



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROTEINAS QUE SE ASOCIAN A PCNA DURANTE EL CICLO CELULAR EN LA GERMINACION DE MAIZ.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA:
RUTH GUTIERREZ AGUILAR



2090501



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

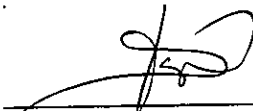
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Raúl Aguilar Caballero
Vocal: Homero Hernández Montes
Secretario: Jorge Manuel Vázquez Ramos
1er Sup.: Rogelio Rodríguez Sotres
2do Sup.: Ma. Manuela Nájera Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

Asesor del Tema:



Dr. Jorge M. Vázquez Ramos

Sustentante:



Ruth Gutiérrez Aguilar

DEDICATORIAS

- A mis padres, Rafael y Margarita, por el cariño, amor, apoyo y formación que siempre me han dado.
- A mis hermanos y familia: Rafael, Judith, Pepe, Carlos, María, Toño, Gerardo, Hilda, Lorraine, Mónica, Sofía, Isabel, Ixchel, Ponchito, Pao, Andrea.
- A mi Miño, Tío Memo y familia.
- A Nuri, Elsa, Viris, Fernanda, Begos, Rocio, Luis, Dorian por compartir conmigo momentos de lucha, alegría y logros.
- A Mary, Ana María, César, Carlos, Lolita, Miren por todos aquellos momentos de victoria y derrotas, no solamente en el softball, sino en mi vida.
- A Ian, Heidi, Maroto, Lalo, Bere, Lorelei, Zeev, Jorge A., Rene, Tere y demás gente que estuvo conmigo en todos estos años de carrera.
- A Santos, María, Julio, Ivan, Sophie, Roxane, Vincent, Gaby, Araceli, Helene, Cecile y a todos aquellos que hicieron tan agradable mi estancia en Montreal.
- A todos aquellos que siempre estuvieron conmigo.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jorge Vázquez por su apoyo y por la confianza que depositó en mi.
- A Mary Paz, "Mi Chief", por todo el tiempo que me dedicó para poder lograr este trabajo. Gracias Chief por todas tus enseñanzas y recomendaciones.
- A Edu, Pilo, Goyo, Dairo, Ceci, Alma, Fabiola, Manuelita por soportarme diario.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
1.1	GERMINACION DE LA SEMILLA DE MAIZ	1
1.2	REPLICACION DEL DNA EN CÉLULAS EUCARIOTES	3
1.3	ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERACION CELULAR (PCNA)	5
1.4	INTERACCION DE PROTEINAS CON PCNA	6
1.5	PCNA Y EL CICLO CELULAR	8
1.6	PCNA Y LA REPARACION DEL DNA	11
1.7	PCNA EN PLANTAS SUPERIORES	13
II.	ANTECEDENTES.....	14
III.	HIPOTESIS	17
IV.	OBJETIVOS	17
V.	MATERIALES Y METODOS.....	18
VI.	RESULTADOS	27
VII.	DISCUSION DE RESULTADOS	42
VIII.	CONCLUSION	47
IX.	APÉNDICE	48
X.	BIBLIOGRAFIA	55

I. INTRODUCCION

1.1 GERMINACION DE LA SEMILLA DE MAIZ

Una semilla madura, la cual contiene del 5-15% de humedad y un metabolismo casi imperceptible, comienza su germinación cuando se le adiciona agua (imbibición) provocando así la activación del metabolismo y como consecuencia, algunos cambios como serían la síntesis de macromoléculas, producción de energía, cambios estructurales, etc. (Bewley y Black, 1994).

Muchos científicos definen la germinación como el proceso en el cual la semilla toma agua y termina con la protrusión de la radícula. En nuestro laboratorio, la definición a la que nos hemos apegado es: "la germinación de una semilla puede definirse como un conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que permiten al embrión estar en condiciones de reiniciar la primera ronda de divisiones celulares en las zonas meristemáticas. Los eventos propios de la germinación conducirán al metabolismo a un punto de compromiso metabólico partiendo de un estado de quiescencia (falta de agua) hasta llegar a la primera división celular, la cual en nuestro concepto marca el inicio del proceso de desarrollo (Vázquez, 2000)."

Existen ocasiones en las que a pesar de que las semillas se encuentran en un ambiente propicio para germinar, como sería la presencia de suficiente cantidad de agua, temperatura óptima y luz, no lo pueden realizar, ya que existen impedimentos físicos o metabólicos; a estas semillas se les conoce como dormantes. Estas semillas dormantes pueden presentar eventos metabólicos de una germinación normal como la imbibición, respiración, síntesis de ácidos nucleicos y sin embargo son incapaces de germinar. Es aquí donde se hace

evidente que haya una coordinación entre el medio ambiente y una actividad metabólica integral.

Durante la germinación se llevan a cabo diferentes eventos que se pueden dividir en: **eventos tempranos** como la hidratación, síntesis de proteínas, síntesis de ATP, síntesis de RNA y reparación de DNA; **eventos tardíos** como la movilización de reservas, expansión celular y replicación del DNA (Bewley y Black, 1994).

Estos eventos conducen a que la semilla logre su objetivo principal, el cual es germinar para posteriormente poder formar una planta. Esta serie de eventos suceden en un continuo y muestran la integridad que tiene el metabolismo. Al hidratarse la semilla, acelera el consumo de oxígeno por las enzimas mitocondriales y esto está acoplado a la síntesis de ATP. Una vez teniendo energía, el embrión de la semilla puede utilizarla para por ejemplo, la reparación del DNA, el cual puede resultar dañado durante la deshidratación y almacenamiento de la semilla. La síntesis de RNA y de proteínas también requiere de un gran aporte de energía. Por otro lado, la degradación de las proteínas que funcionaron durante la maduración de la semilla y que no son necesarias para la germinación proveerán un buen aporte de aminoácidos. Las proteínas sintetizadas *de novo* actuarán, por ejemplo, en la movilización de reservas, así como en la expansión celular, o bien en la replicación del DNA (Bewley y Black, 1994).

1.2 REPLICACION DEL DNA EN CÉLULAS EUCARIOTAS

La replicación del DNA en sistemas animales se ha estudiado *in vitro* utilizando al virus SV40. Al principio de la replicación, un complejo de proteínas se localiza alrededor del origen de replicación y la doble cadena de DNA se empieza a desenrollar gracias a la acción de DNA helicasas. Por otro lado, se une a la cadena sencilla del DNA la proteína de replicación A (RPA). Subsecuentemente, el complejo de la DNA polimerasa α / primasa sintetiza cebadores de RNA en cada una de las cadenas para que posteriormente éstas sean elongadas por las DNA polimerasas. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), el factor de replicación C (RFC) y la polimerasa δ son proteínas que se necesitan para la elongación de las cadenas de DNA continua y discontinua, partiendo del extremo 3'OH que proporciona el cebador previamente sintetizado. Se le llama cadena de DNA continua a la hebra sencilla de DNA que se replica en la dirección del extremo 5' al 3', mientras que la cadena complementaria conocida como discontinua tiene una dirección de 3' a 5'. Para que la replicación se lleve a cabo, se necesita de un extremo 3'OH libre, por lo que las cadenas sintetizadas *de novo* siempre crecen en dirección 5' a 3'. La replicación del DNA requiere adicionalmente de otra polimerasa, la DNA polimerasa ϵ . El cebador de RNA debe ser removido y esto ocurre por la acción de una nucleasa del tipo de la RNasa H, denominada flap endonucleasa 1 (FEN 1), la cual interactúa con el PCNA. Posteriormente, la DNA ligasa une los extremos de los fragmentos de DNA que se forman, principalmente en la cadena discontinua, llamados fragmentos de Okazaki. Se ha visto que la DNA ligasa interacciona con el PCNA y afecta la

síntesis del DNA por las polimerasas δ y ϵ . El PCNA es necesario para la replicación del DNA como una proteína que ayuda a la procesividad de las polimerasas y coordina la elongación de las cadenas del DNA (Blow, 1996).

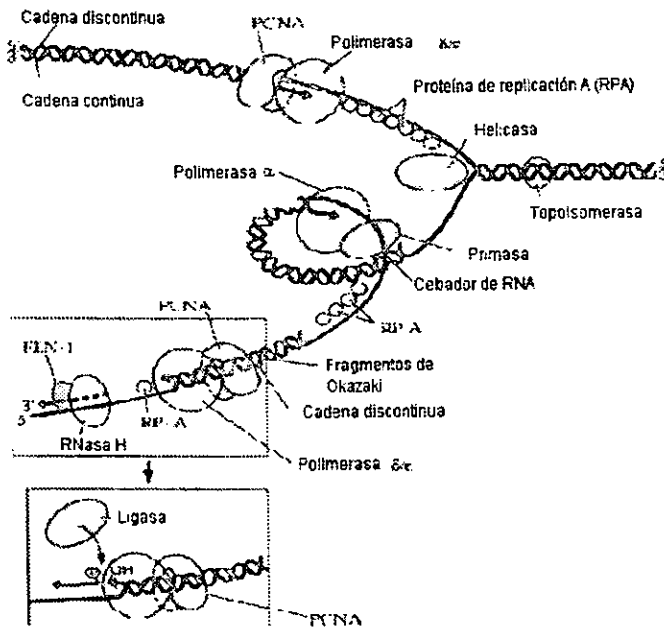


Fig. 1. Modelo de replicación en eucariotes. Proteínas que actúan durante la replicación (Buchanan, 2000).

1.3 ANTIGENO NUCLEAR DE PROLIFERACION CELULAR (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína reguladora del ciclo celular que fue identificada como una proteína antigénica en la enfermedad autoinmune conocida como lupus eritematoso sistémico (Miyachi, 1978). Esta proteína fue nombrada ciclina, debido a su aparición periódica durante la fase S (Bravo, 1980), pero se adoptó el nombre de PCNA para evitar confusiones con la familia de proteínas que se unen a las proteínas Cdk.

Su peso molecular es de 29 KDa y su secuencia está altamente conservada en todos los eucariotes, desde organismos unicelulares hasta el humano (Kelman, O'Donnell, 1995).

El PCNA es una proteína anular análoga a la subunidad β de la DNA polimerasa III holoenzima de *E. coli* y a la proteína del gene 45 del bacteriófago T4 (Kuriyan, O'Donnell, 1993) que funcionan como pinzas móviles en el DNA.

El PCNA es un homotrímero que contiene dos dominios globulares, los cuales tienen dos α hélices en la cavidad central y son perpendiculares al DNA, por lo que en total contiene 12 α hélices. Las hélices están soportadas por nueve hojas β plegadas en la parte externa y que confieren estabilidad a la proteína (Krishna et al., 1994).

