



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INTERACCIÓN *IN VITRO* DE PCNA CON PROTEÍNAS DE CICLO  
CELULAR**

**TESIS**

QUE PRESENTA:

**ALDO TONATIUH LEMUS ENCISO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. AURORA LARA NUÑEZ**



**CD. MX.**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: BERNAL LUGO IRMA OFELIA**  
**VOCAL: CANIZALES QUINTEROS SAMUEL**  
**SECRETARIO: LARA NÚÑEZ AURORA**  
**1ER SUPLENTE: PLATA RAMOS MARÍA DEL CONSUELO**  
**2DO SUPLENTE: GUTIÉRREZ AGUILAR MANUEL**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 114, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

**ASESOR DEL TEMA**

**DRA. AURORA LARA NÚÑEZ**

**SUSTENTANTE**

**ALDO TONATIUH LEMUS ENCISO**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>TABLAS</b>	<b>4</b>
<b>FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1. El maíz	6
1.2 El ciclo celular	8
1.2.1 Complejo Ciclina/CDK en plantas	13
1.2.1.1 Cinasa dependiente de ciclina (CDK)	13
1.2.1.2 Ciclinas	14
1.2.1.3 Regulación del complejo Cyc/CDK	15
1.3 PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular)	17
1.3.1 Estructura	18
1.3.2 Interactividad	19
1.3.3. Función	23
1.3.3.1 Replicación del DNA	23
1.3.3.2 Control del ciclo celular	25
1.4 Inhibidores de CDKs	26
1.4.1 Inhibidores de CDKs en mamíferos	26
1.4.1 Inhibidores de CDKs en plantas	28
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>30</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>39</b>

<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
7.1 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	46
7.2 Purificación de las proteínas recombinantes	47
7.3 Controles de purificación inespecíficos con la columna de anclaje	49
7.4 Controles de interacciones <i>in vitro</i> inespecíficas	50
7.5 Técnicas de interacción <i>in vitro</i>	51
7.6 Ensayos de inhibición de la actividad de cinasa	53
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>60</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>62</b>

## **RESUMEN**

En la actualidad, es difícil comprender la regulación de la actividad biológica de las proteínas de manera aislada, ya que los diversos procesos celulares y rutas funcionales están determinados por asociaciones proteicas. Para el estudio de las interacciones que se presentan en distintos momentos del ciclo celular, se han empleado principalmente tres estrategias: sistemas de doble híbrido, complementación bimolecular de la fluorescencia y purificación por afinidad en tándem, clarificando la importancia de las asociaciones en estos procesos.

La proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) se ha conservado a través de la evolución en secuencia y estructura y se encuentra presente en todas las especies eucariotas. Se describió inicialmente como una proteína accesoria para la DNA polimerasa delta (DNA pol  $\delta$ ) requerida para la síntesis *de novo* de DNA. PCNA desempeña un papel crucial no sólo en la replicación del DNA, sino también en la regulación del ciclo celular, la reparación de daño de DNA, entre otros procesos celulares.

PCNA actúa como plataforma molecular para numerosas interacciones proteína-proteína importantes en la regulación del ciclo celular. En mamíferos PCNA interacciona con reguladores del ciclo celular. Se ha reportado en este sistema la formación de un complejo cuaternario entre PCNA, p21, CDK (cinasa dependiente de ciclina) y Cyps D (ciclina D), lo que sugiere un modelo complejo de regulación. La proteína p21 inhibe la progresión hacia la fase S, cuando PCNA se encuentra sobre el DNA, bloqueando la asociación de ésta con DNA pol  $\delta$ , deteniendo así la síntesis de DNA en mamíferos. Aunque no se han identificado homólogos de p21 en plantas, existe la presencia de la familia de KRPs (Kip related proteins) cuya función de regular el ciclo celular inhibiéndolo sugiere la posible formación de un complejo cuaternario o binario con PCNA análogo al de mamíferos.

