

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

División de Estudios de Posgrado

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA
ACTIVIDAD DE DNA TOPOISOMERASAS DE MAIZ

TESIS

Que para obtener el Grado de Maestro en
Ciencias Químicas (Bioquímica)

presenta

LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN

México, D.F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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	Dra. Aurora Brunner
1er. Vocal	Dr. Edgardo Escamilla
Secretario	Dra. Irma Bernal
Suplente	Dr. Fernando Montiel
Suplente	Dr. Ezequiel Murillo

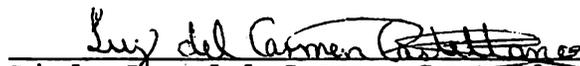
Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioquímica Vegetal de la DEPg de la Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:



Dr. Jorge Vázquez Ramos

Sustentante:



Biol. Luz del Carmen Castellanos Román

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la presencia y purificación parcial de 2 actividades enzimáticas no descritas previamente para maíz: la topoisomerasa I y la topoisomerasa II. Ambas, presentan actividad de relajación en plásmidos superhelicoidales, de manera análoga a la descrita para las correspondientes enzimas de eucariontes animales. Difieren entre sí en sus requerimientos: la topoisomerasa I requiere de KCl (50 mM), trabaja en un rango de pH de 6.5 a 9.0; es estimulada por Mg^{++} y posiblemente se inhiba en presencia de ATP; a lo largo de su purificación y almacenamiento es más estable que la topoisomerasa II. Por su parte, la topoisomerasa II trabaja óptimamente con KCl (100 mM) y requiere de Mg^{++} y ATP (Función óptima con 15 mM y 1 mM respectivamente); el rango de pH para actuar es de 7.0 a 9.0.

SUMMARY

Two new enzymatic activities in maize are described in this work: DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. Both of them relax supercoiled DNA in a manner analogous to that described for animal DNA topoisomerases. However, both enzymes differ in their requirements: topoisomerase I requires KCl (50 mM), is active in a pH range of 6.5-9.0 is stimulated by Mg^{2+} and seems to be partially inhibited by the presence of ATP; besides is more stable than the topoisomerase II. On the other hand, topoisomerase II works optimally at a concentration of KCl of 100 mM, requires Mg^{2+} and ATP (15 mM and 1 mM respectively), and is active in a pH range of 7.0 - 9.0

*Con mucho amor: a Jorge por su dirección,
comprensión y apoyo.*

*A mi hijo, Jorge Francisco por su gran
alegría, que me sirve de estímulo.*

*A mis papás y hermanos por su estímulo
y ayuda para realizar este trabajo.*

ABREVIATURAS

ARA-CTP	Arabinosil Citidintrifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CHES	(2[N-ciclohexilamino] etano sulfónico ac.
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Etilendiamintetraacetato de sodio
g	Gravedad
HMG	Grupo de proteínas de alta movilidad electroforética
HTP	Hidroxiapatita
KPi	Amortiguador de fosfato de potasio
NaPi	Amortiguador de fosfato de sodio
PEG	Polietilen glicol
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TRIS	(Hidroximetil-amino metano)
TX-100	Tritón X-100

INDICE

INTRODUCCION	1
Aspectos sobre la germinación	1
Generalidades sobre el DNA	5
DNA Topoisomerasas	8
DNA Topoisomerasa I.....	9
DNA Topoisomerasa II.....	10
Aspectos Mecanísticos.....	11
Reacción de Corte.....	11
Reacción de Corte por Topoisomerasa I	11
Reacción de Corte por Topoisomerasa II	14
Regulación de Topoisomerasas	15
Aspectos Biológicos.....	16
Localización.....	16
Actividad en replicación de DNA.....	16
Actividad en Transcripción.....	18
Recombinación.....	18
Reparación.....	19
Relación entre germinacion y DNA topoisomerasas.....	19
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS	22
Material Biológico.....	22
Substancias Químicas.....	22
Aparatos.....	22
Amortiguadores.....	23
Medios para crecimiento bacteriano.....	25

Amortiguadores para geles	26
METODOS	28
Imbibición de ejes embrionarios de maíz	28
Extracción de núcleos y lisis.....	28
Preparación de extracto protéico.....	28
Precipitación de ácidos nucléicos.....	29
Precipitación con sulfato de amonio	29
Preparación de Sepharosa Novobiocina.....	29
Preparación de hidroxapatita (HTP)	30
Preparación de Ultrogel HA	31
Preparación de Sephadex G-150	31
Concentración de Muestra	31
Preparación de bolsas de diálisis	31
Ensayo de actividad de topoisomerasa	31
Digestión con enzimas de restricción	34
Aislamiento de plásmido	34
Electroforesis en agarosa	34
Electroforesis en acrilamida	35
Determinación de proteínas	35
Determinación de proteínas por el método	
Espectrofotométrico	35
RESULTADOS	36
Columna de Sepharosa- novobiocina	39
Hidroxapatita (HTP)	42
Ultrogel HA	43
Sephadex G-150	45
CARACTERIZACION	53

Titulación de la Topoisomerasa I con respecto al tiempo	53
Efecto de la fuerza iónica en la actividad de las enzimas	55
Requerimiento de Magnesio	55
Efecto del pH	55
Temperatura	61
Estabilidad	61
DISCUSION	63
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	72

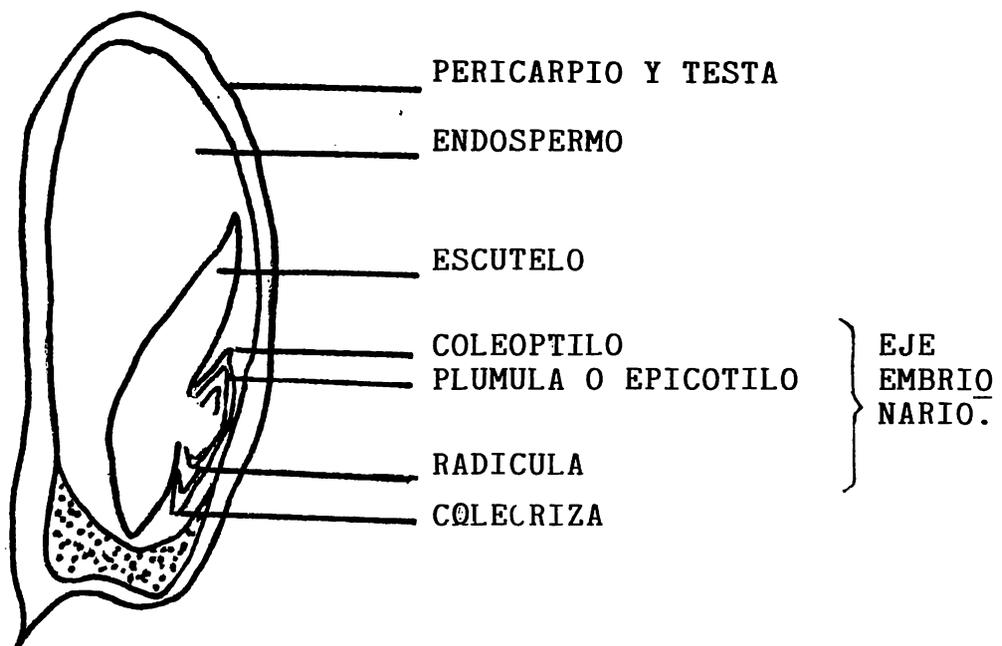
INTRODUCCION

ASPECTOS SOBRE LA GERMINACION

La semilla es un ente de reposo característico en el ciclo reproductor de muchos vegetales y constituye una planta en potencia con un metabolismo muy bajo y con propiedades excepcionales de resistencia a condiciones extremas como calor o frío y gran longevidad (1,2). En la figura 1 se muestra la semilla de maíz.

Una vez madura, la semilla normalmente tiene una etapa de descanso, antes de germinar y convertirse en una nueva planta. El concepto de germinación es difícil de definir pues en la literatura no existe una concordancia en los procesos que abarca. Una definición aceptada establece que cuando la semilla es humedecida se disparan procesos metabólicos que hacen que una parte del embrión, la radícula, emerja; pero esto puede implicar que sólo exista elongación celular y no división celular (3,4) y es aquí donde empiezan las divergencias.

La actividad metabólica de la semilla puede dispararse por imbibición con agua o en algunos casos mediante cambios en las condiciones ambientales u otros factores (2). Por ejemplo, la síntesis de macromoléculas como el RNA y proteínas comienza pocos minutos después de la imbibición, y en general se aceptan como prerequisito para la emergencia radicular; ambos parecen tener un papel importante en la replicación de DNA, pues la inhibición de la síntesis de cualquiera entre las 0 y 9 horas después de la imbibición suprime la síntesis de DNA (2), por otro lado, la síntesis de DNA puede ocurrir después de la germinación como parte



COMPOSICION QUIMICA (PORCENTAJE EN PESO SECO(S))

CARBOHIDRATOS		PROTEINAS	GRASAS
ALMIDON	AZUCAR		
50-70%	1-4 %	10 %	5 %

Fig. 1.- Semilla de maíz

integral del crecimiento de los ejes (4). En el caso particular del maíz se observa síntesis de DNA desde las primeras horas de imbibición de los ejes embrionarios y se incrementa notablemente a las 10 horas aproximadamente, continuando con una cinética similar por lo menos hasta las 25 horas, como se muestra en la figura 2. Dado que la finalidad de la germinación es preparar a la semilla para que sus células se dividan y crezcan y la elongación celular no asegura que exista la división celular, en este trabajo se define a la germinación como el conjunto de eventos metabólicos que se llevan a cabo en una semilla desde su imbibición hasta que ocurren las primeras divisiones celulares (2).

Uno de los eventos más importantes para que ocurra la división celular es la replicación del DNA. Los procesos metabólicos que llevan a que esta molécula se duplique y las enzimas que participan en dichos procesos son ampliamente desconocidas en plantas y por tanto su estudio cobra relevancia. Es de interés en el presente trabajo, el estudio de algunas de las enzimas que participan no sólo en el metabolismo del DNA, sino también en la conformación topológica de éste. Sin duda estos eventos son imprescindibles para que ocurra la replicación del DNA y la primera división celular, logrando así la germinación.

Antes de entrar en detalle sobre lo que se conoce de estas enzimas en otros organismos debemos de conocer generalidades del sustrato con que actúan.

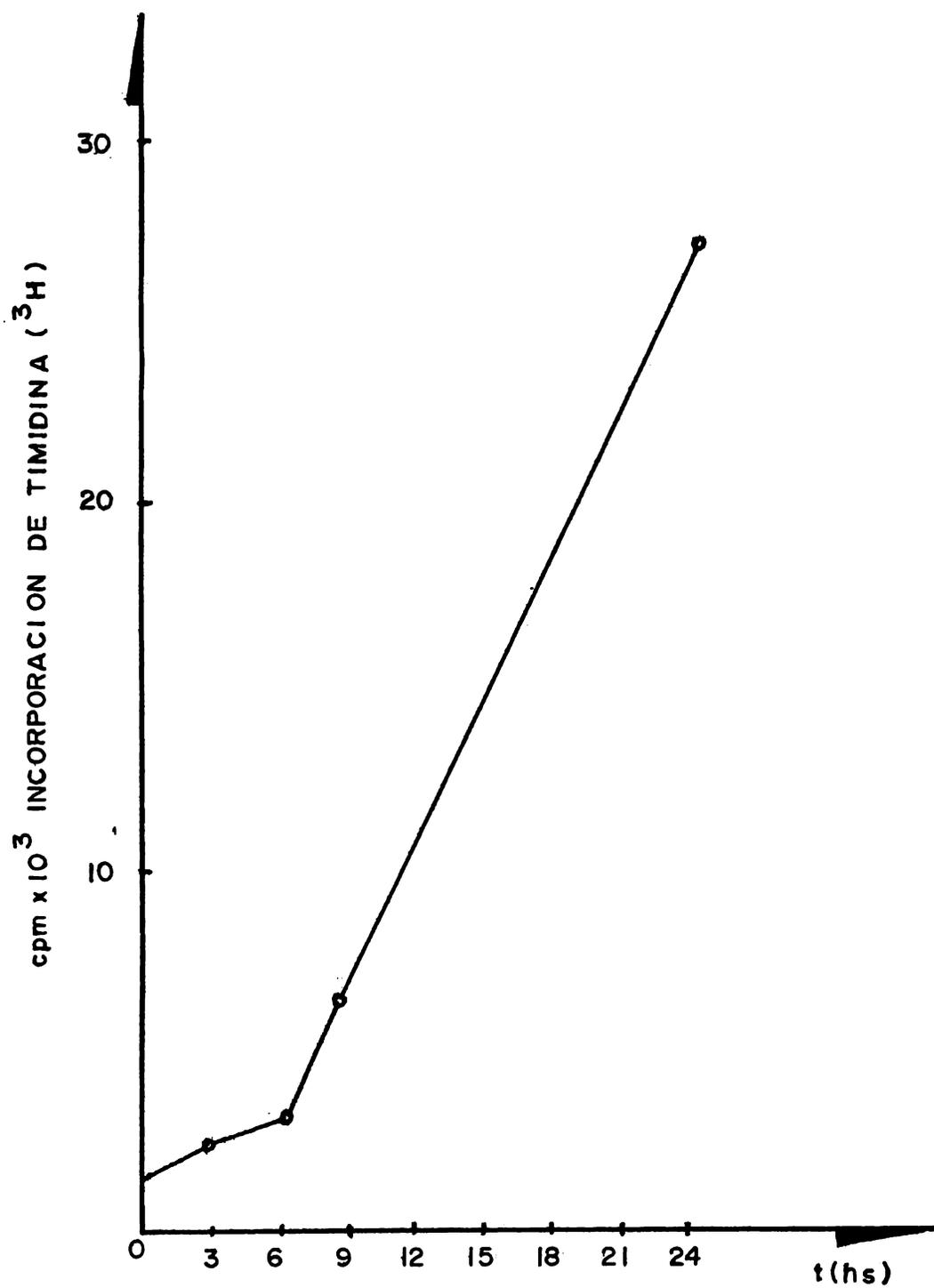


Fig. 2.- Síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz (2).

GENERALIDADES SOBRE EL DNA

La estructura helicoidal del DNA, así como la cantidad que existe de éste en la célula, involucran problemas topológicos que la célula debe resolver para empacar de manera ordenada la larga molécula de DNA en el núcleo; así mismo la manera exacta de doblar el genoma podría determinar la actividad de los genes en esa región. La célula también debe resolver el problema de la replicación del material genético, así como otros procesos en que interviene el DNA.

En el procariote Escherichia coli existen 0.009 pg de DNA por célula (5) y el estado topológico del DNA se considera energéticamente activado puesto que la superhelicidad resultante produce una tensión torcional (6), en tanto que en eucariotes la cantidad de DNA es mayor como se demuestra en tabaco donde existen 2.5 pg de DNA por célula (5) por lo que esta gran cantidad de DNA debe de estar bien organizada para poder llevar a cabo sus funciones y en consecuencia deben de existir niveles de organización.

La cromatina como se sabe, está formada de DNA y de histonas y una proporción variante de proteínas no histónas. El primer nivel de condensación es el nucleosoma en el que el DNA se enrolla en 1.75 vueltas alrededor de éste, siendo las histonas H1 las que interactúan con 20 pares de bases de DNA para completar las 2 vueltas del DNA (7).

Siendo ésto, un hecho tan conservado evolutivamente en los organismos, al igual que características tales como el diámetro del nucleosoma, como lo muestran las medidas de tabaco (1.25 a 1.6 μm), maíz (1.25 μm) y animales vertebrados (1.25 μm) (8); es

de esperarse que especies tan distantes tengan mecanismos semejantes para realizar sus funciones.

Otro nivel de organización es el solenoide que consta de 6 a 7 nucleosomas por vuelta en un enrollamiento continuo (7). Los nucleosomas así organizados pueden formar lo que se denomina fibra de 30 nm, de la que la histona H1 seguramente es responsable; de este nivel de organización se pasa al de los dominios con asas que tienen un promedio de longitud de 400 nm y están constituidos por la fibra de 30 nm. Estos dominios a su vez forman las secciones condensadas de cromosoma con una longitud de 700 nm, formando finalmente el cromosoma de metafase con un ancho de 1400 nm (9) (Figura 3).

Lo anterior da un indicio del nivel de complejidad estructural que presenta el DNA de eucariotes al estar compactada toda su longitud al espacio nuclear y los problemas que la célula tendría que resolver para que su cromosoma pueda ser replicado, transcrito, reparado, etc.