El PCNA es una proteína ácida con un pI de 4.46. La carga se encuentra distribuida asimétricamente en el anillo. En el exterior, el potencial electrostático es negativo; en cambio, en la cavidad central es una región positiva (Krishna et al., 1994). Esta distribución de cargas en el PCNA le permite anclarse alrededor del DNA para poder deslizarse.

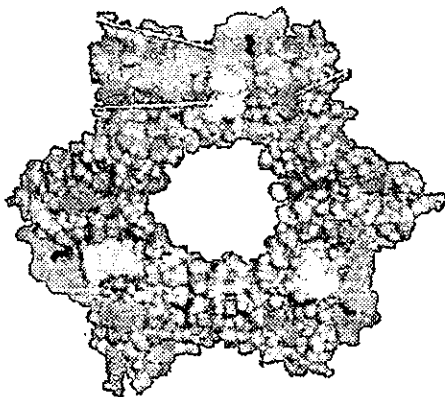


Fig. 2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PCNA. Localización de dominios funcionales: el dominio central (Asp41-His44), se encuentran de color verde; en café el asa conectora del interdominio (Leu121-Glu132), y en rojo el Asp 97 y la cola del C-terminal (Lys254-Glu256). La región en verde interacciona con la DNA pol δ y RFC. Las regiones café y rojo interaccionan con pol δ y RFC, respectivamente (Tsurimoto, 1998).

1.4 INTERACCION DE PROTEINAS CON EL PCNA

El PCNA es una proteína multifuncional y es importante para el metabolismo de los ácidos nucleicos. Es una proteína esencial en la replicación, recombinación y reparación del DNA, en la organización de la cromatina y aparentemente también en la transcripción del RNA.

Para efectuar estas múltiples funciones, el PCNA se une a diferentes proteínas entre las que se encuentran el RFC, las DNA polimerasas δ y ϵ , la FEN1 y la DNA ligasa 1.

FACTOR DE REPLICACION C (RFC)

El RFC es una proteína multimérica con subunidades de pesos moleculares de 36, 37, 38, 40 y 128 KDa. Este complejo posiciona el trímero del PCNA en el DNA, formando así la pinza móvil característica de PCNA. El RFC también es capaz de remover a PCNA del DNA una vez que ha terminado la replicación del mismo. El RFC trabaja de manera dependiente de ATP y las subunidades de 40 y 128 KDa han sido identificadas como las subunidades que interaccionan directamente con el PCNA (Tsurimoto y Stillman, 1991).

DNA POLIMERASA δ

La DNA polimerasa δ (pol δ) es una proteína formada de al menos tres subunidades de pesos moleculares 50, 66 y 125 KDa y al parecer existen otras subunidades que no se han caracterizado todavía. Pol δ es una proteína procesiva que interviene en la replicación del DNA, tanto de la cadena continua como en la discontinua. La interacción de pol δ con el DNA es muy inestable y es por eso que necesita de un factor de procesividad, que es proporcionado por PCNA, para aumentar el número de nucleótidos añadidos a las nuevas cadenas de DNA por evento de unión. Las subunidades de 50 y 125 KDa son las que se unen directamente a PCNA (Bravo et al., 1987; Downey et al., 1990).

DNA POLIMERASA ϵ

La DNA polimerasa ϵ (pol ϵ) es una proteína procesiva que también es necesaria para la replicación del DNA. Pol ϵ es procesiva a bajas concentraciones de sal y en condiciones fisiológicas altas de sal (0.1 M NaCl) exhibe una procesividad limitada. Esto sugiere que pol ϵ replica la cadena discontinua de DNA, mientras que pol δ actúa tanto en la cadena continua como en la discontinua del DNA. Para aumentar su procesividad, pol ϵ se une a PCNA, RFC y ATP. También se ha observado que pol ϵ participa en la reparación por escisión de nucleótidos del DNA, así como en la respuesta del ciclo celular al daño de DNA. El peso molecular de la subunidad catalítica es de 250 KDa. (Araki et al., 1992).

'FLAP' ENDONUCLEASA (FEN-1)

A esta proteína también se le conoce como factor de maduración 1 (MF-1). Las actividades que realiza esta proteína son de exonucleasa 5'-3', al igual que de RNasa H, las cuales son necesarias para la maduración de los fragmentos de Okazaki. FEN-1 pesa 42 KDa y se une a PCNA, el cual estimula su actividad (Li et al., 1995).

1.5 PCNA Y EL CICLO CELULAR

La división celular es una característica fundamental para la propagación de todos los seres vivos, pero sólo los eucariotes han logrado separar temporalmente la replicación del DNA (fase S) y la segregación cromosómica a las células hijas (fase M) (Huntley et al., 1999).

El ciclo celular en eucariotes superiores se regula por la acción de proteínas cinasas que están compuestas de una proteína con actividad de cinasa y otra proteína asociada, llamada ciclina, quien activa a la cinasa y le confiere otras propiedades como las de elección de sustrato y localización celular (Hutchison y Glover, 1995). El par cinasa-ciclina que actúa en la fase G1 del ciclo celular está formado por la ciclina D y por la cinasa Cdk4 (cinasa dependiente de ciclina 4). Este complejo proteico, al ser la puerta de entrada al ciclo, realiza una función fundamental tal que, en mamíferos, su desregulación es frecuentemente causa de cáncer.

Se ha demostrado que el complejo de ciclina D / Cdk4 se asocia a otras proteínas durante la fase G1 del ciclo celular. Entre las proteínas de asociación se encuentra PCNA. Aunque no es claro el por qué de la asociación, se especula que ésta es una manera de evitar que la fase S comience antes de tiempo (Hutchison y Glover, 1995).

CICLINA D

Ciclina D es una proteína de 36 KDa que actúa durante el ciclo celular en la fase G1. El complejo ciclina D / Cdk tiene como función fosforilar a la proteína del retinoblastoma (pRB), la cual inhibe el ciclo celular al secuestrar a la proteína E2F (factor de transcripción). La fosforilación provoca la disociación de pRB y E2F de tal forma que E2F pueda ahora permitir la transcripción de genes cuyos productos actúan en la fase S y así el ciclo celular pueda continuar. pRB es una proteína que tiene la característica de unirse a proteínas que participan en la regulación de la transcripción influyendo tanto positiva como negativamente en la expresión

génica celular. Otra de las proteínas a las que se asocia la ciclina D es el PCNA para impedir una entrada extemporánea a la fase S (Pagano et al., 1994). Durante la transición de G1/S existe una disminución en la cantidad de ciclina D, lo que da como resultado que PCNA se libere del complejo y colabore en la replicación del DNA; algo semejante sucede cuando hay daño al DNA, ya que PCNA participa en la reparación.

Cdks (CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA)

Las cinasas dependientes de ciclinas son proteínas que controlan el ciclo celular en eucariotes a través de eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Como se mencionó anteriormente, una Cdk se encuentra formando un complejo junto con ciclina D y PCNA durante G1/S, el cual fosforila a pRB, siendo un punto de control para la progresión del ciclo celular. La ciclina D se puede unir a diferentes Cdks, como puede ser Cdk4 o Cdk6, durante la fase G1 del ciclo celular. Estas Cdks contienen "cajas consenso" para unión a ciclinas. Este complejo que se forma es un punto de control fundamental para que continúe el ciclo celular a su fase S (Hutchison y Glover, 1995).

p21 y p27

Las proteínas p21 (Cip1) y p27 (Kip1) son inhibidores de Cdks (CDI) en la fase G1, interactuando en complejos cuaternarios con Cdks / ciclina D / PCNA, para así inhibir la fosforilación de pRB; por lo tanto E2F no podrá soltarse de pRB y no se permitirá que continúe el ciclo celular. La proteína p21 también participa en la

inhibición de la replicación del DNA y lo hace de manera dependiente del PCNA. Se han sugerido dos formas por las cuales se da esta inhibición: a) p21 disocia el trímero de PCNA por lo cual no permite que se forme la pinza móvil y b) p21 previene la interacción de PCNA con pol δ (Flores-Rozas et al., 1994). La proteína p21 es una proteína de punto de chequeo; esto es, que supervisa la progresión correcta del ciclo y es inducida por p53, proteína que se activa cuando existe daño en el DNA. La proteína p27 actúa directamente sobre el complejo ciclina E / Cdk2 impidiendo la fosforilación de pRB.

1.6 PCNA Y LA REPARACION DEL DNA

El DNA puede ser dañado por sustancias químicas o agente físicos del medio ambiente, o bien, radicales libres o agentes alquilantes producto del metabolismo celular. El DNA puede acumular errores durante su replicación y daños en el transcurso de los procesos metabólicos. Las formas más comunes en las que el DNA puede ser dañado son: deleción de bases, alteración de bases, inserción de bases, adición de bases incorrectas, etc. Los daños del DNA pueden ser corregidos por diferentes mecanismos: reparación por escisión de nucleótidos, reparación por escisión de bases, reparación por mal apareamiento y otros mecanismos. En todos estos mecanismos se ha observado que el PCNA es indispensable. En núcleos donde el DNA ha sido previamente dañado utilizando luz UV, se ha observado que al utilizar anticuerpos dirigidos contra el PCNA existe inmunodetección en los sitios de reparación, aunque las células no se encuentren en la fase S. Esto sugiere que el PCNA es una proteína que actúa tanto en la

replicación como en la reparación del DNA (Celis y Madsen, 1986). El PCNA es parte de la maquinaria de reparación junto con RFC, pol δ / ϵ y otras proteínas especializadas en la reparación. Dentro de las proteínas especializadas en la reparación se encuentran también MSH2 y MLH1 que participan en la corrección del apareamiento incorrecto de las bases en la doble hélice.

Tabla 1. Proteínas que interaccionan con PCNA (Tsurimoto, 1998).

