsiguientes:

G<sub>1</sub> es el periodo que precede a la síntesis replicativa del DNA.

S es el lapso de tiempo en que se duplica el material genético.

G<sub>2</sub> es el lapso en que la célula se prepara para dividirse.

M corresponde a la mitosis.

Las fases S y M ocupan una fracción constante de tiempo del ciclo celular, aproximadamente 4 y 2 horas respectivamente en cultivos sincrónicos ya que la duración del ciclo completo es de 10-12 horas (Verma y Linn, 1979); por lo tanto si el ciclo se acorta o alarga se debe al tiempo que toman las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Tanto la fase G<sub>1</sub> como la G<sub>2</sub> tienen puntos de control regulados por cinasas dependientes de ciclinas (cdks), es decir, cinasas que se unen a proteínas cuya concentración fluctúa durante el ciclo celular y que por lo

tanto se denominan ciclinas. Dichos complejos funcionan para el reconocimiento del estado metabólico general de la célula, así como de la integridad del material genético antes y después de la replicación; además, son importantes en la prevención de la re-replicación genómica antes de que ocurra la división celular.

En G<sub>1</sub> encontramos el punto de restricción más importante (R), el cual separa los eventos de esta fase en tempranos y tardíos, marcando el límite después del cual la célula queda comprometida a completar el ciclo hasta dividirse, sin que esto dependa ya de factores externos.

Para que R pueda ser superado y el ciclo celular avance, se requiere la intervención de complejos ciclinas/cdks;. Existen diferentes complejos ciclinas/cdks, que actúan en la regulación de las fases del ciclo celular; su aparición y desaparición controla, a través de la fosforilación de otros factores, la transcripción y traducción de genes que codifican para proteínas de importancia en la replicación del DNA.

En semillas de maíz se ha encontrado que la mayor parte de las células se encuentran detenidas en G<sub>1</sub> y sólo un pequeño porcentaje lo están en G<sub>2</sub> (Deltour y Jacquard, 1974). Las células en G<sub>2</sub> progresan hacia la mitosis, mientras que las que están en G<sub>1</sub> deben pasar por todos estos controles y revisiones del estado metabólico antes de decidir si se avanza a la división o se dirigen a otro estado celular (quiescencia, diferenciación o meiosis).

## 1.5 DNA POLIMERASAS DE EUCARIOTES

Existen al menos cuatro DNA polimerasas nucleares en las células eucariotes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . No hay duda de que las polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$  participan en la replicación del DNA; la polimerasa  $\epsilon$ , que se parece a la polimerasa  $\delta$  y es esencial en levaduras para la replicación, se relaciona además con funciones de reparación en los mamíferos, mientras que la polimerasa  $\beta$ , que es la más pequeña de este tipo de enzimas, está asociada fuertemente a la reparación. Existe una DNA polimerasa  $\gamma$  que se ubica en mitocondria y se relaciona con la replicación del DNA (Kornberg y Baker, 1992).

### 1.5.1 DNA polimerasa $\alpha$

Esta enzima se localiza en el núcleo y participa durante la replicación del DNA. Presenta actividad de primasa y carece de actividad 3'-5' exonucleasa. Está conformada por cuatro subunidades: una de 170 kDa que es el centro catalítico; contiene en su extremo carboxilo dos regiones con residuos de aminoácidos involucrados en la unión al dNTP y varios dedos de zinc para su unión con el DNA (Kornberg y Baker, 1992); una proteína de 70-75 kDa que, en el caso de humano, interactúa con el antígeno T del SV40 para ubicar a la enzima en el origen de replicación y mantener la estabilidad de la holoenzima (Collins et al., 1993) y dos péptidos de 50 y 60 kDa que contienen la actividad de primasa (Santocanale et al., 1993; Cottteril et al., 1987).

La DNA pol  $\alpha$  es una enzima no procesiva (procesividad: se refiere al número de nucleótidos incorporados en un solo evento de unión al DNA, una

enzima procesiva incorpora mas de 200 nucleótidos por evento de unión al DNA (Kornberg y Baker, 1992)) y por ello participa principalmente en la síntesis de cebadores cortos de RNA para la síntesis de la cadena continua y de los fragmentos de Okazaki (Bullock et al., 1991; Nethanel y Kaufman, 1990). Esta enzima es inducida de manera ciclo celular dependiente; en mamíferos, se regula por fosforilación (Wong et al., 1986). Se ha determinado que es sensible a afidicolina y butilfenil dGTP, pero no a los ddNTPs (Kornberg y Baker, 1992).

### 1.5.2 DNA polimerasa $\delta$

Se ubica en núcleo y diversos estudios han comprobado que es la enzima más importante para la replicación, ya que lleva a cabo la mayor parte de ella (Budd y Campbell, 1993; Boulet et al., 1989). Además de su actividad de polimerasa, posee actividad 3'-5' exonucleasa (Simon et al., 1991). Estructuralmente es más sencilla que la pol  $\alpha$ , consta solamente de dos subunidades: la catalítica de 125 kDa, que comprende ambas actividades y otra de 50 kDa de función desconocida (Lee et al., 1984; Boulet et al., 1989)

Esta enzima pasa de ser una DNA polimerasa distributiva a ser altamente procesiva cuando se une a otra proteína de 37 kDa denominada antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Tan et al., 1986). Ambas proteínas son inducidas durante el ciclo celular. En levaduras, la subunidad catalítica es suficiente para unir a PCNA (Brown y Campbell, 1993); sin embargo, en ratones se requiere de la intervención de las dos subunidades para dicha unión (Goulian, et al., 1990). Tanto DNA pol  $\delta$  como PCNA son

proteínas altamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva (Wang, 1991).

La DNA pol  $\delta$  tiene preferencia por moldes sintéticos de poli dA- oligo dT, debido seguramente a su muy elevada procesividad. Esta enzima (como la pol  $\alpha$ ) también es sensible a afidicolina; sin embargo, lo es solo ligeramente a butilfenil dGTP e insensible a los ddNTPs. Es inhibida por N-etilmaleimida (NEM) (Kornberg y Baker, 1992).

### 1.5.3 DNA polimerasa $\epsilon$

Se ha observado que esta DNA polimerasa está relacionada con la síntesis reparativa de DNA dañado por radiación UV en células HeLa (Nishida et al., 1988), pero también se le ha asociado a procesos replicativos (Wang et al., 1993).

En humanos, está formada por dos subunidades, una de 215 kDa aproximadamente y otra de 55 kDa (Syvaaja y Linn, 1989; Kesti et al., 1993). Además de su carácter de DNA polimerasa, la que reside en el extremo amino terminal de la subunidad mayor, se ha encontrado en levaduras que la proteína posee en el extremo carboxilo una propiedad sensora de la replicación del DNA (en la fase S del ciclo celular), transmitiendo señales de inhibición en caso de que este proceso haya sido inadecuado (Navas et al., 1995).

Es una enzima muy relacionada con la pol  $\delta$ ; sin embargo, ésta es capaz de sintetizar procesivamente sobre el molde de poli dA-oligo dT en forma independiente de PCNA como se ha visto para las enzimas aisladas de timo de ternera (Wahl et al., 1986) y de médula ósea de conejo (Goscin y Byrnes,

1982) entre otras. Por otra parte, es funcional en altas concentraciones de sales y  $Mg^{2+}$ , características que permiten diferenciarla mejor de la pol  $\delta$  que el empleo de inhibidores como afidicolina, butilfenil dGTP o carbonildifosfonato que no dan diferencias definitivas entre ambas (Bambara y Jessee, 1991).

## 1.6 DNA POLIMERASAS EN PLANTAS SUPERIORES

Se han encontrado distintas DNA polimerasas en vegetales que se han clasificado de acuerdo con la nomenclatura antes mencionada para células animales y eucariontes inferiores.

### 1.6.1 DNA polimerasa tipo $\alpha$

Desde los inicios de la década pasada se han reportado varias DNA polimerasas en plantas, con características muy similares a las de pol  $\alpha$  de eucariontes; pero de todas ellas las más estudiadas han sido la de trigo, maíz y chícharo, observándose un incremento de su actividad en los tejidos en proliferación.

Se ha purificado la enzima de trigo, encontrándose que está compuesta por cuatro subunidades de los siguientes pesos: 104, 79, 60 y 25 kDa (Balmukhanov et al., 1992). El grupo de Castroviejo (1979) encontró, también en trigo, una DNA pol tipo  $\alpha$  (considerada en principio tipo  $\gamma$ ) que copurifica con una actividad de primasa (Graveline et al., 1984). Tanto la actividad de primasa como la de polimerasa se incrementan durante la germinación, coincidiendo el tiempo en que se alcanza el máximo de esta actividad con el

tiempo en que se tienen los niveles óptimos de síntesis de DNA (Benedetto et al., 1996).

