

00562
12
Zey,

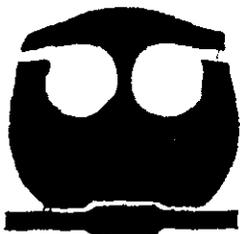


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

DNA POLIMERASA 1 DE MAIZ, CARACTERIZACION
Y ESTUDIOS DE COMPOSICION

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
(ESPECIALIDAD **BIOQUIMICA**)
P R E S E N T A :
DAIRO JESUS ORJUELA HENRY



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264546

MEXICO, D. F.

AGOSTO 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

PRESIDENTE: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

PRIMER VOCAL: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

SECRETARIO: Dr. Javier Plasencia de la Parra

SUPLENTE: Dr. Ruy Pérez Montfort

SUPLENTE: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Asesor de tesis: Dr. **Jorge Vázquez Ramos**

AGRADECIMIENTOS

A mi **Dianita**, ante mis ojos la más bonita, le dedico especialmente esta tesis, por enseñarme a ser papá, que es uno de los misterios que tiene la vida.

A **Diana Henry** y **Dairo Pichelmayer** por el cariño y apoyo tanto moral como económico recibido durante todos estos años, pues de otra forma no hubiera llegado a donde llegaré.

A **Rosa** por cuidar y educar a mi hija cuando yo no estoy

A mis hermanos **Julia** y **Otto** por la victoria

A mis familiares, en especial a mi tía **Edilma**, que me ha apoyado mucho

A **Gaby** por su tiempo y comprensión.

A **Quibdó** que nunca olvido.

A mis compañeros y amigos del L-114: **Pilo, Juanito Farias, Yuri y Yola, Mary, Manuela, Javier, Alberto, Ivonne y Felipe.** Por su compañía, amistad y consejos, sin ellos esta tesis no hubiera resultado.

Al Dr. **Jorge Vázquez** por la oportunidad e impaciencia.

A mis compañeros de la nueva generación: **Alma, Fabi, Edurne y Maritzel.**

A mis amigos del Departamento de Bioquímica, en especial al **Tavo** que me echo la mano en algunos experimentos.

Agradezco al M. en C. **Elpidio García Ramírez** por las enseñanzas y apoyo técnico recibido durante la realización de esta tesis.

INDICE

| | No. de pagina |
|---------------------------------------|---------------|
| Abreviaturas | i |
| Resumen de la Tesis | ii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| A. El Maíz | 1 |
| 1. Clasificación taxonómica del maíz | 2 |
| 2. Anatomía de la semilla de maíz | 2 |
| A1. Germinación de la semilla de maíz | 5 |
| A2. Metabolismo del DNA | 5 |
| 1. Replicación del DNA | 7 |
| a. DNA polimerasa α -primasa | 8 |
| b. DNA polimerasa δ | 12 |
| c. DNA polimerasa ϵ | 14 |
| d. Otras DNA polimerasas | 16 |
| 2. DNA polimerasas de plantas | 16 |
| a. DNA polimerasa tipo α | 17 |
| b. DNA polimerasa tipo δ | 18 |
| c. DNA polimerasa tipo ϵ | 19 |

| | |
|------------------------------------------|----|
| II. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES | 21 |
| III. HIPÓTESIS | 22 |
| IV. OBJETIVOS | 22 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| A. Material Biológico | 23 |
| B. Soluciones Amortiguadoras y Reactivos | 23 |
| C. Métodos | 24 |
| 1. Preparación de Resinas | 25 |
| 2. Imbibición de los Ejes Embrionarios | 26 |
| 3. Obtención del Extracto Crudo | 26 |
| 4. Purificación de las DNA Polimerasas | 27 |
| 5. Ensayo de DNA polimerasa | 28 |
| 6. Caracterización de la DNA pol1 | 29 |
| 7. Inhibidores | 30 |
| 8. Gel Desnaturalizante | 31 |
| 9. Gel Nativo | 31 |
| 10. Gel de Isoelectroenfoque | 32 |
| 11. Gel de Doble Corrida | 33 |

| | |
|--------------------------------------------------|-----------|
| 12. Gel de Actividad Desnaturalizante | 33 |
| 13. Gel de Actividad Nativo | 33 |
| 14. Gel de Actividad de Isoelectroenfoque | 34 |
| 15. Gel de Actividad de Doble Corrida | 34 |
| 16. Western Blot | 34 |
| 17. Ensayo con PCNA | 35 |
| 18. Ensayos de Nucleasa | 35 |
| VI. RESULTADOS | 38 |
| A. Esquema de Purificación | 39 |
| 1. DEAE-Celulosa | 41 |
| 2. Heparine-Hi-Trap | 43 |
| 3. Superdex 200 | 44 |
| 4. Mono Q | 45 |
| B. Caracterización de la DNA Pol1 de Maíz | 46 |
| a. KCl | 47 |
| b. MgCl ₂ | 48 |
| c. MnCl ₂ | 49 |
| B1. Respuesta a NaCl y a inhibidores | 49 |
| a. NaCl | 50 |

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| b. N-etilmaleimida (N-EM) | 51 |
| c. Afidicolina | 51 |
| d. ddTTP | 52 |
| B2. Actividad de Nucleasa | 54 |
| B3. Ensayos con PCNA | 58 |
| C. Gel de Actividad en Condiciones Desnaturalizante | 59 |
| D. Gel de Actividad Nativo | 61 |
| E. Gel de Actividad de Isoelectroenfoque | 63 |
| F. Gel de Actividad de Doble Corrida | 63 |
| VII. DISCUSIÓN | 67 |
| VIII. CONCLUSIONES | 74 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 76 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|-------------------------------------------|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| B | Bases |
| Ci | Curie |
| cpm | Cuentas por minuto |
| DEAE-Celulosa | Dietilaminoetil-celulosa |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNA pol | DNA polimerasa |
| dNTP | Desoxinucleósido trifosfato |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| dCTP | Desoxicitidina trifosfato |
| dGTP | Desoxiguanosina trifosfato |
| dTTP | Desoxitimidina trifosfato |
| ddTTP | Didesoxitimidina trifosfato |
| EDTA | Ácido etiléndiamino tetra-acético |
| kDa | Kilodalton |
| μg | Microgramo |
| mg | Miligramo |
| M | Molar |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferación celular |
| polidA-oligodT | Polidesoxiadenina-oligodesoxitimidina |
| TCA | Ácido tricloro acético |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3diol |

RESUMEN

En nuestro grupo de trabajo se han separado tres actividades de DNA polimerasa a partir de un extracto de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 24 horas. Estas actividades han sido denominadas DNA pol1, DNA pol2 y DNA pol3. De éstas, la que más se ha estudiado ha sido la DNA pol2, y se ha encontrado que comparte características similares a las DNA polimerasas tipo α de eucariotes, ya que además de presentar una actividad de primasa asociada a la actividad de polimerasa, su actividad es afectada fuertemente por inhibidores de la replicación como son N-EM y afidicolina (Coello *et al.* 1992; García *et al.* 1997).

En este reporte se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de la DNA pol1 de maíz, comparándola con las otras dos DNA polimerasas de maíz y con DNA polimerasas de otros eucariotes, encontrándose lo siguiente:

1.- La DNA pol1 de maíz no solo no requiere KCl para su actividad sino que a concentraciones mayores de 6 mM su actividad disminuye; requiere $MgCl_2$ o $MnCl_2$ para su actividad, siendo las concentraciones óptimas de 5 mM y 4 mM respectivamente. La actividad es óptima a concentraciones de 100 mM de NaCl y es fuertemente inhibida por N-etilmaleimida y moderadamente inhibida por afidicolina y ddTTP.

2.- Con la DNA pol1 de maíz co-purifica una actividad de nucleasa, que se detecta en ensayos realizados en geles de poliacrilamida, tratándose al parecer de una actividad de exonucleasa 3'-5'.

3.- Ensayos *in vitro* indicaron que esta enzima fue estimulada por PCNA, aunque esto deberá confirmarse realizando ensayos adicionales.

4.- Los pesos moleculares de la holoenzima y de la subunidad catalítica de la DNA pol1 de maíz fueron de 450 kDa y 70 kDa, respectivamente, determinados por geles de actividad.

El conjunto de resultados obtenidos sugieren fuertemente que la DNA pol1 de maíz se podría clasificar como una DNA polimerasa tipo δ .

Adicionalmente se reportan los intentos para purificar a la subunidad catalítica por medio de geles de isoelectroenfoco y de doble corrida. Sin embargo, después de estos ensayos no se logró obtener a homogeneidad a la subunidad catalítica.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre las DNA polimerasas y enzimas que intervienen en la síntesis del DNA tanto en modelos eucariotes como en procariotes, es un campo de mucho esfuerzo; hoy en día se tiene un amplio conocimiento sobre este tema en procariotes y varios tipos de eucariotes, pero la información es escasa en plantas; por tal motivo, el tema de esta tesis se centra sobre la caracterización de una actividad de DNA polimerasa que es obtenida de un extracto proteico de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* L.) imbibidos por 24 horas. Este capítulo comprende una descripción sobre esta importante planta, su germinación, el metabolismo del DNA y proteínas que participan en este proceso.

A. EL MAÍZ

El teocintle es considerado como el ancestro del maíz (Raven *et al.* 1992). Según Mangelsdorf (1974) para que el maíz haya alcanzado la distribución geográfica que tiene actualmente y el grado de variación genética que se le observa, tuvieron que haber intervenido varios factores como la migración, la mutación, la recombinación genética y la selección principalmente. Hoy en día el maíz se adapta a diversas condiciones ecológicas y esto permite realizar su cultivo en muchas regiones agrícolas, lo que explica su gran importancia económica tanto a nivel nacional como mundial.

1. Clasificación Taxonómica del Maíz

El maíz es un vegetal herbáceo cuya clasificación se muestra a continuación (Robles 1976).

| | |
|-------------|-----------------|
| Reino | vegetal |
| División | traqueofita |
| Subdivisión | pteropsida |
| Clase | angiosperma |
| Subclase | monocotiledónea |
| Grupo | glumifora |
| Orden | graminales |
| Familia | gramíneas |
| Tribu | maydeae |
| Género | <i>zea</i> |
| Especie | <i>mays</i> |
| Subespecie | <i>mays</i> |

2. Anatomía de la Semilla de Maíz

La semilla es el óvulo transformado y maduro de las plantas fanerógamas y la de maíz está constituida por las siguientes estructuras (figura 1):

1) Testa; 2) Capa de células de aleurona; 3) Endospermo; 4) Capa de células epiteliales; 5) Escutelo; 6) Coleóptilo; 7) Plúmula; 8) Nudo cotiledonar; 9) Radícula, 10) Coleorriza y 11) Pedúnculo (Robles S.R. 1976).

1. La **testa** o cubierta seminal es la pared del ovario desarrollado y maduro que proporciona una barrera protectora entre el embrión y el medio externo. En el maíz este tejido se presenta como una delgada

película y por lo mismo no se puede diferenciar en pericarpio, mesocarpio y endocarpio, constituyendo así una sola estructura.

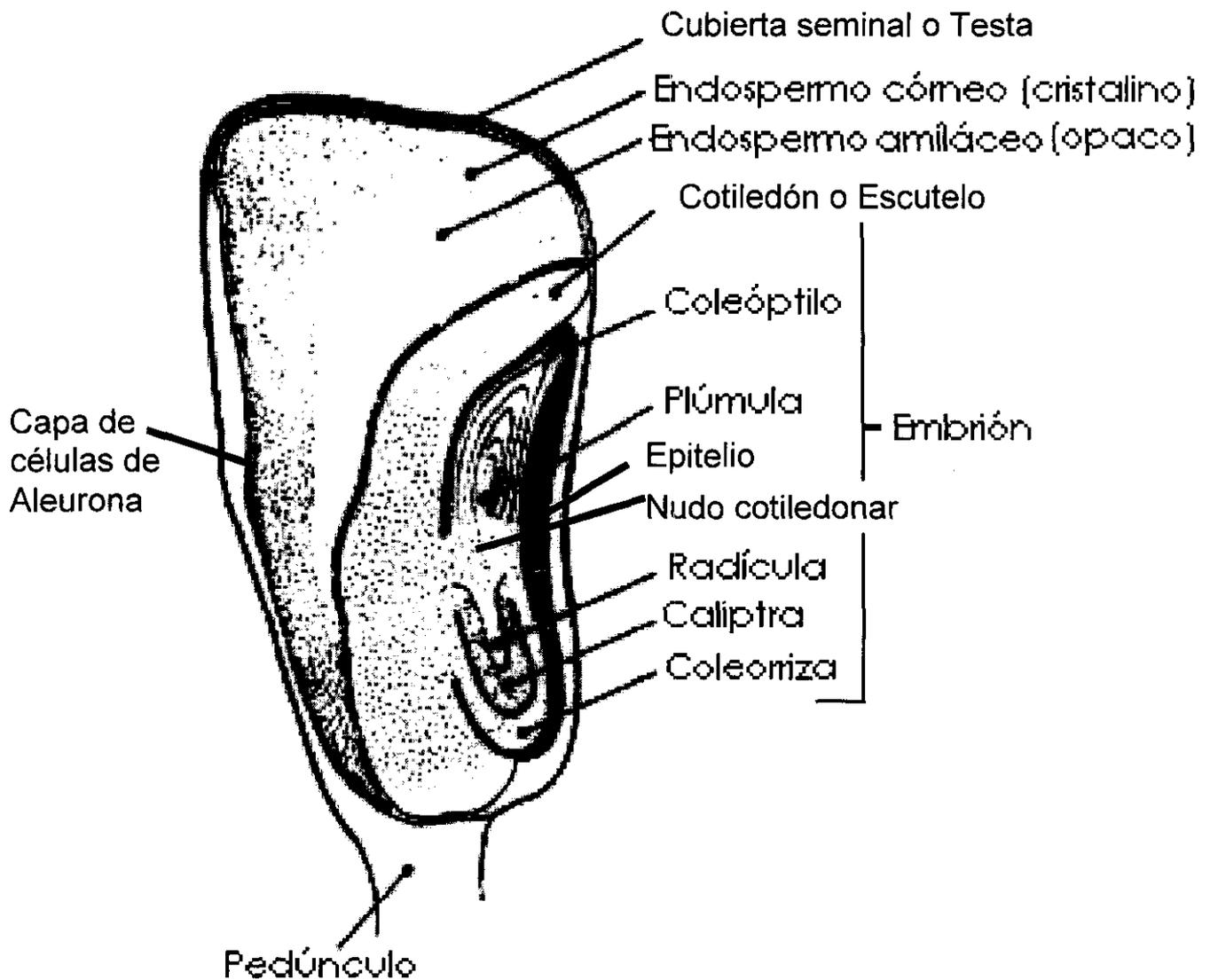


Figura 1: Esquema de Semilla y Embrión.

La testa está impregnada de ceras y grasas, así como de células mucilaginosas que revientan al contacto con el agua, proporcionando una barrera que retiene el agua alrededor de la semilla.

2. La **aleurona** es una capa de células vivas que rodea el endospermo, sintetiza α -amilasa y otras enzimas hidrolíticas que degradan el almidón durante la germinación.
3. El **endospermo** es un tejido nutritivo que se produce en el saco embrionario y que persiste en la semilla como almacén de reservas, las cuales se utilizan en el desarrollo del embrión durante la germinación.
4. El **epitelio** es un tejido que cubre la superficie externa del embrión formando una delgada capa protectora.
5. El **escutelo** o cotiledón en los frutos de las monocotiledóneas, como es el maíz, es una estructura discoidea gruesa que se localiza entre el embrión y el endospermo, representa el cotiledón único, el cual actúa como órgano de succión en favor de la nutrición del embrión durante la germinación.
6. El **coleóptilo** es una cubierta que rodea a la yema plumular y forma a la primera hoja por encima del cotiledón en las gramíneas y rodea el extremo del tallo y a las hojas incipientes. Sirve como protección a la plúmula durante la germinación.
7. La **plúmula** es la yema del embrión en una semilla que dará origen a la parte aérea de la planta.
8. El **nudo cotiledonar** se conoce también como corona y se encuentra entre la plúmula y la radícula.
9. La **radícula** es el extremo del hipocótilo del cual se desarrolla la raíz primaria. En esta región se encuentra la caliptra que es la cubierta celular que rodea al meristemo radicular (radícula).
10. La **coleorriza** es una funda que rodea a la raíz del embrión en las gramíneas.

11. El **pedúnculo** es una articulación que sostiene a la semilla de la inflorescencia.

A1. Germinación de la Semilla

Desde el momento en que termina la formación del embrión, las células suspenden la división y atenúan considerablemente sus funciones de respiración y nutrición, iniciando el período de vida latente que dura hasta el comienzo de la germinación.

La germinación se ha definido de muchas maneras, pero en nuestro grupo de investigación se ha definido como aquel proceso que ocurre desde el momento en que la semilla toma agua (*imbibición*) reiniciando el proceso metabólico necesario, hasta que se completa la primera división celular. Durante este lapso en el eje embrionario se pueden desarrollar algunos eventos comunes a un gran número de semillas gramíneas y pueden dividirse en: eventos tempranos, los cuales incluyen hidratación, síntesis de ATP, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación del DNA; y eventos tardíos o secundarios, como son la expansión celular, movilización de reservas y replicación del DNA (Bewley y Black 1985).

A2. Metabolismo del DNA

La síntesis de DNA es un proceso que ocurre poco tiempo después de la entrada de agua a la semilla (Osborne *et al.* 1980/81). Durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz, la velocidad de síntesis de DNA es baja en las primeras horas y aumenta en tiempos

posteriores al iniciar la síntesis replicativa (Vázquez-Ramos y López 1986).

Se ha sugerido que la síntesis del DNA que se observa en las etapas tempranas es el resultado de la replicación del DNA organelar (Ortega 1988) o de la reparación del DNA (Osborne *et al.* 1980/81; Vázquez-Ramos y Osborne 1986; Zaráin *et al.* 1987; Zlatanova *et al.* 1987; Tamariz 1990); estas dos posibilidades no son excluyentes (Vázquez-Ramos 1992).

Los procesos de reparación del DNA son continuos ya que el DNA puede ser blanco de factores que dañen su integridad (como la luz ultravioleta). Sin embargo, mientras la actividad metabólica sea alta, el funcionamiento de la maquinaria enzimática que constantemente remueve las anomalías presentes en el material genético estará asegurado. El problema se presenta en el DNA de las semillas en estado seco, que tienen un contenido de humedad de aproximadamente el 10% y una actividad metabólica muy baja. En este estado fisiológico el DNA es más sensible a los daños ocasionados si las semillas sufren un almacenamiento prolongado a alta temperatura y/o humedad (Osborne *et al.* 1984). Cuando estas lesiones no son reparadas por que las proteínas que intervienen en el proceso tienen baja actividad los daños en el DNA se acumulan conduciendo a la pérdida de la integridad del genoma y consecuentemente a una baja en la viabilidad de la semilla (Cheah y Osborne 1979).