La unión de p21 a PCNA es a través de un motivo conservado en p21 denominado PIP (PCNA interacting protein). En la familia de KRPs de maíz se identificaron por análisis *in silico* motivos PIP no canónicos o PIP-like en las proteínas KRP4;2 y KRP1;1.

Mediante el uso de las construcciones His-PCNA y dos distintas GST-KRPs de maíz se analizó la interacción de estas *in vitro*. Mediante la técnica de combinación de cultivos bacterianos sobre-expresantes de las distintas proteínas recombinantes y co-purificación a través del TAG de una de ellas por cromatografía de afinidad, se demostró la interacción entre PCNA con cada una de las KRPs.

Posteriormente, en el ensayo de la actividad de cinasa de complejos asociados a PCNA de extractos de maíz, en los que se sabía que el complejo CycD/CDK estaba presente, al añadir a los inhibidores (KRPs) de manera exógena, se observó la inhibición de la actividad, lo que sugiere la presencia de PCNA como una plataforma de unión con CDKs, CycDs y KRPs, conformando un complejo regulatorio del ciclo celular.

La interacción de PCNA con alguna KRP podría ser un mecanismo de regulación que hasta la fecha no se ha descrito ni reportado en plantas.

## **ABREVIATURAS**

ABA	Ácido abscísico
BA	Benciladenina
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CID	Dominio de inhibición de CDKs
Cyc	Ciclina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
DP	Proteína compañera de dimerización
E2F	Factor de unión al promotor E2
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas
ICK	Proteína inhibidora de CDK
IDCL	Asa conectora de interdominios
kDa	Kilodaltones
KRP	Proteína relacionada a Cip/Kip
mRNA	RNA mensajero
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIP	Motivo de interacción de proteínas con PCNA
RBR	Proteína relacionada al retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
Thr	Treonina
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta



## **TABLAS**

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz

Tabla 2. Motivos de interacción a PCNA

Tabla 3. Motivos de unión a PCNA de proteínas de ciclo celular.

Tabla 4. Peso molecular esperado de las construcciones a evaluar

## **FIGURAS**

Figura 1. La planta de maíz

Figura 2. Representación gráfica del ciclo celular y sus checkpoints

Figura 3 Esquema general de las fases del ciclo celular y principales componentes que participan en cada una de ellas.

Figura 4. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas

Figura 5. Regulación de la actividad de CDK

Figura 6. Estructura del trímero de PCNA de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 7. Región de interacción de PCNA: IDCL

Figura 8. Unión de motivo canónico PIP de p21 con PCNA

Figura 9. Modelo de la replicación de DNA en eucariontes

Figura 10. Modelo de interacción de PCNA con proteínas durante el ciclo celular

Figura 11. Inmunodetección de PCNA en las fracciones celulares durante la germinación de maíz.

Figura 12. Actividad asociada a PCNA sobre Histona H1.

Figura 13. Asociación de proteínas del ciclo celular con PCNA.

Figura 14. Interacción entre AtPCNA1 y el péptido p21.

Figura 15. Nivel de proteína ICK durante la germinación.

Figura 16. Análisis filogenético y de secuencia de la familia ICK / KRP del maíz.

Figura 17. Ensayos de interacción *in vitro* entre CycD2; 2, CDKA, KRP1;1 y KRP4;2

Figura 18. Inhibición de la actividad de la cinasa en los complejos CycD-CDK por KRP1;1 y KRP4;2.

Figura 19. Inhibición de la actividad cinasa asociada a PCNA por un polipéptido de Zm KRP4;2.

Figura 20. Purificación de PCNA-His por resina de Níquel.

Figura 21. Purificación de MBP-CycD2;2 por resina de Maltosa.

Figura 22. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST con resina de glutatión.