Una DNA pol tipo  $\alpha$  ha sido reportada en maíz y caracterizada ampliamente (Coello et al., 1992,1994; Coello y Vázquez-Ramos, 1995; García et al., 1997). De esta se hablará con más detalle en los antecedentes.

### 1.6.2 DNA polimerasa tipo $\delta$

La primera DNA polimerasa tipo  $\delta$  que se ha reportado fue hallada en trigo. Se clasificó dentro de esta categoría con base en el efecto de inhibidores y debido a la presencia de una actividad 3'-5' exonucleasa asociada a la de polimerasa (Richard et al., 1991). Por otro lado, estudios posteriores han demostrado que la adición de PCNA de timo de ternera incrementa su procesividad, lo que apoya la hipótesis de que se trata de una DNA pol tipo  $\delta$  (Laquel et al., 1993).

En maíz se ha encontrado una DNA polimerasa que tiene asociada una actividad 3'-5' exonucleasa y que reporta un incremento en su procesividad al ponerlo en contacto con PCNA homóloga (Orjuela et al., datos no publicados).

## 1.7 MECANISMO DE REPLICACIÓN

La replicación del DNA se da en un ensamblaje supramolecular llamado "Replisoma", que involucra la acción coordinada de múltiples y variadas enzimas, entre las que se encuentran las helicasas, las proteínas que forman



el primosoma, las proteínas de unión a cadena sencilla (SSB) en *E. coli* o la proteína de replicación A (RP-A) en eucariotes y las holoenzimas de las polimerasas.

La iniciación de la síntesis del DNA se da cuando ciertos factores proteínicos como DnaA de *E. coli* u ORC de levaduras reconocen secuencias específicas en el genoma denominados orígenes de replicación, los cuales contienen regiones ricas en pirimidinas que son identificadas específicamente por proteínas iniciadoras de la apertura de la doble hélice, formándose el complejo iniciador. En los sistemas eucariotas existen numerosos orígenes a lo largo del DNA en donde se forman replicones de entre 20 y 300 Kb de tamaño. Una vez que ocurre esa unión de las proteínas a los orígenes de replicación, comienza a formarse la burbuja de replicación. La helicasa es entonces introducida a esta burbuja por acción de proteínas accesorias dependientes de ATP y por interacciones con el complejo iniciador. Es la helicasa quien separa las dos hebras del DNA empleando la energía de la hidrólisis de los nucleósidos trifosfato, permitiendo la acción de la DNA primasa para sintetizar una secuencia de aproximadamente 10 ribonucleótidos en cada lado de la burbuja, que sirven como cebadores para la posterior síntesis del DNA. Este acontecimiento da lugar a la formación de la horquilla de replicación (Kornberg y Baker, 1992).

En la apertura de la doble hélice participan también las proteínas SSB o RP-A que al unirse entre ellas y alinearse con el DNA de cadena sencilla logran extenderlo y dejar expuestas las bases para la polimerización. RP-A estimula la actividad de las polimerasas  $\delta$  o  $\epsilon$  (Kenny et al., 1989).

La replicación del DNA se lleva a cabo en ambas hebras a partir del extremo 5' hacia el 3'; dado que estas hebras son antiparalelas, la síntesis ocurre de manera asimétrica. En una de las hebras, la principal o adelantada, la síntesis sucede de manera continua y precede a la de la otra hebra la cual se sintetiza de manera discontinua dando lugar a los fragmentos de Okazaki (100-200 nucleótidos en eucariotes y 1000-2000 en procarariotes), llamándosele cadena retrasada (Kornberg y Baker, 1989). Sin embargo, estudios en el sistema de replicación del bacteriófago T4 han mostrado que la síntesis de ambas hebras esta coordinada y es controlada por interacciones directas entre las maquinarias replicativas de las dos cadenas, lo que puede darse gracias a la formación de un anillo en la cadena retrasada; de este modo, ambas hebras pueden ser sintetizadas en la misma dirección (Sinha et al., 1980).

En el sistema de replicación del virus 40 de simio (SV40) se ha demostrado que la extensión puede darse una vez que el cebador es inhibido por la unión de la proteína de replicación C (RP-C); PCNA seguido de la polimerasa  $\delta$  se unen a la horquilla de replicación por acción del factor de replicación A (RF-A) (Tsurimoto et al., 1990, 1991; Bullock et al., 1991).

La síntesis comienza a partir del cebador de ribonucleótidos. En la cadena continua, la DNA polimerasa  $\alpha$  reconoce el extremo 3' OH libre del último ribonucleótido y lleva a cabo la síntesis de un tramo de 20-25 desoxirribonucleótidos; posteriormente DNA polimerasa  $\delta$  reconoce estos últimos como iniciador y realiza la elongación continua de la cadena adelantada. En cambio, para la cadena retrasada se establece un ciclo entre polimerasa  $\alpha$  y polimerasa  $\delta$  que genera los fragmentos de Okazaki (Tsurimoto y Stillman., 1991). La energía motriz de la replicación es la hidrólisis del

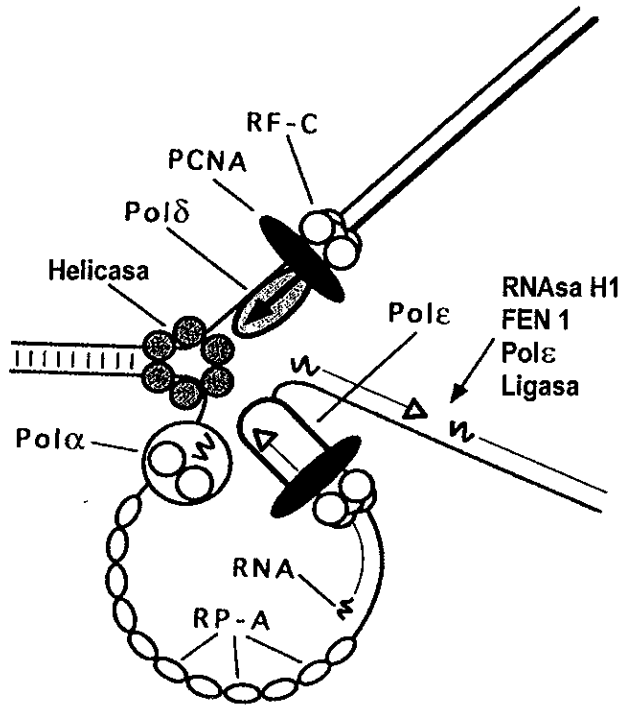
pirofosfato, el cual se libera al enlazar los desoxirribonucleósidos trifosfato entrantes; una vez que dicha molécula es hidrolizada, la reacción se hace irreversible.

La capacidad correctiva 3'-5' exonucleasa de la DNA polimerasa  $\delta$  es lo que sustenta la alta fidelidad y bajísima tasa de error en el copiado del DNA. Cuando dos nucleótidos quedan mal apareados no puede formarse el iniciador activado para continuar la síntesis; en ese momento ocurre el cambio de función de la polimerasa  $\delta$  a su actividad 3'-5' exonucleasa, removiendo un tramo de la parte recién sintetizada para eliminar a los nucleótidos mal apareados y volver a regenerar el extremo 3'-OH libre (Blowet al., 1996).

Para que se dé la maduración de las cadenas recién sintetizadas se requiere de la participación de otras enzimas: unas que remueven el cebador de RNA, otras que sintetizan con desoxirribonucleótidos el espacio resultante y finalmente unas que "sellan" los dos tramos. En SV40 se ha visto que tanto en la degradación del cebador de la cadena continua como en la maduración de los fragmentos de Okazaki, intervienen la RNasa H1, polimerasa  $\delta$  o polimerasa  $\epsilon$ , la nucleasa FEN-1 y la DNA ligasa (Waga y Stillman., 1994).

La RNasa H1 hace una ruptura endonucleolítica estructura-específica en el cebador de RNA, liberándolo de forma intacta pero dejando un ribonucleótido en el extremo 5' que se une con la cadena de DNA recién sintetizada (Huang et al., 1994); posteriormente las DNA polimerasas  $\delta$  o  $\epsilon$  rellena el hueco dejado por la Rnasa H1 (Waga y Stillman, 1994). La nucleasa FEN-1 es una exonucleasa 5'-3' que en asociación con alguna de las polimerasas anteriores hacen el cambio del ribonucleótido por un

desoxirribonucleótido. Finalmente la DNA ligasa 1, que es específica para esta reacción, sella la unión entre los desoxirribonucleótidos.



