

00562

3

20/10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"IDENTIFICACION DE LAS DNA POLIMERASAS NUCLEARES PRESENTES EN EJES
EMBRIONARIOS DE MAIZ DURANTE LAS PRIMERAS HORAS DE LA GERMINACION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A

SAMUEL GUILLERMO MELENDEZ LOPEZ

MEXICO, D.F.

1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

	página
INTRODUCCION.	1
La semilla.	1
Germinación.	2
EVENTOS BIOQUIMICOS QUE SE PRESENTAN DURANTE LA GERMINACIÓN.	4
Respiración.	4
Síntesis de ATP durante la germinación.	7
Síntesis de proteínas y de RNA durante la germinación.	8
Síntesis de DNA durante la germinación.	10
A) DNA polimerasas DNA-dependientes.	12
.-Aspectos generales.	12
.-DNA polimerasas α y δ .	13
.-DNA polimerasa β .	16
.-DNA polimerasa tipo γ .	18
B) DNA polimerasas de plantas superiores.	19
.-DNA polimerasa tipo α .	19
.-DNA polimerasa tipo β .	20
.-DNA polimerasa tipo γ .	21
.-DNA polimerasas de cloroplastos y mitocondrias.	21
II.- ANTECEDENTES FUNDAMENTALES DEL PRESENTE TRABAJO.	22
III.- HIPÓTESIS.	25
IV.- OBJETIVOS.	26
V.- MATERIALES Y METODOS.	27

1.-Material biológico.	27
2.-Reactivos y soluciones amortiguadoras.	27
A) Solución amortiguadora para la imbibición de ejes embrionarios.	27
B) Solución amortiguadora No. 1.	27
C) Solución amortiguadora No. 2.	28
D) Soluciones amortiguadoras empleadas en la cromatografía en DEAE-celulosa.	28
E) Líquido de centelleo.	29
F) Solución amortiguadora para la activación del DNA.	29
G) Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa.	29
H) Reactivos requeridos para determinar proteínas totales por el método de Lowry. (Peterson, 1977).	30
I) Preparación de bolsas de diálisis.	31
J) Preparación de la dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa).	32
MÉTODOS.	33
A) Imbibición de los ejes embrionarios.	33
B) Extracción de núcleos de ejes embrionarios de maíz germinados y no germinados y obtención del extracto nuclear.	33
C) Preparación del DNA activado.	34
D) Determinación de la actividad de la DNA polimerasa.	34
E) Efecto de inhibidores.	35

F) Determinación de la concentración de proteínas.	35
G) Purificación del extracto nuclear dializado en una columna de DEAE-celulosa.	37
H) Irradiación de ejes embrionarios secos.	37
I) Preparación del molde sintético.	38
VI) RESULTADOS.	40
A) Afinación de la metodología para aislar núcleos.	40
B) REVISIÓN DE CUADROS Y FIGURAS.	41
VII) DISCUSIÓN.	52
CONCLUSIONES.	59
REFERENCIAS.	61

ABREVIATURAS

A : Adenina.

ADP : Difosfato de adenosina.

ara-CTP : arabinosil citidina 5'-trifosfato.

ASB : Albúmina de suero bovino.

ATP : Trifosfato de adenosina.

C : Citosina.

CO₂ : Dióxido de carbono.

CTC : Cobre tartrato carbonato.

dATP : Desoxiadenosina 5'-trifosfato.

dCTP : Desoxicitidina 5'-trifosfato.

dGTP : Desoxiguanosina 5'-trifosfato.

DEAE-celulosa : Dietilaminoetil-celulosa.

DMSO : Dimetilsulfóxido.

DNA : Ácido desoxirribonucleico.

DOC : Desoxicolato de sodio.

EDTA : Ácido etilendiaminotetracético.

G : Guanina.

metil-³H-TTP : Timidina 5'-trifosfato tritiada en el grupo metilo.

NAD⁺ : Nicotín Adenín Dinucleótido oxidado.

NADH : Nicotín Adenín Dinucleótido reducido.

NEM : N-etilmaleimida.

Oligo-dT : Oligodesoxitimidina.

PMSF : Fluoruro de fenil metil sulfonilo.

Pi : Ortofosfato.

PM : Peso molecular.

Poli rA : polirriboadenilato.

POPOP : 2,2'-p-fenilbis(fenoxazol).

PP0 : 2,5'-difenoxazol.

RNA : Ácido desoxirribonucleico.

RNAm : RNA mensajero.

RNAr : RNA ribosomal.

SDS : Dodecil Sulfato de Sodio.

T : timina.

TCA : Ácido tricloroacético.

Tris base : Tris (hidroximetil aminometano).

TTP : timidina 5'-trifosfato.

I.-INTRODUCCION

Las monocotiledóneas son plantas de vital importancia en la alimentación de la humanidad. De éstas, las gramíneas que incluyen a los cereales, constituyen quizá las fuentes de alimento más grandes e importantes del mundo.

Un buen ejemplo de este tipo de plantas es el maíz (Zea mays L), que en nuestro país es el cereal de mayor consumo. Por ello, es fundamental conocer a fondo los mecanismos bioquímicos que actúan durante la germinación del maíz y que permiten el establecimiento de la plántula. El conocimiento profundo de este proceso permitirá diseñar estrategias para aumentar la productividad de este cultivo.

LA SEMILLA.-La semilla se deriva del óvulo fertilizado. Cuando madura es la forma mediante la cual el nuevo individuo se dispersa. La semilla ocupa una posición crítica en la vida de las plantas superiores. El establecimiento con éxito del nuevo individuo depende en gran medida de las características fisiológicas y bioquímicas de la semilla. El cultivo de la mayoría de las especies de importancia para el hombre depende de la germinación de semillas. Más aún, las semillas tales como las de cereales y leguminosas son ellas mismas fuentes enormes de alimento, cuya importancia reside en las reservas de proteínas, almidón y aceite que se acumularon durante su desarrollo y la maduración (Bewley y Black, 1986; Murray, D.R, 1984).

En casi todos los casos, las siguientes estructuras pueden ser

reconocidas, durante el desarrollo del óvulo fertilizado:

(1) La testa -producto de uno o ambos integumentos del óvulo; (2) el perispermo - (derivado de la nucela); (3) El endospermo - producido como resultado de la fusión entre un núcleo generativo masculino y los dos núcleos polares para formar el núcleo triploide del endospermo; (4) El embrión -que es el resultado de la fertilización de la oosfera (el óvulo) por el núcleo masculino. El embrión consiste del eje embrionario y uno o más cotiledones. El eje embrionario consiste del hipocotilo al cual están unidos los cotiledones, la radícula y la plúmula (el ápice del tallo con la primera o primeras hojas verdaderas) (Bewley y Black, 1978).

GERMINACION.

En la literatura científica el término germinación se usa frecuentemente con descuido y algunas veces incorrectamente y por tanto es importante aclarar su significado. La germinación comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y termina con el comienzo de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Por tanto incluye numerosos eventos, v. gr. hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular; ninguno de estos es exclusivo de la germinación. Pero su efecto combinado es transformar un embrión en reposo y deshidratado con un metabolismo apenas detectable a uno que posee un metabolismo vigoroso que culmina con el crecimiento. La germinación en sentido estricto, por tanto, no incluye el crecimiento de la plántula, el cual comienza cuando la germinación ha terminado (Bewley y Black, 1986; Murray, D.R. ed., 1984).

Desde el punto de vista bioquímico, la germinación podría definirse como la serie de eventos moleculares que anteceden a la primera división celular (Osborne, 1983).

Para que una semilla pueda llevar a efecto el proceso de germinación, deberá colocarse en condiciones favorables. Las condiciones medioambientales de mayor importancia que se requieren para que este proceso se lleve a efecto son: un aporte suficiente de agua, temperatura y mezcla de gases apropiadas y, para algunas semillas, la presencia de luz (Vázquez Ramos, A., 1986).

El período inicial de absorción de agua, denominado imbibición, se presenta como una hidratación de las paredes celulares y de los coloides citoplasmáticos. La cantidad de agua absorbida por la semilla depende de factores propios y del medio ambiente (Bewley y Black, 1978).

Los requerimientos de energía de la semilla generalmente son proporcionados por los procesos de oxidación en presencia de oxígeno, lo cual involucra el intercambio gaseoso, esto es, salida de bióxido de carbono y entrada de oxígeno. La composición de los gases que rodean a la semilla puede afectar a la germinación (Bewley y Black, 1986).

La temperatura óptima para el desarrollo del embrión varía de acuerdo con la especie y las condiciones ambientales. Para cada especie, existe una temperatura máxima y una mínima, por arriba o debajo de la cual la germinación no se lleva a efecto (Bewley y Black, 1978).

EVENTOS BIOQUÍMICOS QUE SE PRESENTAN DURANTE LA GERMINACION DE SEMILLAS.

Los eventos bioquímicos más ampliamente estudiados durante la germinación han sido: la respiración, la actividad enzimática y organelar, la síntesis de RNA y proteínas y en menor medida la síntesis de DNA (Osborne, 1983).

La respiración o consumo de oxígeno.- El consumo de oxígeno por muchas semillas sigue las fases que a continuación se detallan:

FASE I.- Se presenta inicialmente un marcado incremento en el consumo de oxígeno que puede ser atribuido en parte a la activación e hidratación de enzimas mitocondriales involucradas en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. La respiración durante esta fase se incrementa linealmente conforme avanza el grado de hidratación del tejido.

FASE II.- Se caracteriza por una fase lag en el fenómeno de la respiración, reflejado por la estabilización o aumento muy lento en la toma de oxígeno. Se ha completado la hidratación de todas las partes de la semilla y todas las enzimas preexistentes se han activado. Aparentemente existe un incremento muy pequeño en los niveles de las enzimas respiratorias o en el número de mitocondrias durante esta fase. Esta fase lag en algunas semillas se debe, en parte, a que las cubiertas u otras estructuras limitan la toma de oxígeno al embrión embebido o a los tejidos de reserva, trayendo esto como consecuencia el establecimiento temporal de condiciones anaeróbicas. Otra posible causa de esta fase lag es que la activación de la vía glucolítica durante la germinación es más rápida que el ensamblaje de las mitocondrias. Esto puede

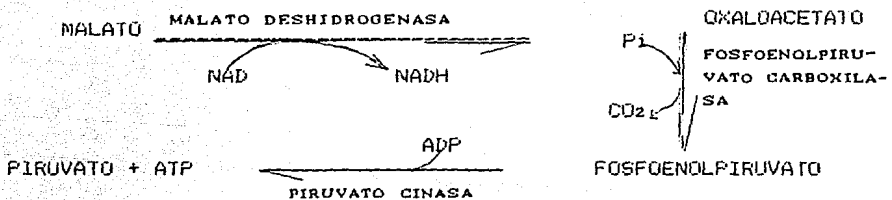
llevar a la acumulación de piruvato debido a deficiencias en el ciclo de Krebs o en la fosforilación oxidativa (cadena de transporte de electrones); por ello, algo del piruvato sería desviado hacia una ruta fermentativa, que no requiere de oxígeno (Murray, 1984; Bewley y Black, 1986).

Entre las fases II y III de la respiración es cuando en el embrión la radícula penetra las estructuras circundantes: la germinación se ha completado (Bewley y Black, 1986).

DESARROLLO MITOCONDRIAL Y FOSFORILACION OXIDATIVA.

Sitio de la producción de ATP durante la imbibición temprana.

La producción enzimática de ATP en el citosol durante las etapas tempranas de la imbibición se ha propuesto como una alternativa de la fosforilación oxidativa. El proceso biosintético propuesto, que no requiere oxígeno, involucra por lo menos los pasos siguientes:



Quizá no sea necesario invocar otro mecanismo de síntesis de ATP, diferente a la fosforilación oxidativa que utiliza la vía de los citocromos dentro de la mitocondria. La respiración a estos tiempos es sensible a cianuro. Existen cada vez más evidencias que esta ruta opera inmediatamente después del comienzo de la imbibición para producir ATP (Bewley y Black, 1978, 1986).

Las mitocondrias en embriones no embebidos y en tejido de

almacenamiento están poco diferenciadas internamente. Como es de esperarse, exhiben deficiencias en su capacidad para utilizar el poder reductor de la NADH y succinato deshidrogenasas. Generalmente, las mitocondrias extraídas de semillas secas pueden oxidar el succinato y el NADH que se les provee. Así, las rutas de transporte de electrones entre succinato y ubiquinona y entre el NADH exógeno y la ubiquinona, están presentes y se activan inmediatamente después de la hidratación. Aunque estas vías tienen inicialmente una actividad baja, cada vez ésta va siendo más prominente conforme avanza el tiempo de imbibición. En contraste, las mitocondrias de semillas recién embebidas oxidan al malato y al α -cetoglutarato en muy baja proporción, y el desarrollo de la capacidad de oxidación usando NADH ocurre mucho más despacio durante la germinación. Además, durante las fases iniciales de la germinación, las mitocondrias pueden no responder en forma evidente a la adición de ADP cuando se usan malato y α -cetoglutarato como sustratos, y la transición del estado 3 al 4 de la respiración no ocurre (Nakayama et al., 1981).

Una característica general de la oxidación mitocondrial en semillas es que se incrementa con el tiempo de imbibición. Esto puede deberse a la eficiencia incrementada de las mitocondrias existentes y/o al incremento en el número de mitocondrias (Moreland et al., 1974).

Es ahora evidente que existen dos patrones diferentes de desarrollo mitocondrial en semillas embebidas: (1) Reparación y activación de orgánulos ya presentes dentro de la semilla seca (ejemplificado por el cotiledón de chícharo) y (2) biogénesis de nuevas mitocondrias (ejemplificado por el cotiledón de

cacahuates) (Bewley y Black, 1986).

SINTESIS DE ATP DURANTE LA GERMINACION. -

La síntesis de ATP durante la germinación ha sido estudiada en solo unas cuantas especies, pero el mismo patrón general siempre emerge. El nivel de ATP en semillas secas es extremadamente bajo comparado con los niveles de otros nucleótidos de adenina (ADP y AMP), pero después de la hidratación se incrementa muy rápido. Durante la fase lag de consumo de oxígeno los niveles de ATP permanecen relativamente constantes; un aumento posterior en los niveles de ATP ocurre después de la germinación (Obendorf y Marcus, 1974). El aumento de ATP en la semilla está acompañado por un aumento en la poza total de nucleótidos de adenina, que sugiere un requerimiento temprano para su síntesis de novo. La poza de ATP durante la fase lag no es estática ya que si la síntesis de ATP es inhibida, y. gr. al colocar las semillas en una atmósfera de nitrógeno para impedir la oxidación final en la mitocondria, la poza de ATP se utilizará rápidamente, y sus niveles disminuyen. La poza de ATP retorna rápidamente a los niveles control después de la reintroducción de las semillas a una atmósfera de oxígeno. Así, durante la fase lag, aunque no existe un incremento neto en la cantidad de ATP, el grado de su síntesis está balanceado exactamente con el grado de su utilización. La carga energética (debida a adenilato) aumenta rápidamente en semillas embebidas, y conforme el agua penetra la síntesis de ATP es activada. Este incremento es impedido por cianuro (un inhibidor de la oxidación terminal). Esta observación apoya la hipótesis de que la síntesis de ATP a tiempos tempranos después de la imbibición es producto de

la actividad de la citocromo oxidasa, v. gr., el ATP producido es consecuencia de la fosforilación oxidativa (Hourmant y Pradet, 1981). El incremento en el nivel de ATP y por tanto, de la carga energética permite que dentro de las células se favorezcan las reacciones biosintéticas (Bewley y Black, 1986).

SINTESIS DE PROTEINAS Y DE RNA DURANTE LA GERMINACION.