Se ha descrito que la síntesis replicativa es un evento tardío en diferentes semillas (Chen y Osborne 1970; Mory 1972; Yadav 1976) y hay evidencias provenientes de estudios realizados utilizando

inhibidores de la replicación (Vázquez-Ramos y López 1986), datos autorradiográficos (Baiza *et al.*1989) y cuantificación del DNA por citometría de flujo (Georgieva *et al.*1994) han establecido que en el maíz el inicio de la replicación del DNA se observa entre las 12 y las 15 horas de germinación.

Si bien la división celular en el caso del maíz es un evento concomitante con la protrusión radicular, la replicación del DNA comienza durante el período de germinación (Bewley y Black 1994; Reyes *et al.*1991).

Poco se sabe acerca de la regulación de la replicación del DNA durante la germinación. Coello *et al.*(1992) y Coello y Vázquez-Ramos (1995a) reportan que tanto la cantidad de la enzima DNA pol2 de maíz como su actividad durante la germinación permanece constante durante las primeras horas y estos autores demuestran que el incremento en la actividad de esta enzima esta asociado a su estado de fosforilación (Coello *et al.* 1992; Coello y Vázquez-Ramos 1995a).

1. Replicación del DNA

La replicación del DNA involucra la acción concertada de muchas enzimas y factores proteicos que las regulan. Entre las primeras se encuentran las DNA polimerasas, primasas, helicadas, topoisomerasas, proteínas de unión al DNA, ribonucleasas y ligasas (Kornberg y Baker 1992).

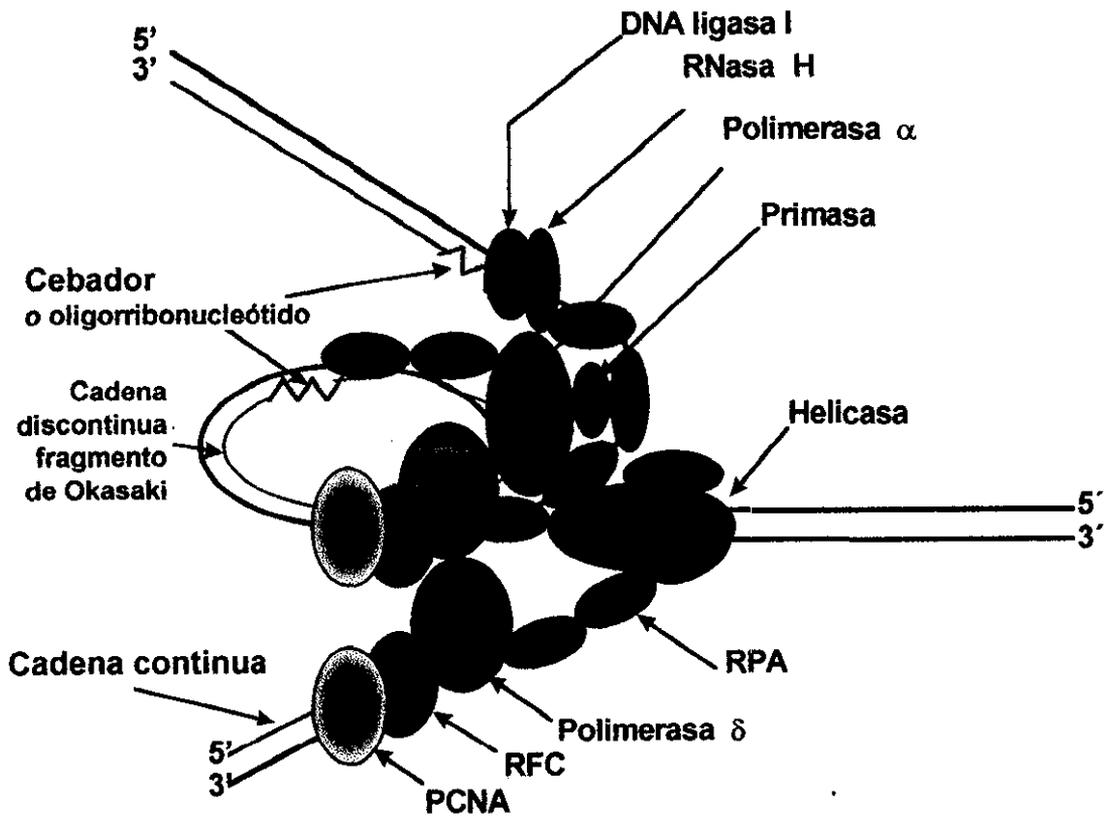
En los últimos años el conocimiento acerca de la replicación del DNA a nivel molecular, así como la naturaleza de las proteínas que están participando en la horquilla de replicación (figura 2) en células

eucariotes ha aumentado de manera considerable. La convergencia de los estudios realizados en una gran variedad de organismos ha puesto de manifiesto la conservación de la estructura y función de muchos de los componentes del aparato de replicación eucariote. El desarrollo de un sistema de replicación *in vitro* usando el DNA del virus SV40, así como la clonación y secuenciación de los genes que codifican para las diferentes proteínas, ha permitido conocer de una forma más clara la función que a nivel celular llevan a cabo las distintas DNA polimerasas, que son las enzimas más extensamente estudiadas del aparato replicativo. De acuerdo a su función y características las DNA polimerasas se han clasificado en:

a. DNA Polimerasa α -Primasa

La DNA polimerasa α (DNA pol α -primasa) fue la primera polimerasa aislada de células eucariotes (de timo de ternera) hace ya más de 30 años por Bollum, 1960. Muchas evidencias experimentales se han acumulado para proponerla como una enzima replicativa:

- La presencia de una subunidad llamada DNA primasa por capacidad de sintetizar un cebador de RNA para proporcionarle un extremo -3'-OH a la DNA polimerasa e iniciar así la síntesis de DNA.
- Es sensible a inhibidores de la replicación como afidicolina (Huberman, 1981) y su actividad se incrementa en células que están proliferando (Chiu y Baryl 1975).



Adaptado de Stillman B 1993.

FIGURA 2

HORQUILLA DE REPLICACIÓN

- Anticuerpos producidos contra esta enzima inhiben la replicación del DNA en células permeabilizadas o cuando son directamente inyectados en el núcleo (Miller *et al.* 1985; Kaczmarek *et al.* 1986).
- Se han identificado mutantes termosensibles deficientes en la replicación del DNA que han resultado tener mutaciones en los genes de la DNA polimerasa α (Eki *et al.* 1986).
- La expresión del gen de la DNA polimerasa α se correlaciona con la activación en la proliferación celular tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Wong *et al.* 1988; Walh *et al.* 1988).

Composición y Propiedades. A pesar de las intensas investigaciones que se han realizado sobre la DNA pol α -primasa, el conocimiento de su estructura y de las subunidades que la conforman ha sido establecido solo recientemente. Dos de los mayores problemas han sido la baja cantidad de proteína presente por célula y su gran sensibilidad a la proteólisis durante los protocolos de purificación. La DNA pol α -primasa esta compuesta por 4 subunidades: una subunidad de 180 kDa (p180) que corresponde a la subunidad catalítica, una subunidad reguladora, que pesa aproximadamente 70 kDa en células de mamíferos y 90 kDa en levaduras en gemación cuya función, al parecer, es la de regular la actividad del complejo polimerasa-primasa, sufriendo fosforilaciones y desfosforilaciones, una subunidad con actividad de primasa que pesa aproximadamente 48 kDa (p48) y un polipéptido de 58 kDa (p58), cuya función no ha sido bien definida, aunque varias funciones han sido sugeridas: 1) que p58 ayuda a estabilizar la naturaleza termolábil de la subunidad catalítica

de la DNA primasa; 2) que p58 sea requerida para la interacción funcional entre p180 y p48, posiblemente con un papel esencial en la transición entre la síntesis del cebador de RNA y la subsecuente elongación por la DNA pol α (Foiani *et al.* 1997). Las 4 subunidades de la DNA pol α -primasa son esenciales para la viabilidad celular (Sugino 1995; Wang 1996).

La DNA pol α es una enzima que tiene baja procesividad que varía entre 20 y 50 nucleótidos. La procesividad es una característica de la actividad enzimática y se define como el número de nucleótidos incorporados en un solo evento de unión a un molde de DNA (Hockensmith y Bambara 1981; Villani *et al.* 1981; Hohn y Grosse 1987).

La DNA pol α -primasa es fuertemente inhibida por afidicolina, N-etilmaleimida y butilfenil-dGTP y su actividad no disminuye con análogos de nucleótidos como didesoxi-NTPs (Kornberg y Baker 1992).

Se ha descrito que la DNA pol α -primasa interactúa con RP-A (proteína de replicación A) (Dorneiter *et al.* 1992; Longhese *et al.* 1994), un heterotrímero con capacidad de unión a DNA de cadena sencilla, compuesto por polipéptidos de 70 kDa, 32 kDa y 13 kDa de peso molecular. La interacción de la DNA pol α con RP-A aumenta su procesividad haciendo que se sinteticen fragmentos que se encuentran en el rango de los fragmentos de Okazaki (100-200 nucleótidos, So y Downey 1992).

También se han reportado interacciones con el antígeno T, una proteína con actividad de helicasa del virus SV40 (Collins *et al.* 1993);

y con el complejo de reconocimiento al origen de replicación (ORC, Longhese *et al.* 1994).

Se ha propuesto que la DNA pol α -primasa es blanco de una cascada de fosforilación y desfosforilación regulada durante el ciclo celular y por ello se ha estudiado la fosforilación de este complejo por cinasas dependientes de ciclinas tales como ciclina A-Cdk2, ciclina A-Cdc2, ciclina B-Cdc2, ciclina E-Cdk2. Se ha encontrado que la fosforilación de la subunidad catalítica de la pol α no influye en la actividad de DNA polimerasa en ensayos *in vitro* usando DNA activado como molde, pero la fosforilación de la subunidad reguladora por las cinasas antes mencionadas afecta la actividad de primasa de la enzima (Voitenleitner *et al.* 1997).

Existen reportes donde se indica que la DNA pol α copurifica con una actividad de exonucleasa, el producto del gen RTH1, cuya participación en el metabolismo del DNA no se conoce hasta ahora (Zhu *et al.* 1997; Biswas *et al.* 1997).

b. DNA Polimerasa δ

Esta enzima, purificada de reticulocitos de conejo en 1976, difiere de la DNA pol α -primasa en que presenta una actividad intrínseca de exonucleasa 3'-5' (Byrnes *et al.* 1976); lo que implica la posibilidad de remover algún nucleótido que no haya sido incorporado adecuadamente, para mantener la fidelidad del proceso de replicación. Estudios realizados en un sistema de replicación *in vitro* con el DNA del virus SV40 han sugerido que solo se necesitan para la replicación

del DNA, la DNA pol α -primasa y la DNA pol δ para la síntesis eficiente de la cadena discontinua y continua respectivamente (Weinberg 1989; Melendy y Stillman 1991).

Composicion y Propiedades. La mayoría de las DNA pol δ que se han descrito están compuestas por 2 polipéptidos, el primero de aproximadamente 125 kDa, que corresponde a la subunidad polimerizante y a la actividad exonucleasa 3'-5', y una subunidad pequeña de 48-50 kDa, que interactúa con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), incrementando notablemente la procesividad de la holoenzima (Kornberg y Baker 1992; Sugino 1995).

Una excepción parece ser la DNA pol δ de *Schizosaccharomyces pombe*, para la que se han descrito 5 subunidades, cuyas proteínas han sido designadas Pol3/Cdc6 (subunidad catalítica, 125 kDa); Cdc1 (subunidad que interactúa con PCNA, 51 kDa); Cdc27 (43 kDa); un polipéptido de 42 kDa con función hasta el momento desconocida; y una subunidad de 22 kDa idéntica a una proteína llamada Cdm1 que fue previamente identificada como un supresor multicopia en mutantes *cdc1* de *S.pombe* (Zuo et al.1997).

Cdc1 y Cdc27 son proteínas que se requieren en la transición G₂- M y mutaciones en alguno de estos genes detienen a la célula en G₂, pero hasta el momento la función de estas proteínas es desconocida (Hutchison y Glover 1995)

La DNA pol δ se inhibe fuertemente por N-etilmaleimida y afidicolina, pero ligeramente por ddNTP. La concentración de butilfenil-dGTP

requerida para inhibir a la DNA pol δ es 100 veces mayor que la requerida para inhibir a la DNA pol α (Kornberg y Baker 1992).

La DNA pol δ tiene una procesividad baja que aumenta enormemente al añadirse PCNA (37 kDa, Tan *et al.* 1986), proteína que se ensambla al molde de DNA en forma de homotrímero, permitiendo a la DNA pol δ deslizarse a lo largo del DNA a duplicar, y por consiguiente poder sintetizar todo el molde de DNA en un solo evento de unión (Downey *et al.* 1990).

Otro factor importante para la interacción de DNA pol δ y PCNA, es el factor de replicación C o RF-C, que es un heteromultímero compuesto de 5 subunidades, 140, 40, 38, 37 y 36 kDa; esta proteína se encarga de ensamblar a PCNA alrededor del molde de DNA requiriendo para ello la hidrólisis de ATP (Campbell 1993; Vladimir *et al.* 1997).

DNA pol δ , PCNA y RF-C son esenciales para la progresión del ciclo celular (Kornberg y Baker 1992).

c. DNA Polimerasa ϵ

Cuando se aisló por primera vez a la DNA pol ϵ se pensó que era un tipo de DNA pol δ , ya que respondía a PCNA y además presentaba una actividad intrínseca de exonucleasa 3'-5 (Kornberg y Baker 1992). Estudios posteriores demostraron que era una enzima diferente a la DNA pol δ , ya que por sí misma tenía una alta procesividad aún en ausencia de PCNA, y era codificada por un gen diferente, POL2 en *S.cerevisiae* (Lee *et al.* 1991; Syväoja 1990; Burgers *et al.* 1990). A pesar de que los primeros reportes indicaban que la DNA pol ϵ estaba

asociada a procesos reparativos (Nishida *et al.*1988), estudios genéticos en levaduras han demostrado que se requiere para la replicación cromosomal (Syväoja 1990) y se ha propuesto un modelo postulando la acción de las tres enzimas α , δ y ϵ en la horquilla de replicación, en cual sugiere que la DNA pol δ sintetiza a la cadena continua y las DNA polimerasas α y ϵ sintetizan a la cadena discontinua del DNA (Morrison *et al.*1990).

Composición y Propiedades. La DNA pol ϵ esta compuesta por 4 subunidades, 250 kDa (subunidad polimerizante y actividad de exonucleasa 3'-5'), DPB2 (80 kDa, al parecer interviene como punto de control en las fases S y G₂), DPB3 (23 kDa, proteína de unión a NTPs) y un polipéptido de 29 kDa cuya función no se conoce hasta ahora. Se ha demostrado que los polipéptidos de 250 y 80 kDa son esenciales para la viabilidad celular y DPB3 no es esencial (Sugino 1995). Esta enzima es sensible a afidicolina y a N-etilmaleimida, pero es insensible a ddTTP y a butilfenil-dGTP (So y Downey 1992). Los anticuerpos policlonales producidos contra la DNA pol δ o ϵ no presentan reacción cruzada entre si, mientras que algunos anticuerpos monoclonales generados contra la DNA pol ϵ inhiben también a la DNA pol δ , indicando que si bien estas enzimas son estructuralmente distintas, comparten algunos epítomos (Lee *et al.*1991).

Hay fuertes evidencias que sugieren la participación de las DNA polimerasas δ y ϵ en procesos reparativos tales como reparación por excisión de nucleótidos y reparación por mal apareamiento de bases (Wood y Shivji 1997).

d. Otras DNA polimerasas

Se han descrito otras DNA polimerasas nucleares, pero que no participan en procesos replicativos del DNA; entre éstas se encuentra la DNA polimerasa β , que es una proteína de aproximadamente 39 kDa, implicada en procesos de reparación, como por ejemplo reparación por excisión de bases (Kornberg y Baker 1992). Recientemente se ha reportado a la DNA polimerasa ζ de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima que esta compuesta por 3 subunidades, la REV3, tiene la actividad de DNA polimerasa y pesa aproximadamente 176 kDa; REV7 es una proteína de 29 kDa y le brinda estabilidad a REV3, ya que REV3 por sí sola es muy inestable y REV1 que es una proteína de 116 kDa, la cual tiene una actividad de desoxicitidiltransferasa.

La DNA pol ζ esta implicada en procesos de reparación mutacional, es decir, si esta proteína encuentra un dímero de timidina o un sitio abásico (sin purinas o sin pirimidinas) incorpora dCMP en el otro lado de la cadena en síntesis (Wood y Shivji 1997).

2. DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES

En células vegetales se han descrito varias DNA polimerasas y se han clasificado de acuerdo con la nomenclatura descrita para eucariotes (Litvak y Castroviejo 1987; Coello *et al.* 1992); sin embargo, su estudio se encuentra todavía en las fases iniciales.

a. DNA Polimerasa α

A principios de los años 80s, aparecieron varios reportes en la literatura describiendo las propiedades de DNA polimerasas tipo α de plantas parcialmente purificadas (Bryant 1982; Litvak y Castroviejo 1985) y en general se trataba de una proteína de alto peso molecular (entre 100 y 200 kDa), fuertemente inhibida por N-etilmaleimida y sensible a afidicolina. La afidicolina actúa a través de una inhibición competitiva con dCTP y no competitiva con los otros nucleótidos (Spadari *et al.*1982). De todas las DNA polimerasas descritas desde hace más de 15 años, solo las de chícharo, trigo y maíz han sido extensamente estudiadas. En el caso de la enzima purificada de chícharo se ha observado que su actividad aumenta en regiones radiculares que presentan tasas mayores de replicación del DNA (Bryant *et al.*1981). Esta polimerasa forma parte de un complejo multiproteico que incluye enzimas con actividad de primasa, endonucleasa específica para DNA de cadena sencilla, exonucleasa, ribonucleasa, topoisomerasa I y actividad de unión al DNA (Bryant *et al.*1992).

La enzima de trigo ha sido purificada con una alta actividad específica y consta de 4 subunidades de pesos moleculares de 104, 79, 60 y 25 kDa. El peso molecular en su forma nativa se calculó en 270 kDa (Balmukhanov 1992). Por otro lado, el grupo de Litvak ha encontrado que la DNA polimerasa A de trigo comparte algunas características de la DNA pol α , ya que copurifica con una actividad de primasa y no se estimula con PCNA (Laquel *et al.* 1990, 1993); además, comparte algunas características con las polimerasas organelares, como el uso

del templado de polirA-oligodT (Tarrago-Litvak *et al.* 1975). No ha sido posible establecer si las proteínas purificadas de trigo por ambos grupos son la misma enzima.

La DNA pol α de maíz o DNA pol2 ha sido ampliamente estudiada por Coello *et al.*(1992, 1994, 1995a, 1995b, 1996) y García *et al.*(1997); esta enzima esta compuesta por polipéptidos de 90, 70, 60, 55, 45 y 28 kDa y su actividad polimerizante se encuentra en el polipéptido de 90 kDa. La DNA pol2 también presenta una actividad de primasa que copurifica con la actividad de polimerasa; la DNA pol2 es inhibida por N-etilmaleimida, afidicolina y no es inhibida por ddTTP (Coello *et al.*1992, García *et al.*1997). Esta proteína tiene una procesividad de aproximadamente 18 nucleótidos (Coello *et al.*1995b). Se han producido anticuerpos específicos contra la DNA pol2, los cuales no cruzan ni con la DNA pol1, ni con la DNA pol3 de maíz (Coello *et al.*1994).