Las enzimas de suma importancia en el proceso de replicación son las DNA topoisomerasas que intervienen para que la apertura de la doble hélice no ocasione un superenrollamiento cromosómico. Estas enzimas actúan uniéndose covalentemente al extremo 5' de una de las cadenas produciendo una ruptura momentánea reversible, que permite que la hélice gire sobre el enlace fosfodiéster de la cadena no rota, recuperándose la estructura normal (Blow et al., 1996).

## II. ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO

Mediante una separación cromatográfica en DEAE-celulosa de extractos proteínicos de ejes embrionarios de maíz, se han encontrado tres actividades de DNA polimerasa, que se han designado como pol1, 2 y 3 según su orden de elución (Coello et al.,1992).

La DNA pol1 ha sido purificada cerca de 5000 veces a través de varios pasos cromatográficos (Coello et al.,1992). Presenta un peso molecular muy elevado en condiciones nativas. Es estimulada con concentraciones de NaCl que inhiben a las otras dos (50-100 mM), no es estimulada por  $K^+$  y es dependiente de  $Mg^{2+}$  para su función. Presenta un patrón de inhibición característico de las enzimas replicativas: sensible a NEM y afidicolina y ligeramente sensible a ddTTP; además, tiene preferencia por el uso del molde sintético polidA-oligodT (García et al., 1997). Experimentos posteriores mostraron que su actividad se incrementaba en presencia de PCNA homólogo, lo cual da gran evidencia de que se trata de una polimerasa tipo  $\delta$ . Se ha encontrado que tiene asociada una actividad 3'-5' exonucleasa, característica también de la pol tipo  $\delta$ .

La DNA pol2 se ha purificado casi 8000 veces mediante el uso de los mismos pasos cromatográficos que para pol1 (García et al., 1997). Esta ha sido la más estudiada de las tres actividades. Requiere  $Mg^{2+}$  y se estimula por concentraciones 100mM de  $K^+$ . Presenta al igual que pol1 patrones de inhibición típicos de polimerasas replicativas. Experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo heterólogo anti polimerasa  $\alpha$  mostraron una disminución del 70% en la actividad de DNA polimerasa

(Coello et al., 1992). Posteriormente se desarrolló un anticuerpo homólogo con el cual se reconocieron una subunidad de 90 kDa que posee la actividad catalítica y otros polipéptidos de menores tamaños: 83, 70, 60, 55, 45, y 24 kDa que parecen ser polipéptidos que forman parte de la holoenzima, aunque no se descarta que pudieran ser productos de degradación (Coello et al., 1994). Otros datos mostraron que esta enzima copurifica con una actividad de primasa (García et al., 1997). Estos experimentos dieron datos concluyentes acerca de la naturaleza tipo  $\alpha$  de esta enzima.

La actividad específica de la DNA pol2 se incrementa hasta 100 veces durante la germinación, a diferencia de las otras dos enzimas cuya actividad permanece sin cambio. Se ha visto que este incremento no se debe a su síntesis *de novo* (Coello et al., 1992) y dado que varias DNA polimerasas tipo  $\alpha$  sufren modificaciones postraduccionales por fosforilación, se han realizado experimentos de fosforilación *in vivo* con fosfato radiactivo, obteniendo como resultado que las subunidades de 90, 70, 55 y 45 kDa que componen esta enzima presentan un patrón de fosforilación que varía de manera cíclica (Coello y Vázquez-Ramos, 1995).

El patrón de fosforilación de la pol2 que pareciera ciclo celular dependiente, mostró los niveles más altos entre las 11-14 y 45-48 horas de germinación. El fósforo incorporado entre 11-14 horas permanece estable al menos hasta las 24 horas, que es el periodo en el que ocurre la síntesis del DNA. Posteriormente debe ocurrir una defosforilación y la enzima vuelve a fosforilarse hacia las 45 horas. Sin embargo, estos resultados no correlacionaron con la variación de la actividad de la enzima, por lo que no se pudo asegurar

cual sea el papel de la fosforilación *in vivo* durante la germinación del maíz (Coello y Vázquez-Ramos, 1995).

Los fitorreguladores juegan papeles fundamentales en la regulación del ciclo de vida de las plantas. Se ha demostrado que la benciladenina (BA), fitohormona sintética perteneciente al grupo de las citocininas, incrementa la síntesis total de DNA (Galli, 1984). Esta síntesis es reparativa durante las primeras horas de la germinación, como se ha visto en ejes de maíz  $\gamma$ -irradiados (Zaraín et al., 1987); sin embargo, BA también promueve el inicio de la replicación mucho tiempo antes de que ocurra en los ejes control (Reyes et al., 1991). En estos mismos estudios se observó que BA produjo un aumento de entre 15-20% en la actividad de DNA polimerasa (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).

En experimentos con inhibidores de la transcripción ( $\alpha$ -amanitina) y de la traducción (cicloheximida), se determinó que la estimulación de transcripción y/o traducción es parte del mecanismo por el cual BA estimula la síntesis del DNA; sin embargo, no se encontró que ocurra síntesis *de novo* de las DNA polimerasas (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).

En estudios sobre el efecto de BA en la replicación del DNA se observaron incrementos mayores al 50% con respecto al control, con un máximo de síntesis a las 6 horas y otro a las 12 horas (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990; Zaraín et al., 1987).

En ejes control la primera ronda de replicación del DNA comienza entre las 12-15 horas de germinación finalizando hacia las 24 horas, dada la asincronía de las células en los tejidos meristemáticos (Vázquez y López, 1986; Baiza et

al., 1989; Georgieva et al., 1994), sin embargo, en los ejes tratados con el fitorregulador la replicación empieza antes de las 6 horas de germinación y para las 15 horas el contenido de material genético se ha duplicado, sugiriendo esto que las células se encuentran en fase G<sub>2</sub>. También se observó que hacia las 24 horas de germinación existe un incremento de más de tres veces en el índice de figuras mitóticas en los ejes tratados con BA en comparación con ejes control (Reyes et al., 1991).

BA provoca un incremento en la actividad de DNA polimerasa nuclear y por lo tanto en la síntesis de DNA tanto de tipo reparativo como de tipo replicativo, lo que resulta en la iniciación más temprana de los eventos del ciclo celular (Reyes et al., 1991; Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).



### III. HIPÓTESIS

El adelanto de los eventos del ciclo celular en maíz causado por benciladenina se debe, al menos en parte, a una estimulación de la actividad de las DNA polimerasas replicativas (pol1 y pol2), lo que acelera la entrada a la fase S del ciclo celular.

#### IV. OBJETIVOS

-Purificar parcialmente las DNA polimerasas 1 y 2 de maíz a través de cromatografía en DEAE-sefarosa.

-Comparar la actividad específica de las DNA polimerasas 1 y 2 en ejes tratados con benciladenina e incubados por diferentes tiempos, en relación a sus respectivos controles.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 1 Material Biológico:

Semillas de maíz variedad chalqueño obtenidas de un proveedor del Valle de Chalco, Edo de México.

Para el estudio se empleó el eje embrionario, que se obtuvo por disección manual y se almacenó a 4°C por menos de tres días antes de su utilización. Para cada tiempo y tratamiento se emplearon 0.2 g de ejes aproximadamente.

### 2 Soluciones Amortiguadoras y Reactivos:

#### 2.1- Solución amortiguadora para activación de DNA

Tris-HCl pH 7.4	10 mM
Cloruro de magnesio	50mM
Albúmina Sérica Bovina (Sigma)	0.5mg/mL

#### 2.2- Solución amortiguadora de imbibición

Tris-HCl pH 7.4	50mM
Cloruro de potasio	50mM
Acetato de magnesio	10mM
Sacarosa	2%

#### 2.3- Soluciones para los tratamientos de los ejes

##### 2.3.1- Solución de Benciladenina

6-bencilaminopurina (Sigma)	1µM
Hidróxido de sodio	4mM

### 2.3.2- Solución control de Benciladenina

Igual que la 2.3.1, pero sin la Benciladenina.