La síntesis de proteínas es esencial para que la germinación pueda ser completada y para que la radícula emerja. Su inicio después de la imbibición es, en gran medida, independiente de una síntesis previa de DNA; no obstante, antes de que la germinación haya terminado, es muy probable que se requiera RNA nuevo para síntesis de proteínas (de novo). Por otro lado, la síntesis duplicativa de DNA es parte integral del crecimiento del eje embrionario (Murray, 1984).

La síntesis de proteínas no ocurre en la semilla seca, da inicio cuando las células están suficientemente hidratadas para permitir que los ribosomas se asocien con el mRNA (Sen et al., 1975).

Se ha demostrado que en embriones secos de trigo existe la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas (Marcus et al., 1970; Iarrago et al., 1970) y que ésta se inicia en los primeros minutos después de la imbibición (Osborne, 1982).

Asimismo, se ha observado que los polisomas no están presentes en las semillas secas y que, durante la imbibición la formación de estos está correlacionada con la disminución del número de

ribosomas libres (Marcus y Feeley, 1964). Existe una controversia en relación a si la síntesis de proteínas que se lleva a efecto en la semilla recién embebida es o no precedida por una síntesis de RNA, en particular de mRNA. Duré y Waters en 1965 y Klein et al., en 1971 demostraron que la síntesis de proteínas en esa etapa de la germinación estaba guiada por mRNA previamente sintetizado, es decir, mRNA sintetizado y utilizado durante la embriogénesis y almacenado en el momento de la formación de la semilla.

Existen otros estudios que sustentan la idea precedente. Chen et al., en 1968, mostraron que existe un nivel muy bajo de síntesis de mRNA (transcripción) al iniciarse la germinación en ejes embrionarios aislados. Asimismo, la observación de que la formación temprana de polirribosomas no es afectada por cordicepina y α -amanitina, inhibidores ambos muy efectivos de la síntesis de mRNA, era evidencia clara de que la transcripción no es un proceso necesario para la síntesis temprana de proteínas, y que al inicio de la germinación este proceso funciona principalmente con mRNA almacenado (Brooker et al., 1977). No obstante, existen reportes que muestran la existencia de síntesis temprana de RNA en la germinación.

En 1979, Cheung y cols. contribuyeron con evidencias que indican que en embriones de trigo, después de 40 minutos de establecida la imbibición, la síntesis de proteínas estaba dirigida principalmente por mRNA sintetizado de novo, más que por el mRNA almacenado. También Spiegel y cols. (1975), mostraron claramente que en trigo la transcripción se llevaba a efecto tan pronto como los ejes embrionarios eran puestos a imbibir, detectándose tanto rRNA como mRNA poliadenilado marcado

isotópicamente. Otros autores obtuvieron resultados similares con otras especies (Payne, 1977; Takaiwa y Tanifuji, 1979).

La síntesis de RNA durante la imbibición temprana requiere la presencia de una RNA polimerasa activa. Se ha demostrado que esta enzima está presente tanto en embriones de trigo y de cebada aún secos (Jendrisak y Becker, 1973; Fabisz-Kijowska et al., 1975); la enzima parece encontrarse en la cantidad suficiente para catalizar la síntesis de RNA inmediatamente después de la imbibición. Ha sido difícil establecer con certeza la relevancia del mRNA de vida larga almacenado en las semillas, para la síntesis temprana de proteínas. Es probable que el mRNA almacenado sea el sobrante del proceso de la embriogénesis y que las proteínas necesarias para la germinación provengan del mRNA sintetizado de novo.

SINTESIS DE DNA DURANTE LA GERMINACION.-

La secuencia de eventos bioquímicos y fisiológicos, que parecen ser comunes durante la germinación de semillas de gramíneas, pueden dividirse en dos grupos: a) Eventos tempranos; hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de RNA y reparación del DNA, y b) eventos tardíos o secundarios; expansión celular, duplicación del DNA y movilización de reservas (Osborne, 1983).

La expansión de la radícula dentro de la semilla ocurre inicialmente por elongación celular y su subsecuente emergencia a través de la testa puede estar o no acompañada por la división celular. La duplicación del DNA es un requisito necesario para que la división celular ocurra (Bewley y Black, 1986).

El tiempo en que comienza la síntesis duplicativa del DNA varía de acuerdo a la especie y va desde las 4 a las 12 horas

después de establecida la imbibición (Chen y Osborne, 1970; Buchowicz et al., 1978; Balza et al., 1989).

En el caso particular del maíz, se sabe que la síntesis duplicativa del DNA, medida como la incorporación de un nucleótido marcado puede dispararse a partir de las 9 horas de imbibición (Vázquez y López, 1986). No obstante, en tiempos tempranos de la imbibición existe un pequeño incremento en la incorporación de la marca; las evidencias sugieren que esta síntesis de DNA es de tipo reparativo (Zarain et al., 1987).

En plantas superiores, las evidencias bioquímicas de la existencia de reparación de lesiones y/o cortes en el DNA son relativamente recientes (Veleminsky et al., 1977; Osborne et al., 1984).

Además de las diferentes lesiones al DNA que permanecen sin reparar durante el desarrollo del embrión, otras lesiones se acumulan durante el período en el que la semilla permanece en estado seco. Por ello, es imperativo que el proceso enzimático de la reparación se reactive en el momento de la imbibición. A menos que los daños ocurridos en el material genético del embrión sean reparados completamente, los eventos posteriores de la germinación difícilmente podrán operar adecuadamente.

Para que puedan llevarse a efecto dentro de la célula los diferentes procesos que involucran al DNA, como son la duplicación y la reparación del mismo, se requiere de la acción concertada de un gran número de proteínas diferentes. Dentro de ellas las DNA polimerasas-DNA dependientes tienen un papel relevante en ambos procesos (Aquellas codificadas en el DNA).

A.- DNA POLIMERASAS DNA DEPENDIENTES.

Aspectos generales.-

Las DNA polimerasas-DNA dependientes son las enzimas capaces de llevar a cabo la incorporación de los cuatro desoxirribonucleótidos-5'trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y TTP) a un molde base de DNA de acuerdo al apareamiento de bases según Watson y Crick, A con T y G con C, liberándose pirofosfato (Kornberg,1980).

Todas las DNA polimerasas requieren de un iniciador o cebador que tenga un extremo 3'-OH libre, el cual puede ser RNA o DNA, para que sean capaces de ejercer su acción de polimerización. Requieren de un catión divalente, magnesio o manganeso, y un molde de DNA para su acción y solo actúan sobre los nucleósidos 5'-trifosfatados.La nueva cadena de DNA se sintetiza en forma complementaria y antiparalela en dirección 5'-3'.

En procariotes se ha demostrado la existencia de tres tipos diferentes de DNA polimerasas, denominadas pol I, pol II y pol III de acuerdo al orden en que fueron descubiertas(Kornberg, 1980). Se ha podido estudiar las funciones de cada una de estas enzimas, debido principalmente a las razones siguientes: la facilidad para manejar este tipo de organismos, el hecho de que tienen un tiempo de generación corto, pero sobre todo a la posibilidad de obtener mutantes condicionales letales de los genes que codifican para cada una de estas enzimas. En el cuadro A se resumen las características y propiedades más importantes de estas tres clases de DNA polimerasas.

En células eucarióticas (de mamíferos) son cuatro las

CUADRO A

	pol I	pol II	pol III
Funciones:			
polimerización 5'--3'	+	+	+
Exonucleasa 5'--3'	+	-	+
Exonucleasa 3'--5'	+	+	+
Molde sintético			
Dúplex intacto	-	-	-
Cadena sencilla cebada	+	-	-
Dúplex con cortes	+	-	-
Actividad:			
Efecto de	60	60	60
KCl % del óptimo	20 mM	60	60
	50 mM	80	100
	100 mM	100	70
	150 mM	80	50
Inhibición por 2'-desoxi-análogos	-	+	+
Inhibición por ara-CTP	-	+	-
Inhibición por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo	-	+	+
Generales			
Tamaño (Kd)	109	120	140

polimerasas que se han podido distinguir. Se han usado diferentes nomenclaturas para identificarlas (Litvak y Castroviejo, 1987). En este trabajo, la clasificación basada en el alfabeto griego se utilizará para su identificación.

DNA POLIMERASAS α y δ .

La DNA polimerasa α fue la primera de las DNA polimerasas de mamíferos descrita (Bollum, 1960). Se encontró que era una enzima de alto peso molecular incapaz de corregir los errores de incorporación (proofreading) ya que no presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' (So y Downey, 1988).

Se considera que la DNA polimerasa α está involucrada en la duplicación del DNA y varias evidencias dan soporte a esta aseveración: la magnitud de su actividad enzimática correlaciona en forma directa con la síntesis de DNA durante la proliferación celular (fase S del ciclo celular); todos los inhibidores de la proliferación celular inhiben igualmente la duplicación del DNA y a la DNA polimerasa α in vitro (Ikegami et al., 1978).

Esta enzima ha sido aislada generalmente en forma de un complejo polipeptídico (Wong et al., 1988; So y Downey, 1988; Tamai et al., 1988; Nasheuer y Grosse, 1988). En general consiste de: 1) un polipéptido catalítico que in vitro es un fosfopolipéptido que oscila entre 125 a 180 Kd; 2) una fosfoproteína de 77 Kd de función desconocida y 3) dos polipéptidos de 55 y 49 Kd asociados con la actividad de la DNA primasa. Se ha observado que el polipéptido de 49 Kd en particular, es el que posee tal actividad (Nasheuer y Grosse, 1988).

La DNA polimerasa δ difiere de otras DNA polimerasas de

mamíferos porque es la única que presenta una actividad de exonucleasa 3'-5' (Crute et al., 1986). Además de su actividad de exonucleasa en esa dirección, esta enzima puede distinguirse de la DNA pol α por su comportamiento cromatográfico y la especificidad con que utiliza algunos moldes sintéticos in vitro. Las DNA polimerasas tipo δ prefieren copolímeros alternados tales como poli(dA-dT), mientras que su actividad sobre moldes de DNA activado con DNAsa es muy baja.

Las DNA polimerasas tipo δ de mamíferos con actividad asociada de exonucleasa 3'-5', han sido aisladas de varios tejidos, como por ejemplo: timo de ternera (Lee et al., 1980; Crute et al., 1986; Wahl et al., 1986), médula ósea de conejo (Goscin y Byrnes, 1982) y placenta humana (Lee y Toomey, 1987). Algunas de las propiedades de todas estas enzimas, como son el peso molecular y la utilización de moldes sintéticos varían, aunque existe la posibilidad de que esto se deba al protocolo de purificación empleado en cada caso.

Este tipo de polimerasas presentan algunas características en común entre las cuales están: un elevado peso molecular, una gran sensibilidad a NEM (N-etilmaleimida) y a afidicolina (y como parte constitutiva del complejo, poseen DNA primasa) (Crute et al., 1986). Anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α no cruzan con la DNA polimerasa δ .

Una propiedad común a todas las polimerasas tipo δ es su mínima inhibición por butil-fenil-dGTP y butil-anilino-dATP, que inhiben con mayor fuerza a la DNA pol tipo α (Crute et al., 1986).

Tanto las polimerasas tipo α como las tipo δ son sensibles a arabinosilnucleótidos y resistentes a didesoxinucleótidos (So y

Downey, 1988). Teniendo como fundamento estas similitudes ha surgido la interrogante de si la DNA pol δ es solo una forma modificada de la DNA pol α o viceversa.

A pesar de estas semejanzas, una amplia gama de evidencias sugieren que son enzimas diferentes, ya que son varias las características que no comparten: actividad de exonucleasa (Downey *et al.*, 1988), una respuesta diferencial a la proteína PCNA, responsable de la regulación del ciclo celular (Jan *et al.*, 1986), sensibilidad a inhibidores como butil-fenil-dGTP y butil-anilino-dATP (Wahl *et al.*, 1986); anticuerpos monoclonales contra DNA polimerasa α no inhiben la actividad de la DNA polimerasa δ (Wahl *et al.*, 1986; Lee y Toomey, 1987); anticuerpos policlonales contra DNA polimerasa δ de timo de ternera no inhiben a la DNA polimerasa α de la misma especie, estudios sobre la procesividad (capacidad para sintetizar en forma continua sin interrupciones) de ambas enzimas y sobre el uso de moldes sintéticos, muestran respuestas diferentes (Hohn y Grosse, 1987).

El papel funcional de estas enzimas ha sido muy difícil de determinar debido en primer lugar a la carencia de mutantes en eucariotes superiores.

Recientemente se ha propuesto a manera de hipótesis, la posible función de cada una de ellas en la horquilla de duplicación, adjudicándosele a la DNA pol δ la duplicación de la cadena continua, y a la DNA polimerasa α la duplicación de la cadena discontinua (Focher *et al.*, 1988).

Por un lado tenemos a la DNA polimerasa α , que es una enzima con una actividad asociada de DNA-primasa que posee una procesividad moderada, lo cual le permite realizar una síntesis

discontinúa en la horquilla de duplicación (Kaguni *et al.*, 1983).

Por otro lado, tenemos una enzima con un altísimo grado de procesividad que le permite realizar una síntesis continua, es capaz de realizar una síntesis de desplazamiento de cadena, es regulada por la proteína PCNA -involucrada en la regulación de la duplicación-, y cuenta con actividad de exonucleasa, se requiere para sintetizar la cadena continua, y todas estas características corresponden con la DNA polimerasa de tipo δ (So y Downey, 1988).

Haciendo una analogía con el modelo de duplicación de procariotes, es posible que las DNA polimerasas α y δ sean componentes de un complejo multiproteínico durante la duplicación, aún cuando hasta la fecha no hay evidencia de tal complejo (So y Downey, 1988).

DNA POLIMERASA β .

La DNA polimerasa β de mamíferos ha sido purificada de varios organismos y en todos los casos se ha encontrado una enzima que consiste de un solo polipéptido de alrededor de 40,000 de peso molecular (Hubscher *et al.*, 1979; Sakaguchi y Boyd, 1985; Wilson *et al.*, 1988).

Se ha clonado el gen que codifica para la DNA pol β de ratón y de humano (Date *et al.*, 1988).

Las DNA polimerasas no requieren de grupos sulfhidrilo para su actividad y por tanto, no son inhibidas por agentes bloqueadores de estos grupos y, a diferencia de lo que ocurre con las polimerasas de tipo α , éstas son estimuladas por altas concentraciones de cationes monovalentes. Este tipo de enzima es

fuertemente inhibida por didesoxinucleósidos trifosfato y es insensible a arabinosilnucleósidos trifosfato y afidicolina. Por ello, estos inhibidores son muy útiles para poder distinguir a los diferentes tipos de DNA polimerasas. Además, este tipo de DNA polimerasa muestra una gran resistencia a agentes químicos como ácido fosfonoacético, urea 5M y alcohol o acetona al 20-25% (Boldem *et al*, 1975; Chang, 1973).

El tipo de molde sintético que prefiere este tipo de DNA polimerasa es el DNA con huecos, al igual que las polimerasas tipo α . Este tipo de DNA polimerasas se localiza exclusivamente en el núcleo, unida fuertemente a la cromatina (Foster y Gurney, 1974). Una vez purificada queda libre de nucleasas. Es una enzima relativamente pequeña, consiste de un solo polipéptido con un coeficiente de sedimentación de 4S. Tiene un punto isoeléctrico básico.

Hasta hace algún tiempo el papel fisiológico de la DNA polimerasa β no estaba bien definido. Era considerada como una enzima de tipo reparativo; la evidencia que daba sustento a esta aseveración era bastante circunstancial: en primer lugar, no se presentan fluctuaciones medibles en su actividad durante el ciclo celular (Spadari y Weissbach, 1974, Chiu y Baril, 1975). En linfocitos estimulados por fitohemaglutinina, el mayor incremento en la actividad de DNA pol β coincide con el pico de síntesis reparativa y de mínima duplicación del DNA (Bertazzoni *et al*, 1976). Finalmente se demostró que la DNA pol β puede participar en reparación por escisión del DNA en neuronas en la etapa estacionaria de crecimiento (esto es, no dividiéndose), dañadas por luz ultravioleta (Hubscher *et al*, 1979; Waser *et al*, 1979), estas

células no presentan DNA pol α detectable. Todos estos hallazgos han sido confirmados en otras especies (Pedrali-Noy y Spadari, 1980; Siedlechi et al, 1980). Algunos estudios indican que la DNA pol β funciona casi exclusivamente en la reparación de tramo corto.