Las DNA topoisomerasas parecen ser las herramientas que poseen las células para solucionar adecuadamente los problemas topológicos que representa la compactación del DNA celular y su grado de superhelicidad. Por cierto, para explicar la superhelicidad del DNA es conveniente mencionar algunos comentarios topológicos; la superhelicidad de un DNA duplex circular se define en términos del número de unión α . el número de unión α se refiere al número de veces que dos hebras se entrecruzan, cuando el círculo se fuerza a estar en un plano y se cuenta el exceso de entrecruzamientos de dirección derecha o izquierda de una hebra sobre la otra con

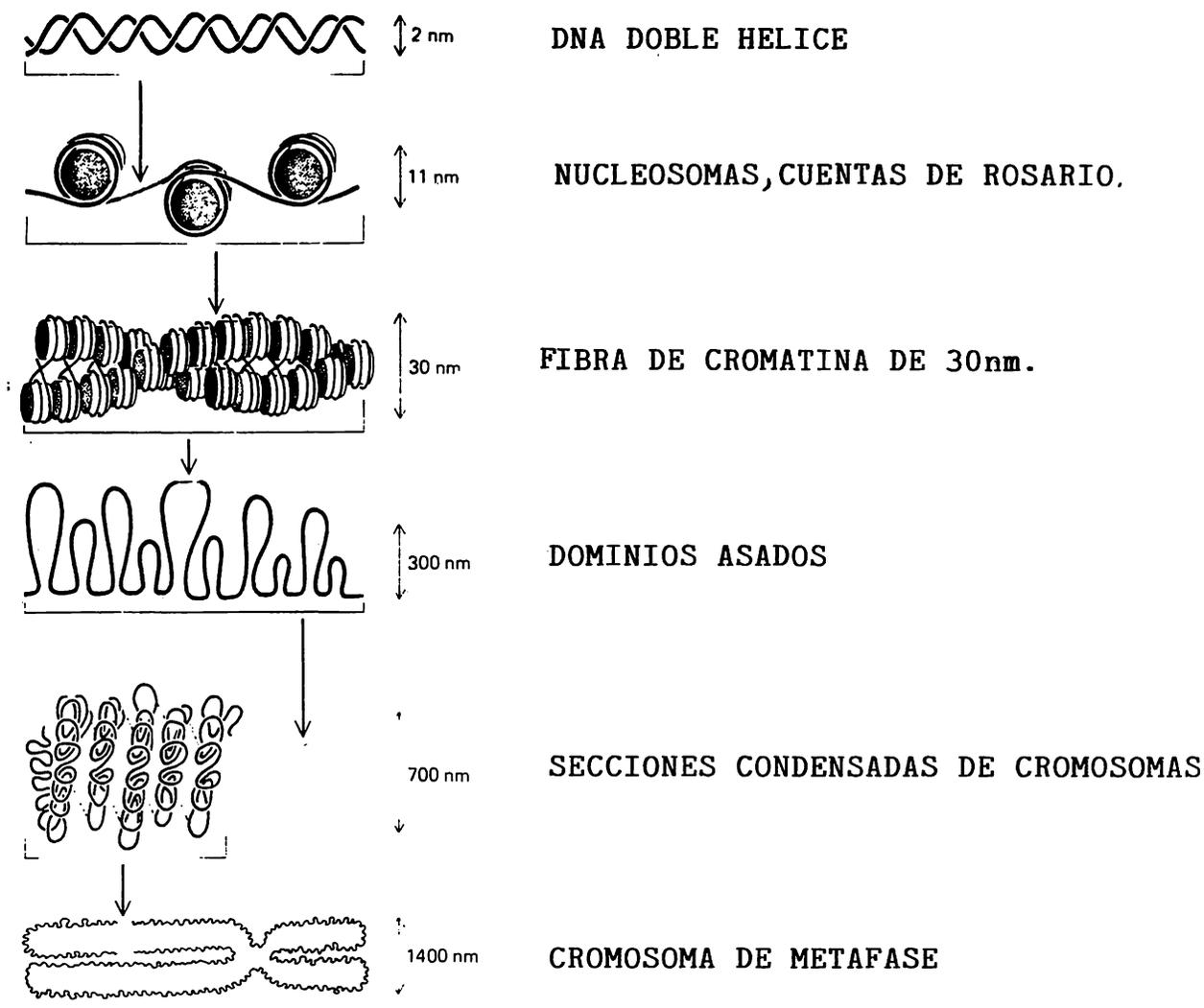


Fig. 3. Estructura de la cromatina (9)

respecto al eje de la hélice. En el estado basal y considerando la configuración beta del DNA (10.4 pares de bases por vuelta) donde no existe tensión torcional, el número de unión α se considera relajado. Cuando $\alpha = \beta$ entonces el DNA está relajado, en tanto que cuando $\alpha \neq \beta$ el DNA está super helicoidal y si $\alpha > \beta$ la superhelicidad es positiva. Es decir, que cuando el número de unión α es más pequeño que $1/10.4$ p.b. la superhelicidad es negativa y si es más grande, entonces es superhelicidad positiva (6,65).

DNA TOPOISOMERASAS

En la horquilla de replicación, por cada 10 pares de bases replicadas, la doble hélice paterna debe de girar una vuelta alrededor de su eje. Cuando la horquilla se mueve, el cromosoma entero enfrente de ésta debería rotar rápidamente, proceso que requeriría gran cantidad de energía, sobre todo cuando se trata de cromosomas largos. Ya que esto no es factible la solución sería que sólo un pequeño fragmento alrededor de la región por replicar se girase en el sentido adecuado y permitiera que la replicación continuase; esto es un ejemplo de lo que pueden resolver las topoisomerasas (9). Las topoisomerasas son enzimas capaces de interconvertir las formas topológicas del DNA. Su descubrimiento es relativamente reciente y la primera topoisomerasa que se descubrió fue la ω en 1971 (10). Se han encontrado tanto en procariotes como en eucariotes y se les asocia con procesos de vital importancia. Por su mecanismo de acción de corte y reunión, así como el tipo de actividad que pueden realizar se ha asociado su función

con procesos del cromosoma como relajación y superenrollamiento, anudación y desanudación, catenación y descatenación, renaturalización de círculos de una hebra con secuencia complementaria, etc.

Dos tipos de topoisomerasas han sido descritas según el mecanismo de acción que desarrollan y se describen a continuación.

DNA TOPOISOMERASA I

Este tipo de enzimas relajan al DNA superhelicoidal principalmente negativo, aunque algunas relajan también el positivo. Hacen el corte en una sola hebra del DNA y no requieren ni ATP ni Mg^{2+} . El cambio en el número de unión es de uno en uno.

En procariotes, la topoisomerasa I de E. coli tiene preferencia por el DNA superhelicoidal negativo; el positivo casi no se afecta y esto concuerda con el hecho de que el DNA superhelicoidal negativo favorece las regiones de DNA de hebra sencilla que se requieren para que actúe la enzima (6). La enzima de procariotes se une por una unión O^4 -fosfotirosina al grupo fosforil 5'P en el corte producido al DNA (6,11,13). En eucariotes las topoisomerasas I pueden relajar superhelicidad negativa y alguna positiva también; no requieren de magnesio aunque éste puede llegar a tener un efecto estimulador; el ATP no se requiere e incluso en algunos casos llega a tener un efecto inhibitorio como ocurre en Ustilago maydis (14) y en eritrocitos de pollo (15). Los pesos moleculares de las topoisomerasas I se encuentran entre 62000 y 100 000 con excepción de las de coliflor y U. maydis que se calculan entre 200 000 y 270 000 (14,16,17), aunque éstas han sido sólo parcialmente purificadas.

Las topoisomerasas I de eucariotes interaccionan con el nucleosoma y varias proteínas cromosomales, y se piensa que las proteínas H1 y HMG estimulan la relajación (11). La unión de la enzima con el DNA es covalente y es en el extremo 3' formando una 3'-fosfotirosina (6), contraria a la que se forma en procariotes.

DNA TOPOISOMERASA II

Este tipo de enzimas cortan ambas hebras del DNA y por tanto cambian el número de unión en pasos de 2 en 2. Requieren ATP y magnesio para realizar su actividad.

La DNA topoisomerasa II aislada de procariotes se ha llamado DNA girasa y consta de un tetrámero en asociaciones diméricas con subunidades diferentes. La girasa desarrolla varias funciones (6): a) superenrolla negativamente el DNA dúplex relajado en presencia de ATP y Mg^{++} , b) en ausencia de ATP relaja el DNA superhelicoidal; c) en presencia de ácido oxolínico (inhibidor específico de la subunidad A) promueve un doble corte en sitios específicos; d) hidroliza ATP en presencia de DNA y e) es capaz de formar y desunir catenados.

La DNA girasa se une al DNA por el extremo 5'P del corte producido. Alrededor de 105 pares de bases de DNA rodean en una vuelta a la enzima aunque la unión del ATP causa la asociación de longitudes más grandes (18).

En eucariotes las topoisomerasas II que se han purificado a homogeneidad parecen constar de una sola cadena peptídica y su tamaño va de 150 000 a 180 000 daltones (11); pueden relajar, catenar, descatenar y desanudar el DNA, y para que realicen una u otra función sólo tiene que variarse la fuerza iónica, así como la

presencia de estimuladores como la espermidina e histonas (14,16, 19). No se ha encontrado actividad de superenrollamiento en estas enzimas, a diferencia de las de procariotes (20).

En la Figura 4 se muestra un cuadro con las características de algunas topoisomerasas.

ASPECTOS MECANISTICOS

El arquetipo de las topoisomerasas examinadas muestra que éstas: a) rompen y sellan la cadena o cadenas de DNA; b) presentan una unión O^4 -fosfotirosina con el DNA y c) forman un complejo covalente de DNA-enzima, que es un intermediario activo en la topoisomerización. Esto se ejemplifica en la figura 5.

REACCION DE CORTE

REACCION DE CORTE POR TOPOISOMERASA I

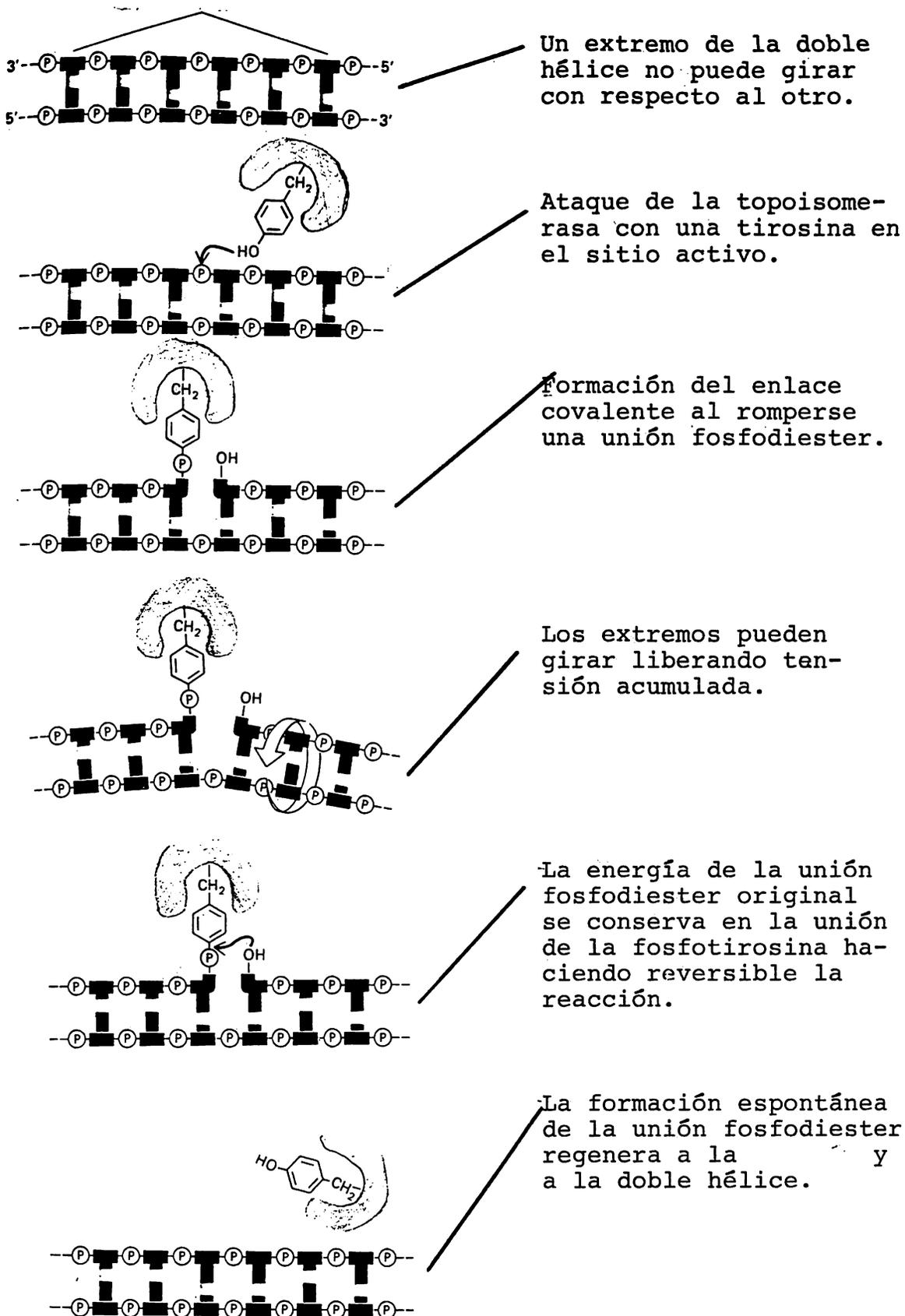
Las topoisomerasas I de procariotes como E. coli y M. luteus cortan al DNA dúplex en una región de hebra sencilla en la posición $5' \dots C N N N \downarrow \dots$ donde N es cualquier base (13,21). Pueden anudar y desanudar plásmidos, por lo que la formación de nudos debe de requerir de regiones de apareamiento local de bases (22). También pueden aparear círculos de hebras sencillas complementarias (6). Otra actividad que pueden realizar es la de catenar o descatenar, siempre y cuando al menos uno de los círculos contenga un corte en una hebra (23). Las enzimas bacterianas son refractarias a cortar DNA relajado, mientras que las de eucariotes lo cortan a menor velocidad que el superhelicoidal (11).

En eucariotes la composición nucleotídica para los cuatro nucleótidos del extremo 5' del sitio de corte (posición -4 a -1)

Fig. 4. TOPOISOMERASAS

ORIGEN	TIPO	PM	ACTIVIDAD	INHIBIDORES	ESTIMULADORES	CARACTERISTICAS
Trigo (53)	I	111,000	Capaz de aumentar o disminuir el No. topológico del DNA covalentemente cerrado			No requiere Mg++ ni ATP
	I	200,000	Relajación	EDTA T=40°C, 30 min,	Espermidina Mg++	
Coliflor (16)	II	200,000	Relajación	Novobiocina Espermidina EDTA, T=40°C, 2'		Requiere ATP y Mg++
<u>Ustilago maydis</u> (14)	I	270,000	Remueve superhelicidad de DNA positiva y negativa.	ATP	Mg++ H1	Homedímero
<u>Drosophila</u> (19)	II	261,000	Relajación, catenación, decatenación, desanudación, Altera el No. de unión en pasos de 2.	Novo 210 mM		Dímero Requiere ATP Cuando corta la enzima se une al 5'
<u>Xenopus laevis</u> (49)	II		Catenación de DNA superhelicoidal negativo o relajado Decatenación	Coumermicina.	Espermidina	Requiere Mg++, ATP. Fuerza Iónica 26-30 mM KCl Fuerza iónica alta Mg++, ATP
Eritrocito de pollo (51,61)	I	62,000 100,000	Relajación			
Hígado de rata (50)	I	66,000	Relajación de DNA superhelicoidal negativo y positivo.			Rompe en región potencial para la formación de dulex uniéndose al 3'
		100,000	A 150 mM es más procesiva la forma grande que la chica.			
HeLa (52)	I	100,000	Relaja superhelicidad positiva y negativa. Catención		Mg++	Monomérica rica en lisina. Se une al 3' y preferencialmente a pirimidinas.
			Promueve renaturalización de 2 anillos de SS Puede romper DNAss	Heparina	H1, HMG	

FIG. 5



así como el nucleótido inmediato al sitio de corte 3' (posición +1) tienen un consenso significativo en su secuencia y es diferente de la procariotes.

El corte en eucariotes se produce en regiones de DNA dúplex, en tanto que en procariotes la enzima interactúa preferencialmente con segmentos de DNA con regiones de hebra sencilla y dúplex ocurriendo el corte en la región de hebra sencilla (11). El corte que produce la topoisomerasa I de procariotes al DNA, sugiere que la enzima se une al DNA en ambos lados del sitio de corte y establece un puente entre los extremos. En eucariotes el corte de la topoisomerasa I es en regiones dúplex de DNA por lo que la complementariedad de las hebras las mantendría juntas en el corte, lo que equivaldría al puente de los procariotes (11).