### 2.4- Solución amortiguadora para homogeneizado de ejes embrionarios 1

SDS	50mM
EDTA trisódico pH 7.5	100mM
Cloruro de sodio	1.5mM

### 2.5- Solución amortiguadora para homogeneizado de ejes embrionarios 2

Tris-HCl pH 7.6	40mM
Cloruro de potasio	15mM
Acetato de magnesio	1mM
Sacarosa	0.25mM
2-mercaptoetanol	1mM

Por cada 50mL de solución se adiciona una tableta de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim): Aprotinina, Bestatina, Quimiostatina, E-64, Leupeptina, Pefabloc SC, Fosforamidón, Pepstatina, Dihidrocloruro de antipaina.

### 2.6- Soluciones amortiguadoras empleadas en la purificación de las DNA polimerasas:

#### 2.6.1- Solución amortiguadora A

Solución de fosfatos pH 7	40mM
EDTA trisódico	1mM
Glicerol	20%
2-mercaptoetanol	1mM

### 2.6.2- Solución amortiguadora B

Igual que la 2.6.1, excepto que la concentración de fosfatos es 400mM

### 2.7- Mezcla de Reacción para el ensayo de actividad de DNA polimerasas

Tris-HCl pH7.6	50mM
Cloruro de potasio	15mM
Acetato de sodio	8mM
Glicerol	5%
2-mercaptoetanol	0.4mM
DNA activado	100µg/mL
ATP (Sigma)	1mM
dATP (Sigma)	0.1mM
dGTP (Sigma)	0.1mM
dCTP (Sigma)	0.1mM
(metil- <sup>3</sup> H) dTTP (57Ci/mmol Amersham)	5µCi/mL

### 2.8- Líquido de centelleo

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

### 2.9- Reactivo de Bradford

Azul brillante de Coomasie G (Sigma)	0.5g
Ácido perclórico 70%	51.8mL
Agua desionizada c.b.p.	1L

Otras soluciones empleadas:

- Ácido tricloroacético (TCA) al 10%
- Ácido tricloroacético (TCA) al 2%
- Etanol 96%
- Citrato de sodio 1%
- Hipoclorito de sodio 0.5%

3 Equipos:

- 3.1-Incubadora 41900 (Thermolyne)
- 3.2-Homogeinizador PCU 2 (Polytron)
- 3.3-Microcentrífuga SORVALL MC 12V (Dupont)
- 3.4-Ultracentrífuga TL-100 (Beckman)
- 3.5-Columna Prempacada de 1mL de DEAE-sepharose fast flow (Pharmacia)
- 3.6-Equipo FPLC Pump P-500 (Pharmacia LKB)
- 3.7-Baño con agitación Polystat (Cole Parmer)
- 3.8-Filtros de Fibra de Vidrio GF/C (Whatman)
- 3.9-Equipo de filtración al vacío (Millipore)
- 3.10-Contador de Centelleo LS 6000IC (Beckman)
- 3.11-Espectrofotómetro Ultrospec III (Pharmacia LKB)

#### 4 Metodologías:

##### Prueba de Actividad Estimulante de Benciladenina

Esta prueba se hizo por triplicado tanto para los ejes control como para los ejes tratados con BA para determinar si la solución de la citocinina a emplear en los experimentos de actividad era capaz de estimular la proliferación celular. Se incubaron a 25°C (3.1) 10 ejes por caja Petri con 100µL de solución de imbibición (2.2) y 20 µCi/mL de [<sup>3</sup>H] timidina durante 6 horas, donde se detecta el primer pico de síntesis de DNA.

Después de transcurrido el tiempo de incubación se lavaron los ejes con citrato al 1%, y se homogeneizaron con 1.2mL de solución amortiguadora para homogeneizado de ejes embrionarios 1 (2.4) en un homogeneizador (3.2) a máxima velocidad. Se le adicionó TCA al 10% para precipitar los ácidos nucleicos, dejándolos durante una hora en baño de hielo.

El homogeneizado se agitó y se filtró al vacío (3.9) a través de filtros de fibra de vidrio (3.8), lavando el tubo 2 veces con TCA al 2% y posteriormente con etanol 96%.

Para secar los filtros se colocaron en una estufa a 54°C y finalmente se transfirieron a frascos viales con 2.5mL de líquido de centelleo (2.8) y se leyó la cantidad de marca incorporada en un contador de centelleo (3.10).

##### Preparación de la Resina

Se empleó una columna de un mL con resina de DEAE-sefarosa (3.5). Todos los lavados se realizaron en el FPLC (3.6). Primeramente, se observó que la hidratación de la resina fuera correcta. Posteriormente se hizo pasar un volumen de cama (1 mL) de una solución de NaOH 1M, lavando inmediatamente con agua desionizada para evitar la hidrólisis de la matriz. Se

equilibró la columna con cinco volúmenes de cama de una solución de Tris-HCl 20mM pH 7.6.

Comercialmente se establece que la columna tiene capacidad para 110mg de albúmina sérica humana (HSA) por mL de gel, pero para cerciorarse se hicieron pasar 5mL de una solución de albúmina sérica humana (BSA) 50mg, Tris-HCl 20mM y NaCl 10mM. La cantidad de albúmina no debe exceder el 50% de la capacidad teórica. El primer eluato colectado se leyó a 280nm (3.11) para verificar que no diera lectura, ya que la proteína debía estar retenida en la matriz. Posteriormente se lavó la columna con solución de NaCl 2M, con lo cual se asegura que toda la proteína retenida sea liberada, regenerándose la capacidad total de la columna. Con esto se garantiza que la resina este funcionando adecuadamente. Finalmente la columna se lavó con etanol al 20% y se guardó así para evitar el desarrollo bacteriano.

Todas las soluciones fueron filtradas a través de un poro de tamaño 0.20 $\mu$  para evitar la obstrucción de la columna.

#### Activación de DNA

Se pesaron 0.5mg de DNA de timo de ternera (Sigma) y se disolvieron en 1mL de solución amortiguadora para activación de DNA (2.1); para esto se dejó en agitación suave a 4°C toda la noche. La disolución anterior se hizo reaccionar con 1 $\mu$ g de DNasa I (Sigma), la mezcla se incubó a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos y posteriormente se desnaturalizó la DNasa I calentando 5 minutos a 77°C. Esta solución se guardó a 4°C hasta su utilización.



### Imbibición de los ejes embrionarios

Se lavaron ambos lotes de ejes (control y tratados con BA) con solución de hipoclorito de sodio al 0.5% para desinfectarlos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito.

Se tomaron 10 $\mu$ L de solución de BA 10<sup>-3</sup>M (2.3.1) y se llevaron a 10mL con solución amortiguadora de imbibición (2.2) para obtener una concentración 10<sup>-6</sup>M. Lo mismo se hizo con la solución control de BA (2.3.2).

Los ejes fueron distribuidos homogéneamente en cajas de Petri grandes con un filtro Whatman #1 ó #2, a cada lote se le adicionó la solución 10<sup>-6</sup>M correspondiente (control o BA). Los lotes de ejes fueron incubados a 25°C (3.1) por los tiempos correspondientes, 6 ó 20 horas. Las cajas que se incubaron por 20 horas se rodearon con Parafilm para evitar la desecación de los ejes. Todo el material empleado fue esterilizado previamente y se trabajó en una campana de flujo laminar.

### Obtención del Extracto Proteico

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C y en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas para evitar la degradación proteica.

A cada lote de ejes se le adicionó un volúmen suficiente de solución amortiguadora para homogenado de ejes embrionarios 2 (2.5) para cubrir los ejes imbibidos. La homogeneización se hizo en el polytrón durante 30 segundos a máxima velocidad (2 veces). Posteriormente se hizo una centrifugación (3.3) a 10,500g durante 15 min, el sobrenadante se extrajo con una jeringa de 5mL con aguja #21 inclinando el tubo para no arrastrar lípidos ni restos de la pastilla. Este sobrenadante se centrifugó (3.4) a 130,000g durante 1 hora, el sobrenadante se volvió a extraer de la misma forma que en el paso anterior y finalmente se filtró a través de una jeringa Life Technologies con

filtro de acetato con un poro de  $0.45\mu$  y dos capas extra de filtro Whatman del #1 ó #2 para eliminar cualquier partícula que pudiera tapar la columna cromatográfica.

#### Purificación de las DNA polimerasas

Se lavó la columna de DEAE-sefarosa con 10 volúmenes de cama de la solución amortiguadora A (2.6.1). El extracto proteínico obtenido en el paso anterior se hizo pasar a través de la columna a un flujo de  $0.5\text{mL}/\text{minuto}$ ; una vez cargado el extracto se lavó la columna con 5 volúmenes de cama de la solución amortiguadora A para eluir las proteínas unidas inespecíficamente. Posteriormente se eluyeron las proteínas retenidas con un gradiente de fosfatos de  $40\text{-}400\text{mM}$  con las soluciones amortiguadoras A y B (2.6.1 y 2.6.2 respectivamente) y finalmente se dio un lavado con 10 volúmenes de cama de esta última solución. Todas las fracciones, desde que se comenzó a cargar la columna hasta que terminó el lavado con  $400\text{mM}$  de fosfatos se fueron colectando a razón de un mL por fracción. Estas fracciones se emplearon para los análisis posteriores.