DNA POLIMERASA TIPO γ .

La DNA polimerasa tipo γ tiene una localización subcelular en la mitocondria en donde se le ha atribuido la función de duplicar el genoma organular (Hubscher et al, 1979). Esta enzima ha sido también encontrada en la fracción nuclear, pero su función ahí es desconocida. Muestra una gran heterogeneidad al ser purificada, habiéndose reportado pesos moleculares que fluctúan entre 110 a 300 Kd (Spadari et al, 1974) y también es común encontrar formas agregadas de las misma. No tiene actividad nucleolítica intrínseca. Tiene un pI ácido.

Recientemente se demostró que la DNA polimerasa γ de Drosophila es un heterodímero que consiste de una subunidad catalítica de 125,000 daltones y otra subunidad de 35,000 daltones, de función desconocida (Wernette et al, 1988).

La DNA polimerasa γ copia además de moldes de DNA naturales y sintéticos, una variedad de ribohomopolímeros como poli A, poli C, etc. (Knopf et al, 1976). Tanto este tipo de enzimas, como las transcriptasas reversas de los virus muestran capacidad para el uso o utilización de ribohomopolímeros como moldes; no obstante, este tipo de polimerasas son incapaces de duplicar moldes naturales de RNA, además los anticuerpos antitranscriptasa reversa

no cruzan con la DNA polimerasa γ de humano (Weissbach, 1977). Se puede distinguir de las polimerasas α y β , porque es inhibida a la vez por NEM y ddTTP, pero es insensible a afidicolina.

Las características más relevantes de estas polimerasas, se muestran en el cuadro B.

B.-DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES.

Las DNA polimerasas aisladas de eucariotes inferiores y de plantas no presentan exactamente el mismo comportamiento que las de su contraparte de animales.

DNA POLIMERASA TIPO α

En general las polimerasas tipo α descritas en sistemas vegetales presentan un alto peso molecular (desde 100 a 230 Kd) y son fuertemente inhibidas por NEM (bloqueador de grupos sulfhidrilos) (Amileni, et al, 1979; Fukasawa et al, 1980; Chivers y Bryant, 1983).

En sistemas como trigo, espinaca, arroz y coliflor la afidicolina, un inhibidor específico de DNA polimerasas tipo α de células de mamíferos, es capaz de inhibir la DNA polimerasa de alto peso molecular (Sala, et al, 1980/81).

En forma también general, las DNA polimerasas α de sistemas animales no reconocen un molde de poli rA oligo dT y resultados similares se han obtenido en el caso de las enzimas estudiadas en células vegetales.

Con el auxilio de métodos autorradiográficos, se ha observado que una DNA polimerasa sensible a afidicolina, se encuentra exclusivamente en el núcleo de células de arroz; resultados

CUADRO B

PROPIEDADES	α	β	γ	δ
LOCALIZACION	Nuclear	Nuclear	Mitochondrial Nuclear	Nuclear
FUNCION	Replicación del DNA	Reparación del DNA	Repl. mitocondrial	Replicación del DNA
PM (Kd)	150-1000	45	> 110	250-290
ACTIVIDAD RELATIVA				
Cel. en crecimiento	100	10	2	
Cels. en reposo	0-5	100	10	
Asoc. con primasa	si	no	si	no
TEMPLADOS				
DNA activado	si	si	si	si
RNA natural con primer de desoxinucleótidos	no	no	no	no
Molde de DNA con primer de RNA	si	no	si	no
INHIBIDORES				
NEM	si	no	si	si
ddTTP	no	si	si	
araCTP	si	si	no	
Afidicolina	si	no	no	si
butil-dTTP	si	no	no	no

similares se han obtenido en células de soya creciendo en cultivo (Sala et al., 1981; Litvak y Castroviejo, 1987).

DNA POLIMERASA BETA.

Una de las características fundamentales de la DNA polimerasa β en animales es que son proteínas de bajo peso molecular (comparativamente). Este tipo de enzimas han sido encontradas en tabaco, trigo, chícharo y remolacha (Litvak y Castroviejo, 1987). En coliflor se ha identificado una polimerasa de 70 Kd (Fukasawa, 1980). Debe tomarse en cuenta, que si un parámetro importante es el tamaño, es necesario considerar que existe una elevada actividad proteolítica en los extractos de plantas. De trigo se ha purificado una DNA polimerasa de 50 Kd casi a homogeneidad y tanto el efecto de inhibidores como su especificidad de molde, muestra diferencias muy claras en comparación con otras dos polimerasas tipo α obtenidas de esa misma planta. Sin embargo, los anticuerpos obtenidos contra esta enzima de bajo peso molecular presentan reacción cruzada con las de las polimerasas tipo α (Castroviejo et al., 1979).

Las enzimas de bajo peso molecular en remolacha y chícharo solo se inhiben a altas concentraciones de NEN, la polimerasa tipo β de chícharo se encuentra fuertemente unida a la cromatina, hasta el momento no se conoce el papel funcional de estas polimerasas (Castroviejo et al., 1979).

Aún no se ha demostrado el papel de las DNA polimerasas tipo β en la reparación del DNA en células vegetales. Sin

embargo, algunos autores, han demostrado que la síntesis reparativa inducida por irradiación con luz ultravioleta en protoplastos de tabaco es resistente a afidicolina (Sala et al., 1982).

DNA POLIMERASA γ (GAMA).

La DNA polimerasa tipo γ muestra una marcada preferencia por poli rA-oligo dT como molde *in vitro*. Este tipo de polimerasa ha sido detectado en tabaco (Srivastava, 1974), trigo (Castroviejo et al., 1979) y arroz (Amileni et al., 1979; Sala et al., 1981).

La DNA polimerasa tipo γ de trigo, tiene un peso molecular de 100,000 y es la única enzima entre todas las presentes, que es capaz de sintetizar su propio cebador (Graveline, et al., 1984).

En arroz, la DNA polimerasa tipo γ es la encargada de llevar a cabo la duplicación del DNA de los orgánulos. Tiene un peso molecular aproximado de 100,000 e in vitro prefiere un molde sintético de poli rA-oligo dT, que es una de las características fundamentales de las polimerasas tipo γ . Su actividad es dependiente de Mn^{++} y de alta fuerza iónica, es inhibida por N-etilmaleimida y posee en general un pH óptimo que fluctúa entre 8 y 9.

DNA POLIMERASAS DE CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS.

Se ha realizado el aislamiento y la caracterización de las DNA polimerasas de cloroplastos de dos plantas diferentes. La enzima proveniente de cloroplastos de espinaca, se ha clasificado como una polimerasa de tipo γ , dada su alta eficiencia con moldes de poli rA-oligo dT, su peso molecular relativo es de 105 Kd, es

C U A D R O C

DNA POLIMERASAS DE PLANTAS SUPERIORES

PROPIEDADES	POLIMERASA α	POLIMERASA β	POLIMERASA γ
PESO MOLECULAR: SUBUNIDAD CATALITICA	100-200,000	50,000	105-140,000
ENZIMA NATIVA	400-600,000	50,000	105-140,000
INHIBICIÓN POR: N-ETILMALEIMIDA	SI	SI ^B	SI
AFIDICOLINA	SI	NO	NO
FOSFATO	NO	SI ^C	NO
FOSFONOACETATO	SI	SI	--
ALTA CONCENTRA-- CIÓN DE K ⁺ y/o Na ⁺	SI	NO	NO
REQUERIMIENTO DE K ⁺ y/o Na ⁺	BAJO	ALTO	ALTO
CATION DIVALENTE PREFERIDO CON LOS SISTEMAS NORMALES DE MOLDE-CEBADOR.	Mg ²⁺	Mg ²⁺	?
USO DE POLI(rA) OLIGO(dT) COMO MOLDE-CEBADOR.	NO	NO	SI, ES EL MOLDE PREFERIDO SI EL Mn ²⁺ ES EL CATION DIVALENTE.
ACTIVIDADES ENZI-- MATICAS INTIMA-- MENTE ASOCIADAS:			
EXONUCLEASA 5'-3'	?	NO	NO
EXONUCLEASA 3'-5'	?	NO	?
PRIMASA	SI	NO	?
LOCALIZACION IN VIVO.	NUCLEO	NUCLEO (CROMATINA)	NUCLEO CLOROPLASTO MITOCONDRIA.

A) REFERENCIA (Bryant, J.A. y Dunham, V.L., 1988).

B) ALGUNAS PREPARACIONES DE POL β SON RESISTENTES A NEM; AQUELLAS QUE SON INHIBIDAS SE INHIBEN MENOS FUERTEMENTE QUE LA DNA POL α .

C) INHIBIDA MENOS FUERTEMENTE QUE LA POL α .

inhibida por NEM y muestra resistencia a afidicolina (Sala, et al, 1980a).

En cambio la DNA polimerasa proveniente de cloroplastos de chícharo no reconoce al poli rA-oligo dT como molde, pero es inhibida por NEM, bromuro de etidio y es resistente a la acción de afidicolina (Mckown y Tewari, 1984).

Se ha encontrado una DNA polimerasa con un peso molecular aparente de 180 Kd en mitocondrias purificadas de trigo. Esta enzima, a diferencia de la encontrada en mamíferos, no es capaz de sintetizar sobre un molde de poli rA-oligo dT en presencia de cationes divalentes. Debido a esto no puede clasificarse como DNA polimerasa y típica a pesar de que su localización subcelular es la mitocondria (Litvak y Castroviejo, 1987).

Todavía no ha sido posible dilucidar el papel fisiológico de las DNA polimerasas de mitocondrias y cloroplastos. Aún así, es posible suponer que dichas enzimas tienen alguna relación con la duplicación y la reparación de los genomas organulares.

Como puede derivarse de esta breve revisión, aún son necesarios infinidad de estudios en relación al tipo de DNA polimerasas presentes en plantas superiores y la función que desempeña cada una de ellas. En el cuadro C se muestran las propiedades más importantes de cada una de ellas.

II.-ANTECEDENTES FUNDAMENTALES DEL PRESENTE TRABAJO.

En la gran mayoría de semillas de gramíneas, la duplicación del DNA es un evento relativamente tardío en el proceso de germinación. No obstante, se ha detectado un bajo nivel de síntesis

de DNA en períodos previos a la duplicación del DNA, tanto en embriones de centeno (Osborne *et al.*, 1980), como en embriones de maíz (Vázquez-Ramos y López, 1986).

Se ha sugerido que dicha síntesis temprana es de tipo reparativo de acuerdo a las evidencias obtenidas en embriones de centeno y de maíz tanto control como γ -irradiados (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986; Zarain *et al.*, 1987).

Meléndez López y Vázquez en 1989, demostraron que en ejes embrionarios de maíz no embebidos el DNA se encuentra fragmentado, y, conforme los ejes se embeben, este DNA cambia de bajo a alto peso molecular, indicando que de alguna forma se está recuperando la integridad del material genético.

Asimismo, en algunos estudios realizados en núcleos aislados a partir de ejes embrionarios de maíz, se encontró que la síntesis de DNA es inhibida diferencialmente por diversas sustancias (inhibidores de la duplicación del DNA), cuando éstas son añadidas ya sea durante las primeras horas de la germinación (0-3 h) o bien a las 15 horas de iniciado este proceso (Vázquez-Ramos y López, 1986).

En plantas superiores, se desconoce aún que tipo de DNA polimerasa que en particular está asociada a los procesos de reparación y duplicación del DNA.

Para maíz en particular, la actividad de DNA polimerasa que se encuentra en forma predominante a las 3 y 24 horas de imbibición ha sido purificada parcialmente y caracterizada (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988). Los resultados de dichos experimentos muestran que no existen diferencias considerables entre las enzimas presentes a estos tiempos de imbibición y que, en

general, debido a sus respuestas a ciertos inhibidores, pH óptimo, efecto de la fuerza iónica, etc., se asemejan ambas, más bien, a una DNA polimerasa de tipo α .

Es por ello, que con todas estas evidencias, el propósito del presente trabajo es : purificar y caracterizar la(s) DNA polimerasa(s) presente(s) en núcleos de ejes embrionarios de maíz durante las primeras 6 horas de germinación y compararla(s) con la(s) DNA polimerasas presentes a las 24 horas de germinación. Cabe también mencionar que se hará una comparación entre las polimerasas nucleares y las polimerasas solubles presentes en cada tiempo de germinación.

III. HIPOTESIS

Dados los antecedentes que hemos mencionado, postulamos que será posible purificar parcialmente y caracterizar una DNA polimerasa diferente a aquella que previamente ha sido purificada y caracterizada en nuestro laboratorio (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1987) la cual tendrá localización nuclear, estará fuertemente unida a la cromatina y que tendrá una respuesta característica a inhibidores, fuerza iónica y moldes sintéticos y por supuesto un comportamiento cromatográfico característico. Esta DNA polimerasa tendrá un papel importante durante las primeras horas de la germinación, con lo cual podría implicársele en la síntesis reparativa del DNA durante ese período.

IV.-OBJETIVOS

.-Contar con una metodología adecuada para aislar núcleos con un buen rendimiento.

.-Determinar la actividad de la DNA polimerasa en extractos nucleares de ejes embrionarios de maíz, en presencia de inhibidores y otros efectores.

.-Purificar parcialmente el extracto nuclear a través de una columna de DEAE-Celulosa y caracterizar la(s) actividad(es) que puedan ser resueltas.

V.-MATERIALES Y METODOS

1.-MATERIAL BIOLÓGICO.

En todos los experimentos aquí descritos se utilizaron semillas de maíz variedad "Chalqueño", las cuales fueron adquiridas a través de PRONASE (Productora Nacional de Semillas de la SARH).

Para todos los experimentos se utilizaron ejes embrionarios de semillas secas, los cuales se extrajeron manualmente.

REACTIVOS Y SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.

A) Solución amortiguadora para la imbibición de ejes embrionarios.

Trisma base(Merck,México) pH=7.6	50 mM
Cloruro de potasio(KCl)(Baker Chem.Co.,México)	50 mM
Cloruro de Magnesio(MgCl ₂)(Merck, México)	10 mM
Sacarosa(Merck, México)	2%
Cloranfenicol(Sigma Chem. Co.)	10 µg/ml

B) Solución amortiguadora No. 1 (para la extracción de núcleos).

Trisma base pH=7.6	50 mM
Cloruro de potasio(KCl)	20 mM
Cloruro de Magnesio(MgCl ₂)	5 mM
Sacarosa	1.2 M
Glicerol(Baker Chem. Co.)	30%

β -Mercaptoetanol (Merck, Alemania) 1 mM

Solución amortiguadora No. 2 (para la resuspensión de núcleos).

Trisna base pH=7.6 50 mM

Cloruro de Magnesio(MgCl₂) 10 mM

Glicerol 10 %

β -Mercaptoetanol 1 mM

PMSF(Sigma Chemical Co.) 0.2 mM

EDTA(Merck, Alemania) 30 mM

La solución amortiguadora para diálisis contiene lo anterior con excepción del EDTA.

D) Soluciones amortiguadoras empleadas en la cromatografía en DEAE-celulosa.

Todos los amortiguadores empleados en el proceso de purificación tienen la misma composición, lo único que cambia es la concentración de fosfato de potasio para cada caso.

Fosfato de potasio (Baker Chem. Co.) pH=7.5 10, 400 y 600 mM.