Figura 23. Solo PCNA-His se ancla a la resina de Níquel

Figura 24. Interacción *in vitro* utilizando a PCNA-His como proteína de anclaje. Controles de purificación inespecíficos con la columna de anclaje

Figura 25. Interacción *in vitro* utilizando a PCNA-His como proteína de anclaje. Controles de interacciones *in vitro* inespecíficas

Figura 26. Interacción *in vitro* ente PCNA-His y GST-CDKs

Figura 27. Interacción *in vitro* ente PCNA-His y GST-KRPs

Figura 28. Efecto de ZmKRPs sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Inducción de la proteína recombinante PCNA-His

Anexo 2. Inducción de las proteínas recombinantes GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1

Anexo 3. Inducción de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2

Anexo 4. Alineamiento de las proteínas KRPs con p21.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El maíz

El maíz, junto con el arroz y el trigo, es una de las plantas más valiosas a nivel mundial, no sólo por ser una fuente abundante nutricional para la gente y el ganado, sino también por ser una materia prima indispensable en la fabricación de productos alimenticios, farmacéuticos y de uso industrial.

México es identificado como centro de origen, diversidad y domesticación del maíz. De las aproximadamente 300 razas de maíz que existen en América Latina, en México se encuentran entre 59 y 62, las cuales son el resultado de la cuidadosa selección que realizaron poblaciones indígenas durante unos 10,000 años y recientemente, grupos mestizos que las han domesticado adaptándola a climas suelos, plagas y a diferentes usos.

Los registros demuestran que, a partir del año de 1998, el maíz superó al trigo y se colocó como el cereal con mayor producción a nivel mundial, en el año 2016 alcanzó más de mil millones de toneladas colocándolo como el segundo producto agrícola con mayor producción solo por debajo de la caña de azúcar (FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC/visualize>). Esto lo convierte en una planta con gran valor económico para nuestra región y para el mundo entero.



*Figura 1. La planta de maíz.*  
Disponibile en <http://www.agroatlas.ru> y <https://www.cnseed.org>

Adicionalmente, el maíz también ha cobrado importancia en la ciencia; durante muchos años el estudio de la biología, bioquímica y genética vegetal se ha basado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, desde hace unas décadas se ha comenzado a adoptar nuevos modelos vegetales como trigo, arroz, tabaco, frijol, alfalfa, maíz, etc., los cuales tienen en común ser plantas con valor comercial, cobrando mayor importancia su estudio.

El maíz también ha adquirido importancia como modelo biológico ya que tiene una larga historia de desarrollo de herramientas genéticas y genómicas, además de ser considerado uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles. Con un genoma completamente secuenciado, un conjunto de herramientas citogenéticas, métodos de genética tanto de forma directa como inversa y marcadores de fenotipo caracterizados, el maíz resulta objeto de estudio de aspectos incluso más allá de la biología vegetal. Grandes descubrimientos en las áreas de los transposones, la impronta y la biología cromosómica provienen del trabajo en maíz, concluyendo que el maíz resulta un sistema modelo clásico, que seguirá estando a la vanguardia del estudio biológico (Nannas & Kelly Dawe, 2015).

De acuerdo con su clasificación taxonómica, el maíz forma parte de un género (*Zea*) que incluye muchas otras plantas que se denominan genéricamente “teocintle”. A pesar de que las características morfológicas del maíz son diferentes respecto a las otras subespecies de *Zea mays*, a nivel molecular e inclusive celular las diferencias son poco notorias, siendo más importantes las estrechas similitudes: todas poseen 10 cromosomas, presentan únicamente 5 regiones significativamente diferentes en su genoma, el programa de división celular esencialmente es el mismo, y son capaces de producir híbridos totalmente fértiles y viables (Doebley, 2004).

En términos biológicos el maíz (*Zea mays*) es una planta vascular perteneciente al subreino Tracheobionta que cuenta con raíz, tallo y hojas. Desarrolla flor, lo cual la clasifica en la división Magnoliophyta. El maíz produce y se desarrolla a partir de semillas (Spermatophyta), pertenece a la clase Lilipsida lo cual significa que presenta sólo un cotiledón en su eje embrionario (monocotiledónea) y se clasifica

en la familia Poaceae, a la cual también pertenecen el trigo, el arroz, la caña de azúcar, etc. (USDA, <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ZEMA>).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del maíz

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae
<b>Género</b>	<i>Zea</i>
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i>
<b>Subespecie</b>	<i>Zea mays ssp. mays</i>

Datos del USDA (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ZEMA>)

## 1.2 Ciclo celular

El ciclo celular tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de todos los organismos multicelulares, que en conjunto con la diferenciación celular darán lugar a la formación de un nuevo organismo (Dewitte & Murray, 2003).