Proteína que interacciona con PCNA	Función	Efecto de la interacción con PCNA	Sitio de unión a PCNA	Peso molecular en humanos (KDa)
REPLICACIÓN				
DNA polimerasa δ	Síntesis de DNA (cadena continua y discontinua); reparación de DNA.	Síntesis procesiva de DNA	Dominio central; asa conectora del interdominio	125, 66, 50
DNA polymerase ϵ	Síntesis y reparación de DNA; punto de control en el ciclo celular.	Síntesis procesiva del DNA	Extremo carboxi-terminal	250
RFC (factor de replicación C)	Posicionador de PCNA en el extremo 3' OH del molde cebador, ATPasa	Estimulación de ATPasa: formación del complejo en el extremo 3' del cebador de DNA.	Dominio central; Asp ⁹⁷ ; extremo del carboxi-terminal	36, 37, 38, 40, 128
FEN1 (flap endonucleasa)	Exonucleasa 5'-3' del cebador de DNA y fragmentos de Okazaki	Estimulación de la actividad endonucleasa	Dominio central; asa conectora del interdominio, extremo carboxi-terminal	42
DNA ligasa I	Liga el DNA; une los fragmentos de Okazaki de DNA.	Afecta la síntesis de DNA por pol δ y ϵ	No determinado	125
CICLO CELULAR				
p21 (CIP1, WAF1)	Unión a ciclina/CDK; inhibición de la actividad ciclina/CDK	Inhibición selectiva de la replicación del DNA.	Dominio central; asa conectora del interdominio, residuos 231-233; extremo carboxi-terminal	21
Ciclina D	Ciclina de G1; activación de CDK	Inhibición de la replicación de DNA	Residuos 1-68, 195-261	36

REPARACION DEL DNA				
GADD45	Desconocida; detención del crecimiento y gen inducido por daño al DNA	Desconocido	Residuos 1-20, 61-80, 196-215, extremo carboxi-terminal	
MyD118	Desconocido; gen de respuesta a la diferenciación terminal	Desconocido	No determinado	
MLH1, MSH2	Reparación del mal apareamiento de bases	Estimula la reparación del mal apareamiento de bases	No determinado	
XP-G	Endonucleasa; escisión-reparación	Unión entre escisión y reparación. Induce resíntesis del DNA	No determinado	
DNA metil-transferasa	Metilación de citosinas en el DNA	Blanco de un DNA sintetizado	No determinado	
Uracil-DNA glicosilasa	Reparación del DNA por escisión de bases; remueve un uracilo del DNA	Desconocido	No determinado	

1.7 PCNA EN PLANTAS SUPERIORES

Genes que codifican para el PCNA han sido clonados en plantas como el arroz, el chícharo y la zanahoria (Suzuka et al., 1991; Shimizu et al., 1998; Hata et al., 1992).

Se ha demostrado que el PCNA de mamíferos estimula la actividad y procesividad de la DNA polimerasa δ de trigo, por lo que esto nos sugiere que el PCNA tanto de animales como de plantas está conservado y puede complementar a diversas especies taxonómicamente divergentes (Laquel et al, 1993).

El PCNA recombinante de arroz estimula la DNA polimerasa δ de humano (Matsumoto et al., 1994) y el PCNA purificado del chícharo fue capaz de formar un complejo estable con ciclina D y p21 de humanos (Ball et al., 1996, Shimizu et al., 1998).

II. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado al PCNA de maíz y se determinó que existen dos genes que codifican para esa proteína (López et al., 1995, 1997). La secuencia del marco de lectura abierta de ambos genes es virtualmente idéntica y sólo difiere en las regiones 3' y 5' no traducibles. El cDNA de uno de estos genes ha sido clonado en un vector de expresión pROEX HTb (Gibco-BRL) y la correspondiente proteína fue sobreexpresada. Este vector de expresión agrega seis histidinas en la región amino terminal de la proteína recombinante, lo cual facilita su purificación, debido a que se unen covalentemente al níquel de una columna de Ni-NTA que es utilizada para su purificación. Estas histidinas no afectan la funcionalidad de la proteína, pues no impiden la formación del trímero del PCNA, necesario para activar a las polimerasas. La proteína recombinante se usó para obtener anticuerpos con los cuales se ha logrado determinar la ontogenia del PCNA durante la embriogénesis y la germinación del maíz.

Durante la germinación, los niveles del PCNA se incrementan gradualmente hasta llegar a su máximo a las 20 horas de germinación. Se ha observado que la imbibición en presencia de hormonas estimuladoras de la germinación como las citocininas (benziladenina, BA), incrementa los niveles de PCNA, los cuales alcanzan un máximo hacia las 6 horas de germinación; en cambio, la imbibición en presencia de ácido abscísico (ABA), inhibidor de la germinación, no altera el patrón de expresión comparado con las semillas control (Herrera et al., 2000).

Experimentos de co-inmunoprecipitación han demostrado que el PCNA se asocia con una proteína tipo ciclina D durante la germinación y esta asociación es

alterada por fitohormonas. El complejo PCNA / ciclina D está presente a las 15 horas de germinación bajo condiciones control, pero se disocia a las 6 horas si los ejes embrionarios son tratados con BA o ABA. La disociación del complejo en presencia de BA se debe a la degradación de la ciclina D; en cambio en presencia de ABA la ciclina D es estable (Herrera et al., 2000).

Se ha visto también que a este complejo (PCNA / ciclina D) se le une una Cdk durante las primeras horas de la germinación. En plantas se han identificado dos tipos de Cdk: a) la Cdk-A, que contienen un motivo conservado con las cdc2 de animales que es la secuencia de aminoácidos PSTAIRE; esta Cdk actúa en la fase G1/S y b) la Cdk-B, que no contienen este motivo y en su lugar contiene PPT(A/T)LRE y actúa desde la fase S hasta la fase M. En el maíz, se han identificado dos formas de Cdk-A con pesos moleculares de 32 y 36 Kda (Sánchez, 2001).

Estos complejos ternarios de ciclina D / Cdk-A / PCNA contienen una actividad de cinasa que fosforila a la proteína Zm RBr, proteína de maíz relacionada con la del retinoblastoma de humanos y es el sustrato natural de este tipo de cinasas. La actividad de cinasa asociada al PCNA alcanza su máximo nivel hacia las 6 horas de la germinación, decayendo posteriormente (Sánchez et al., 2001).

Se ha demostrado en mamíferos la presencia de otras proteínas aparte de las antes mencionadas que se unen al PCNA, algunas de las cuales parecen expresarse durante el ciclo celular.

Ya que en plantas se han descrito pocas proteínas que se asocien al PCNA, el propósito de este trabajo es el de identificar proteínas con esa cualidad y con mayor énfasis en aquellas proteínas involucradas en el ciclo celular.

Una vez identificadas, las proteínas serán aisladas y enviadas a microsecuenciar para así al conocer su secuencia, poder relacionarlas con las familias de proteínas descritas en las bases internacionales de proteínas.

III. HIPOTESIS

Ya que la proteína PCNA del maíz conserva regiones de unión a proteínas del ciclo celular semejantes a las encontradas en mamíferos, entonces se podrán purificar en maíz las correspondientes proteínas homólogas de unión a PCNA.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ▶ Extraer, purificar e identificar las proteínas que se asocian a PCNA de maíz.

OBJETIVO PARTICULAR

- ▶ Identificar aquellas proteínas del ciclo celular del maíz que se unan al PCNA.

III. HIPOTESIS

Ya que la proteína PCNA del maíz conserva regiones de unión a proteínas del ciclo celular semejantes a las encontradas en mamíferos, entonces se podrán purificar en maíz las correspondientes proteínas homólogas de unión a PCNA.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ▶ Extraer, purificar e identificar las proteínas que se asocian a PCNA de maíz.

OBJETIVO PARTICULAR

- ▶ Identificar aquellas proteínas del ciclo celular del maíz que se unan al PCNA.

V. MATERIALES Y METODOS

1) MATERIAL BIOLÓGICO:

Las semillas de maíz variedad chalqueño fueron obtenidas de un proveedor del Valle de Chalco, Edo. De México. De estas semillas se obtuvieron los ejes embrionarios y se guardaron a 4°C hasta la extracción de las proteínas.

La composición de las soluciones que se utilizan en todas las metodologías se describe en el apéndice (pag. 48).

2) IMBIBICIÓN DE LOS EJES EMBRIONARIOS:

Se desinfectan 1.5 g de ejes embrionarios con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 3 minutos. Se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril y posteriormente se ponen en las cajas petri que deben contener papel filtro Whatman #2 y se les añaden 6 mL de la solución de imbibición. Todo esto se realiza en condiciones de esterilidad y con material estéril. Se germinan los ejes por 6 horas a 25°C.

3) EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS:

Los ejes embrionarios imbibidos se homogenizan con 4 mL de la solución de extracción en un mortero mantenido a 4°C. Se ultracentrifugan a una velocidad de 30,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se toma el sobrenadante con cuidado de no tomar la capa lipídica y se almacenan a -70°C.

4) INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PCNA:

Se aíslan colonias de células transformadas con el plásmido que tiene el gene para PCNA. Se toma una colonia aislada y se inocula en medio LB líquido con 50 µg de ampicilina por µL de medio. Se incuba por 12 h a 30°C. Al término de este tiempo se toman 1.5 mL del cultivo anterior y se transfieren a 1L de medio nuevo con ampicilina. Se incuban por 2.5 h a 30°C para que se reproduzcan las bacterias. Se le agrega β-isopropil tiogalactósido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM con el fin de inducir el gene en cuestión. Se incuba el cultivo por otras 4 h a la misma temperatura y al finalizar se centrifugan las bacterias por 10 min a 5000 rpm a 4°C y finalmente se congelan a -70°C (de esta manera pueden ser almacenadas por un par de días).

Las células obtenidas se resuspenden en 20 mL de amortiguador de lisis (Tris pH=8.5 50 mM, β-mercapto etanol 1 0mM). Se adicionan 80 mg de lisozima y una tableta de inhibidores de proteasas y se deja incubar 1 h a 4°C, con agitación. Posteriormente, las células se sonicán a 25 Hz por periodos de 15 seg, dejando reposar unos cuantos segundos entre cada tiempo, hasta completar 2 min. Se centrifugan dos veces a 10,000 rpm por 15 min a 4°C. Las proteínas solubles que serán purificadas se localizan en el sobrenadante.

PURIFICACIÓN

PREPARACIÓN DE LA RESINA DE Ni-NTA

Esta resina contiene níquel, el cual es un catión que forma un complejo de coordinación con las histidinas que contiene la proteína recombinante en su extremo amino y nos ayuda a que la purificación sea más eficaz. Las histidinas tienen un grupo imidazol que se une fuertemente al níquel, logrando así que la proteína recombinante se una fuertemente a la resina. Posteriormente, se agrega un amortiguador que contiene una concentración

elevada de imidazol y este grupo compite con el imidazol propio de las histidinas, desplazándolo para liberar a la proteína recombinante.

Para eso se equilibra la resina de Ni-NTA con amortiguador de acoplamiento a la resina Ni-NTA (Tris 20 mM pH= 8.5, KCl 100 mM, β -mercapto etanol 10 mM, glicerol 10%, imidazol 20 mM). Se toman 20 mL del sobrenadante conteniendo las proteínas solubles y se les adiciona 1 mL de la resina. Se incuba por 3 h a 4°C con agitación continua. Al término, la mezcla se centrifuga a 3000 rpm por 5 min y se elimina el sobrenadante (proteínas no unidas a la columna).

Se lava la resina 4 veces con 2.5 mL del amortiguador de acoplamiento empleando la agitación por períodos de 15 min. Posteriormente, se realizan 4 eluciones con 2.5 mL del amortiguador de elución (Tris 20 mM pH= 8.5, KCl 100 mM, β -mercapto etanol 100 mM, glicerol 10%, imidazol 100 mM) agitando en cada ocasión durante 15 min. Las fracciones obtenidas se guardan a -20 °C.