EDTA 1 mM

Glicerol 10 %

β -Mercaptoetanol 1 mM

PMSF 0.2 mM

E) Líquido de centelleo.

2,2-p-fenilbis(5-fenoxazol) (POPOP) (Merck)	0.1 g
2,5-difenoxazol (POP, Merck)	5.0 g
Tolueno Q.P. (químicamente puro).	1 l

F) Solución amortiguadora para la activación del DNA.

Trisma base pH=7.5	10 mM
MgCl ₂	50 μ M
Albumina de suero Bovino (ASB, Sigma Chem. Co.)	0.5 mg/ml
DNA de timo de ternera (Sigma Chemical Co.)	0.25 mg/ml

G) Mezcla de reacción para el ensayo de DNA polimerasa.

1) DNA polimerasa tipo α :

Trisma base pH=7.6	50 mM
KCL	20 mM
MgCl ₂	10 mM
dATP (Sigma Chem Co)	0.1 mM
dCTP (Sigma Chem Co)	0.1 mM
dGTP (Sigma Chem Co)	0.1 mM
Glicerol	4 %
β -Mercaptoetanol	0.4 mM
DNA activado	1 μ g
ATP (Sigma Chem Co)	1 mM
(metil- ³ H) TTP (80 Ci/mmol, New England Nuclear)	5 μ Ci/ml

2) DNA polimerasa tipo β .

Trisma base pH=8.5	50 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	20 mM
dATP	0.1 mM
dCTP	0.1 mM
dGTP	0.1 mM
Glicerol	4 %
β -Mercaptoetanol	0.4 mM
DNA activado	1 μ g
(metil- ³ H)TTP (80 Ci/mmol, New England Nuclear)	5 μ Ci/ml

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

Reactivo A:

Se mezclan partes iguales de una solución de NaOH 0.8 N, SDS al 10 %, agua destilada y de CTC (solución de Cobre-Tartrato-Carbonato).

Esta solución es estable durante más o menos 2 semanas a temperatura ambiente.

Reactivo B:

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma de México)	1 volumen
Agua bidestilada	5 volúmenes

SOLUCIONES BASE:

-Solución de CTC.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3 ; Merck, México)	10 %
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1 %

(Baker Chem. Co)

Tartrato doble de sodio y potasio (Merck, México)	0.2 %
---	-------

Esta solución es estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

Desoxicolato de Sodio (Sigma Chem Co) (DOC)	0.15 %
---	--------

Acido tricloro acético (TCA)	72%
------------------------------	-----

Solución proteica para la elaboración de la curva patrón.

Albúmina de suero bovino	1 mg/ml ó 0.2 mg/ml.
--------------------------	-------------------------

I) PREPARACION DE LAS BOLSAS PARA DIALISIS.

Las bolsas se hierven dos veces con NaHCO_3 (Q.P.) durante 10 minutos y 2 veces con EDTA 5 mM durante también 10 minutos. Se guardan en EDTA 5 mM y etanol al 10% en refrigeración.

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

J) Preparación de la dietilaminoetil-celulosa (DEAE-Celulosa, Sigma Chem. Co.).

Se colocan 5 g de DEAE-celulosa en 75 ml de HCl 0.5 N, agitando suavemente durante 45 minutos a intervalos de 15 minutos. Se lava con agua destilada hasta llegar a un pH de 4.

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

La resina se resuspende en 80 ml de KCl 0.05 N, y se lleva a pH= 7.2 con HCl 0.05 N. Se agita suavemente durante una hora, a intervalos de 15 minutos, a temperatura ambiente. Se revalora hasta un pH= 7.2 con HCl 0.05 N, y se agita suavemente durante 2 horas, a intervalos de 30 minutos. Se retitula una vez más a pH= 7.2 y se decanta el sobrenadante eliminando los finos y la materia particulada. La resina se resuspende en fosfatos 10 mM, a pH= 7.5.

METODOS

A) Imbibición de los ejes embrionarios (tanto control como y irradiados).

Las muestras de ejes embrionarios, 2 g para la extracción de núcleos y 4 g para la purificación parcial a través de DEAE-celulosa, se desinfectaron previamente con NaClO al 0.5 %, y se colocaron entre 2 círculos de papel filtro humedecido con solución amortiguadora para imbibición en una caja de Petri de tamaño estándar (10 cm de diámetro). Los ejes se incubaron a 27°C durante el tiempo requerido en cada caso.

B) Extracción de núcleos de ejes embrionarios germinados y no germinados y obtención del extracto nuclear. (Método modificado de D'Allessandro y Dunham, 1980).

Las muestras de ejes embrionarios germinados o no germinados se colocaron sobre un mortero preenfriado y se homogeneizaron con 1.5 volúmenes de solución amortiguadora No. 1 hasta obtener un homogenado de consistencia de tipo pastoso. El homogenado se filtra a través de tres capas de papel miracloth, con ayuda de vacío, la suspensión obtenida se centrifuga durante 40 minutos a 20,000 x g.

Los núcleos sedimentados se resuspenden con 3 ml de solución amortiguadora No. 2 y se congela y se descongela el extracto 3 veces (de -70°C a 20°C). El extracto se centrifuga durante 2 horas

a 100,000 x g. El sobrenadante se separa y se dializa durante 12 a 16 horas contra solución amortiguadora de diálisis. Lo mismo se hace con el sobrenadante obtenido durante la separación de núcleos; este también se dializa contra solución amortiguadora de diálisis. A este sobrenadante dializado se le conoce como extracto soluble y aquel obtenido en la centrifugación de alta velocidad es el extracto nuclear.

C) Preparación del DNA activado (Según Aposhian y Kornberg, 1962).

Se hacen reaccionar 0.25 mg de DNA de timo de ternera (Sigma Chem Co), previamente disuelto en solución amortiguadora de activación con 5×10^{-4} μ g de DNasa I (Sigma chemical Co.), se incuba 15 minutos a 37°C y luego se calienta durante 5 minutos a 77°C, finalmente a la mezcla de reacción se le baja rápidamente la temperatura transfiriéndola a un baño de hielo.

D) Determinación de la actividad de la DNA polimerasa.

La actividad de la DNA polimerasa tanto tipo α como tipo β , se ensaya en un volumen final de 100 μ l, dicho volumen contiene la mezcla de reacción, 40 a 50 μ l de los extractos (nucleares o solubles) o fracción de columna, en ausencia o presencia de diferentes inhibidores. La reacción se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se detiene adicionando 100 μ l de una solución de DNA tipo IV de esperma de arenque (Sigma Chem Co) (2 mg/ml) y 2.5 ml de TCA al 10 % frío. Las muestras se colocan en hielo durante por lo menos 30 minutos.

La radiactividad incorporada e insoluble en TCA, se colecta

filtrando con ayuda de vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C ó GF/A. Los filtros se lavan primero con 3 ml de TCA al 10 % frío, a continuación con 3 ml de TCA al 5 % también frío y finalmente con 6 ml de etanol al 96 % frío.

Se secan perfectamente y se transfieren a frascos viales que contienen 5 ml de líquido de centelleo. Se determinan las cpm en un contador de centelleo (Tipo β) para muestras líquidas.

EFECTO DE INHIBIDORES.-

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

1- β -arabinofuranosil-citosina-5'-trifosfato (ara-CTP), a una concentración final de 200 μ g/ml.

N-etilmaleimida (NEM) a una concentración final de 10 mM, disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO).

ddTTP.-Didesoxitimidina trifosfato en una concentración final de 3.125×10^{-5} μ mol/ml, disuelta en agua.

Afidicolina, a una concentración final de 50 μ g/ml, disuelta en DMSO.

Para el caso de NEM y afidicolina se incluye un control adicional al cual se le agrega una cantidad equivalente (en volumen) del disolvente empleado. El resultado obtenido bajo estas condiciones es el que se toma en cuenta para determinar el efecto del inhibidor correspondiente.

F) Determinación de la concentración de proteínas.

-Método modificado de Lowry (Peterson, 1977).

Este método se empleó para determinar la cantidad de proteínas en los extractos nucleares y solubles.

Se prepararon dos soluciones patrón de albúmina sérica bovina (ASB), de concentración de 1 mg/ml ó 0.2 mg/ml. Las muestras problemas (20 a 100 μ l), se llevan a un volumen final de 1 ml con agua desionizada. A cada una de las muestras, tanto problemas como patrones, se les añade 0.1 ml de desoxicolato de sodio (DOC), se mezcla con ayuda de un vórtex y se dejan reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se les agrega 0.1 ml de TCA al 72 % frío, se mezcla con ayuda de un vórtex y se colocan en hielo durante 15 minutos.

Las muestras se centrifugan 15 minutos a 3000 rpm, el sobrenadante se descarta, a la pastilla se le añade 1 ml de agua desionizada y un ml de reactivo A y se mezcla muy bien con ayuda de un vórtex, se dejan reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo, se adiciona a cada tubo 0.5 ml de reactivo B, se agitan los tubos con ayuda de un vórtex y se dejan reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, período durante el cual se desarrolla el color. Se lee la absorbencia a 750 nm.

La concentración de proteínas de las muestras Problema se determina interpolando la absorbencia obtenida en la curva patrón.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.-

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

El método consiste en determinar la absorbencia de una solución diluida de proteínas tanto a 280 nm como a 260 nm y aplicar la fórmula siguiente:

Concentración de proteína.

$$(\text{mg/ml}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260} \quad (\text{Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988})$$

G) PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO NUCLEAR DIALIZADO, EN UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

Dos a tres ml de extracto nuclear dializado se cargaron sobre una columna de DEAE-Celulosa (con 5-6 ml de resina), previamente equilibrada con una solución de fosfatos 10 mM. Se lava la columna con tres volúmenes de lecho de fosfatos 10 mM y se eluye con un gradiente lineal de fosfatos (40 ml = 5 volúmenes de lecho) de 10 a 400 mM. Se colectan fracciones de 1 ml cada una. Todas estas manipulaciones se llevan a efecto en el cuarto frío a 4°C. Finalmente se lava la columna con 3 volúmenes de lecho de fosfatos

600 mM.

Se determina la actividad de la DNA polimerasa en cada una de las fracciones, mediante el ensayo tipo α descrito previamente.

La concentración de proteínas en cada fracción se determina mediante el método espectrofotométrico. Habitualmente se colectaron alrededor de 60 fracciones de 1 ml que comprenden el lavado y gradiente de fosfatos.

H) γ -Irradiación de ejes embrionarios secos.

Los ejes embrionarios de maíz secos (no embebidos) se irradiaron con 1000 Grays (1 Kilogray) en un irradiador gamma modelo γ -Cell, en el Instituto de Investigaciones Nucleares (UNAM). Estos ejes embrionarios se procesaron posteriormente de igual forma que los control.

I) Preparación del molde sintético: Poli rA-Oligo dT.

Se disuelven el poli rA y el oligo dT por separado, en una solución que contiene Tris 10 mM pH=7.5, MgCl₂ 50 μ M, ASB (albúmina sérica bovina) 0.5 mg/ml. Para preparar el molde sintético se mezclan volúmenes iguales de solución de poli rA y de solución de oligo dT, quedando ambos en una relación molar de 50:1 (esto es, 10 moles de A por un mol de dT). Cada 10 μ l de oligo dT(dTs) contiene 8.4×10^{-4} mg de éste, y cada 10 μ l de solución de poli rA contiene 5 μ g del mismo. La relación molecular final de poli rA y oligo dT deberá ser de una molécula del primero (poli rA, con una longitud aproximada de 400 nucleótidos) y 8 moléculas

del segundo (dT₅).

Para realizar el ensayo en la presencia exclusiva de este molde y en las proporciones antes estipuladas, se mezclan 10 μ l de la solución de poli rA y 10 μ l de la solución de oligo dT, por cada tubo en que se lleve a efecto la determinación de DNA polimerasa deberá agregarse 20 μ l de la mezcla anterior. El ensayo se lleva a efecto en las condiciones descritas para el ensayo tipo α . El resto de las manipulaciones se lleva cabo como se describió previamente en el apartado de Métodos. Este molde fue preparado de acuerdo a la metodología reportada por Vishwanatha *et al*, (1986). El poli rA y el oligo dT se adquirieron de Sigma Chemical Company, Saint Louis, Mo. USA.

VI-RESULTADOS

A) AFINACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA AISLAR NÚCLEOS.

El primer objetivo que nos planteamos fue el referente a afinar y/o montar una técnica que nos permitiera aislar núcleos de ejes embrionarios con un buen rendimiento, de tal forma que pudieran hacerse extractos proteicos de estos núcleos a partir de los cuales se pudiera determinar la actividad de la DNA polimerasa.

En nuestro laboratorio ya contábamos con una metodología para aislar núcleos debida a Cheah y Osborne (1978) ; el objetivo original de esta técnica era aislar la mayor cantidad posible de núcleos para extraer de ellos el DNA. Hicimos algunas pruebas para saber si la técnica serviría para hacer extractos enzimáticos nucleares, a partir de los cuales pudiera ensayarse la actividad de la DNA polimerasa. Los resultados de estas pruebas fueron positivos, no obstante se presentaron dos inconvenientes: a) El procedimiento mediante el cual se obtenían los núcleos y por ende los extractos enzimáticos propiciaban que el extracto final mostrara contaminación bastante apreciable con lípidos y almidón (estas no se consideran como condiciones adecuadas para realizar ensayos de DNA polimerasa) y b) se requería de una cantidad considerable de ejes embrionarios para obtener extractos enzimáticos nucleares con una actividad relativamente baja de DNA

polimerasa.

Tomando en consideración los inconvenientes anteriores se procedió a indagar sobre otras metodologías de aislamiento de núcleos. Se analizó la metodología reportada por D'Allessandro y Durham(1980), y después de una ligera modificación se logró obtener una técnica de aislamiento de núcleos que permitía la obtención de extractos enzimáticos nucleares casi libres de lípidos y almidón y con una elevada actividad de DNA polimerasa. Este procedimiento se describe con detalle en el apartado de Materiales y Métodos. La presencia de núcleos se determinó mediante microscopía de luz empleando preparaciones teñidas con aceto orceína (Baíza et al, 1986).

Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (y otros reportados en la literatura), consistió en caracterizar la DNA polimerasa presente a las 3 y 24 horas de germinación (se partió de extractos solubles totales). Se pensaba que las DNA polimerasas más abundantes a estos tiempos debían ser diferentes, ya que los estadios de germinación estaban muy bien diferenciados. No obstante los resultados indicaron que la DNA polimerasa presente a ambos tiempos de germinación tenía características muy similares. En principio se intentó identificar a la polimerasa tipo β , empleando para este propósito el ensayo clásico (esto es, $\text{pH}=8.5$, $\text{KCl}=100 \text{ mM}$ y presencia de NEM). La actividad residual detectada en este ensayo, correspondería con una DNA polimerasa tipo β . No fue posible detectar, mediante estas condiciones de ensayo ninguna actividad de DNA polimerasa. La NEM presente en el ensayo inhibía completamente la actividad de toda(s) la(s) DNA polimerasa(s) presentes. Una de las conclusiones obtenidas de este

y de otros trabajos en la literatura es, que probablemente la DNA polimerasa tipo β de plantas es susceptible a NEM.

En este trabajo, en forma preliminar se ensayó la actividad de la DNA polimerasa nuclear bajo las condiciones del ensayo β clásico, observándose que la actividad enzimática se inhibía totalmente. Por esta razón, abandonamos la utilización de NEM en el ensayo, pero conservamos las condiciones de pH y fuerza iónica (8.5 y 100 mM respectivamente). Estas condiciones, por sí solas, ocasionaban una inhibición en la actividad de la DNA polimerasa caracterizada por Vázquez et al (1988), de alrededor del 80%. Se pensó que estas condiciones podrían servir como un criterio para diferenciar actividades de DNA polimerasa. Aún así estamos conscientes de que quizá este ensayo no permitirá distinguir inequívocamente actividades diferentes de DNA polimerasas.

