



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA
División de Estudios de Posgrado

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA
ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA DE MAIZ”**

T E S I S

Que para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)

p r e s e n t a

ALEJANDRA VAZQUEZ RAMOS

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. JORGE VAZQUEZ

Secretario:

DR. EDGARDO ESCAMILLA

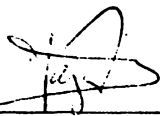
Suplente:

DR. ALEJANDRO BAYON

Suplente:

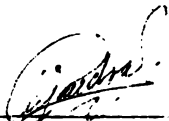
DR. CARLOS ARAMBURO

Asesor del tema:



DR. JORGE VAZQUEZ

Sustentante



BIOL. ALEJANDRA VAZQUEZ RAMOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento

Al Dr. Jorge Vázquez por su valiosa asesoría, dirección y gran apoyo que siempre me brindó.

Al Departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U. N. A. M., por las facilidades que me brindó para llevar a cabo la investigación.

Al Jurado Dictaminador por la revisión crítica del manuscrito.

A Alfonso R. Antúnez S. por la realización de las figuras y tablas.

A todos aquellos, familiares y amigos, que de alguna u otra forma me brindaron su apoyo y ayuda para la realización del presente trabajo.

Con mucho cariño:

A mi madre.

A mis hermanas.

A mis sobrinos.

A la memoria de mi padre.

A la memoria de mi abuelita.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCION

La semilla.

Germinación.

Síntesis de proteínas y RNA durante la germinación.

Síntesis y reparación de DNA durante la germinación.

DNA polimerasas.

Generalidades.

DNA polimerasa alfa.

DNA polimerasa beta.

DNA polimerasa gama.

DNA polimerasa delta.

DNA polimerasas de plantas superiores.

DNA polimerasa alfa.

DNA polimerasa beta.

DNA polimerasa gama.

DNA polimerasa de mitocrondias y cloroplastos.

Antecedentes inmediatos del laboratorio.

OBJETIVO

MATERIALES Y METODOS.

Materiales.

1. Material biológico.
2. Soluciones amortiguadoras y reactivos utilizados.
3. Preparación de resinas.

Métodos.

1. Imbibición de ejes embrionarios.
2. Curva de síntesis de DNA.
3. Preparación del extracto celular.
4. Preparación de DNA activado.
5. Determinación de la actividad de DNA polimerasa.
6. Caracterización.
7. Gel de poliacrilamida.
8. Determinación de la concentración de proteína.

RESULTADOS

1. Purificación de DNA polimerasa, etapa tardía.
2. Purificación de DNA polimerasa, etapa temprana.
3. Caracterización.

DISCUSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

ara-CTP	arabinosil citidina 5'-trifosfato.
ASB	albúmina de suero bovino.
BuAU	butilanilinouacilo.
CTC	cobre-tartrato-carbonato.
d	daltones.
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato.
dCTP	desoxicitidina 5'- trifosfato.
ddNTP	didesoxinucleósido 5'-trifosfato.
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato.
DMSO	dimetilsulfóxido.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DNA pol.	DNA polimerasa.
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfatado.
DOC	desoxicolato de sodio.
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato.
EDTA	ácido etilen diamino tetracético..
HTP	hidroxiapatatita.
Kd	Kilodaltones
NEM	N-etilmaleimida.
P-11	fosfocelulosa.
PM	peso molecular.
PMSF	floruro de fenilmetilsulfonilo.
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero.
RNA _r	ácido ribonucleico ribosomal.

RNA _t	ácido ribonucleico de transferencia.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
SSC	solución salina de citratos.
TCA	ácido tricloracético.
UV	ultra violeta.

RESUMEN

La síntesis replicativa del DNA es un evento que ocurre relativamente tarde durante la germinación de semillas. No obstante, se ha observado que existe un bajo nivel de síntesis de DNA, que puede detectarse dentro de la primera hora y que precede al proceso replicativo. Dicha síntesis temprana de DNA se ha considerado que pudiera ser de tipo reparativo.

Con el fin de distinguir el tipo de síntesis que se lleva a cabo en la etapa temprana de la que ocurre en la etapa tardía de la imbibición de ejes embrionarios de maíz, se escogió determinar si existía alguna diferencia en el tipo de enzima que sintetiza el DNA en ambos periodos.

Para poder lograr esto, se montó la técnica de aislamiento de DNA polimerasa, con la que se logró purificar parcialmente la actividad del tipo de enzima presente mayoritariamente en ambas etapas y se llevó a cabo la caracterización de cada una de ellas.

Los resultados obtenidos muestran que las enzimas aisladas en ambas etapas corresponden a una DNA pol. tipo α , en base a sus requerimientos, pero sobre todo a la respuesta a varios compuestos que se sabe inhiben específicamente a las DNA polimerasas tipo alfa.

INTRODUCCION

Las monocotiledóneas contribuyen de manera muy importante a la economía del hombre, y entre éstas las gramíneas constituyen una de las principales fuentes alimenticias en el mundo. El conocimiento de la estructura y funciones bioquímicas de sus semillas durante los eventos tempranos de la germinación, pueden suministrar un mejor entendimiento de los sistemas de control que determinan el buen establecimiento de la plántula. El maíz, *Zea mays* Linnaeus, es un buen ejemplo.

LA SEMILLA.

Para la mayoría de las plantas, la semilla es un paso muy importante en su ciclo de vida, pues esta contiene la planta en miniatura para propagar la especie y lograr así su supervivencia. Para poder lograr su función como unidad de dispersión, la semilla se encuentra bien equipada, tanto fisiológica como estructuralmente. Asimismo, está provista de reservas alimenticias para poder sostener a la plántula joven hasta que es autosuficiente, es decir, hasta que es capaz de fotosintetizar.

El desarrollo de la semilla se inicia con la fertilización del óvulo. Es una estructura compleja constituida por un embrión rodeado por una cubierta protectora. El embrión generalmente se deriva de la

fusión del núcleo de los gametos femenino y masculino. La cubierta o testa se origina de la planta materna y generalmente se desarrolla de los integumentos del óvulo. Además, las semillas de las angiospermas contienen endospermo el cual se deriva, al igual que el embrión, del material genético materno y paterno y constituye un tejido de almacenamiento de alimentos. (Bewley y Black, 1978).

Una vez formada la semilla, se inicia una desecación progresiva de los tejidos. El contenido de humedad de la semilla completa, incluyendo el embrión, cae desde 80-90% hasta un 10% en pocos días. A pesar de esta extrema deshidratación, el embrión desecado puede permanecer vivo semanas, años o décadas dependiendo de la especie. El principal requisito para reanudar la actividad sintética y reiniciar el crecimiento y desarrollo del embrión es la adición de agua.

La desecación, cambia profundamente la subsecuente actividad bioquímica de las células vivas del embrión. La síntesis de macromoléculas: DNA, RNA y proteínas se detiene, y el embrión entra en un estado de mínima actividad metabólica. Bajo esta condición, puede resistir las vicisitudes del medio ambiente.

GERMINACION.

Es el conjunto de etapas sucesivas que llevan a que la semilla cambie de su estado quiescente o latente, al metabólicamente activo, despertándose con ello una serie de eventos moleculares que llevan finalmente a la formación de una plántula a partir del embrión. Aunque el concepto de germinación no es fácil de definir, generalmente se dice que ha ocurrido una vez que una parte del embrión, normalmente la radícula, atraviesa completamente la cubierta de la semilla. Este acontecimiento es precedido por una serie de eventos que son acompañados

por, o terminan en un incremento irreversible en el volúmen del eje embrionario. Desde un punto de vista bioquímico, la germinación podría definirse como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular.

Para que una semilla pueda germinar; debe colocarse en condiciones favorables. Entre las condiciones medioambientales mas importantes que se requieren para que este proceso se lleve a cabo se encuentran: un apropiado suplemento de agua, temperatura y composición de gases adecuado y para algunas semillas, la luz es un factor importante - (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

El agua es esencial para la rehidratación como un paso inicial en la germinación. El período inicial de absorción de agua, denominado imbibición, aparece como una hidratación física de las paredes celulares y de los coloides citoplásmicos. La cantidad de agua absorbida por la semilla depende de factores tanto propios, como medioambientales.

Aunque la toma de agua es una condición necesaria, no es suficiente. La germinación es un proceso de las células vivas y requiere de un gasto o consumo de energía. Los requerimientos de energía generalmente son proporcionados por los procesos de oxidación en presencia de oxígeno, lo cual involucra un intercambio gaseoso, salida de bióxido de carbono y entrada de oxígeno. Es por esto que la germinación puede verse afectada por la composición de gases de la atmósfera que rodea a la semilla (Hourmant y Pradet, 1981; Mocquot, *et al*, 1981).

Otro factor importante que influye en la germinación es la temperatura. La temperatura óptima para el desarrollo del embrión varía de acuerdo con la especie y las condiciones ambientales. Para cada es-

pecie, existe una temperatura máxima y una mínima, por arriba o debajo de la cual la germinación no ocurre. Además, la temperatura ejerce un marcado efecto sobre la velocidad de entrada del agua a la semilla. (Ching, 1975).

La cubierta de la semilla también puede ejercer una profunda influencia sobre la capacidad de germinación de muchas semillas. La cubierta puede regular la germinación estableciendo una barrera de permeabilidad y con ello, interfiriendo en la toma de agua; el intercambio gaseoso, particularmente la toma de oxígeno; y la salida, por difusión, de inhibidores endógenos de la germinación. Además, la cubierta puede también ofrecer resistencia mecánica al crecimiento del embrión.

Un factor adicional que puede también influir en la capacidad de germinación de una semilla es la viabilidad del embrión. A lo largo del período que la semilla permanece seca, ocurren continuamente pequeños cambios dentro de las células vivas, los cuales pueden eventualmente llevar a la pérdida de viabilidad y vigor o sea, al envejecimiento de la semilla. El período de tiempo que una semilla permanece viable es muy variable, y depende tanto de las condiciones de almacenamiento como del tipo de semilla.

En suma, bajo condiciones ambientales favorables, la absorción de agua por la semilla desata una serie de cambios que dan como resultado el desarrollo de una plántula. El embrión respira rápidamente, pasando al estado metabólicamente activo y empieza a crecer tomando el alimento que ha estado almacenado en la semilla.

ALGUNOS ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA GERMINACION.
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y RNA DURANTE LA GERMINACION.

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla seca, comienza cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el RNAm.

Dentro del reino vegetal, el sistema que ha sido más estudiado es el embrión de trigo. Se sabe que la formación del complejo de iniciación de la síntesis de proteínas está limitado por la unión de la subunidad pequeña del ribosoma, 40S, con el metionil RNAt, en el sitio de iniciación indicado en el RNAm, y la posterior unión de la subunidad grande del ribosoma, 60S, quedando formado entonces el complejo de iniciación 80S (Marcus, *et al*, 1970; Tarrago, *et al*, 1970; Weeks, *et al*, 1972). Para que esto se lleve a cabo, se requiere de la intervención de unos factores proteícos solubles, denominados factores de iniciación, que se sabe están presentes en la semilla seca (Seal, *et al*, 1972), GTP y tal vez ATP.

Para que la elongación de la cadena pueda llevarse a cabo, se requiere además de la presencia de otros factores proteícos solubles, al menos uno para ir colocando los subsiguientes aminoacil-RNAt en la posición correcta en el RNAm, y otro para llevar a cabo la translocación del ribosoma sobre el RNAm, denominados factores de elongación y que requieren GTP para su actividad (Golińska y Legocki, 1973; Twardowski y Legocki, 1973).

Es claro que la síntesis de proteínas ocurre en la semilla poco después de la imbibición (Fujisawa, 1966; Marcus, 1969; Walton y Soofi, 1969). El tiempo exacto parece ser variable. En embriones disectados de trigo y centeno (Marcus, *et al*, 1966; Roberts, *et al*, 1973; Sen, *et al*, 1975) y en ejes disectados de *Phaseolus vulgaris* (Gillard y Walton, 1973) se ha demostrado que dicha síntesis comienza dentro de los primeros 15-30 min. de ser colocados a imbibir en agua.

Asimismo, se ha observado que los polisomas se encuentran ausentes - en las semillas secas, y que durante la imbibición, la formación de estos se ve acompañada por la concomitante disminución en el número de polisomas libres (Marcus y Feeley, 1964).

Existe una cuestión, que hasta la fecha ha creado controversia, en relación a si la síntesis de proteínas en la semilla que se pone a imbibir es o no precedida forzosamente por la síntesis *de novo* de RNA, particularmente, RNAm.

A este respecto, existen reportes que muestran que la síntesis de proteínas *de novo* puede ocurrir en la ausencia de una concomitante - síntesis de RNA tanto en semillas de algodón (Dure y Waters, 1965), embriones de trigo (Marcus y Feeley 1964; Chen, *et al* 1968), y semillas de chícharo (Barker y Hollinshead, 1964). La conclusión se basa en evidencia de la continua incorporación de aminoácidos marcados en proteínas insolubles en ácido tricloracético (TCA) en la presencia de actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de RNA.

Además, Weeks y Marcus (1971), encontraron que una fracción celular (fracción mensajera, FM), obtenida a partir de embriones de semillas de trigo secas, podía estimular la síntesis de proteínas *in vitro*. Durante los primeros minutos de imbibición, hay un aumento en la actividad de FM en el embrión, la cual declina rápidamente hasta ausentarse en embriones imbibidos por tres horas. A medida que la actividad de la FM decrece el número de polisomas aumenta. Esto aporta una prueba de la existencia de RNAm almacenado presente en el embrión seco, y que éste se une rápidamente a ribosomas durante la imbibición temprana.

Resultados de este tipo apoyan el concepto de que durante la etapa temprana de germinación, la síntesis de proteínas está dirigida uni-

camente por RNAm de vida media larga, y que dicho RNAm es sintetizado durante la embriogénesis, almacenado en la semilla seca, y reactivado como molde sólo después de la imbibición en agua durante la germinación. No obstante, existen otros reportes que muestran la existencia de síntesis temprana de RNA en la germinación.

En 1979, Cheung y colaboradores, proporcionaron evidencia de que después de 40 min. de imbibición, la síntesis de proteínas en trigo, es dirigida por RNA sintetizado *de novo*, más que el RNAm almacenado. - Otros grupos han obtenido evidencia de que algunos de los RNAm almacenados codifican para proteínas de reserva de la semilla (Bollini y Chrispeels, 1977; Mori, *et al*, 1978). Esto podría significar que - parte del RNAm almacenado es el restante que fué traducido durante - la maduración de la semilla, pero no fué degradado cuando la semilla se secó. Desde luego que esto no descarta la posibilidad de que dentro de estos RNAm almacenados puedan existir algunos específicos de germinación.

La pregunta crucial de si estos mensajeros de vida media larga, que están presentes en el embrión seco, juegan un papel controlador en la germinación y en que tiempo los mensajeros sintetizados *de novo* son esenciales para el desarrollo, aún permanece sin respuesta.

Otro punto de controversia, es con respecto al período de síntesis de las diferentes especies de RNA. En 1973, por estudios realizados en trigo, se sostenía que la síntesis de los diferentes RNAs se iniciaba secuencialmente (Dobrzanska, *et al*, 1973). Dichos estudios mostraban evidencia de que la síntesis de RNAm comenzaba antes que la del RNAr. Mas adelante, Spiegel y colaboradores (1975) y Sen y colaboradores (1975), mostraron claramente que la síntesis de RNA tomaba lugar tan pronto como los embriones se ponían a imbibir y que se detectaba simultáneamente tanto RNAr como RNA poliadenilado marcado.

Otros investigadores reportaron resultados similares con otras especies (Payne, 1977; Takaiwa y Tanifuji, 1979).

La síntesis de RNA durante la imbibición temprana requiere la presencia de una RNA polimerasa activa. Se ha visto que la enzima está presente tanto en embriones de trigo como de cebada secos (Jendrisak y Becker, 1973; Fabisz-Kijowska, *et al*, 1975), y que la enzima parece estar disponible en cantidades suficientes para catalizar la síntesis de RNA inmediatamente después de la imbibición.

Existe un aporte suficiente tanto de RNAt como de sus respectivos aminoacil- RNAt sintetasas, presentes en el sobrenadante de semillas secas, para apoyar la síntesis de proteínas. No obstante, la síntesis de RNAt se ha visto que comienza dentro de los primeros 30 min. de imbibición en embriones de centeno y trigo (Sen, *et al*, 1975; Marcus, *et al*, 1966); pero no se sabe cuando o si es que este RNAt está involucrado en la síntesis temprana de proteínas.

SINTESIS Y REPARACION DE DNA DURANTE LA GERMINACION.

Durante la germinación, la secuencia de eventos que parecer ser común a embriones de un buen número de semillas de gramíneas puede dividirse en: a) eventos tempranos; hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación de DNA y b) eventos tardíos o secundarios; expansión celular, replicación del DNA y movilización de reservas (Osborne 1983).

Esta secuencia disminuye progresivamente conforme la semilla envejece y pierde viabilidad, con lo que podría resultar el aplazamiento del tiempo al cual ocurre la replicación del DNA en el embrión. En embriones de cebada de alta viabilidad, la replicación del DNA en la punta de la raíz y coleoptilo ocurre entre las primeras 3 a 4 hrs. de imbibición, pero en embriones de baja viabilidad puede posponerse hasta -

11-12 hrs. (Osborne, 1983). La disminución en la velocidad de germinación no necesariamente evita o previene que se produzca, eventualmente, una plántula normal.

El tiempo exacto en que comienza la síntesis replicativa del DNA no se ha podido determinar, más bien parecer ser variable, y va desde 4 hasta 12 hrs. de imbibición (Chen y Osborne, 1970; Mory, *et al*, 1972; Buchowicz, *et al*, 1978; Vázquez y López, 1986).

En el caso del maíz, existen datos que indican que la síntesis replicativa del DNA, medida como incorporación de un nucleótido marcado, - podría dispararse a las 9 hrs. de imbibición (Vázquez-Ramos y López, 1986); aunque a tiempos anteriores, se observa un pequeño incremento en la incorporación de la marca, lo cual podría atribuirse, como se verá mas adelante, a una posible síntesis reparativa del DNA.

Tanto procariotes como eucariotes contienen sistemas efectivos de reparación del DNA que mantienen la integridad del genoma (Hanawalt, *et al*, 1979). Estos sistemas de reparación operan por el reconocimiento del sitio dañado en la molécula del DNA, seguido por la incisión en el locus defectuoso por endonucleasas específicas. El subsecuente reconocimiento de la ruptura en la cadena por una combinación de exonucleasa-polimerasa lleva a la escisión del fragmento que contiene la lesión y la resíntesis de la sección, tomando como molde de DNA la cadena opuesta. La reparación completa se logra cuando la muesca se sella - gracias a la actividad de DNA ligasas específicas.

Se ha observado la reparación de lesiones inducidas en el DNA de células vegetales para diferentes tejidos, incluyendo plántulas (Soyfer, 1979) y embriones de semillas (Velemínský, *et al*, 1977; Osborne, *et al*, 1980). Asimismo, se ha demostrado que se lleva a cabo la reparación de rupturas de una sola cadena inducidas por irradiación con rayos γ o tratamientos químicos en embriones de cebada (Velemínský y Gichner, 1978).

En 1978, Cheah y Osborne, demostraron que el DNA de embriones en el estado seco, aún de semillas de alta viabilidad, posee rupturas de cadena sencilla. Posteriormente, se encontró que la mayoría de estas rupturas son reparadas por una síntesis de DNA no programada, posiblemente de tipo reparativa, que ocurre dentro de los primeros 30 min. de imbibición. Dicha síntesis es estable y se mantiene (Osborne, *et al*, 1980; Vázquez-R. y Osborne, 1986).

Un aspecto importante de la pérdida de viabilidad es la disminución progresiva en la velocidad de germinación, seguida por un retardo en el establecimiento de la plántula. Dicha disminución en la germinación, puede en realidad reflejar la demora en lograr la restauración de la integridad del DNA como molde. La transcripción de todas las especies de RNAs (incluyendo RNAm) esenciales para el establecimiento de los nuevos patrones de crecimiento en la germinación, depende de la integridad de la información genética. A menos que los eventos reparativos en el embrión se logren por completo, los eventos subsiguientes y posteriores no podrán operar adecuadamente.