REACCION DE CORTE POR TOPOISOMERASA II.

Las topoisomerasas II de bacterias, o girasas, cortan en regiones dúplex de DNA que tengan la secuencia

5' RNNNRNRT | GRYC^TYNYNGNY 3' donde N es cualquier nucleótido,
(G) (T)

R es una purina y Y es una pirimidina (24), y no cortan DNA de hebra sencilla (25).

Este tipo de enzimas se unen fuertemente a DNA de hebra sencilla y se piensa que pueden reconocer estructuras secundarias del DNA, de manera análoga a como actúa la topoisomerasa II del fago T4 (25).

Algunas drogas antitumorales estimulan el corte del DNA por topoisomerasa II. Así, la 4'-9-acridinilamino metanosulfon m-anisidina (m-AMSA), en presencia de SDS, estimula el corte del

DNA por la topoisomerasa II de maífero (26).

REGULACION DE TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas pueden sufrir modificaciones como la fosforilación, que incrementa la actividad de relajación, mientras que si se trata a la enzima con fosfatasas baja la actividad, como se ha reportado para la topoisomerasa I de células de ascitis de Novikoff (27). Los aminoácidos de la enzima que se modifican in vitro son serina y treonina y uno de estos es el que se modifica in vivo (11). La topoisomerasa II de Drosophila se modifica también en residuos de treonina y serina (28).

En bacterias el sitio de fosforilación podría ser la tirosina involucrada en la unión al DNA o alguna cercana a ésta, como se ha demostrado en experimentos donde se bloquea el residuo de tirosina y no ocurre la fosforilación (29). La modificación química de los residuos de tirosina de topoisomerasa I y de girasa inactiva a las enzimas (30).

Se ha descrito una proteína cinasa asociada a la topoisomerasa II de D. melanogaster que se coinactiva con ésta, por calor o por N-etil maleimida, por lo que existe la posibilidad de que la cinasa sea una actividad intrínseca de la topoisomerasa (28).

La topoisomerasa I de eucariontes también se modifica e inactiva por la poli (ADP-ribosa) sintetasa (31), lo que debe de constituir un mecanismo de regulación in vivo. Interesantemente in vitro la topoisomerasa I es un buen aceptor de la poli (ADP-ribosa).

ASPECTOS BIOLÓGICOS

LOCALIZACIÓN

La actividad de topoisomerasas en eucariotes se ha encontrado en el núcleo, mitocondrias y cloroplastos. La cantidad de enzima por organelo parece ser pequeña y a que como ejemplo, en mitocondria de mamífero existen 6 moléculas de topoisomerasa I o de 1-2 copias por genoma mitocondrial (32).

La topoisomerasa I nuclear de D. melanogaster se encuentra en lugares transcripcionalmente activos (33). La tipo II se ha encontrado en cromosomas politénicos y se ha visto que durante la mitosis ésta parece distribuirse en toda la célula (34). Igualmente se ha encontrado mayoritariamente en el armazón de los cromosomas, como se muestra en los cromosomas mitóticos de pollo (35).

ACTIVIDAD EN REPLICACION DE DNA

La DNA girasa y la DNA topoisomerasa del fago T4 están implicadas en el inicio de la replicación. Esto se ha estudiado en sistemas in vitro con fracciones solubles de enzimas que pueden iniciar la replicación bidireccional de la región de origen ori C cromosomal clonada en plásmidos; mostrando que se requiere de girasa para iniciar la replicación tanto en sistemas de plásmidos circulares como lineales (6,11). El papel de la topoisomerasa I de E. coli es difícil de estudiar por los efectos pleiotrópicos de la disfunción de la enzima. Durante la elongación de la replicación, el avance de la horquilla originará que se acumule superhelicidad positiva en la porción no replicada mientras que la porción ya replicada tenderá a tener menor superhelicidad de la

requerida para el funcionamiento cromosomal. En procariotes se ha visto que in vivo es la topoisomerasa I quien se encarga de relajar el DNA que se encuentra excesivamente superhelicoidal. A su vez, la topoisomerasa II o girasa funciona reintegrando el grado de superhelicidad a regiones de DNA que han sido relajadas. Esto es, existe un equilibrio en la actividad de estas 2 enzimas para mantener al DNA en el estado de superhelicidad adecuado (6). Para eucariotes no se ha podido aún establecer un modelo para el funcionamiento in vivo de estas enzimas y solo se tienen algunos datos sobre su posible función biológica. Por ejemplo, parece ser claro que la topoisomerasa II es indispensable para la segregación cromosomal en levaduras y la separación de replicones cromosomales (36), aunque la replicación aparentemente prosigue con o sin topoisomerasa II. A su vez, la topoisomerasa I puede faltar completamente en la célula y ésta ser viable (36).

Quizás el ejemplo más claro de la función de las topoisomerasas en eucariotes provenga de uno de sus virus. La replicación de SV 40 puede detenerse completamente por medio de campotecina, un inhibidor de topoisomerasa I, o de epipodofitotoxina VM-26, inhibidor de topoisomerasa II; así como con los anticuerpos contra cualquiera de estas enzimas (37).

Estudios in vivo en eucariotes han mostrado que altas concentraciones de novobiocina pueden inhibir la iniciación de la síntesis de DNA, ejemplo de esto se tiene en células de mamíferos y en células infectadas con adenovirus (38,39); en maíz también se ha visto afectada la síntesis (40).

ACTIVIDAD EN TRANSCRIPCION

La transcripción del DNA parece ser regulada por el grado de superhelicidad. En algunos operones procariotes como el de la lactosa y el de maltosa la transcripción se deprime al usar inhibidores de girasa, mientras que otros casi no se afectan (11). La transcripción parece ser especialmente alterada por inhibidores de DNA girasa en bacterias en esporulación (41).

En eucariotes la transcripción se puede estimular por la superhelicidad del molde. En éstos la mayoría del DNA no esta bajo la tensión de constreñimientos topológicos como en procariotes; sin embargo, una fracción podría estar en superhelicidad negativa debido al nucleosoma (11).

Estudios de oocitos de Xenopus en transcripción indican que el ensamblaje de la cromatina requiere de ATP y magnesio y se inhibe por novobiocina, por lo que también parece ser necesaria la topoisomerasa II (42, 43). Como ya se mencionó antes, la topoisomerasa I se encuentra preferencialmente en regiones activas en transcripción (11). Aún así, su función biológica no está clara.

RECOMBINACION

La topoisomerasa I puede estar involucrada en recombinación pues permite el apareamiento de hebras complementarias sin extremos y puede cortar y sellar, así como transferir hebras de DNA (11). Los sitios de corte de la topoisomerasa I de SV 40 participan en la recombinación no homóloga, pues las secuencias de corte de entrecruce tienen homología en 2 o 3 pares de bases (44).

En procariotes se ha observado que las topoisomerasas al mantener la superhelicidad del DNA pueden estimular la recombina-

ción; esto se ha visto en la integración de lambda (6), y en la transposición de Tn 5 (11).

En eucariotes la topoisomerasa I puede escindir secuencias virales integradas en tanto que la topoisomerasa II interviene en el intercambio de cromátidas hermanas (11,47).

REPARACION

En procariotes se ha descrito que en la reparación de daños al DNA por luz ultravioleta, interviene la DNA girasa (45,46). También la topoisomerasa I puede inhibirse "in vitro" cuando la luz U.V. altera la estructura del DNA.

La poli ADP-ribosilación de topoisomerasas parece estimular los procesos de reparación (31).

RELACION ENTRE GERMINACION Y DNA TOPOISOMERASAS.

Estudios realizados en el laboratorio han indicado que pueden distinguirse 2 tipos de síntesis de DNA durante la germinación temprana de maíz: una que podría considerarse como pre-replicative y que se lleva a cabo durante las primeras 6-10 horas después de la imbibición; y otra que se ha relacionado con síntesis replicativa y que ocurre después de las 10-12 horas de la imbibición. Uno de los criterios para establecer esta diferencia ha sido el uso de inhibidores de la síntesis replicativa de DNA como son ara-CTP y novobiocina.

Núcleos aislados de embriones de semillas, sobre todo de aquellas semillas cuya viabilidad se ha reducido por almacenamiento inadecuado, (que han envejecido artificialmente) muestran una clara distinción en el efecto que novobiocina causa a la síntesis

de DNA; mientras que el inhibidor no es efectivo en núcleos de embriones incubados por 0-3 horas (período pre-replicativo), la síntesis es notablemente reducida por novobiocina en los núcleos de embriones incubados por más de 15 horas (período replicativo, (40)). Independientemente de poder sugerir que existen 2 tipos de síntesis de DNA durante la germinación temprana de maíz, es importante hacer notar que novobiocina es un potente inhibidor de DNA topoisomerasas tipo II (20,48). Podría entonces sugerirse que la síntesis de tipo replicativo requiere una topoisomerasa II para que pueda llevarse a cabo mientras que la enzima no es tan importante en períodos pre-replicativos.

Ante la evidencia de la presencia de topoisomerasas en sistemas eucariotes animales (19,49,50,51,52) y más recientemente en vegetales (16,53), decidimos iniciar la búsqueda de este tipo de enzimas en maíz, siendo nuestro modelo el eje embrionario de maíz durante las primeras horas de la germinación. El aislamiento parcial y caracterización se describirá a continuación.

OBJETIVOS

1. Detectar la actividad de topoisomerasas en maíz.
2. Optimizar el ensayo adecuado para medir su actividad
3. Establecer la metodología para el aislamiento de las enzimas
4. Caracterizar la actividad de la(s) enzima(s) encontrada(s).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. Maíz variedad Chalqueño fue amablemente proveído por PRONASE, Coyoacán, México D.F.

Sustancias Químicas. Tritón X-100, Pronasa, Proteinasa K, polietilenglicol, PMSF, Azul de Coomassie, acrilamida, bis-acrilamida, DEAE-celulosa, Sephadex G-150 y Sepharosa 6B se adquirieron en Sigma Chemicals Co., St. Louis Missouri, USA. Hind III y pBR 322 se adquirieron en Amersham, Bucks., U.K. SDS se compró en Merck, México; Agarosa M. Trisacril y Ultrogel HA fueron de LKB, Uppsala, Suecia; TEMED y HTF se adquirieron en Bio Rad, USA y finalmente fosfocelulosa P-11 se adquirió en Whatman. Otros reactivos fueron de grado analítico.

Aparatos.

Homogenador Polytron Kinematica CMBH (Lucerna, Suiza).

Fuente de voltaje AV-ZEV, Electrónica Vimar.

Aparato de electroforesis LMB MS29, Cambridge, Inglaterra.

Aparato de electroforesis Bio Rad Dual Vertical slab modelo 220.

Transiluminador de ultravioleta, Ultraviolet Products Inc. San Gabriel Calif., USA.

Baño con temperatura controlada J.M. Ortiz.

Balanza analítica Mettler.

Potenciómetro Sargent Welch modelo PBL

Colector de Fracciones LKB Ultrorac 7000.

Refrigerador American.

Espectrofotómetro Pye Unicam SP6-550 UV/Visible.

Microfuga Beckman

Centrifuga Clínica MSE modelo LR6

Centrifuga clínica Damon/IEC Division

Centrifuga Beckman J2-21

Centrifuga Beckman L-50

Centrifuga Beckman L-5-75

Amortiguadores

Amortiguador de Imbibición (para ejes embrionarios).

KCl 50 mM

MgCl₂ 10 mM esterilizar a 121°C, 15 min. 15 Psi

Tris/HCl 50 mM pH 7.6

Sacarosa 2% (Stock 25%). Esterilizar a 110°C, 10 min.

Cloranfenicol 10 µg/ml (stock 2 mg/ml). Esterilizar por filtración.

Amortiguador de extracción de núcleos.

Sacarosa 0.3 M Tris/HCl 15 mM, pH 7.4

KCl 10 mM espermina 0.15 mM

NaCl 15 mM espermidina 0.5 mM

B-mercaptoetanol 15 mM

Amortiguador de lisis

NaCl 0.4 M EDTA 10 mM

NaOH 0.15 M pH 13.0

Amortiguador para homogeneización

Tris/HCl 50 mM pH 7.6 B-mercaptoetanol 1 mM

KCl 25 mM Sacarosa 0.25 M

MgCl₂ 1 mM PMSF 0.1 mM

Amortiguador de diálisis (extracto protéico)

Tris/HCl 50 mM pH 7.6 Glicerol 10%

MgCl₂ 10 mM PMSF 0.1 mM

B-mercaptoetanol 1 mM

Amortiguadores para Hidroxiapatita

Amortiguador de muestra

NaPi pH 7.1 15 mM glicerol 10%
B-mercaptoetanol 0.5 mM PMSF 1 mM
Bisulfito de sodio 10 mM Tritón X-100 0.01%

Amortiguador de lavado. El de muestra pero con 0.1 mM de PMSF y 100 mM NaCl.

Amortiguador de elusión (Gradiente). El de muestra pero con 0.1 mM PMSF y 200 mM KPi para la concentración inicial y KPi

Amortiguador para Ultrogel HA

De diálisis y resuspensión de muestra

Glicerol 10% B-mercaptoetanol 0.5 mM
KPi pH 7.2 50 mM PMSF 0.1 mM

De lavado. Igual al de diálisis excepto por el KPi que es 100 mM. El gradiente lineal se hace en el amortiguador de lavado pero con una concentración inicial de KPi de 100 mM y una final de 500-600 mM.

Amortiguador S (Sephadex G-150)

KPi pH 7.2 70 mM glicerol 25%
B-mercaptoetanol 0.5 mM PMSF 0.1 mM

Amortiguador de ensayo para Topoisomerasas

Tris/HCl pH 8.0 10 mM
KCl 50 mM se esteriliza por filtración
MgCl₂ 10 mM
BSA 160 µg/ml
ATP 1 mM se esteriliza por filtración

Solución SE

SDS 0.77%

EDTA 77 mM

Amortiguador para Proteinasa K

Proteinasa K 625 µg/ml CaCl₂ 1 mM

Tris/HCl pH 7.9 50 mM

Amortiguador para Hind III (10 X)

Tris/HCl pH 7.5 66 mM MgCl₂ 66 mM

B-mercaptoetanol 70 mM NaCl 0.5 M

Amortiguador para Eco RI (10 X)

Tris/HCl pH 7.5 1.0 M MgCl₂ 0.05 M

NaCl 1.0 M

Amortiguador para parar la reacción (enzimas de restricción)

Urea 6 g

Azul de bromofenol en agua 0.5%, 1 ml

Xilen cianol en agua, 0.5%, 1 ml

Agua destilada 8 ml

Medios para crecimiento bacteriano

Medio Luria (por litro)

Triptona o peptona de caseina purificada 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

NaOH 1.0 N 2.5 ml

Esterilizar a 121°C, 15 min 15 Psi

Medio M-9

MgSO₄ 0.1 M 10 ml CaCl₂ 0.01 M 10 ml

Casaminoácidos 20%, 20 ml Agua destilada 825 ml

Amortiguador para gel concentrador

Tris/HCl pH 6.8 0.25 M

SDS 0.2%

Amortiguador de corrida

Tris 4.54 g

L-glicina 21.4 g pH 6.8

SDS 1.5 g

Aforar a 1.5 l.

Amortiguador "cracking"

CHES/NaOH pH 9.8 5 mM SDS 2%

B-mercaptoetanol 60 mM. glicerol 15%

Azul de bromofenol 0.005%

METODOS

Imbibición de ejes embrionarios de maíz.

Los ejes (200-1200) se disecan de la semilla de maíz en estado seco, no germinados y se ponen a imbibir entre 2 discos estériles de papel Whatman No. 1, en un tubo de cultivo estéril, con amortiguador de imbibición estéril. Se dejan incubar a 27°C por 24 h.

Extracción de núcleos y lisis.

A ejes embrionarios se les agrega amortiguador de extracción de núcleos (3 ml/400 mg) y se homogenan en un mortero pre-enfriado. El homogenado se diluye agregando una porción del mismo amortiguador (10 ml/400 mg) y se filtra a través de 3 capas de Miracloth (donado por el M. en C. R. Aguilar); el residuo se lava con 10 ml del mismo amortiguador. Al filtrado se le agrega Tritón X-100 hasta una concentración de 0.05% y entonces se centrifuga a 625 g por 6 min. El botón obtenido se lisa con 0.2 ml de amortiguador de extracción y 0.8 ml de solución de lisis, dejándolo a temperatura ambiente por 3 horas. El lisado se diluye a 3 ml y se centrifuga a 100,000 g por 2 horas.

Preparación del extracto protéico.