A continuación se describe la respuesta de las DNA polimerasas solubles y nucleares, frente a NEM, ddTTP y afidicolina. Se muestran primero los resultados del efecto de NEM y ddTTP, y por separado aquéllos obtenidos con afidicolina; esto es así porque los resultados obtenidos con afidicolina son particularmente importantes para la posible determinación de las características de las diferentes actividades enzimáticas.

En el cuadro No. 1 podemos observar el comportamiento de la actividad de la DNA polimerasa de los extractos solubles y nucleares provenientes de ejes no embebidos (0 horas) frente a los inhibidores NEM (N-etilmaleimida, un inhibidor de polimerasas tipo α , tipo γ y tipo δ de mamíferos) y ddTTP (didesoxitimidina trifosfato, un inhibidor específico de polimerasas tipo β y tipo γ de mamíferos y plantas, que no afecta a las polimerasas de tipo

0 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	97 \pm 5	97.5 \pm 5	95 \pm 5	93 \pm 5
SOLUBLE (SO)	100	100	100	100

CUADRO No. 1.- RESPUESTA DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO SOLUBLE Y NUCLEAR PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (CONTROL) EMBEBIDOS DURANTE 0 HORAS, FRENTE A NEM Y ddTTP. (LOS VALORES ESTAN DADOS COMO POR CIENTO DE INHIBICIÓN). ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE) OBTENIDA EN LOS ENSAYOS CONTROL; ENSAYO α : NEM_{NU}=214 \pm 20, NEM_{SO}=31 \pm 7, ddTTP_{NU}=181 \pm 17, ddTTP_{SO}=26 \pm 4. ENSAYO β : NEM_{NU}=104 \pm 15, NEM_{SO}=10 \pm 5, ddTTP_{NU}=145 \pm 14, ddTTP_{SO}=11 \pm 3. AE: CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.

3 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	88 \pm 5	97 \pm 5	93 \pm 5	95 \pm 5
SOLUBLE (SO)	86 \pm 3	93 \pm 3	97 \pm 3	95 \pm 3

CUADRO No. 2.- RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO SOLUBLE Y NUCLEAR PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (CONTROL) EMBEBIDOS DURANTE 3 HORAS, FRENTE A NEM Y ddTTP. (LOS RESULTADOS ESTAN EXPRESADOS COMO POR CIENTO DE INHIBICIÓN). ACTIVIDAD ESPECIFICA OBTENIDA EN LOS ENSAYOS CONTROL; ENSAYO α : NEM_{NU}=221 \pm 30, NEM_{SO}=61 \pm 10, ddTTP_{NU}=215 \pm 40, ddTTP_{SO}=57 \pm 8. ENSAYO β : 136 \pm 15, NEM_{NU}: 136 \pm 15, NEM_{SO}: 39 \pm 15, ddTTP_{NU}: 300 \pm 50, ddTTP_{SO}: 81 \pm 17. AE=CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DEL EXTRACTO.

6 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	85 ₋₆	92 ₊₄	95 ₋₅	95 ₊₄
SOLUBLE (SO)	85 ₊₄	87 ₊₅	97 ₊₅	94 ₊₄

CUADRO No. 3.- RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO SOLUBLE Y NUCLEAR PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (CONTROL) EMBEBIDOS DURANTE 6 HORAS, FRENTE A NEM y ddTTP (LOS RESULTADOS ESTAN EXPRESADOS COMO POR CIENTO DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE) OBTENIDA EN LOS ENSAYOS CONTROL; ENSAYO α : NEM_{nu}=93⁺¹⁶, NEM_{so}=130⁺²⁰, ddTTP_{nu}=113⁺²³, ddTTP_{so}=123-13. ENSAYO β : NEM_{nu}=163-12, NEM_{so}=103-10, ddTTP_{nu}=245-28, ddTTP_{so}=96-14. AE=CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN EL EXTRACTO.

24 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	91 ₊₅	94 ₊₃	85 ₊₅	98 ₊₂
SOLUBLE (SO)	86 ₊₄	96 ₊₄	90 ₊₅	97 ₊₃

CUADRO No.4.-RESPUESTA DE LAS ACTIVIDADES DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO NUCLEAR Y SOLUBLE PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (CONTROL) GERMINADOS DURANTE 24h, FRENTE A NEM Y ddTTP (LOS RESULTADOS ESTAN EXPRESADOS COMO % DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE) OBTENIDA EN LOS ENSAYOS - CONTROL; ENSAYO α : NEM_{nu}=518-52, NEM_{so}=105-9, ddTTP_{nu}=649-37, ddTTP_{so}=103⁺¹⁴. ENSAYO β : NEM_{nu}=408⁺²², NEM_{so}=72-11, ddTTP_{nu}=480-26, ddTTP_{so}=87⁻⁹. AE= CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN EL EXTRACTO.

a).

Tanto en el ensayo para α como para β polimerasas el efecto inhibitorio de estas dos sustancias fue superior al 90 %.

En el cuadro No. 2 mostramos el comportamiento de los extractos nucleares y solubles provenientes de ejes embrionarios embebidos durante 3 horas frente a los inhibidores NEM y ddTTP. Observamos que las actividades en dichos extractos se inhiben en un porcentaje superior al 90 %. Este porcentaje de inhibición se presentó en los dos tipos de ensayo.

En el cuadro No. 3 se puede observar el comportamiento de la actividad enzimática presente en extractos nucleares y solubles proveniente de ejes embrionarios embebidos durante 6 horas frente a NEM y ddTTP. Nuevamente puede observarse que el efecto inhibitorio es del 90 % o superior en las dos condiciones de ensayo.

En el cuadro No. 4 se muestra el efecto que NEM y ddTTP ejercen sobre la actividad de la DNA polimerasa presente en extractos nucleares y solubles provenientes de ejes embrionarios embebidos durante 24 horas. Estas sustancias ejercieron una inhibición promedio de alrededor del 90 % sobre la actividad enzimática (de la DNA polimerasa), tanto en el ensayo tipo α como en el tipo β .

En resumen, a todos los tiempos probados, la inhibición por NEM y ddTTP fue superior al 90 %, sin permitir diferenciación de actividades.

3 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	92 \pm 4	94 \pm 3	94 \pm 4	94 \pm 4
SOLUBLE (SO)	86 \pm 5	94 \pm 3	93 \pm 3	95 \pm 4

CUADRO No. 5.-RESPUESTA DE LAS ACTIVIDADES DE DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO NUCLEAR Y SOLUBLE PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (γ -IRRADIADOS) EMBEBIDOS DURANTE 3h, FRENTE A NEM Y ddTTP (LOS RESULTADOS ESTAN EXPRESADOS COMO % DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE) OBTENIDA EN LOS ENSAYOS CONTROL; ENSAYO α : NEM_{nu}=36 \pm 10, NEM_{so}=132 \pm 20, ddTTP_{nu}=64 \pm 13, ddTTP_{so}=118 \pm 11. ENSAYO β : NEM_{nu}=58 \pm 9, NEM_{so}=65 \pm 8, ddTTP_{nu}=55 \pm 10, ddTTP_{so}=81 \pm 16. AE-CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.

6 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO				
EXTRACTO	ALFA		BETA	
	NEM	ddTTP	NEM	ddTTP
NUCLEAR (NU)	85 \pm 5	92 \pm 4	85 \pm 6	85 \pm 6
SOLUBLE (SO)	90 \pm 5	95 \pm 3	97 \pm 4	94 \pm 3

CUADRO No.6.-RESPUESTA DE LAS ACTIVIDADES DE DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO NUCLEAR Y SOLUBLE PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (γ -IRRADIADOS) EMBEBIDOS DURANTE 6h, FRENTE A NEM Y ddTTP (LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN % DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA(AE) OBTENIDA EN LOS ENSAYOS CONTROL; ENSAYO α : NEM_{nu}=63 \pm 14, NEM_{so}=92 \pm 10, ddTTP_{nu}=105 \pm 22, ddTTP_{so}=99 \pm 18. ENSAYO β : NEM_{nu}=32 \pm 7, NEM_{so}=46 \pm 10, ddTTP_{nu}=45 \pm 14, ddTTP_{so}=85 \pm 16. AE- CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.

Los experimentos siguientes se realizaron con ejes γ -irradiados; el principio de esto es que bajo estas condiciones (en que se ha dañado el DNA) la síntesis no programada o reparativa del DNA se verá incrementada; concomitantemente a este incremento en la síntesis deberá darse otro en la actividad de una o varias DNA polimerasas que estén participando en este proceso, y que mediante el uso de diferentes inhibidores podría detectarse cual de todas ellas se ha incrementado.

En el cuadro No. 5 se muestran los resultados de ensayar la actividad de la DNA polimerasa de extractos solubles y nucleares provenientes de ejes embrionarios γ -irradiados embebidos durante 3 horas, en presencia de NEM y ddTTP; de nuevo estas sustancias logran inhibir la actividad enzimática en un porcentaje promedio del 90 %, en ambas condiciones de ensayo.

En el cuadro No. 6 se muestra el efecto inhibitorio que tienen NEM y ddTTP sobre la actividad de la DNA polimerasa en extractos nucleares y solubles provenientes de ejes embrionarios de maíz γ -irradiados embebidos durante 6 horas. El porcentaje de inhibición producido por ambas sustancias es alrededor del 90 % en las condiciones tanto del ensayo α como del ensayo β .

Estos resultados no hacen posible detectar más de una actividad de DNA polimerasa, ya que los extractos nucleares y solubles se comportan de idéntica forma en presencia de NEM y ddTTP. Puedo considerar entonces dos cosas : o que existe solo una actividad enzimática o que las diversas actividades de DNA

polimerasa que están presentes en los diferentes extractos responden todas en forma similar a los inhibidores empleados.

No obstante, pudimos diferenciar actividades enzimáticas mediante el uso de otro inhibidor: la afidicolina. Esta sustancia es un inhibidor específico de DNA polimerasas tipo α de animales y plantas.

Los experimentos siguientes se refieren al efecto de afidicolina.

En la figura No. 1 se muestra la sensibilidad a afidicolina de las DNA polimerasas de los extractos nucleares tanto en el ensayo tipo α como en el tipo β . Lo que observamos, es que en ambos tipos de ensayo la inhibición por afidicolina es máxima a las 3 horas de imbibición (53% y 41% para α y β respectivamente) disminuyendo ésta desde las 6 horas, permaneciendo más o menos constante hasta las 24 horas de germinación en cada tipo de ensayo.

En la figura No.2 se muestra el comportamiento de las polimerasas del extracto soluble frente al inhibidor afidicolina; lo que se observa es que para las polimerasas ensayadas en las condiciones α se llega a un máximo de inhibición a las 6 horas de germinación (72 %), disminuyendo hasta alrededor del 10 % a las 24 horas de imbibición. En el ensayo tipo β el pico de inhibición se obtiene a las 3 horas de imbibición (37 %) disminuyendo igualmente hasta alrededor del 0 % a las 24 horas de germinación.

La inhibición por afidicolina resulta ser superior para las

Sensibilidad a Afidicolina

Extracto nuclear

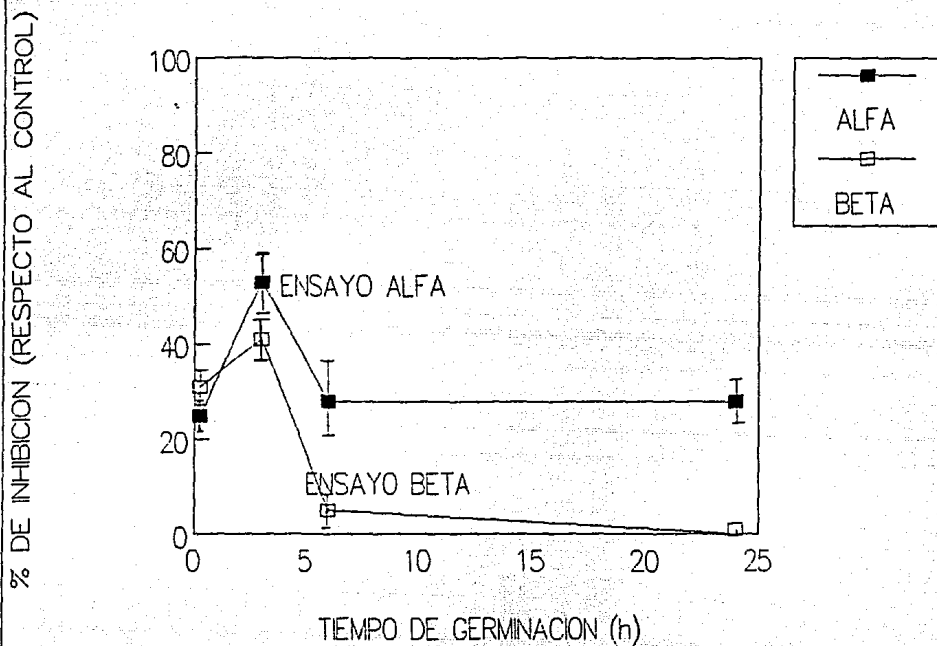


Figura No. 1.- Sensibilidad a Afidicolina de las DNA polimerasas presentes en los extractos nucleares de ejes embrionarios de maiz (control), germinados durante diferentes tiempos.

Sensibilidad a Afidicolina

Extracto soluble

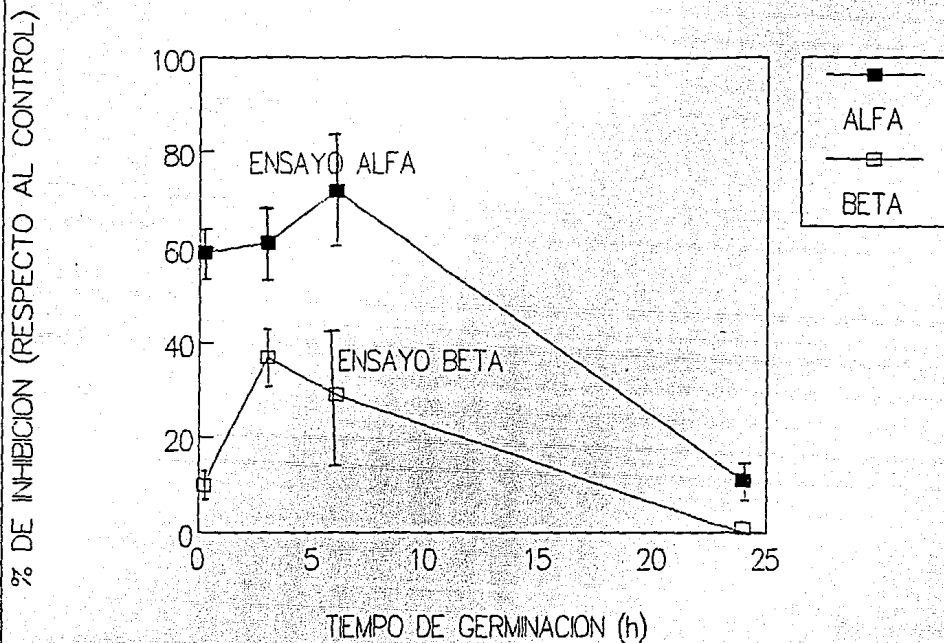


Figura No. 2.- Sensibilidad a Afidicolina de las DNA polimerasas presentes en los extractos solubles de ejes embrionarios de maiz (control), germinados durante diferentes tiempos.

DNA polimerasas provenientes de extractos solubles en comparación con aquellas provenientes de extractos nucleares, en particular durante las 3 y las 6 horas de imbibición, hacia las 24 horas de imbibición, la sensibilidad a afidicolina disminuye o permanece constante en todos los extractos. Esto refuerza la posibilidad de que existan por lo menos 2 actividades de DNA polimerasas.