Experimentos recientes con centeno, indican que un factor importante para el éxito de los eventos bioquímicos tempranos en la germinación, es la efectividad con que operan los sistemas de reparación del DNA durante las primeras horas de imbibición (Osborne, *et al*, 1984). La restauración efectiva del molde genético durante las primeras horas de imbibición puede ser el principal factor que determine la velocidad de germinación y vigor, y con ello, la sobrevivencia del nuevo individuo.

Para que puedan llevarse a cabo dentro de la célula los diferentes procesos que involucran al DNA, como son la reparación y replicación, se requiere de la acción concertada de un gran número de proteínas diferentes. Dentro de todas ellas, las DNA polimerasas-DNA dependientes juegan un papel muy importante en ambos procesos.

DNA POLIMERASAS.

GENERALIDADES.

Las DNA polimerasas-DNA dependientes son las enzimas encargadas de llevar a cabo la incorporación de los cuatro desoxirribonucleósidos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a un molde materno de DNA de acuerdo al apareamiento de bases Watson-Crick, A con T y C con G, con la liberación de pirofosfato inorgánico.

Desde el descubrimiento de la primera DNA polimerasa, esta clase de enzimas se ha encontrado que están presentes en formas múltiples en todos los organismos estudiados hasta la fecha, desde procariotes hasta eucariotes. Aunque estas pueden diferir en algunas de sus propiedades físicas y químicas, presentan similitudes importantes. Todas requieren de un iniciador o cebador que tenga un extremo 3'-OH libre, el cual puede ser DNA o RNA, para poder polimerizar. Requieren de un catión divalente, magnesio o manganeso, y de un molde de DNA para su acción y solo actúan sobre los nucleósidos 5'-trifosfatados. La nueva cadena de DNA se sintetiza en forma complementaria y antiparalela en dirección 5'-3'.

En procariotes se sabe que existen tres tipos diferentes de DNA polimerasas, denominadas DNA pol I, II y III, de acuerdo al orden en que fueron descubiertas (Kornberg, 1980). Se han podido estudiar las funciones biológicas de cada una de ellas debido, en primer lugar, a la facilidad para manejar este tipo de organismos, su tiempo de generación tan corto, pero sobre todo, a la posibilidad de obtener mutantes condicionales letales de los genes que codifican para cada una de ellas. En la tabla I se muestran algunas de las características y propiedades más importantes de estas tres clases de polimerasas.

TABLA I. Algunas propiedades de la DNA polimerasa I, II y III de Escherichia coli.

	pol I	pol II	pol III	
Funciones:				
Polimerización 5'—3'	+	+	+	
Exonucleasa 5'—3'	+	-	+	
Exonucleasa 3'—5'	+	+	+	
Molde sintético:				
Duplex intacto	-	-	-	
Cadena sencilla cebada	+	-	-	
Duplex con cortes	+	-	-	
Actividad:				
Efecto de KCl por ciento del óptimo.	20 mM	60	60	100
	50 mM	80	100	50
	100 mM	100	70	10
	150 mM	80	50	0
Inhibición por 2'-desoxianálogos	-	+	+	
Inhibición por ara-CTP	-	+	-	
Inhibición por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo.	-	+	+	
Generales:				
Tamaño (K d)	109	120	140	
Genes estructurales	pol A	pol B	pol C	

+ y - representan la presencia o ausencia respectivamente de la propiedad enlistada.

Tomado de Kornberg, 1980. (pág. 169).

En el caso de eucariotes, tanto la purificación como la caracterización de este tipo de enzimas es más complicado, pero se ha encontrado que existen al menos cuatro tipos diferentes de DNA polimerasas, a las cuales se les han designado letras griegas para poderlas diferenciar de las DNA pol. de procariotes. A continuación se hace una pequeña revisión de cada una de ellas.

DNA POLIMERASA ALFA.

Fué la primera DNA pol. de mamíferos parcialmente purificada y aislada (Bollum, 1960). Este tipo de polimerasa parece estar siempre presente en células que están en crecimiento, desde eucariotes inferiores, hasta mamíferos. Una característica propia de este tipo de polimerasas, es su sensibilidad a agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo, como son N-etilmaleimida, NEM, y parahidroximercuribenzoato (Bollum, 1975). Esto habla de la presencia de grupos sulfhidrilo en el sitio activo de la enzima. Asimismo, es altamente inhibida por afidicolina (Ikegami, *et al*, 1978), 1-β-D-arabinosilcitosina 5'-trifosfato, ara-CTP, (Yoshida, *et al*, 1977; Okura y Yoshida, 1978) y por altas concentraciones de cationes monovalentes. Además, muestra un requerimiento absoluto por un catión divalente, Mg⁺⁺ preferencialmente.

Este tipo de enzima es altamente soluble; cuando se realizan extracciones celulares acuosas, la mayor parte de la enzima se encuentra en la fracción citoplásmica. Este hecho provocó una gran controversia durante mucho tiempo, con respecto a la localización intracelular de la enzima. Pero mediante la utilización de métodos de extracción más refinados se ha podido mostrar que la enzima se encuentra en el núcleo (Foster y Gurney, 1976; Herrick, *et al*, 1976). Métodos inmunoquímicos más recientes parecen indicar que la DNA pol. α puede estar localizada en la región perinuclear del citoplasma (Brown, *et al*, 1981).

La primera evidencia de que esta enzima estaba involucrada en la replicación del DNA, vino de estudios realizados con células que se estimulaban a dividirse; incluyendo hígado en regeneración después de una hepatectomía parcial y estimulación de linfocitos con fitohemaglutinina. Estas células mostraban un incremento de pol. α , el cual era paralelo a la velocidad de síntesis de DNA (Chang y Bollum, 1972; Baril, *et al*, 1973; Coleman, *et al*, 1974). También se ha observado que la DNA pol. α es la principal polimerasa asociada con los cromosomas de SV-40 replicándose (Edenberg, *et al*, 1978). Además, se ha observado que la afidicolina previene la división mitótica de embriones de erizo de mar, la cual requiere de la síntesis replicativa del DNA; pero no afecta la división meiótica de oocitos de estrella de mar, la cual no depende de la replicación del DNA (Ikegami, *et al*, 1978).

Estos hechos, junto con su capacidad para utilizar DNA cebado con RNA, han llevado a la proposición de que el papel principal de este tipo de polimerasa es llevar a cabo la síntesis replicativa del DNA. Estudios más recientes, indican que este tipo de polimerasas también participa en mecanismos de reparación por escisión (Snyder y Regan, 1981; Miller y Lui, 1982; Seki, *et al*, 1982; Yamada, *et al*, 1985).

Se ha podido observar una gran heterogeneidad en cuanto al peso molecular de las diferentes DNA pol. tipo α aisladas a partir de una gran variedad de sistemas celulares, que van desde 70,000, hasta 1,000,000. Algunas de las DNA polimerasas α que se han aislado están formadas por varias subunidades; constituidas por un corazón o centro catalítico con un PM aproximado de 150,000, en asociación con otras 3 o 4 subunidades menores que van de 40-60,000 de PM (McKune y Holmes, 1979; Grosse y Krauss, 1981; Masaki, *et al*, 1982).

Estudios más recientes, han mostrado que la DNA pol. α se encuentra asociada a una actividad de DNA primasa, aislada a partir de varias

fuentes diferentes, como una parte de la molécula multimérica (Conaway y Lehman, 1982; Shioda, *et al*, 1982; Tseng y Ahlem, 1982; Kaguni *et al*, 1983; ; Yagura, *et al*, 1983; Holmes, *et al*, 1985; Suzuki, *et al*, 1985). La DNA primasa es la enzima encargada de sintetizar pequeños fragmentos de oligorribonucleótidos que funcionan como cebador para ser extendidos por la DNA pol. formando así los fragmentos de Okazaki. La replicación del DNA por el complejo eucariótico DNA polimerasa-DNA primasa involucra la síntesis de pequeños fragmentos de RNA cebador por la primasa, seguido por la replicación de la cadena de DNA por la DNA pol.

Es muy posible que la DNA pol. encargada de llevar a cabo la replicación del DNA pol. α , por comparación con la DNA pol. III de *Escherichia coli*, sea también una holoenzima constituida por varias subunidades, las cuales desempeñan diferentes funciones dentro del proceso. Al menos se ha podido determinar ya la asociación de una actividad de DNA primasa; aún falta realizar muchos estudios para determinar las funciones de las demás subunidades relacionadas con la actividad de DNA pol. α . No se había reportado que existiera una actividad de tipo nucleolítica asociada con esta enzima. Actualmente se discute sobre la posibilidad de que la DNA pol. δ (designada con esta letra por ser la última pol. de eucariotes descubierta) la cual presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' y DNA primasa asociada a ella; sea o no en realidad una pol. tipo α con estas dos actividades asociadas, pero de eso se hablará más adelante, cuando se revisen los datos referentes a la DNA pol. δ .

DNA POLIMERASA BETA.

Hasta hace algunos años, se pensaba que este tipo de polimerasa era exclusiva de los animales, ya que no se había podido detectar activi-

dad tipo β ni en eucariotes inferiores, ni en plantas (Chang, 1976). En la actualidad, existen reportes que indican la presencia de una enzima de este tipo tanto en hongos (Baril, *et al*, 1980), protozoarios (Furukawa, *et al*, 1979), así como en el reino vegetal, a lo cual se hará referencia mas adelante. Lo anterior indica que este tipo de actividad, DNA pol. β , puede estar universalmente presente en todos los organismos eucarióticos. Sin embargo, en estas especies no animales, la pol. tipo β no está presente en todos los tejidos, o en todos los estados del desarrollo. En *Tetrahymena* por ejemplo, la producción de pol. tipo β se limita a la fase logarítmica tardía de los cultivos. En *Drosophila*, pol. β es difícil de detectar en estadios tardíos del desarrollo. Esto podría explicar el hecho de no haber podido detectar anteriormente este tipo de enzima en estos organismos.

Las pol. tipo β no requieren de grupos sulfhidrilo para su actividad y por tanto, no son inhibidas por agentes bloqueadores de estos grupos y, a diferencia de lo que ocurre con las pol. tipo α , éstas son estimuladas por altas concentraciones de cationes monovalentes. Este tipo de enzima, es fuertemente inhibida por ddNTP, e insensible a ara-NTP y afidicolina. Por ello, estos inhibidores son muy útiles para poder distinguir a los diferentes tipos de polimerasas. Además, este tipo de pol. muestra una gran resistencia a agentes químicos como ácido fosfonoacético, urea 5M y alcohol o acetona al 20-25%. (Borden, *et al*, 1975; Chang, 1973).

El tipo de molde sintético que prefieren es DNA con huecos, al igual que las pol. tipo α . Este tipo de pol. se localiza exclusivamente en núcleo, unida fuertemente a la cromatina (Foster y Gurney, 1974). La enzima purificada está libre de actividad nucleolítica. Es una enzima relativamente pequeña, consiste de un solo péptido con un coeficiente de sedimentación 4S y un PM entre 30-40,000. Tiene punto isoeléctrico básico.

Aún no se ha definido cual es su papel preciso *in vivo*, aunque se le ha atribuido una función principal en la reparación del DNA. En primer lugar no existen fluctuaciones medibles en su actividad durante el ciclo celular (Spadari y Wissbach, 1974; Chiu y Baril, 1975). En linfocitos estimulados por fitohemaglutinina, el mayor incremento en pol. tipo β se encontró que coincide con el pico de actividad reparadora y mínima replicación del DNA (Bertazzoni, *et al*, 1976). Finalmente se encontró que la pol. tipo β puede participar en reparación por escisión del DNA en neuronas no dividiéndose, dañadas con luz U. V. (Hübscher, *et al*, 1979; Waser, *et al*, 1979), que no contienen pol. α . Estos resultados se han confirmado para otras especies (Pedrali-Noy y Spadari, 1980; Siedlecki, *et al*, 1980). Estudios más recientes sugieren que la DNA pol. β funciona sola en la reparación de tramo corto, pero que tanto α como β están involucradas en la reparación de tramo largo (Mosbaugh y Linn, 1984).

DNA POLIMERASA GAMA.

El tercer tipo de DNA pol., pol. γ , constituye sólo una pequeña porción de la actividad total. Al igual que las pol. tipo α y β , muestran una naturaleza heterogénea cuando se le aisla, y se han reportado P.M. de 110-300 Kd. (Spadari, *et al*, 1974), y también es común encontrar formas agregadas de la misma. No se ha encontrado actividad nucleolítica intrínseca. Tiene punto isoeléctrico ácido.

Una característica muy importante de este tipo de pol., que en parte se toma para distinguirla de la pol. tipo α ya que presentan muchas características en común, es que puede copiar además de moldes de DNA naturales o sintéticos, una gran variedad de ribohomopolímeros sintéticos como polirA, polirC, etc. (Gerard, 1975; Knopf, *et al*, 1976). Además también puede distinguirse de α y β , porque las pol. tipo γ son estimuladas tanto por cationes monovalentes como

por fosfato en presencia de KCl, cosa que no ocurre con pol. α , ya que es inhibida por altas concentraciones de cationes monovalentes, o con pol. β , la cual muestra inhibición en presencia de fosfato. La pol. γ es inhibida por agentes bloqueadores de grupos sulfhidri- lo y ddNTP, pero es insensible a afidicolina.

La actividad de la enzima muestra una correlación con la replicación del DNA, y por ello se ha sugerido que pudiera estar involucrada en la replicación del DNA. Un dato interesante, surge por el hecho de que este tipo de pol. es muy similar a la pol. encontrada en mitocon- dria. Esto ha llevado a que algunos investigadores sugieran que, - de hecho, la DNA pol. γ es la mitocondrial y que no está involucra- da en la síntesis del DNA nuclear (Hubscher, *et al.*, 1979, Geuskens, *et al.*, 1981); independientemente de que esta pueda localizarse en el núcleo. No obstante, algunos trabajos han mostrado que existen dos poblaciones distintas de enzimas capaces de utilizar polirA-oligdT - como molde sintético (Fry y Weissbach, 1973; Wang, *et al.*, 1975). Pe- ro aún queda por determinar si éstas representan dos poblaciones de la misma enzima, o si se trata de dos enzimas diferentes.

En la tabla II se resumen las características y propiedades más im- portantes de estos tres tipos de polimerasas.

DNA PLIMERASA DELTA.

La alta fidelidad en la replicación de procariotes se ha adscrito en parte, a la presencia de una actividad exonucleasa 3'-5' asociada - con los diferentes tipos de DNA pol. (Gefter, 1975). Dicha activi- dad, tiene una función de lectura de corrección y remueve los nucleoti- dos mal apareados incorporados en la terminal del DNA reciente du- rante la polimerización del DNA (Brutlang y Kornberg, 1972). Por tanto, esta actividad de nucleasa juega un importante papel en la fi- delidad de la replicación y la prevención de mutaciones.

TABLA. II. Algunas propiedades de la DNA polimerasa α , β y γ de animales.

Propiedad	Pol α	Pol β	Pol γ
Fisico-químicas:			
PM (nativa) K d	190 - 450	40	180 - 330
Punto isoelectrico	ácido	básico	ácido
Orden de elución en fosfocelulosa	2	1	3
Catalítica			
pH óptimo	7.2	8-9	8-9
Catión preferido	Mg ⁺⁺	Mg ⁺⁺ Mn ⁺⁺	Mg ⁺⁺ Mn ⁺⁺
Funcional y biológica			
Molde sintético preferido	DNA con huecos	DNA con huecos	ribohomopol.
Nucleasa	no	no	no
Cantidad relativa en células en crecimiento	> 80	10 - 15	2 - 5
Presencia de subunidades	si	no	no
Nº de moléculas/célula	6x10 ⁴	2.5x10 ⁴	4 x10 ⁴
Síntesis por desplazamiento de cadena.	no	si	si
Efecto inhibitorio			
Bloqueadores de - SH (NEM)	fuerte	no	fuerte
Sal (K Cl 200 mM)	si	estimula	estimula
Fosfato (0.1 M)	no	si	estimula
Calor (10 min a 40°C) ^a	0	70-100	70
Didesoxi-NTP	no	fuerte	fuerte
Arabinosil-NTP	fuerte	no	no
Aftidicolina	si	no	no
Función propuesta	Replic.DNA _n	Reparación	Replic.DNA _m
Localización	Núcleo	Núcleo	Mitocondria ^b

a) porcentaje de actividad perdida.

b) también encontrada en el núcleo

Sin embargo, no se había reportado que las DNA pol. de eucariotes es tuvieran asociadas con una actividad exonucleasa de ningún tipo (Chang, 1973; Bollum, 1975; Sedwick, *et al*, 1975), por lo que se creía que - las DNA pol. de eucariotes carecían de actividad exonucleolítica. Ya que la alta fidelidad en la replicación del DNA de eucariotes también se mantiene rigurosamente, se surtió que debían existir mecanismos - diferentes para corregir los errores en la incorporación en las células de eucariotes (Hopfield, 1974; Abbots y Loeb, 1985).

Sin embargo, en 1976, Byrnes y colaboradores, reportaron la presencia de una actividad exonucleasa 3'-5' asociada con una nueva especie de DNA pol. de elevado PM, a la que denominaron DNA pol. δ , presente en médula. Recientemente, se ha podido aislar a partir de otras fuentes (Lee, *et al*, 1984; Crute, *et al*, 1986).

Este tipo de pol. presenta algunas características en común con la DNA pol. tipo α , las cuales incluyen; un elevado PM, una gran sensibilidad a NEM y afidicolina, y como una parte constitutiva del complejo, poseen una actividad de DNA primasa (Crute, *et al*, 1986).

La diferencia más importante entre las pol. α y δ , es la presencia de una actividad exonucleasa 3'-5' intrínseca a pol. δ . También se ha visto que esta enzima exhibe diferencias en la especificidad de molde. Sustratos de DNA tales como dA-dT o dG-dC alternados, o poli(dA) cebado con segmentos de oligo-(dT) logran la mayor actividad de polimerización con esta enzima, mientras que el molde sintético preferente de las pol. tipo α es el DNA de timo de ternera activado (Kornberg, - 1980).

Debido a las similitudes existentes entre las DNA pol. α y δ , se sugiere que esta última podría ser una DNA pol. tipo α con una exonucleasa asociada y que esta podría haberse perdido durante la purificación de DNA pol. α aislada previamente, al menos para las especies - en las que se ha encontrado la DNA pol. δ , ya sea por remoción de la subunidad o por proteólisis (Crute, *et al*, 1986). La presencia de una DNA pol. α asociada con una exonucleasa podría explicar la alta fidelidad en la replicación del DNA.

DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES.

Mientras que los patrones de las diversas polimerasas encontradas en vertebrados se encuentran relativamente bien caracterizadas, la naturaleza de las DNA pol. presentes en plantas superiores aún es materia de discusión.

DNA POLIMERASA ALFA.

Se ha podido purificar, a partir de un gran número de diferentes especies, una pol. que tiene muchas propiedades en común con las pol. tipo α de animales. Estas incluyen; elevado PM, baja concentración óptima de KCl, inhibición por NEM, así como la incapacidad para poder utilizar poli(rA)-oligo(dT) como molde sintético.

Las enzimas mejor caracterizadas son las purificadas a partir de espinaca (Misumi y Weissbach, 1982), trigo (Castroviejo, *et al*, 1979), - *Vinca rosea* (Gardner y Kado, 1976) y arroz (Amileni, *et al*, 1979). También se han aislado pol. tipo α y descrito algunas de sus propiedades a partir de otras especies, pero solo en el caso de las enzimas aisladas a partir de trigo, espinaca y arroz, se ha utilizado - afidicolina y se ha observado que su mecanismo de acción es el mismo que en animales (Sala, *et al*, 1980 b).