Durante la germinación se ha encontrado que esta enzima incrementa su actividad a medida que transcurre este evento; además, se sabe que es una fosfoproteína la cual incrementa su estado de fosforilación a medida que transcurre la germinación (Coello y Vázquez-Ramos 1995a); estos datos sugieren que al parecer la actividad de esta enzima es regulada a través de fosforilaciones y desfosforilaciones.

b. DNA Polimerasa tipo δ

El único reporte que se tiene de una DNA polimerasa tipo δ proviene de estudios en embriones de trigo (Richard *et al.*1991, Laquel *et al.*1993). La DNA polimerasa B purificada por Castroviejo y

colaboradores en 1975 fue clasificada originalmente como una polimerasa tipo α con base en la especificidad del molde que utilizaba y el efecto de algunos inhibidores (Castroviejo *et al.* 1975, 1979). Estudios adicionales demostraron que durante todo el proceso de purificación existía una actividad de exonucleasa 3'-5' asociada a la DNA polimerasa confiriéndole capacidad de edición (Richard *et al.* 1991). Se ha observado que PCNA de timo de ternera incrementa enormemente la procesividad de esta enzima, apoyando la hipótesis de que esta proteína es una DNA polimerasa tipo δ (Laquel *et al.* 1993).

Evidencias obtenidas en este laboratorio sugieren que la DNA pol 1 de maíz es una enzima tipo δ de plantas ya que es inhibida fuertemente por N-etilmaleimida, afidicolina y moderadamente por ddTTP; esta enzima ha sido parcialmente purificada (DEAE-celulosa, Heparine-sepharosa, Sephacryl-300 y DNA-celulosa) y caracterizada (García Ramírez 1992).

c. DNA Polimerasa tipo ε

No existe algún reporte donde se indique claramente la presencia de este tipo de DNA polimerasas en plantas. Sin embargo, se ha propuesto a la enzima CII, purificada de trigo, como la DNA pol ε , ya que esta proteína se estimula enormemente por PCNA, pero que a diferencia de las típicas DNA pol ε , la enzima CII no presenta actividad de exonucleasa, presenta una procesividad baja y prefiere al DNA activado como molde-templado (Laquel *et al.* 1993).

A continuación se resumen las características más generales de las DNA polimerasas eucarióticas que participan en la replicación del DNA.

TABLA 1
 CARACTERÍSTICAS DE LAS DNA POLIMERASAS REPLICATIVAS DE EUCARIOTES

| Características | DNA pol α | DNA pol δ | DNA pol ϵ |
|---------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Masa nativa (kDa) | >250 | 170 | 256 |
| Peso de la subunidad catalítica (kDa) | 165-180 | 125 | 215 |
| Otras subunidades (kDa) | 70, 50, 60 | 48 | 55 |
| Funciones asociadas | | | |
| Act. Exonucleasa 3'-5' | No | Si | Si |
| Primasa | Si | No | No |
| Propiedades | | | |
| Respuesta a PCNA | No | Si | Si |
| Templado preferido | DNA Activado | PolidA-OligodT | PolidA-OligodT |
| Procesividad | Baja | Baja | Alta |
| Inhibidores | | | |
| NaCl (0.15 mM) | Fuerte | Fuerte | Fuerte |
| N-Etilmaleimida | Fuerte | Fuerte | Fuerte |
| Afidicolina | Fuerte | Fuerte | Fuerte |
| Butylphenyl dGTP | 1 μ M | 100 μ M | 100 μ M |
| Didesoxi-NTPs | no | Ligeramente | Ligeramente |

Kornberg y Baker 1992

II. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

En nuestro grupo de investigación se han reportado tres actividades de DNA polimerasas a partir de un extracto crudo obtenido de ejes embrionarios de maíz, llamadas DNA pol1, DNA pol2 y DNA pol3 por el orden de elución en que aparecen cuando este extracto se hace eluir a través de una resina de DEAE-celulosa. Como se mencionó en la introducción, de estas enzimas la que más ha sido estudiada es la DNA pol 2 (Coello *et al.*1992; Coello y Vázquez-Ramos 1994, 1995a, 1995b, 1996; García *et al.*1997) la cual es una DNA polimerasa tipo α de maíz, ya que presenta una actividad de primasa, es inhibida fuertemente por N-etilmaleimida, afidicolina y moderadamente por ddTTP.

La DNA pol3 de maíz no ha sido muy estudiada, pero hay evidencias que indican que esta proteína puede ser una DNA polimerasa tipo β , ya que es inhibida fuertemente por ddTTP, y no es inhibida por N-ETILMALEIMIDA, ni por afidicolina (García *et al.*1997).

Como ya se indicó también en la introducción, la DNA pol1 de maíz ha sido parcialmente estudiada (García Ramírez 1992; Camacho Villasana 1996) y hay evidencias que la enmarcan como una DNA polimerasa tipo δ de plantas ya que es inhibida por N-etilmalimida, afidicolina y ddTTP.

En este trabajo se reporta la caracterización y los estudios de composición de la DNA pol1 de maíz utilizando modificaciones en el esquema de purificación.

III. HIPOTESIS

De acuerdo con los datos obtenidos hasta ahora se postula que la DNA polimerasa 1 de maíz es una enzima tipo δ .

IV. OBJETIVOS

General

- Realizar estudios de caracterización y composición de la DNA pol1 de maíz.

Particulares

- Establecer las condiciones óptimas del ensayo de DNA polimerasa *in vitro* y además observar la respuesta de la DNA pol1 frente a diferentes inhibidores de la replicación.
- Determinar si contiene una actividad de exonucleasa.
- Determinar si se modifica la actividad de la DNA pol1 de maíz frente a PCNA.
- Determinar el peso molecular de la subunidad catalítica de la DNA pol1 de maíz.
- Determinar el peso molecular de la holoenzima de DNA pol1 de maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

- A. MATERIAL BIOLÓGICO

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

- B. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS Y REACTIVOS

Solución Amortiguadora de Ejes Embrionarios: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 2% de sacarosa y 10 µg/mL de cloranfenicol.

Solución Amortiguadora para Homogenar Ejes Embrionarios: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 30 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄, 0.25% de sacarosa, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de benzamidina, 20% de glicerol y una tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas por 50 mL de buffer.

Soluciones Amortiguadoras Utilizadas para los Pasos Cromatográficos: Solución Amortiguadora **A:** 40 mM fosfato de potasio pH 7.4, 1 mM de EDTA, 20% de glicerol, 1 mM de benzamidina, 1 mM de β-mercaptoetanol. Solución Amortiguadora **B:** Igual que la solución amortiguadora A excepto que la concentración de fosfatos es de 400 mM. Solución Amortiguadora **C:** Igual que la solución Amortiguadora A excepto que esta solución contiene NaCl

150 mM. Solución Amortiguadora **D**: Igual que la solución Amortiguadora A excepto que esta solución contiene NaCl 1500 mM. Solución Amortiguadora **E**: Igual que la solución Amortiguadora A excepto que esta solución contiene NaCl 50 mM.

Solución Amortiguadora para la Activación de DNA de Alto Peso Molecular de Timo de Ternera: 5 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 μ M de MgCl₂, 0.5 mg/mL de BSA, 0.5 mg/mL de DNA de timo de ternera y 1 μ g/mL de DNAsa 1.

Mezcla de Reacción para el Ensayo de DNA Polimerasa: 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 6 mM de KCl, 8 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.4 mM de β -mercaptoetanol; 10 μ g de DNA activado de timo de ternera, 1 mM de ATP; 0.1 mM de cada uno los nucleótidos dGTP, dCTP, dATP; 5 μ Ci/mL de (³H) dTTP.

Líquido de Centelleo: 0.1 g de 2,2'-p-fenilen-bis{5-feniloxazol} (POPOP), 5 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y tolueno c.b.p. 1 litro.

- **C. MÉTODOS**

Preparación de Protamina: Se preparó una solución de protamina al 10%, disolviendo 10 g de protamina en 10 mL de agua destilada, se le adicionó suficiente HCl 6 N hasta obtener un pH de 7.8, se aforó con agua destilada a 100 mL.

1. PREPARACIÓN DE RESINAS

Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-Celulosa) Sigma Co.

Se colocó 1 g de DEAE-Celulosa en 75 mL de HCl 0.5 N agitando suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos. La resina se colectó por filtración al vacío lavándola con agua desionizada hasta llegar a pH 4.0 (sin permitir que la resina se seque). Posteriormente se agregó a la resina 75 mL de KOH 0.5 N, se agitó suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos y se lavó con agua desionizada hasta llegar a pH 8.0, se resuspendió en 80 mL de KCl 50 mM. Se agitó suavemente durante una hora, a intervalos de 15 minutos. Se retituló a pH 7.2 y se decantó eliminando los finos y materia particulada. La resina se resuspendió en solución amortiguadora A y se equilibró con 10 volúmenes de la misma.

Heparine-Hi-Trap (Pharmacia Bio Tech)

Esta resina se suministró ya empacada por el proveedor y sólo se equilibró con 10 volúmenes de solución amortiguadora C.

Superdex 200 (Pharmacia Bio Tech)

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

Mono Q HR 5/5 (Pharmacia Bio Tech)

La resina se suministró empacada por el fabricante y sólo se equilibró con 10 volúmenes de solución amortiguadora C.

- 2. IMBIBICIÓN DE LOS EJES EMBRIONARIOS

Ejes embrionarios se obtuvieron por disección manual de semillas de maíz variedad Chalqueño con más de un 95% de germinación y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. Para la imbibición de los ejes embrionarios (aproximadamente 15 g), estos se lavaron una vez con hipoclorito de sodio al 0.5% y cuatro veces con agua destilada estéril. El exceso de agua se eliminó secando los ejes con papel Whatman N° 1 estéril y luego se pusieron entre dos papeles Whatman N° 1 humedecidos con solución de imbibición (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 2% de sacarosa y 10 µg/mL de cloranfenicol) y se incubaron en una estufa a 25°C por 24 horas (Coello *et al.* 1992).

- 3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Todos los procesos se realizaron a 4°C, a menos que se indique de otra manera. Después de 24 horas de imbibición los ejes embrionarios se homogeneizaron en un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 30 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄, 0.25% de sacarosa, 1 mM de β-mercaptoetanol, 1 mM de benzamidina, 20% de glicerol y una tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete de Boehringer Mannheim) por 50 mL de buffer. Los ejes embrionarios se homogeneizaron 3 veces en un politrón PCU-2 a la velocidad máxima por 20 segundos cada vez. El homogenado se centrifugó a 7000 x g por 15 minutos y la pastilla se homogeneizó nuevamente, y el sobrenadante resultante se mezcló con el primer

sobrenadante obtenido y esta mezcla se centrifugó a 10.000 x g por 15 min. El sobrenadante que se obtuvo, se centrifugó a 100.000 x g por 2 1/2 horas.

Los ácidos nucleicos se precipitaron con la adición de protamina al 10% a una concentración final de 10 µg/mL, agitándose en un baño de hielo por 30 minutos; la solución se centrifugó por 15 minutos a 10.000 x g y el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 mµ de tamaño de poro (fracción I).

• 4. PURIFICACION DE LAS DNA POLIMERASAS

Las enzimas se purificaron mediante la técnica de FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) de Pharmacia. Para esto, el extracto crudo obtenido (fracción I) se cargó a una columna empacada con el intercambiador aniónico, DEAE-celulosa, de aproximadamente 30 mL de volumen de cama, la cual se equilibró con solución amortiguadora A, y el gradiente se aplicó utilizando solución amortiguadora B y con esta estrategia las proteínas que se unen a la matriz son eluidas aplicando un gradiente de fosfato que va de 40 a 400 mM; en esta columna se resuelven tres picos de actividad, el primer pico o DNA pol1 sale en el lavado (40 mM de fosfatos), el segundo pico de actividad o DNA pol2 eluyó a una concentración de 120 mM de fosfatos, y el tercer pico de actividad (DNA pol3) eluyó a 220 mM de fosfatos. Las fracciones con actividad de DNA pol1 se mezclaron y se cargaron a una columna empacada con una resina de afinidad, Heparine-Hi-Trap (1 mL de volumen de cama), a la cual se le aplicó un gradiente de NaCl de 150 a 1500 mM. Para esto se utilizaron

la solución amortiguadora C y la solución amortiguadora D. La DNA pol1 eluyó de esta columna con una concentración de 680-700 mM de NaCl. Las fracciones con actividad enzimática se agruparon y se concentraron en tubos Centricon de corte molecular de 100 kDa para disminuir la alta concentración de NaCl a la que eluye la enzima de la columna de Heparin Hi-Trap y de paso eliminar proteínas de bajo peso molecular. Las fracciones con actividad de DNA pol1 se mezclaron y se cargaron en una columna empacada con una resina de exclusión molecular Superdex-200, para realizar esta cromatografía se utilizó la solución amortiguadora E; Las fracciones con actividad después del paso por Superdex-200 se agruparon y se cargaron a una resina de intercambio aniónico, Mono Q; que al igual que en la columna de Heparine Hi-Trap, se le aplicó un gradiente de 150-1500 mM de NaCl y para ello se utilizaron las soluciones amortiguadoras C y D (antes mencionados). En esta resina la actividad de DNA pol1 eluyó con una concentración de 680 mM de NaCl; por último, las fracciones con actividad de DNA pol1 se concentraron en tubos Centricon 100 para disminuir la alta concentración de NaCl a la que eluye la enzima y eliminar productos de proteólisis menores a 100 kDa.

- 5. ENSAYO DE DNA POLIMERASA

Esta reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l con un amortiguador que contenía 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 6 mM de KCl, 8 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.4 mM de β -mercaptoetanol; 10 μ g de DNA activado de timo de ternera, 1 mM de ATP; 0.1 mM de cada uno los nucleótidos dGTP, dCTP, dATP; 5 μ Ci/mL de (³H) dTTP y 20 μ g de

proteína total de la fracción con actividad. Esta mezcla se incubó 30 minutos a 37°C, luego se detuvo la reacción con TCA al 10% y 100 µL de DNA de esperma de salmón (20 µg/mL), se incubó en hielo por 30 minutos y la muestra se filtró al vacío usando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, los cuales se lavaron con 5 mL de TCA al 10% y 5 mL de etanol al 96%. Los filtros se secaron en una estufa a 70°C durante 15 minutos y la radiactividad insoluble en el ácido es medida colocando los filtros en frascos viales que contenían líquido de centelleo, usando un contador de centelleo Beckman LS6000IC. El DNA activado se prepara disolviendo el DNA en un buffer que contiene 5 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 µM de MgCl₂, 0.5 mg/mL de BSA, 0.5 mg/mL de DNA de timo de ternera y 1 mg/mL de DNAsa 1, se incubaba 15 minutos a 37°C, se calienta 5 minutos a 77°C y se pasa rápidamente a un baño de hielo (Vázquez y Vázquez-Ramos 1987).

Para establecer las condiciones óptimas de reacción se varió un parámetro a la vez.

Una unidad de actividad enzimática es igual a un picomol (pmol) de dTMP incorporado al DNA (cpm insoluble en TCA= 23209) durante 30 minutos a 37°C.

• 6. CARACTERIZACIÓN DE LA DNA POLIMERASA 1

La actividad de la DNA pol1 de maíz se ensayó con la proteína obtenida en el último paso de purificación y cambiando las condiciones descritas a continuación:

NaCl.- Se probaron Las siguientes concentraciones de NaCl 0, 25, 50, 100, 150 y 200 mM.

KCl.- Se analizaron las siguientes concentraciones de KCl 0, 6, 12, 20 y 50 mM.

MgCl₂.- Las concentraciones de MgCl₂ que se probaron fueron 0, 2, 5, 8, 12 y 20 mM.

MnCl₂.- Las concentraciones de MnCl₂ que se probaron fueron 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM.

• 7. EFECTO DE INHIBIDORES

N-ETILMALEIMIDA (N-ETILMALEIMIDA): Se preparó a una concentración final de 500 mM disuelta en dimetil sulfoxido (DMSO); las concentraciones que se probaron fueron 0, 0.25, 1, 2.5, 10 y 100 mM.

AFIDICOLINA (Afi): Se preparó una solución estándar de 1.47 mM disuelta en DMSO. Las concentraciones de afidicolina que se probaron fueron 147, 14.7 y 1.47 μ M.

DIDESOXITIMIDINA TRIFOSFATO (ddTTP): Se preparó una solución a una concentración final de 3.12 mM disuelta en agua, y se probaron concentraciones de 312, 31.2 y 3.12 μ M.

Para el caso de N-ETILMALEIMIDA y afidicolina se incluyeron controles con DMSO al 2 y al 5% de concentración final.

La concentración proteica de cada fracción se determinó usando el método de Bradford (1976), construyendo una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones conocidas: Las muestras se leyeron a 590 nm, tomando como referencia que una unidad de absorbancia es igual a 1mg de proteína (Bradford 1976).

- 8. GEL DESNATURALIZANTE

Se realizó de acuerdo a Laemmli (1970) con un gel apilador que contenía 3-4% de acrilamida, 150 mM de Tris-HCl pH 6.8, 0.12% de SDS, 0.01% de TEMED y 0.1% de persulfato de amonio y un gel separador que contiene 10% de acrilamida, 375 mM de Tris-HCl pH 8.8, 0.1% de SDS, 0.01% de TEMED, 0.1% de persulfato de amonio. Los marcadores de peso molecular (en kDa) fueron miosina (cadena H) 200, fosforilasa b 97.4, albúmina sérica bovina 68, ovalbúmina 43, anhidrasa carbónica 29, β -galactoglobulina 18.4 y lisozima 14.3; estos geles se tiñeron con reactivo de Bradford (0.25 g de azul de Coomassie, 25.9 mL de HClO₄ al 70% (0.6 N) y aforar a 500 mL con H₂O).

- 9. GEL NATIVO

Este gel se realizó de acuerdo a Laemmli (1970) con un gel apilador del 3-4% de acrilamida, 150 mM de Tris-HCl pH 6.8, 0.01% de TEMED

y 0.1% de persulfato de amonio y un gel separador que contenía 5.5% de acrilamida, 187.5 mM de Tris-HCl pH 8.8, 20% de glicerol, 10% de etilenglicol, 0.01% de TEMED, 0.1% de persulfato de amonio; los marcadores de peso molecular (en kDa) fueron tiroglobulina 669, ferritina 450, catalasa 232, lactato deshidrogenasa 140, albúmina sérica bovina 68; estos geles se tiñen con reactivo de Bradford.