5) ACOPLAMIENTO A LA RESINA HITRAP-NHS:

Una vez teniendo purificada la proteína PCNA recombinante, se acopla a la resina HiTrap NHS (Amersham Pharmacia Biotech) activada de 1 mL. El amortiguador de acoplamiento a la resina HiTRAP NHS pH= 8.3 contiene NaHCO_3 0.2 M y NaCl 0.5 M.

El acoplamiento se puede hacer en un intervalo de pH de 6.5-9, alcanzando un acoplamiento óptimo a un pH alrededor de 8.

Primeramente, se disuelve el ligando, en nuestro caso PCNA o albúmina (control), en el amortiguador de acoplamiento para obtener una concentración final de 0.5-10 mg de proteína por mL del medio. Se quita la tapa superior de la columna y se

añade una gota de HCl 1 mM frío para evitar las burbujas. Se conecta la bomba peristáltica a la columna y se remueve la parte inferior de la columna a una velocidad de flujo de 1 mL / min.

Posteriormente, se elimina el isopropanol que contiene la columna empleando 6 mL de HCl 1 mM frío sin sobrepasar la velocidad de flujo de 1 mL / min. Se deja recircular la muestra por 4 horas a 4°C.

Lavado y desactivación de los grupos activos

Para desactivar grupos activos a los cuales no se acopló el ligando (PCNA o albúmina), así como también lavar ligandos unidos inespecíficamente, se utilizan:

Amortiguador A: etanolamina 0.5 M, NaCl 0.5 M, pH=8.3

Amortiguador B: acetato 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH=4

Los pasos que se siguen son:

- a) Inyectar 6 mL del amortiguador A.
- b) Inyectar 6 mL del amortiguador B.
- c) Inyectar 6 mL del amortiguador A.
- d) Dejar reposar la columna de 15-30 minutos
- e) Inyectar 6 mL del amortiguador B.
- f) Inyectar 6 mL del amortiguador A.
- g) Inyectar 6 mL del amortiguador B.
- h) Inyectar 2 mL de un amortiguador a un pH neutro (Na_2HPO_4 0.05M).

Para guardar la columna en buenas condiciones debe de utilizarse Na_2HPO_4 0.05M, NaN_3 0.1%, pH=7.

De esta misma manera se trabajó con dos tipos de columnas control, una que fue acoplada con albúmina y la otra sin poner ligando, es decir, simplemente bloqueada la columna utilizando etanolamina.

6) PURIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS A TRAVES DE LA COLUMNA DE AFINIDAD (HITRAP-NHS)

Todo este proceso se lleva a cabo a 4°C.

Se equilibra la columna con	Tris 75 mM pH=8	24mL
Se pasa la muestra (extracto crudo)	3 horas	
Se lava con	Tris 75 mM pH=8	15mL
Se lava con	NaCl 100 mM	10mL
Se eluye con	NaCl 250 mM	10mL
Se eluye con	NaCl 500 mM	10mL
Se eluye con	NaCl 1.0 M	10mL
Se lava con	Tris 75 mM pH=8	10mL
Se guarda con	Tris 75 mM pH=8 y NaN ₃ 0.1%	10mL

Se colecta el eluido en fracciones de 1 mL y estas fracciones se etiquetan progresivamente. Se utiliza la bomba peristáltica a un flujo no mayor de 1 mL / min.

7) DESALADO Y CONCENTRADO

De las ocho purificaciones realizadas se juntaron todas las eluciones que correspondían a una misma fracción. Para desalar estas fracciones se utilizó un filtro centrífugo de corte de 10 KDa. Las fracciones se centrifugaron a 5000 rpm y se añadió 1 mL de muestra cada hora. Una vez que ya se hubo agregado toda la muestra, se agregó 1 mL de Tris 75 mM pH=8 para quitar las sales que todavía pudieran quedar en la fracción y se dejó centrifugando hasta obtener aproximadamente 300 µL. Se concentró la muestra utilizando el Speed-Vac hasta obtener el mínimo volumen posible (cerca de 30 µL)

8) ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Para preparar el gel separador se mezclan 1.25 mL de la solución patrón de gel separador, persulfato de amonio 0.2%, acrilamida 8 u 11%, TEMED 0.1% y agua para completar un volumen final de 10 mL. Se vierte esta solución en el molde y se deja polimerizar el gel. Mientras tanto, se hace la mezcla del gel apilador que contiene 750 μ L de la solución patrón de gel apilador, acrilamida 4%, persulfato de amonio 0.1%, TEMED 0.01% y agua para completar 3 mL. Una vez polimerizado el gel separador, se vierte el gel apilador en el molde y se coloca el peine con los pozos requeridos. Al término de la polimerización, el gel se coloca en la cámara de electroforesis donde se le añaden 50 mL del amortiguador de electrodos más 600 mL de agua.

Las muestras que se van a analizar por electroforesis se preparan mezclando 5 μ L del amortiguador de carga (Tris-HCl 200 mM pH=6.8, DTT 400 mM, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol) con 15 μ L de cada muestra y se calientan por 5 min a 95°C. Se colocan en los pozos correspondientes. Uno o dos pozos contenían las proteínas de pesos moleculares conocidos (BioRad o Gibco). Se corre el gel a 100 voltios durante 90 min.

9) TINCIONES DE LOS GELES

TINCIÓN POR AZUL DE COOMASIE

Se añade al gel la solución de azul de Coomasie (Coomasie G25 0.05%, HClO₄ (70%) 5.18%) y se deja en agitación por 20 min. Pasado este tiempo se elimina el colorante y se le agrega metanol 50% y se deja destiñendo hasta que se observen las bandas de interés.

TINCION POR NITRATO DE PLATA

Se pone el gel en un contenedor limpio con la solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 5%). Se agita por 20 min. Se elimina esta solución y se lava con agua destilada y desionizada por 20 min; se repite dos veces.

Se elimina el agua y se pone en solución de sensibilización (tiosulfato de sodio 0.02%) por 2 min. Se lava con agua por un minuto. Se elimina el agua y posteriormente se añade la solución de nitrato de plata 0.1% fría por 60 min a 4°C. Se elimina la solución de nitrato de plata y se lava con agua por un minuto. Se agrega la solución reveladora (Na_2CO_3 2%, formaldehído 0.04%), evitando que se enturbie, hasta que se visualicen las bandas, momento en el que se para la reacción agregando ácido acético al 5%.

10) WESTERN BLOT

Se realiza una electroforesis en gel SDS-PAGE con las muestras seleccionadas para posteriormente transferirlas a una membrana de Immobilon. Para la electrotransferencia, sobre el ánodo del aparato (parte inferior) se colocan 6 papeles Whatman 3MM del tamaño del gel, se pone la membrana de Immobilon, se coloca el gel y finalmente se ponen otros 3 papeles Whatman 3MM. Todo esto se debe de humedecer previamente en la solución de transferencia. Por último se coloca el cátodo y se deja transferir a 75 voltios durante 1 hora.

Se incuba la membrana de Immobilon con la solución de bloqueo (PBS 1x, leche en polvo 5%, Tween 20 1.2%) durante 1 hora. Se desecha esta solución y se agrega el primer anticuerpo mezclado con la solución de bloqueo dejándose en agitación durante toda la noche a 4°C, o bien a temperatura ambiente por dos horas.

Una vez que la membrana se ha incubado con el primer anticuerpo, se lava con el amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1x por 15 min dos veces e intermedio a estos lavados se hace otro lavado durante 15 min con PBS 1x + NaCl 0.5 M.

La membrana se incuba con el segundo anticuerpo (anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa alcalina) por una hora a temperatura ambiente. Para evitar inespecificidad del segundo anticuerpo, después de la incubación se lava tres veces con PBS 1x por 15 minutos.

La identificación de las proteínas se lleva a cabo con el sistema de quimioluminiscencia (Amersham); para eso se deja incubar la membrana por 2 min en presencia del sustrato (luminol), se expone la película de rayos X por 5 min sobre la membrana y finalmente se revela.

11) ENSAYO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CINASA

En un tubo Eppendorf se agrega el amortiguador de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH=7.5, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, β -glicerolfosfato 60 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 25 mM, MgCl_2 10 mM), el amortiguador de reacción de cinasa (ATP 20 μ M, γATP^{32} 5 μ Ci, Zm RBr 4 μ g, DTT 1mM) y la muestra de interés; se centrifuga. En la campana de radiación se agrega el ATP marcado (γATP^{32} 5 μ Ci) y se deja reaccionar por 30 min. Como parte del amortiguador de reacción de cinasa se encuentra la proteína Zm RBr, que es la proteína de maíz relacionada a la del retinoblastoma. En este caso, se utiliza solamente un fragmento de la proteína Zm RBr correspondiente al extremo carboxilo a partir del aminoácido 558 y hasta el 683, que contiene múltiples sitios de fosforilación.

La reacción se detiene al añadirse el amortiguador de carga (Tris-HCl 200 mM pH=6.8, DTT 400 mM, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol) y se desnaturalizan las proteínas por 5 min. Después se colocan las muestras en los pozos correspondientes del gel y se corre, evitando que salga la marca del gel.

El gel de acrilamida recién corrido se transfiere a una membrana de Immobilon. Posteriormente, se deja exponer la membrana por una noche en la pantalla del PhosphorImager y finalmente se revela la membrana utilizando el equipo del PhosphorImager Personal TX, el cual nos sirve para detectar radioactividad.

12) MICROSECUENCIACION

Las proteínas aisladas e identificadas por tinción de plata serán enviadas a microsecuenciación tanto al Laboratorio de Química de Proteínas de la Facultad de Medicina, como a la Unidad de Servicios Analíticos de la Universidad de California en Davis, EUA.

VI. RESULTADOS

PURIFICACIÓN DEL PCNA

Para confirmar que la proteína purificada era el PCNA, se realizó un Western Blot con un anticuerpo homólogo contra esa proteína (Fig. 3). En el gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie se observaron varias proteínas en las fracciones de los lavados (aquellas proteínas que no se unen a la columna de Ni-NTA), pero en las fracciones donde la proteína quedó retenida a la columna de Ni-NTA y después se eluyó de ésta empleando imidazol 50 mM, sólo se observó una proteína con un peso molecular de 32 KDa. En la primera fracción de elución fue donde se detectó la mayor cantidad de proteína. Al realizar el Western Blot utilizando el anticuerpo anti-PCNA, se logró ver que tanto en las fracciones de lavado como en las eluciones hay presencia de PCNA. El identificar con el anticuerpo el PCNA en las fracciones de lavado, nos indica que el PCNA recombinante no se acomplejó totalmente con el níquel, por lo que se eluye con el volumen de lavado. Esto se puede deber a que la columna se saturó, por lo que el rendimiento de la purificación baja, aunque se obtuvo la cantidad suficiente para continuar con los ensayos.