#### Determinación de la Actividad de la DNA polimerasa

La actividad de DNA polimerasa fue ensayada en un volumen final de  $50\mu\text{L}$  de la siguiente manera. en tubos de  $12 \times 75 \text{ mm}$  se depositaron  $10\mu\text{L}$  de las fracciones y  $40\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (2.7). Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en un baño con agitación durante 15 minutos. La reacción se detuvo adicionando TCA al 10%, colocando los tubos en baño de hielo por 30 minutos

La radiactividad insoluble en TCA se colectó filtrando al vacío en el equipo Millipore a través de filtros de fibra de vidrio (3.8), lavando cada tubo dos veces con TCA frío al 2% y por último con etanol al 96%. Los filtros se

secaron perfectamente y se transfirieron a frascos viales que contenían 2.5mL de líquido de centelleo (2.8), determinando la cantidad de marca incorporada en un contador de centelleo (3.10).

Las cuentas por minuto (cpm) obtenidas fueron transformadas a unidades arbitrarias de actividad (U.A.), definidas como: 1pmol de TMP incorporado en un molde de DNA activado durante 15 min a 37°C, considerando la siguiente relación:

23,209cpm=1unidad de actividad

#### Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Primeramente se leyó la absorbancia (3.11) de cada una de las fracciones eluidas de la columna de DEAE-sefarosa a 280nm para tener una noción aproximada de la cantidad de proteína en cada una de ellas, tomando una unidad de absorbancia igual a un mg de proteína (Kalckar H.M.,1947).

Posteriormente se preparó una curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 0-40µg de proteína/mL. Cada uno de los puntos se mezcló con 1mL del reactivo de Bradford (2.9) y la lectura se hizo a 595nm.

Volúmenes variables de las fracciones (considerando la lectura a 280nm) que pudiesen caer dentro del rango de la curva de calibración fueron mezclados con un mL del reactivo de Bradford y se detrmínó la absorbancia a 595nm. Los resultados de absorbancia se interpolaron dentro de la curva y estos datos fueron corregidos por el factor de dilución correspondiente para obtener una estimación cuantitativa de proteína en cada fracción.

Para determinar la actividad específica de cada fracción se dividió el número de unidades de actividad obtenidas anteriormente entre la cantidad de proteína presente en cada fracción.

## RESULTADOS

Las DNA polimerasas empleadas en los experimentos fueron aisladas a partir de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 6 y 20 horas, con y sin la fitohormona Benciladenina (BA).

Una vez obtenido el extracto celular a partir de ejes embrionarios, éste se hizo pasar a través de una columna de intercambio aniónico de DEAE-sefarosa con lo cual podemos separar las diferentes actividades de polimerasa. En las primeras fracciones eluyó la polimerasa1. Esta proteína no tiene suficientes cargas negativas para quedar retenida en los grupos DEAE, al menos al pH empleado que es 7.4 y por lo tanto a una fuerza iónica de 40mM de fosfatos eluye fácilmente. Posteriormente, la columna se lavó con el mismo amortiguador para terminar de eliminar las proteínas unidas inespecíficamente. Al finalizar el lavado se formó un gradiente de 40-400mM de fosfatos; en este gradiente eluyó la polimerasa2, cuyas características incluyen la de tener suficientes cargas negativas para quedar retenida en la columna y que puede eluirse entre 100-120mM de fosfatos (Coello et al.,1992).

A continuación se muestra un gráfico del perfil de elución de las distintas DNA polimerasas de maíz a través de una resina de DEAE-sefarosa en el que pueden observarse tanto el perfil de proteína como el de actividad (Coello et al.,1992).

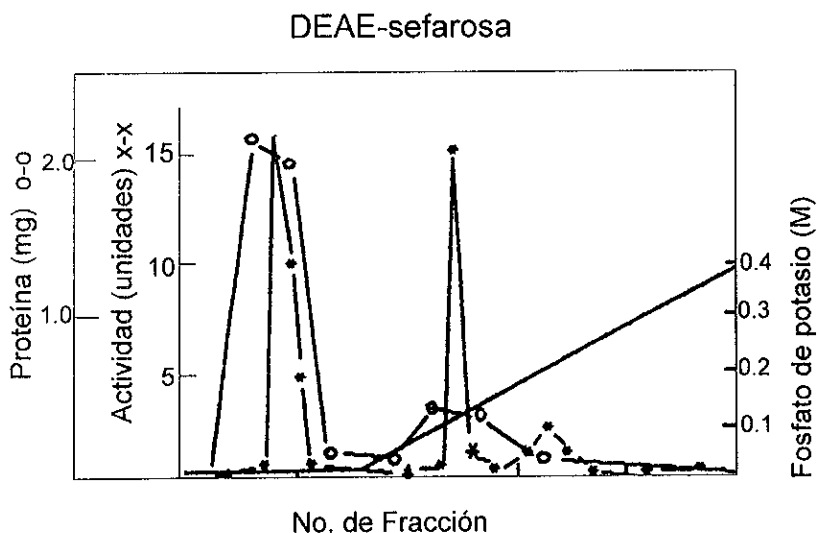


Figura 1. Perfil de elución de las DNA polimerasas de maíz a través de una columna de DEAE-sefarosa. Proteína (o-o), Actividad (x-x), gradiente de fosfatos (---). El primer pico de actividad corresponde a la DNA polimerasa 1, el segundo a la DNA polimerasa 2 y el tercero a la DNA polimerasa 3.

En este trabajo se realizaron varios experimentos de los cuales se exponen los gráficos más representativos. En las figuras 2 a la 5 se puede observar que para los dos tiempos empleados para determinar el efecto de la benciladenina sobre la actividad de las DNA polimerasas (6 y 20 horas), la enzima en las fracciones provenientes de ejes tratados con el fitoregulator presentó mayor actividad específica con respecto a su control, lo cual refleja una estimulación de la actividad de síntesis mayor al incubar los ejes con la hormona.

En la figura 2 se muestra la actividad específica en cada una de las fracciones de la DNA polimerasa 1 de ejes control y tratados, incubados durante 6 horas. La suma de estas actividades y por lo tanto la actividad específica total de la enzima proveniente de los ejes tratados, en este particular experimento, fue aproximadamente 294% mayor a la actividad específica total en las fracciones de ejes control.

Por otro lado, en la figura 3 se presentan las actividades específicas de la polimerasa1 en las fracciones de ejes control y tratados durante 20 horas; la actividad específica total se incrementó aproximadamente un 161% en relación con la mostrada por el control.

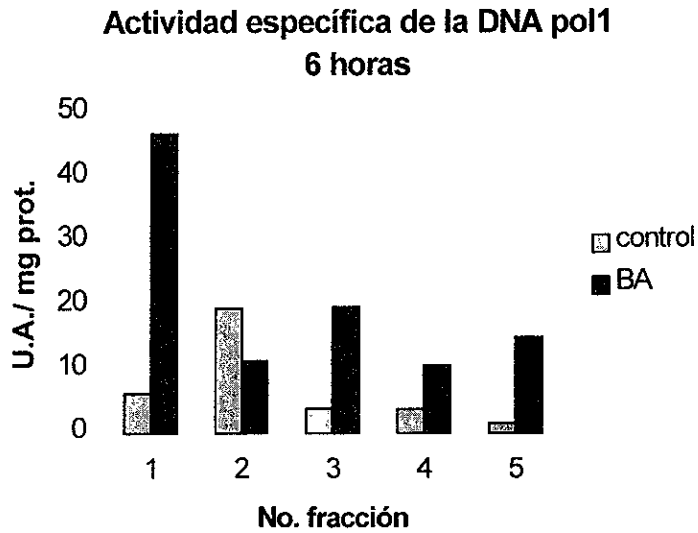


Figura 2. Efecto de BA en la actividad específica (U.A./ mg prot.) de DNA polimerasa1 en fracciones obtenidas después de pasar el extracto crudo de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 6 horas, a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-sefarosa.