En el caso de embriones de trigo, encontraron dos polimerasas tipo α , una que no se retiene en una columna de DEAE-celulosa y otra que eluye a 300 mM de KCl (Castroviejo, *et al*, 1979). Observaron que la pol. que sí se retiene en la columna posee actividad nucleolítica - asociada a ella; al igual que para la pol. de elevado peso molecular aislada a partir de coliflor (Matsumoto, *et al* 1981). En virtud de que ninguna de estas enzimas se ha purificado a homogeneidad, no pueden aún agrupárseles dentro de las pol. tipo δ de animales, ya que

existe la posibilidad de que junto con la actividad de pol. esté copurificando una nucleasa.

En 1984, Graveline y colaboradores, encontraron la presencia de una actividad de DNA primasa en trigo. Este mismo grupo, ha aislado varias DNA pol. (Castroviejo, *et al*, 1979), y a diferencia de lo que ocurre en animales, al parecer la DNA primasa aislada de trigo se asocia con la DNA pol. A (tipo γ) a lo cual se hará referencia mas adelante.

En el caso de DNA pol. aisladas a partir de otras fuentes, se ha podido observar que la de tipo α es la mas abundante en células creciendo exponencialmente, y responde a cambios en la velocidad de multiplicación celular (Amileni, *et al*, 1979; Sala, *et al*, 1981).

DNA POLIMERASA BETA.

La existencia de una polimerasa tipo β en plantas aún no es muy clara. Se han descrito DNA pol. de bajo PM en remolacha (Tymonko y Dunham, 1977) y chícharo (Chivers y Bryant, 1983), pero estas enzimas son muy sensibles a NEM, en contraste con la resistencia (arriba de 20 mM) a este agente por la pol. tipo β de animales. Algunos investigadores han propuesto que las plantas no poseen una DNA pol. de bajo PM, ya que este tipo de enzima no ha podido detectarse en extractos crudos de trigo y *V. linca rosea* (Chang, 1976; Gardner y Kado, 1976). Otros investigadores han descrito pol. tipo β basándose en el criterio de una fuerte afinidad de la enzima a la cromatina (Stevens, *et al* 1978; D'Allesandro, *et al*, 1980). No obstante, existen reportes de la presencia de una DNA pol. semejante a la β de animales en azucena (Sakaguchi, *et al*, 1980), coliflor (Yamaguchi, *et al*, 1979; Fukasawa, *et al*, 1980) y trigo (Graveline, *et al*, 1984), pero al menos en azucena, este tipo de pol. solo se produce durante la

profase meiótica. Como se mencionó anteriormente, parecer ser que - en las especies no animales, la pol. tipo β no está presente en todos los tejidos o en todos los estados del desarrollo.

La enzima aislada a partir de coliflor ha sido mejor caracterizada, y muestra algunas similitudes con la β de animales. Estas incluyen una estimulación por altas concentraciones de cationes monovalentes, es fuertemente inhibida por fosfato, pero a diferencia de la β de animales, ésta es moderadamente inhibida por NEM y estimulada por ácido fosfonoacético. Tiene un PM algo mayor y no se encontró actividad nucleolítica asociada a ella.

DNA POLIMERASA GAMA.

En adición a las dos enzimas descritas arriba, las plantas superiores también poseen una tercera DNA pol., equivalente a la pol. tipo γ de animales, la cual muestra una marcada preferencia por poli(rA)-oligo(dT) como molde *in vitro*. Esta se ha podido detectar al menos en tres especies diferentes; tabacó (Srivastava, 1974), trigo (Castro viejo, *et al*, 1979) y arroz (Amileni, *et al*, 1979; Sala, *et al*, 1981).

La DNA pol. A (tipo γ) de trigo, tiene un PM de 100,000 y es la única enzima, entre todas las presentes, capaz de iniciar la síntesis de DNA a partir de un cebador. (Graveline, *et al*, 1984). Además, encontraron que es el único tipo de pol. que puede asociarse con la actividad de DNA primasa que pudieron aislar. (Graveline, *et al*, -- 1984).

En el caso de la pol. tipo γ de arroz, se ha visto que esta se encarga de llevar a cabo la replicación del DNA de los organelos. Tiene un PM aproximado de 100,000 y prefiere poli(rA)-oligo(dT) como molde sintético, principal característica de las DNA, tipo γ . Su activi

dad es dependiente de Mn^{++} y de una alta fuerza iónica, es resistente a afidicolina, inhibida por NEM y tiene un pH óptimo entre 8-9.

DNA POLIMERASA DE MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS.

Como se mencionó anteriormente, la pol. tipo γ de animales se encuentra presente tanto en la fracción molecular como en la mitocondrial. En plantas, la clasificación de la DNA pol. mitocondrial como una enzima tipo γ no es tan evidente. La enzima purificada a partir de mitocondria de trigo, es incapaz de reconocer poli(rA)-oligo(dT) como molde sintético, característica principal de las pol. tipo γ . No obstante, se parece a la pol. mitocondrial de animales en su respuesta a inhibidores. Es resistente a afidicolina y sensible a ddTTP y bromuro de etidio (Christophe, *et al*, 1981; Richard, *et al*, 1983).

Se ha observado que extractos mitocondriales de inflorescencias de coliflor pueden reconocer eficientemente poli(rA)-oligo(dT) solo en presencia de Mn^{++} , pero no se han realizado estudios con inhibidores de esta enzima (Fukasawa y Chou 1980).

En 1980, se logró la purificación parcial de una DNA pol. a partir de cloroplastos de espinaca, la cual se comporta como la pol. tipo γ , ya que es capaz de utilizar eficientemente un molde sintético de poli(rA)-oligo(dT), mientras que, sorprendentemente, no reconoce DNA activado (Sala, *et al*, 1980a).

Más recientemente se ha podido purificar, a homogeneidad, una DNA pol. a partir de cloroplastos de chícharo. Esta enzima es un monómero de 90,000 de PM, es fuertemente inhibida por NEM, insensible a afidicolina e incapaz de reconocer como molde poli(rA)-oligo(dT) sintético (McKown y Tewari, 1984).

De lo anterior, resulta evidente que el estudio de las DNA pol. en plantas superiores aún se encuentra en sus inicios. Es claro, que aún falta realizar muchos estudios con respecto a las pol. presentes en las plantas superiores y a la posible función que desempeña cada una de ellas.

En la tabla III se resumen algunas de las características principales de las pol. presentes en algunas especies vegetales.

ANTECEDENTES INMEDIATOS DEL TRABAJO.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis replicativa del DNA es un evento que ocurre relativamente tarde durante la germinación de semillas, particularmente en gramíneas (Osborne, *et al*, 1980; Vázquez-Ramos y López, 1986). No obstante, se ha encontrado que existe un bajo nivel de síntesis de DNA, el cual precede al proceso replicativo, y que puede detectarse dentro de los primeros 15 min. de imbibición en embriones de centeno (Osborne, *et al*, 1980) y dentro de la primera hora en ejes embrionarios de maíz (Vázquez-R. y López, 1986).

Dicha síntesis temprana no programada de DNA se ha considerado que pudiera ser de tipo reparativo, de acuerdo a la evidencia obtenida con embriones de centeno normales y γ irradiados (Osborne, *et al*, 1980; Vázquez-R. y Osborne, 1986).

Adicionalmente, en el laboratorio se ha observado, por estudios realizados en núcleos aislados a partir de ejes embrionarios de maíz, que la síntesis de DNA reacciona de manera diferente cuando se adicionan diversos compuestos capaces de inhibir este proceso en etapas tempranas de imbibición, 0-3 hrs., que cuando se adicionan en etapas tardías, 15 hrs, o más (Vázquez-R. y López, 1986).

TABLA III. Algunas propiedades de la DNA polimerasa α , β y γ de plantas superiores.

	α	β	γ
P. M.	110,000	-	100,000
p H óptimo	7 - 8	-	8 - 9
Inhibidores			
Ara-CTP	si	no	no
NEM	fuertemente	debilmente	si
Afidicolina	si	no	no
[KCl] > 200 mM	si	estimula	estimula
fosfato	no	si	no

En base a estos datos, y a lo reportado con referencia a la posible función que desempeñan los diferentes tipos de DNA pol. presentes en eucariotes, sería de esperarse, que en etapas tempranas de imbibición pudiera estar presente preferencialmente una actividad de DNA - pol. tipo β , y en etapas tardías una de tipo α . Es decir, que se postula la posible existencia de diferentes DNA pol. durante las diferentes etapas en la germinación de maíz.

En base a lo anterior, el objetivo general del presente trabajo consiste en aislar y caracterizar el tipo de DNA pol. presente, en ejes embrionarios de maíz, tanto en la etapa temprana como en la tardía de la imbibición de los mismos.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Las semillas de maíz, denominado chalqueño, utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en PRONASE (Productora Nacional de Semillas de la SARH).

2. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS UTILIZADOS.

2.1 Solución amortiguadora de imbibición.

Tris-HCl (Sigma Chemical, Co.) pH 7.6	50	mM
Cloruro de potasio (KCl)	50	mM
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	10	mM
Sacarosa	2	g
Cloranfenicol (Sigma Chemical, Co.)	10	μg/ml

2.2 Solución amortiguadora A para homogeneizar.

Tris-HCl pH. 7.6	50	mM
Cloruro de potasio (KCl)	25	mM
2-mercaptoetanol	1	mM
Sacarosa	0.25	M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma).	0.10	mM
Cloruro de magnesio	1	mM

2.3 Soluciones amortiguadoras empleadas en la purificación.

Todos los amortiguadores empleados en el proceso de purificación tienen los mismos componentes, lo único que cambia en cada caso es la concentración de fosfato de potasio, la cual es específica para cada amortiguador:

Fosfato de potasio	pH 7.5		
Acido etilendiamino tetracético (EDTA) (Merck).		1	mM
Glicerol		10	%
2-mercaptoetanol		1	mM
PMSF		0.15	mM

2.3.1 Solución amortiguadora B:

Fosfato de potasio	60	mM
--------------------	----	----

2.3.2 Solución amortiguadora C:

Fosfato de potasio	400	mM
--------------------	-----	----

2.3.3. Solución amortiguadora D:

Fosfato de potasio	25	mM
--------------------	----	----

2.3.4 Solución amortiguadora E:

Fosfato de potasio	10	mM
--------------------	----	----

2.4 Líquido de centelleo.

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

2.5 Solución amortiguadora para activación de DNA.

Tris-HCl pH 7.5	50 μ M
MgCl ₂	5 μ M
Albúmina de suero de bovino (ASB, Sigma Chem. Co.)	0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera (Sigma Chem. Co.)	0.25 mg/ml

2.6 Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa.

2.6.1 DNA polimerasa α :

Tris-HCl pH 7.6	25 mM
KCl	16 mM
MgCl ₂	6 mM
dATP (Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
dCTP (Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
dGTP (Sigma Chem. Co.)	0.1 mM
Glicerol	4 %
2-mercaptoetanol	0.4 mM
DNA activado	1 μ g
ATP (Sigma Chem. Co.)	1 mM
(metil- ³ H) TTP (57 Ci/mmol, Amersham)	5 μ Ci/ml

2.6.3 DNA pol. β :

Tris- HCl	pH 8.5	50	mM
KCl		100	mM
MgCl ₂		20	mM
dATP		1	mM
dCTP		1	mM
dGTP		1	mM
Glicerol		4	%
2-mercaptoetanol		0.1	mM
DNA activado		1	μ g
ATP		1	mM
(metil- ³ H) TTP		5	μ Ci/ml
N-etilmaleimida (NEM, Merck)		10	mM

2.7 Soluciones requeridas para geles de acrilamida.

2.7.1 Solución amortiguadora para el gel separador:

Tris-HCl	pH 8.8	0.75	M
Dodecil sulfato de sodio (SDS, Merck)		2	%

2.7.2 Solución amortiguadora para el gel concentrador:

Tris-HCl	pH 6.8	0.25	M
SDS		2	%

2.7.3 Solución amortiguadora para los electrodos:

Tris- HCl	pH 8.3	25	mM
L-glicina		0.19	mM
SDS		2	%

2.7.4 Solución amortiguadora para la muestra:

Tris-HCl	pH 6.8	50	mM
EDTA		20	mM
SDS		1	%
Glicerol		10	%
2-mercaptoetanol		1	%
Azul de bromofenol		0.001	%

2.7.5 Solución para tefir el gel:

Azul de coomassie	0.2	%
Metanol	50.0	%
Acido acético	7.0	%

2.7.6 Solución destañidora:

Acido acético	7.0	%
---------------	-----	---

2.7.7 Solución stock de acrilamida (30% en 100 ml. de agua) :

Acrilamida (Merck)	30.0	g
Bis-acrilamida	0.8	g

2.8 Reactivos requeridos para determinar proteínas totales por el método modificado de Lowry (Peterson, 1977).

2.8.1 Reactivo A:

Se mezclan partes iguales de una solución de hidróxido de sodio 0.8 N, SDS al 10%, agua destilada y una solución - stock de cobre-tartrato-carbonato (CTC. 2.8.3.1.).

Esta solución es estable por dos semanas a temperatura am biente.

2.8.2 Reactivo B.

Reactivo de Folin-Ciocalteu	1.0	vol.
Agua destilada	5.0	vol.

2.8.3 Soluciones complementarias.

2.8.3.1 Solución stock CTC:

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	10.0	g
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1	g
Tartrato de sodio potasio	0.2	g

Esta solución es estable por dos meses a temperatura ambiente.

2.8.3.2 Desoxicolato de sodio (DOC) 0.15 g

2.8.3.3. TCA 72.0 g

2.8.3.4. Solución proteica para la construcción de la curva patrón.

Albúmina de suero bovino 1.0 mg/ml.

2.9 Solución salina de citrato para disolver DNA (SSC).

Cloruro de sodio (NaCl)	pH 7.0	0.15	M
Citrato de sodio		0.015	M

2.10 Preparación de bolsas de dialisis.

Las bolsas se hierven dos veces con NaHCO_3 durante 10 min. y dos veces con EDTA 5 mM durante 10 min. Se guardan en EDTA 5 mM y etanol al 10% en refrigeración.

Antes de usarse, las bolsas se enjuagan muy bien con agua desionizada.

2.11 Preparación de la solución de salmina.

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

La solución se clarifica por filtración, y se guarda a 4°C.

3. PREPARACION DE RESINAS.

3.1 Fosfocelulosa (Whatman, P-11).

Se coloca 1 g. de P-11 en 35 ml. de HCl 0.2 N 1:1 en etanol al 95% durante 30 min. a temperatura ambiente, agitando suavemente. Se deja reposar y se decanta el sobrenadante eliminando los finos y materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío y se lava 3 veces con 175 ml. de agua destilada.

Se lleva a pH 7.0 con NaOH 1 N y se resuspende en 35 ml. de NaOH 0.1 N, agitando suavemente durante 30 min. a temperatura ambiente. Se deja reposar y se decanta el sobrenadante eli-

minando finos y materia particulada. La resina se colecta por filtración al vacío.

La resina se resuspende en 35 ml. de EDTA 1 mM, agitando suavemente durante 30 min. a temperatura ambiente. Se deja reposar y se decanta el sobrenadante eliminando los finos y se lava 3 veces con 175 ml. de agua destilada. Se lleva a pH 7.0 con HCl 1 N.

La resina se resuspende en la solución amortiguadora B (2.3.1.).

3.2. Hidroxiapatita (HTP, Sigma):

Se coloca 1 parte de HTP en 6 volúmenes de solución amortiguadora D(2.3.3.), agitando suavemente durante 30 min. Se deja clarificar durante 10 min. Se decanta eliminando los finos y materia particulada.

Se agrega un volumen igual de la solución amortiguadora D, agitando suavemente durante 30 min. Se deja clarificar, se decanta eliminando los finos, y se resuspende la resina en la misma solución amortiguadora.

3.3 Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa, Sigma).

Se colocan 5 g. de DEAE-celulosa en 75 ml. de HCl 0.5 N agitando suavemente durante 45 min. a intervalos de 15 min. Se lava con agua destilada hasta llegar a pH 4.0.

La resina se resuspende en 75 ml. de KOH 0.5 N, agitando suavemente durante 45 min., cada 15 min., a temperatura ambiente. Se lava con agua destilada hasta llegar a pH 8.0.

La resina se resuspende en 80 ml. de KCl 0.05 N, y se lleva a pH 7.2 con HCl 0.05 N. Se agita suavemente durante 1 hr., a intervalos de 15 min., a temperatura ambiente. Se retitula a pH 7.2, y se agita suavemente durante 2 hr., cada 30 min. Se retitula una vez más a pH 7.2 y se decanta eliminando los finos y materia particulada.

La resina se resuspende en la solución amortiguadora E (2.3.4.).

3.4 Sefadex G-150 (Sigma Chemical, Co.).

El gel se pone a hinchar en agua desionizada a 4°C durante 48 hrs. Se decantan los finos, se monta la columna y se equilibra con la solución amortiguadora B (2.3.1.).

~~MÉTODOS.~~

1. Imbibición de ejes embrionarios.

Las muestras de ejes embrionarios, 10 para curva de síntesis de DNA y 1000 para extracción y purificación de DNA pol., previamente desinfectados con NaClO al 0.5 %, se colocan en tubos de cultivo estériles que contienen papel filtro humedecido con solución amortiguadora de imbibición, se incuban a 27° durante el tiempo indicado en cada caso.

Para las muestras que se utilizan para la curva de síntesis de DNA, la solución amortiguadora de imbibición contiene además 5 μ Ci/ml de (metil-³H) timidina (87 Ci/mmol, Amersham).

2. Curva de síntesis de DNA (incorporación de tritio a material insoluble en TCA).

2.1 Procesamiento de los ejes.

Pasado el tiempo de imbibición, los ejes se lavan con 10ml de citrato de sodio 1%, conteniendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina - no marcada, y luego con 10 ml. de etanol al 80%, conteniendo también 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina. Las muestras se guardan en tubos de ensaye a -70°C , hasta que se utilizan para determinar la incorporación de la marca.

2.2 Determinación de la incorporación de la marca.

Las muestras se homogeneizan en 1.5 ml. de etanol al 80% - conteniendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de timidina, con la ayuda de un Polytron PCU-2, durante 25 seg. a la máxima velocidad. Este proceso se realiza en frío, teniendo cuidado de que la suspensión sea homogénea, es decir, que no queden pedazos de ejes embrionarios.

El homogeneizado se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 min. el sobrenadante se desecha y la pastilla se resuspende en 0.5 ml. de NaOH 1 M, se calienta en baño maría a 90°C durante 3 min. Las muestras se dejan enfriar, se les añade 2 ml. de TCA al 10% y se dejan en hielo durante 15 min.

Se filtran, utilizando un sistema de filtración Millipore con filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, y se lavan primero con una solución de TCA al 5% (7 ml) y luego con etanol al 96% (7 ml.).

Una vez que los filtros están completamente secos, se transfieren a frascos que contienen 5 ml. de líquido de centelleo (2.4) y se determinan las cuentas por minuto (cpm) - utilizando para ello un contador de centelleo Packard, Tri-Carb.

3. Preparación del extracto celular.

Pasado el tiempo de imbibición, los ejes embrionarios se homogeneizan con 2.5 vol. (relación de peso fresco de los ejes a volumen de solución amortiguadora) de solución amortiguadora A (2.2), con la ayuda de un Polytron, en la forma antes descrita. Todas las manipulaciones se realizan a 4°C.

El homogeneizado se centrifuga a 5,000 Xg durante 15 min., se realiza una reextracción de la pastilla con 1.5 vol. de solución amortiguadora A, se centrifuga una vez a 5,000 Xg durante 15 min. Se combinan los sobrenadantes de estas dos centrifugaciones y se realiza una tercera a 5,000 Xg durante 15 min.

Esta centrifugación sirve para eliminar restos celulares y la mayoría de los lípidos presentes. El sobrenadante se centrifuga a 100,000 Xg durante 2 hrs. a 4°C, la pastilla se desecha y el sobrenadante se utiliza como fuente enzimática para continuar la purificación (fracción I).