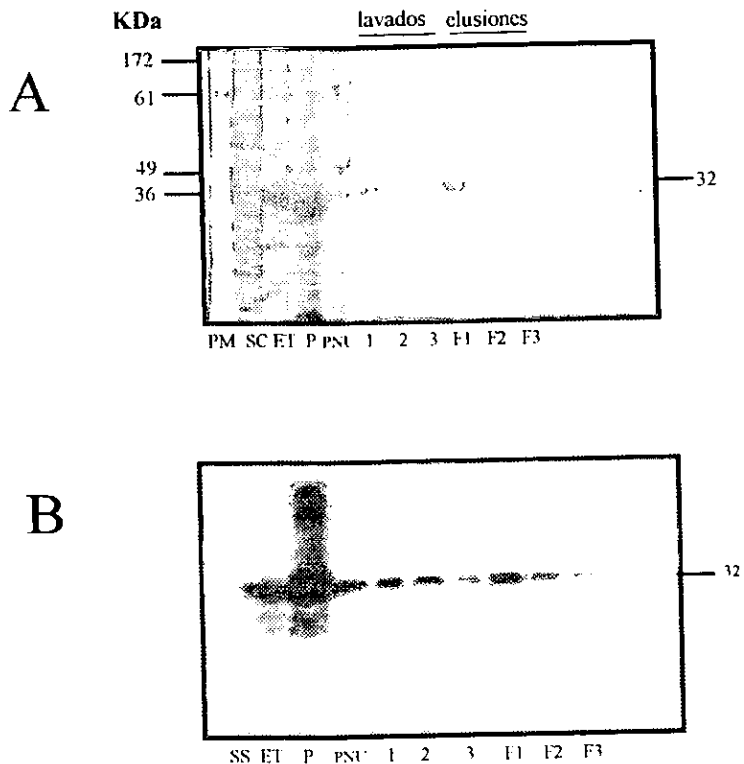


Fig. 3. PCNA recombinante purificada con la resina de Ni-NTA. A) Gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie, B) Western blot revelado con anticuerpo contra el PCNA. Carriles: PM = Estándares de peso molecular conocido preteñidos (Gibco BRL), SS = Semilla seca, ET = Extracto total de *E.coli* inducida, P = precipitado, PNU = Proteínas no unidas; 1, 2, 3 fracciones de lavado de la preparación, F1, F2 F3 fracciones eluidas de la columna de Ni-NTA

PURIFICACIÓN DE PROTEINAS QUE SE UNEN AL PCNA

Se utilizó la primera elución (F1) del PCNA recombinante puro para acoplarlo a una columna de Hi-TRAP NHS que une covalentemente al ligando, en este caso el PCNA. El porcentaje de acoplamiento fue de 90%, calculado por la densitometría del Western Blot realizado con la fracción proteínica antes y después del acoplamiento. Esta columna de afinidad se utilizó para aislar y eluir de los extractos proteínicos de maíz las proteínas que tienen afinidad por el PCNA, utilizando diferentes concentraciones salinas: 250 mM, 500 mM y 1.0 M de NaCl (Fig. 4). Muestras de cada una de las fracciones eluidas a las diferentes concentraciones se cargaron en dos geles de acrilamida-SDS para poder comparar todas las fracciones obtenidas y se tiñeron con plata para observar las diversas proteínas que se unen al PCNA con diferentes afinidades. Observamos que en las primeras fracciones eluidas con 250mM de NaCl (fracciones 1-10), hay gran cantidad de proteínas de diversos pesos moleculares, entre las que sobresalen una proteína de un peso aparente de 100 KDa, una alrededor de 75 KDa, un doblete por abajo de 50 KDa y otras proteínas por debajo de 25 KDa. En las fracciones eluidas con 500 mM de NaCl (fracciones 11-20) se observó una reducción notable de la cantidad de proteínas que se unieron al PCNA. En estas fracciones las proteínas más sobresalientes son aquellas con pesos moleculares de 90 KDa, 40 KDa, 32 KDa y 20 KDa. Finalmente, se observa que las proteínas eluidas con 1.0 M de NaCl (fracciones 21-24) son relativamente pocas comparadas con las fracciones anteriores y las que se observan a mayor concentración son las que tienen pesos moleculares de 90 KDa, 72 KDa, 40 KDa, 35 KDa y 20 KDa.

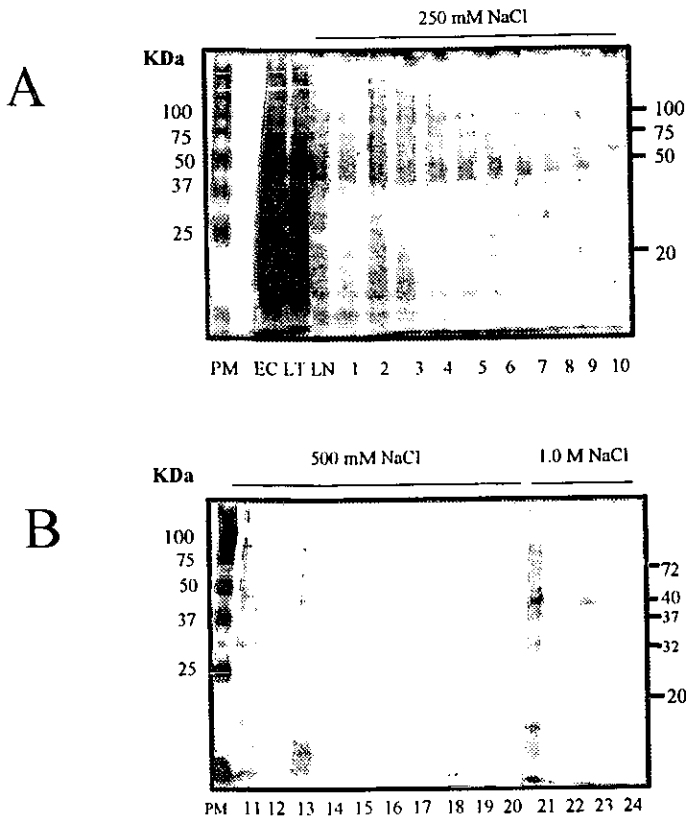


Fig. 4. Patrón de proteínas eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA. Geles de acrilamida-SDS al 11% teñidos con plata de las fracciones eluidas con diferentes concentraciones de NaCl. **A)** PM: estándares de peso molecular conocido (BioRad), EC= extracto crudo, LT= lavado con Tris 75 mM, pH=8, LN= lavado con 100 mM NaCl, fracciones 1-10: eluidas con 250 mM NaCl. **B)** PM: estándares de peso molecular conocido (BioRad), fracciones 11-20: eluidas con 500 mM NaCl, fracciones 21-24: eluidas con 1.0M NaCl.

Al analizar los geles anteriores, observamos que al cambiar de concentración salina con la cual se eluyen las proteínas, cambia el patrón de las mismas. Esto nos indicaba que estas proteínas podían ser diferenciales y es por esto que se tomaron las primeras fracciones de las eluciones hechas a 500 mM y a 1.0 M de NaCl y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE (Fig. 5). Las proteínas eluidas con 500 mM presentaron un patrón similar entre sí. Dentro de las proteínas más interesantes se encuentra una con un peso molecular alrededor de 32 KDa y una proteína arriba de 37 KDa. Estas dos proteínas coinciden con el peso molecular que se ha descrito para las Cdk-A. En las fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl observamos una proteína en gran cantidad de alrededor de 72 KDa y otra en 40 KDa muy tenue. También se observan proteínas con un tamaño semejante al de las proteínas eluidas con 500 mM.

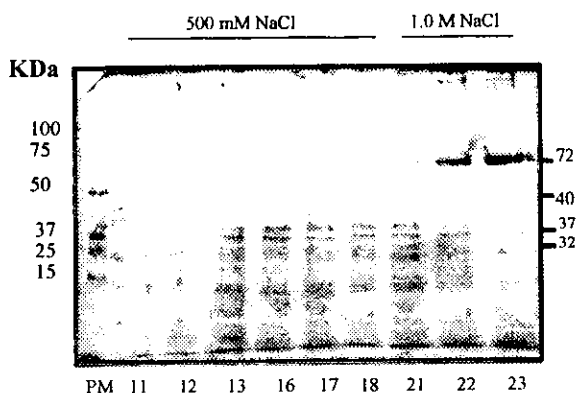


Fig. 5. Patrón de proteínas eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA. Gel de acrilamida-SDS al 11% teñido con plata. Fracciones 11-13, 16-18: eluidas con 500 mM de NaCl; fracciones 21-23: eluidas con 1.0 M de NaCl.

Para descartar que estas proteínas se unieran artificialmente a PCNA, se realizaron columnas controles. En una de estas columnas control se acopló albúmina sérica a la resina y se siguió la misma metodología para obtener las fracciones a diferentes concentraciones salinas. Se corrió un gel de acrilamida-SDS teñido con plata de las fracciones eluidas con 500 mM y con 1.0 M de NaCl (Fig.6). Se observó que existen muy pocas proteínas que eluyen con 500 mM de la columna de albúmina, pero no así en las eluciones hechas con 1.0 M de NaCl. En estas últimas fracciones se observó un triplete entre 100 y 75 KDa, también una banda en 68 KDa, otra en 37 KDa y otras de bajo peso molecular. El patrón de las proteínas eluidas de las columnas de PCNA y de albúmina era muy diferente, lo que nos hizo pensar que se trataban de diferentes proteínas.

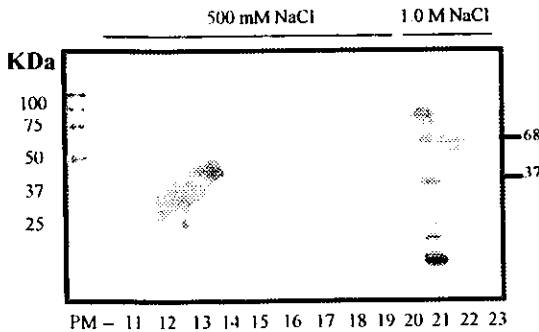


Fig. 6. Patrón electroforético de las proteínas eluidas de la columna de albúmina. Gel de acrilamida-SDS al 11% teñido con plata. Fracciones 11-20: eluidas con 500 mM de NaCl; fracciones 21-23: eluidas con 1.0 M de NaCl.

Para comprobar que las proteínas que se unían a PCNA eran específicas, se preparó otra columna control con los sitios bloqueados con etanolamina. La figura 7 muestra el gel donde se comparan las proteínas eluidas con NaCl 1.0 M de las dos columnas controles (albúmina y etanolamina) con las fracciones de PCNA. El resultado que obtuvimos al correr este gel de acrilamida-SDS y tñirlo con plata fue que en las fracciones eluidas de la columna de albúmina existe una mayor cantidad de proteínas que con las fracciones obtenidas de la columna bloqueada con etanolamina. En cuanto a las fracciones de PCNA, observamos las mismas proteínas que en los geles anteriores (Fig. 4, 5).