En el cuadro No. 7 se muestra la sensibilidad a afidicolina de extractos nucleares y solubles de ejes embrionarios γ -irradiados embebidos durante 3 horas. La mayor inhibición se logra en el extracto nuclear bajo las condiciones del ensayo α ; en el ensayo tipo β inhibe un promedio de 5 %. La polimerasa presente en el extracto soluble presenta mayor sensibilidad a afidicolina tanto en el ensayo α como en el ensayo β .

En el cuadro No. 8 mostramos el efecto de la afidicolina en extractos nucleares y solubles de ejes embrionarios γ -irradiados, embebidos durante 6 horas. El extracto nuclear presenta una sensibilidad del 39 % en el ensayo tipo α y de 20 % en el ensayo tipo β . Las DNA polimerasas del extracto soluble presentan una inhibición del 60 % en el ensayo tipo α , y del 25 % en el ensayo tipo β .

Varias conclusiones pueden extraerse de los experimentos anteriores. La respuesta a NEM y a ddTTP es idéntica a todos los tiempos de imbibición y bajo todas las condiciones de ensayo. Es decir, no es posible diferenciar actividades de DNA polimerasas presentes en núcleos usando estos inhibidores. No constituyen un criterio adecuado para intentar distinguir a las DNA polimerasas presentes en esos extractos.

3 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO		
EXTRACTO	ALFA	BETA
	% DE INHIBICION	
NUCLEAR (NU)	29 _± 7	5 _± 2
SOLUBLE (SO)	39 _± 5	27 _± 6

CUADRO No. 7.-RESPUESTA DE LAS ACTIVIDADES DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO NUCLEAR Y SOLUBLE PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (γ - IRRADIADOS) EMBEBIDOS DURANTE 3h FRENTE A AFIDICOLINA (LOS VALORES SE EXPRESAN COMO % DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA(AE) OBTENIDA EN LOS CONTROLES; ENSAYO α : AFInu=27⁻8, AFIso=130⁻24. ENSAYO β : AFInu=37⁻5, AFIso= 58⁻20. AE= CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.

6 HORAS DE GERMINACION

TIPO DE ENSAYO		
EXTRACTO	ALFA	BETA
	% DE INHIBICION	
NUCLEAR (NU)	39 _± 5	20 _± 5
SOLUBLE (SO)	60 _± 10	25 _± 3

CUADRO No. 8.-RESPUESTA DE LAS ACTIVIDADES DE LAS DNA POLIMERASAS DEL EXTRACTO NUCLEAR Y SOLUBLE PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS (γ - IRRADIADOS) EMBEBIDOS DURANTE 6h FRENTE A AFIDICOLINA (LOS VALORES SE EXPRESAN COMO % DE INHIBICION). ACTIVIDAD ESPECIFICA(AE) OBTENIDA EN LOS CONTROLES; ENSAYO α : AFInu=68⁻12, AFIso=97⁻13. ENSAYO β : AFInu=32⁻10, AFIso=54⁻10. AE= CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA CONTENIDA EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.

Igualmente, las condiciones de ensayo (tipo α y tipo β) no pueden considerarse como criterios adecuados para clasificar y/o diferenciar las DNA polimerasas presentes en núcleo, ya que las condiciones del ensayo β no disminuyen apreciablemente la actividad de la DNA polimerasa presente en los extractos nucleares y solubles. Este criterio también puede descartarse como válido y/o adecuado para lograr la diferenciación de las DNA polimerasas presentes. Con respecto a afidicolina, lo interesante es que frente a este inhibidor la sensibilidad de los diferentes extractos varía en relación al tiempo de germinación, siendo mayor ésta en los extractos de 3 y 6 horas de germinación que en los de 24 horas.

Esta respuesta diferencial de la actividad de DNA polimerasa (nuclear y soluble) frente a afidicolina puede significar lo siguiente: que en los extractos nuclear y soluble tengamos por lo menos 2 actividades de DNA polimerasas y la sensibilidad a afidicolina varía con el avance de la germinación porque la proporción de ambas polimerasas varía también durante este mismo proceso.

Otro resultado interesante es aquel obtenido con los extractos nucleares y solubles procedentes de ejes embrionarios γ -irradiados, en presencia de afidicolina. No se encuentran diferencias significativas entre la sensibilidad a afidicolina de los extractos nucleares y solubles de ejes embrionarios γ -irradiados en relación a su contraparte proveniente de ejes control. Es decir, en este período de la germinación (3 a 6 horas) la tendencia al aumento o la disminución en la sensibilidad a la

afidicolina es más o menos la misma en las DNA polimerasas de ejes embrionarios control y γ -irradiados. Esto es importante, ya que de acuerdo al conocimiento actual, la DNA polimerasa que participa en la reparación del DNA en eucariotes (en mamíferos principalmente), la DNA polimerasa β es insensible a afidicolina, mientras que lo que observamos en nuestros experimentos es que la sensibilidad a afidicolina aumenta entre las 3 y las 6 horas de germinación en los extractos de ejes embrionarios γ -irradiados (esto es, en un sistema en que la síntesis reparativa del DNA ha sido estimulada y toda la maquinaria enzimática que la acompaña). Nuestros experimentos no nos permiten afirmar a la luz de la literatura existente, la posible presencia de una polimerasa de tipo reparativo que actúe en forma preferencial en ejes embrionarios de maíz γ -irradiados durante las primeras 6 horas de la germinación, pero tampoco la descartan. En la discusión se abundará más al respecto.

Es evidente que los estudios previos resultaron insuficientes para obtener una idea clara sobre las características de las DNA polimerasas presentes en núcleos de ejes embrionarios de maíz durante las primeras horas de la germinación. Por esta razón, se procedió a la purificación parcial de las DNA polimerasas nucleares mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna de DEAE-Celulosa. Los resultados se describen a continuación (se muestra un experimento representativo de por lo menos tres similares).

En la figura No. 3 se muestra el perfil de elución que resultó al cromatografiar el extracto nuclear de ejes no embebidos

0 HORAS DE GERMINACION

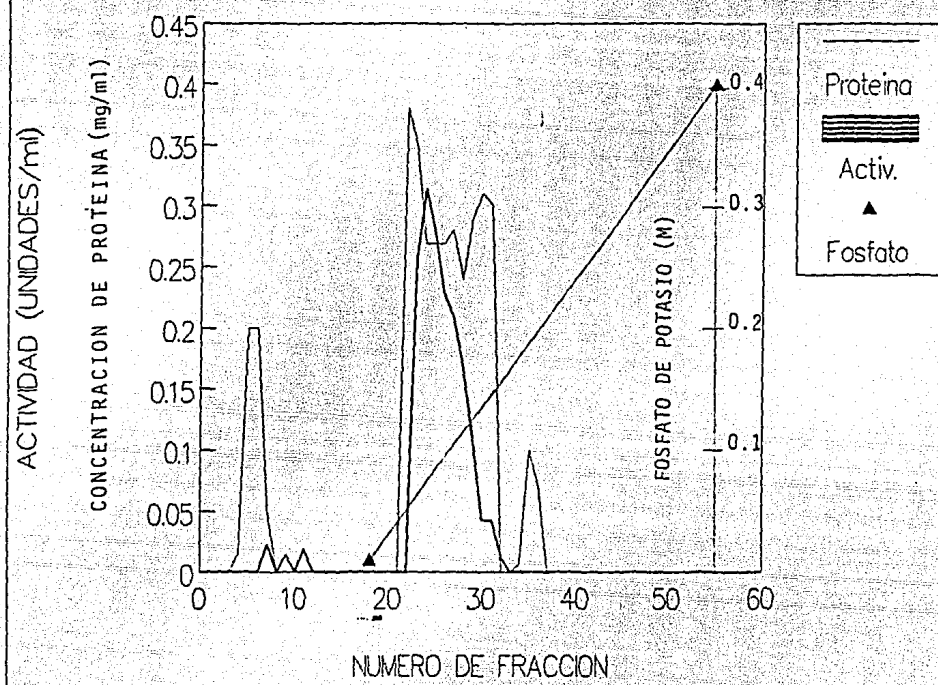


Figura No. 3.- Perfil de elucion en DEAE-celulosa de las DNA polimerasas presentes en el extracto nuclear de ees embrionarios de maiz germinados durante 0 horas (esto es no enbebidos).

CUADRO No. 9

INHIBIDOR Y/O ESTIMULADOR	% DE INHIBICION CON RESPECTO AL CONTROL
NEM	90 %
AFIDICOLINA	10 %
DDTTP	95 %
KCL 200MM	LIGERA ESTIMULACION
KCL 250MM	INHIBE \pm 40 %

CARACTERIZACION DEL PICO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA OBTENIDO AL PASAR EL EXTRACTO NUCLEAR DE EJES EMBEBIDOS 0H A TRAVES DE UNA COLUMNA DE DEAE CELULOSA.

CUADRO No. 10

INHIBIDOR Y/O ESTIMULADOR	% DE INHIBICION CON RESPECTO AL CONTROL
NEM	90 %
AFIDICOLINA	9 %
DDTTP	95 %
KCL 200MM	LIGERA ESTIMULACION
KCL 250MM	INHIBE \pm 40 %

CARACTERIZACION DEL PICO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA OBTENIDO AL PASAR EL EXTRACTO NUCLEAR DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 3 h A TRAVES DE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

(0 horas) a través de una columna de DEAE-Celulosa. Se obtuvo un solo pico de actividad relativamente amplio (que se extiende de una concentración de fosfatos que va de 80 a 120 mM). La caracterización de este pico de actividad con inhibidores y fuerza iónica se muestra en el cuadro No. 9 . La actividad de DNA polimerasa presente en el pico resultó ser inhibida por NEM y ddTTP; la afidicolina casi no afecta a esta actividad de DNA polimerasa (produce una inhibición de alrededor del 10 %). Una concentración de KCl de 200 mM estimula ligeramente la actividad de la DNA polimerasa presente en el pico de actividad, mientras que una concentración de 250 mM (de KCl) es capaz de inhibirla hasta en un 40 %.

En la figura No. 4 se presenta la purificación del extracto nuclear obtenido de ejes embrionarios de 3 horas de germinación , a través de DEAE-celulosa. De nuevo se obtuvo un solo pico de actividad de DNA polimerasa el cual eluyó entre una concentración de fosfatos que fluctuó entre 90 y 120 mM. Al someterse este pico de actividad a la caracterización se obtuvieron los resultados observados en el cuadro 10. De nuevo, NEM y ddTTP inhibieron alrededor del 90 %, afidicolina ejerció una inhibición menor al 10 % y KCl 200 mM estimuló de nuevo ligeramente la actividad enzimática. La actividad enzimática se inhibió en presencia de KCl 250 mM en más o menos un 40 %.

En la figura No. 5 , se presenta el perfil de elución obtenido al pasar a través de DEAE-Celulosa el extracto nuclear de ejes embrionarios embebidos durante 6 horas. Otra vez, se obtiene un solo pico de actividad que eluye en un intervalo de

3 HORAS DE GERMINACION

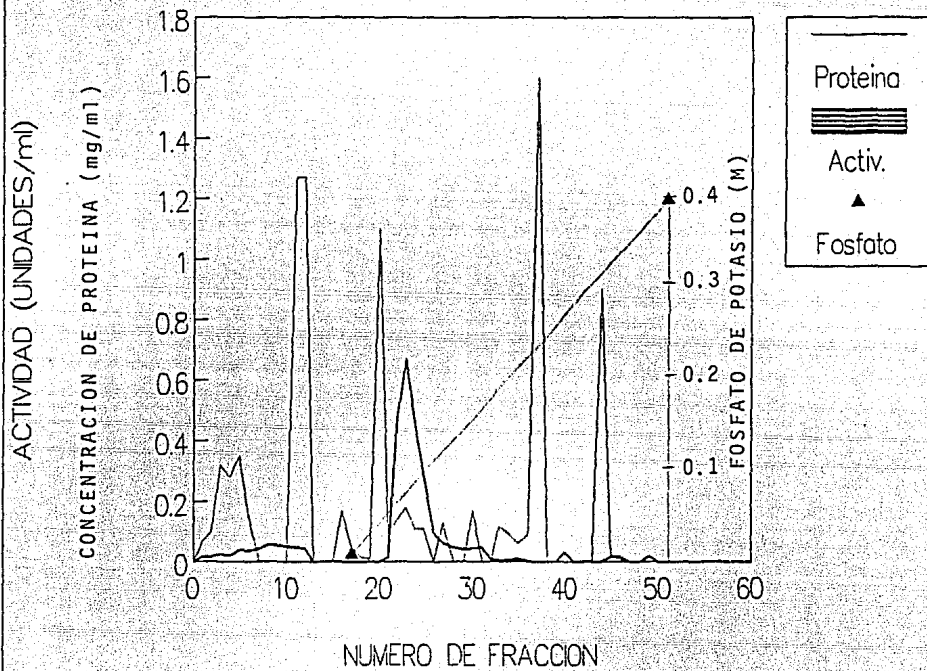


Figura No. A.- Perfil de elucion en DEAE-celulosa de las DNA de las fracciones purificadas y el extracto nuclear de ejes embrionarios de maiz germinados durante 3 horas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

6 HORAS DE GERMINACION

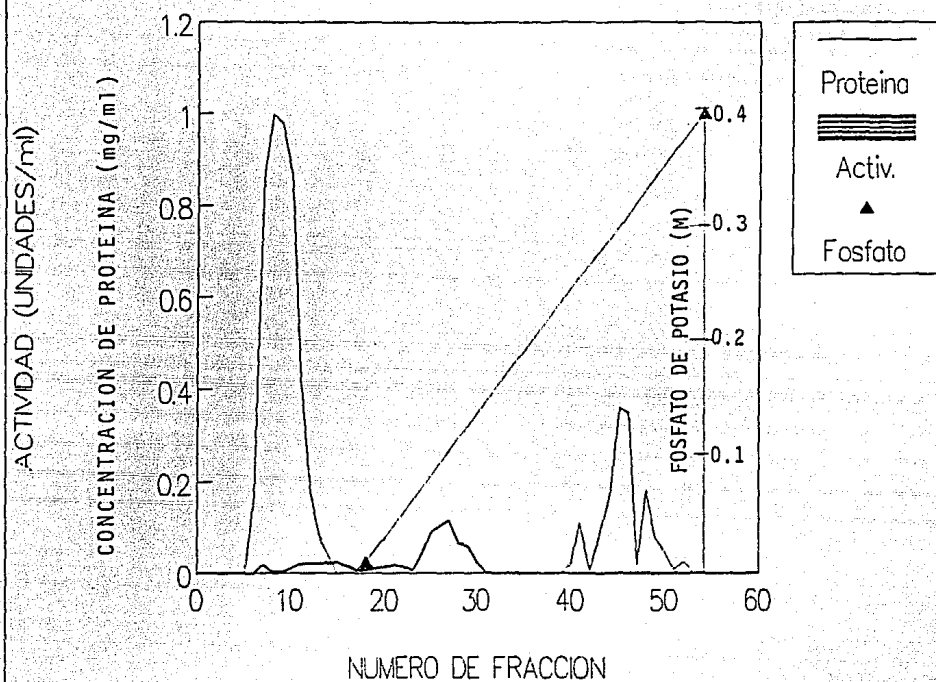


Figura No. 5.- Perfil de elución en DEAE-celulosa de las DNA polimerasas presentes en el extracto nuclear de ojos embrionarios de salmón germinados durante 6 horas.

concentración de fosfatos que va de 110 a 140 mM. Al ser caracterizado este pico, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro No. 11, NEM y ddTTP inhibieron la actividad de la DNA polimerasa en alrededor del 90 %; afidicolina no parece afectar a la actividad de la DNA polimerasa en este pico (inhibición menor al 5 %). KCl 200 mM produce una elevada estimulación de alrededor del 50 %, en cambio KCl 250 % produce inhibición de la actividad enzimática que fluctúa entre un 40 y 50%. En este caso, se probó también la capacidad de esta actividad de DNA polimerasa para utilizar un molde sintético (un Polihomorribonucleótido formado por poli rA-oligo dT). El resultado obtenido indica que la enzima presente en el pico de actividad es capaz de utilizar el molde sintético con alta eficiencia (90 %), como se muestra en el cuadro No. 11A. Previamente se indagó la capacidad de los extractos nucleares y solubles para utilizar el molde sintético antes mencionado (poli rA-oligo dT); los resultados indican que dicho molde es empleado un poco más eficientemente por el extracto nuclear que por el soluble.