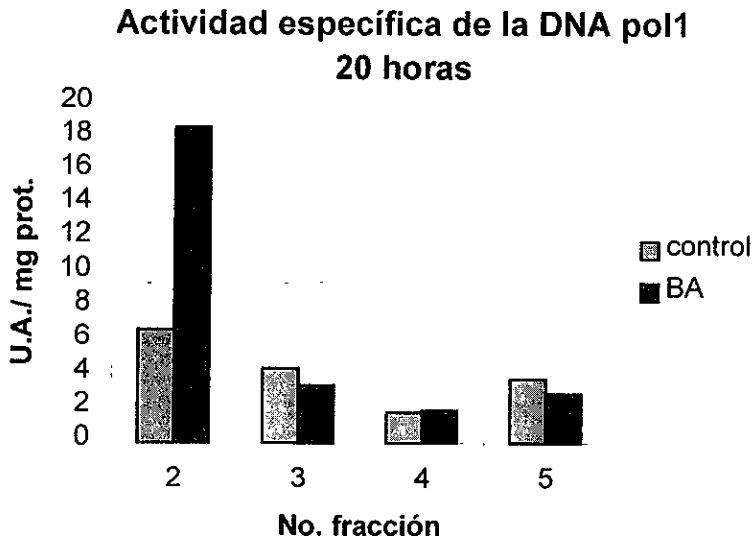


Figura 3. Efecto de BA en la actividad específica (U.A./ mg prot.) de DNA polimerasa1 en fracciones obtenidas después de pasar el extracto crudo de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 20 horas, a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-sefarosa.



En la tendencia general para la DNA polimerasa2, al igual que para la DNA polimerasa1, se observaron incrementos importantes en la actividad específica de la enzima proveniente de los ejes tratados con BA respecto a su control, lo cual se muestra en las figuras 4 y 5.

De estas figuras se obtuvo la información del incremento total de actividad específica de la DNA polimerasa 2. Se observó un aumento de 280% en las fracciones enzimáticas de ejes tratados con respecto a las fracciones provenientes de ejes control de 6 horas de imbibición y un aumento de 379% en las fracciones enzimáticas de ejes tratados por 20 horas con relación a la actividad total mostrada en las fracciones control.

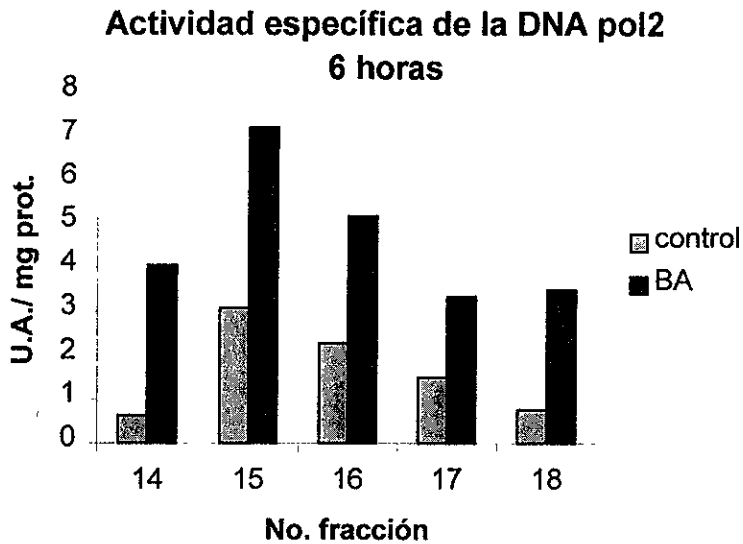


Figura 4. Efecto de BA en la actividad específica (U.A./ mg prot.) de DNA polimerasa2 en fracciones obtenidas después de pasar el extracto crudo de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 6 horas, a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-sefarosa.

### Actividad específica de la DNA pol2 20 horas

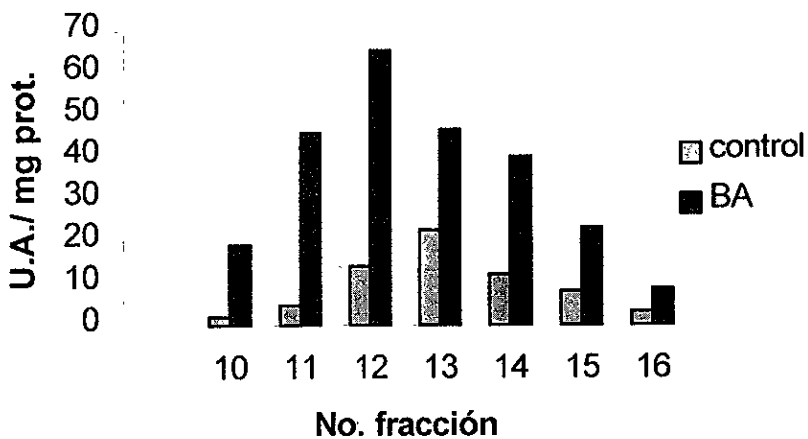


Figura 5. Efecto de BA en la actividad específica (U.A./ mg prot.) de DNA polimerasa2 en fracciones obtenidas después de pasar el extracto crudo de ejes embrionarios de maíz imbibidos durante 20 horas, a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-sefarosa.

En la tabla 1 se presentan los resultados de dos experimentos independientes que muestran las cpms obtenidas de la actividad de las DNA polimerasas 1 y 2 presentes en las fracciones de ejes control y tratados con BA, imbibidos durante 6 y 20 horas; de esta manera, se pudo determinar el comportamiento general de las enzimas provenientes tanto de ejes control como tratados. Las figuras 2 a 5 corresponden a una de estas dos repeticiones.

Tabla 1 Actividad total de las fracciones de DNA polimerasas 1 y 2

Tiempo de imbibición (h)	Experiment No.	Actividad DNA polimerasa 1 (cpms)	Actividad DNA polimerasa 2 (cpms)
6	1	369,600 control 898,500 BA	357,647 control 1'557,100 BA
6	2	—————	550,100 control 740,300 BA
20	1	673,800 control 970,800 BA	1'845,300 control 3'888,100 BA
20	2	627,900 control 798,100 BA	3'177,700 control 4'058,500 BA

En esta tabla 1 se observa que la cantidad de [metil-<sup>3</sup>H]-dTTP incorporado por la acción enzimática es mayor a las 20 horas que a las 6 horas tanto para ejes control como para ejes tratados; es importante señalar que la cantidad de proteína cargada a la columna para las purificaciones de los extractos de ejes tratados y control fue similar en cada caso, aproximadamente 200mg. Esta diferencia en la cantidad de marca incorporada podría estar reflejando que es en el tiempo de 20 horas cuando está ocurriendo más activamente la síntesis del DNA tanto en ejes control como en ejes tratados con el fitoregulador. También se puede observar que las cuentas son mayores para la polimerasa2 en ambos tiempos, implicando que es esta enzima la que está más activa de las dos estudiadas.

La tabla 2 muestra los porcentajes de incremento de la actividad específica total de polimerasa presente en las fracciones provenientes de ejes tratados con el fitoregulador con respecto a aquella presente en las fracciones provenientes de ejes control; se muestran los datos de la actividad específica total de los dos experimentos independientes, mostrados en la Tabla 1 para ambas enzimas en los dos tiempos de imbibición empleados. Para determinar este porcentaje de incremento se tomó la actividad específica total de las fracciones control como 100% y se relacionó con la actividad específica total de las fracciones provenientes de ejes tratados con la hormona. Se muestra también el promedio de los porcentajes.

Tabla 2 Incremento en la actividad específica total de las DNA polimerasas1 y 2 provenientes de ejes imbibidos con BA

Tiempo de imbibición (h)	No de experimento	%incremento en actividad específica total pol1	No. de experimento	% incremento en actividad específica total pol2
6	1	294	1	280
	2	_____	2	670
	promedio	294	promedio	475
20	1	130	1	379
	2	161	2	185
	promedio	145.5	promedio	285

Se puede observar que existe en promedio una mayor actividad específica de la DNA polimerasa2 a las 6 que a las 20 horas. De la polimerasa1 no puede concluirse nada al respecto ya que no se tienen datos suficientes para asegurar que esto también se dé. Sin embargo si puede hablarse de que en ambos tiempos la actividad específica de la polimerasa2 es mayor que la de la polimerasa1.

## DISCUSIÓN

Las DNA polimerasas de maíz empleadas para los ensayos de actividad quedan sólo parcialmente purificadas después del paso cromatográfico a través de DEAE-sefariosa; sin embargo, esto es suficiente para obtener resultados representativos de su comportamiento general en respuesta al tratamiento con la fitohormona benciladenina.