- 10. GEL DE ISOELECTROENFOQUE

Este gel se realizó de acuerdo a Maurides *et al.* (1989) con un gel al 5.5% de poliacrilamida, 1.8 mM de urea y 6.7% v/v de anfolinas de SIGMA pH 9-5; a las muestras problema se les adicionó urea 4 M y 3% de anfolinas. Cuando las muestras se cargaron a los pozos se les añadió 15 μ l de urea 2 M, y se terminó de cubrir el pozo con NaOH 30 mM, misma solución que cubrió la parte superior del aparato (cátodo), dejando al H₂SO₄ 0.1 M en la base del mismo (ánodo), para establecer el gradiente de pH. El gel se sometió a diferentes voltajes, iniciando la corrida con 50V durante 15 minutos, se continuó a 100V por 25 minutos seguido de otros cambios de voltaje a 200, 300, 400, 500 y 600V dejando 25 minutos entre un cambio y otro, después se bajó la intensidad hasta 250V en la que se mantuvo durante 18 horas, finalmente a 600V durante 30 minutos. Considerando el voltaje al que se sometió el gel, este debe ser lo más delgado posible (0.5 mm) para reducir la resistencia y así evitar el sobre calentamiento; el gel se tiñó con reactivo de Bradford.

- 11. GEL DE DOBLE CORRIDA

Este gel se realizó, primero resolviendo las muestras en un gel de isoelectroenfoque como se mencionó arriba. Después se cortó la parte superior del gel (1 a 2 milímetros a partir del fondo del pozo) para ensamblarse en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (descrito anteriormente); este segundo gel se corrió a 30V hasta que se salió el colorante; después se coloreó con reactivo de Bradford.

- 12. GEL DE ACTIVIDAD DESNATURALIZANTE

Este gel se realizó de acuerdo a Spanos *et al.* (1981). Con un gel apilador del 3-4% y un gel separador al 10% de poliacrilamida al cual se le adiciona 125 µg/mL de DNA activado de timo de ternera más EDTA 2 mM pero con las modificaciones de Karawya *et al.* (1983). Estas modificaciones consisten en adicionar suero fetal de ternera (desnaturizado a 100°C por 4 horas) a las muestras que se van a resolver, ya que la subunidad catalítica de muchas DNA polimerasas es muy lábil y para poder mantener la actividad de estos polipéptidos en este tipo de geles se requieren proteínas acompañantes que ayuden a su renaturalización y actividad (Karawya *et al.* 1983).

- 13. GEL DE ACTIVIDAD NATIVO

De acuerdo a Spanos *et al.* (1981), se hizo con un gel apilador del 3-4% y un gel separador al 5.5% de poliacrilamida pero sin SDS y

además con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA activado de timo de ternera más EDTA 2 mM, pero con las modificaciones de Karawya *et al.* 1983.

- 14. GEL DE ACTIVIDAD POR ISOELECTROENFOQUE

Se realizó de la misma forma que el gel de isoelectroenfoque, poliacrilamida 5.5%, 1.8 mM de urea y 6.7% de anfolinas con un rango de pH de 9-5 y adicionándole 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA activado al gel, con las modificaciones de Karawya *et al.* (1983).

- 15. GEL DE ACTIVIDAD DE DOBLE CORRIDA

Este gel se realizó de la misma forma que el gel de doble corrida, adicionándole al gel de SDS-poliacrilamida al 10%, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA activado de timo de ternera, con las modificaciones de Karawya *et al.* (1983).

- 16. WESTERN BLOT

Las proteínas fueron fraccionadas en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, para después transferirse en una membrana de nitrocelulosa (Maniatis *et al.* 1989). La membrana se lavó dos veces con TBS (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.150 mM de NaCl) y a continuación se bloqueó con TBS más leche semidescremada al 5% y 0.6% de Tween 20 por 2 horas a 37°C. La membrana se incubó con el primer anticuerpo en solución de bloqueo (anticuerpo de conejo contra la

DNA pol2 holoenzima de maíz; Coello *et al.* 1994) toda la noche a 4°C y se lavó dos veces con TBS y una vez con TBS y NaCl 0.5 M. Finalmente, la membrana se puso en agitación con el segundo anticuerpo que es IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa alcalina en solución, por 1 hora a temperatura ambiente. La señal se visualizó utilizando el sistema de quimioluminiscencia (ECL Amersham Ltd).

- 17. ENSAYO CON PCNA

Este ensayo es idéntico al ensayo de DNA polimerasa excepto que se probaron diferentes concentraciones de ATP (3 y 5 mM) y PCNA de maíz (1, 3 y 5 µg) (Herrera y Sánchez, datos sin publicar), cambiando un parámetro a la vez y combinando las condiciones entre si. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100µL que contenía 50mM de Tris-HCl pH 7.4, 6 mM de KCl, 8 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.4 mM de β-mercaptoetanol; 5 µg de polidA₄₀₀₀₋₅₀₀₀oligodT₁₂₋₁₈, 5 µCi de (H³) dTTP y 10 mg de fracción proteica.

- 18. ENSAYOS DE NUCLEASA

Se utilizó un molde de polidA₄₀₀₀₋₅₀₀₀ apareado con oligodT₁₂₋₁₈ a una relación molar de 1:1 molde-cebador, se sintetizó la cadena complementaria utilizando un exceso de (H³) dTTP (1 mCi/mL), y DNA pol1 de maíz: Las condiciones de reacción fueron Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 6 mM de KCl, 8 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.4 mM de β-

mercaptoetanol. Esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 37°C y se hizo una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, como se describió anteriormente, hasta obtener la pastilla de poli dA-polidT(³H), que se resuspendió en un volumen determinado para obtener 10 000 cpm por ensayo.

En un volumen final de 100µL de mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.4 mM de β-mercaptoetanol, 5% de glicerol, 1.5 mM de CaCl₂ y 10 µg de fracción con actividad de DNA pol1, esta mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C, la reacción se detuvo adicionando 5mL de TCA al 10% frío y 2 µg de DNA de esperma de salmón, se incubó en hielo por 30 minutos, la muestra se filtró al vacío usando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, los cuales se lavaron con 5mL de TCA al 10% y 5mL de etanol al 96%, estos filtros se secaron en una estufa a 70°C durante 15 minutos, la radiactividad insoluble en el ácido se midió colocando los filtros en frascos viales que contenían líquido de centelleo, como se describió anteriormente.

Las condiciones óptimas se establecieron variando un parámetro a la vez.

Ya que los ensayos de nucleasa sugerían la presencia de una actividad de exonucleasa en las fracciones con actividad de DNA pol1 de maíz, era necesario confirmar nuevamente su presencia, y la dirección de esta actividad de exonucleasa; para esto se realizaron geles de exonucleasa, usando como molde un oligonucleótido de 30 bases (DNA de cadena sencilla) marcado en el extremo 5' con (P³²)-γ-ATP por la enzima polinucleótido cinasa (GIBCO) del bacteriofago T4 como lo recomienda el fabricante.

Este oligonucleótido fue sintetizado por nuestro laboratorio, y la secuencia es 5'-ACGTAAAGGGAATTTCCCGGGGAAAACAA-3'. Hubo problemas para obtener este oligonucleótido de tamaño homogéneo por tal motivo se usó de esta forma.

- GELES PARA DETERMINAR ACTIVIDAD DE EXONUCLEASA

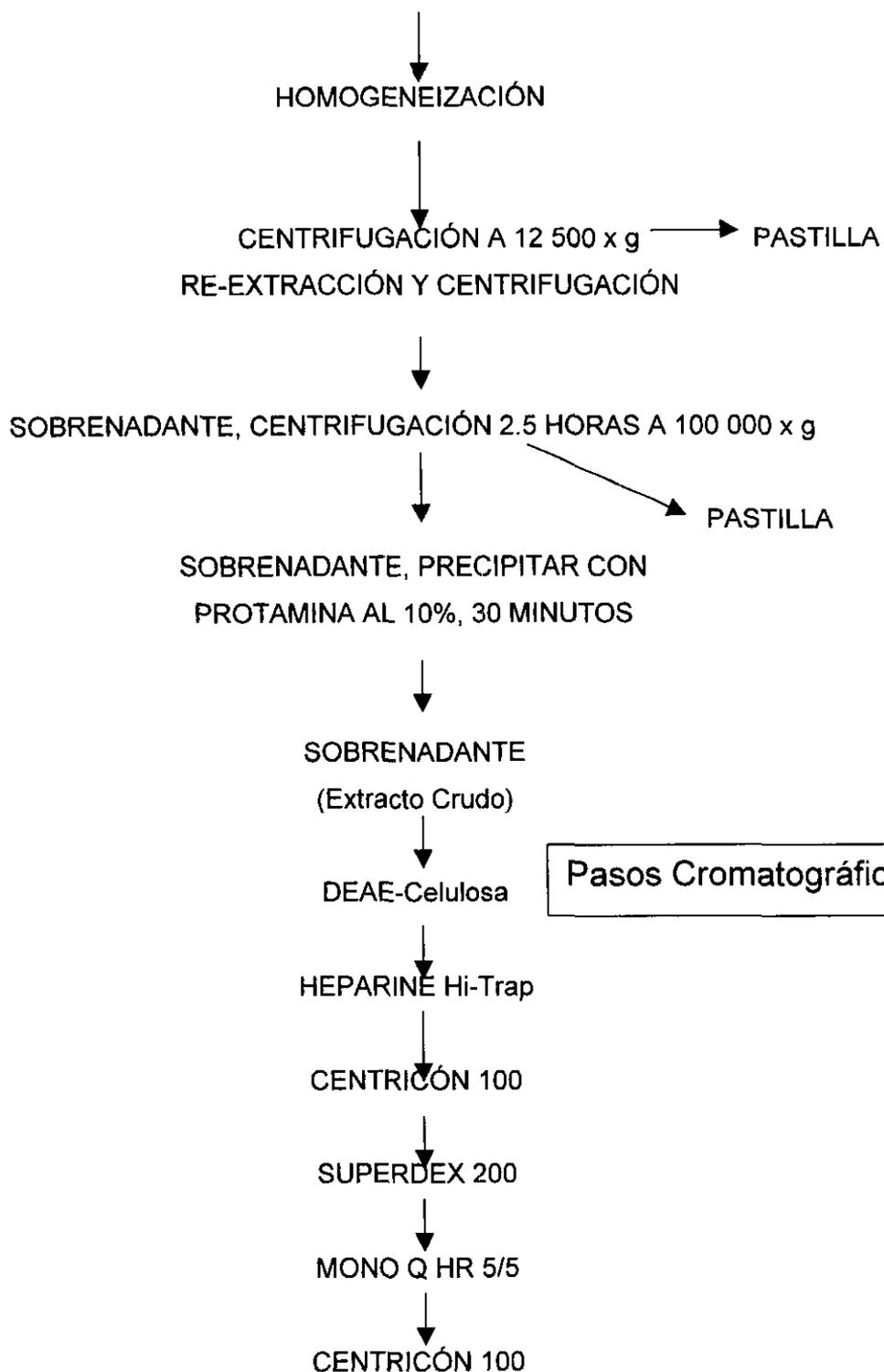
Estos ensayos se realizaron en un volumen final de 50 μ L que contenían 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.4 mM de β -mercaptoetanol, 5% de glicerol, 1.5 mM de CaCl_2 , y 50 ng de un oligo de DNA (30 b) de cadena sencilla marcado en el extremo 5' con (P^{32}) γ -ATP con la enzima T_4 polinucleótido cinasa (GIBCO). La reacción se inició adicionando 7 μ g de la fracción proteica con DNA pol1, incubándose a 37°C por 30 minutos y se detuvo calentando la mezcla a 70°C por 5 minutos. Se resuspendieron aproximadamente 200,000 cpm del ensayo (3 μ L) en formamida al 95%, azul de bromofenol 0.25%, Xilen cianol 0.25% y la muestra se separó en un gel de poliacrilamida al 14%, urea 7 M y 5 mL de buffer tolerante de glicerol 1x (Pisa-Williamson y Fuller 1992). Los marcadores de tamaño molecular que se usaron fueron 13 b, y de 12 a 18 b marcados con T_4 polinucleótido cinasa (GIBCO) y (P^{32})- γ -ATP como lo recomiendan los fabricantes. La electroforesis se detuvo cuando el primer colorante migró 2/3 del gel; el gel se separó de los vidrios, se fijó a un papel Whatman, se secó y se expuso a una placa de rayos X (Coello y Vázquez-Ramos 1995b; Laquel *et al.* 1993).

VI. RESULTADOS

Los estudios sobre la actividad de la DNA pol1 de maíz se realizaron utilizando una proteína parcialmente purificada mediante el procedimiento cromatográfico reportado previamente (García *et al.* 1997), con ligeras modificaciones, las cuales consistieron en concentrar en tubos Centicón 100 las fracciones con actividad de DNA pol1 cuando eluían de la columna de Heparine-Hi-Trap y posteriormente cuando eluyeron de la columna de Mono Q, reduciendo la fuerza iónica a la que sale la fracción de DNA pol1 de estas columnas.

A. ESQUEMA DE PURIFICACIÓN

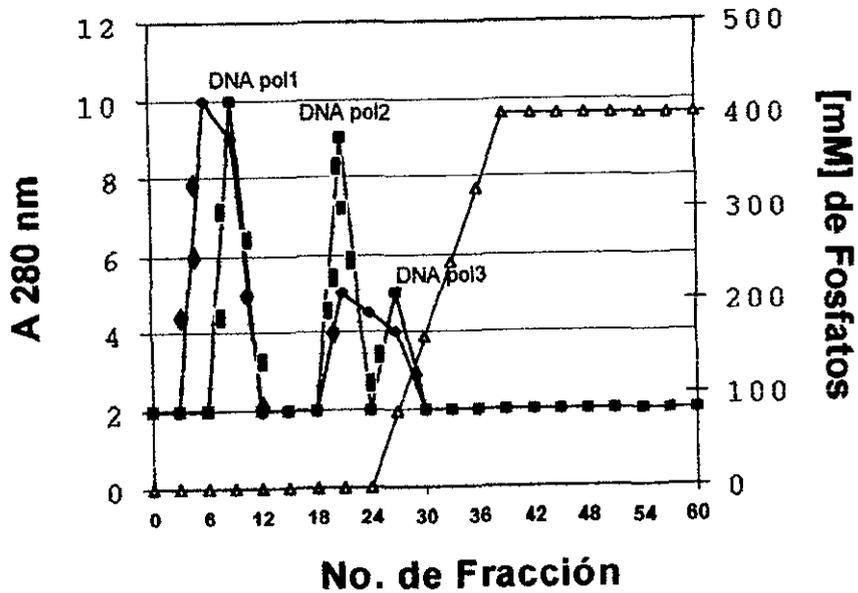
EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ IMBIBIDOS POR 24 HORAS



La primera resina cromatográfica utilizada fue de intercambio aniónico, DEAE-celulosa. En este primer paso de purificación se resolvieron claramente tres picos con actividad de DNA polimerasa. Estos picos se nombraron de acuerdo al orden de elución de la manera siguiente: DNA pol1, DNA pol2 y DNA pol3 (Coello *et al.* 1992).

Como se observa en la figura 3 el primer pico de actividad eluye al lavar la columna, con buffer de fosfatos de 40 mM; el segundo pico eluye a una concentración de fosfatos aproximadamente de 100 mM y el tercer pico a una concentración de alrededor de 200 mM. Lo anterior sugiere indirectamente que la DNA pol1 (holoenzima) tiene una carga eléctrica parcial positiva y que existe una carga parcial negativa en las DNA pol2 y 3. La elección de esta resina como primer paso cromatográfico fue debida a la alta resolución de los picos de actividad (Coello *et al.* 1992).

Las fracciones con actividad de DNA pol1 se agruparon y se cargaron a una columna de afinidad, Heparine Hi-Trap. La heparina es un glucosaminoglucano altamente sulfatado que imita a la estructura polianiónica del DNA. En esta cromatografía, la proteína cargada se



- ◆ Proteína total
- Actividad de DNA polimerasa

Figura 3

PERFIL DE ELUCIÓN DE TRES ACTIVIDADES DE DNA POLIMERASAS DE MAÍZ A TRAVÉS DE UNA RESINA DE DEAE-CELULOSA

La fracción I (50mL) fue aplicada a una columna de DEAE-Celulosa (2.5 x 15 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora A.

Se aplicó una gradiente lineal de 40 a 400 mM de fosfatos a un flujo de 15 mL/hr.

DNA pol: DNA polimerasa

eluyó aplicando un gradiente de NaCl desde 150 mM hasta 1.5 M; la DNA pol1 eluyó a 650 mM como se observa en la figura 4.

Con el objeto de concentrar la enzima y reducir la elevada fuerza iónica a la que eluye, las fracciones con actividad catalítica se colectaron y se concentraron en tubos Centricón con capacidad de corte molecular de 100 kDa. La proteína concentrada se cargó a una resina de exclusión molecular, Superdex 200, la que separa proteínas de 10 a 600 kDa. Como se observa en la figura 5, la DNA pol1 de maíz eluyó en fracciones correspondientes a un tamaño aproximado de 450 kDa. Utilizando NaCl 50 mM como amortiguador eluyente. Nuevamente, las fracciones con actividad de DNA pol1 se mezclaron y se cargaron a una columna cromatográfica de intercambio aniónico fuerte, Mono Q. Como se observa en la figura 6, en esta cromatografía la actividad de polimerasa eluyó a una concentración de NaCl de 680 mM.

Por último, las fracciones con actividad enzimática se concentraron en tubos Centricón de corte molecular de 100 kDa, para realizar los ensayos de actividad. De esta forma la DNA pol1 de maíz quedó purificada más de 5000 veces (tabla 2).

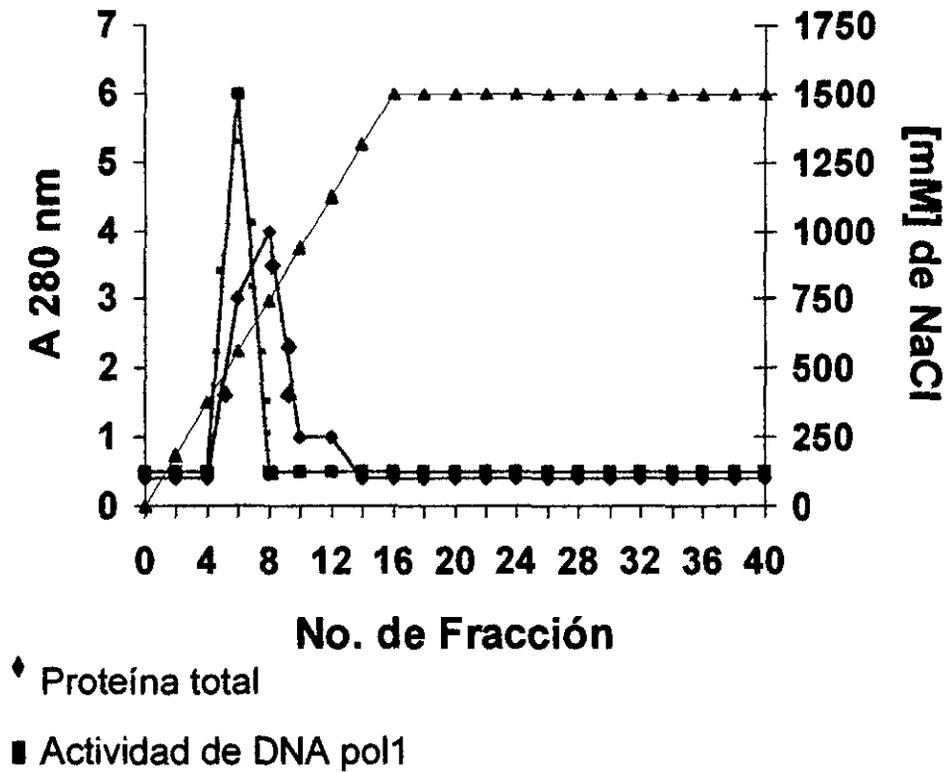


Figura 4

PERFIL DE ELUCIÓN DE LA DNA pol1 DE MAÍZ A TRAVÉS DE UNA RESINA DE HEPARINE Hi-Trap

La fracción 2 (20 mL) fue aplicada a una columna de Heparine Hi-Trap(1.5 x 5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora C. Se aplicó un gradiente lineal de 150 a 1500 mM de NaCl a un flujo de 10 mL/hr.