Ejes embrionarios (1000) se homogenan en un mortero pre-enfriado o con un Polytron PCU-2 a toda velocidad por 25 seg, con 40 ml de amortiguador para homogeneización. el homogenado se centrifuga 2 veces a 5000 rpm por 15 min, se reextrae el precipitado con el mismo amortiguador y se vuelve a centrifugar a la misma velocidad. El sobrenadante resultante se centrifuga a 100 000 g por 2 horas.

Precipitación de ácidos nucleicos.

Para remover ácidos nucleicos, tanto en el sobrenadante del lisado de extracción de núcleos, como en el del extracto protéico, se utilizan 10 μ l de protamina (5% en agua) por ml de extracto utilizado y se agrega poco a poco con agitación continua por 30 min a 4°C. Finalmente se centrifuga a 13 000 rpm por 10 min.

Precipitación con sulfato de amonio.

Se mide el volúmen de la muestra que se quiere precipitar y se agregan 209 mg de sulfato de amonio por ml de muestra (35%), lentamente y con agitación continua, en frío.

La suspensión se centrifuga a 13 000 rpm por 10 min, se desecha el precipitado y el sobrenadante se recupera y se le agregan 430 mg de sulfato de amonio por ml de muestra (65%) en las mismas condiciones descritas antes. El paquete protéico obtenido después de la centrifugación es resuspendido en 1 ml de amortiguador de diálisis y se dializa toda la noche contra amortiguador de diálisis (1 litro) a 4°C.

Preparación de Sepharosa-novobiocina.

Para acoplar la novobiocina a la sepharosa se sigue el método descrito por Staudenbauer y Orr (48) que consiste en lo siguiente:

1. Se hidrata 1 g de epoxi-sepharosa 6-B (que contiene un grupo espaciador hidrofílico para acoplamiento directo al ligando), con 100 ml de agua destilada por 1 hora a temperatura ambiente.
2. La resina se pone en un embudo de vidrio y se lava con 100 ml de carbonato de sodio 0.3 M, pH 9.5.
3. Una vez lavada, la sepharosa se mezcla con 100 mg de novobiocina en 3 ml de carbonato de sodio 0.3 M pH 9.5 y se agita suavemente

por 16 horas a 37°C en un baño de agua.

4. A continuación se bloquean los grupos epoxi en exceso, con etanolamina que queda en una concentración final de 1 M. Se continúa la agitación por otras 4 horas a 37°C.

5. Se lava con 100 ml de NaCl 0.5 M en carbonato de sodio 0.3 M, pH 9.5 y después se pasan 100 ml de agua destilada.

6. Finalmente se lava con 100 ml de NaCl 0.5 M en acetato de sodio 0.1 M pH 4.0 y posteriormente 100 ml de agua destilada.

Una vez preparada la sepharosa-novobiocina, se monta en una jeringa de plástico y se equilibra con 30 ml de amortiguador SN que contiene Tris/HCl pH 7.0, 50 mM; MgCl₂ 20 mM, KCl 150 mM, DTT 3 mM, PMSF 2 mM y glicerol 10%.

Se carga la muestra y se lava con 52 ml del mismo amortiguador. Para eluir se utilizan 10 ml de amortiguador SN pero conteniendo 200 mg/ml de novobiocina y se para el flujo de la columna por toda la noche para colectar el eluido a la mañana siguiente; éste se concentra y se dializa contra el mismo amortiguador pero sin novobiocina.

Preparación de hidroxiapatita (HTP)

Las soluciones amortiguadoras se preparan con agua recién hervida para minimizar el CO₂ disuelto.

La resina se hidrata añadiendo una parte de HTP por 6 de amortiguador de diálisis de Ultrogel HA y se agita suavemente; se deja clarificar por 10 min y se decanta removiendo los finos. Se añade un volumen igual del amortiguador anterior y se hace una segunda decantación. Se resuspende con un volumen igual del amortiguador y se prepara la columna.

El gradiente lineal se hace en el amortiguador de lavado para HA pero con una concentración inicial de 100 mM KPi y una final de 500-600 mM KPi.

Preparación de Ultrogel HA

Se monta directamente ya que no necesita ningún tratamiento. Los amortiguadores utilizados son previamente desgasificados.

Preparación de Sephadex G-150

El sephadex se hincha en un exceso de amortiguador S previamente desgasificado, por 48-72 horas a temperatura ambiente. Se monta la columna lentamente y se equilibra con amortiguador S. Una vez equilibrada, se pone la muestra cuyo volumen no debe de ser más del 5% del volumen total y se eluye con 2 volúmenes del mismo amortiguador.

Concentración de muestras

Para concentrar las muestras, éstas se ponen en bolsas de diálisis en presencia de PEG 6000 a 4°C hasta obtener el volumen deseado.

Preparación de bolsas de diálisis

Las bolsas de diálisis se hierven 2 veces por 10 min cada vez en bicarbonato de sodio, agitando periódicamente. En seguida se hierven 2 veces por 10 min cada vez en EDTA 5 mM. Finalmente se guardan en 5 mM EDTA y 10% de etanol.

Ensayo de actividad de topoisomerasa

Se utiliza como sustrato un DNA circular cerrado superhelicoidal (plásmido pBR 322). Al actuar la topoisomerasa sobre este sustrato, se produce un DNA relajado que corre más lentamente en un gel de agarosa que el DNA superhelicoidal inicial (fig. 6).

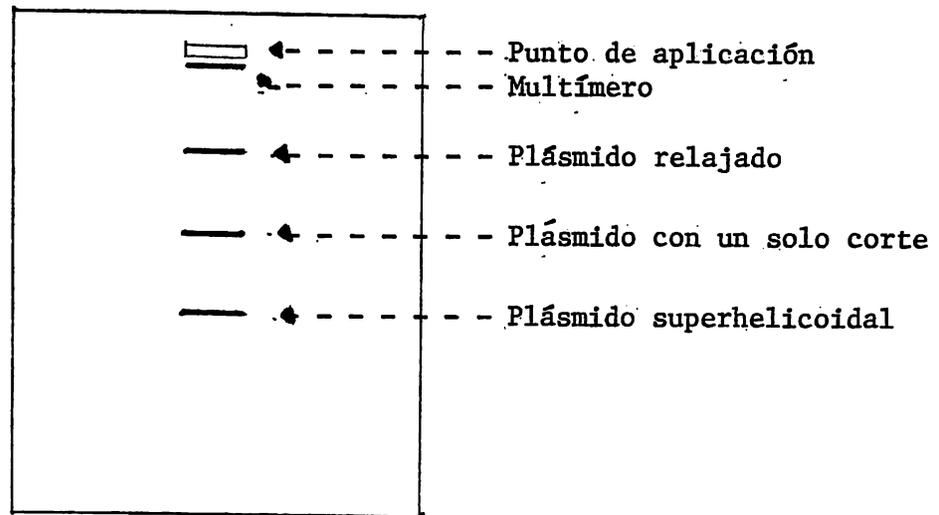


Fig. 6. Electroforesis en agarosa de diferentes estados topológicos de un plásmido.

Plásmidos abiertos (cortados) o multímeros de plásmidos también pueden detectarse en este gel. Los patrones de corrimiento de las diferentes formas de DNA en geles de agarosa, se han descrito en trabajos como los de Johnson y Grossman (64). Para el estudio de la actividad enzimática, la mezcla de reacción tiene un volumen total de 15 μ l y contiene un décimo del volumen de amortiguador de reacción (10 X) 3 μ l de ATP (opcional), 0.2-0.3 μ g de plásmido pBR322 superhelicoidal, 5 μ l de extracto enzimático y lo que falte para 15 μ l se completa con agua destilada estéril. La mezcla se incuba a 30°C por 1 hora o el tiempo indicado dependiendo del ensayo de que se trate.

Al terminar el tiempo de la reacción, ésta se para con 1 μ l y solución SE y posteriormente se agrega 1 μ l de proteinasa K incubando por 30 min a 37°C para eliminar las proteínas presentes que pudieran interferir con el ensayo. Alternativamente se puede desproteínizar la mezcla de reacción con fenol-cloroformo de la siguiente manera: se agrega un volumen de fenol saturado con 0.5 ml de NaCl, se agita y se añade un volumen de cloroformo; se centrifuga y se colecta la fase acuosa a la que se le agrega un volumen de cloroformo, se centrifuga y a la fase acuosa se le agrega 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M más 2 volúmenes de etanol absoluto frío; se deja en hielo seco de 15-60 min, se centrifuga y el DNA precipitado se resuspende en agua o amortiguador.

La medición de la actividad enzimática fue cualitativa, ya que carecíamos de un densitómetro, que nos indicara las cantidades de las diferentes formas topológicas del DNA. La forma en que observamos la actividad fue cuando la banda del plásmido super-

helicoidal desaparecía y aparecía otra en el sitio del plásmido relajado.

Digestión con enzimas de restricción

La mezcla de reacción se prepara en el volumen deseado, generalmente 15 μ l y se compone de DNA (0.3 μ g o la cantidad a usarse), la décima parte del amortiguador (10 X) apropiado y la enzima de restricción, cuyo volumen no debe exceder al del amortiguador que se use. Se agrega agua destilada para llevar la mezcla de reacción al volumen deseado. La mezcla se incuba comúnmente a 37°C por 30 min, dependiendo de la actividad de la enzima y se para la reacción usando un quinto del volumen de mezcla para detener la reacción, o cuando es necesario se extrae la proteína como se describió arriba.

Aislamiento de plásmidos

Se siguió el método de Maniatis (54).

Electroforesis en agarosa

La electroforesis se hace en un aparato de electroforesis horizontal para geles sumergidos, utilizando 40 ml de agarosa al 0.8% en TBE. Para correr el gel se utilizan 50 ml del mismo amortiguador. Las muestras tienen un volumen de 15-20 μ l para finalizar la reacción se les agregan 5 μ l de mezcla para detener la reacción.

La electroforesis se realiza a voltaje constante de 30 volts por 4 horas con refrigeración. Al terminar la electroforesis los geles se tiñen con bromuro de etidio (0.4 μ g/ml) durante 15 min y se observan en un trans-iluminador de luz U.V.

Electroforesis en acrilamida

Se siguió la técnica de Laemmli y Favre (55).

Determinación de proteínas

Se utilizó la técnica de Lowry modificada por Peterson (56).

Determinación de proteínas por el método espectrofotométrico (57)

Este método es muy rápido y puede usarse bajo condiciones tales como la presencia de sulfato de amonio que dificulta otros métodos. Da buenos resultados siempre y cuando la mezcla no esté turbia y no contenga más del 20% de ácidos nucleicos. Lo que se hace es medir la densidad óptica a 260 y 280 nm y aplicar la siguiente fórmula:

Concentración de proteína (mg/ml) = $1.45 \text{ DO}_{280} - 0.74 \text{ DO}_{260}$

RESULTADOS

Para la búsqueda de la actividad de DNA topoisomerasa, se usaron extractos protéicos de ejes embrionarios imbibidos por 24 horas. Se escogió este tiempo debido a que en esta etapa la síntesis de DNA es muy pronunciada (figura 2) sugiriendo que las células deben de encontrarse en plena fase S.

Primero se probaron dos alternativas para la incubación del material biológico: semillas completas que después de su imbibición se les disecaba el eje embrionario; o bien, ejes embrionarios disecados e imbibidos por 24 horas. Es más fácil aislar el eje embrionario de una semilla imbibida que de una semilla seca, además de que si se rompe el eje, aún se puede utilizar el material, pues ya fue imbibido; lo que no se puede controlar con exactitud es el tiempo de incubación pues existirán diferencias en lo que se tarde uno en sacar el primero y el último eje embrionario del lote. Por otro lado, al sacar los ejes embrionarios de semillas no imbibidas nos aseguramos de que todos los ejes embrionarios tengan el mismo tiempo de incubación. Finalmente se escogió esta última opción para los experimentos que se describirán a continuación. Debe hacerse notar que en cada uno de los pasos de purificación seguidos, se probó la actividad de topoisomerasa en cada fracción obtenida.

El siguiente paso fue decidir si aislar la actividad de topoisomerasa de extractos nucleares o de extractos protéicos totales. Después de varios experimentos, la conclusión fue que conviene más trabajar con el extracto total, pues es más rápida la extrac-

ción de la enzima y se mantiene por más tiempo la actividad de topoisomerasa. Al utilizar núcleos el rendimiento es muy bajo, aún partiendo de 1200 ejes embrionarios. Por otro lado, el extracto protéico de solo 100-300 ejes embrionarios es suficiente para obtener actividad estable.

De extractos protéicos y utilizando un promedio de 200 ejes embrionarios se logró observar la actividad de topoisomerasa, es decir, la relajación del plásmido superhelicoidal. Según se observa en la figura 7, se detectó actividad de topoisomerasa I en los carriles 3 y 4 ya que el plásmido fue totalmente relajado en presencia y ausencia de ATP. No obstante, la presencia de novobiocina (carril 2) provoca una inhibición parcial de la actividad. Como se mencionó anteriormente, la novobiocina es un inhibidor de topoisomerasa tipo II. Lo que el resultado anterior sugería es que podría haber 2 tipos de topoisomerasas en el extracto protéico, quizás siendo mayoritaria la de la topoisomerasa tipo I. Al usar como fuente de enzima el extracto crudo, esto es, el extracto previo a la centrifugación post-ribosomal, se observó actividad nucleolítica y sólo una leve actividad de topoisomerasa (carril 5).

Desde los primeros intentos por medir la actividad enzimática se observó que era importante que al preparar el extracto protéico todo fuera lo más rápido posible pues sobre todo en el paso del centrifugado post-ribosomal, cualquier retardo ocasionaba que la actividad se perdiera.

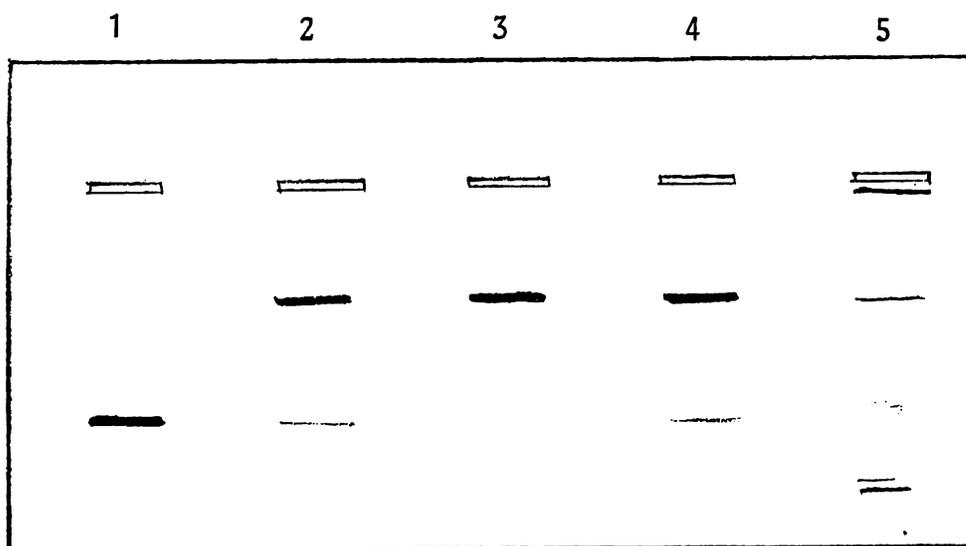


Fig. 7. Actividad de topoisomerasa en extractos protéicos.

1, control pBR 322 sin fuente de enzima; 2, extracto protéico dializado en presencia de ATP y novobiocina (400 µg/ml); 3, extracto protéico dializado en ausencia de ATP; 4, extracto protéico dializado en presencia de ATP; 5, extracto crudo antes de la centrifugación diferencial.

Después del centrifugado post-ribosomal se removían los ácidos nucleicos con protamina para evitar interferencias en las columnas (19), así como en los ensayos de actividad.

Como siguiente paso en la purificación de la enzima se hicieron una serie de precipitaciones con sulfato de amonio para enriquecer más las actividades. Las precipitaciones fueron de 20, 40, 60, 70 y 80%, encontrándose actividad en las de 40% y 60%, por lo que se escogió el rango de 35-65% de precipitación como la fuente enzimática. En esta fracción se resuspendió en el amortiguador de diálisis cuya composición varió dependiendo de la columna a utilizarse (materiales y métodos). La fracción se dializó toda la noche.

Columna de Sepharosa-novobiocina

En un principio la idea de separar a las topoisomerasas, especialmente a la tipo II, en pocos pasos usando una columna de afinidad como la de sepharosa-novobiocina parecía muy atractivo, sobre todo teniendo como antecedentes: a) el aislamiento de la girasa en bacterias (48, 58) y la topoisomerasa II de ratón (59) mediante este gel; b) la inhibición de la síntesis de DNA en maíz por novobiocina encontrada en el laboratorio (40) y c) la posible inhibición de la actividad de topoisomerasa por novobiocina en los extractos protéicos descritos anteriormente (fig. 7). Así, se procedió a la preparación de la columna de sepharosa-novobiocina como se describe en materiales y métodos.