El comportamiento general fué el incremento en la actividad específica de las dos enzimas, DNA polimerasas 1 y 2, en ambos tiempos de imbibición estudiados (6 y 20 horas), demostrando que el fitorregulador si está ejerciendo un notable efecto en la activación de estas enzimas replicativas, lo cual estaría generando, potencialmente, un adelanto en el tiempo de replicación del material genético para que pueda darse la división celular. Anteriormente se había reportado que la cantidad de material genético se duplicaba en menor tiempo en ejes tratados con BA [ $\mu\text{M}$ ] y que en estos mismos ejes ocurría un incremento de 3 veces en el índice de figuras mitóticas a las 24 horas de germinación con respecto al control (Reyes et al., 1991). También se ha reportado que uno de los efectos de BA es el de sincronizar en G1 a las células de tejidos en proliferación (Cruz-García et al., 1998), de manera que un mayor número de éstas entran a la fase replicativa aproximadamente al mismo tiempo; esta podría ser otra de las explicaciones del incremento de actividad observado, ya que si un mayor número de células están en la etapa de síntesis se observará una mayor actividad de las enzimas replicativas.

En la tabla 1 se observan diferencias marcadas en el número de cuentas entre ejes control y ejes tratados en 6 y 20 horas para ambas enzimas, lo mismo

sucede en las diferencias porcentuales mostradas en la tabla 2. En esta segunda tabla aparentemente los promedios indican que el incremento de la actividad específica podría estar siendo mayor a las 6 que a las 20 horas. Esto parecería indicar que el efecto estimulante que ejerce la hormona sobre las DNA polimerasas es más notable en tiempos tempranos de la germinación y se explica porque para este tiempo las células de los ejes control aún no se encuentran en un estado fisiológico adecuado para comenzar la replicación, mientras que las células de los ejes tratados con BA ya han entrado en la fase de síntesis del DNA, que abarca de las 11 a las 24 horas de la germinación aproximadamente.

Por lo que respecta al tiempo de 20 horas, se puede ver que hay un mayor número de cpms tanto en ejes control como en ejes tratados con BA en el caso de las dos enzimas. Esta diferencia en la cantidad de marca incorporada podría estar reflejando que es en este tiempo (20h) cuando ocurre más activamente la síntesis del DNA tanto en los ejes no tratados como en los tratados con el fitorregulador. Para las 20 horas de la germinación las células de ejes control se encuentran de lleno en la fase de síntesis ya que esta ocurre de las 12 a las 24 horas aproximadamente; en el caso de los ejes tratados con el fitorregulador, dado que se ha visto anteriormente que éste provoca un acortamiento en los tiempos de los eventos del ciclo celular adelantándose por tanto la replicación (Reyes-Jiménez et al., 1991; Cruz-García et al., 1995), se especula que las células han completado un ciclo y podrían estar comenzando otra vez a replicar su material genético para una nueva división. Alternativamente, nuevas poblaciones celulares podrían estar entrando a la fase S.



De los datos de actividad presentados en la tabla 1 se observa que en general es mayor la cantidad de marca incorporada por la DNA pol2 lo cual sugiere que está ocurriendo una mayor estimulación de esta DNA polimerasa, ya que las diferencias de actividad entre los ejes control y los tratados son mucho mayores que las que se tienen para la DNA polimerasa 1. Esto también se puede deducir de los gráficos donde la actividad de las fracciones de polimerasa2 de ejes tratados con la fitohormona es varias veces mayor que la de las fracciones control, mientras que este aumento no es tan marcado para las fracciones de polimerasa1.

Los párrafos anteriores señalan a la DNA polimerasa2 como el blanco que responde con mayor intensidad a los estímulos que causa la benciladenina. Esto significaría que de las dos DNA polimerasas de maíz, la que ha sido clasificada como tipo  $\alpha$  es la que se hace más activa.

Dado que es la polimerasa  $\alpha$  quien interviene en la síntesis de cebadores para la cadena continua y más activamente para la cadena retrasada, en la síntesis de los fragmentos de Okazaki, resulta muy interesante que sea ésta la que incremente más su actividad y no la DNA polimerasa  $\delta$ , que es la enzima procesiva (solo si está asociada a PCNA). Se podría especular que ya que la polimerasa  $\alpha$  es la primera de las DNA polimerasas que ingresa a la "burbuja de replicación", si la pol2 (tipo  $\alpha$ ) fuese la principal receptora de los efectos de BA, su activación podría estar llevando en consecuencia a la activación de la pol1 (tipo  $\delta$ ). La actividad de las DNA polimerasas determinada *in vitro* sugiere el comportamiento que podrían tener estas enzimas *in vivo*.

En todos los experimentos realizados se observó (como se ve en los gráficos) un barrido de la actividad; es decir, esta eluyó en varias fracciones.

Esto podría deberse a que la subunidad catalítica de las polimerasas está asociada a otras proteínas, como se ha reportado en células HeLa (Vishwanatha et al., 1986); por ello la interacción de las diferentes subunidades con la resina resulta en diferentes grados de afinidad.

La resolución cromatográfica de la polimerasa 2 proveniente de ejes imbibidos por 6 horas fue ligeramente diferente a la de la enzima de 20 horas, aún cuando los extractos fueron obtenidos de la misma manera y las condiciones cromatográficas empleadas fueron iguales. Esto es quizás indicativo de alguna modificación proteica, de la cual se tiene evidencia (Coello y Vázquez-Ramos, 1995).

En los experimentos realizados se encontró que la actividad de DNA polimerasa de ejes tratados con BA empezaba a eluir una o dos fracciones antes que la actividad de los ejes control; se piensa que esto podría deberse a dichas modificaciones postraduccionales, por fosforilación, que sufre(n) alguna(s) subunidade(s) de la holoenzima (Coello y Vázquez-Ramos, 1995.).

Esta fosforilación podría ocurrir en tiempos anteriores para ejes tratados con BA con respecto a los ejes control, dado el adelanto de los eventos del ciclo celular que provoca esta hormona (Reyes-Jiménez et al., 1991) y aunque parece no haber una relación directa entre el estado de fosforilación con la actividad de la pol2 de maíz (Coello y Vázquez-Ramos, 1995) esta modificación podría estar interviniendo en la unión al DNA o a alguna(as) otra(s) proteína(s) del replisoma, como sucede en levaduras y otros sistemas de células eucariotes (Wang, 1991). Este tópico sigue en investigación en nuestro laboratorio.

## CONCLUSIONES

De los resultados analizados se puede concluir que el fitorregulador benciladenina activa a las DNA polimerasas replicativas de ejes embrionarios de maíz, pol1 y pol2. Por ello se intuye que se acelera la entrada a la fase S del ciclo celular.

Se encontró que la pol2, tipificada como DNA polimerasa tipo  $\alpha$ , presenta una respuesta mayor en cuanto al incremento de su actividad que la DNA pol1, tipificada como tipo  $\delta$ .

La diferencia en la respuesta a BA (entre ejes control y ejes tratados), parece ser mayor en tiempos tempranos que en tiempos tardíos de la germinación, lo que correlaciona con los estados fisiológicos en los que se encuentran las células de ejes en germinación normal (control) y las de ejes en *germinación acelerada (BA)*.

## REFERENCIAS

Baiza A.M., Vázquez-Ramos J. y Sánchez de Jiménez E. (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.*, 135:426

Bambara R.A. y Jessee C.B. (1991). Chromosomal DNA replication. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: genome dynamics, protein synthesis and energetics. Broach J.R., Pringle J.R. y Jones E.W. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y.