La figura No. 6 muestra el perfil de elución obtenido como resultado de la purificación del extracto nuclear de ejes embrionarios germinados durante 24 horas. Se obtuvo un solo pico de actividad de DNA polimerasa que eluye en un intervalo de concentración de fosfatos que va de 100 a 140 mM. La caracterización del pico de actividad que se resume en el cuadro No. 12, arrojó los siguientes resultados: NEM y ddTTP inhibieron en una proporción mayor al 90 %. Afidicolina virtualmente no cambió (inhibición menor al 5 %). La actividad de la DNA

CUADRO No. 11

INHIBIDOR Y/O ESTIMULADOR	% DE INHIBICION CON RESPECTO AL CONTROL
NEM	85 %
AFIDICOLINA	5 %
DDTTP	100 %
KCL 200MM	ESTIMULACION DEL 50 %
KCL 250MM	INHIBE ENTRE 40 A 50 %

CARACTERIZACION DEL PICO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA OBTENIDO AL PASAR EL EXTRACTO NUCLEAR DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 6 h A TRAVES DE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

CUADRO No. 12

INHIBIDOR Y/O ESTIMULADOR	% DE INHIBICION CON RESPECTO AL CONTROL
NEM	90 %
AFIDICOLINA	5 %
DDTTP	100 %
KCL 200MM	ESTIMULACION DEL 24 %
KCL 250MM	INHIBICION DEL 50 %

CARACTERIZACION DEL PICO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA OBTENIDO AL PASAR EL EXTRACTO NUCLEAR DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 24 h A TRAVES DE UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

24 HORAS DE GERMINACION

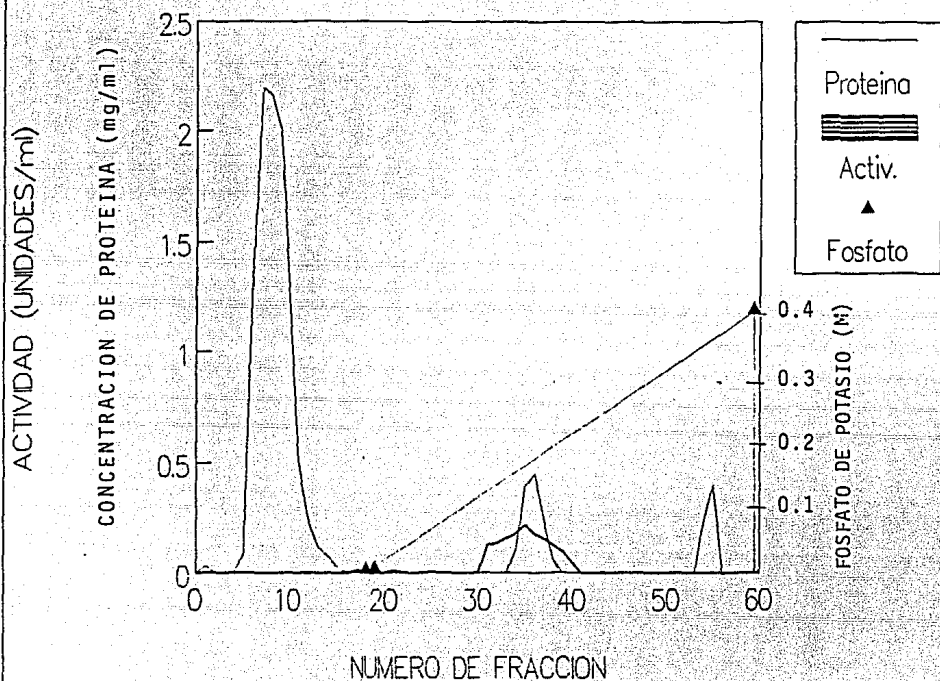


Figura No. 6.- Perfil de elución en DEAE-celulosa de las LNA polimerasas presentes en el extracto nuclear de ejes embrionarios de maíz germinados durante 24 horas.

CUADRO No. 11 A

EXTRACTO ENZIMATICO	% DE UTILIZACION DE MOLDE SINTETICO.
SOLUBLE	42.5
NUCLEAR	55.2
PICO DE ACTIVIDAD	90.0

CAPACIDAD DE UTILIZACION DE POLI rA-OLIGO dT COMO MOLDE POR EL EXTRACTO SOLUBLE, NUCLEAR Y EL PICO DE ACTIVIDAD OBTENIDO EN DEAE-CELULOSA DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 6 HORAS. CPM INCORPORADAS POR LAS REACCIONES CONTROL. CoNudact=30,261, CoSodact=5407, CoNupolia=16,746, CoSopolia=2149. ACTIVIDAD ESPECIFICA (AE): CoNudact=540, CoSodact=70.1, CoNupolia=298, CoNupolia=29.8. AE= CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LA CANTIDAD DE μg DE PROTEINA PRESENTE EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO. CPM INCORPORADAS POR EL PICO DE ACTIVIDAD: CoNudact=4166, CoSopolia=3898. ESTE ES EL RESULTADO DE UN EXPERIMENTO REPRESENTATIVO DE POR LO MENOS 3 QUE SE REALIZARON.

polimerasa en presencia de KCl 200 mM resultó estimulada en alrededor de un 20 %. En contraste, KCl 250 mM inhibió la actividad enzimática en alrededor del 50 %.

El pico de actividad enzimática fue analizado en su capacidad para utilizar el molde sintético poli rA-oligo dT. Resultó ser bastante baja (alrededor del 10 % con respecto al control de DNA activado). No obstante, tanto el extracto soluble como el extracto nuclear mostraron una tendencia ligeramente mayor a la utilización de este molde sintético (fue entre 10 a 15% de la incorporación obtenida en el control con DNA activado). Todos estos resultados están resumidos en el cuadro No. 12A.

CUADRO No. 12 A

EXTRACTO ENZIMATICO	% DE UTILIZACION DE MOLDE SINTETICO.
SOLUBLE	13.0
NUCLEAR	15.7
PICO DE ACTIVIDAD	10.0

CAPACIDAD DE UTILIZACION DE POLI rA-OLIGO dT COMO MOLDE POR EL EXTRACTO SOLUBLE, NUCLEAR Y EL PICO DE ACTIVIDAD OBTENIDO EN DEAE-CELULOSA DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 24 HORAS.CPM - INCORPORADAS POR LAS REACCIONES CONTROL. CoNuDACT=16,000, CoSoDACT=4833, CoNuPOLIA=2550, CoSoPOLIA=645. ACTIVIDAD ESPECIFICA(AE). CoNuDACT=644, CoSoDACT=63.6, CoNuPOLIA=102, CoSoPOLIA=8.5. AE= CPM INCORPORADAS DIVIDIDAS ENTRE LOS μ g DE PROTEINA PRESENTE EN LA ALICUOTA DE EXTRACTO.CPM INCORPORADAS POR LA DNA POLIMERASA PRESENTE EN EL PICO DE ACTIVIDAD. CoDACT=1688, CoPOLI=169. SE PRESENTE UN EXPERIMENTO REPRESENTATIVO DE TRES REALIZADOS.

VII.-DISCUSION

En la literatura se consigna la posible presencia de DNA polimerasas con función reparativa (tipo β), como enzimas de bajo peso molecular y fuertemente unidas a la cromatina. Los intentos por caracterizar una polimerasa con estas características en plantas han sido poco exitosos. Es un hecho aceptado que durante las primeras horas de la germinación de semillas de cereales, entre ellos el maíz, la síntesis de DNA que se lleva a efecto y que es posible detectar, es de tipo reparativo (Osborne, 1982, 1983 y 1984; Vázquez-Ramos y Osborne, 1986). Desde entonces uno de los objetivos planteados por nuestro laboratorio ha sido la purificación y/o caracterización de las DNA polimerasas que participan en dicho proceso reparativo.

El presente trabajo se planteó la caracterización y posterior purificación parcial de las DNA polimerasas presentes en los núcleos de células de ejes embrionarios de maíz germinados durante 0, 3, 6, y 24 horas. Contamos con evidencia indirecta de que la síntesis del DNA nuclear que se presenta en maíz durante las primeras 6 horas de germinación es de tipo reparativo (Meléndez López, 1987; Meléndez López *et al*, 1989; Zarain-Herzberg *et al*, 1987).

En los cuadros 1 al 4, se presenta el efecto que ejercen NEM y ddTTP sobre la actividad de las DNA polimerasas de extractos solubles y nucleares de todos los tiempos de imbibición; lo que se puede observar es que el efecto de estas sustancias es total, es decir, inhiben en todos los casos la actividad de las DNA

polimerasas presentes en un 90 % o más. De estos resultados se desprende que el uso de estos 2 inhibidores no permite la diferenciación de las actividades de las DNA polimerasas y que la respuesta de éstas a las sustancias en cuestión es idéntica. No se descarta que en los extractos exista solo una actividad de DNA polimerasa y que dé este tipo de respuesta, aunque no es improbable pensar que pudieran existir 2 o más actividades de DNA polimerasa que respondieran en forma similar a estos inhibidores.

Las diferentes condiciones en que se ensayó la actividad de las DNA polimerasas (ensayos tipo α y β), no permitieron su diferenciación ya que las condiciones del ensayo β no afectaron sensiblemente alguna actividad en todos los tiempos de imbibición. Abandonamos también la pretensión de tratar de determinar polimerasa tipo β con la utilización del ensayo clásico (esto es incorporando NEM) ya que NEM siempre inhibió a cualquier actividad presente.

Entonces, decidimos utilizar solo las condiciones de PH y fuerza iónica (eliminando NEM) de este ensayo como un criterio para diferenciar las DNA polimerasas; sabíamos de antemano que probablemente los resultados tendrían restricciones, tal como sucedió, ya que las condiciones del ensayo tipo β no llegaron a inhibir nunca la actividad de la DNA polimerasa en un porcentaje superior al 50% (con respecto al ensayo α), en todos los extractos de todos los tiempos de imbibición.

La respuesta a NEM y ddTTP de las polimerasas presentes en extractos nucleares y solubles, provenientes de ejes embrionarios γ -irradiados, fue idéntica a la observada por aquéllas

provenientes de ejes embrionarios control. Se pueden observar estos resultados en los cuadros 5 y 6. En este caso tampoco estos inhibidores permitieron diferenciar entre diferentes actividades de DNA polimerasa, e inclusive no se encontró estimulación de la actividad de la DNA polimerasa en estos extractos (de ejes embrionarios y-irradiados) ya que su actividad específica estaba al nivel de los control.

A la luz de los resultados anteriores, adquiere vital importancia la respuesta obtenida por los extractos nucleares y solubles de todos los tiempos de imbibición frente a afidicolina (como se observa en las figuras 1 y 2); la inhibición que ejerce esta sustancia varía con el tiempo de germinación, este hecho podría indicar quizá la presencia de por lo menos dos diferentes actividades de DNA polimerasa cuyas proporciones varíen a lo largo de la germinación (por ello la respuesta diferencial a afidicolina).

Esta respuesta tan definida a la afidicolina descarta que alguna condición como el pH haya modificado a la misma y por ende su efecto inhibitorio sobre la actividad de la DNA polimerasa. Los porcentajes de inhibición son perfectamente repetitivos como lo indican las desviaciones estándar en las figuras 1 y 2. resultados. En conclusión, las condiciones del ensayo no modificaron el efecto que ejerce la afidicolina sobre la actividad de las diferentes DNA polimerasas.

Tomando en consideración estos resultados se procedió a tratar de resolver las posibles actividades de las DNA polimerasas nucleares obtenidas de ejes embrionarios embebidos durante

diferentes tiempos (0, 3 6 y 24 horas) a través de una columna de DEAE-Celulosa . Los resultados que se muestran en las figuras 3 a 6 , indican que existe preponderantemente una DNA polimerasa (en base a un comportamiento cromatográfico muy similar) y cuyas características se desglosaron en las tablas 9 a 12, estas son: inhibición por NEM y ddTTP superior al 90 %, afidicolina casi no inhibe (10 % o menos), KCl 200 mM (condición de elevada fuerza iónica) estimula la actividad de la DNA polimerasa mientras que KCl 250 mM es capaz de ejercer cierto efecto inhibitorio sobre la misma.

En nuestro laboratorio ya había sido purificada parcialmente y caracterizada una sola actividad de DNA polimerasa (a las 3 y las 24 horas de imbibición) a partir de extractos solubles totales (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988). No obstante existen 2 diferencias fundamentales entre esta DNA polimerasa y la caracterizada en este trabajo. En el comportamiento cromatográfico , nuestra enzima eluye a una concentración de fosfatos que fluctúa entre 90 y 130 mM, mientras que la obtenida previamente eluía a una concentración de fosfatos de entre 210 a 240 mM. La segunda diferencia reside en la sensibilidad de éstas actividades de DNA polimerasa a alta fuerza iónica ; la enzima que previamente fue aislada en nuestro laboratorio se inhibe a una fuerza iónica de KCl 100 mM , mientras que la enzima que hemos purificado en este trabajo, no se inhibe con esta concentración de KCl, sino que aún a fuerzas iónicas mayores (KCl 200 mM) la actividad de esta polimerasa se estimula. Además, en este trabajo demostramos que esta actividad de DNA polimerasa es sensible a la inhibición por ddTTP. este inhibidor no se empleó en el trabajo previo (Vázquez y Vázquez-Ramos, 1988).

En los cuadros 11 A y 12 A se demuestra que esta actividad es capaz de utilizar un molde sintético de poli rA-Oligo dT (sobre todo a las 6 horas de Germinación).

Una explicación al hecho de que la sensibilidad a afidicolina disminuya al pasar a través de DEAE-Celulosa puede ser que solo se separe una sola actividad de DNA polimerasa, perdiéndose otra u otras actividades enzimáticas por alguna razón que aún desconocemos, o que durante este proceso de purificación se pierda o inactive algún factor que sea el que determina la sensibilidad a afidicolina.

Con respecto al comportamiento de las DNA polimerasas de extractos solubles y nucleares provenientes de ejes embrionarios γ -irradiados embebidos durante 3 y 6 horas frente a afidicolina, resulta interesante que no haya sido posible encontrar diferencias significativas en la respuesta a afidicolina, entre estas DNA polimerasas (de ejes γ -irradiados) y aquéllas provenientes de ejes control. En estos experimentos se esperaba que la sensibilidad a afidicolina variara, si bajo las condiciones de daño al DNA se estimulara un proceso de reparación del mismo, en el cual deberá actuar en forma preponderante una DNA polimerasa con función reparativa. Aunque no se observó un cambio en la sensibilidad a afidicolina, ni un aumento en la actividad específica de la DNA polimerasa a estos tiempos de la germinación (3 y 6 horas), esto no descarta que un proceso de reparación se lleve a efecto y que algún tipo de DNA polimerasa esté involucrada y actúe en forma importante durante esta etapa de la germinación. Probablemente nuestros experimentos no fueron los más adecuados para demostrarlo.

Si comparamos las características de la actividad de DNA polimerasa que hemos purificado parcialmente a partir de los extractos nucleares, podríamos clasificar a esta DNA polimerasa nuclear como una polimerasa de tipo γ (Castroviejo et al., 1979; Litvak y Castroviejo, 1987) de plantas, basándonos en las características ya establecidas de las DNA polimerasas tipo γ de animales y plantas que se muestran en los cuadros B y C.