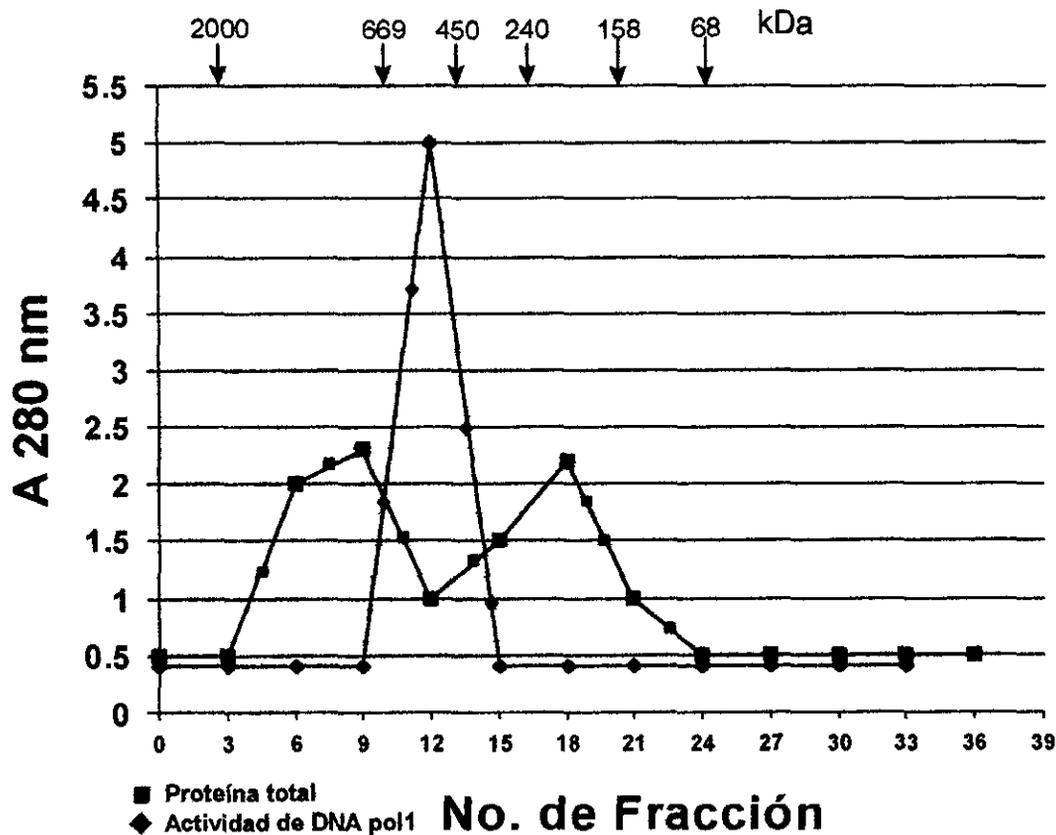


Figura 5

PERFIL DE ELUCIÓN DE LA DNA pol1 DE MAÍZ A TRAVÉS DE UNA RESINA DE SUPERDEX 200

La fracción 3 (concentrada en tubos Centricón 100) fue aplicada a una columna de Superdex 200 (1.6 x 60 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora E. Las proteínas aplicadas fueron eluidas con tres volúmenes de solución amortiguadora E a un flujo de 45 mL/hr. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: Azul de dextran 2000 kDa; tiroglobulina 669 kDa; ferritina 450 kDa; catalasa 240 kDa; aldolasa 158 kDa y albumina 68 kDa.

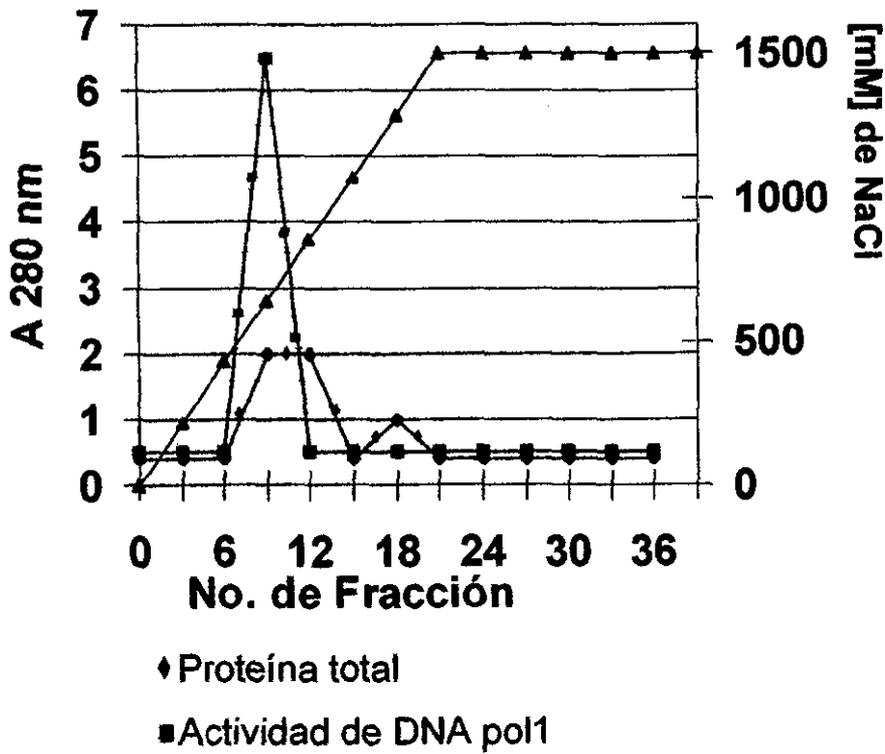


Figura 6

PERFIL DE ELUCIÓN DE LA DNA pol1 DE MAÍZ A TRAVÉS DE UNA RESINA DE MONO Q

La fracción 4 (28 mL) fue aplicada a una columna de Mono Q (0.5 x 5 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora C. Se aplicó un gradiente lineal de 150 a 1500 mM de NaCl a un flujo de 30 mL/hr.

TABLA 2

Cuadro de Purificación

| MUESTRA | ACTIVIDAD TOTAL (unidades) | PROTEÍNA TOTAL (mg) | ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg) | VECES DE PURIFICACIÓN |
|------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Extracto Crudo | 88.97 | 1134 | 0.08 | ----- |
| DEAE-Celulosa | 211.16 | 99 | 2.13 | 26.6 |
| Heparine Hi-Trap | 160 | 0.9 | 172 | 2150 |
| Centricon 100 | 158 | 0.875 | 180.57 | 2257 |
| Superdex 200 | 84.1 | 0.4 | 210 | 2628 |
| Mono Q | 59.56 | 0.15 | 397 | 4963 |
| Centricon 100 | 59.5 | 0.148 | 402 | 5025 |

Una unidad de actividad enzimática es igual a un picomol (pmol) de dTMP incorporado al DNA durante 30 minutos a 37°C.

Se intentaron otros pasos cromatográficos tales como DNA-Celulosa, Heparine Hi-Trap, Phenyl-Sepharose, para obtener más pura a la enzima pero no se tuvo éxito ya que se pierde la actividad de la DNA pol1. Lo anterior pudo deberse a la poca cantidad de proteína que se obtiene después del paso por la columna de mono Q.

B. CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA DNA pol1 DE MAÍZ

Con el fin caracterizar la actividad catalítica de la DNA pol1 de maíz y comparar esta con las actividades de las DNA pol2 y 3 de maíz, se realizaron ensayos para determinar los requerimientos de diferentes cationes (Mg^{++} , Mn^{++} , K^+), así como para conocer los efectos de la fuerza iónica (NaCl) y de diferentes inhibidores (N-etilmaleimida, afidicolina, ddTTP) sobre la actividad de esta enzima.

La ulterior caracterización de la DNA pol1 de maíz incluyó la determinación de actividades de nucleasa y el efecto de PCNA, sobre la actividad sintética de la DNA pol1.

- Efecto de Diferentes Cationes

Para determinar las condiciones óptimas de actividad de la DNA polimerasa 1 de maíz, se probaron diferentes concentraciones de $MgCl_2$, $MnCl_2$ y KCl , variando un parámetro a la vez. El 100% de actividad se tomo como la concentración 0 para KCl y $NaCl$, pero para $MgCl_2$ y $MnCl_2$ se tomo como la concentración a la que la DNA pol1 presentó mayor actividad. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. A continuación se muestra el perfil de actividad de la DNA pol1 de maíz bajo diferentes condiciones:

TABLA 3

a. Respuesta a KCl

| KCl (mM) | DNA pol1 (% de actividad) |
|------------|------------------------------|
| 0 | 100 |
| 6 | 103.2 |
| 12 | 90.6 |
| 20 | 86.2 |
| 50 | 73.6 |
| 100 | 32.3 |

Como se observa en la tabla 3, la DNA pol1 no requiere KCl para catalizar la reacción, además a concentraciones hasta 6 mM no tienen efecto alguno sobre la actividad de la DNA pol1 sin embargo a

concentraciones de 12 mM de KCl y mayores se obtuvo un efecto inhibitorio. La DNA pol2 al igual que la DNA pol1 de maíz y no requiere KCl para su actividad, pero se estimula a concentraciones de 100 mM (Coello y Vázquez-Ramos 1995b).

TABLA 4

b. Respuesta a MgCl₂

| MgCl ₂ (mM) | DNA pol1 (% de actividad) |
|------------------------|------------------------------|
| 0 | 0 |
| 2 | 74.4 |
| 5 | 100 |
| 8 | 93 |
| 12 | 77.7 |
| 20 | 83.2 |

Los resultados mostrados en la tabla 4 nos indican que el Mg⁺² es esencial para la actividad de la DNA pol1 y que la actividad máxima se alcanzan entre 5 y 8 mM de MgCl₂; a concentraciones mayores la actividad disminuyó ligeramente. La DNA pol2 al igual que la DNA pol1, requiere Mg⁺² para llevar a cabo su actividad polimerizante, pero la concentración óptima para su actividad se encuentra alrededor de 12 mM (Coello y Vázquez-Ramos 1995b).

TABLA 5

c. Respuesta a $MnCl_2$

| $MnCl_2$ (mM) | DNA pol1 (% de actividad) |
|---------------|------------------------------|
| 0 | 0 |
| 0.5 | 65.4 |
| 1 | 69.3 |
| 2 | 89.3 |
| 4 | 100 |
| 8 | 62.3 |

La DNA pol1 requiere para su actividad polimerizante de un catión divalente, y Mg^{+2} puede ser sustituido por Mn^{+2} como se muestra en la tabla 5. La concentración óptima de estimulación de la actividad de la DNA pol1 para Mn^{+2} fue alrededor de 4 mM; a concentraciones mayores la actividad decreció. La DNA pol2 de maíz requiere concentraciones de Mn^{+2} similares a la DNA pol1 (entre 1-4 mM, Coello y Vázquez-Ramos 1995b).

- B1. Respuesta a NaCl y a Inhibidores de la Síntesis de DNA

Se hizo una comparación de la DNA pol1 con las otras DNA polimerasas de maíz hasta ahora reportadas en cuanto a su respuesta a diferentes concentraciones de NaCl y a inhibidores de la síntesis de DNA tales como N-etilmaleimida, afidicolina y didesoxitimidina trifosfato (ddTTP). El perfil de actividad que se muestra a continuación de las DNA pol1 y 2 (purificadas por DEAE-Celulosa, Heparine-Hi-Trap, tubo Centricon 100, Superdex 200, Mono Q y tubo Centricon 100) y DNA pol3 de maíz (purificada por DEAE-Celulosa, Heparine Hi-

Trap y tubo Centricon 10) fue realizado a partir de un mismo extracto crudo. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. A continuación se muestra el perfil de actividad a diferentes concentraciones de:

TABLA 6

a. Efecto de NaCl sobre la actividad de las DNA pol1, 2 y 3 de maíz

| NaCl (mM) | DNA pol1 (% de actividad) | DNA pol2 (% de actividad) | DNA pol3 (% de actividad) |
|-----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 25 | 139 | 74 | 81.4 |
| 50 | 139.7 | 49.3 | 61.4 |
| 100 | 144.6 | 45.6 | 41.3 |
| 150 | 57.2 | 41.7 | 35.7 |
| 200 | 52.9 | 23.42 | 23.2 |

Los resultados mostrados en la tabla 6 indicaron que existe una respuesta diferencial entre las DNA pol1, 2 y 3 ya que mientras a concentraciones de hasta 100 mM NaCl estimuló a la DNA pol1, la presencia de NaCl inhibe notablemente la actividad de las DNA pol2 y 3.

TABLA 7

b. Efecto de N-etilmaleimida sobre la actividad de las DNA pol1, 2 y 3 de maíz

| N-etilmaleimida (mM) | DNA pol1 (% de actividad) | DNA pol2 (% de actividad) | DNA pol3 (% de actividad) |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 15.8 | 26.8 | 93.1 |
| 10 | 0 | 5.22 | 82.6 |
| 100 | 0 | 0 | 75.4 |
| DMSO al 5% | 93 | 90.1 | 116.7 |

TABLA 8

c. Efecto de Afidicolina (Afi) sobre la actividad de las DNA pol1, 2 y 3 de maíz

| Afi (μ M) | DNA pol1 (% de actividad) | DNA pol2 (% de actividad) | DNA pol3 (% de actividad) |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1.47 | 94 | 93 | 100.8 |
| 14.7 | 81 | 73 | 93 |
| 147 | 48 | 38 | 102.4 |
| DMSO al 5% | 93 | 90 | 142.3 |

Mientras que N-etilmaleimida inhibió totalmente a la DNA pol1 a concentraciones de 10 mM y a la DNA pol2 a 100 mM; una concentración tan baja como 1 mM redujo la actividad de ambas polimerasas por debajo de 27% (tabla 7). La DNA pol3 fue altamente resistente a N-etilmaleimida ya que a 100 mM la actividad de la DNA pol3 fue de 75%. Es de notarse aquí que el compuesto usado para disolver a N-etilmaleimida, el DMSO, causó una inhibición de un 10% de la actividad de las DNA pol1 y 2, no así la de la DNA pol3.

La afidicolina es un inhibidor específico de las DNA polimerasas replicativas en eucariotes diferentes a plantas e inhibió hasta un 52% a la DNA pol1 y hasta en un 62% a la DNA pol2, mientras que la DNA pol3 fue insensible a la afidicolina a todas las concentraciones usadas (tabla 8).

TABLA 9

d. Efecto de didesoxitimidina trifosfato (ddTTP) sobre la actividad de las DNA pol1, 2 y 3 de maíz

| ddTTP (nM) | DNA pol1 (% de actividad) | DNA pol2 (% de actividad) | DNA pol3 (% de actividad) |
|------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 3.12 | 83.8 | 88 | 45.3 |
| 31.2 | 97.2 | 79.5 | 37 |
| 312 | 91.1 | 80.1 | 28.3 |
| 3120 | 51.2 | 75.4 | 10 |

El ddTTP es un inhibidor de DNA polimerasas tipo β o reparativas (Kornberg y Baker 1992). La tabla 9 nos muestra que el ddTTP inhibió solo parcialmente y a altas concentraciones a las DNA pol1 y 2, mientras que la DNA pol3 fue altamente sensible al inhibidor aún a bajas concentraciones.

Los resultados de la caracterización se resumen en la tabla 10:

TABLA 10

Resumen de la Caracterización de las 3 DNA Polimerasas de Maíz

| | DNA pol1 | DNA pol2 | DNA pol3 |
|--------------------------------------|----------------|------------------|------------|
| NaCl | | | |
| 50-100 mM | Estimulación | Inhibición | Inhibición |
| 150-200 mM | Inhibición | Inhibición | Inhibición |
| Condiciones de Reacción | | | |
| MgCl ₂ (mM) | 5 a 8 | 12* | ND |
| MnCl ₂ (mM) | 2 a 4 | 1 a 4* | ND |
| KCl (mM) | No se requiere | No se requiere * | ND |
| Inhibición con: (% de inhibición) | | | |
| ddTTP (3.12 μM) | 48.8% | 24.6% | 90% |
| Afidicolina (0.147mM) | 48% | 62% | No inhibe |
| N-etilmaleimida (1 mM) | 83% | 73.2% | 6.9% |

*Resultados de la DNA pol2 de maíz fueron reportados por Coello y Vázquez-Ramos 1995b. ND: No se ha determinado.

De acuerdo con los patrones de inhibición y de concentración de sales, se puede inferir que las DNA polimerasas 1, 2 y 3 de maíz son distintas entre si. La DNA pol1 requiere 100 mM de NaCl para incrementar su actividad, mientras que las DNA pol2 y 3 se inhibe a esta concentración. Por otro lado, N-etilmaleimida y afidicolina inhiben a las DNA pol1 y 2 pero no inhiben a la DNA pol3. Finalmente, el ddTTP inhibe principalmente a la DNA pol3 y muy poco a las DNA pol1

y 2. Estos parámetros permiten sugerir que las DNA pol1 y 2 son semejantes a las DNA polimerasas replicativas de eucariotes y la DNA pol3 pareciera de tipo reparativo (Konberg y Baker 1992).

- Ensayos de Nucleasa y de Efecto de PCNA

- B2. ACTIVIDAD DE NUCLEASA

Con excepción de las DNA tipo β y la ζ , el resto de las DNA polimerasas reportadas en eucariotes poseen actividad de exonucleasa 3' o 5' (Kornberg y Baker 1992). En las DNA polimerasas δ y ε la actividad de exonucleasa es 3'-5', y en la DNA pol α la actividad de exonucleasa va de 5'-3', mientras que la DNA pol γ posee ambas actividades. Con el objetivo de determinar si la DNA pol1 de maíz posee actividad de exonucleasa y al mismo tiempo establecer la dirección de ésta, se realizaron experimentos para medir indirectamente esta actividad, mediante la disminución en la marca radiactiva detectada en contador de centelleo, cuando se adicionan *in vitro* alícuotas de la enzima purificada a un molde de polidA-poli-(H³)dT. Se realizaron también ensayos directos determinando la disminución en el tamaño de un oligonucleótido de ~30 b al resolverlo en un gel de poliacrilamida. La caracterización de la actividad de exonucleasa incluye la determinación de las concentraciones de Mg²⁺ y Ca²⁺ requeridas para obtener un máximo de actividad. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 11 y en la figura 7.