Se trata de un proceso conformado por una serie de eventos moleculares coordinados de manera temporal, espacial y de forma unidireccional cuya función básica es la de duplicar en forma exacta el DNA cromosómico y su posterior distribución en dos células hijas genéticamente iguales, así como asegurar a lo largo del ciclo que este se realice de forma regulada y eficiente para la correcta generación de sistemas complejos como lo son los sistemas celulares (Alberts et.al., 1994).

El número de componentes que participan en el desarrollo y regulación del ciclo celular es extenso rondando los cientos. Entre todos los eucariontes se ha observado un alto grado de conservación en secuencia proteica, así como en vías y/o mecanismos que regulan al ciclo. Aunque existen claras diferencias entre plantas y animales en estructura celular, organización, crecimiento, desarrollo y diferenciación, se ha visto que convergen en la maquinaria central del ciclo celular. Sin embargo, análisis en la secuencia del genoma demuestran una evolución independiente entre plantas y animales. Por lo tanto, es de esperar diferencias en los mecanismos mediante los cuales la influencia del ambiente y del desarrollo interactúan con el ciclo celular (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

En el ciclo celular se identifican dos etapas: la interfase y la mitosis. La interfase a su vez comprende tres etapas metabólicas: G1, S y G2. Antes de que pueda llevarse a cabo el proceso de división, para formar dos nuevas células, durante la mitosis, la célula debe duplicar su DNA cromosómico, incrementar la cantidad de histonas y otras proteínas asociadas al DNA; multiplicar el número de organelos a repartir entre las dos células hijas y ensamblar la maquinaria proteica requerida para que se puedan separar los cromosomas durante la mitosis y culminar con la citocinesis. Estos procesos ocurren durante la interfase (Alberts et.al., 1994).

Durante la interfase, en la primera fase (G1) la célula percibe las condiciones ambientales (nutrientes, temperatura, humedad, hormonas, entre otros) que desencadenan señales para que ésta se prepare a iniciar el ciclo celular y se compromete a la siguiente fase. La célula incrementa su capacidad enzimática, se replican sus organelos y otras estructuras citoplasmáticas, dando inicio a un proceso de alargamiento. Después de alcanzar un cierto tamaño (en promedio el doble del tamaño original), las células entran a la siguiente fase (S o de síntesis), en la cual ocurre la síntesis de DNA para duplicar el material hereditario el cual será repartido en dos nuevas células. Durante la siguiente fase (G2) la célula asegura que la replicación del DNA se haya realizado de manera completa y sin errores, de lo contrario el ciclo celular se vería comprometido a activar los mecanismos de reparación. Finalmente, en la fase M o mitosis se lleva a cabo la segregación de

cromátidas en dos células que serán genéticamente iguales. (Alberts et.al., 1994; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Completado este proceso se prosigue a la mitosis, la que sucede en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. Durante la profase ocurre la ruptura de la membrana nuclear y la condensación de cromatina para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las dos nuevas envolturas nucleares rodean a cada juego de los cromosomas separados, éstos se descondesan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis. Después de la división de las células, éstas reingresan a la fase G1 y el ciclo celular puede recomenzar (Alberts et.al., 1994; Magyar et.al., 2013).

Las células integran la información externa que es derivada de estímulos mitogénicos y de la disponibilidad de nutrientes para prepararse y poder pasar a través de las distintas fases del ciclo celular. Para asegurar la progresión apropiada, las células han desarrollado puntos de control o checkpoints, que previenen la entrada a una nueva fase hasta que hayan completado correctamente la fase previa.