La sepharosa 6B epoxi-activada tiene un grupo espaciador hidrofílico para acoplarse con ligandos que contengan grupos hidroxilos, aminos o tioles; en el caso del ligando novobiocina la unión es muy probablemente en un grupo hidroxilo que se une al

grupo oxirano activo libre de la sepharosa (60).

Para comprobar la unión de novobiocina a la sepharosa, se igualaron las lecturas espectrofotométricas de 540 nm, de muestras de sepharosa en amortiguador y de sepharosa-novobiocina en el mismo amortiguador igualando así la máxima turbidez de ambas muestras. Después se leyó a 300 nm que es donde la novobiocina tiene un pico de absorción, según se muestra a continuación:

Longitud de onda (nm)	Sepharosa en amortiguador#	Sepharosa novobiocina
540	0.02	0.02
300	0.004	1.40

= Promedio de 3 lecturas.

De esta manera se comprobó que la novobiocina se había unido a la resina. Se procedió entonces a bloquear los grupos epoxi de la sepharosa para que quedara preparada la columna y montarla en una jeringa de plástico.

Para probar la columna se partió de 200-300 ejes embrionarios, de los que se obtuvo un extracto protéico total al que se le removieron los ácidos nucleicos, se dializó toda la noche contra amortiguador de diálisis y el dializado se centrifugó a 3000 rpm por 20 min; se pasó por la columna, se lavó y se eluyó con el amortiguador apropiado (materiales y métodos); el eluido se concentró desde 10 hasta 2.5 ml y se dializó. El eluido se usó como fuente de actividad enzimática. Sin embargo en ningún caso se pudo determinar presencia de topoisomerasa II, ni en el eluido ni en el lavado. Por otro lado, en la fracción proteica no retenida en la columna no se pudo determinar presencia de topoisomerasa II aunque se detectó actividad de topoisomerasa I, según se muestra

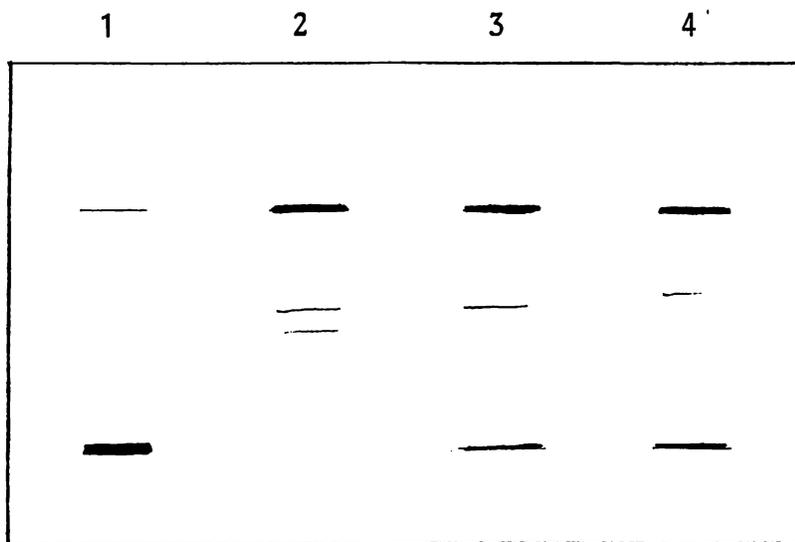


Fig. 8. Columna de Sepharosa-novobiocina. Carriles 1, control pBR 322; del 2 al 4, actividad de topoisomerasa de la fracción protéica no retenida por la columna: 2, en presencia de ATP y 400 $\mu\text{g/ml}$ de novobiocina; 3, sin ATP y sin novobiocina; 4, con ATP y sin novobiocina.

en la figura 8. La enzima es activa tanto en presencia como en ausencia de ATP y/o novobiocina (carriles 2, 3 y 4).

Podría pensarse que finalmente la novobiocina no tiene afinidad por la topoisomerasa II o bien que la enzima es muy lábil y su actividad decae rápidamente; no obstante, cualquier explicación que fuere, decidimos cambiar de metodología y usar resinas de intercambio iónico. Se utilizaron como primera o segunda columnas, resinas como fosfoceulosa que se ha utilizado en la purificación de topoisomerasa II de células HeLa y topoisomerasas I de U. maydis; Trisacryl y DEAE-celulosa. Sin embargo, su velocidad o capacidad de resolución fueron deficientes y no se utilizaron más en la purificación debido al problema ya mencionado de la rápida inactivación de nuestras enzimas.

Hidroxiapatita (HTP)

Esta resina es un intercambiador catiónico y se ha utilizado para aislar topoisomerasa I de células HeLa (52), y de eritrocito de pollo (51,61) como primera columna, así como la topoisomerasa II de D. melanogaster como segunda columna (19).

Se utilizaron primero columnas de polipropileno Bio-Rad (no. cat. 731-1110) con volúmenes de resina de 2 ml para los ensayos iniciales, utilizando los amortiguadores descritos para hidroxapatita. Cuando se aumentó la cantidad de ejes embrionarios se utilizaron columnas de vidrio de 1 x 10 cm con un volumen de resina de 7 ml. Lo que se hizo fue equilibrar la columna, cargar la muestra, lavar la resina con 7 volúmenes de columna de amortiguador de lavado para posteriormente pasar el gradiente de elusión de 0.1 a 0.6 M KPi pH 7.1. Al principio se usaron 15 volúmenes de

columna, pero después se vió que 8 volúmenes eran suficiente con un gradiente de 0.1 a 0.5 M KPi.

Al eluir las proteínas de esta columna se encontraron dos picos de actividad de topoisomerasa (fig. 9), una que eluyó entre 0.16 y 0.22 M de KPi y presentó actividad de topoisomerasa I y otra que eluyó entre 0.4 y 0.44 M con aparente actividad de topoisomerasa II, la cual fue muy inestable y perdió la actividad muy rápido.

Debido a que el tiempo de elusión parecía ser el factor limitante para aislar a la topoisomerasa II con suficiente actividad, se buscó la manera de mejorar la velocidad de flujo de la resina y por tanto se utilizó hidroxapatita unida a celulosa microcristalina. Con esta nueva resina el flujo mejoró ligeramente e incluso se pudo obtener actividad de topoisomerasa tipo II más estable. Aún así, el flujo siguió siendo muy lento por lo que se buscó un tercer tipo de resina con un soporte más poroso y de mejor flujo.

Ultrogel HA

Otro tipo de soporte que usa hidroxapatita es agarosa, y la resina obtenida, conocida comercialmente como Ultrogel HA se compone de una matriz de esferas de agarosa con uniones entrecruzadas dentro de la cual se encuentran distribuidas regularmente microcristales de hidroxapatita. Esta resina se ha utilizado en la purificación de topoisomerasa I de U. maydis (14).

Con el Utrogel HA el flujo es rápido manteniendo buena resolución, por lo que es muy recomendable su uso para la extracción de nuestras actividades. Se usaron así columnas de Ultrogel HA de 1.1 x 10 cm y con un flujo de 1 ml/min.

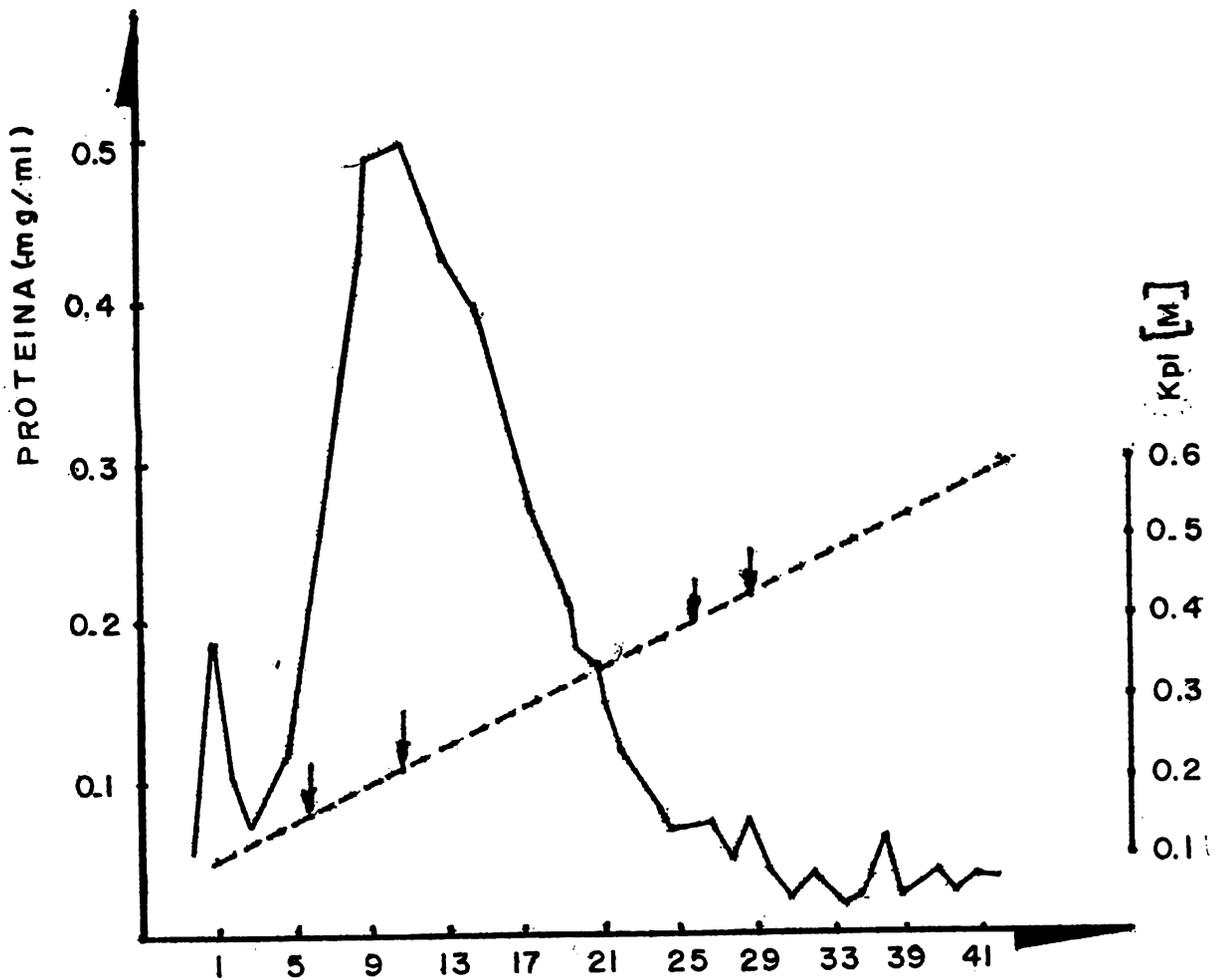


Fig. 9. Patrón de elusión en hidroxiapatita.

En una columna de 1 x 10 cm., con un volúmen de hidroxiapatita de 7 ml, se aplicó la muestra de 1 ml, se lavó con amortiguador de lavado (7 vol.) y se eluyó con un gradiente de KPi de 0.1 a 0.6 M KPi (8 vol.). La actividad eluyó entre 0.16 y 0.22M KPi y entre 0.4 y 0.44 M KPi

Usando esta resina, la muestra se cargó, se lavó con 30 ml de amortiguador HA y las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente de KPi de 0.1 a 0.5 M. La actividad de topoisomerasa eluyó entre 0.19 y 0.27 M de KPi (fig. 10). Esta resina fue utilizada como primera columna en la purificación de las enzimas.

Sephadex G-150

Esta resina de exclusión molecular separa moléculas de peso molecular de 5000 a 300 000 y se ha utilizado como 2a. columna en el aislamiento de topoisomerasas I y II de coliflor (16) así como la tipo I de hígado de rata (50), y fue utilizada en el proceso de purificación de nuestras actividades como 2a. columna dando buenos resultados.

Se usaron columnas de 0.6 x 30.5 cm con un volumen de resina de 7 ml y con un flujo de 3 ml/hr. La muestra proveniente de las fracciones con actividad de la primera columna, antes de pasarse con el gel fue concentrada a aprox. 5% del volumen total del gel, es decir, 0.35-0.5 ml, mediante PEG 6000 y luego eluida con 2 volúmenes (14 ml) de amortiguador S. De esta manera se pudieron separar 2 actividades de topoisomerasa: actividad de topoisomerasa I salió en la fracción 5, mientras que actividad de topoisomerasa II salió en la fracción 3, sugiriendo esto que la tipo II tiene un mayor peso molecular. La figura 11 muestra el patrón de elusión en Sephadex.

De las fracciones con actividad de las columnas que se utilizaron, se hicieron geles de acrilamida-SDS. De las fracciones provenientes de hidroxapatita se enriquecieron unas bandas con peso molecular cercano a 56000, 94000 y más de 94000 (no mostrado).

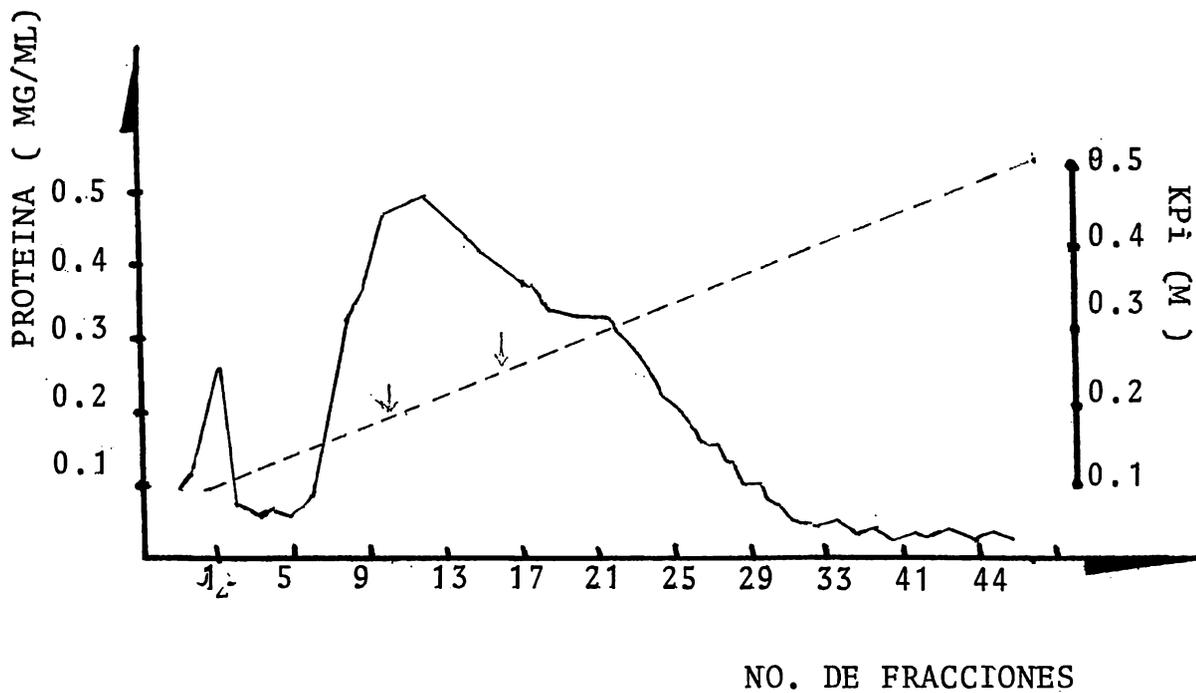


Fig. 10. Patrón de elusión en Ultrogel HA.

En una columna de 1.1×10^6 μm , con un volumen de resina de 7 ml se aplicó la muestra de 1.5 ml, se lavó con amortiguador de lavado HA (7 volúmenes) y se eluyó con un gradiente de KPi de 8 volúmenes de columna, con un flujo de 1 ml/min. La actividad eluye entre 0.19 y 0.27 H KPi.