TABLA 11

Ensayo indirecto de la actividad de Nucleasa de la DNA pol1 de Maíz

| MUESTRA | Actividad residual (cpm) | % de degradación |
|-----------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Molde de DNA (control) | 11125 | 0 |
| DNA pol1+ 1.5 mM MgCl ₂ | 3468 | 70.9 |
| DNA pol1 + 500 μM MgCl ₂ | 4527 | 59.3 |
| DNA pol1 + 50 μM MgCl ₂ | 5303 | 52.3 |
| DNA pol1 + 1.5 mM CaCl ₂ | 3753 | 66.3 |
| DNA pol1 + 500 μM CaCl ₂ | 4797 | 56.9 |
| DNA pol1 + 50 μM CaCl ₂ | 5632 | 49.6 |
| DNA pol1 S/KCl,MgCL ₂ ,CaCl ₂ | 5534 | 50.3 |
| DNA pol1 de <i>E. coli</i> (control +) | 2773 | 74.7 |

cpm: Cuentas por minuto. S/: Sin. *E. coli*: *Escherichia coli*.

Como se observa en la tabla 10, la DNA pol1 contiene una actividad de nucleasa y esta actividad se incrementó conforme aumentó la concentración tanto de Mg⁺² como de Ca⁺², siendo 1.5 mM la concentración óptima de catión divalente con la que se obtuvo un máximo de actividad. Además, se observó que el K⁺, Mg⁺² y Ca⁺² no eran necesarios para esta actividad. La actividad de nucleasa es semejante (en las mejores condiciones del ensayo) a la actividad mostrada por la DNA pol I de *E.coli* (usando 1.5 mM de CaCl₂).

La actividad de nucleasa también se detectó mediante geles de poliacrilamida. Para la realización de estos ensayos se adicionó a la DNA pol1 sobre un molde de DNA de cadena sencilla de 30 b, marcado con P³² en el extremo 5' de la hebra. Los productos obtenidos

se separaron en un gel de poliacrilamida al 14% y se detectaron por autorradiografía.

Tomando en cuenta que el oligonucleótido está marcado en el extremo 5', la dirección de la actividad de exonucleasa se infirió de la siguiente manera: Si la enzima desplegara una actividad de exonucleasa desde el extremo 5', como producto de la reacción se encontraría únicamente una banda en el fondo del gel correspondiente a la liberación del nucleótido radiactivo; mientras que si desplegara una actividad de exonucleasa de 3'-5', se observaría una escalera de degradación, desde la zona del molde sin cortar hasta donde corra el último nucleótido del extremo 5', cuando los productos de la reacción se separan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Como se observa en la figura 7, los ensayos de exonucleasa con la DNA pol1 de maíz a diferentes tiempos de reacción (1, 30, 60 minutos, carriles del 4 al 6 respectivamente) mostraron la aparición de bandas de bajo peso molecular (1 a 7 bases) que no estaban presentes en el molde control (carril 3), la desaparición de la banda de 18 bases y la disminución de la de 30 bases (carril 6). Como control positivo se empleó a la nucleasa BAL31 (materiales y métodos, Wei *et al.* 1983).

Aunque el oligonucleótido no es totalmente homogéneo, ya que presenta dos componentes principales de 30 y 18 bases, el resultado sugiere que la DNA pol1 de maíz posee una actividad de exonucleasa 3'-5'. Este tipo de actividad ha sido reportada para las DNA polimerasas tipo δ y ϵ de eucariotes (Kornberg y Baker 1992).

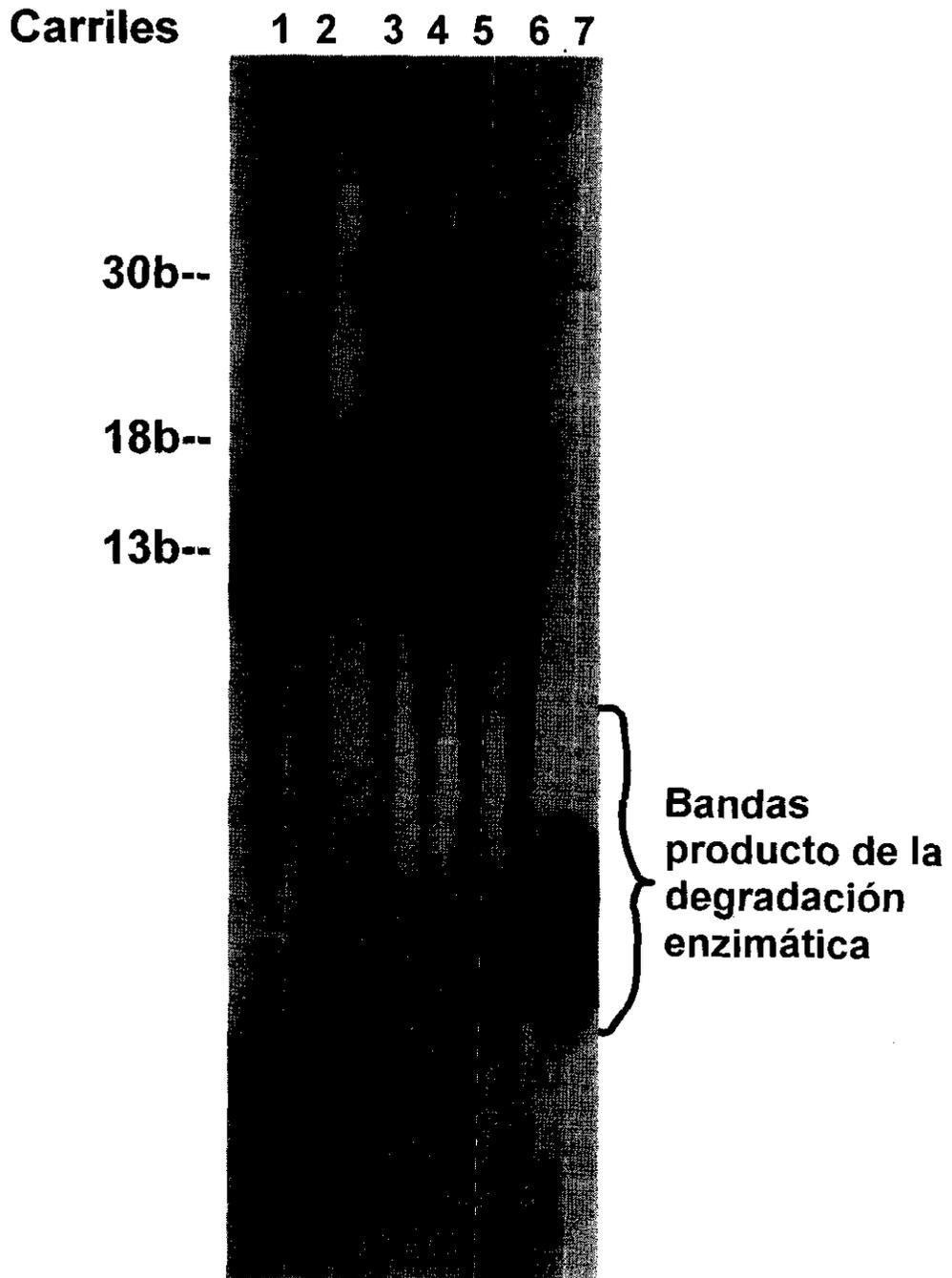


FIGURA 7

ENSAYO DIRECTO DE ACTIVIDAD DE EXONUCLEASA DE LA DNA pol1 DE MAÍZ.

Carril 1: marcador de 13 b; carril 2: marcadores de 12 a 18 b; carril 3: molde control; carril 4 al 6: Molde incubado por 1, 30 y 60 minutos con DNA pol1, Carril 10 minutos con la Nucleasa BAL-31.

- B3. ENSAYOS CON PCNA

La procesividad de las DNA polimerasas tipo δ se incrementa cuando en la reacción esta presente PCNA (Kornberg y Baker 1992; Laquel *et al.* 1993).

Con el fin de determinar si la DNA pol1 de maíz es una DNA polimerasa tipo δ , se realizaron ensayos de actividad de DNA polimerasa en presencia de PCNA de maíz expresada en *E.coli* y purificada (López *et al.* 1997; Herrera y Sánchez, comunicación personal). Se utilizaron diferentes cantidades de PCNA y ya que este proceso requiere del consumo de energía, se probaron además diferentes concentraciones de ATP. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 12:

TABLA 12

EFFECTO DE PCNASOBRE LA ACTIVIDAD DE DNA pol1 DE MAÍZ

| Muestras | cpm | % de actividad |
|--------------------------------------|-------|----------------|
| DNA pol1+1 mM de ATP (control) | 11350 | 100 |
| DNA pol1+3 μ g de PCNA + 1mM ATP | 14795 | 130.5 |
| DNA pol1+5 μ g de PCNA + 1mM ATP | 15350 | 135.2 |
| DNA pol1+3 μ gPCNA+3 mM ATP | 27050 | 238.3 |
| DNA pol1+3 μ g PCNA+5 mM ATP | 26950 | 237.4 |

La mezcla de reacción para la DNA pol1 contenía 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 6 mM de KCl, 8 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.4 mM de β -mercaptoetanol, 1 mM de ATP, 5 μ g de polidA-oligodT, 5 μ Ci de (H³)-dTTP y 10 μ g de fracción proteica. cpm: Cuentas por minuto. DNA pol1: DNA polimerasa 1 de maíz.

Como se puede observar en la tabla 12, PCNA estimula la actividad de la DNA pol1 de maíz en un 30%; como este proceso requiere energía

se decidió incrementar la concentración de ATP a 3 y 5 mM. Como se observa en la tabla este incremento de ATP estimuló a la DNA pol1 a más del 100% aunque no hay diferencias entre 3 y 5 mM de ATP. La actividad de la enzima en presencia de ATP 3 y 5 mM, en ausencia de PCNA no es muy diferente al control.

La confirmación de la actividad de la DNA pol1 y su procesividad por PCNA no pudo determinarse por geles de acrilamida por problemas metodológicos; sin embargo, la detección de la estimulación de la actividad de polimerasa por PCNA, junto con la presencia de la actividad de exonucleasa 3'-5', nos permiten proponer que la DNA pol1 posee propiedades similares a las DNA polimerasas δ de eucariotes.

C. GEL DE ACTIVIDAD EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

- Identificación de la Subunidad Catalítica.

La fracción que se obtuvo después del último paso de purificación (Mono Q-Centrifugación 100) de la DNA pol1 se resolvió en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y fueron revelados tanto con azul de Coomassie como por actividad (figura 8) para hacer una correlación entre ellos y distinguir cual sería la posible banda con actividad de DNA polimerasa. En el gel de actividad se detectó una banda con actividad de DNA polimerasa de aproximadamente 70 kDa (figura 8B, carril 6) la cuál corresponde a la subunidad catalítica de la enzima, que correlaciona con una banda del mismo tamaño en el gel teñido con azul de Coomassie (figura 8A, carril 3). La subunidad catalítica de la

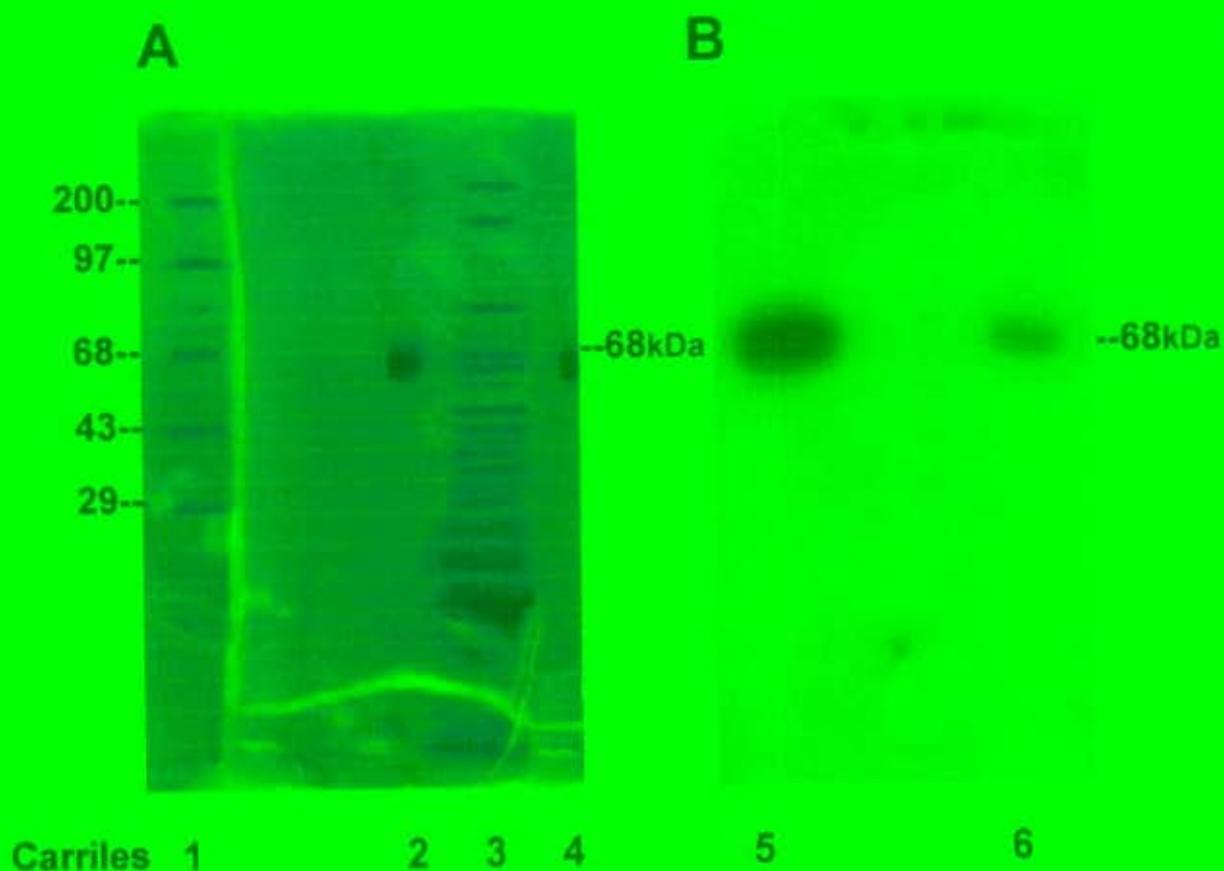


FIGURA 8

GELES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

A. Gel teñido con azul de Coomasie.

Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2 y 4: albúmina sérica bovina; carril 3: fracción con actividad de DNA pol1 después del último paso de purificación.

B. Autorradiografía de un Gel de Actividad en Condiciones Desnaturalizantes.

Carril 5: Fragmento Klenow (68 kDa); carril 6: Subunidad catalítica de la DNA pol1 de maíz.

DNA pol1 es un polipéptido de baja estabilidad, lo que se determinó durante la realización de los geles de actividad en condiciones desnaturalizantes; es decir, si la fracción de DNA pol1 después del último paso de purificación no se carga al gel acompañado de proteínas desnaturalizadas de suero fetal de ternera (como proteínas acompañantes) o proteínas que estabilicen, la subunidad catalítica no se renaturaliza, perdiendo la actividad polimerizante (Karawya et al. 1983).

D. GEL DE ACTIVIDAD EN CONDICIONES NATIVAS

Para determinar el tamaño de la DNA pol1 en su estado nativo, no desnaturalizado, se realizó un gel de actividad en condiciones no desnaturalizantes; como se observa en la figura 9A (carril 1). Se detectó una banda con un tamaño aproximado de 450 kDa, que migra en una posición que corresponde al tamaño de la enzima completa; por otro lado, cuando el ensayo se llevó a cabo en presencia de urea 4 M o de SDS 1%, se detectó un barrido que va desde los 450 kDa hasta un peso debajo de 100 kDa (figura 9C, carril 10). Esto sugiere la presencia de varios complejos enzimáticos que pueden tomar diversas conformaciones con la subunidad catalítica. En otras palabras, se trata de una enzima multimérica, lo que no es raro para las DNA polimerasas replicativas de eucariotes (Sugino 1995; Kornberg y Baker 1992; Foiani et al. 1997; Zou et al. 1997). Estos ensayos se realizaron también para la DNA pol2 de maíz, la cual migra a un peso mayor a 650 kDa (figura 9A, carril 3), y cuando se trata con urea 4 M o SDS al 1% esta enzima forma un barrido que va de un peso aproximado a 650

kDa, hasta un peso por debajo de los 100 kDa (figura 9A, carril 2, y 8 C, carril 11), sugiriendo que al igual que la DNA pol1 de maíz, esta enzima forma parte de un complejo multienzimático.

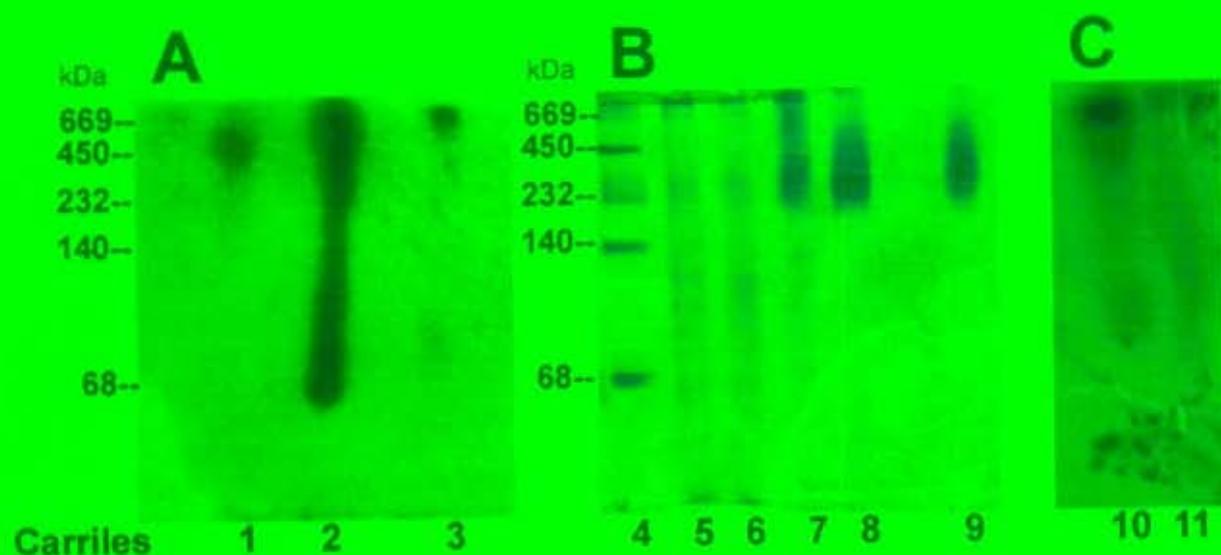


FIGURA 9
GELES EN CONDICIONES NATIVAS

A. Autorradiografía de un Gel de Actividad en Condiciones Nativas. Carril 1: DNA pol1 en estado basal; carril 2: DNA pol2 desnaturizada con SDS al 1%; carril 3: DNA pol2 en su estado basal.