Existen tres puntos principales de control: (1) la entrada a fase S (transición G1/S), (2) la entrada a mitosis (transición G2/M) y (3) la salida de mitosis (el paso de metafase a anafase) (Figura 2). La transición G1/S es vital, dado que una vez que la célula se compromete a dividirse y empieza a replicar su DNA debe completar el ciclo, de lo contrario morirá. Una vez que el DNA ha sido replicado completamente, la transición G2/M es importante para la célula, pues se asegura que todo el DNA ha sido copiado correctamente, o las células hijas no poseerán todo el material genético derivado de su antecesora. Finalmente, otro punto fundamental de control es durante la mitosis, en la transición de metafase a anafase, en la que la célula verifica que todos los cromosomas estén unidos correctamente en los microtúbulos del huso mitótico y estén alineados en el plano de metafase.

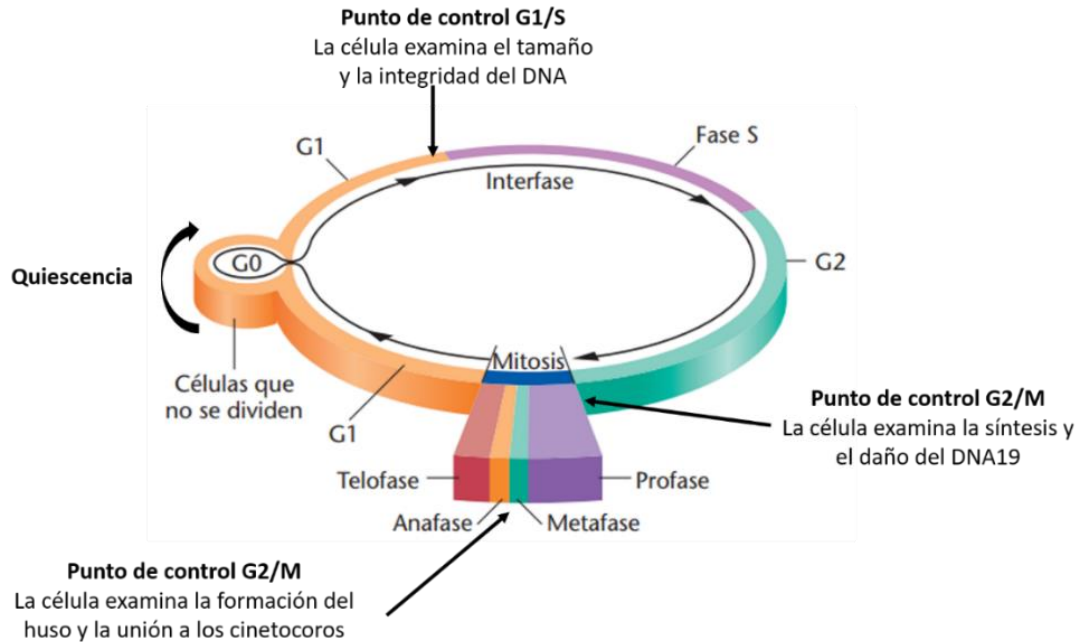


Figura 2. Representación gráfica del ciclo celular y sus checkpoints. (Modificado de(Klug, Cummings, & Spencer, 2006)

La regulación del ciclo celular es importante para el crecimiento y desarrollo de los organismos. El progreso del ciclo celular es regulado por la actividad de cinasa de complejos proteicos heterodiméricos formados por una subunidad catalítica, denominada cinasa dependiente de ciclina (CDK) y una subunidad regulatoria, llamada ciclina (Cyc). Los complejos Cyc/CDK son los encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco que controlan las transiciones de G1/S, G2/M y metafase a anafase durante la mitosis (Magyar et al., 2013).

Los complejos CycD/CDKA fosforilan a la proteína RBR en la transición G1/S, liberando al factor transcripcional E2F/DP, lo que a su vez permite la transcripción de un conjunto de actores encargados de conducir la progresión del ciclo celular. En S, así como en G2 se establecen diversos complejos CycA/B con CDKA/B, mientras que en M sólo se han observado complejos CycB/CDKB, fosforilando una vasta cantidad de sustratos, dando inicio a la replicación y a la mitosis respectivamente. Para que el ciclo funcione correctamente las ciclinas son degradadas y sintetizadas de *novo* al iniciar un nuevo ciclo (Figura 3).