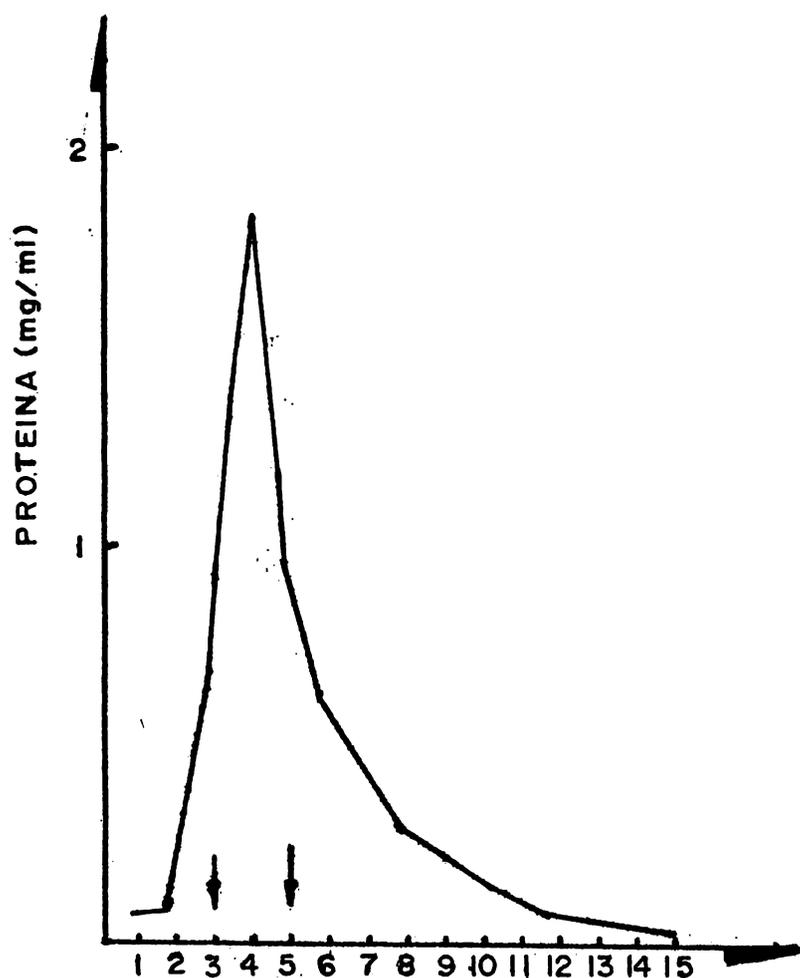


Fig. 11. Perfil de elusión en la columna de Sephadex G-150.

En una columna de 0.6 x 30.5 cm, con un volumen de resina de 7 ml, se aplicó la fracción con actividad de Ultrogel HA concentrada a 0.4 ml y se eluyó con 2 volúmenes de columna (14 ml) de amortiguador S. El flujo de la columna fue de 3 ml/hr. La actividad de la topoisomerasa I eluyó en la fracción 5 y la actividad de la topoisomerasa II en la fracción 3.

Cuando se corrieron las fracciones con actividad obtenidas del Ultrogel HA, se enriquecieron 4 bandas que en orden de intensidad eran de peso molecular igual a 55500, 94000, 62000 y 75000 como se muestra en la figura 12. Estos pesos son muy semejantes a los de las proteínas que eluyeron de hidroxapatita y seguramente algunos de estos corresponden a los de las topoisomerasas.

Las fracciones con actividad eluidas de Ultrogel HA se concentraron y se pasaron por Sephadex G-150; a su vez, las fracciones que presentaban actividad se corrieron en geles de acrilamida-SDS y el resultado se muestra en las figuras 13 y 14.

Es interesante hacer notar en la fig. 13 que las bandas que se intensifican en el carril 5 que corresponde a la fracción 5 tienen un peso molecular de >94000, cerca de 94000 y 56000, así como una banda de 20000 que podría ser un producto proteolítico. En la fig. 14 se pueden observar bandas con peso molecular mayor de 94000, y en el carril 5 que corresponde a la fracción 3 de Sephadex.

Finalmente, la fig. 15 muestra el esquema de purificación seguido para la obtención de la actividad de la topoisomerasa, brevemente consiste en homogenar los ejes embrionarios; al homogenado quitarle lípidos y partículas muy grandes, mediante centrifugaciones a baja velocidad para después volver a centrifugar y obtener un sobrenadante postribosomal, al cual se le remueven los ácidos nucleicos con protamina. Posteriormente se selecciona la fracción protéica que precipita con sulfato de amonio entre 30 y 65%, después de dializarla se pasa por Ultrogel-HA para obtener las fracciones con actividad de topoisomerasa; estas fracciones se concentran y pasan a una columna de sephadex de donde se obtienen las

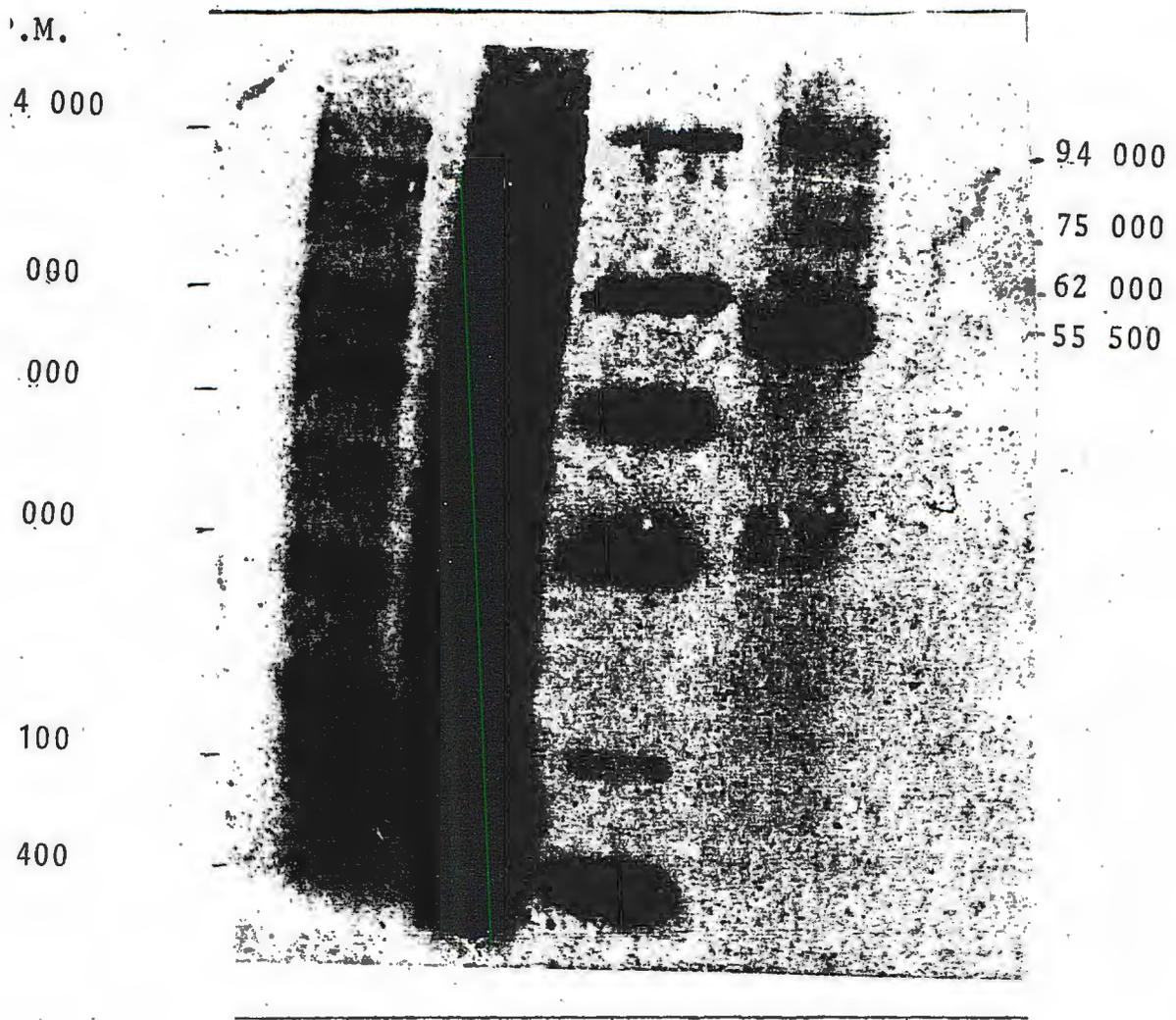


Fig. 12. Gel de Poliacrilamida-SDS. Carril 1, sobrenadante post-ribosomal; 2, precipitación con sulfato de amonio de 30-65%, 3, estándares de proteínas y 4, fracción con actividad de topoisomerasa I eluída de Ultrogel HA.

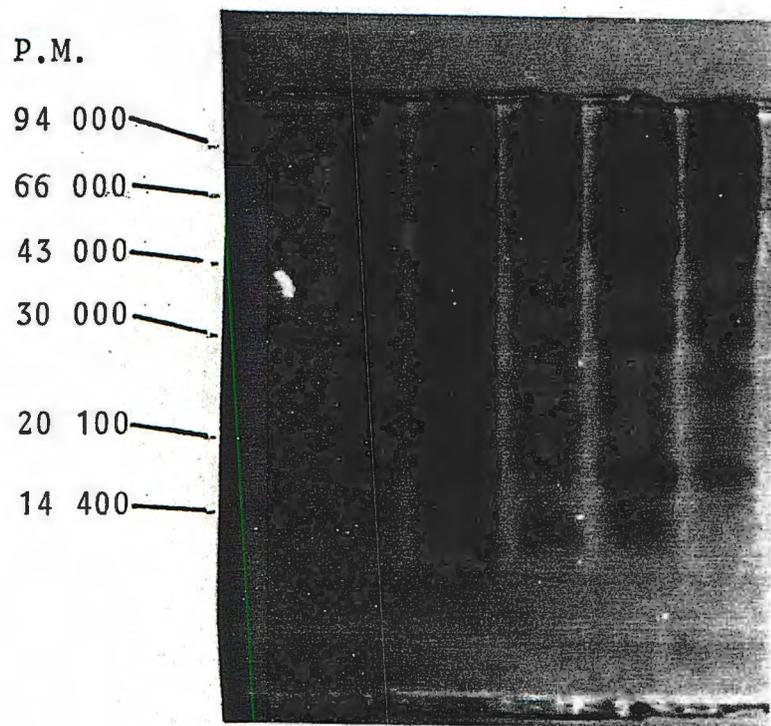


Fig. 13. Gel de poliacrilamida-SDS. Carril 1, estándares de proteínas; 2, sobrenadante post-ribosomal; 3, precipitación con sulfato de amonio de 30-65%; 4, fracción con actividad de Ultrogel HA; 5, fracción 5 de sephadex; 6, fracción 4 de Sephadex.

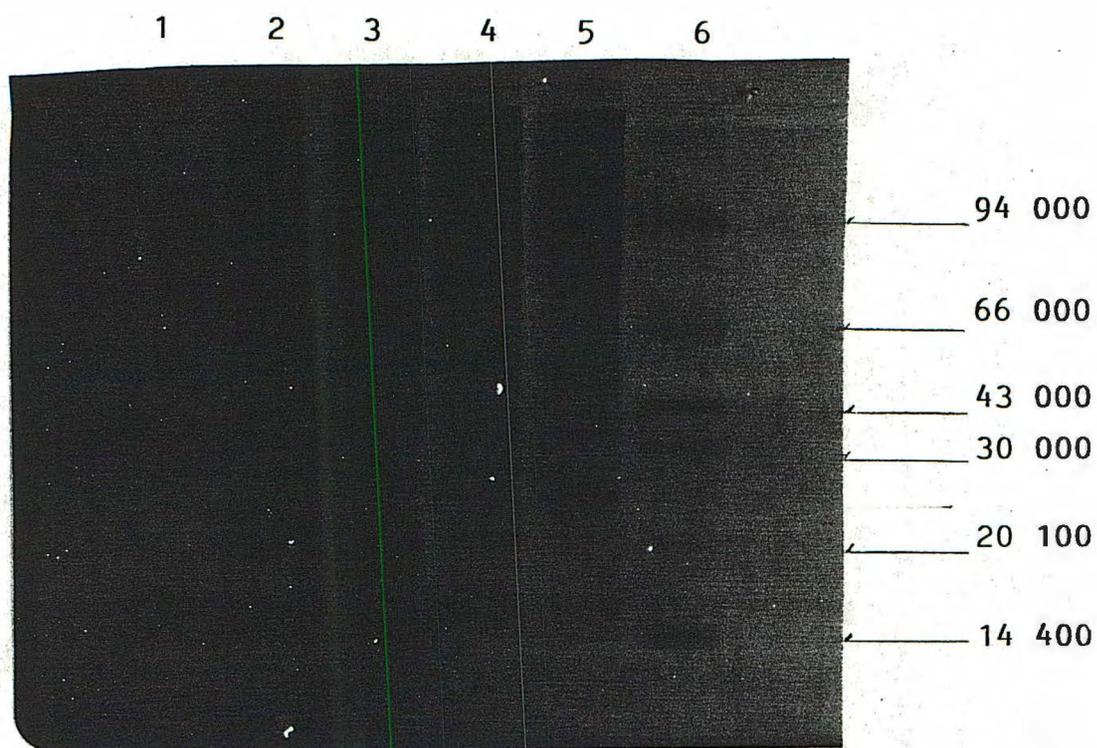
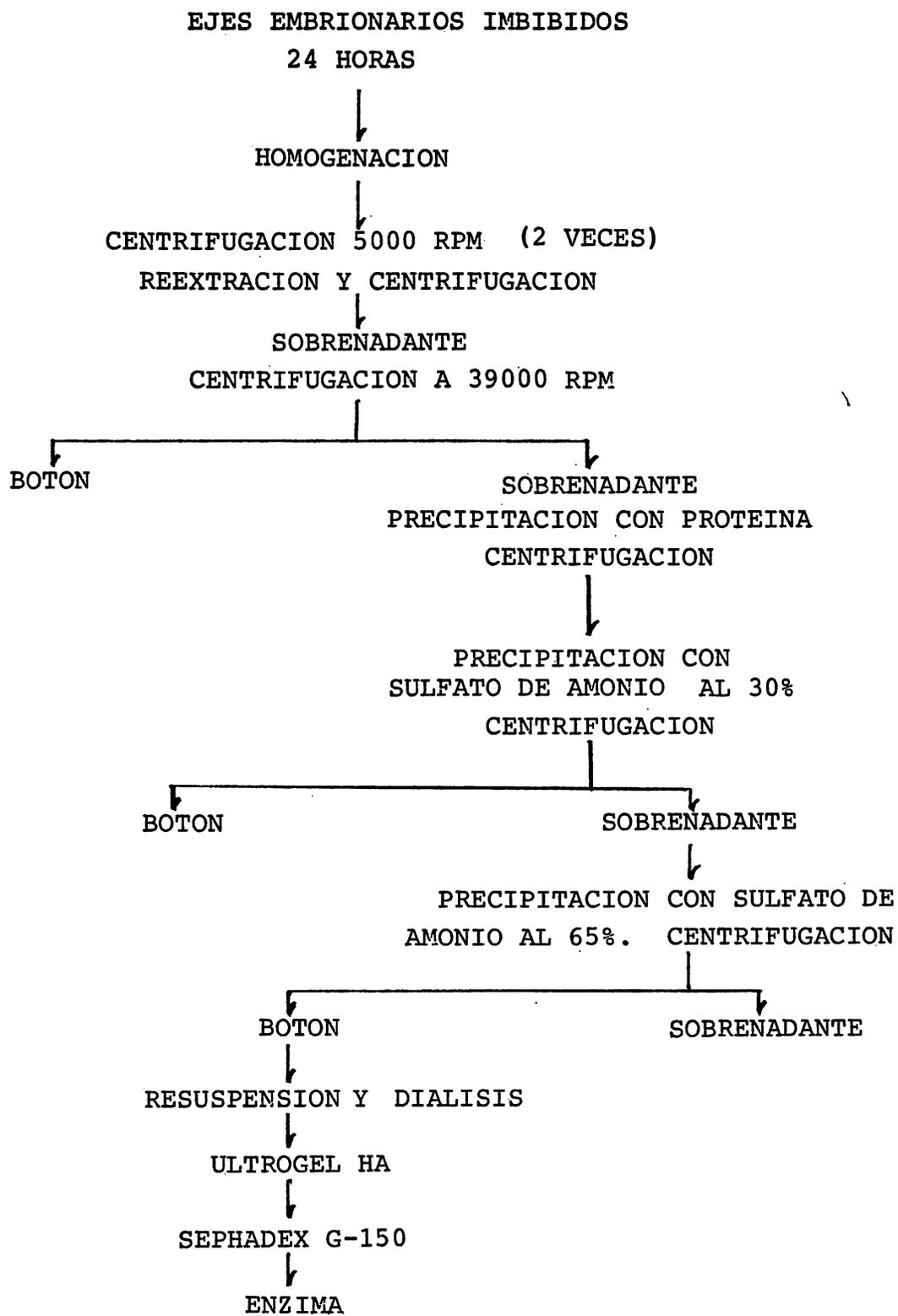


Fig. 14. Gel de acrilamida-SDS. Carriles 1 y 6, estándares de proteína; 2, sobrenadante post-ribosomal; 3, precipitación con sulfato de amonio; 4, fracción con actividad de Ultrogel HA; 5, fracción 3 de sephadex.