B. Gel de Poliacrilamida en Condiciones Nativas. Tinción con Coomasie. Carril 4: Marcadores de peso molecular; carriles 5 y 6: DNA pol2 basal; carril 7: DNA pol1 basal; carriles 8 y 9: DNA pol1 desnaturizada con urea 4M.

C. Autorradiografía de un Gel de Actividad en Condiciones Nativas. Carril 10: DNA pol1 desnaturizada con urea 4M; carril 11: DNA pol2 desnaturizada con urea 4M.

En el gel teñido con azul de Coomasie no se pudieron distinguir las bandas correspondientes a las detectadas en el gel de actividad, pues en el primero se observa la presencia de muchas proteínas de alto peso molecular; además, la baja concentración de acrilamida a la que se realizaron estos geles (5.5 o 6% de poliacrilamida), hace muy difícil la definición de la enzima en los geles nativos (figura 9B).

E. GEL DE ACTIVIDAD DE ISOELECTROENFOQUE

Con el propósito de hacer geles de doble dimensión y así purificar a homogeneidad a la subunidad catalítica de la DNA pol1, se realizó un gel de actividad de isoelectroenfoco usando una escala de punto isoeléctrico de 9 a 5.

Como se observa en la figura 10, bajo estas condiciones, las actividades catalíticas analizadas (DNA pol1 y DNA pol2 de maíz) no migraron (carriles 1 y 2), lo que sugiere que las DNA pol1 y 2 de maíz tienen un punto isoeléctrico de 9 o mayor a 9.

F. GEL DE ACTIVIDAD DE DOBLE CORRIDA

Dado que las actividades de DNA pol1 y DNA pol2 se quedaban en el pozo cuando se realizaban los geles de punto isoeléctrico en un rango de 9 a 5, se decidió cortar los pozos del gel y ensamblarlos en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (ver métodos) (figura 11). En estos ensayos se utilizó al fragmento Klenow como control positivo. Después de este tratamiento una parte del gel (Figura 11 A, carriles 1, 2 y 3, correspondientes a la DNA pol1, fragmento Klenow y

DNA pol2, respectivamente) fue usada para realizar el ensayo de actividad y con la parte restante (fig. 11 B, carriles 4 y 5, correspondientes a la DNA pol1 y DNA pol2) se realizó un ensayo tipo Western blot (como control positivo) usando anticuerpos contra la DNA pol2 de maíz (Coello *et al.* 1994).

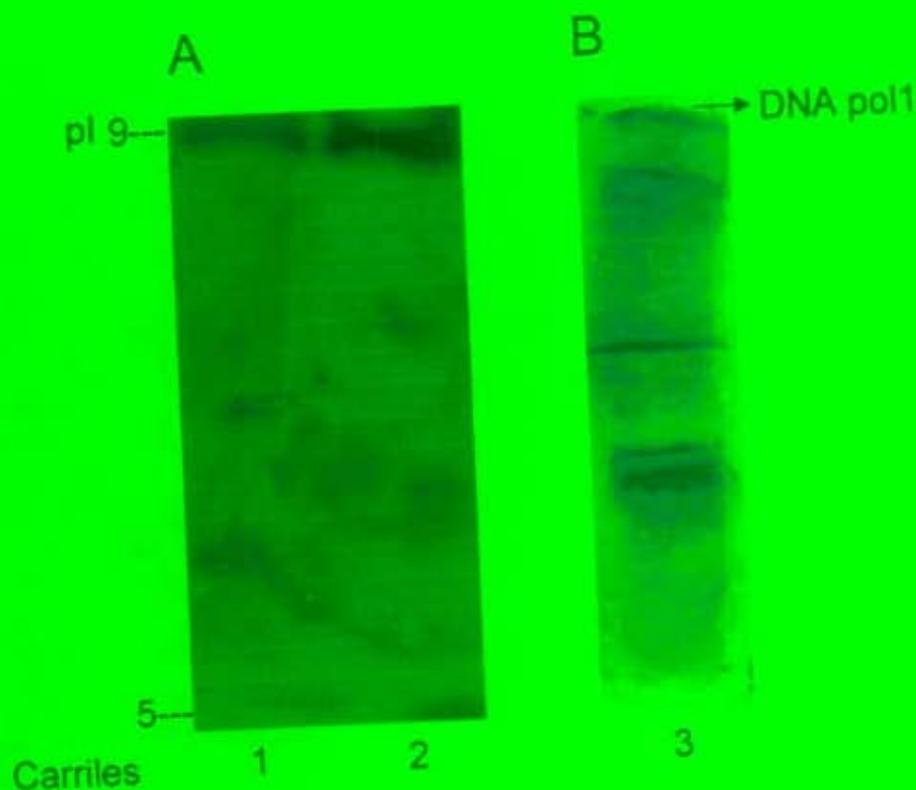


FIGURA 10

GELES DE ISOELECTROENFOQUE

A. Autorradiografía de un Gel de Isoelectroenfoque.
Carril 1: DNA pol1; carril 2: DNA pol2.

B. Gel de Isoelectroenfoque Teñido con Azul de Coomasie.
Carril3: DNA pol1 después del último paso de purificación.

Como se observa en la figura 11 A, se alcanzó a detectar la subunidad catalítica de la DNA pol1 en el peso esperado de 70 kDa (carril 1), como también al fragmento Klenow de la DNA polimerasa 1 de *E.coli* (68 kDa) (carril 2) (Lehninger *et al.* 1993) y a la DNA pol2 de maíz (90 kDa)(carril 3) como controles. En el Western blot utilizando anticuerpos de conejo contra la DNA pol2 (fig. 11 B, carriles 4 y 5), se visualizaron tres bandas en el carril correspondiente a la DNA pol2 (carril 5), una que esta alrededor de 90 kDa y las otras dos de 55, y 45 kDa, bandas que ya habían sido reportadas por Coello *et al.* (1994) y que corresponden a la subunidad catalítica (90 kDa) y posiblemente a las subunidades de primasa de la enzima (55 y 45 kDa); por otro lado, se observó que el anticuerpo no reaccionó contra la DNA pol1 de maíz (fig. 11 B, carril 4). En la figura 11 C se observa el patrón electroforético teñido con azul de Coomasie de la DNA pol1 después de este tratamiento, y se puede apreciar una disminución en la cantidad de bandas, comparadas con las que se observaron en la figura 8 A (figura 11 C, carril 6). A través de estos geles se confirmó el peso de las subunidades catalíticas de las DNA polimerasas probadas y además, la eliminación de polipéptidos los cuales se quedan en el gel de isoelectroenfoque (figura 11B). Explorando este tipo de metodologías, sería posible aislar a pureza las bandas con actividad catalítica de las DNA pol1 y 2.

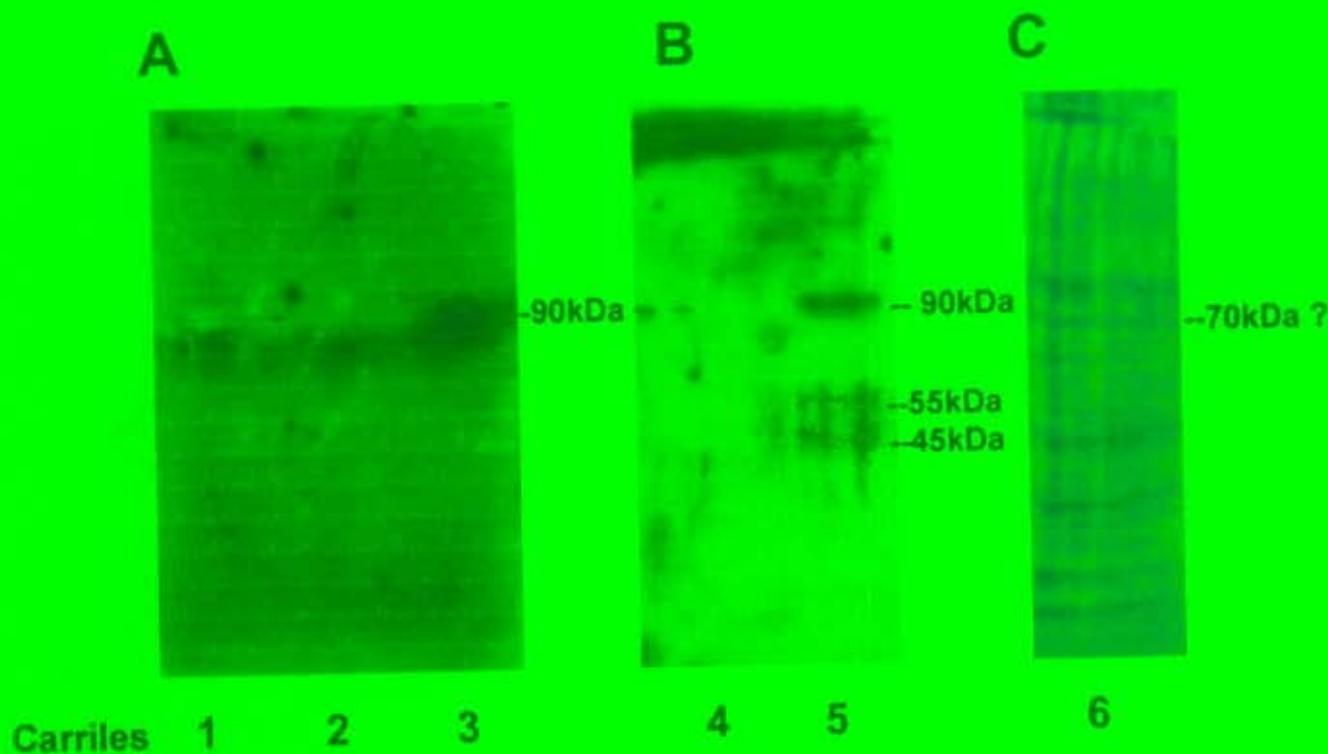


FIGURA 11

GELES DE DOBLE CORRIDA

A. Autorradiografía un Gel de Electroforesis de Doble Corrida
 Carril 1: DNA pol1 de maíz; carril 2: Fragmento Klenow; carril 3: DNA pol2 de maíz.

B. Inmunodetección Usando un Anticuerpo anti-DNA pol2 de Maíz.
 Carril 4: DNA pol1 de maíz; carril 5: DNA pol2 de maíz.

C. Gel de Doble Corrida Teñido con Azul de Coomasie.
 Carril 6: DNA pol1 de maíz.

VII. DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio se han aislado 3 actividades de DNA polimerasas a partir de un extracto crudo de ejes embrionarios de maíz imbibidos por 24 horas, de las cuales la DNA pol2 se ha caracterizado como una DNA polimerasa tipo α (Coello *et al.* 1992, 1994, Coello y Vázquez-Ramos 1995a, 1995b y 1996; García *et al.* 1997) y hasta el momento poco se ha estudiado de la DNA pol1 (García 1990) y a la DNA pol3 (García *et al.* 1997).

Esta tesis reporta los estudios caracterización de la DNA pol1 y los resultados obtenidos se han comparado con los reportados para otras DNA polimerasas eucarióticas y de plantas, y que se resumen en la tabla 13:

TABLA 13

Comparación de Algunas DNA Polimerasas Eucarióticas con Respecto a la DNA pol1 de Maíz

| Características | *DNA pol. δ | ^o DNA pol. A trigo | ^o DNA pol. B trigo | DNA pol1 maiz |
|------------------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Peso de la subun. catalítica (kDa) | 125 | 150 | 120 | 70 |
| Es un Complejos | Si | ND | ND | Si |
| Actividad de exonucleasa 3' - 5' | Si | No | Si | Si |
| Actividad de primasa | No | Si | No | No |
| Preferencia de molde | polidA-oligodT | @polirA-oligodT | @@polidA-oligodT | **polidA-oligodT |
| Estimulación por PCNA | Si | No | Si | Si |
| Inhibidores | | | | |
| N-ETILMALEIMIDA | Inhibe | Inhibe | Inhibe | Inhibe |
| Afidicolina | Inhibe | No inhibe | Inhibe | Inhibe mod. |
| ddTTP | Inhibe mod. | Inhibe | No inhibe | Inhibe mod. |

* Kornberg y Bake 1992; ^o Laquel *et al.* 1993; ** García *et al.* 1997; @ Laquel *et al.* 1990; @@ Richard *et al.* 1991; ND. No determinado

De las DNA polimerasas que participan en la replicación del DNA, la DNA polimerasa δ es la DNA polimerasa de eucariotes que forma el complejo catalítico más pequeño con un tamaño de aproximadamente 180 kDa, que tiene una subunidad catalítica de aproximadamente 125 kDa; además, esta enzima presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' localizada en el polipéptido con actividad polimerizante (125 kDa) y se propone que esta actividad es requerida para la autocorrección; es decir, a pesar de que la enzima presenta una alta fidelidad, al momento de incorporar los desoxinucleótidos la DNA pol δ puede cometer errores los cuales puede corregir inmediatamente a través de

la actividad de exonucleasa 3'-5' (Kunkel *et al.* 1987). No se conoce bien la función de la subunidad que pesa 50 kDa ya que la subunidad catalítica de la DNA pol δ de *S. cerevisiae* es suficiente para interactuar con PCNA (Blow 1996), a diferencia de la subunidad catalítica de la DNA pol δ de *Drosophila melanogaster* (Brown y Campbell 1993), humano (Zhou *et al.* 1997), de *Schizosaccharomyces pombe* (Tratner *et al.* 1997) y la de ratón que requieren a la p50 para interactuar con PCNA (Goulian *et al.* 1990; Chiang *et al.* 1993; Aoyagi *et al.* 1994).

Una de las características que presenta esta enzima es su preferencia por el molde polidA-oligodT. Aparentemente lo anterior es debido a la alta procesividad de la enzima en presencia de PCNA y solamente el polidA-oligodT le puede proporcionar espacios de síntesis más grandes, a diferencia del DNA activado le proporciona espacios reducidos de síntesis.

Una particularidad de la DNA pol δ es que es una enzima distributiva, ya que sintetiza tramos cortos de DNA y que solamente en presencia de PCNA se convierte en una polimerasa altamente procesiva, un rasgo que la hace diferente de la DNA pol ϵ (Blow 1996).

La DNA polimerasa B de trigo es la DNA polimerasa tipo δ de plantas mejor caracterizada hasta la fecha (Laquel *et al.* 1990,1993; Richard *et al.* 1991). Esta enzima presenta todas las características de una DNA polimerasa tipo δ , ya que es distributiva, volviéndose muy procesiva en presencia de PCNA. Además es inhibida por N-etilmaleimida y

afidicolina, e insensible a ddTTP, prefiere al molde polidA-oligodT y presenta una actividad de exonucleasa 3'-5'.

Como se resume en la tabla 13, se han detectado similitudes importantes entre la DNA pol1 de maíz y las DNA polimerasas tipo δ , como son la presencia de una actividad de nucleasa (tabla 11) con dirección 3'-5' (figura 7), similar a la encontrada en las DNA pol δ . Esta actividad de nucleasa no requiere KCl, $MgCl_2$ ó $CaCl_2$ (tabla 11), aunque se estimula a concentraciones de 1.5 mM de $MgCl_2$ o $CaCl_2$.

Reportes anteriores indican que la DNA pol1, en ensayos *in vitro*, utiliza muy eficientemente al polidA-oligodT como templado-cebador, característica común a enzimas altamente procesivas (García *et al.* 1997).

Nuestros datos sugieren que la actividad de la DNA pol1 se estimula con PCNA (tabla12) aunque será necesario realizar ensayos adicionales para establecer este efecto, a través de experimentos para medir su procesividad en presencia de PCNA.

La proteína PCNA interviene en la regulación del ciclo celular formando asociaciones con varias proteínas (Kelman 1997) y para estimular a la DNA polimerasa δ es necesario que forme un homotrímero en forma de anillo alrededor del DNA, en el extremo 3'-OH del cebador. Para el ensamblaje de PCNA al DNA se requiere una proteína llamada RF-C (Factor de Replicación C) que esta compuesta de 5 subunidades, las cuales se encargan de montar a PCNA sobre el molde de DNA en un proceso dependiente de ATP.

La DNA pol1 se inhibe fuertemente por N-etilmaleimida y moderadamente por afidicolina y ddTTP (tabla 10).

De acuerdo a lo anterior la DNA pol1 comparte muchas características con las DNA polimerasas tipo δ , lo que la hace una enzima muy interesante para estudiar, ya que es una enzima que participa en la replicación y reparación del DNA.

La DNA pol1 se comparó con las otras dos DNA polimerasas reportadas en maíz y se lograron observar claras diferencias entre estas tres enzimas, además de las que ya se habían establecido anteriormente. De estas diferencias podemos mencionar que la DNA pol1 se estimula con NaCl, a diferencia de las DNA pol2 y 3 que son inhibidas por NaCl. La DNA pol2 presenta actividad de primasa mientras que la DNA pol1 no. La DNA pol3 es una enzima que es inhibida fuertemente por ddTTP e insensible a N-etilmaleimida y afidicolina a diferencia de las DNA pol1 y 2 que son más resistentes a ddTTP y más sensibles a N-etilmaleimida y afidicolina (García *et al.* 1997).

La DNA pol1 de maíz forma un complejo polipeptídico de alrededor de 450 kDa (figura 9) y difiere de las DNA polimerasas tipo α y δ en que tiene una subunidad catalítica pequeña de 70 kDa (figuras 8 y 11), un tamaño menor al que poseen las subunidades catalíticas de las DNA polimerasas replicativas de eucariotes (Kornberg y Baker 1992). Hasta el momento no se ha identificado una subunidad catalítica de mayor tamaño; por el contrario, hemos encontrado, además de la banda de 70 kDa otras bandas de menor tamaño, que podrían ser productos de degradación de la subunidad catalítica, y que aun conservan esta actividad.

Por otro lado, existen evidencias que indican que la subunidad catalítica de la DNA pol1 forma diversas asociaciones con los polipéptidos que conforman a la enzima nativa (figura 9). Se desconocen que proteínas podrían formar parte de este complejo y sería muy interesante conocer el tipo de actividades asociadas.

La DNA pol2 forma un complejo polipeptídico de mayor tamaño, aproximadamente de 650 kDa, y además se confirmó el tamaño de la subunidad catalítica que es de 90 kDa tamaño que es más pequeño que el que poseen las DNA polimerasas tipo α de eucariotes.

Anteriormente se había realizado un estudio sobre la DNA pol1 de maíz (García E 1992) donde se utilizó un esquema que llevó a purificar a la enzima alrededor de 2000 veces; intentando obtener a homogeneidad a la subunidad catalítica. En este trabajo se modificó el esquema de purificación y la enzima se pudo purificar más de 5000 veces (ver esquema de purificación; García *et al.* 1997), proporcionándonos una enzima con una mayor estabilidad para su estudio.

Acoplado el uso de los geles de *doble corrida* (figura 11) al esquema de purificación utilizado en esta tesis, se logró la eliminación de un número de bandas que copurificaban con la banda de actividad catalítica. De esta manera, es posible proponer que con ensayos adicionales se podrían aislar bandas con actividad de DNA polimerasas 1 y 2 de maíz.