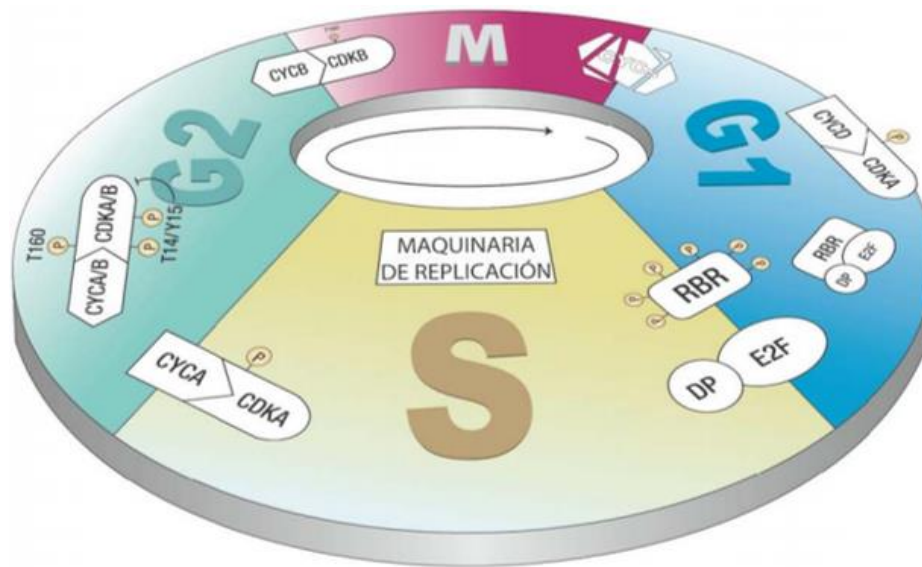


Figura 3. Esquema general de las fases del ciclo celular y principales componentes que participan en cada una de ellas. (Garza Aguilar, et.al., 2014)

En levaduras, la regulación de las tres transiciones es mediada por la actividad de quinasas de sólo una forma de CDK con su respectiva ciclina. En animales y plantas superiores, el avance del ciclo celular es más complejo debido al gran número de genes reguladores de ciclo celular como CDKs y Cycs contenidos en sus genomas. Esto sugiere que existe una dinámica y diversidad de formación (ensamblaje y desensamble) de heterodímeros Cyc/CDK más compleja en el progreso y regulación del ciclo celular. Además, se ha demostrado que el complejo se asocia a otras proteínas tales como factores de replicación o PCNA durante la fase G1 del ciclo, regulando esta maquinaria.

Los genomas vegetales codifican, en general, para un mayor número de genes que los genomas animales, lo que origina una mayor cantidad de proteínas del ciclo celular. Esto genera una alta complejidad, tanto en asociaciones como en mecanismo de regulación. Algunos de estos genes y proteínas son únicos en plantas, reflejando así la alta plasticidad que las especies vegetales requieren para enfrentarse a un estilo de vida sésil.

## 1.2.1 Complejo Ciclina/CDK en plantas

### 1.2.1.1 Cinasa dependiente de ciclina (CDKs)

Las CDKs fueron descritas por primera vez cuando su actividad de cinasa mostró ser el componente activo del factor promotor de mitosis, es decir, el componente proteico que conduce a una célula de interfase a mitosis (Gautier et.al., 1988). La CDK se describió como un regulador maestro de la progresión del ciclo celular de aproximadamente 34 kDa, producto de los genes *cdc2/CDC28*. Las CDKs son proteínas cinasas de serina y treoninas (Ser/Thr) y en plantas se clasifican en 8 grupos de acuerdo con el motivo de unión a la ciclina, no todas las CDKs están directamente involucradas en el control del ciclo celular en plantas, dos grupos principales que sí median la regulación de este proceso son los más estudiados, las CDKs tipo A y B (Menges et al., 2005; Vandepoele et al., 2002).