Balmukhanov T., Erekenov A. y Ajtkhazhina N. (1992). Isolation of DNA polymerase  $\alpha$  from germinated wheat embryos. *Mol. Biol. Rep.* 16:11

Benedetto J.P., Ech-Chaoui R., Plissonneau J., Laquel P., Litvak S. y Castroviejo M. (1996). Changes of enzymes and factors involved in DNA synthesis during wheat embryo germination. *Plant Mol. Biol.*, 31:1217

Bewley J.D. y Black M. (1994). *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2<sup>a</sup> ed, Plenum Press N.Y. pp 1-233

Blow J.J y Burgers P.J.: *Enzymology of the replication fork.. Eukaryotic DNA replication*. 1996, Oxford University, N.Y., p.p 1-28

Boulet A., Simon M., Faye G., Bauer G.A. y Burgers P.M.J. (1989). Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *EMBO J.*, 8:1849

Brown W.C. y Campbell J.L. (1993). Interaction of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerase  $\delta$ . *JBC*, 268:21706

Budd M.E. y Campbell J.L. (1993). DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  are required for chromosomal replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 13:496

Bullock P.A., Seo Y.S. y Hurwitz J. (1991). Initiation of SV40 DNA synthesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 11:2550

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

Coello P., García E., Rodríguez R. y Vázquez-Ramos J. (1992). A DNA polymerase from maize embryo axes: its purification and possible role. *Plant Mol. Biol.*, 20(6):1159

Coello P., García E. y Vázquez-Ramos J. (1994). Preparation of an antibody against a maize DNA polymerase. Identification of the polymerase catalytic subunit. *Can. J. Botany*, 72(6):818

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

Cohen J.D. (1982). Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-1-aspartate from seeds of *Glycine max* L., *Plant Physiol.*, 70:749

Collins K.L., Russo A.A., Tseng B.Y. y Kelly T.J. (1993). The role of 70KDa subunit of human DNA polymerase  $\alpha$  and DNA replication. *EMBO J.*, 12:4555

Cotterill S., Chui G. y Lehman I.R. (1987). DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. The DNA polymerase subunit. *J.B.C.*, 262:16100

Cruz-García F., Zúñiga-Agular J.J. y Vázquez-Ramos J.M. (1998). Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plantarum*, 102:573

Deltour R. y Jacquard A. (1974). Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L.. *Ann. Bot.* 38:329

Galli M.G. (1984). Synthesis of DNA in excised watermelon cotyledons grown in water and benzyladenine. *Planta*, 160:193

García E., Orjuela D., Camacho Y., Zúñiga J.J., Plasencia J. y Vázquez-Ramos J. (1997). Comparison among DNA polymerases 1, 2 y 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol. Biol.*, 33:445

Georgieva E., López-Rodas G., Hittmair A., Feichtinger H., Brosch G. y Loid P. (1994). Maize embryo germination I. Cell cycle analysis. *Planta*, 192:118

Goscin L.P. y Byrnes J.J. (1982). DNA polymerase  $\delta$ : one polypeptide, two activities. *Biochem* 21:2513

Goulian M., Herrmann S.M., Sackett J.W. y Grimm S.L. (1990). Two forms of DNA polymerase  $\delta$  from mouse cells. Purification and properties. *JBC*, 265:16402

Graveline J., Tarrago-Litvak L., Castroviejo M. y Litvak S. (1984). DNA primase activity from wheat embryos. *Plant Mol. Biol.* 3:207

Hill A.T. (1977). *Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal*. Ed. Omega, Barcelona, España

Huang L., Kim Y., Turchi J.J. y Bambara R.A. (1994). Structure-specific cleavage of the RNA primer from Okazaki fragments by calf thymus Rnasa H1. *JBC*, 269:25922

Kakimoto T. (1996). CKI1, a histidine Kinase homolog implications in cytokinin signal transduction. *Science*. 274:982

Kenny M.K., Lee S.H. y Hurwitz J. (1989). Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in SV40 DNA replication : single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:9757.

Kesti T., Frantti H. y Syvaioja J.E. (1993). Molecular cloning of cDNA for the catalytic subunit of human DNA polymerase  $\epsilon$ . JBC 268:10238

Koorneef M., Reuling G. y Karseen C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant 61:377

Kornberg A. y Baker T. (1992). DNA Replication. W.H. Freeman and Company, 2 ed., USA p.p.101-112,197-226,275-306,323-402,471-510.

Kualeva O.N. (1981) Cytokinin action of cytokinins. Ed. J. Guern and C. Péaud Lenoël, Spin-Verlag, Berlin Heidelberg

Laquel P., Litvak S. y Castroviejo M. (1993). Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerizes. Plant Physiol. 102:107

Lee M.Y.W.T., Tan C-K, Downey K.M. y So A.G. (1984). Further studies on calf thymus DNA polymerase  $\delta$  purified to homogeneity by a new procedure. Biochemistry 23:1906

Marcus A., Feeley J. y Volcani J. (1966). Protein synthesis in imbibed seeds III: Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation. Plant Physiol. 41:1167

Navas T.A., Zhou Z. y Elledge S.J. (1995). DNA polymerase  $\epsilon$  links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. Cell 80:29

Nethanel T. y Kaufman G. (1990). Two DNA polymerase subunits. JBC 262:16100

Nishida C., Reinhard P. y Linn S. (1988). DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase  $\delta$ . JBC 263:501

Osborne D.J. (1983) Biochemical control systems operating in the early hours of germination. Can.J.Bot. 61:3568

Raven P.H., Evert R.F. y Eichhorn S.E. (1992). Biology of plants, 5<sup>a</sup> ed.,Worth Publishers, N.Y., p.p.545-562

Reyes J., Jiménez-García L., González M. y Vázquez-Ramos J. (1991). Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Res.*, 1:113

Richard M.C., Litvak S. y Castroviejo M. (1991).DNA polymerase B from wheat embryos. *Arch. Biochem. Biophys.* 287:141

Sakakibara H., Suzuki M., Takei K., Deji A., Taniguchi M. y Sugiyama T. (1998). A response-regulator homolog possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J.*(in press)

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

Sánchez de Jiménez E. y Aguilar R. (1984). Protein synthesis patterns: relevance of the new messenger RNA in germinating maize embryos. *Plant Physiol.* 75:231

Santocanale C., Foiani M., Lucchini G. y Plevani P. (1993). The isolated 48000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis. *JBC* 268:1343

Simon E.W. (1984) Early events in germination in seed physiology V; II Germination and reserve mobilization. David R. Murray, ed. Academic Press, Australia, p. 77

Simon M., Giot L. y Faye G. (1991). The 3'-5' exonuclease activity located in the DNA polymerase  $\delta$  subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is required for accurate replication. *EMBO J.* 10:2165



Sinha N:K., Morris C.F. y Alberts B.M. (1980). Efficient in vitro replication of double stranded DNA templates by a purified T4 Bacteriophage replication system. JBC 255:4290

Syvaioja J. y Linn S. (1989). Characterization of a large form of DNA polymerase delta from HeLa cells that is insensitive to proliferating cell nuclear antigen. JBC 264:2489

Tan E.K., Castillo C., So A.G. y Downey K.M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase delta from fetal calf thymus. JBC 261:12310

Thomas T.H. (1977). The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Ed. A.A. Khan. North Holland, Amsterdam. P.111

Tsurimoto T., Melendy T. y Stillman B. (1990). Sequential initiation of lagging and leading strands synthesis by two different DNA polymerase complex at the SV40 DNA replication origin. Nature 346:534

Tsurimoto T. y Stillman B. (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. II Switching of DNA polymerase  $\alpha$  and  $\delta$  during initiation of leading and lagging strands synthesis. Mol. Cell Biol. 11:2350

Vázquez-Ramos J. y López S. (1986). Inhibición de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de maíz por novobiocina y araCTP. Rev. Soc. Quim. Mex., 30(3):119

Vázquez-Ramos J. y Reyes J. (1990). Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity during early germination of maize embryos axes. Can. J. Bot. 45:649

Van Staden J. (1983). Seeds and citikinins. Physiol. Plant 55:60

Verma R.S. y Linn M.S. (1979). The duration of DNA synthetic (S) period in *Zea mays*: A genetic control. Theor. Appl. Genet. 54:277

Vishwanatha J.K., Coughlin S.A., Wesolowski-Owen M. y Baril E.F. (1986). A multiprotein in form of DNA polymerase  $\alpha$  from HeLa cells. Resolution of its associated catalytic activities. JBC 261:6619

Waga S., Bauer G. y Stillman B. (1994). Reconstitution of SV40 DNA replication with purified replication factors. *JBC* 269:10923

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

Wang T.S.F. (1991). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 60:513

Wang Z., Wu X. y Friedberg E.C. (1993). DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase  $\epsilon$  and is influenced by polymerases  $\alpha$  and  $\delta$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 13:1051

Whal A.F., Crute J.J., Sabatino R.D., Bodner J.B., Maraccino R.L., Harwell L.D., Lord E.M. y Bambara R.A. (1986). Properties of two forms of DNA polymerase  $\delta$  from calf thymus. *Biochem* 25:782

Wong S.W., Pavorsky L.R., Fischer P.A., Wang T.S.F. y Korn D. (1986). Structural and enzymological characterization of immunoaffinity purified DNA polymerase  $\alpha$  DNA primase complex from KB cells. *JBC* 261:7958

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

Zlatanova J.S., Ivanov P.V., Stoilov L.M., Chimsinova V. y Stanchev B. (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol. Biol.* 10:139

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