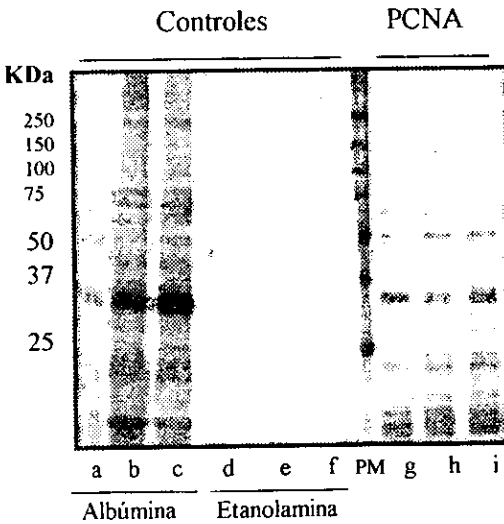


Fig. 7 Patrón de electroforesis de proteínas eluidas con 1.0 M NaCl de las columnas controles (albúmina y etanolamina), así como también de PCNA. Gel de acrilamida-SDS al 11% tñido con plata. Las fracciones son las F21, F22, F23 eluidas de las diferentes columnas.

Una vez que se obtuvieron los diferentes patrones de corrimiento de las proteínas eluidas, tanto de los controles como de PCNA, se realizaron ensayos de Western Blot con el fin de dilucidar qué tipo de proteínas se podían encontrar. Como se mencionó con anterioridad, sabemos que el PCNA es una proteína multifuncional, la cual se puede unir a diferentes proteínas del ciclo celular. Al ser este último uno de los temas de mayor interés en el laboratorio, se decidió hacer inmunodetección, utilizando anticuerpos homólogos y heterólogos contra diferentes proteínas del ciclo celular.

Sabemos que el PCNA es un homotrímero, por lo tanto queríamos saber si el PCNA recombinante (unido a la columna) podía reconocer al PCNA endógeno. Para esto se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo homólogo contra PCNA (Fig. 8). En los dos primeros carriles (a, b) observamos a PCNA recombinante (32 KDa); en los carriles c y d tenemos fracciones eluidas de la columna de PCNA con 500 mM de NaCl tanto de ejes embrionarios como de raíz. En estos carriles se logra ver una banda muy tenue en el peso esperado de 29 KDa. Los carriles e, f y g corresponden a fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl y en ningún caso se observó una proteína del tamaño esperado. Se realizó un Western utilizando las mismas fracciones de las columnas control (albúmina y etanolamina) y no se observó la presencia de PCNA (datos no mostrados.)

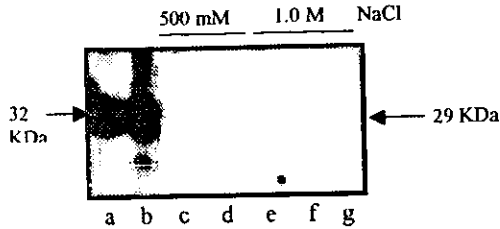


Fig. 8 Western Blot revelado con anticuerpo contra el PCNA de diferentes eluciones de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA. a y b) PCNA recombinante c) F16 de ejes embrionarios eluida con 500mM de NaCl, d) F16 de radícula eluida con 500mM de NaCl, e y f) F21 eluida con 1.0M NaCl de ejes y radícula, respectivamente g) F22 eluida con 1.0 M NaCl.

Por antecedentes del laboratorio, sabíamos que PCNA podía estar formando un complejo ternario junto con ciclina D y su correspondiente Cdk, la cual contiene una secuencia PSTAIRE (Cdk-A). Para comprobar esto, se realizaron Western Blots con anticuerpos que identifican estas proteínas. El primer ensayo que se realizó fue un Western Blot revelando con anticuerpos contra ciclina D (Fig. 9), para lo cual se utilizó un anticuerpo heterólogo. Los dos primeros carriles corresponden a los estándares de peso molecular conocido (Bio-Rad); en el carril c se tiene extracto crudo de ejes germinados durante 6 horas y es aquí donde se observaron varias bandas siendo la más sobresaliente una de 72 KDa. El carril d corresponde a las fracciones eluidas con 250 mM de NaCl (fracciones 1, 2, 3) y el e a las fracciones eluidas con 500 mM de NaCl (fracciones 11, 12, 13) de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA. No hubo inmunodetección en ninguna de estas fracciones. El carril f representa fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl (fracciones 21, 22, 23) de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA y en éste se

observa un doblete alrededor de 72 KDa, similar al detectado en el extracto crudo. Finalmente, el carril g representa fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl de la columna control de albúmina, donde no se encuentra presente esta proteína.

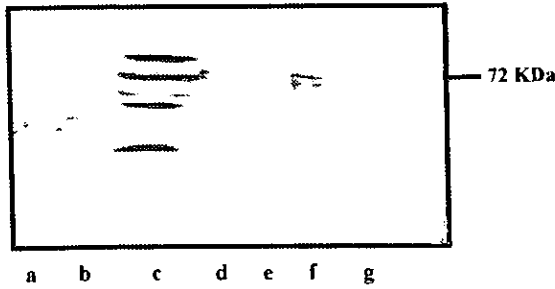


Fig. 9. Western Blot de diferentes fracciones proteínicas de maíz usando anticuerpo contra ciclina D. Carril *a* y *b*) Estándares de peso molecular conocido (Bio-Rad), *c*) control a 6 horas de germinación, *d*) fracciones eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con 250 mM de NaCl (fracciones 1, 2, 3), *e*) fracciones eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con 500 mM de NaCl (fracciones 11, 12, 13); *f*) fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl (fracciones 21, 22, 23); *g*) fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl de la columna de albúmina (fracciones 21, 22, 23).

También se realizó un Western Blot para inmunodetectar a Cdk-A utilizando un anticuerpo homólogo dirigido contra la región característica de estas proteínas, la secuencia de aminoácidos PSTAIRE (Fig. 10). En el carril a se cargó extracto crudo de ejes embrionarios germinados por 6 horas y se observaron dos bandas características en 36 y 32 KDa. Estas dos proteínas han sido ya caracterizadas en nuestro laboratorio (María de la Paz Sánchez, datos por ser publicados). Los siguientes carriles (b-d) corresponden a proteínas eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con 500 mM de NaCl, en los que no se logró detectar nada. Los carriles e-g son las fracciones eluidas de la misma columna con 1.0 M de NaCl, y

en el carril e se observó un doblete proteico con un corrimiento semejante al observado en el carril a, aunque muy tenue. Los carriles siguientes, h-m son fracciones obtenidas de la columna de albúmina a las mismas concentraciones que las de Hi-TRAP NHS-PCNA y en ningún carril se observó la inmunodetección.

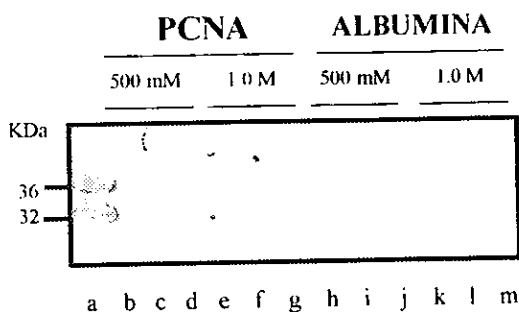


Fig. 10 Western Blot revelado con anticuerpo contra Cdk-A (PSTAIRE) de fracciones eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA y albúmina. a) Extracto crudo de 6 horas de germinación, b,c,d) fracciones eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con 500 mM de NaCl, e, f y g) fracciones eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con 1.0 M NaCl, h, i, j) fracciones eluidas de la columna de albúmina con 500 mM NaCl, k, l, m) fracciones eluidas de la columna de albúmina con 1.0 M NaCl.

Por último, se realizaron Western Blots para inmunodetectar a p21 y p27, usando anticuerpos heterólogos, ya que se ha reportado que pueden formar un complejo cuaternario junto con PCNA, Cdk y ciclina D, debido a que tanto p21 como p27 son inhibidores de Cdks. En ninguna de las fracciones que fueron analizadas se encontró inmunodetección (datos no mostrados).

ENSAYOS DE CINASA

Los resultados anteriores nos llevaban a pensar que podía existir actividad de cinasa en las fracciones proteicas, debido a que se inmunodetectó tanto una putativa ciclina D como a una Cdk (PSTAIRE) en la misma fracción. Ambas proteínas deben estar presentes para que exista el complejo activo ciclina D / Cdk.

Tomando las fracciones 21, eluidas de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA con una concentración de 1.0 M de NaCl de diferentes purificaciones, se realizó un ensayo de cinasa, el cual consiste en poner ATP radiactivo (^{32}P), al igual que la proteína Zm RBr. Esta proteína, Zm RBr, es el sustrato natural de las cinasas tipo *cdc2*. Se llevó a cabo la reacción y después las proteínas se separaron por SDS-PAGE para posteriormente transferirse a una membrana Immobilon. Esta membrana se dejó exponer durante dos días y se observó en el carril a de la figura 11 una proteína fosforilada alrededor de 30 KDa y otra de 39 KDa que corresponde al peso del sustrato utilizado, Zm RBr. También se observa muy tenue un doblete de proteínas de alrededor de 60 KDa que son fosforiladas, al igual que una proteína de alto peso molecular. Se ha visto en otros experimentos que una proteína de 60 KDa co-inmunoprecipita con PCNA y también se fosforila en los ensayos de cinasa. Esta proteína podría estar asociada al complejo PCNA-Cdk-ciclina y ser un sustrato para este tipo de cinasas. El carril b representa proteínas de la fracción 23 y no se logra ver ninguna proteína fosforilada. Recuérdese que en la F23 no se identificó ni ciclina D ni a Cdk-A. En el carril c, se cargó la fracción 21, pero sin ZmRBr como control.

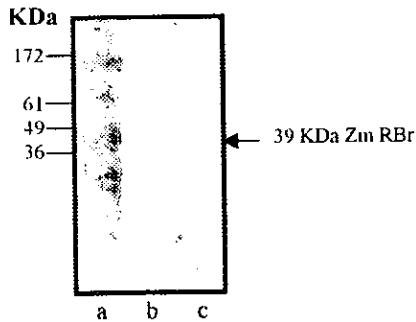


Fig. 11 Autorradiografía del ensayo de la actividad de cinasa en las fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl de la columna Hi-TRAP NHS- PCNA. a) Fracción 21, b) Fracción 23, c) Fracción 21 sin sustrato (Zm RBr).