FIG. 15. CUADRO DE
PURIFICACION



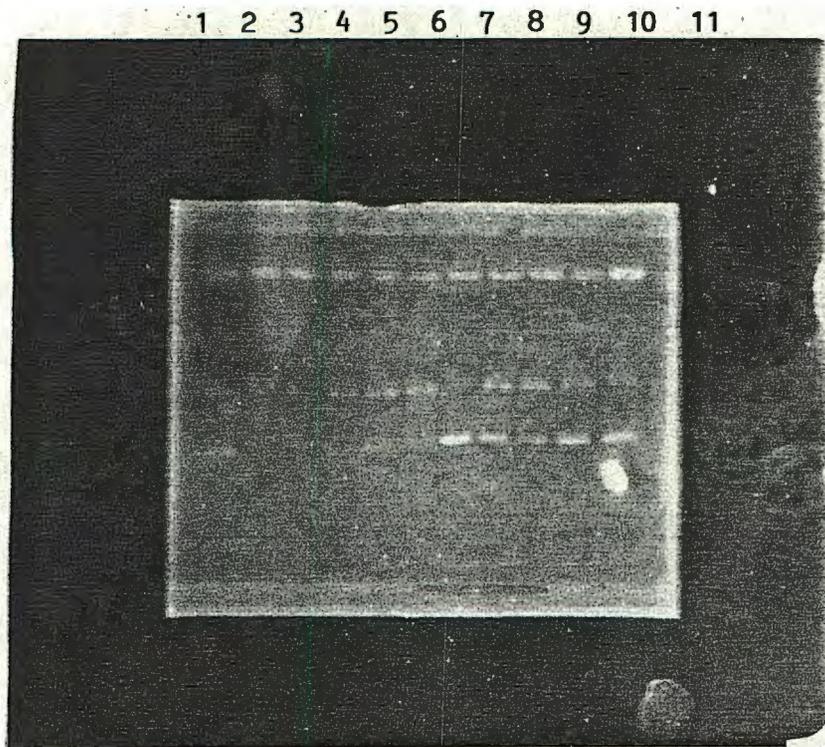
actividades enzimáticas de topoisomerasas. Una vez montada la técnica de purificación, se procedió a caracterizar las actividades encontradas en base a sus requerimientos.

CARACTERIZACIÓN:

Una vez que se obtuvo actividad de topoisomerasas en las fracciones 3 y 5 de sephadex G-150, se probó qué tipo de actividades eran mediante la incubación de las fracciones en presencia y ausencia de ATP; se encontró que existían las 2 actividades de topoisomerasa como se muestra en la fig. 16. Se puede observar en los carriles 1 y 2 en forma clara la actividad de topoisomerasa II, pues en ausencia de ATP (carril 1) no existe actividad, mientras que en su presencia (carril 2) la forma superhelicoidal pasa a la forma relajada, observándose también formas topológicas intermedias. En los carriles 3 y 4, en los que se ensaya la fracción 5 de sephadex se observa la actividad de topoisomerasa I, pues tanto en presencia como en ausencia de ATP hay actividad. Cabe hacer notar que en presencia de ATP quedó cierta cantidad de plásmido sin relajarse, hecho que ya se ha reportado antes en este trabajo, sugiriendo una posible inhibición por ATP, aunque el resultado no es muy consistente.

Titulación de la topoisomerasa I con respecto al tiempo.

La titulación se hizo desde los 5 min hasta los 60 y lo que se aprecia en la fig. 16, en los carriles 6-11 es que conforme pasó el tiempo la banda del plásmido relajado aumentó en intensidad mientras que la del superhelicoidal disminuyó. También se pueden apreciar las formas topológicas intermedias que aparecen al aumentar el tiempo de la reacción.



60' 60' 40' 20' 10' 5' Tiempo

Fig. 16. Actividad de topoisomerasas. Carriles 1 y 2, (fracción 3 de Sephadex) topoisomerasa II. Carriles 3 y 4 (fracción 5 de Sephadex) topoisomerasa I. Carriles 5, 6, 8, 9, 10, y 11 (fracción 4 de Sephadex). Carril 7, control (no enzima). Carriles 1, 3, 5, y 7 sin ATP, Carriles 2, 4, 5 y 8-11 con ATP. El volumen de la reacción es de 15 μ l y al término de la incubación se desproteíniza con Proteinasa K. Tiempos de incubación: carriles 1-7, 60 min; carril 8, 40 min; 9, 20 min; 10, 10 min y 11, 5 min.

Efecto de la fuerza iónica en la actividad de las enzimas

Para probar como influye la fuerza iónica en la actividad de las enzimas, se pusieron diferentes concentraciones de KCl, desde cero hasta 200 mM. Lo que se obtuvo es que la topoisomerasa I actúa mejor con una concentración de KCl de 50 mM como se muestra en las figs. 17 y 18; esta última muestra la actividad de topoisomerasa I pero con una actividad nucleolítica contaminante; no obstante la concentración óptima de KCl es la misma..

La concentración requerida por la topoisomerasa II es de 100 mM, siendo mayor a la que utiliza la tipo I.

Requerimiento de Magnesio

Se probó también que tanto influye el magnesio en la actividad de las enzimas; para esto se utilizaron concentraciones de cero hasta 15 mM de $MgCl_2$.

Como se muestra en las figuras 19 y 20, esta última con actividad nucleolítica contaminante, la topoisomerasa I no requiere Mg^{++} para realizar su actividad, no obstante concentraciones de 10 y 15 mM la estimulan. En cuanto a la topoisomerasa II, se encuentra que sí requiere de Mg^{++} y una concentración de 15 mM es adecuada para su funcionamiento (fig. 19).

Efecto del pH

Las topoisomerasas de maíz pueden actuar en un rango amplio de pH. La topoisomerasa I se probó en un rango de 6.5 a 9.0 (fig. 21) y en todos los casos presentó actividad. La topoisomerasa II también tuvo actividad en todos los pH probados (de 7.0 a 9.0) aunque parecía que a pH 8.0 su actividad era mayor (resultado no mostrado).

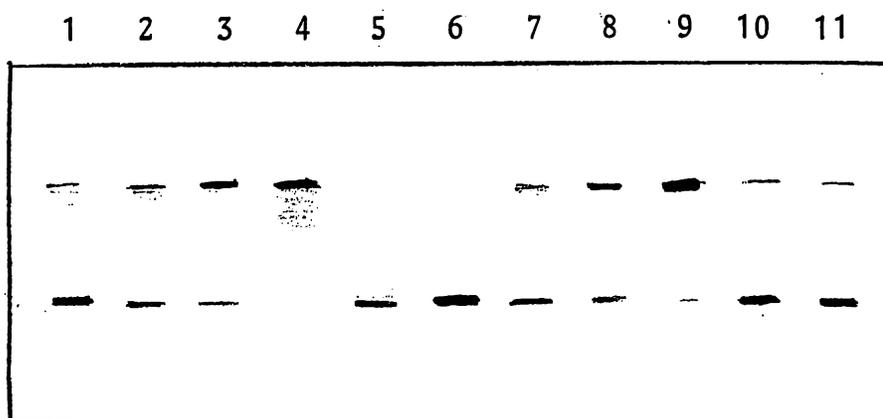


Fig. 17. Efecto de la fuerza iónica en topoisomerasas I y II. Carriles 1-5, topoisomerasa II con concentraciones de KCl de 0, 25, 50, 100 y 200 mM respectivamente. Carriles 7-11, topoisomerasa I con iguales concentraciones crecientes de KCl. Carril 6, control (no enzima). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l por 1 hora a 30°C y al final de desproteiniza con Proteínasa K.

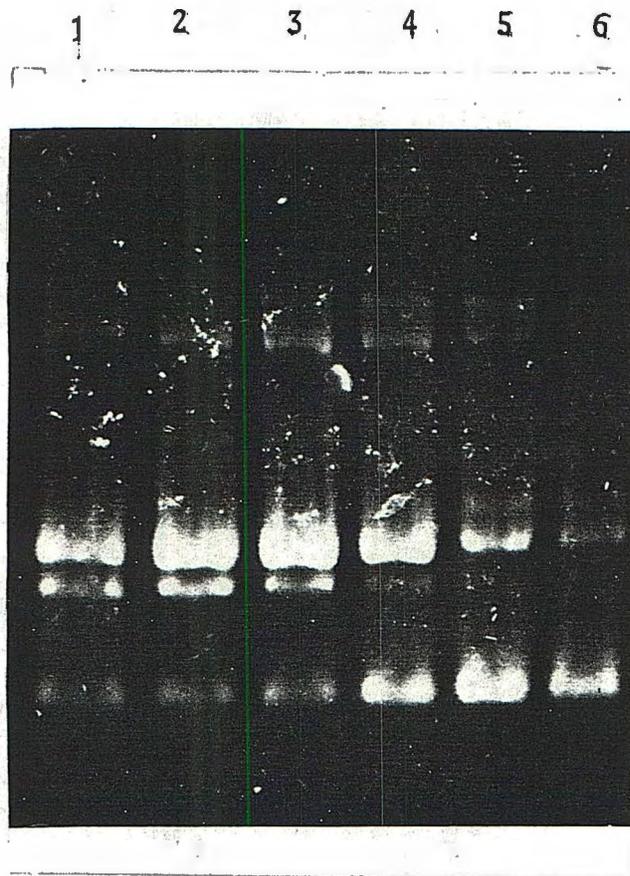


Fig. 18. Efecto de la fuerza iónica en la actividad de topoisomerasa. Carriles 1, Sin KCl; 2, con 25 mM de KCl; 3, con 50 mM de KCl; 4, con 100 mM de KCl y 5, con 200 mM de KCl y 6, control.

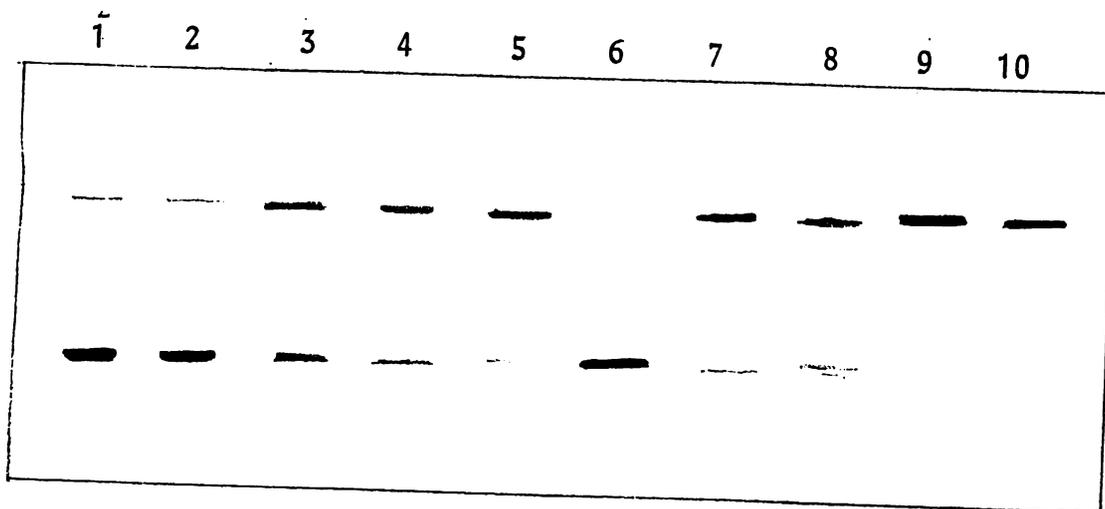


Fig. 19. Requerimiento de magnesio por topoisomerasas. Carriles 1 al 5, topoisomerasa II; carriles 7 al 10, topoisomerasa I; carril 6, control. Carriles 1, sin ATP y 10 mM $MgCl_2$; 2, con ATP y sin $MgCl_2$; 3 al 5, con ATP y 5, 10 y 15 mM de $MgCl_2$; 6, con ATP y 10 mM $MgCl_2$; 7 al 10, sin ATP y con 0, 5, 10 y 15 mM de $MgCl_2$ respectivamente.



Fig. 20. Efecto de magnesio en la actividad de la topoisomerasa I. Carriles 1, control (no enzima); 2, sin $MgCl_2$; 3, con 5 mM de $MgCl_2$; 4, con 10 mM de $MgCl_2$; 5, con 15 mM de $MgCl_2$

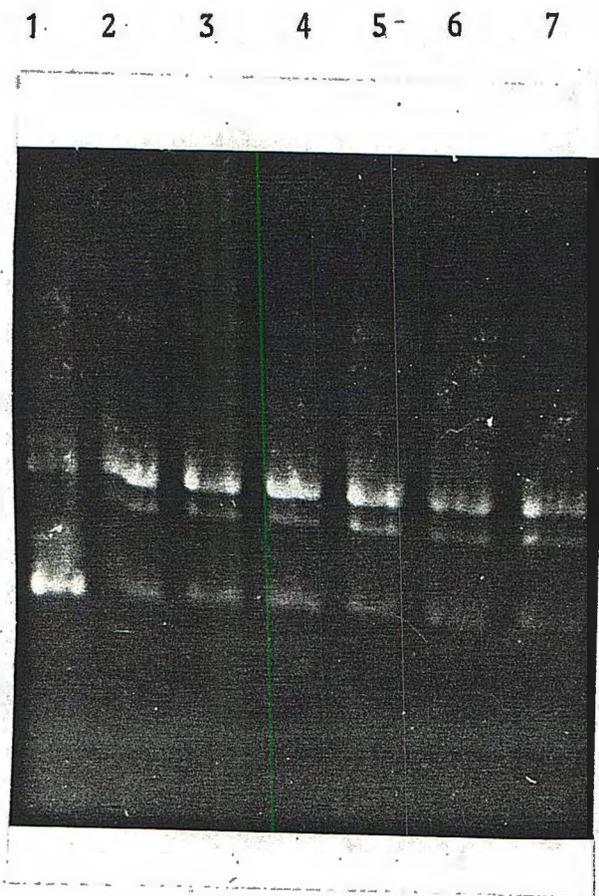


Fig. 21. Efecto del pH en la actividad de la topoisomerasa I.
Amortiguador Tris/HCl con los siguientes pH: carriles 1, control
(no enzima) pH 8.0; 2, pH 9.0; 3, pH 8.5; 4, pH 8.0; 5, pH 7.5;
6, pH 7.0; 7, pH 6.5.

Temperatura

Las temperaturas probadas para topoisomerasa I fueron de 20 a 50°C, con excepción de 20°C, en todas las demás hubo actividad. No obstante, a partir de 40°C se comienza a manifestar una ligera actividad de nucleasa que provoca degradación de DNA, por lo que es conveniente trabajar entre 30 y 35°C (fig. 22). No se tiene un resultado para topoisomerasa II.

Estabilidad

En cuanto a la estabilidad de las enzimas con respecto al tiempo observamos que la topoisomerasa I fue mucho más estable, pues mientras que la tipo II perdió su actividad en 2-3 días después de la homogenización de los ejes embrionarios, la tipo I conservó su actividad al mes de haber iniciado su aislamiento. Almacenando ambas con 50% de glicerol a -20°C.



Fig. 22. Actividad de topoisomerasa I en función de la temperatura. Carriles 1, 50°C, 2, 40°C; 3, 35°C; 4, 25°C; 5, control (no enzima), 30°C.

DISCUSION

Las topoisomerasas son enzimas que se han estudiado principalmente en procariotes y animales; en vegetales, cuando se inició este trabajo solo existía la descripción de la purificación parcial de la topoisomerasa I de trigo (53); más tarde se reportó la purificación de las topoisomerasas I y II de coliflor (16), y durante la redacción del presente trabajo se publicó la existencia de la topoisomerasa I en espinaca (11). En vegetales, como vemos es poco lo que se conoce.

Por el tipo de actividad que presentan las topoisomerasas, tan ligada al DNA, así como la cantidad tan reducida de estas enzimas por célula, era de esperarse que aislando organelos tales como el núcleo, el rendimiento en la purificación de la actividad enzimática fuera mucho mayor; esto ha sido reportado ya para sistemas animales (19, 49, 51). Sin embargo, para topoisomerasa tipo II de D. melanogaster se publicó en 1983 (62) que existían problemas cuando se partía de núcleos, pues esta enzima parecía distribuirse por toda la célula durante la mitosis, por lo que era mejor trabajar con el embrión completo, ya que encontraban igual cantidad de enzima en núcleo y citoplasma.