4. Preparación de DNA activado (según Aposhian y Kornberg, -- 1962).

Se hacen reaccionar 0.25 mg. de DNA de timo de ternera (Sigma), previamente disuelto en 1 ml. de solución amortiguadora de activación (2.5) con 5×10^{-4} µg de DNAasa I (Sigma). Se

incuba 15 min. a 37°C y luego se calienta 5 min. a 77°C; - finalmente se pasa a un baño de hielo.

5. Determinación de la actividad de DNA polimerasa.

5.1 DNA pol. α .

La actividad de DNA pol. α se ensaya en un volumen final de 100 μ l. que contiene la mezcla de reacción (2.6.1.) y de 10-20 μ l. de extracto proteico o de las fracciones de las columnas. A menos que se especifique otra cosa, la incubación se lleva a cabo a 37°C. durante 30 min. La reacción se detiene adicionando 100 μ l. de una solución de DNA de esperma de salmón (2 mg/ml., Sigma Chem. Co) disuelto en solución salina de citratos (SSC, 2.8.), y 2 ml. de TCA al 10% frío. Las muestras se colocan en hielo durante 30 min.

La radiactividad incorporada en forma insoluble en TCA, se colecta filtrando por vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros se lavan primero con 5 ml. de TCA al 5% frío y luego con 5 ml. de etanol al 96%. Se secan perfectamente y se transfieren a frascos que contienen líquido de centelleo. Se determinan las cpm en el contador de centelleo.

Una unidad de actividad enzimática se define como un pmol de desoxirribonucleótido incorporado en forma insoluble en ácido a 37°C durante 30 min.

5.2 DNA pol. β .

La actividad de DNA pol. β se ensaya en un volúmen final de 100 μ l que contiene la mezcla de reacción (2.6.2.) y de 10-20 μ l de extracto proteico o fracción de las columnas. En este caso, se realiza una preincubación a 0°C durante 30 min. con el fin de inactivar a la DNA pol. tipo α presente. La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 30 min., la reacción se detiene adicionando 100 μ l de una solución de DNA de esperma de salmón (2 mg/ml) y 2 ml. de TCA al 10% frío. Se colocan en hielo durante 30 min.

El material radiactivo incorporado en forma insoluble en TCA se obtiene en la forma antes descrita.

5.3 Efecto de inhibidores.

La actividad de DNA pol. α se ensaya y determina en la forma descrita en la sección correspondiente, sólo que a la mezcla de reacción se le adicionan diferentes sustancias y se determina su efecto.

5.3.1 Novobiocina (Merck), concentración final 100 μ g/ml disuelta en agua.

5.3.2. 1- β -D-arabinofuranosil-citosina 5'-trifosfato (ara-CTP) - concentración final 200 μ g/ml, disuelto en agua.

5.3.3. N-etilmaleimida (NEM), concentración final 10 mM disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO).

- 5.3.4. Butilaminouracilo (BuAU) concentración final 40 μ g/ml., - disuelto en DMSO.
- 5.3.5. Afidicolina (Afi) concentración final 50 μ g/ml., disuelta en etanol.

Para el caso de NEM, BuAU y afidicolina se incluye un control adicional, al cual se le agrega una cantidad equivalente del solvente utilizado. El valor obtenido es el que se toma en cuenta para determinar el efecto del inhibidor correspondiente.

6. Caracterización.

La actividad de DNA pol. α se ensaya y determina en la forma antes descrita, sólo cambiando las condiciones y concentraciones descritas a continuación.

6.1 pH. El tris de la mezcla de reacción se ajusta a pH 6.6., - 7.0, 7.6, 8.5 y 9.5, respectivamente.

6.2 Temperatura.

La incubación se lleva a cabo a 25, 30, 37, 40, 45, 50 y - 60°C respectivamente.

6.3 Concentración de KCl.

La concentración de KCl de la mezcla de reacción se ajusta a 0, 16, 30, 50 y 100 mM.

6.4 Concentración de $MgCl_2$.

La concentración de $MgCl_2$ de la mezcla de reacción se ajusta a 0, 6, 12, 30 y 50 mM.

7. Gel de poliacrilamida (Laemmli y Favre, 1973).

7.1 Preparación del Gel.

De la solución stock de acrilamida (2.7.7.) se toma lo necesario dependiendo de la concentración final que se desea y se completa con solución amortiguadora separadora o concentradora respectivamente (2.7.2., 2.7.3.) según sea el caso, se eliminan las burbujas. Para que polimerice se le adiciona 50-100 μ l de persulfato de amonio al 10% y 100 μ l de TEMED al 10% por cada 15 ml. de acrilamida.

7.2 Preparación de las muestras.

A una cantidad equivalente a 75 μ g de proteína de cada muestra se le adiciona un volumen igual de TCA al 20% frío, se deja en hielo durante 15 min., se centrifuga 2 min. en una microfuga, ICE-Micro-MB, se decanta el sobrenadante y se elimina completamente el TCA residual. Se le agregan 20 μ l de solución amortiguadora para la muestra (2.7.4.) - la pastilla se resuspende, se calienta 2 min. a 80°C y se colocan las muestras en el gel.

7.3 Corrida.

Una vez colocadas las muestras en el gel, se monta el aparato de electroforesis vertical LKB, se adiciona la solución amortiguadora para los electrodos (2.7.3.) y se corre a 40 mAmp.

Una vez concluida la corrida, el gel se coloca durante 30 min. en la solución de tñido (2.7.5.) y luego se pasa a la solución destefidora (2.7.6.) en donde se deja hasta que se ven claramente las bandas.

Como patrones de peso molecular se utilizan: fosforilasa bovina (94,000 d), albúmina de bovino (67,000 d), ovoalbúmina (43,000 d), anhidrasa carbónica (30,000 d) inhibidor de tripsina de soya (20,100 d) y α -lactalbúmina (14,400d).

8. Determinación de la concentración de protefna.

8.1 Método modificado de Lowry (Peterson, 1977).

A partir de la solución stock de albúmina de suero bovino (ASB, 2.8.3.4.), se preparan soluciones patrón de diferentes concentraciones de albúmina desde 0 hasta 200 μ g/ml, en un volumen final de un ml.

Las muestras problema (de 10 a 20 μ l) se llevan a un volumen final de 1 ml. con agua destilada.

A cada una de las muestras, tanto las problema como las patrón, se les agrega 0.1 ml. de DOC (2.8.3.2.) mezclando en un vortex y se dejan 10 min. a temperatura ambiente. Pasando este tiempo, se les agrega 0.1 ml. de TCA al 72% frío y se colocan en hielo durante 15 min.

Las muestras se centrifugan 15 min. a 3,000 rpm, el sobrenadante se desecha, a la pastilla se le agrega 1 ml. de agua destilada y 1 ml. del reactivo A (2.8.1.) y se mezcla muy bien en un vortex, se dejan 10 min. a temperatura am -

biente. Pasado este tiempo, se les adiciona 0.5 ml. del reactivo B (2.8.2.), se agita y se deja 30 min. a temperatura ambiente, período en el cual se desarrolla el color. Se lee la absorbancia a 750 nm.

La curva patrón se construye graficando en las abscisas la concentración de proteína (μ g/ml.) y en las ordenadas la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteína de las muestras problema se determina interpolando la absorbancia en la curva patrón.

8.2 Método espectofotométrico.

La estimación de la concentración de proteína por el método espectofotométrico se lleva a cabo fácil y rápidamente, utilizando una pequeña cantidad de muestra, y bajo condiciones en las cuales presenta dificultades la aplicación de otros métodos, como en la presencia de sulfato de amonio u otras sales.

El método consiste en determinar la absorbancia de una solución diluída de proteína tanto a 280 como a 260 nm y aplicar la siguiente fórmula:

Concentración de proteína

$$(\text{mg/ml}) = 1.45 A_{280} - 0.74 A_{260}$$

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, la finalidad del presente trabajo - consiste en aislar y caracterizar la actividad de DNA polimerasa presente tanto en la etapa temprana como en la tardía de la imbibición de ejes embrionarios de maíz. En base a ello, lo primero que se hizo, fué determinar el tiempo al cual correspondían dichas etapas. En la figura 1, se muestra una curva típica de síntesis de DNA, tomada como incorporación de timidina tritiada, con respecto al tiempo de imbibición. En ella se observa claramente, que la síntesis se dispara aproximadamente a las 10 hrs. de imbibición. Asimismo, puede observarse que desde la primera hora se tiene síntesis de DNA, la cual no corresponde, hasta donde se sabe a una síntesis de tipo replicativa. Esto podría indicar que se trata de un proceso temprano de reparación de DNA, por comparación con lo reportado para centeno (Osborne, *et al*, 1980).

Por lo anterior, se escogió trabajar un tiempo de 3 hrs. de imbibición como etapa temprana y uno de 24 hrs. como etapa tardía, y se comenzó a montar la técnica de purificación parcial. Es importante hacer notar que para montar la técnica se comenzó trabajando a 24 hrs. de imbibición, ya que en este tiempo se tiene una mayor síntesis de DNA (fig. 1).

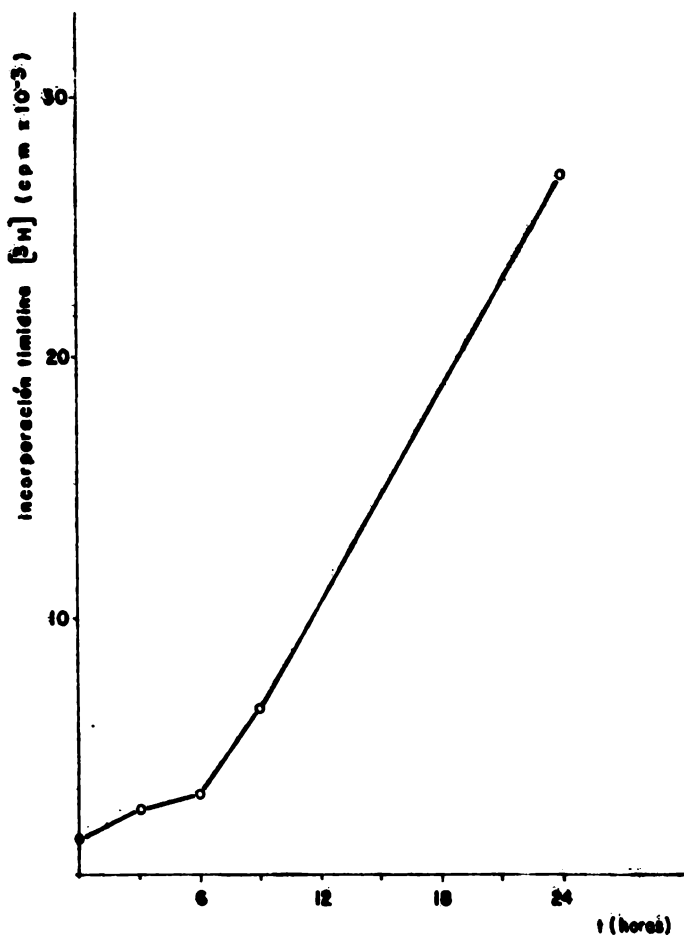


FIG. 1. Curva de síntesis de DNA.

Determinada como incorporación de timidina tritiada a material insoluble en TCA a diferentes tiempos de imbibición.

1. PURIFICACION DE DNA POLIMERASA (ETAPA TARDIA).

Todas las operaciones en el proceso de purificación, se llevan a cabo a 4°C y en presencia de PMSF (0.15M), con el fin de evitar al máximo la degradación proteolítica y con ello la pérdida de la actividad enzimática.

La obtención del extracto proteico, fracción I, se realiza en la forma descrita en métodos (3).

1.1 Fraccionamiento.

A la fracción I se le adiciona lentamente una suspensión de salmína - fría al 10% (Materiales 2.10), 10 μ l/ml. de la fracción I. La suspensión resultante se agita durante 30 min. adicionales, y el precipitado se colecta centrifugando 10 min. a 15,000 Xg.

Con el fin de reducir la cantidad total de proteínas y con ello incrementar la velocidad y facilidad de manipulación de los subsiguientes pasos cromatográficos, se determinó la cantidad de sulfato de amonio que se necesitaba para precipitar la mayor actividad de DNA polimerasa.

En la tabla IV se muestran los datos obtenidos en donde se observa - que la mayor actividad de DNA polimerasa precipita entre 0 y 40% de sulfato de amonio, por ello esa fracción es la que se utiliza en los experimentos posteriores.

Las proteínas se precipitan adicionando lentamente, y con agitación - continua, sulfato de amonio pulverizado (0.243 g/ml. del sobrenadante claro de salmína). Después de agitar durante 30 min. adicionales, la solución resultante se centrifuga 10 min. a 15,000 Xg. El sobrenadante se desecha y la pastilla se resuspende en 2 ml. de la solución

TABLA IX. Actividad de DNA polimerasa que precipita a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

Precipitación con sulfato de amonio (%)	actividad (unidades/ml)
extracto crudo	5.2
0 - 40 %	44.6
40-60 %	7.6
> 60 %	2.2

amortiguadora con la que se equilibra la columna que se va a utilizar. Se dializa toda la noche contra un litro de la misma solución amortiguadora. El material insoluble que aparece durante la diálisis se elimina centrifugando 10 min. a 5,000 Xg. (fracción II).

1.2 Cromatografía.

El siguiente paso para montar el esquema de purificación era determinar el tipo de resina de intercambio iónico más adecuado. Se probaron varias clases de resinas en base a lo reportado en la bibliografía para la purificación de enzimas de este tipo en diferentes sistemas; tanto vegetales, como animales e insectos (Srivastava, 1974; Amileni, *et al*, 1979; Castroviejo, *et al*, 1979; Misumi y Weissbach, 1982; Mechali, *et al*, 1980; Banks, *et al*, 1979).

1.2 Fosfocelulosa.

La fracción II se coloca sobre una columna de fosfocelulosa (1x8 cm), previamente equilibrada con la solución amortiguadora B. La columna se lava con tres volúmenes de columna utilizando la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas por la resina se eluyen, colectando fracciones de 1 ml., utilizando 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 60-400 mM de fosfato de potasio utilizando las soluciones amortiguadoras B y C respectivamente. Una vez obtenidas las fracciones se determina la cantidad de proteína presente y la actividad de DNA polimerasa en las mismas.

Este procedimiento se realizó varias veces sin poder obtener un resultado favorable, pues la actividad de la enzima no se podía detectar.

1.2.2. Hidróxiapatita (HTP).

En base a los resultados obtenidos previamente, se decidió probar otro tipo de resina, y se escogió HTP. El dializado de la fracción II se coloca sobre una columna de HTP (1x8 cm.), previamente equilibrada con la solución amortiguadora D. Las proteínas no retenidas en la columna se lavan con 3 volúmenes de columna con la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas, se eluyen con 8 volúmenes de columna, colectando fracciones de 1 ml., de un gradiente lineal de 25-400 mM de fosfato de potasio pH 7.5 utilizando la solución amortiguadora D y C, respectivamente.

Como puede observarse en la figura 2, se obtiene un pico de máxima actividad alrededor de 165 mM de fosfato de potasio, pero el grado de purificación es bajo y el % de recuperación es muy pobre como se muestra en el cuadro de purificación de la tabla V, otra desventaja que presenta el utilizar este tipo de resina, es la velocidad a la cual fluye la columna, demasiado lenta. Es muy probable que este sea el factor principal por el cual sólo se pudo recuperar una mínima parte de la actividad. Se observó a lo largo de la purificación, que el tiempo es un factor importante en los primeros pasos del aislamiento ya que la enzima parecer ser lábil antes de purificarse.

1.2.3. DEAE-celulosa.

Por los resultados obtenidos con HTP, se decidió probar un tercer tipo de resina, y se escogió DEAE-celulosa. El dializado de la fracción II se coloca sobre una columna de DEAE-celulosa (1x8 cm.), previamente equilibrada con la solución amortiguadora E. Las proteínas no retenidas por la resina se eluyen con tres volúmenes de columna, de la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyen, colectando fracciones de 1 ml., con 8 volúmenes de columna de

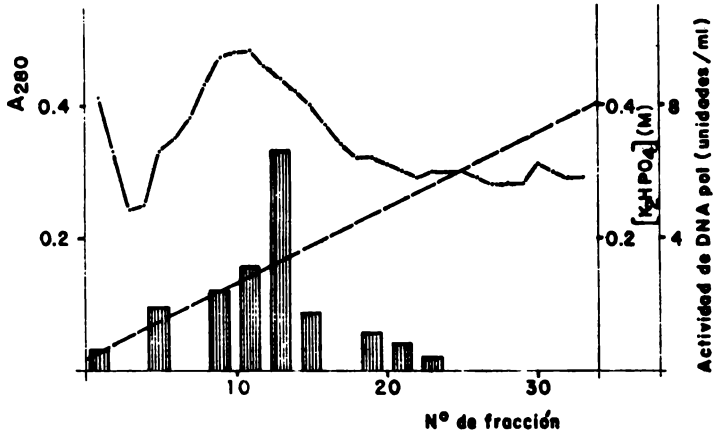


FIG. 2 . Perfil de elución de la columna de HTP de la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios imbibidos durante 24 h. La fracción II (1.2 ml) se aplicó a una columna de HTP (1x8 cm), previamente equilibrada con la solución amortiguadora D (25 mM de fosfato de Potasio) y se lavó con 3 volúmenes de columna con la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 25-400 mM de fosfato de potasio (línea punteada — — —), colectando fracciones de 1 ml. Absorbancia a 280 nm (— — — — —). Actividad de DNA polimerasa (■).

TABLA V. Purificación de la DNA polimerasa (24 horas de imbibición) utilizando HTP.

P a s o	Vol. Total (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad especí- fica (unid./mg)	Veces de purificación	% de recuperación
Frac. I (ext.)	12.2	118.3	195.6	1.6	—	100
Frac. II (40%)	1.2	13.9	87.5	6.3	3.9	44.6
Frac. III HTP	1.0	0.22	5.5	25.0	15.6	2.8

una gradiente lineal de 10-400 mM de fosfato de potasio pH 7.5, utilizando la solución amortiguadora E y C respectivamente. Flujo aproximado de 10 ml/h.

Los resultados obtenidos con este tipo de resina fueron óptimos, por lo que se decidió trabajar con ella posteriormente. El tamaño de columna, las condiciones de elución y el flujo fueron los mismos en todos los casos en que se utilizó esta resina, por lo que ya no se mencionan.

En la fig. 3 se muestra el perfil de elución de la columna de DEAE-celulosa para el material correspondiente a 24 hrs. de imbibición. La actividad de la enzima se probó tanto en el lavado, como en algunas fracciones de la columna. No se detectó actividad de la enzima ni en el lavado, ni en las primeras fracciones. La mayor actividad de DNA pol. eluye alrededor de 240 ± 20 mM de fosfato de potasio, tomando los datos obtenidos en los experimentos realizados. Las fracciones activas de esta columna se juntaron y se concentraron aproximadamente veinte veces utilizando para ello polietilenglicol, (PEG - 6,000) en frío (fracción III).

El siguiente paso para completar el esquema de purificación parcial fué determinar el tipo de resina que podía emplearse como segundo paso. Para lograr esto, se volvió a probar si podía utilizarse HTP y/o fosfocelulosa como un tercer paso de purificación, pero con ninguna de estas 2 clases de resina se obtuvieron resultados favorables ya que surgen los problemas anteriormente descritos.

1.2.4 Sefadex G-150.

Por lo anterior, se decidió probar un procedimiento diferente, y se escogió una resina de exclusión molecular, Sefadex G-150.