Sin embargo, creemos que son necesarios más estudios para que esto sea completamente evidente, como el cálculo del peso molecular de esta enzima una vez que haya sido purificada más extensivamente.

Observando de nuevo los cuadros B y C, encontramos que la única diferencia entre nuestra DNA polimerasa nuclear y la DNA polimerasa β de animales (y plantas), sería su susceptibilidad a NEM. Se ha reportado que la DNA polimerasa tipo β de plantas es más sensible a NEM que su contraparte de animales (Stevens et al., 1978; Chivers and Bryant, 1983; Litvak y Castroviejo, 1987). Considerando las características que hemos establecido de nuestra DNA polimerasa, si la comparamos con la DNA polimerasa tipo γ de plantas y animales, resultaría muy similar si no idéntica (tomando solo en cuenta las características establecidas).

Finalmente, consideramos que el hecho de que no hayamos podido aislar más que una sola actividad de DNA polimerasa en la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Celulosa), no indica que sólo esa actividad de DNA polimerasa se encuentre presente en

CUADRO D

CARACTERÍSTICAS DE LAS DNA POLIMERASAS TIPO γ Y LA DNA
POLIMERASA NUCLEAR DE MAÍZ.

	DNA POL γ DE MAMÍFEROS	DNA POL γ DE PLANTAS	DNA POL NUCLEAR DE MAÍZ
PH ÓPTIMO	8 - 9	8 - 9	7.6 - 8.5
USO DE UN HOMO- RRIBOPOLÍMERO - COMO MOLDE SIN- TÉTICO Poli rA- Oligo dT.	SI	SI	SI
EFFECTO DE IN- HIBIDORES.			
BLOQUEADORES DE -SH (NEM).	FUERTE	FUERTE	FUERTE
FUERZA IÓNICA: KCl 200 mM.	ESTIMULA	ESTIMULA	ESTIMULA
DIDESOXITIMIDI- NA TRIFOSFATO. (ddTTP)	FUERTE	FUERTE	FUERTE
AFIDICOLINA	NO	NO	NO
FUNCIÓN PROPUESTA	Duplicación y reparación del genoma mitocon- drial.	Duplicación reparación del genoma mito- condrial y cloroplástico.	Desconocida aún.
LOCALIZACIÓN	MITOCONDRIA y NÚCLEO ?	MITOCONDRIA NÚCLEO CLOROPLASTO ?	NÚCLEO.

REFERENCIA: BRYANT Y DUNHAM, 1988.

núcleos de ejes embrionarios de maíz durante las primeras horas de germinación. Algunas explicaciones a lo anterior podrían ser las que a continuación se enumeran: las otras DNA polimerasas son muy lábiles o susceptibles a proteólisis; éstas se encuentran en muy baja cantidad a esos tiempos de la germinación, de tal forma que su actividad es difícilmente detectada; dos o más actividades de DNA polimerasas pudieron haber copurificado (esto podría descartarse a la luz de los resultados obtenidos con el inhibidor afidicolina, ya que la actividad obtenida al pasar por la columna resultó ser insensible a la misma). Las anteriores son explicaciones probables de los resultados que hemos obtenido.

Finalmente, pensamos que nuestro trabajo, aunque no permite llegar a conclusiones definitivas, contribuirá a enriquecer la literatura del tema.

VIII. CONCLUSIONES

1.-NEM Y dJTP NO PERMITEN DIFERENCIAR ENTRE DIFERENTES ACTIVIDADES DE DNA POLIMERASAS TANTO EN LOS EXTRACTOS NUCLEARES O SOLUBLES PROVENIENTES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ, O EN FRACCIONES PARCIALMENTE PURIFICADAS, DE PROCEDENCIA NUCLEAR.

ES MUY PROBABLE QUE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACION DE DNA POLIMERASAS APLICADOS A LOS SISTEMAS DE CELULAS ANIMALES NO SE PUEDEN USAR PARA AQUELLAS DE CELULAS VEGETALES.

2.-EL INHIBIDOR AFIDICOLINA AL INHIBIR EN FORMA DIFERENCIAL A LAS DNA POLIMERASAS PRESENTES EN EXTRACTOS SOLUBLES Y NUCLEARES DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ, NOS DA IDEA DE LA EXISTENCIA DE POR LO MENOS DOS ACTIVIDADES DE DNA POLIMERASAS.

3.-LA PURIFICACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES DE EJES EMBRIONARIOS EMBEBIDOS DURANTE 0, 3, 6 Y 24 HORAS A TRAVES DE DEAE-CELULOSA, SOLO PERMITIO LA RESOLUCION DE UN PICO DE ACTIVIDAD. ESTE RESULTADO NO DESCARTA QUE MEDIANTE OTRAS METODOLOGIAS O MODIFICACION DE ESTA MISMA, SE PUEDA RESOLVER MAS DE UN PICO DE ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA.

4.- LAS CARACTERISTICAS QUE SE LE DETERMINARON A LA DNA POLIMERASA OBTENIDA A TRAVES DE DEAE-CELULOSA, CORRESPONDEN A UNA DNA POLIMERASA DE TIPO γ DE CELULAS ANIMALES Y VEGETALES.

IX.- R E F E R E N C I A S

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

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

Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J. and Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant. Physiol.* 135: 426-431.

Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali-Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A., and Spadari, S. (1976). Variation of DNA polymerase α and β during prolonged stimulation of human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 785-789.

Bewley, J.D. and Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. I, Development, germination and Growth.* Springer-Verlag, Berlin, FRG., pp: 1-3, 7-17, 107, 115, 117, 153-171.

Bewley, J.D. and Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. II. Viability, Dormancy and Environmental control.* Springer-Verlag, Berlin, FRG, pp. 17-21, 27-39.

Bewley, J.D., and Black, M. (1986). *Seeds.- Physiology of Development and Germination.* Plenum press. New York, USA. pp: 89-171.

Boldem, A., Aucker, J., Weissbach, A. (1975). Synthesis of herpes simplex virus, vaccinia virus, and adenovirus DNA in isolated HeLa cell nuclei. *J. Virol.* 16: 1584-1592.

Bollum, F.J. (1960). Calf Thymus polymerase. *J. Biol. Chem.* 235: 2399-2403.

Brooker, J.D., Cheung, C.P. and Marcus, A. (1977). In *physiology and biochemistry of seed dormancy and germination.* (A.A.,

Bryant, J.A. and Dunham, V.L. (1988). Replication of nuclear DNA. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Vol 5. 23-55.

Buchowicz, J., Kraszewska, E. and Eberhardt, J. (1978). Characterization of the early synthesized DNA in germinating *Triticum aestivum* embryos. Phytochem. 17: 1481-1484.

Castroviejo, M.L., 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 cytoplasm and one from purified mitochondria. Biochem. J., 181: 183-191.

Chang, L.M.S. (1976). Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin. J. Biol. Chem. 248: 3789-3795.

Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. (1978). DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. Nature. 272: 593-599.

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

Chen, D., Sarid, S., and Katchalski, E. (1968). Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60: 902-909.

Cheung, C.P., Wu, J. and Suhaldonik, R.J. (1979). Dependence of protein synthesis on RNA synthesis during the early hours of germination of wheat embryos. Nature. 263: 679-682.

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

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

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

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

Date, T; Yamaguchi, M; Hirose, F; Nishimoto, Y; Tanihara, K; Matsukage, A. (1988). Expression of rat DNA polymerase β in *Escherichia coli*. *Biochem.* 27:2983-2990.

Downey, K.M., Tan, C.K., Andrews, D.M., Li, X., y So, A.G. (1988), in cancer cells 6: Eucaryotic DNA replication (Kelly, T.J., and Stillman, B, eds), pp: 403-410, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Dur , L.S. and Waters, L. (1965) Long lived messenger RNA: evidence from cottonseed germination. *Science*, 147: 410-412.

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

Focher, F., Ferrari, E., Spadari, S, and Hubscher, U. (1988). Do DNA polymerases δ and α act coordinately as leading and lagging strand replicases? *FEBS Letters.* 229: 6-10.

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

Fukasawa, H., Yamaguchi, M.Y., Chou, M.Y., Matsumoto, H., and Matsukage, A. (1980). Characterization of two DNA polymerases from cauliflower inflorescence. *J. Biochem.* 87: 1167-1175.

Goscin, L.P., and Byrnes, J.J. (1982). DNA polymerase δ : one polypeptide, two activities. *Biochem.* 21: 2513-2518.

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

Hohn, K., and Grosse, F. (1987). Processivity of the DNA polymerase α -Primase complex from calf thymus. *Biochem.* 26: 2870.

Hourmant, A., and Pradet, A. (1981). *Plant Physiol.* 68: 631-635.

Hübscher, U., Kuenzle, C.C., and Spadari, S. (1979). Functional roles of DNA polymerases β and γ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 2316-2320.

Ikegami, S., Taguchi, T., Ohasi, M., Oguro, M., Nagano, H., and Mano, Y. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase α . Nature. 275: 458-460.

Jendrisak, J., and Becker, W.M. (1973). Isolation, purification and characterization of RNA polymerases from wheat germ. Biochem. Biophys. Acta. 319: 48-54.

Kaguni, L.S., Rossignol, J.M., Conaway, R.C., and Lehman, I.R. (1983). Isolation of an intact DNA polymerase-primase from embryos of Protophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:2221-2225.

Klein, S., Barenholz, H., and Budnik, A. (1971). Plant and Cell Physiol. 12: 41-60.

Knopf, K.W., Yamada, M., and Weissbach, A. (1976). HeLa cell DNA polymerase γ : Further purification and properties of the enzyme. Biochem. 15: 4540-4548.

Kornberg, A. (1980). DNA replication. W.H. Freeman and Company. San Francisco. Ca. USA. 167-229.

Lee, M., Tan, C., So, S., and Downey, K. (1980). Purification of Deoxyribonucleic Acid polymerase δ from calf thymus: partial characterization of physical properties. Biochem. 19: 1096-2001.

Lee, M.Y.W.T., Toomey, N.L. (1987). Human placental DNA polymerase δ : identification of a 170 Kd polypeptide by activity staining and immunoblotting. Biochem. 26:1076-2001.

Litvak, S., and Castroviejo, M. (1987). DNA polymerases from plant cells. Mutat. Res. 181: 81-91.

Marcus, A., and Feeley, J. (1964). Activation of protein synthesis in the imbibition phase of seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51: 1075-1079.

Marcus, A., Weeks, D.P., Leis, D.P., and Keller, E.B. (1970). Protein chain initiation by methionyl-tRNA in wheat in wheat embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67:1681-1687.

McKown, R.L., y Tewari, K.K. (1984). Purification and properties of pea chloroplast DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 2354-2358.

Meléndez López, S.G., Ortega Muñoz, R., y Vázquez Ramos, J.M. Naturaleza y localización de la síntesis de DNA durante las primeras horas de la germinación de ejes embrionarios de maíz. (1989). Revista de la Sociedad Química de México. sometido.

Meléndez López, S.G. Patrones de peso molecular del DNA mediante gradientes de sacarosa y geles de agarosa de semillas deterioradas de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. (1987).

Moreland, D.E., Hussey, G.G., Shriner, C.R., and Farmer, F.S. (1974). Plant Physiol. 54: 560-563.

Murray, D.R. (editor) (1984). - Seed Physiology. Vol. II. Germination and reserve mobilization. Academic Press. Australia. pp: 77-111.

Nasheuer, H., and Grosse, F. (1988). DNA polymerase α -primase from calf thymus. Determination of the polypeptide responsible for primase activity. J. Biol. Chem. 263: 8981-8988.

Nakayama, N., Sugimoto, I., and Asahi, T. (1980). Plant Physiol. 65:229-233.

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

Osborne, D.J. (1982). DNA integrity in plant embryos and the importance of DNA repair. In embryonic development. Part B. Cellular aspects. pp: 577-592 (Allan R. Liss, Inc. 150 Fifth Ave. New York, N.Y. 1001).

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

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

Payne, P.I. (1977). Synthesis of poly-A-rich RNA in embryos of rye

during imbibition and early germination. *Phytochemistry*. 16:431-434.

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

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

Sakaguchi, K., and Boyd, J. (1988). Purification and characterization of a DNA polymerase β from *Drosophila*. *J Biol. Chem.* 260: 10,406-10,411.

Sala, F., Amileni, A.R., and Spadari, S. (1980a). A γ -like DNA polymerase in spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 112: 211-217.

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

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

Sala, F., Magnien, E., Galli, M.G., Daschaert, X., Pedrali-Noy, G., and Spadari, S. (1982). DNA repair synthesis in plant protoplasts is aphidicolin resistant. *FEBS. Letters;* 138: 213-217.

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

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

So, A., and Downey, K. (1988). Mammalian DNA polymerases α and δ : current status in DNA replication. *Biochem.* 27: 4591-4595.

Spadari, S., Muller, R., and Weissbach, A. (1974). The

dissimilitude of the low and high molecular deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerases of HeLa cells. J. Biol. Chem. 249: 2991-2992.

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

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

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

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

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

Tamai, K., Kojima, Haraichi, T., Masaki, S., Suzuki, N., Umekawa, H., and Yoshida, S. (1988). Structural study of immunoaffinity-purified DNA polymerase α -DNA-Primase complex from calf thymus. Biochim. Biophys. acta. 950: 263-273.

Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G., and Downey, K.M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase δ from fetal calf thymus. J. Biol. Chem. 261:12,310-12,316.

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

Vázquez Ramos, Alejandra. (1986). Aislamiento y caracterización de la actividad de la DNA polimerasa de maíz. Tesis Maestría. Facultad de Química. UNAM.

Vázquez, A. and Vázquez-Ramos, J.M. (1988). Characteristics of the major DNA polymerases found during early and late maize germination. Can. J. Bot. 66: 1186-1191.

Vázquez Ramos, J.M. y López Murillo, S. (1986). Inhibición in vitro de la síntesis de DNA durante la germinación temprana de embriones de maíz por novobiocina y ara-CTP. Revista de la Sociedad química de México. Vol 30, No. 3, pp: 119-123.

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

Veleminsky, J., Zadrazil, S., Pokorny, V., and Gichner, T. (1977). DNA repair synthesis stimulated by mutagenic N-methyl-Nitrosourea in Barley seeds and wheat embryos. *Mutat. Res.* 44: 43-51.

Vishwanatha, J.K., Coughlin, S.A., Wesolowski-Owen, M., and Baril, E.M. (1986). A multiprotein form of DNA polymerase α from HeLa cells. (Resolution of its associated catalytic activities). *J. Biol. Chem.* 261: 6619-6628.

Wahl, A., Crute, J., Sabatino, R., Bodner, J., Marracino, R.L., Harwell, L.W., Lord, E.M. and Bambara, R.A. (1986). Properties of two forms of DNA polymerases δ from calf thymus. *Biochem.* 23: 1906-1913.

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

Weissbach, A. (1977). Eucaryotic DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 25-47.

Wernette, C., Conway, T., and Kuguni, C. (1988). Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: kinetics, processivity, and fidelity of DNA polymerization. *Biochem.* 15: 4540-4548.

Wilson, S., Abbot, J., and Widen, S. (1988). Progress toward molecular biology of DNA polymerase β . *Biochem. Biophys. Acta.* 949: 149-157.

Wong, S., Wahl, A., Yuan, F., Arai, N., Pearson, B., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, W., and Wang, T. (1988). Human DNA polymerase α gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and Eucaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO. Journal.* 7: 37-47.

Zarain-Herzberg, M., Bernal-Lugo, I., and Vázquez-Ramos, J.M. (1987). Effect of Benzyladenine on the synthesis of DNA during early germination of maize embryo axes. *Mutat. Res.* 181: 103-110.