Si se lograra aislar la banda con actividad catalítica, sería posible cortar la banda del gel para microsecuenciar el extremo amino y de esta manera rastrear el gen de la subunidad catalítica, conocer que factores transcripcionales pudieran estimular la expresión de esta

proteína, etc. Por otro lado, con la obtención de la subunidad catalítica se podrían obtener anticuerpos dirigidos contra este polipéptido y así realizar ensayos de inmunoprecipitación que proporcionarán datos sobre su regulación postraducciona, implicando a esta enzima como un marcador bioquímico de la germinación o de proliferación celular. Y por último, también se podría montar un esquema de purificación de la subunidad catalítica y proteínas asociadas, más rápido y eficiente utilizando resinas de afinidad utilizando el anticuerpo. Así, se podría montar un sistema de replicación del DNA de plantas *in vitro*, utilizando las enzimas de maíz.

VIII. CONCLUSIONES

Se lograron establecer algunas condiciones óptimas del ensayo de síntesis de DNA *in vitro* para la DNA pol1 de maíz tales como una concentración de MgCl₂ entre 5 y 8 mM, o una concentración de MnCl₂ de 1-4 mM. No requiere KCl; y que es estimulada por una fuerza iónica de 50-100 mM de NaCl.

La DNA pol1 de maíz es inhibida por N-ETILMALEIMIDA (83%), y en menor grado por afidicolina (48%) y ddTTP (49%).

Una actividad de exonucleasa 3'-5' copurifica con la DNA pol1 de maíz.

La actividad de la DNA pol1 de maíz se estimula por PCNA.

La holoenzima tiene un tamaño molecular de aproximadamente 450 kDa con una subunidad catalítica de alrededor de 70 kDa; esta subunidad catalítica parece formar diversas conformaciones con otros polipéptidos que componen a la DNA pol1.

A través del uso de geles de doble corrida se puede facilitar el aislamiento de la subunidad catalítica, con el fin de obtener un conocimiento más profundo de esta proteína.

Los datos obtenidos en este trabajo y los reportados anteriormente para la DNA pol1 de maíz, sugieren fuertemente que se trata de una DNA polimerasa tipo δ de plantas.

BIBLIOGRAFIA

Aoyagi N., Matsuoka S., Furunobu A., Matsukage A. and Sukaguchi K. 1994. *Drosophila* DNA polymerase delta. Purification and characterization. **J. Biol. Chem.** 269, 6045.

Baiza A. M., Vázquez-Ramos J. M. and Sánchez de Jiménez E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. **J. Plant Physiol.** 135, 416-412.

Balmukhanov T, Erekenov A M and Ajtkhozhina N A. 1992. Isolation of DNA polymerasa alpha from germinated wheat embryos. **Mol. Biol. Reports.** 16, 11-16.

Bewley, J.D., and Black, M. "PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF SEEDS. IN RELATION TO GERMINATION" Vol. 1 GERMANY. 106-131 pp. 1978

Biswas Esther E., Fan Xiu Zhu and Subhasis B. Biswas. 1997. Stimulation of RTH1 Nuclease of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Replication Protein A. **Biochemistry.** 36, 5955-5962.

Blow J. Julian. 1996. EUKARYOTIC DNA REPLICATION. IRL PRES. Oxford University Press.

Bollum F.J. 1960. Calf Thymus Polymerase. **J. Biol. Chem.** 235. 2399-2404.

Bradford M. M. 1976.. A refined and sensitive method for the quantitation of microgramos quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 22, 248.

Brown, W. C: and Campbell, J. L. 1993. Interaction of proliferating cell nuclear antigen with yeast DNA polymerase delta from mouse cells. **J. Biol. Chem.** 268, 21 706.

Burgers P, Bambara R A, Campbell J, Chang L, Downey K, Hübscher U, Lee M, Linn S, So A G and Spadari S. 1990. Revised nomenclature for eukaryotic DNA polymerases. **Eur. J. Biochem.** 191, 617-618.

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 delta. *Biochemistry*. 15, 2817-2822.

Bryant J A, Jenns S M and Francis D. 1981. DNA polymerase activity and DNA synthesis in root of pea (*Pisum sativum* L.). *Phytochemistry*. 20, 13-15.

Bryant J M. 1982. DNA replication and cell cycle. In: B. Parthier and D Boutier (Eds). The Encyclopedia of Plant Physiology. 14B, Springer, Heidelberg, pp 75-110.

Bryant J A, Fitchett P N, Hughes S G and Sibson D R. 1992. DNA polymerase α in pea is part of a large multiprotein complex. *J. Exp. Bot.* 43, 31-40.

Camacho Villasana Yolanda M. 1996. Utilización diferencial de moldes de DNA por las DNA polimerasas 1, 2 y 3 de maíz. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias.

Campbell J L. 1993. Yeast DNA replication. *J. Biol. Chem.* 268, 25261-25264.

Castroviejo M, Tarrago-Litvak L and Litvak S. 1975. Partial purification and characterization of two cytoplasmic DNA polymerases from ungerminated wheat. *Nucleic Acids Res.* 2, 2077-2090.

Castroviejo M, Tharaud D, Tarrago-Litvak L and Litvak S. 1979. Multiple DNA polymerases from quiescent wheat embryos. Purification and characterization of three enzymes from the soluble cytoplasmic and one from purified mitochondria. *Biochem. J.* 181, 183-191.

Castroviejo Michel, Marie-Thérèse Gatius and Simon Litvak. 1990. "A Low Weight DNA Polymerase from Wheat Embryos" *Plant Molecular Biology*. 15: 383-397.

Cheah K S E and Osborne D J. 1979. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seeds. *Nature* (London) 272, 593-599.

Chen D and Osborne D J. 1970. Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. *Nature* (London) 226, 1157-1160.

Chiang, C. S., Mitsis, P. G. And Lehman, I. R. 1993. DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9105.

Chiu R W and Baryl E F. 1975. Nuclear DNA polymerases and the Hela cell cycle. *J. Biol. Chem.* 7951-7957.

Coello Patricia, Rogelio Rodríguez, Elpidio García and Jorge M. Vázquez-Ramos. 1992. A DNA polymerase from maize axes: its purification and possible role" *Plant Molecular Biology* 20: 1159-1168.

Coello- Coutiño Patricia, García Ramírez Elpidio y Jorge Vázquez Ramos. "Preparation of an Antibody Against a Maíz DNA Polymerase Holoenzyme: Identification of the Catalytic Subunit". *Can. J. Botany* 72: 818-822. 1994.

Coello P and Vázquez-Ramos J M. 1995a. Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem.* 321, 99-103.

Coello Patricia and Jorge M. Vázquez-Ramos. 1995b. Studies on the processivity of maize dna polymerase 2, an α -type enzyme. *Plant Physiology*. 109, 645-650.

Coello P and Vázquez-Ramos J M. 1996. Maize DNA polymerase 2 (an α -type enzyme) suffers major damage after seed deterioration. *Seed Science Reserch*. 6, 1-7.

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

Downey K M, Tan C K and So A. 1990. DNA polymerase δ : A second eukaryotic DNA replicase. *BioEssays*. 12, 231-236.

Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E. 1992. Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J.* 11, 769-776.

Eki T, Murakami Y, Enomoto T, Hanaoka F and Yamada M. 1986. Characterization of DNA replication at a restrictive temperature in a mouse DNA temperature sensitive mutant ts FT20 strain, containing heat-labile DNA polymerase alpha activity. *J. Biol. Chem.* 261, 8888-8894.

Evert R.F. and Eichhorn S.E. 1992. *Biology of Plants*. Fifth edition. Worth Publishers. USA. pp 693.

Foiani Marco, Giovanna Lucchini and Paolo Plevani. 1997. The DNA Polymerase α -Primase Complex Couples DNA Replication, Cell-Cycle Progression and DNA-Damage Response. *TIBS* 22: 424-427.

García Ramírez. Purificación parcial de una DNA polimerasa de ejes embrionarios de maíz presente a las 24 horas de germinación. Tesis de licenciatura. 1992. Facultad de Química.

García-Ramírez, Elpidio; Orjuela-Henry, Dairo; Camacho-Villasana, Yolanda; Zúñiga-Aguilar, José Juan; Plasencia, Javier and Vázquez-Ramos, Jorge. "Comparison among dna polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. a dna primase copurifies with dna polymerase 2", *Plant Molecular Biology*, 33: 445-455, 1997.

Georgieva E I, López-Rodas G, Hittmair A, Feichtinger H, Brosch G and Loidl P. 1994. Maize embryo germination. I cell cycle analysis. *Planta*. 192, 118-124.

Goulian, M., Herrmann, S. M., Sackett, J. W. and Grimm, S. L. 1990. Two forms of DNA polymerase delta from mouse cells. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 265, 16 402.

Hockensmith J W and Bambara R A. 1981. Kinetic Characteristics which distinguish two forms of calf thymus. *Biochemistry*. 20,227-232.

Hohn K.-T and Grosse F. 1987. Processivity of the DNA polymerase α -primase complex from calf thymus. *Biochemistry*. 26, 2870-2878.

Huberman J A. 1981. New views of the biochemistry of eukaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase α . *Cell*. 23, 647-648.

Hutchison Christopher and David M. Glover. 1995. Cell Cycle Control. Oxford University Press, pp. 65, 85 y 86.

Kaczmarek L, Miller M R, Hammond R A and Mercer E. 1986. A microinjected monoclonal antibody against human DNA polymerase α inhibits DNA replication in human, hamster and mouse cell lines. *J. Biol. Chem.* 261, 10802-10807.

Karawya Essam, Judith A. Swak and Samuel H. Wilson. 1983. Improved Conditions for Activity Gel Analysis of DNA Polymerase Catalytic Polypeptides. *Analytical Biochemistry* 135: 318-325.

Kelman Zvi. 1997. PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629-640.

Kornberg, A., Baker, J. "DNA REPLICATION" W.H. FREEMAN AND COMPANY. 931 pp. 1992

Kunkel T A, Ralph D S and Bambara R A. 1987. Exonucleolytic proofreading by calf thymus DNA polymerase δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84, 4865-4869.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.

Laquel P, Sallafranque-Ancheola M, Tarrago-Litvak L, Castroviejo M and Litvak S. 1990. Wheat embryo DNA polymerase A reverse transcribes natural and synthetic RNA templates. Biochemical characterization and comparison with animal DNA polymerase γ and retroviral reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Acta*. 1048, 139-148.

Laquel, P.; Litvak, S. and Castroviejo, M. 1993. "Mammalian Proliferating Cell Nuclear Antigen Stimulates the Processivity of Two Wheat Embryo DNA Polymerases". *Plant Physiology*. 102, 107-114.

Lee M, Jiang Y, Zhang S M and Toomey N L. 1991. Characterization of human DNA polymerase δ and its immunochemical relationship with DNA polymerase α and ϵ . *J. Biol. Chem.* 266, 2423-2429.

Lehninger A L, Nelson D L and Cox M M. 1993. Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publisher.

Litvak S and Castroviejo M. 1987. DNA polymerases from plant cells. *Mut. Res.* 181, 81-91.

Longhese M.P., Plevani P. and Lucchini G. 1994. Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7884-7890.

Mangelsdorf P.C. 1974. Corn. Its origin, evolution and improvement. The Belknap Press of Harvard University Press. 2nd edition. USA. pp 262.

Maniatis T, Sambrook and Fritsch E F. 1989. Molecular Cloning: A laboratoru manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Maurides P.A., Akkaraju G.R. and Jagus R. (1989) Evaluation of Protein Phosphorylation state by a combination of vertical slab gel isoelectric focusing and immunoblotting, *Anal Biochem.* 183, 144-151.

Melendy T and Stillman B. 1991. Purification of DNA polymerase α as an essential simian virus 40 DNA replication factor. *J. Biol. Chem.* 266, 1942- 1949.

Miller M R, Ulrich R G, Wang T and Korn D. 1985. Monoclonal antibodies againts human DNA polymerase α -inhibit DNA replication in permeabilized human cells. *J Biol. Chem.* 260, 134-138.

Morrison A, Araki H, Clark A B, Hamatake R K and Sugino A. 1990. A third essential DNA polymerase in *S.cereviciae*. *Cell.* 62, 1143-1148.

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

Nishida C, Reinhard P and Linn S. 1988. DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* 263,501-510.

Ortega R. 1988. Localización del AND Sintetizado Durante las Primeras Horas de Germinación. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias, UNAM.

Osborne D J, Sharon R and Ben-Ishai R. 1980/81. Studies on DNA integrity and DNA repair in germination embryos of rye (*Secale cereale*). *Israel J. Bot.* 29, 259-272.

Osborne D J, Dell'Aquila A and Elder R H. 1984. DNA repair in plant cells. An essential event of early embryo germination in seeds. *Folia Biológica. Proc. FEBS Symposium DNA Spe.* Publ. 155-169.

Pisa-Willianson D. AND Fuller C.W. 1992. *Comments* 19 No 2, pp 1 y 7, United States Biochemical Corp., Cleveland OH.

Raven P H, Evert R F and Eichhorn S E. 1992. Biology of plants. Fifth edition. Worth Publishers. USA. pp 693.

Reyes J, Jiménez-García L F, González M A and Vázquez-Ramos J M. 1991. Benzyladenine- stimulation of nuclear synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci. Res.* 1, 113-117.

Richard M C, Litvak S and Castroviejo M. 1991. DNA polymerase B from wheat embryos: A plant δ -like DNA polymerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 287, 141-150.

Robles S.R. (1976) Producción de Granos y Forrajes. Editorial Limusa, México. pp 784.

Sedwick W. David, Teresa Shu-Fong Wang and David Korn. 1972. Purification and Properties of Nuclear and Cytoplasmic DNA Polymerases from Human KB Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 247, No. 16, pp 5026-5033.

So A G and Downey K M. 1992. Eukarotic DNA replication. *Crit. Rev. Biochem and Mol. Biol.* 27, 129-155.

Spadari S F, Sala F and Pedrali-Noy G. 1982. Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotic. *Trends Biochem. Sci.* 7, 29-32.

Spanos, A., Sedwick, S., Yarranton, G., Hübscher, U., and Banks, G. 1981. Detection of the catalytic activities of DNA polymerases and their associated exonucleases following SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *NUCLEIC ACIDS RES.* 9, 1825-1839.

Stillman B. 1994. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell.* 9 78:5 725-8.

Stillman B. 1994. Initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes. Lessons from lambda. *J Biol Chem.* Mar 11 269:10 7047-50.

Street, H. E., and Opik, H. 1984. "THE PHYSIOLOGY OF THE FLOWERING PLANTS. THEIR GROWTH AND DEVELOPMENT" 3a edición. CONTEMPORARY BIOLOGY. U.K. 4-25 pp.

Sugino Akio 1995. Yeast DNA Polymerases and their Role at the Replication Fork, *TIBS* 20: 319-323.

Syvöoja J E. 1990. DNA polymerase epsilon: the latest member in the family of mammalian DNA polymerases. *BioEssays.* 12, 533-536.

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

Tan C K, Castillo C, So A G and Downey K M. 1986. An auxiliary protein for DNA polymerase delta from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 261, 12310-12316

Tarrago-Litvak L, Castroviejo M, Litvak S. 1975. Studies on a DNA polymerase γ -like enzyme from wheat embryos. *FEBS Lett* 59, 125-130.

Tratner Isabelle, Karine Piard, Muriel Grenon, Mylène Perderiset and Giuseppe Baldacci. 1997. PCNA and DNA polymerase δ catalytic subunit from *Schizoccharomyces pombe* do not interact directly. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 231, No. 2, 321-328.

Vázquez A. and Vázquez-Ramos J. 1987. Characteristics of the major dna polymerase found during early and late maize germination **Can. J. Bot.** 66: 1186-1191.

Vázquez Ramos J.M. y López S. 1986. Inhibición *In vitro* de la Síntesis de DNA Durante la Germinación Temprana de Embriones de Maíz por Novobiocina y ara-CTP. **Rev. Soc. Quim. Méx.** 30, pp. 119-123.

Vázquez-Ramos J M. 1992. Maize germination, DNA metabolism and cytokinins. Proc. Of the Fuorth International Workshop on seeds. 2, 317-322.

Vázquez-Ramos J M and Osborne D. 1986. Analysis of the DNA synthesised during early germination of rye embrions using BND-cellulose chromatography. **Mut. Res.** 166, 39-47.

Villani G, Fay P J, Bambara RA, Lehman I R. 1981. Elongation of RNA-primed DNA templates by DNA polymerase alpha from *Drosophila melanogaster* embryos. **J Biol Chem.** 256,15 8202-7.

Vladimir N. Podust and Ellen Fanning. 1997. Assembly of functional replication factor C expressed using recombinant baculoviruses. **The Journal of Biological Chemistry.** 272, 10: 6303-6310.

Voitenleitner C., E. Fanning, H-P Nasheuer. 1997. Phosphorilation of DNA polymerase α -primase by Ciclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication *in vitro*. **Oncogene.** 14, 1611-1615.

Walh A F, Geis A M, Spain B H, Wong S W, Korn D and Wong T S-F. 1988. Gene expression of human DNA polymerase alpha during cell proliferation and cell cycle. **Mol. Cell. Biol.** 8, 5016-5022.

- Wang T.S.F. 1996. DNA replication in eukaryotic cells. DePanphilis M.L., pp 461, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Weinberg D L, Collins K L, Simancek P, Russo A, Wold M S, Virship D M and Kelly T S. 1990. Reconstitution of SV40 DNA replication with purified enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8692-8704.
- Wei C, Alianell G. & Gray H. 1983. Isolation and comparison of two molecular species of the BAL 31 nuclease from *Alteromonas espejiana* with distinct kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 258: 13506-13512.
- Wong S W, Wahl A F, Yuan P M, Arai N, Pearson B E, Arai K, Korn D, Hunkapillar M W and Wang S T F. 1988. Human DNA polymerase gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J.* 7, 37-47.
- Wood D Richard and Mahmud K K Shivji. 1997. Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes?. *Carcinogenesis.* 18, 4: 605-610.
- Yadav S P. 1976. Rhythmic increase in DNA content and incorporation of [³H] thymidine in the developing wheat embryo during seed germination. *Planta.* 129, 87-89.
- Zarain M, Bernal-Lugo I and Vázquez-Ramos J M. 1987. Effect of benzyl adenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mut. Res.* 181, 103-110.
- Zhou Jin-Qiu, Hua He, Cheng-Keat Tan, Kathleen M. Downey and Antero G. So. 1997. The small subunit is required for functional interaction of DNA polymerase δ with the proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Reserch*, vol. 25, No. 6. 1094-1099.
- Zhu Fan Xiu, Esther E. Biswas and Subhasis B. Biswas. 1997. Purification and Characterization of the DNA Polymerase α Associated Exonuclease: The RTH1 Gene Product. *Biochemistry*, 36, 5947-5954.
- Zlatanova S, Ivanov P V, Stoilov L M, Chishirova K V and Stanchev B S. 1987. DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Mol. Biol.* 10, 139-144.

Zuo Shaojun, Emma Gibbs, Zvi Kelman, Terese S.-F. Wang, Mike O'Donnell, Stuart A. MacNeill and Jerard Hurwitz. 1997. DNA polymerase δ isolated from *Schizosaccharomyces pombe* contains five subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 11244-11249.