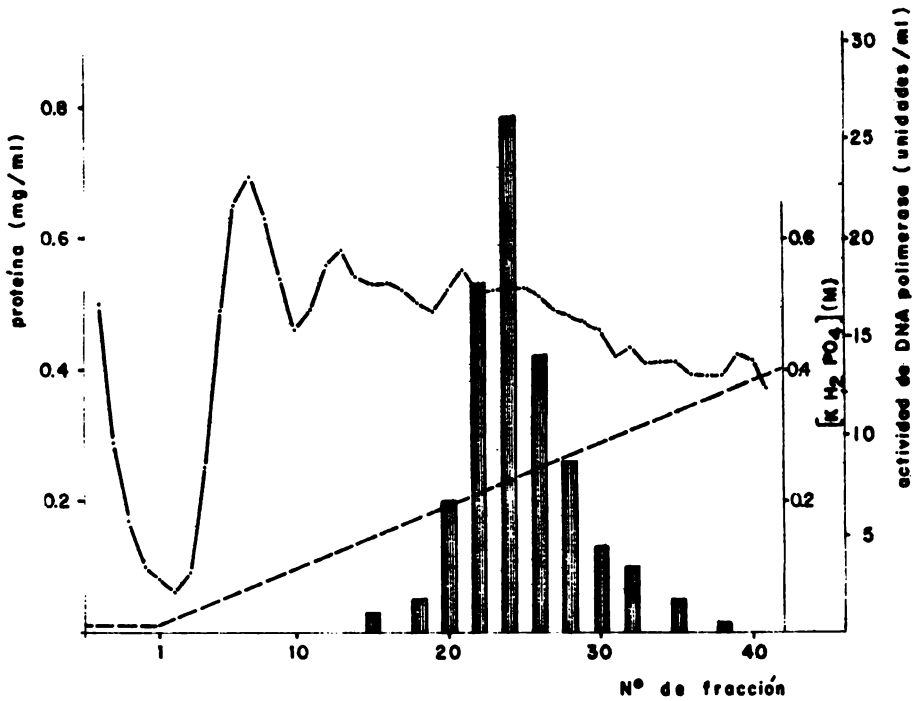


FIG. 3. Perfil de elución de la columna de DEAE-celulosa de la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios imbibidos durante 24 h. La fracción II (2 ml) se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (1x8cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora E (10 mM de fosfato de potasio) y se lavó con 3 volúmenes de columna, con la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 10-400 mM de fosfato de potasio (línea punteada ---), colectando fracciones de 1 ml. con un flujo aproximado de 10 ml/h. Proteína (—) Actividad de DNA polimerasa (■).

La fracción III se coloca sobre una columna de Sefadex G-150 (0.7 x 20 cm.), previamente equilibrada con solución amortiguadora B. Se colectan fracciones de 1 ml., pasando 1.2 volúmenes de columna de la misma solución amortiguadora con un flujo aproximado de 3ml/h.

Con esta columna se obtuvieron buenos resultados, por lo que se decidió trabajar con esta resina como segunda columna en el proceso de purificación. Con esto se completó el esquema de purificación parcial para DNA pol. de ejes embrionarios de maíz; dicho esquema se resume en la tabla VI.

En la figura 4 se muestra el perfil de elución de la columna de Sefadex G-150 para la muestra de 24 hrs., en donde puede observarse que la actividad de la enzima eluye en la fracción 3, por lo que se puede decir que la enzima es de elevado peso molecular. Hasta este paso, la enzima se ha podido purificar alrededor de 200 veces, como puede observarse en la tabla VII, en donde se muestra el cuadro de purificación para la enzima en la etapa tardía de imbibición, 24 hrs.

Para esta etapa se ensayó la actividad de DNA pol. β tanto en el extracto crudo (frac. I), como en los últimos pasos de purificación, para ver si existía actividad de otro tipo de polimerasa, sin poder detectar en ningún caso una actividad comparable a la DNA pol. tipo β

Una vez obtenida la actividad de DNA pol. presente mayoritariamente en la etapa tardía se procedió a realizar su caracterización, pero de ello se hablará más adelante.

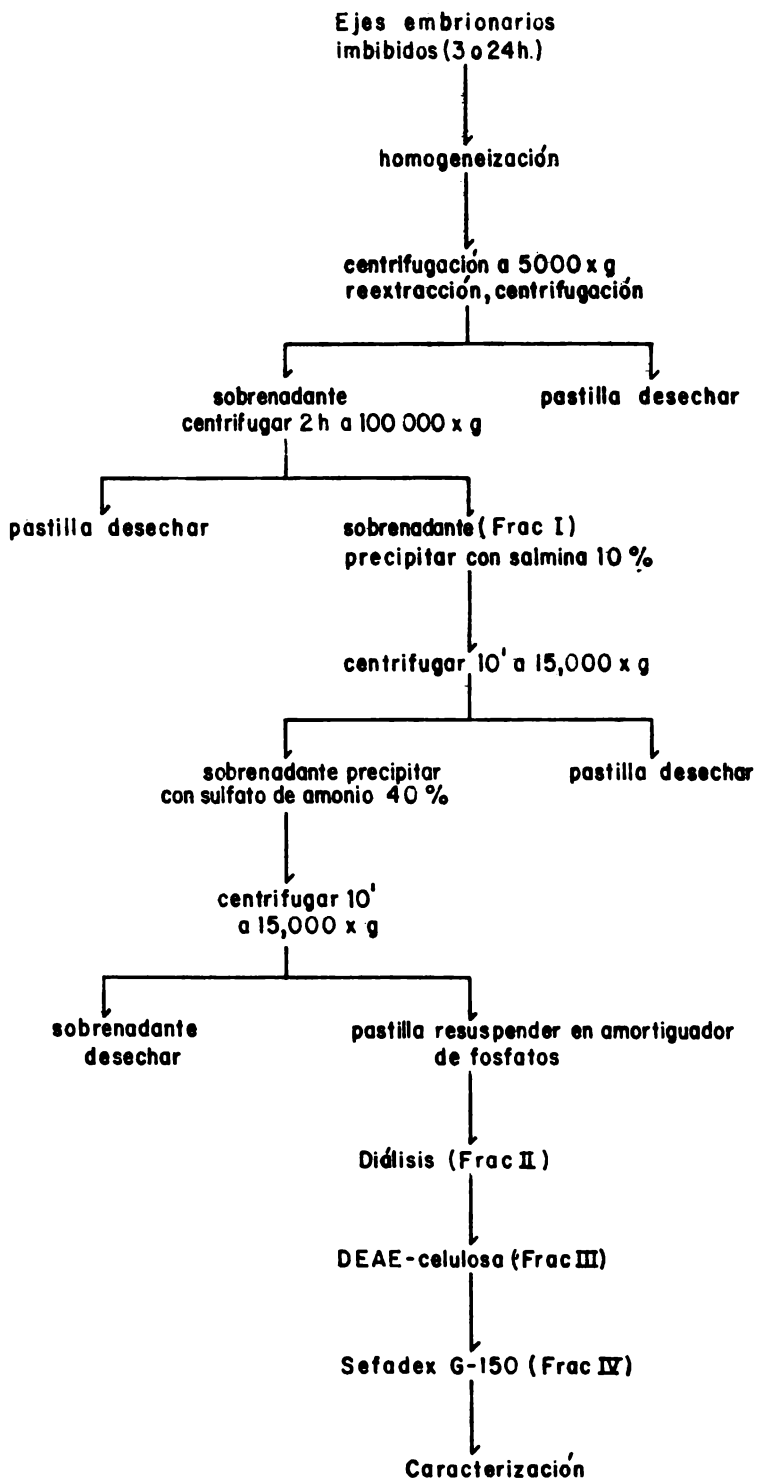


TABLA VI . Esquema completo de purificación de la DNApolimerasa de maíz.

TABLA VII. Cuadro completo de purificación de la DNA polimerasa aislada a partir de las muestras imbibidas durante 24 h.

Fracción	Volumen Total (ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (unidades)	Actividad Especifica (unid/ mg)	veces de purificación	% de recuperación
I ext. crudo	40.0	284.0	428.0	1.5	-	100.0
II pp 40%	2.0	32.0	171.4	2.7	1.9	40.0
III DEAE-cel	1.0	3.4	102.9	30.3	20.2	24.0
IV Sefadex G-150	1.0	0.34	92.9	273.2	182.1	22.0

2. PURIFICACION DE DNA POLIMERASA, ETAPA TEMPRANA.

Una vez obtenida la enzima parcialmente purificada de la etapa tardía de imbibición, se procedió a aislar la actividad de DNA pol. presente en la etapa temprana, 3 hrs. La técnica de purificación que se siguió, fué la misma que se montó para 24 hrs., que se muestra en la tabla VI. En este caso, se ensayó en cada uno de los pasos tanto la actividad de DNA pol. tipo α , como tipo β . En ningún caso, ni aún en el extracto crudo (fracción I), se pudo detectar la actividad de DNA pol. tipo β .

Por lo anterior, se procedió a aislar la actividad de la DNA polimerasa presente mayoritariamente en la etapa temprana de imbibición. Es importante hacer notar que de cualquier forma, siempre se rastreó la posible presencia de una DNA pol. tipo β .

En la figura 5, se muestra el perfil de elución de la columna de DEAE celulosa para 3 hrs. de imbibición. En ella se observa que la mayor actividad de DNA pol. eluye alrededor de 250 \pm 20 mM de fosfato de potasio, tomando los datos obtenidos en los experimentos realizados. Comparando el perfil de elución de la etapa temprana con el de la etapa tardía que se muestra en la figura 3, puede decirse en términos generales, que el patrón de elución, tanto de proteínas como de actividad, es muy parecido en ambos casos.

Las fracciones activas de la columna de DEAE-celulosa se juntaron, concentraron y se pasaron por una columna de Sefadex G-150. En la fig. 6, se muestra el perfil de elución de dicha columna, en donde se observa que la mayor actividad eluye en la fracción # 4 (fracción IV). Nuevamente, si se comparan los perfiles de elución de la columna de Sefadex para ambas etapas, fig. 4 y 6, puede observarse que ambos son muy similares.

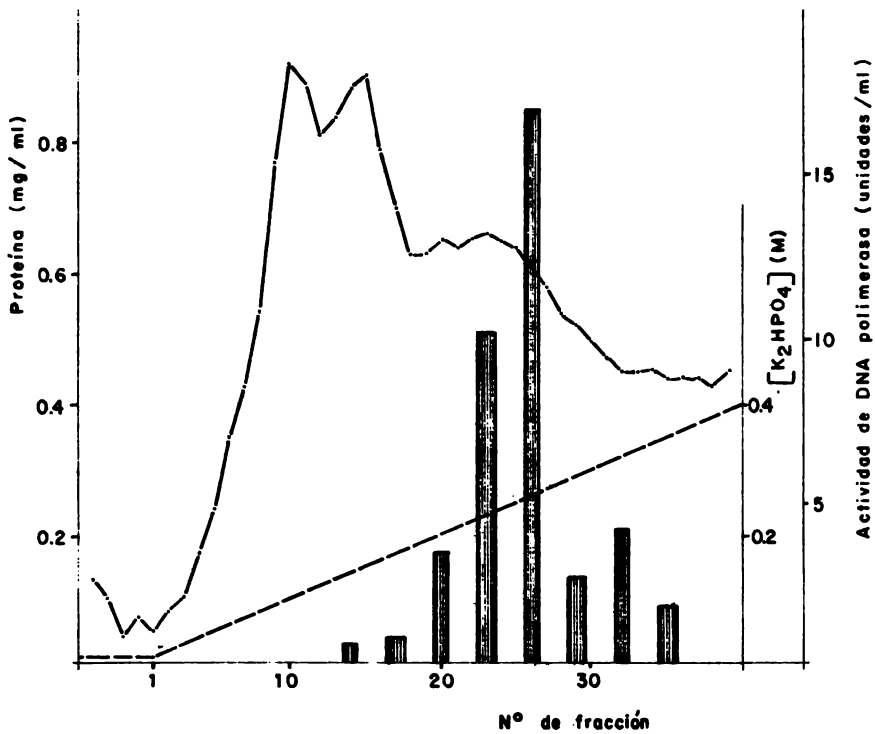


FIG. 5. Perfil de elución de la columna de DEAE-celulosa de la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios imbibidos durante 3 h. La fracción II (2 ml) se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (1x8cm), previamente equilibrada con la solución amortiguadora E (10 mM de fosfato de potasio) y se lavó con 3 volúmenes de columna, con la misma solución amortiguadora. Las proteínas retenidas se eluyeron con 8 volúmenes de un gradiente lineal de 10-400 mM de fosfato de potasio (línea punteada ----), colectando fracciones de 1 ml con un flujo aprox. de 10 ml/h. Proteína (—·—·—·). Actividad de DNA polimerasa (■).

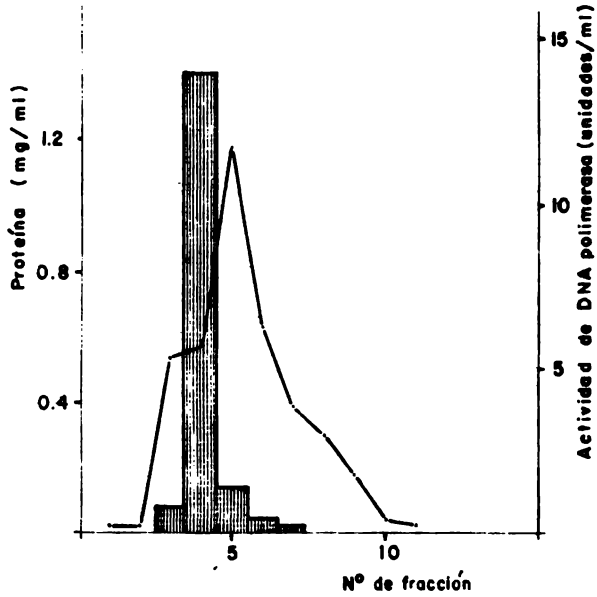


FIG. 6. Perfil de elución de la columna de Sefadex G-150 de la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios imbibidos durante 3 h. La fracción III (0.4 ml) se aplicó a una columna de Sefadex G-150 (0.7 x 20 cm), previamente equilibrada con la solución amortiguadora B (60 mM de fosfato de potasio). Las proteínas se eluyeron con 1.2 volúmenes de columna de la misma solución amortiguadora, colectando fracciones de 1ml con un flujo aproximado de 3 ml/h. Proteína (— — —) Actividad de DNA polimerasa (▨).

En la fig. 7 se muestra una fotografía de un gel de poliacrilamida, en donde cada carril corresponde a los diferentes pasos de purificación. Puede observarse que hay una banda, B, alrededor de 90,000 de PM, que se va intensificando conforme avanza la purificación. Así mismo, se observa otra banda, A, que aparece en el carril 3 (fracción 22 de la columna de DEAE-celulosa) y que corresponde a un PM aproximado de 105,000, pero esta no se intensifica, por lo que es más probable que la DNA pol. aislada en esta etapa, 3 hrs. de imbibición, corresponda a la banda de PM aproximado 90,000 (B).

Finalmente, en la tabla VIII se muestra el cuadro de purificación para la enzima aislada a partir de ejes imbibidos durante 3 hrs. En este caso, solo se pudo lograr purificar la enzima 50 veces, obteniéndose un bajo porcentaje de recuperación, en comparación con la enzima aislada a partir de ejes imbibidos durante 24 hrs. (tabla VII). Asimismo, puede observarse que la actividad específica, de la enzima aislada a las 3 hrs. de imbibición, es menor que la encontrada para la muestra de 24 hrs. de imbibición. En la fig. 8 se muestra una cinética de tiempo, en donde se ve claramente como la actividad de la enzima aislada a partir de los ejes imbibidos durante 24 hrs. es proporcional al tiempo de incubación, aún a los 120 min., en tanto que la actividad de la enzima aislada a partir de las muestras imbibidas durante 3 hrs. no sigue este comportamiento, y aproximadamente a los 60 min. alcanza un máximo de actividad, llegando a una meseta después. Lo anterior podría indicar la presencia de un factor, en el caso de la enzima aislada para la muestra de 3 hrs. de imbibición, que la está inhibiendo.

Este dato ayudaría a explicar por qué, a pesar de tener una cantidad de proteína comparable en los últimos pasos de purificación en ambas etapas, la actividad total, y con ello la actividad específica de la enzima aislada en la etapa temprana, 3 hrs. de imbibición, es menor

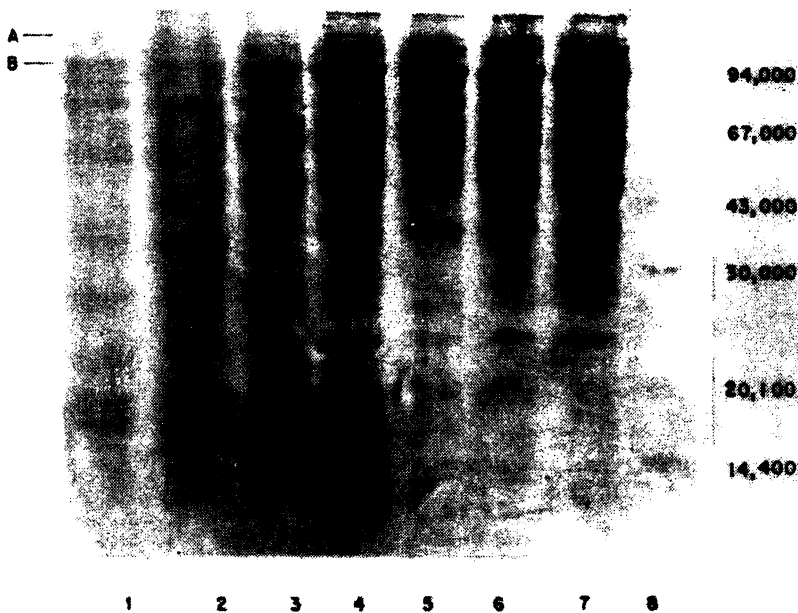


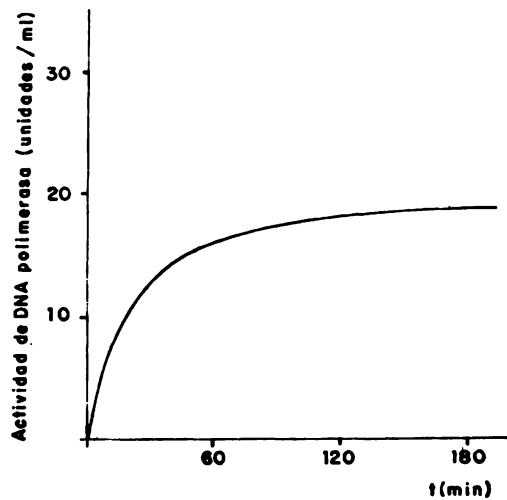
FIG. 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS de los diferentes pasos de purificación de la enzima aislada a los 3h de imbibición. Carril 1 fracción I, extracto crudo. Carril 2 fracción II, precipitación con sulfato de amonio 40%. Carril 3 fracción 22 de la columna de DEAE-celulosa. Carril 4 fracción IV, concentrado de la columna de DEAE-celulosa. Carriles 5, 6 y 7 fracciones 3, 4 y 5 de la columna de Sephadex G-150. Carril 8 patrones de P.M.

A. Banda que aparece conforme transcurren los pasos de purificación.

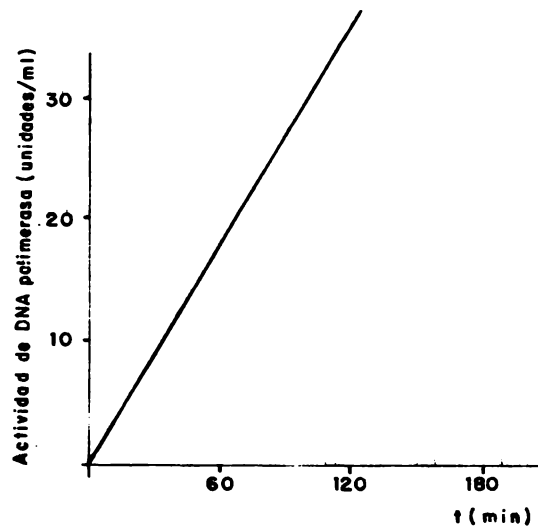
B. Banda que se intensifica conforme transcurren los pasos de purificación.

TABLA VIII . Cuadro completo de purificación de la DNA polimerasa aislada a partir de las muestras imbibidas durante 3 h.