PREPARACIÓN DE LAS PROTEINAS PARA LA MICROSECUENCIACION

Se usó la técnica de microsecuenciación de proteínas con el fin de identificar algunas de las proteínas que se unen a PCNA. Se realizaron geles SDS-PAGE donde se cargaron las muestras de interés.

En un primer intento, se mandaron microsecuenciar dos proteínas con pesos moleculares de 72 y 40 KDa. La microsecuenciación externa no se pudo lograr, ya que estas proteínas se encontraban bloqueadas por el extremo amino terminal. Fue necesario entonces hacer más purificaciones (ocho en total) y juntar todas las fracciones en una misma y concentrarlas. Esto se hizo con el fin de obtener mayor concentración de cada proteína que se unía a PCNA y poderla

enviar a microsecuenciar en forma interna; esto es, utilizar diferentes endoproteasas y posteriormente secuenciar los fragmentos obtenidos.

Se cargó la fracción 21 (eluida con 1.0 M NaCl) de una sola purificación concentrada en un gel de acrilamida al 8% (Gel A) y en otro gel (Gel B) se cargó la fracción 21 concentrada de varias purificaciones; ambos geles se tiñeron por plata (Fig. 12.) En el gel A se observa una banda muy fuerte de 40 KDa, la cual se cortó del gel. En el gel B se logran ver diferentes bandas siendo las mismas que se presentaron en los primeros geles (Fig. 4, 5). Se decidió cortar del gel las bandas correspondientes a proteínas con pesos moleculares de 90, 77, 72, 60, 47, 37 y 35 KDa. Todos estos fragmentos de gel fueron centrifugados mediante un Speed-Vac para eliminar restos de agua.

La proteína de 72 KDa es diferencial para las fracciones de PCNA que se eluyen a una concentración de 1.0 M de NaCl. Esta misma proteína fue reconocida por el anticuerpo contra ciclina D y se halla en una concentración de 6 pmol en el gel, suficiente para la microsecuenciación, por lo que se decidió enviarla a microsecuenciar. También la proteína de 40 KDa, en una concentración de 25 pmol en el gel, se envió a microsecuenciar

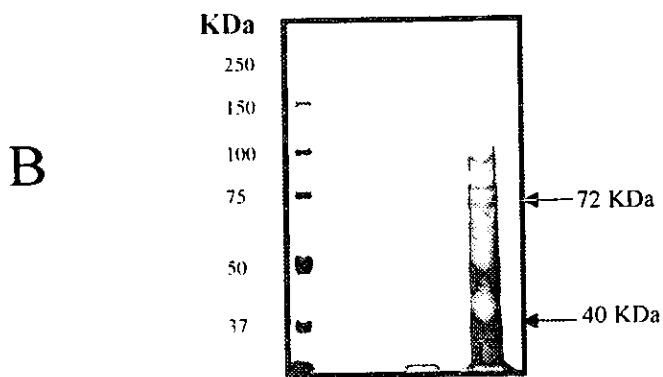
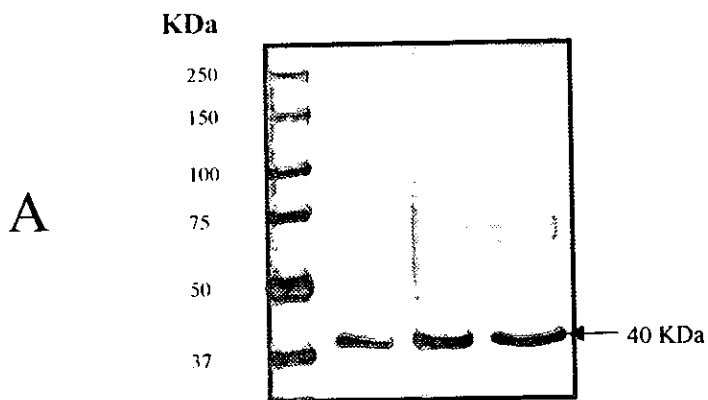


Fig. 12. Gel SDS-PAGE al 8% teñido por plata. A) F21 concentrada de una sola purificación. B) F21 concentrada de 8 purificaciones.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El PCNA recombinante se obtuvo muy puro, aunque se puede observar que sólo una porción de la proteína se une a la resina de Ni-NTA y el resto eluye en las fracciones de lavado, por lo que se pierde una cantidad significativa (Fig. 3). La proteína PCNA aislada de la fracción F1, por el contrario, se acopló eficientemente a la columna de Hi-TRAP NHS. Al pasar un extracto proteico crudo de ejes embrionarios germinados por 6 horas por esta columna se logra ver que existen proteínas que tienen diferentes afinidades por PCNA y esto se refleja por la concentración salina con la cual eluyen. Se observa que en las fracciones proteicas eluidas con 250 mM de NaCl existen todavía gran cantidad de proteínas; conforme aumentamos la molaridad, el número de proteínas que eluyen es menor. Nos enfocamos a las proteínas de las primeras fracciones eluidas con 1.0 M, debido a que son éstas las que se unen más fuertemente a PCNA, por lo que deben tener mayor afinidad y suponemos que pueden tener un mayor significado fisiológico. Existen proteínas que eluyen en las tres concentraciones salinas usadas y por lo tanto fueron descartadas de nuestro estudio, ya que nos indican que podrían ser un artificio del experimento (Fig. 4, 5).

Observando nuestros controles, vemos que la resina que se encontraba bloqueada con etanolamina, no une absolutamente nada, ya que no tenía acoplado ningún ligando. En cambio, la columna de albúmina une a varias proteínas, ya que la albúmina es una proteína transportadora de proteínas (Fig. 6, 7). Todas las proteínas eluidas de esta columna y con corrimiento semejante a las proteínas que eluyen de la columna de PCNA fueron desechadas y sólo nos concentramos en aquellas con corrimiento diferencial.

Al realizar Western Blots utilizando anticuerpos contra PCNA, ciclina D, Cdk-A (PSTAIRE), p21 y p27 se intentó saber si el tipo de proteínas que usualmente se unen *in vivo* a PCNA podrían mostrar suficiente afinidad para ser aisladas en una columna con el PCNA unido covalentemente. El PCNA sólo fue inmunodetectado en las fracciones a una concentración de 500 mM NaCl (Fig. 8.) Esto nos indica que el PCNA recombinante, unido covalentemente a la resina, efectivamente se une a PCNA endógeno, aunque se disgrega a una concentración de 500 mM de NaCl. En experimentos con PCNA de humano se había observado que el homotrímero es estable hasta la concentración de 500 mM NaCl y posteriormente se disgrega (Jonsson, 1998). Este resultado nos hace pensar que sucede algo parecido con PCNA de maíz, que podría afectar a PCNA tanto recombinante como endógeno.

En el Western Blot revelado contra la ciclina D se obtuvo un doblete de alrededor de 72 KDa en las fracciones eluidas con 1.0 M de NaCl de la columna Hi-TRAP NHS-PCNA (Fig. 9). Aparentemente había una proteína con un corrimiento semejante en la columna de albúmina; no obstante, podemos concluir que no se trata de la misma proteína, pues el Western Blot nos indica que la proteína que reacciona con el anticuerpo anti-ciclina D sólo se encuentra en aquellas fracciones obtenidas de la columna de Hi-TRAP NHS-PCNA (Fig. 6, 7).

Al realizar el Western Blot revelado con anticuerpos contra proteínas que contienen la secuencia PSTAIRE, encontramos que se detectan proteínas con masas moleculares de 36 y 32 KDa. Ambas se encuentran en muy bajas concentraciones y sólo en la fracción 21 eluida de la columna de PCNA con 1.0 M de NaCl. Estas dos proteínas han sido caracterizadas con anterioridad en el

laboratorio, encontrando que muestran un comportamiento diferencial durante la germinación; la proteína de 36 KDa se encuentra presente durante todo el proceso germinativo y la de 32 KDa parece estar presente sólo durante la germinación temprana. Esto nos hace suponer que se puede tratar de dos tipos de Cdk-A que contienen la secuencia consenso de unión a ciclinas (PSTAIRE) y que posiblemente se unan a diferentes ciclinas durante la germinación (María de la Paz Sánchez et al., enviado a publicación).

Con respecto a los Western Blots que inmunodetectan a p21 y p27, no obtuvimos un resultado positivo; esto podría indicar cualquiera de varias posibilidades, no excluyentes: a) que no se encuentren estas proteínas en las fracciones, b) que no se unan a PCNA, c) que el anticuerpo heterólogo no haya sido específico o d) que no existan proteínas semejantes en maíz.

El inmunodetectar juntas a la Cdk-A y a la ciclina D en la fracción 21, nos sugiere que esta fracción podría contener una actividad de cinasa, debido a que el complejo puede estar presente en su forma activa. Para comprobar esto, se realizó un ensayo de cinasa utilizando a la proteína Zm RBr, la cual es el sustrato natural de Cdk-A (PSTAIRE). Fue sumamente interesante observar que efectivamente existe una actividad de cinasa, lo que corrobora que en maíz existen complejos semejantes a aquellos encontrados en células de mamíferos y que de alguna manera, el control de la fase G1 del ciclo celular sería regulado de manera semejante. Todo esto nos lleva a pensar que el complejo ternario ciclina D / Cdk-A / PCNA se encuentra presente y activo a las 6 horas de germinación de maíz, lo cual también nos indica que estas semillas se encuentran en la fase G1. Las proteínas fosforiladas de mayor peso molecular que se encontraron en los

ensayos de cinasa podrían corresponder a otras proteínas que también se unan a PCNA; en particular se ha sugerido que en *Arabidopsis* existe una Ciclina D3 con un peso molecular de alrededor de 60 KDa, que se asocia a Cdk-A y que es fosforilada en los inmunoprecipitados (Healy, 2001). Esto sugiere que pueden existir diversos tipos de ciclinas D en maíz que pueden ser fosforiladas.

Finalmente, el conocer con exactitud que tipo de proteínas se asocian a PCNA y su significado fisiológico es una de las metas más importantes de este trabajo. Por esto, aquellas con mayor fuerza de unión fueron aisladas y preparadas para su microsecuenciación. En particular, una proteína de alrededor de 40 KDa y otra de 72 KDa fueron procesadas de esta manera. Ambas proteínas habían sido previamente secuenciadas por el extremo amino terminal y se encontró que estaban bloqueadas. Las proteínas sufren alteraciones postraduccionales para protegerse de degradación y bloquean su extremo amino por acetilación o glicosilación (Stryer, 1996). Por lo tanto, fue necesario purificar una mayor concentración de estas mismas proteínas, las que se enviaron a microsecuenciar una segunda vez, pero ahora por secuenciación interna; esto es, se hacen cortes internos de la proteína por medio de endoproteasas y se obtiene la secuencia de esos fragmentos. La finalidad de la microsecuenciación es obtener información que nos ayude a saber de que tipo de proteínas se trata; un segundo paso es obtener información que nos lleve a sintetizar oligonucleótidos específicos y con esto obtener, paso a paso, el gen que codifique para la proteína en cuestión y así estudiar más a fondo su función, significado en su asociación con PCNA y a la vez el significado fisiológico de proteína y asociación

Estos estudios nos demuestran la existencia de las interacciones que existe entre proteína-proteína. La interacción que existe entre ciclina D / Cdk-A / PCNA, proteínas reguladoras del ciclo celular, nos podrían ayudar a dilucidar el efecto que pueden tener sobre la replicación del DNA.