En nuestro caso cuando aislamos núcleos, la actividad que se detectó fue bajísima por lo que nos decidimos a trabajar con extractos protéicos totales, los que nos dieron buen resultado. Esto concuerda con lo que se describió para las purificaciones de las topoisomerasas de vegetales, en las cuales el material biológico del que se partió fue: en trigo, del germen, mientras que en

coliflor de las inflorescencias y en ambas plantas se hicieron extractos protéicos totales para iniciar la purificación. Obviamente, para estudios de localización exacta y función biológica de las topoisomerasas, sería recomendable aislar organelos con DNA durante diferentes etapas de la germinación, lo más rápida y eficientemente posible. También sería conveniente trabajar con otro tejido vegetal pues para disecar 1000 ejes embrionarios una persona con experiencia tarda una semana; una opción sería trabajar con tejidos meristemáticos de plántulas, de los cuales de una manera relativamente rápida podríamos obtener mayor cantidad de materia prima. No obstante, ya que nuestro objetivo inicial era encontrar y caracterizar las enzimas durante la germinación, el material biológico tenía que ser el eje embrionario.

La columna de sepharosa-novobiocina utilizada para aislar girasa de E. coli (48) y topoisomerasa II de ratón (59), no obstante sus grandes ventajas, no ha sido utilizada en general para la purificación de topoisomerasas II. Cuando nosotros la preparamos y usamos, no pudimos localizar la actividad de la enzima. Esto se pudo deber a: 1) que la estabilidad enzimática fuera muy baja y no se detectara la actividad en el eluido; 2) que la topoisomerasa II se hubiera unido irreversiblemente a la columna; pero esto no es muy factible ya que indicaría que la afinidad de la novobiocina por la enzima debería ser muy fuerte para que esto ocurriera y no existen reportes al respecto; 3) que la afinidad entre la topoisomerasa y la novobiocina bajo estas condiciones es baja y no hubo unión. 4) otra posibilidad es que la topoisomerasa II de maíz no sea inhibida por la novobiocina por lo que la enzima no

se unió a la columna y su actividad al salir estuviera enmascarada por la topoisomerasa I, o bien se perdió. Pareciera contradictorio el hecho de que novobiocina no inhibe a la topoisomerasa II en nuestro ensayo de reacción (los resultados no fueron consistentes), mientras que la síntesis de DNA en núcleos de ejes embrionarios sí se inhibe. Esto podría explicarse si se considera que la novobiocina podría estar actuando sobre otras enzimas del metabolismo del DNA que requieren de ATP y que se ha reportado recientemente pueden inhibirse por el agente químico (63).

En cuanto a las otras resinas usadas, con hidroxapatita el problema principal fue el tiempo que tardaban en eluir las enzimas, reflejándose esto en la pérdida de actividad de al menos una de ellas. El Ultrogel HA vino a remediar este problema, pues la elusión es muy rápida por lo que podemos contar con la actividad de las topoisomerasas por más tiempo, aunque existe el problema de que eluyen juntas; esto se soluciona entonces con la columna de Sephadex, que nos separa bien las actividades enzimáticas y se puede contar con la actividad enzimática estable de topoisomerasa I y, aunque por menos tiempo, de topoisomerasa II. Este fenómeno se ha reportado frecuentemente en la literatura por lo que hay que extremar los cuidados para purificar a este tipo de enzimas. Para nuestros objetivos, el procedimiento de purificación parcial utilizado resultó adecuado.

El ensayo que utilizamos para detectar la actividad de topoisomerasa consiste en la relajación de plásmidos superhelicoidales y este es uno de los ensayos más usados para este tipo de enzimas. La forma en que observamos la actividad enzimática fue cualitativa, puesto que carecíamos de un densitómetro que nos

indicara el momento en que el plásmido superhelicoidal hubiera pasado a la forma relajada en un 50% en las condiciones de nuestro ensayo, que es como se reportan generalmente las unidades de actividad para estas enzimas. Sin embargo, cualitativamente pudimos observar cuando la banda del plásmido superhelicoidal desaparecía y aparecía otra en el lugar del plásmido relajado y así es como medíamos la actividad. Si no tenemos unidades confiables, no se pueden dar datos sobre el rendimiento en la purificación de la enzima; no obstante, podemos mencionar que conforme se avanzaba en los pasos de purificación, la cantidad de proteína utilizada en los ensayos era mucho menor.

Es interesante mencionar que en los ensayos iniciales, al comienzo de este trabajo, no se utilizaban proteasas para desproteínizar la mezcla de reacción después de terminado el tiempo de incubación y los resultados indicaban una serie de bandas con los geles de agarosa que corrían poco como si fueran multímeros del plásmido, en fracciones donde no se esperaba actividad. Al tratar con proteasas los ensayos de estas fracciones, se observaba que la banda del plásmido corría igual a la del control sin fracción protéica, por lo que se podía deducir que el plásmido no había sufrido ningún cambio. Esto sugiere que proteínas que se unen al DNA y que están presentes en algunas fracciones modifican al corrimiento del plásmido y por tanto el resultado; de ahí la importancia de desproteínizar después de probar la actividad.

Los resultados de la caracterización de las enzimas se resumen en el siguiente cuadro, donde se muestran datos de algunas topoisomerasas de diversas fuentes con el fin de comparación,

(figura 23).

En maíz, la topoisomerasa I podría tener un peso molecular menor que la topoisomerasa II dado el patrón de elusión en Sephadex y esto coincidiría con los datos reportados en la literatura para los dos tipos de enzimas. Para topoisomerasa I los pesos moleculares en eucariotes varían de 62000 a 135000; esta variación parece deberse a la presencia de productos proteolíticos de la enzima que aún tienen actividad. Los primeros reportes de peso molecular de la enzima la situaban cerca de 60000 pero después, al refinarse más las técnicas de purificación, lo colocaron alrededor de 100000. En los geles de acrilamida-SDS en donde se corrieron fracciones con actividad de las diferentes etapas de purificación de nuestra enzima, se puede observar un enriquecimiento de bandas con pesos moleculares de 57000 y 94000, por lo que tal vez podrían corresponder a la enzima. Para topoisomerasa II los pesos moleculares reportados van de 150000 a 261000. En nuestro caso, se enriquecen algunas bandas de 94000 o más mediante acrilamida-SDS y pudiera ser que entre alguna de estas bandas se encontrara la correspondiente a la topoisomerasa II. Nos faltó probar con marcadores de peso molecular más altos, pues el mayor era de 94000.

En cuanto a la fuerza iónica óptima para la actividad de las enzimas, la topoisomerasa I trabaja mejor en una concentración menor que la tipo II y ambas concentraciones caen dentro de lo reportado para otras topoisomerasas, como se muestra en la fig. 23.

En el caso del magnesio, la topoisomerasa I es estimulada en su presencia; este hecho ocurre también en coliflor y en células

FIG. 23 CUADRO COMPARATIVO DE DNA TOPOISOMERASAS

Tipo de Enzima Origen	Fuerza Iónica [KCl]		Mg ⁺⁺		pH		ATP		Novobiocina
	TI	TII	TI	TII	TI	TII	TI	TII	TII
Maíz	50 mM	100 mM	10-15 mM estimula	15 mM	6.5-9		posible inhibición	1 mM	posible inhibición
Trigo	50-150 mM NaCl		-				-		
Coliflor	50-200 mM	50-100 mM	10-15 mM estimula	10 mM	8	8		1 mM	100 µg/ml inhibición
<u>Drosophila</u>		100-150 mM 175 mM		5-10 mM		6.5-10		1 mM	210 mM
<u>Ustilago</u>	180 mM		10 mM estimula		5.5-8		5 mM inhibición		
Células HeLa	120 mM		10 mM estimula						
Eritrocito de pollo							inhibición		1

HeLa. Para la topoisomerasa II de maíz el magnesio es requerido con un óptimo de 15 mM, que es un poco más alto que lo reportado para otras enzimas de su tipo.

El rango de pH en que trabajan nuestras enzimas es: de 6.5 a 9.0 para topoisomerasa I y de 7.0 a 9.0 para la II, en amortiguador Tris. Usando el mismo amortiguador, la topoisomerasa II de Drosophila tiene un rango de pH de 7.5 a 10, aunque si se usa amortiguador de glicina, el rango se reduce mucho. En Ustilago maydis el rango de pH que se reporta es de 5.5 a 8.0 con diferentes amortiguadores. Esto nos indica que las topoisomerasas tienen un rango amplio de pH para actuar, aunque se debe ser cuidadoso para seleccionar el amortiguador que se quiera utilizar.

Es interesante el hecho de que algunas topoisomerasas I como la de eritrocito de pollo y la de U. maydis pueden inhibirse por ATP. La topoisomerasa I de maíz parece presentar la inhibición también, pero faltan más estudios para establecerlo categóricamente. Esta inhibición es muy interesante puesto que podría sugerirnos una forma de regulación de las topoisomerasas, pues mientras las tipo II requieren ATP para su actividad, las tipo I se estarían inhibiendo.

Finalmente, la función biológica de estas enzimas es todavía en gran medida un enigma. El esclarecimiento de su actividad in vivo se complica por la carencia de metodología adecuada para establecer su localización y actividad. No obstante, mutantes de las enzimas en levaduras principalmente, han comenzado a dar información y procesos tales como la mitosis, la segregación cromosomal y la transcripción se afectan (36). Es indudable que en los

próximos años se definirán una a una todas las funciones que estas enzimas realizan en las células y su importancia en el metabolismo de DNA.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se demuestra la existencia de actividad de topoisomerasas de tipo I y II en ejes embrionarios de maíz, imbibidos por 24 hr.
2. Durante el aislamiento de las enzimas, se encontró que al menos la topoisomerasa tipo II, es sumamente lábil desde los primeros pasos de aislamiento, por lo que éste debe realizarse en forma rápida.
3. La topoisomerasa I es estimulada por magnesio aunque la presencia del catión no es obligatoria para la actividad de la enzima. Por otra parte, pareciera ser que el ATP inhibe parcialmente la actividad de la enzima.
4. La topoisomerasa II requiere magnesio y ATP para trabajar y no es claro que se inhiba por novobiocina.

REFERENCIAS

1. Conquist, A. (1977). Introducción a la Botánica. 2a. Ed. C.E.C.S.A. México.
2. Vázquez Ramos, J. (1985) Función de las macromoléculas en la germinación de semillas de cereales. Cuadernos de Posgrado, Facultad de Química, UNAM, México
3. Mayer, A.M., y A. Poljakoff-Mayber (1975). The germination of seeds. 2a. Ed. Pergamon Press, England.
4. Bewley, J.D., y M. Black (1978). Physiology and Biochemistry of seeds, Vol. 1. Springer Verlag, Alemania.
5. Bhagavan, N.V. (1983) Bioquímica 2a. Ed. Interamericana. México.
6. Gellert, M. (1981). Ann. Rev. Biochem. 50: 879-910.
7. Igo-Kemenes, T., W. Horz y H.G. Zachaux (1982) Ann. Rev. Biochem. 51: 89-121.
8. Spiker, S. (1985) Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 235-253.
9. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson (1983). Molecular Biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York.
10. Wang, J.C. (1971). J. Mol. Biol. 55: 523-533.
11. Wang, J.C. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54: 655-697.
12. Gardner, E.J. (1975) Principles of Genetics. 5a. Ed. John Wiley & Sons Inc. New York.
13. Tse, Y.C., K. Kirkegaard y J.C. Wang (1980). J. Biol. Chem. 255: 5560-5565.

14. Rowe, T.C., J.R. Rusché, M.J. Brougham y W.K. Hollman (1981)
J. Biol. Chem. 256: 10354-10361.
15. Trask, D.K., J.A. Di Donato y M.T. Muller (1984). EMBO J.
3: 671-676.
16. Fukata, H. y H. Fukasawa (1982). J. Biochem. 91: 1337-1342.
17. Fukata, H., y H. Fukasawa (1983) Jpn. J. Genet. 58: 425-432.
18. Gellert, M. et al (1986). J. Cell. Biochem. Symp. on Molec.
Cell. Biol. Supplement 10B, 1290.
19. Shelton, E.R., N. Osheroff, D.L. Brutlag (1983). J. Biol.
Chem. 258: 9530-9535.
20. Gellert, M., K. Mizuuchi, M. O'Dea y E. Nash (1976). PNAS
USA 73: 3872-3876.
21. Dean, F., M.A. Krasnow, R. Otter, M.M. Matzuk (1982). Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 769-777.
22. Liu, L.F., R.E. Depew y J.C. Wang (1976) J. Mol. Biol. 106:
439-452.
23. Tse, Y.C., y J.C. Wang (1980) Cell 22: 269-276.
24. Lockshon, D., y B.R. Morris (1985) J. Mol. Biol. 181: 63-74
25. Kreuzer, F.N., y C.V. Jonyencel (1983). Methods in Enzymol.
100: 145-160.
26. Nelson, E.M., K.M. Tewey y L.F. Liu (1984) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 81: 1361-1365.
27. Durban, E., J.S. Mills, D. Roll y H. Busch (1983) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 111: 897-905.
28. Sander, M., J. Nolan y T.S. Hsieh (1984) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 81: 6928-6942.

29. Tse-Dinh, Y.C., y T.W. Wing y A.R. Goldberg (1984). *Nature* 312: 785-786.
30. Klevan, L., y Y.C. Tse (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 745: 175-180.
31. Ferro, A.M., N.P. Higgins, y B.M. Olivera (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 6000-6003.
32. Castora, F. et al (1986) *J. Cell. Biochem. Symp. on Molec. & Cell. Biol. Supplement 10B*, 154.
33. Howard, J.C. et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6958-6962.
34. Berrios, M., Osheroff, N. y P.A. Fisher (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4142-4146.
35. Earnshaw, W.C., B. Halligan, C.A. Cooke y L.F. Liu (1985) *J. Cell. Biol.* 100: 1706-1715.
36. Sternglanz, R. et al (1986) *J. Cell Biochem. Symp. on Molec. & Cell. Biol. Supplement 10B*, 138.
37. Liu, L. (1986) *J. Cell. Biochem. Symp. on Molec. & Cell. Biol. Supplement 10B*, 137.
38. Mattern, M.R. y R.B. Painter (1979). *Biochem. Biophys. Acta* 563: 306-312.
39. D'Halluin, J.C., M. Milleville y P. Boulanger (1980). *Nucleic Acid Res.* 8: 1625-1641.
40. Vázquez Ramos, J. y S. López (1986) *Rev. Soc. Quim. Mex en prensa*.
41. Vázquez Ramos, J.M. y J. Mandelstam (1981) *J. Gen. Microbiol.* 127: 11-17.

42. Harland, R.M., H. Weintraub y S.L. McKnight (1983) Nature 302: 38-43.
43. Glikin, G.G., I. Ruberti y A. Worcel (1984). Cell 37: 33-41.
44. Bullock, P. (1986) J. Cell. Biochem. Symp. on Molec & Cell. Biol. Supplement 10B, 1240.
45. Hays, J.B., y S. Boehmer (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4125-4129.
46. Wright, A., y B.A. Bridges (1981) J. Bacteriol. 146: 18-23.
47. Marshall, B., R.K. Ralph y R. Hancock (1983) Nucleic Acid Res. 11:4251-4256.
48. Staudenbauer, W., y E. Orr (1981). Nucleic Acid Res. 9: 3589-3603.
49. Baldi, M.I., P. Benedetti, E. Mattocia y G.P. Tocchini-Valentini (1980) Cell 20: 461-467.
50. Martin, S.R., W.K. McCoubrey Jr., B.L. McConaughy, L.S. Young, M.D. Been, B.J. Brewer y J.S. Champoux (1983). Methods in Enzymol 100: 137-144.
51. Pulleyblank, D. y M. Ellison (1982) Biochem. 21: 1155-1161.
52. Liu, L.F. (1983) Methods in Enzymol. 100: 133-137.
53. Dynan, W. (1980) J. Biol. Chem. 256: 5860-5865.
54. Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
55. Laemmli, U.K., y M. Favre (1973) J. Mol. Biol. 80: 575-599.
56. Peterson, G.L. (1977) Anal. Biochem. 83: 346-356.
57. Layne, E. (1957) Methods in Enzymol. III (IV): 447-454.
58. Orr, E., y W.L. Staudenbauer (1982) J. Bacteriol. 151: 524-527.

59. Colwill, R.W. y R. Sheinin (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
80: 4644-4648.
60. Sundberg, L., y J. Porath (1974) J. Chromatog. 90: 87-98.
61. Tricoli (1983) Biochem. 22: 2025-2031.
62. Hsieh, T. (1983) Methods in Enzymol. 100: 161-170.
63. Meechan, P.J. et al (1984) Mutation Res. 141: 69-73.
64. Johnson, P.H., L.I. Grossman (1977) Biochem. 16 (19): 4217-4225.
65. Champoux, J. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 449-479.