Fracción	Volumen Total (ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (unidades)	Actividad Específica (unid / mg)	Veces de purificación	% de recuperación
I ext. crudo	33.0	192.3	104.5	0.54	-	100.0
II pp 40 %	2.0	34.8	28.6	0.82	1.5	27.4
III DEAE-cel	0.4	3.0	11.3	3.77	6.9	10.8
IV Sefadex G-150	1.0	0.44	11.45	26.0	47.9	11.0



A



B

FIG. 8. Actividad de la DNA polimerasa aislada a partir de ejes embrionarios imbibidos durante 3 h (A) y 24 h (B) con respecto al tiempo de incubación a 37 ° C.

que la de la enzima aislada en la etapa tardía, 24 hrs. de imbibición. Con el fin de poder determinar si las enzimas parcialmente purificadas en ambas etapas son del mismo tipo, se procedió a realizar la caracterización de cada una.

3. CARACTERIZACION.

3.1. pH.

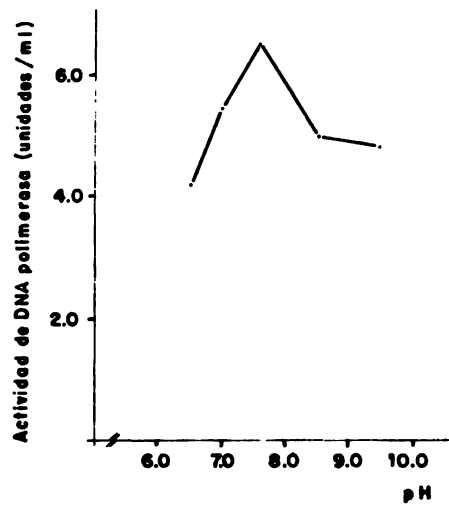
En la fig.9 (A y B), se muestra como se ve influida la actividad de las enzimas en cada etapa, con respecto al pH de la solución amortiguadora de la mezcla de reacción.

Comparando ambas gráficas, puede observarse que la forma de la curva es la misma en ambos casos, aunque es importante hacer notar la diferencia en cuanto a la actividad en ambas etapas, mucho mayor a 24 hrs. que a 3 hrs. En términos generales, puede decirse que el pH influye de manera muy parecida en la actividad de ambas enzimas, observándose una máxima actividad a pH 7.6 en los dos casos.

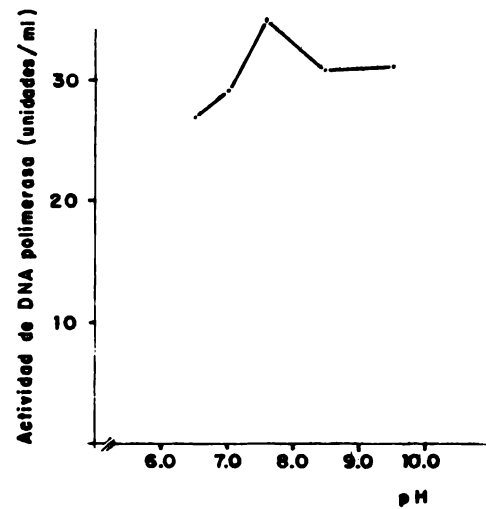
3.2 Temperatura.

En la fig. 10 (A y B), se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas aisladas en ambas etapas. Nuevamente, en términos generales, puede decirse que la forma de la gráfica es comparable en ambos casos, observándose un rango de temperatura óptimo que va de 30 a 37°C.

También puede apreciarse claramente, que a temperaturas elevadas, la actividad enzimática se pierde casi completamente (fig. 10 B).

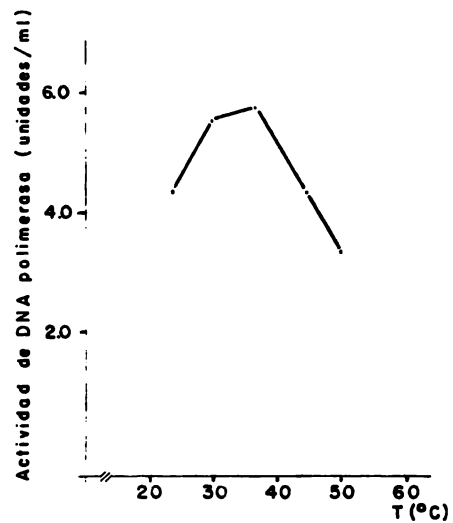


A

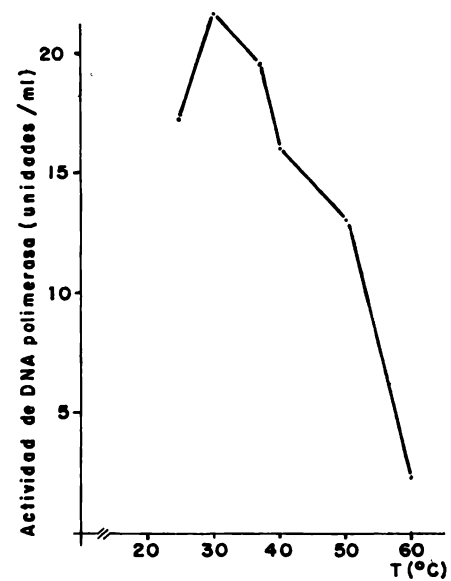


B

**FIG.9. Efecto del pH sobre la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz.
A. etapa temprana, 3h de imbibición y B. etapa tardía, 24h de imbibición.**



A



B

FIG. 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz.

A. Etapa temprana, 3 h de imbibición.

B. Etapa tardía, 24 h de imbibición.

Sólo para la enzima aislada en la etapa temprana de imbibición, 3 hr. se determinó la inactivación por el calor, para lo cual la enzima se incubó, en la solución amortiguadora de ensayo, a 50°C durante diferentes tiempos. En la fig. 11 se puede observar como disminuye la actividad enzimática de manera proporcional conforme se incrementa el tiempo de incubación a 50°C.

3.3 Concentración de cloruro de potasio.

En la fig. 12 se muestra el efecto de la concentración de KCl sobre la actividad enzimática. En ella se puede apreciar que la forma de la curva para ambas enzimas, A y B, es muy parecida. Asimismo, puede observarse que con 50 mM de KCl se obtiene la mayor estimulación de la actividad enzimática, en ambos casos, y a concentraciones mayores dicho efecto estimulador desaparece.

3.4 Concentración de cloruro de magnesio.

En la fig. 13 (A y B), se muestra el efecto de la concentración de $MgCl_2$ sobre la actividad de las enzimas, en donde puede observarse claramente que existe una dependencia absoluta de la presencia de Mg^{++} para que las enzimas puedan actuar. En ausencia de $MgCl_2$, no hay actividad enzimática.

Nuevamente puede verse que la forma que adopta la gráfica para cada una de las enzimas es muy similar, obteniéndose una máxima actividad con 12 mM de $MgCl_2$. Concentraciones por arriba de este valor, producen una disminución en la actividad enzimática en ambos casos.

3.5 Inhibidores.

Por último, se estudió el efecto de algunos compuestos, que se sabe actúan sobre las DNA pol. tipo α de mamíferos, sobre la actividad de las enzimas aisladas en ambas etapas.

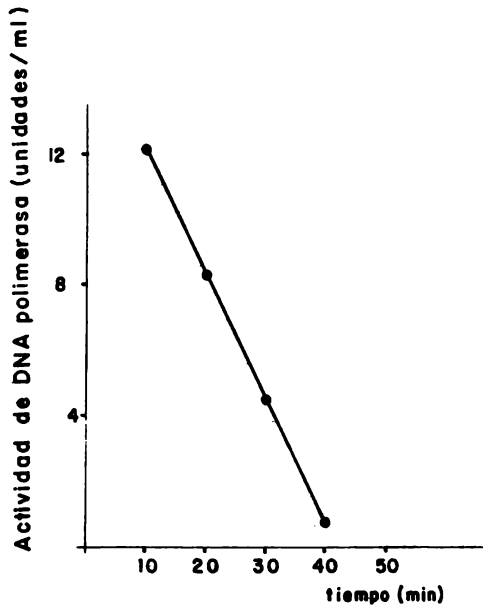
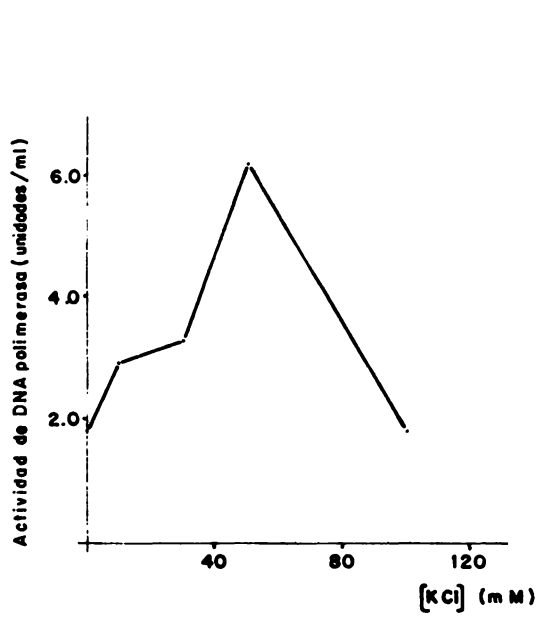
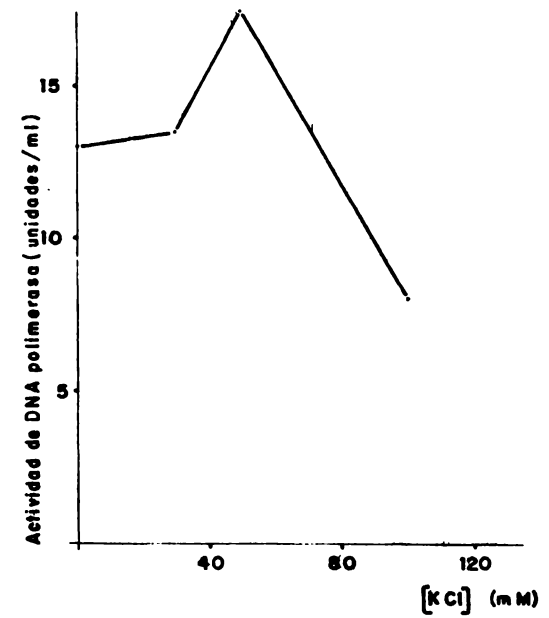


FIG. 11. Estabilidad térmica de la DNA polimerasa aislada a las 3 horas de imbibición . El ensayo de actividad se realiza en la forma descrita en materiales y métodos, solo que la incubación se lleva a cabo a 50°C por el tiempo indicado en cada caso.



A



B

FIG. 12 . Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad de DNA polimerasa de ejes embriónicos de maíz. A etapa temprana, 3 h. de imbibición. B etapa tardía, 24 h. El ensayo de actividad se realiza en la forma descrita en materiales y métodos, cambiando la concentración de KCl en la mezcla de reacción según se indica en cada caso.

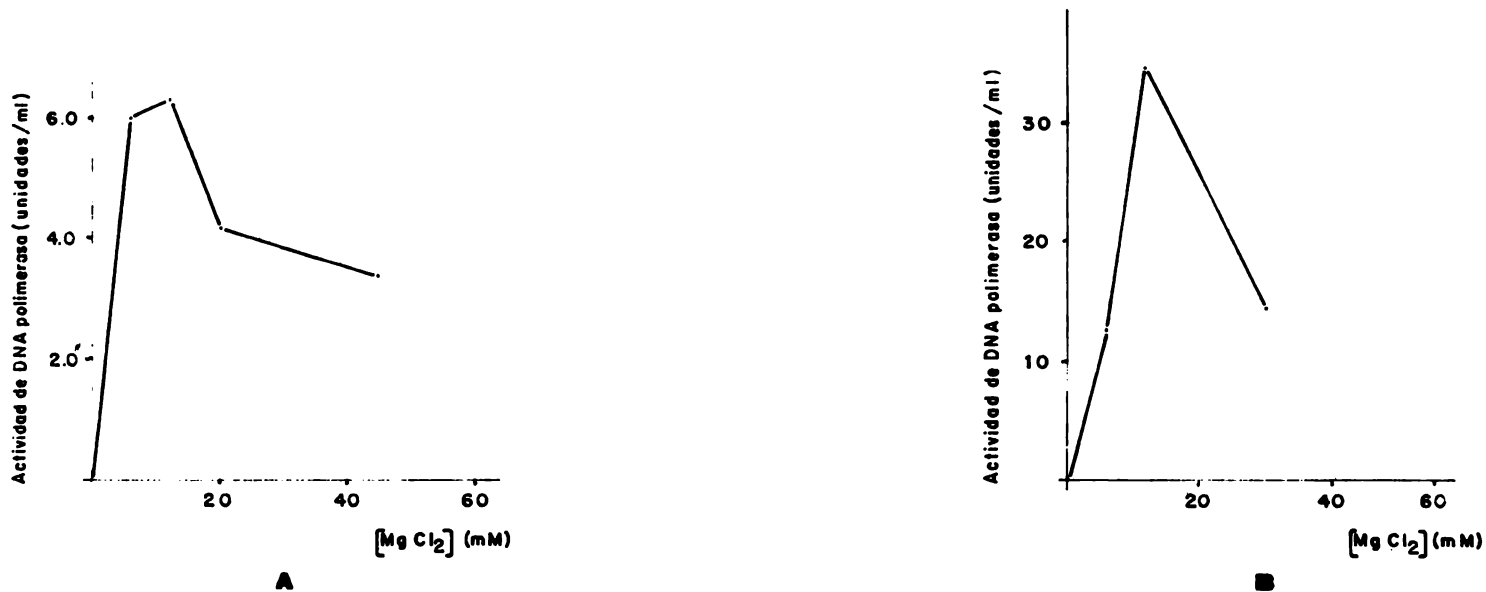


FIG. 13. Efecto de iones divalentes sobre la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz . La actividad de DNA polimerasa (fracción **IV**) se ensaya en la forma descrita en materiales y métodos, excepto que la concentración de Mg Cl₂ , en la mezcla de reacción, varía según se muestra en cada caso. A. etapa temprana (3h de imbibición). B. etapa tardía (24 h).

Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 14 (A y B).

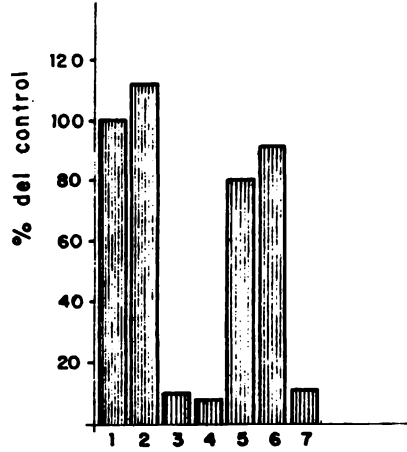
La barra #1 representa, en ambos casos, la actividad enzimática del control, que corresponde a 11.29 unidades/ml para 3 hrs., y a 27.2 - unidades /ml. para 24 hrs. Los datos se reportan tomando estos valores como 100%.

La novobiocina es un inhibidor de la síntesis de DNA. Originalmente, se observó que este compuesto tiene un efecto directo sobre la DNA - topoisomerasa II (Gellert, 1976). En la actualidad, se tienen algunos reportes que indican la inhibición, por novobiocina, de la DNA - pol. tipo α de animales (Burke, *et al*, 1979; Edenberg, 1980; Nishio y Uyeki, 1982).

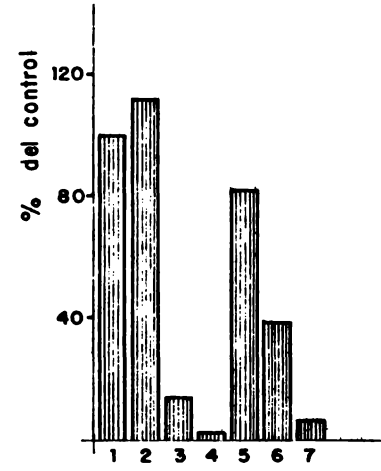
Por lo anterior, se determinó el efecto de este compuesto sobre la - actividad de las enzimas aisladas (barra # 2). En ambos casos, se - observa que la novobiocina no ejerce ningún efecto sobre la activi - dad de las DNA pol. aisladas.

Se ha reportado que ara-CTP tiene un efecto inhibidor sobre las DNA pol. tipo α (Furth y Cohen, 1968; Frindland, 1977; Yoshida, *et al*, - 1977). La barra # 3, muestra claramente como ara-CTP tiene un fuerte efecto inhibidor sobre ambas enzimas, alrededor de un 90% en los dos casos.

Es bien sabido que en el sitio activo de las DNA pol. tipo α se encuentran presentes grupos sulfhidrilo que son indispensables para su actividad. Con el fin de observar esto se empleó NEM, como se puede observar en la barra # 4, este compuesto ejerce un fuerte efecto inhibidor sobre la actividad de ambas enzimas; más de un 90% en los - dos casos.



A



B

FIG. 14. Efecto de varias sustancias sobre la actividad de DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz.

A. etapa temprana y B. etapa tardía. La fracción IV se ensaya en la presencia de las diferentes sustancias como

se indica en métodos. Los resultados se expresan como por ciento de actividad del control, 11.29 unid / ml

75

pra A y 272 pra B. Barra 1 control. Barra 2 Novobiocina. Barra 3 ara-CTP. Barra 4 NEM. Barra 5

BuAU. Barra 6 Afidicolina. Barra 7 Ensayo de pol β .

Otro de los compuestos que se probaron, fué BuAU, el cual se ha reportado como inhibidor de las DNA pol. tipo α de mamíferos (Wright, *et al*, 1980; Wright, *et al*, 1982). La barra # 5 muestra los resultados obtenidos con BuAU; en ambos casos, este compuesto inhibe tan solo 20%, a la concentración utilizada.

Un hecho importante que debe hacerse notar, es que tanto NEM como BuAU se encuentran disueltos en un solvente orgánico, DMSO, ya que son insolubles en agua. En estos casos, se introdujo un segundo control, al cual se le adicionó una cantidad equivalente del solvente. El efecto que se observó del DMSO sobre la actividad de ambas enzimas, siempre fué estimulador, incrementándose la actividad en presencia de este solvente alrededor de un 30%. Lo anterior podría ser un indicio de que la actividad de esta enzima se ve favorecida por un ambiente hidrofóbico.

Por último, se utilizó afidicolina, ya que se sabe que este compuesto es un potente inhibidor de las DNA pol. tipo α de animales (Ikegami, *et al*, 1978; Ohashi, *et al*, 1978; Hanaoka, *et al*, 1979) y de plantas (Sala, *et al*, 1980 b). La afidicolina es insoluble en agua, por lo que se empleó etanol para poder disolverla. El etanol por sí solo muestra un ligero efecto inhibitor sobre la actividad de las DNA pol. aisladas, pero este efecto se tomó en cuenta al realizar el cálculo final. La barra # 6 muestra los resultados obtenidos al utilizar este inhibidor. Es de hacer notar que en este caso, sí existe diferencia en cuanto a la sensibilidad a la afidicolina por ambas enzimas. La de la etapa temprana solo resulta inhibida un 10%, en tanto que la de la etapa tardía se inhibe poco más de un 60%.

Finalmente, la barra # 7 muestra la actividad de una posible DNA pol. tipo β presente. Las diferencias más importantes en la mezcla de reacción para probar la actividad de DNA pol. tipo β son: a) ma-

yor concentración de sales, b) pH más básico y C) la presencia de - NEM, con el fin de inhibir a la DNA pol. tipo α presente. La barra # 7 muestra una actividad remanente muy parecida a la que se encuentra cuando se mide la actividad de DNA pol. tipo α en presencia de NEM, barra # 4. Es pues poco probable que se encuentre presente una actividad de DNA pol. β .

DISCUSION

En el caso de las gramíneas, la síntesis replicativa del DNA es un evento que ocurre tardíamente, comparado con la síntesis de RNA y proteínas, durante el proceso de la germinación. No obstante, tanto en centeno como en maíz (Osborne, *et al*, 1980; Vázquez-Ramos y López, 1986) se ha observado que existe síntesis de DNA en etapas muy tempranas de la germinación, que aparentemente no corresponde a una síntesis replicativa del DNA.