VIII. CONCLUSIONES

- Se observaron diferentes proteínas que se unen específicamente a PCNA empleando una resina Hi-TRAP acoplada a PCNA. Estas proteínas eluyen a diferentes concentraciones de NaCl, indicándonos diferente afinidad de las proteínas por PCNA.
 - En las eluciones a 500 mM de NaCl hay presencia de PCNA, y anteriormente se había reportado para PCNA de humanos que el homotrímero era inestable a esta concentración salina.
 - En las fracciones de mayor afinidad, eluidas con 1.0 M de NaCl, encontramos actividad de cinasa dada por un complejo ternario formado por PCNA / Cdk-A / ciclina, la cual podría ser de tipo D.

- El observar que PCNA tiene diferentes interacciones con múltiples proteínas sugiere que la proteína juega un papel importante en la formación de complejos que posiblemente intervengan en el control del ciclo celular y en la replicación del DNA; lo anterior podría ser un factor fundamental para lograr una germinación exitosa.

- Al inmovilizar a PCNA en una columna, podemos obtener las proteínas que interactúan con este y posteriormente caracterizarlas y encontrar la función que realizan junto con PCNA, durante la germinación de maíz.

IX: APENDICE

SOLUCIÓN DE IMBIBICIÓN:

Tris-HCl	pH 7.4	50mM
KCl		50mM
MgCl ₂		10mM
Sacarosa		2%

SOLUCION DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Tris-HCl	70 mM	pH 7.5
MgCl ₂	1.0 mM	
KCl	25 mM	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5.0 mM	pH 8.0
Sacarosa	0.25 mM	
DTT	7.5 mM	
Tritón X-100	0.1 %	

Para la extracción de proteínas a las cuales se les realizará el ensayo de actividad de cinasa se le adiciona al amortiguador anterior lo siguiente:

NaF	50mM
Na ₃ VO ₄	1mM
B-glicerolfosfato	80mM

1 tableta de la mezcla de inhibidores de proteasas Complete™ (Boehringer) por cada 10 ml de amortiguador).

SDS-PAGE.

Acrilamida 30%

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
H ₂ O c.b.p	100 ml

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 6.8)

Tris-HCl	7.88 g
SDS	0.4 g
H ₂ O c.b.p	100 ml

Amortiguador del gel separador 2X (pH 8.8):

Tris-HCl	23.64 g
SDS	0.4 g
H ₂ O c.b. p.	100 ml

PREPARACION DE LOS GELES

<u>Gel separador:</u>	8%	11%
Amortiguador del gel separador 2X	1.25 ml	1.25 ml
Acrilamida/bisacrilamida al 30 %	4.33 ml	3.6 ml
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ al 20 %	25 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl
H ₂ O	6.73 ml	5.0 ml

Gel apilador:

Amortiguador del gel apilador 2X	0.750 ml
Acrilamida/bisacrilamida al 30 %	0.500 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 20 %	7.5 μl
TEMED	10 μl
H ₂ O	1.83 ml

AMORTIGUADOR DE CARGA 4X

Tris-HCl	200 mM pH 6.8
DTT	400 mM
SDS	8%
Glicerol	40%

Azul de bromofenol. Adicionar la mínima cantidad posible.

AMORTIGUADOR DE ELECTRODOS 10X (pH 8.3)

Tris-HCl 250 mM	30.32 g
Glicina 1.92 M	144 g
SDS al 1%	10 g
H ₂ O	1000 ml

TINCIONES DE GELES

SOLUCION DE AZUL DE COOMASIE G

Coomasie G25	0.05%
HClO ₄ (70%)	5.18%

TINCION POR NITRATO DE PLATA

Solución de fijación

Metanol	50%
Acido acético	5%

Solución de sensibilización

Tiosulfato de sodio	0.02%
---------------------	-------

Solución de nitrato de plata

Nitrato de plata (Sigma)	0.1%
--------------------------	------

Solución reveladora

Carbonato de sodio	2%
Formaldehído	0.04%

El formaldehído no debe estar oxidado, esto es, debe estar transparente la solución y se añade momentos antes de empezar a revelar.

WESTERN BLOT

Solución de transferencia

Glicina	1.44%
Tris-HCl 1M (pH=8.3)	2.5%
Metanol	4%
H ₂ O	1000 ml

PBS 10X (pH=7.4) (amortiguador salino de fosfatos)

NaCl	8%
KCl	0.2%
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.72%
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.28%
H ₂ O	1000 ml

Solución de bloqueo

PBS 1x	20 ml
Leche en polvo	5%
Tween 20	1.2%

Anticuerpos

Primer anticuerpo:

α -PCNA	1:1500
α -Cyc D	1:1000
α -PSTAIR (cdc2a)	1:1500
α -p21	1:1500
α -p27	1:1500

Segundo anticuerpo:

α -conejo	1:10,000
α -ratón	1:3500

Solución para lavar las membranas donde se han transferido anteriormente las proteínas

EDTA 0.5 mM pH=8	200 μ l
SDS	2 g
NaCl	2.9 g
PBS 1X cbp	100 ml

AMORTIGUADOR PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CINASA

Tris-HCl	70 mM pH=7.5
EGTA	5 mM
NaCl	150 mM
β -glicerolfosfato	60 mM
Na_3VO_4	1 mM
NaF	25 mM
MgCl_2	10 mM

X. BIBLIOGRAFIA

- 1) Araki H., Ropp P.A., Johnson A.L., Morrison A., Sugino A., (1992), *DNA polymerase II, the probable homolog of mammalian DNA polymerase epsilon, replicates chromosomal DNA in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 11: 733-740
- 2) Ball, K.L., Lane, D.P., (1996), *Human and plant proliferating-cell nuclear antigen have a highly conserved binding site for the p53-inducible gene product p21^{Waf1}*, Eur. J. Biochem., 237: 854-861.
- 3) Bewley, J. D., Black, M., (1994), *Physiology and Biochemistry of seeds in relation to Germination*, Germany , 1: 106-131.
- 4) Blow, J.J., (1996), Eukaryotic DNA Replication, Frontiers in Molecular Biology, IRL Press, Oxford, Inglaterra, pp. 1-19.
- 5) Bravo, R., Celis, J.E., (1980), *A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells*. J. Cell Biol., 84: 795-802.
- 6) Buchanan, Gruissem, Jones, (2000), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, pp. 268
- 7) Celis, J.E., Madsen, P. (1986), *Increased nuclear cyclin / PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair*, FEBS Lett., 209:277-283.
- 8) Downey, K.M., Tan C.K. So A.G., (1990), *DNA polymerase delta: a second eukaryotic DNA replicase*, Bioessays, 12, 231:236.
- 9) Flores-Rozas H., Kelman Z., Dean F., Pan ZQ. Harper Jw, (1994), *Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and*

- inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase δ holoenzyme*, Proc. Natl. Acad. Sci., Usa, 91:8655-8659.
- 10) Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., Hashimoto, J., (1992), *Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase δ auxiliary protein*, Eur. J. Biochem., 203: 367-371.
- 11) Healy, J.M., Menges, M., Doonan, J.H., Murray, J., (2001), *The Arabidopsis D / type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled*, J. Biol. Chem., 276:7041-7047.
- 12) Herrera, I., Sánchez M.P., Molina, J., Plasencia J., Vázquez-Ramos J., (2000), *Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins*, Physiol. plantarum, 110: 127-134.
- 13) Huntley R., Murray J., (1999), *The plant cell cycle*, Curr. Op. Plant Biol., 2: 440-446.
- 14) Hutchison, C., Glover, D.M., (1995), Cell Cycle Control, Frontiers in Molecular Biology, IRL Press, Oxford, Inglaterra, pp. 156-166.
- 15) Jonsson, Z., Hindges, R., Hubscher, U., (1998), *Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen*, The EMBO J., 17: 2412-2425.

- 16) Kelman, Z., O'Donnell, M., (1995), *Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps*, Nucleic Acids Res. 23: 3613-3620. Corrigendum: 23: 4938
- 17) Krishna TSR, Kong X-P, Burger PM., Kuriyan J, (1994), *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA*, Cell, 79:1233-1243.
- 18) Kuriyan, M. O'Donnell, (1993), *Sliding clamps of DNA polymerases*, J. Mol. Biol., 234: 915-925.
- 19) Laquel, P., Litvak, S. and Castroviejo, M., (1993), *Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases*, Plant Physiol., 102:107-114.
- 20) Li X., Li J., Harrington J., Lieber M.R., Burgers PMJ., (1995), *Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen*, J. Biol.Chem., 270: 22109-22112.
- 21) López I., Khan, Z., Vázquez, J., Hussey, P., (1997), *The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in Zea mays is composed of two members that have similar expression programmes*, Biochim. Biophys. Acta, 1353:1-6.
- 22) Loor, G., Zhang, S., Zhang P., Toomey, N., Lee, M., (1997), *Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA*, Nucl. Acids Res., 25: 5041-5046.
- 23) Matsumoto, Y., Kim, K., Bogenhagen, D.F., (1994), Mol. Cell Biol., 14: 6187-6197.
- 24) Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M., (1978), *An autoantibody to nuclear antigen in proliferating cells*, J. Immunol., 121: 2228-2234

- 25) Pagano M., Theodoras A.M., Tam Sw, Draetta G.F., (1994), *Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts*, Genes Dev., 8: 1627-1639.
- 26) Sanchez, M.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutiérrez, C., Vázquez-Ramos, J.M., (2001), *PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize*, Plant Mol. Biol., en prensa.
- 27) Schimizu, S., Mori H., (1998), *Changes in proteins interactions of cell cycle-related genes during the dormancy to growth transition in Pea Auxillary Buds*, Plant Cell Phys., 39: 1073-1079.
- 28) Tsurimoto, T., Stillman, B., (1991), *Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins*, J. Biol. Chem, 266: 1950-1960.
- 29) Tsurimoto, T., (1998), *PCNA, a multifunctional ring on DNA*, Bioch Bioph Acta, 1443: 23-39.
- 30) Vázquez-Ramos, J. (2000), "Cell cycle control during maize germination." Seed Biology: Advances and Applications, Vázquez-Ramos, J., Black, M., Bradford, K. Eds. CAB International, Oxford, Inglaterra, pp. 261-270.