Con el fin de obtener datos sobre el tipo de síntesis que se lleva a cabo tanto en la etapa temprana como en la tardía de la germinación de ejes embrionarios de maíz, se decidió aislar las DNA polimerasas presentes en ambas etapas.

Se sabe poco acerca de la función que desempeñan los diferentes tipos de DNA pol. presentes en vegetales superiores. Los estudios realizados en mamíferos, indican que la DNA pol. tipo α está involucrada en la síntesis replicativa del DNA nuclear y la tipo β en la reparativa. Es por ello, que se esperaba encontrar preferencialmente una actividad tipo β en la etapa temprana (3 hrs. de imbibición) y una tipo α en la etapa tardía (24 hrs.) de la germinación del maíz.

Con el fin de poder obtener datos acerca del tipo de DNA pol. presente en maíz en diferentes etapas de la germinación, lo primero que se hizo fué montar la técnica de purificación parcial. Para ello, se probaron varios tipos de resinas, en base a lo reportado en la bibliografía para enzimas de este tipo en otros sistemas, tanto vegetales como animales.

En la mayoría de los casos, la fosfocelulosa ha dado buen resultado. Se ha observado que este tipo de resina retiene la mayoría de las proteínas y enzimas que se sabe interactúan con los ácidos nucleicos. Sin embargo, en el caso de maíz esta resina no funcionó, ya que al cargar la columna con la muestra (fracción II), la actividad se pierde totalmente. Esto podría explicarse de dos formas; que la enzima se pega tan fuertemente a la resina de forma que resulta muy difícil despegarla, o que al pasar la enzima por esta resina, por alguna razón, se inactive.

Por lo anterior, se probó una columna de HTP. Los resultados obtenidos con esta resina fueron mejores, ya que se obtuvo un pico de actividad bien definido, pero se encontró que el utilizar esta resina presenta dos desventajas, las cuales están estrechamente relacionadas.

La primera es que el grado de purificación y porcentaje de recuperación de la actividad es muy pobre. La segunda, es la baja velocidad de flujo de esta columna. Cuando se montó la técnica de purificación parcial, pudo observarse que el tiempo es un factor muy importante en los primeros pasos de purificación, ya que aparentemente la enzima es muy lábil antes de ser purificada. Es muy probable entonces, que ésta sea la principal razón por la cual sólo puede recuperarse una mínima parte de la actividad cuando se utiliza una resina de HTP.

En base a los resultados obtenidos con estas resinas, se decidió probar DEAE-celulosa. Los resultados obtenidos con esta resina fueron muy buenos, ya que a pesar de que no se aumentan mucho las veces de purificación, comparando el cuadro de purificación utilizando HTP (tabla V) con el obtenido cuando se utiliza DEAE-celulosa (tabla VII) si se incrementa el porcentaje de recuperación. Es de hacer notar -



que la enzima se pega fuertemente a la resina, a pesar de tratarse de una resina de intercambio aniónico, ya que se requiere de alrededor de 250 mM de fosfato de potasio para poder eluir la enzima. Lo anterior sugiere que la enzima posee alguna región con carga negativa que podría ser la que interactuara con la resina.

Otras resinas utilizadas también tuvieron inconvenientes por las razones antes dadas, por lo que se decidió trabajar con DEAE-celulosa como primera columna, y Sefadex G-150 como segunda. Con esto se completó el esquema de purificación parcial que se muestra en la tabla VI y que fue el que se siguió para aislar la enzima en ambas etapas, tanto la temprana como la tardía, de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

En cuanto a la purificación parcial de la enzima en ambas etapas, hay un punto importante que debe hacerse notar, y es el hecho de que la actividad específica de la enzima aislada a partir de ejes imbibidos durante 3 hrs., siempre es menor que la de la enzima aislada a partir de ejes imbibidos durante 24 hrs.

Si se compara el cuadro de purificación de las enzimas aisladas a partir de las muestras imbibidas durante 3 y 24 hrs., tabla VIII y tabla VII respectivamente, puede observarse que la cantidad de proteína total presente en el extracto crudo, fracción I, es menor en las muestras imbibidas durante 3 hrs., que en las de 24 hrs. No obstante, conforme proceden los pasos de purificación, la cantidad de proteína total presente en las fracciones II, III y IV son comparables en los dos casos. Sin embargo, la actividad total, y con ello la actividad específica, en la etapa temprana (3 hrs. de imbibición) es mucho menor que en la etapa tardía (24 hrs) de la germinación.

El hecho de que siempre la actividad encontrada a partir de las muestras imbibidas durante 3 hrs. sea mucho menor que a partir de las de 24 hrs., podría explicarse de dos formas diferentes: 1) la enzima presente en la etapa temprana (3 hrs.) se encuentra en menor cantidad que la de la etapa tardía (24 hrs) o 2) la enzima presente en la etapa temprana se encuentra inhibida. Como puede verse en la fig. 8 B, la actividad de la enzima aislada en la etapa tardía se incrementa, de manera proporcional, conforme aumenta el tiempo de incubación a 37°C. En cambio, la actividad de la enzima aislada en la etapa temprana (fig. 8 A) no es proporcional con respecto al tiempo de incubación. Esto tal vez podría indicar la presencia de un inhibidor de la actividad de DNA pol. aislada a partir de las muestras imbibidas durante 3 hrs., el cual se encontraría pegado a la enzima, ya que copurifica junto con esta. Lo anterior podría a la vez explicar los datos obtenidos en cuanto a la purificación de ambas enzimas. Estos datos también podrían explicarse en base a la presencia, en las fracciones de la enzima aislada en la etapa temprana, de una enzima que degrade el DNA formado, pero esta segunda opción parece menos probable.

Una forma de poder comprobar la primera opción, sería probando extractos combinados de las fracciones IV aisladas en ambas etapas. Es decir, obtener la fracción IV a partir de muestras imbibidas durante 3 y 24 hrs. y hacer el ensayo de actividad de cada una por separado, y luego probar agregando parte de la fracción IV de la muestra de 3 hrs. a la fracción IV de la muestra de 24 hrs. y observar si hay inhibición de la actividad.

Para poder distinguir si se trata de la segunda opción, una enzima que degrade el producto formado, podría hacerse el ensayo de actividad para la fracción IV de la muestra de 24 hrs. y luego, ya al producto formado, agregarle parte de la fracción IV de la muestra de 3 hrs. y observar si se degrada el producto formado.

Con lo anterior podría comprobarse si se trata de alguna de estas posibilidades. Aunque hay que tener en cuenta que si se trata de un inhibidor, es muy probable que éste se encuentre fuertemente pegado a la enzima, posiblemente un modulador alostérico negativo, ya que al parecer purifican al mismo tiempo. Lo más conveniente sería entonces, en primer lugar, lograr la purificación de ambas enzimas a homogeneidad, para de esta forma poder saber realmente a que se debe que la actividad de la enzima aislada a partir de las muestras imbibidas durante 3 hrs. sea mucho menor que la de 24 hrs.

Con el fin de comprobar que las enzimas aisladas en ambas etapas eran del mismo tipo, se procedió a realizar su caracterización. Como se observa en la parte correspondiente a resultados, ambas enzimas muestran los mismos requerimientos en cuanto a pH, temperatura, concentración estimuladora de KCl y requerimiento de $MgCl_2$ (fig. 9,10,12y13, respectivamente), y ambas reaccionan de manera similar ante la presencia de varios compuestos que se sabe tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de DNA pol. tipo α (fig. 14). Estos resultados indican que las enzimas aisladas en ambas etapas entran dentro de lo que corresponde a una DNA pol. tipo α , en base a la clasificación que se hace comparando las características de la DNA pol. α de animales, las cuales incluyen; elevado peso molecular, requerimiento absoluto por un catión divalente (preferencialmente Mg^{++}) e inhibición por elevadas concentraciones de cationes monovalentes, ara-CTP, NEM y afidicolina.

A continuación se hace una comparación de las características de las enzimas aisladas en este trabajo y otras DNA pol. α aisladas a partir de diferentes fuentes incluyendo: *D. melanogaster*, mamíferos y algunas especies vegetales (tabla IX).

Fuente	pH	Temperatura (°C)	K Cl (m M)	Mg Cl ₂ (m M)	% de Inhibición				
					Novobiocina	Ara-CTP	NEM	BuAU	Afidicolina
1. <u>D. melanogaster</u>	8.5	ND ^(A)	60	12	ND	ND	90(0.1mM)	ND	25(5µg/ml)
2. HeLa	7.0-7.5	ND	50	2.5	ND	90(1.0mM)	90(3mM)	ND	90(30µg/ml)
3. Células K.B.	7.6	ND	50-100	10	ND	ND	ND	ND	ND
4. <u>Vinca rosea</u>	7.5	ND	50	6-15	ND	ND	90(10mM)	NC	ND
5. <u>Oryza sativa</u>	7.2-8.4	ND	ND	5-10	ND	ND	20(1mM)	ND	ND
6. Trigo	7.0-8.0	ND	ND	5	ND	ND	90(5-10mM)	ND	ND
7. Soya	7.5-8.0	ND	50-100	10	ND	ND	90(>2mM)	ND	ND
8. Espinaca	7.0-8.5	ND	ND	10	ND	ND	90(0.1mM)	ND	90(10µg/ml)
9a. Maíz(etapa temprana)	7.6	30-37	50	12	0(100µg/ml)	90(200µg/ml)	92(10mM)	20(40µg/ml)	10(50µg/ml)
9b. Maíz(etapa tardía)	7.6	30-37	50	12	0(100µg/ml)	80(200µg/ml)	98(10mM)	18(40µg/ml)	62(50µg/ml)

TABLA IX. Cuadro comparativo de las propiedades de algunas DNA polimerasas tipo α aisladas a partir de diferentes fuentes tanto animales como vegetales.

1 Banks, et al, 1979; 2. Enomoto, et al, 1983; 3. Fisher y Korn, 1977; 4. Gardner y Kado, 1976; 5. Amileni, et al, 1979; 6. Castroviejo, et al, 1979; 7. D'Allesandro, et al, 1980; 8. Misumi y Weissbach, 1982; 9a y 9b. Presente trabajo.

A)ND No determinado.

Con respecto al pH óptimo encontrado, 7.6, puede observarse claramente que cae dentro del rango de pH óptimo reportado para otras especies, con excepción de *D. melanogaster*, el cual resulta ser básico.

En ningún caso se reportan estudios del efecto de la temperatura sobre la actividad. Aunque en todos ellos se indica que el ensayo de actividad se realiza a 37°C, lo cual podría llevar implícito que es la temperatura óptima para cada una de ellas. En el caso concreto del maíz, se encontró un rango de temperatura óptimo que va de 30-37°C.

Con respecto al efecto de KCl sobre la actividad enzimática, puede observarse que el efecto estimulador de 50 mM observado en este trabajo, concuerda con los datos reportados para *D. melanogaster*, HeLa, células KB, *V. rosea* y soya. (tabla IX). En algunos casos, como espinaca, trigo y arroz, únicamente reportan el efecto inhibitorio que ejerce KCl a elevada concentración (200 mM), sobre la actividad de la DNA pol. α . En el presente trabajo, no se utilizaron concentraciones tan elevadas (200 mM), pero puede observarse claramente como a concentraciones mayores a 50 mM, la actividad disminuye (fig. 12).

En cuanto al requerimiento de un catión divalente, los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado en otras especies, encontrándose que la concentración óptima de $MgCl_2$ es de 6-15 mM, con excepción de HeLa. En todos los casos, se observa un requerimiento absoluto por un catión divalente, preferencialmente Mg^{++} sobre Mn^{++} , y una inhibición a concentraciones mayores (fig. 13 y tabla IX).

Finalmente, con respecto al efecto inhibitorio de varias sustancias, en la mayoría únicamente reportan el efecto que ejerce NEM, y ocasionalmente afidicolina, sobre la actividad de las enzimas. En todos los casos, NEM inhibe alrededor de un 90%, a concentraciones tan pequeñas como 0.1 mM. En este caso, se probaron diferentes concentraciones de NEM solo para la enzima aislada a 3 hrs. de imbibición.

En la fig. 15, puede observarse que concentraciones de 0.1 mM inhiben 60%, mientras que concentraciones mayores, 10 mM, inhiben poco más de 90%.

En ningún caso, de los que se encuentran en el cuadro de la tabla IX, se muestra el efecto de novobiocina o BuAU sobre la actividad de las enzimas, pero se ha reportado al menos en mamíferos, que novobiocina y BuAU inhiben pol. α (Burke, *et al*, 1979; Edenberg, 1980; Nishio y Uyeki, 1982; Furth y Cohen, 1968; Frindland, 1977). En este caso se encontró que la novobiocina no tiene efecto sobre la actividad de las enzimas aisladas y BuAU, a la concentración utilizada, inhibe sólo al rededor de un 20%.

El efecto de ara-CTP únicamente se reporta para HeLa, encontrando que inhibe 90% a 1.0 mM. En este trabajo, se encontró que ara-CTP 200 μ g/ml inhibe alrededor de 90%. Finalmente, la afidicolina se ve que tiene efectos variados, tanto en espinaca como en HeLa se observa un 90% de inhibición (a concentraciones de 10 y 30 μ g/ml respectivamente) en tanto que en *D. melanogaster* solo se observa un 25% de inhibición (a 5 μ g/ml). Los datos obtenidos en este trabajo muestran que las enzimas aisladas a partir de maíz no son tan sensibles a este compuesto, e inclusive, la afidicolina tiene un efecto diferente en ambas. Para la enzima aislada en la etapa temprana se logra una inhibición de tan solo un 10%, en tanto que para la de la etapa tardía el efecto inhibitor es mayor, alrededor de un 60%. Esto podría ser un indicio de una pequeña diferencia en cuanto a la naturaleza de ambas enzimas.

Un dato que se desprende de este estudio, y que resulta interesante, consiste en el efecto estimulador, observado en ambas enzimas, que tiene el DMSO, el cual también se ha visto que se lleva a cabo en el caso de la DNA pol. tipo δ aislada a partir de placenta humana (Lee,

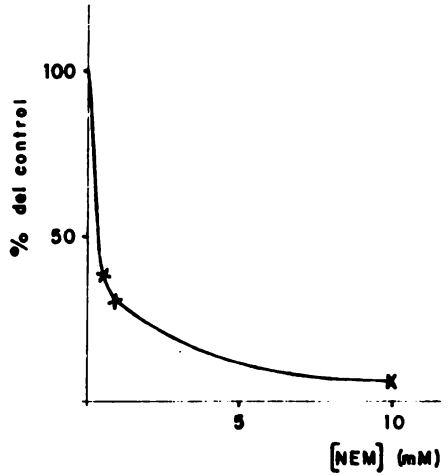


FIG. 15. Inhibición de la actividad de DNA polimerasa a 3 h de imbibición por NEM. La fracción **IV** se ensaya en la presencia de las concentraciones indicadas de NEM. Los resultados se expresan como porcentaje del control.

et al, 1986). Dicho efecto estimulador podría ser un indicio de que la enzima trabaja en un ambiente hidrofóbico.

Los datos obtenidos, indican que las enzimas aisladas en ambas etapas se clasifican como DNA pol. α . Pero estos datos de ninguna manera excluyen la posible existencia de una DNA pol. de algún otro tipo, tal vez una tipo β , al menos en etapas tempranas de la germinación.

Los datos referentes a la existencia de una DNA pol. tipo β en plantas aún son confusos, pero al parecer ésta si se encuentra presente, pero no en todos los tejidos ni en todos los estados del desarrollo y por ello es más difícil poder detectarla y, aunado a ello, aislarla.

Es muy posible entonces que en este sistema, ejes embrionarios de maíz, si exista una DNA pol. tipo β , pero tal vez hace falta encontrar un ensayo de actividad más sensible o un método de purificación más adecuado.

CONCLUSION

De este trabajo puede concluirse que se aisló una DNA polimerasa tipo α tanto en la etapa temprana (3 hrs.), como en la tardía (24 hrs.) de la imbibición de ejes embrionarios de maíz, en base, principalmente, a sus requerimientos pero sobre todo, a su respuesta a inhibidores específicos para este tipo de polimerasa.

Asimismo, se observa que la enzima aislada a partir de las muestras imbibidas durante 3 hrs. es menos activa que la de 24 hrs. Esto podría deberse ya sea a una menor cantidad de la enzima o a la posible presencia de un inhibidor de la actividad de DNA pol. en la enzima aislada a partir de las muestras de 3 hrs. de imbibición.

Con respecto a la caracterización, puede decirse, en términos generales, que ambas enzimas muestran los mismos requerimientos en cuanto a temperatura, pH, concentración de KCl y $MgCl_2$ para obtener una máxima actividad.

En el caso de los diferentes inhibidores utilizados, únicamente se observa una diferencia significativa en el caso de la respuesta a afidicolina para ambas enzimas, siendo más sensible la de la etapa tardía que la de la temprana.

Un punto importante de tomarse en cuenta, es que las enzimas no se aislaron a homogeneidad, por lo que sería conveniente lograr aislarlas a homogeneidad para de esta forma, poder caracterizarlas mejor.

Como se mencionó en la discusión, los datos reportados en este trabajo de ninguna manera excluyen la posible existencia de una DNA pol. de otro tipo, como podría ser una de tipo β .

Una posibilidad, para encontrar el método de purificación y el ensayo de actividad más adecuado, podría ser induciendo un daño al DNA de los ejes embrionarios de maiz. Por ejemplo, tratar los ejes con bleomicina y aislar la enzima presente mayoritariamente en la etapa temprana de imbibición. Se ha observado que este compuesto induce una síntesis reparativa relacionada con la actividad de DNA pol. β (Miller y Chinault, 1982; Miller y Lui, 1982). De esta forma, sería más fácil poder montar la técnica y el ensayo adecuado para poder aislarla y detectarla. Una vez teniendo esto, irse a ejes embrionarios no tratados a diferentes horas de imbibición.

BIBLIOGRAFIA

Abbots, J. and Loeb, L.A. (1985). DNA polymerase α and models for proofreading. *Nucleic. Acid. Res.* 13:261-274.

Amileni, A., Sala, F., Cella, R. and Spadari, S. (1979). The major DNA polymerase in cultured plant cell: Partial purification and correlation with cell multiplication. *Planta.* 146:521-527.

Aposhian, H.V. and Kornberg, A. (1962). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 237:519-525.

Banks, G.R., Boezi, J.A. and Lehman, I.R. (1979) A high molecular weight DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Biol. Chem.* 254:9886-9892.

Baril, E.F., Jenkins, M.D., Brown, D.E., Laszlo, J. and Morris, H. P. (1973). DNA polymerases I and II in regenerating rat liver and Morris hepatomas. *Cancer Res.* 33: 1187-1193.

Baril, E.F., Scheiner, C. and Pederson, T. (1980). A β -like DNA polymerase activity in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:3317-3321.

Barker, G.R. and Hollinshead, J. A. (1964). Nucleotide metabolism in germinating seeds. *Biochem J.* 93:78-83.

- Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. and Spadari, S. (1976). Variations of DNA polymerase α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 785-789.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1978). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1. Development, germination and growth. Springer-Verlag. pp. 115-117.
- Boldem, A., Aucker, J. and Weissbach, A. (1975). Synthesis of herpes simplex virus, vaccinia virus, and adenovirus DNA in isolated HeLa cell nuclei. J. Virol. 16:1584-1592.
- Bollini, R. and Chrispeels, M.J. (1977). Germinating kidney bean seeds synthesize vicilian and other seed proteins utilizing preexisting mRNA. J. Cell. Biol. 75: 2part2abst. RT 117.
- Bollum, F. J. (1960). Calf thymus polymerase. J. Biol. Chem. 235:2399-2403.
- Bollum, F.J. (1975). Mammalian DNA polymerases. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 15:109-144.
- Brutlang, D. & Kornberg, A. (1972). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 247:241-248.
- Brown, M-B., Bollum, F.J. and Chang, L.M.S. (1981). Intracellular localization of DNA polymerase α . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:3049-3052.
- Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. (1978). Characterization of the early synthesized DNA in germinating *Triticum aestivum* embryos. Phytochem. 17:1481-1484.

- Burke, J.F., Duff, P.M. and Pearson, C.K. (1979). Effect of drugs on deoxyribonucleic acid synthesis in isolated mammalian cell nuclei: Comparison with partially purified deoxyribonucleic acid polymerases. - Biochem. J. 178:621-626.
- Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L. and So, A.G. (1976). A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase δ . Biochemistry 15: 2817-2823.
- Castroviejo, M., Tharaud, D., Tarrago-Litvak, L. and Litvak, S. (1979). Multiple deoxyribonucleic acid polymerases from quiescent wheat embryos. Biochem. J. 181:183-191.
- Chang, L.M.S. (1973). Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. J. Biol. Chem. 248:3789-3795.
- Chang, L.M.S. (1976). Phylogeny of DNA polymerase β . Science. 191: 1183-1185.
- Chang, L.M.S. and Bollum, F.J.J. (1972). Variation of deoxyribonucleic acid polymerase activities during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 247:7948-7950.
- Cheah, K.S.E. and Osborne, D. (1978). DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. Nature. 272:593-599.
- Chen, D. and Osborne, D.J. (1970). Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. Nature. 226:1157-1160.
- Chen, D., Sarid, S. and Katchalski, E. (1968). Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60: 902-909.

Cheung, C.P., Wu, J. and Suhadolnik, A. (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during early hours of germination of wheat embryos. *Nature*. 277:66-67.

Ching, T.M. (1975). Temperature regulation of germination in crimson clover seeds. *Plant Physiol*. 56:768-771.

Chiu, R.W. and Baril, E.F. (1975). Nuclear DNA polymerases and the HeLa cell cycle. *J. Biol. Chem.* 250:7951-7957.

Chivers, H.J. and Bryant, J.A. (1983). Molecular weights of the major DNA polymerases in a hight plant, *Pisum sativum* L. (pea). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:632-639.

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

Coleman, M.S., Hutton, I.J. and Bollum, F.J. (1974). Terminal ribonucleotidyl transferase in human lymphocytes. *Nature*. 248:407-409.

Conaway, R.C. and Lehman, I.R. (1982). A DNA primase activity associated with DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:2523-2527.

Crute, J.J. Wahl, A.F. and Bombara, R.A. (1986). Purification and characterization of two new high molecular weight forms of DNA polymerase δ . *Biochem.* 25:26-36.

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

Dobrzanska, M., Tomaszewski, M., Grzelczak, Z., Rejman, E. and Buchowicz, J. (1973). Cascade activation of genome transcription in wheat. *Nature*. 244: 507-509.

Dure, L.S. and Waters, L. (1965). Long-lived messenger RNA: evidence from cotton seed germination. *Science*. 147: 410-412.

Edenberg, H.J. (1980). Novobiocin inhibition of simian virus 40 DNA - replication. *Nature*: 286:529-531.

Edenberg, H.J., Anderson, S. and DePamphilis, L.M. (1978). Involvement of DNA polymerase α in simian virus 40 DNA replication. *J. Biol. Chem* 253: 3273-3280.

Enomoto, T., Tanuma, S. and Yamada, M. (1983). Purification and characterization of two forms of DNA polymerase α from HeLa cell nuclei. *Biochem*. 22:1134-1138.

Fabisz-Kijowska, A., Dullin, P. and Walerych. (1975). Isolation and purification of RNA polymerases from rice embryos. *Biochem. Biophys. Acta*. 390:105-116.

Fisher, P.A. and Korn, D. (1977). DNA polymerase α . *J. Biol. Chem.* 252: 6528-6535.

Foster, D.N. and Gurney, T. Jr. (1974). Sizes of DNA polymerases from nucleic isolated by a non-aqueous method. *J. Cell. Biol.* 63:2part. 2abst.:103a.

Foster, D.N. and Gurney, T. Jr. (1976). Nuclear localization of mammalian DNA polymerase activities. *J. Biol. Chem.* 251:7893-7898.

- Frindland, S. (1977). Effect of cytosine arabinoside on replication - initiation in human lymphoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 72-78.
- Fry, M. and Weissbäch, A. (1973). A new deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase from HeLa mitochondria. *Biochemistry*. 12: 3602-3608.
- Fujisawa, H. (1966). Role of nucleic acid and protein metabolism in the initiation of growth at germination. *Plant Cell Physiol.* 7:185-197.
- Fukasawa, H. and Chou, M.Y. (1980). Mitochondrial DNA polymerase from cauliflower inflorescence. *Japan J. Genet.* 55:441-445.
- Fukasawa, H., Yamaguchi, M., Chou, M-Y., Matsumoto, H. and Matsukage, A. (1980). Characterization of two DNA polymerases from cauliflower inflorescence, *J. Biochem.* 87:1167-1175.
- Furth, J.J. and Cohen, S.S. (1968). Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9- β -D-arabinofuranosyladenina. *Cancer. Res.* 28:2061-2067.
- Furukawa, Y., Yamada, R. and Kohno, M. (1979). Presence of two DNA polymerases in *Tetrahymena pyriformis*. *Nuc. Acid. Res.* 7:2387-2398.
- Gardner, J.M. and Kado, C.I. (1976). High molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from crown gall tumor cells of periwinkle (*Vinca rosea*). *Biochem.* 15: 688-696.

Gefter, M.L. (1975). DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 44:45-78.

Gellert, M., O'Dea, M.H., Itoh, T. and Tomizawa, T. (1976). Novobiocin and coumermicine inhibit DNA supercoiling catalised by DNA girase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:4474-4478.

Gerard, G.F. (1975). Poly(2'D-methylcytidylate)oligodeoxyguanylate, a template-primer specific for reverse transcriptase, is not utilized by HeLa cell γ DNA polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63:706-711.

Geuskens, M., Hardt, W., Pedrali-Noy, G. & Spadari, S. (1981). An autoradiographic demonstration of nuclear DNA replication by DNA polymerase α and of mitochondrial DNA synthesis by DNA polymerase γ . *Nucleic Acid Res.* 9:1599-1613.

Guillard, D.F. and Walton, D.C. (1973). Germination of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 51:1147-1149.

Golifska, B. and Legocki, A.B. (1973). Purification and some properties of elongation factor I from wheat germ. *Biochem. Biophys. Acta* 324:156-170.

Graveline, J., Tarrago-Litvak., Castroviejo, M. and Litvak, S. (1984). DNA primase activity from wheat embryos. *Plant Molec. Biol.* 3:207-215.

Grosse, F.G. and Krauss, G. (1981). Purification of a 9S DNA polymerase α species from calf thymus. *Biochem.* 20:5470-5475.

Hanaoka, F., Kato, H., Ikegami, S., Ohashi, M. and Yamada, M. (1979). Aphidicolin does inhibit repair replication in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87:575-580.

- Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. and Smith, C.A. (1979). - DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 48:783-836.
- Herrick, G., Spear, B.B. and Veomett, G. (1976). Intracellular localization of DNA polymerase α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:1136-1139.
- Holmes, A.M., Cheriathundam, E., Bollum, F.J. and Chang, L.M.S. (1985). Initiation of DNA synthesis by the calf thymus DNA polymerase-primase complex. *J. Biol. Chem.* 260:10840-10846.
- Hopfield, J.J. (1974). Kinetic proofreading: A new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. -- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:4135-4139.
- Hourmant, A. and Pradet. A. (1981). Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition. *Plant Physiol.* 68:631-635.
- Hubscher, U. (1983). DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action and biological implications. *Experientia.* 39:1-25.
- Hubscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1979). Functional roles of DNA polymerases β and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:2316-2320.
- Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. and Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . *Nature.* 275:458-460.
- Jendrisak, J. and Becker, W.M. (1973). Isolation, purification and characterization of RNA polymerases from wheat germ. *Biochem. Bio -- phys. Acta* 319: 48-54.

- Kaguni, L.S., Rossignol, J-M, Conaway, R.C. and Lehman I.R. (1983). Isolation of an intact DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:2221-2225.
- Knopf, K-W., Yamada, M. and Weissbach, A. (1976). HeLa cell DNA polymerase γ : Further purification and properties of the enzyme. Biochem. 15:4540-4548.
- Kornberg, A. (1980). DNA replication. W.H. Freeman and Company, San Francisco. pp. 167-229.
- Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973). Maturation of the head of the bacteriophage T4. DNA packing events. J. Mol. Biol. 80:575-599.
- Lee, M.Y.M.T., Tan, Ch-K., Downey, R.M. and So, A.G. (1984). Further studies on calf thymus DNA polymerase δ purified to homogeneity by a new procedure. Biochem. 23:1906-1913.
- Lee, M.Y.M.T., Toomey, L.M. and Fenna, M.J. (1986). Isolation and characterization of human placental DNA polymerase δ . J. Cell. Biochem. Supp. 10B. Abstr. I-321. pag. 235.
- Marcus, A. (1969). Seed germination and the capacity for protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol. 23:143-160.
- Marcus, A. and Feeley, J. (1964). Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51:1075-1079.
- Marcus, A., Feeley, J. and Volcani, J. (1966). Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of amino acid incorporation, ribosome activation and polysome formation. Plant Physiol. 41:1167-1172.

- Marcus, A., Weeks, D.P. Leis, J.P. and Keller, E.B. (1970). Protein-chain initiation by methionyl-tRNA in wheat embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67:1681-1687.
- Masaki, S., Koiwai, D. and Yoshida, S. (1982). 10S DNA polymerase α of calf thymus shows a microheterogeneity in its large polypeptide component. J. Biol. Chem. 257:7172-7177.
- Matsumoto, H., Fukata, H. and Fukasawa, H. (1981). Presence of associated exonuclease activity in DNA polymerase B from cauliflower in fluorescence. Plant Cell. Physiol. 22:1317-1324.
- Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. (1975). The germination of seeds. Second edition. Pergamon Press. U.K. pp. 21-35.
- McKown, R.L. and Tewari, K.K. (1984). Purification and properties of a pea chloroplast DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2354-2358.
- McKune, K. and Holmes, A.M. (1979). Further studies on partially purified calf thymus DNA polymerase α . Nucleic Acid Res. 6:3341-3352.
- Mechali, M. Abadiebat, J. and de Recondo, A-M. (1980). Eukaryotic DNA polymerase α . J. Biol. Chem. 255:2114-2122.
- Miller, M.R. and Chinault, D.N. (1982). The roles of DNA polymerases α , β and γ in repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents. J. Biol. Chem. 257:10204-10209.
- Miller, M.R. & Lui, L.H. (1982). Participation of different DNA polymerases in mammalian DNA repair synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108:1676-1682.

Misumi, M. and Weissbach, A. (1982). The isolation and characterization of DNA polymerase α from spinach. J. Biol. Chem. 257:2323-2329.

Mocquot, B., Prat, Ch., Mouches, C. and Pradet, A. (1981). Effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryos. Plant Physiol. 68:636-640.

Mori, T., Wakabayashi, Y. and Takagi, S. (1978). Occurrence of mRNA for storage protein in dry soybean seeds. J. Biochem. 84:1103-1111.

Mory, Y.Y., Chen, D. and Sarid, S. (1972). Onset of deoxyribonucleic acid synthesis in germinating wheat embryos. Plant Physiol. 49:20-23.

Mosbaugh, D.W. and Linn, S. (1984). Gap-filling DNA synthesis by HeLa DNA polymerase α in an *in vitro* base excision. DNA repair scheme. J. Biol. Chem. 259:10247-10251.

Nishio, A. and Uyeki, E.M. (1982). Inhibition of DNA synthesis in permeabilized L. cells by novobiocin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106:1448-1455.

Ohashi, M., Taguchi, T. and Ikegami, S. (1978). Aphidicolin a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82:1084-1090.

Okura, A. and Yoshida, S. (1978). Differential inhibition of DNA polymerases of calf thymus by 9- β -D-arabinofuranosyl adenine-5'-triphosphate. J. Biochem. 84:727-732.

Osborne, D.J. (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. Can J. Bot. 61:3568-3577.

Osborne, D.J., Dell'Aquila, A. and Helder, R.H. (1984). DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. FEBS Symposium on DNA 1983. Folia Biologica (Praha) Special Publication. 155-169.

Osborne, D.J., Sharon, R. and Ben-Ishai, R. (1980). Studies on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*). Israel J. Bot. 29:259-272.

Payne, P.I. (1977). Synthesis of poly A-rich RNA in embryos of rye during imbibition and early germination. Phytochemistry. 16:431-434.

Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1980). Aphidicolin allows a rapid and simple evaluation of DNA repair synthesis in damage human cells. Mutation Res. 70:389-394.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83: 346-356.

Richard, B., Echeverria, M., Christophe, L. & Litvak, S. (1983). DNA synthesis in isolated mitochondria and mitochondria extracts from wheat embryos. Plant Molec. Biol. 2:167-175.

Roberts, B.E., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1973). Protein synthesis and the viability of rye grains: Loss of activity of protein-synthesizing systems *in vitro* associated with a loss of viability. Biochem. J. 131: 275-286.

Sakaguchi, K., Hotta, Y. & Stern, H. (1980). Chromatin associated DNA polymerase activity in meiotic cells of lily DNA mouse; its stimulation by meiotic helix-destabilizing protein. Cell Struc. Funct. 5:323-334.

Sala, F., Amileni, R.A., Parisi, B. & Spadari, S. (1980 a). A γ -like DNA polymerase in spinach chloroplast. Eur. J. Biochem. 112:211-217.

Sala, F., Galli, M.G., Levi, M., Burrioni, D., Parisi, B., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1981). Functional roles of the plant α -like and γ -like DNA polymerases. FEBS Letters. 124:112-118.

Sala, F., Parisi, B. Burrioni, D., Amileni, A.R., Pedrali-Noy, G. and Spadari, S. (1980 b). Specific and reversible inhibition by aphidicolin of the α -like DNA polymerase of plant cells. FEBS Letters. 117:93-98.

Seal, S.N., Bewley, J.D. and Marcus, A. (1972). Protein chain initiation in wheat embryo. J. Biol. Chem. 247:2592-2597.

Sedwick, D.W., Shu-Fong, W.T. and Korn, D. (1975). "Cytoplasmic" deoxyribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem. 280:7045-7056.

Seki, S., Ohashi, M., Ogura, H. and Oda, T. (1982). Possible involvement of DNA polymerases α and β in bleomycin induced unscheduled DNA synthesis in permeable HeLa cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104:1502-1508.

Sen, S., Payne, P.I. and Osborne, D.J. (1975). Early ribonucleic acid synthesis during the germination of rye (*Secale cereale*) embryos and relationship to early protein synthesis. Biochem. J. 148:381-387.

Shioda, M., Nelson, M.E., Bayne, L.M. and Benbow, M.R. (1982). DNA primase activity associated with DNA polymerase α from *Xenopus laevis* ovaries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:7209-7213.

Siedlecki, J.A., Szyszko, J., Pietrzykowska, I. and Znudzka, B. (1980). Evidence implying DNA polymerase β function in excision repair. *Nucleic Acid Res.* 8:361-375.

Snyder, R.D. and Regan, J.D. (1981). Aphidicolin inhibits repair of DNA in UV-irradiated human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:1088-1094.

Soyfer, V.N. (1979). DNA damage and repair in higher plants. *Adv. Radiat. Biol.* 8:219-227.

Spadari, S., Muller, R. and Weissbach, A. (1974). The dissimilitude of the low and high molecular weight deoxyribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerases of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 249: 2991-2992.

Spadari, S. and Weissbach, A. (1974). The interrelation between DNA synthesis and various DNA polymerase activities in synchronized HeLa cells. *J. Mol. Biol.* 86:11-20.

Spiegel, S., Obendorf, R.L. and Marcus, A. (1975). Transcription of ribosomal and messenger RNAs in early wheat embryos germination. *Plant Physiol.* 56:502-507.

Srivastava, B.I. (1974). A 7S DNA polymerase in the cytoplasmic fraction from higher plant. *Life Science.* 14:1947-1954.

Stevens, C., Bryant, J.A. and Wyvill, P.C. (1978). Chromatin-bound DNA polymerase from higher plants. *Planta.* 143:113-120.

Suzuki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F. and Yamada, M. (1985). Dissociation and reconstruction of a DNA polymerase α - primase complex. *J. Biochem.* 98:581-584.

Takaiwa, F. and Tanifuji, S. (1979). RNA synthesis in embryo axes of germinating pea seeds. *Plant. Cell Physiol.* 20:875-884.

Tarrago, A., Monasterio, D. and Allende, J.E. (1970). Initiator-like properties of a methionyl-tRNA from wheat embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:765-773.

Tseng, B.Y., and Ahlem, C.N. (1982). DNA primase activity from human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 257:7280-7283.

Twardowski, T. and Legocki, A.B. (1973). Purification and some properties of elongation factor 2 from wheat germ. *Biochem. Biophys. Acta* 324: 171-183.

Tymonko, J.M. and Dunham, V.L. (1977). Evidence for DNA polymerase α and β activity in sugar beet. *Physiol. Plantar.* 40:27-30.

Vázquez-Ramos, J.M. y López, M.S. (1986). Inhibición *in vitro* de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-CTP. *Revista de la Sociedad Química de México.* En prensa.

Vázquez-Ramos, J.M. and Osborne, D.J. (1986). Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutat. Res.* 166:39-48.

Velemfnský, J. and Gichner, T. (1978). DNA repair in mutagen-injured higher plants. *Mutation Res.* 55:71-84.

Velemfnský, J., Zadrazil, S., Pokorný, V. and Gichner, T. (1977). DNA repair synthesis stimulated by mutagenic N-methyl-N-nitrosourea in barley seed and free embryos. *Mutat. Res.* 44: 43-51.

Walton, D.C. and Soofi, G.S. (1969). Germination of *Phaseolus vulgaris* III. The role of nucleic acid and protein synthesis in the initiation of axis elongation. *Plant Cell Physiol.* 19:29-38.

Wang, T.S.F., Fisher, P.A., Sedwick, W.D. and Korn, D. (1975). Identification of a new DNA polymerase activity in human KB cells. *J. Biol. Chem.* 250:5270-5272.

Waser, J., Hübscher, U., Kuenzle, C.C. and Spadari, S. (1979). DNA polymerase β from brain neurons is a repair enzyme. *Eur. J. Biochem.* - 97:361-368.

Weeks, D. and Marcus, A. (1971). Preformed messenger of quiescent wheat embryos. *Biochem. Biophys. Acta* 232:671-684.

Weeks, D.P., Verma, D.P.S., Seal, S.N. and Marcus, A. (1972). Role of ribosomal subunits in eukaryotic protein chain initiation. *Nature.* - 236:167-168.

Wright, G.E., Baril, E.F., and Brown, N.C. (1980). Butylaminouracil: a selective inhibitor of HeLa cell DNA synthesis and HeLa cell DNA polymerase alpha. *Nucleic. Acid. Res.* 8:99-119.

Wright, G.E., Baril, E.F., Brown, V.M. and Brown, N.C. (1982). Design and characterization of N²-arylamino purines which selectively inhibit replicative DNA synthesis and replication specific DNA polymerases: guanine derivatives active on mammalian DNA polymerases and bacterial DNA polymerase III. *Nuc. Acid. Res.* 10:4431-4440.

Yagura, T., Tanaka, S., Kozu, T. Seno, T. and Korn, D. (1983). Tight association of DNA primase with a subspecies of mouse DNA polymerase α . *J. Biol. Chem.* 258:6698-6700.

Yamada, K., Hanaoka, F. and Yamada, M. (1985). Effects of aphidicolin and/or 2', 3'-dideoxythymidine on DNA repair induced in HeLa cells by four types of DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* 260:10412-10417.

Yamaguchi, M., Chou, M-Y., Matsumoto, H. and Fukasawa, H. (1979). Partial purification and characterization of DNA polymerase from the cauliflower inflorescence. *Jpn. J. Genet.* 54:97-108.

Yoshida, S., Yamada, M. and Mosaki, S. (1977). Inhibition of DNA polymerase α and β of calf thymus by 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine 5'-triphosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* 477:144-150.