El grupo de CDKAs se caracteriza por presentar un motivo canónico PSTAIRE de unión a ciclina, altamente conservado y estructuralmente homólogo a las proteínas cinasas de mamíferos y levaduras. En estudios del ciclo celular de distintas especies vegetales, los niveles de CDKA tanto de transcrito como de proteína son constantes en todas las fases del ciclo celular, esto indica que las CDKAs tienen un papel preponderante en la proliferación celular durante el desarrollo de la planta regulando la progresión a la fase S como en el paso a la mitosis, asociándose a diferentes ciclinas conforma progresa el ciclo celular (Inzé & De Veylder, 2006; Vandepoele et al., 2002).

Las CDKs tipo B son específicas de plantas ya que carecen de homólogos en levaduras y mamíferos. Éstas poseen un motivo de unión a ciclinas divergente PPTAIRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2. El gen de *CDKB* durante el ciclo celular de distintas especies vegetales se expresa desde la fase S tardía hacia la transición G2/M, lo que ha sugerido que actúa en dichas etapas (Magyar et al., 2013, 1997).

El estado de fosforilación de las CDKs es fundamental para la actividad del complejo que estas forman con las ciclinas (CDKs/Cybs) (Pines, 1995). Su activación está

determinada por la fosforilación de un residuo de treonina conservado en la zona central de la proteína (Treonina 160), mientras que la inhibición se da por la fosforilación de un residuo de treonina o de un residuo de tirosina en la región amino terminal (Treonina 14 y Tirosina 15).

### 1.2.1.2 Ciclinas

Las ciclinas, denominadas así porque a diferencia de las CDKs se acumulan y degradan cíclicamente durante el ciclo celular, son el principal factor que determina el tiempo de actividad de las CDKs. Las alteraciones cíclicas de las concentraciones de ciclinas contribuyen a la formación y activación de los complejos CDK/Cyts. Son proteínas típicamente inestables, con un alto número de recambio y vida media corta. Las ciclinas son una familia de proteínas que tienen una región conservada de 250 aminoácidos; la cual a su vez está constituida por dos dominios: el dominio N-terminal que comprende una región de 100 residuos de aminoácidos, en donde se encuentra una secuencia de ocho aminoácidos llamada caja de ciclina, que sirve como sitio de unión a CDK, y el dominio C-terminal, menos conservado y a veces ausente en algunas ciclinas, lo que sugiere que provee una función específica o adicional, pero quizá no crítica. Además, casi todas presentan el motivo conservado LXCXE (en el que X representa cualquier residuo de aminoácido) cerca del extremo amino terminal, el cual es responsable de la interacción con la proteína RBR, sustrato de complejos CycD/CDKA en la transición G1/S. Adicionalmente, algunas ciclinas tipo D de plantas poseen cajas PEST que regula su degradación mediante el mecanismo de ubiquitinación-proteasoma (Capron, 2003; Inzé & De Veylder, 2006).

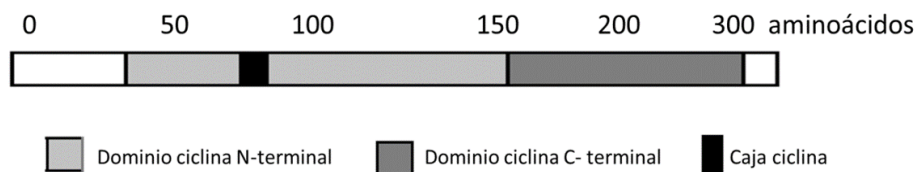


Figura 4. Representación esquemática de los dominios característicos de ciclinas (Modificado de Buendía-Monreal et al., 2011)

Dependiendo de la similitud estructural y de los patrones de acumulación periódicos durante el ciclo celular, estas proteínas se agrupan en ciclinas de G1 (tipo D en eucariontes superiores) y ciclinas mitóticas (tipos A y B) (Pines, 1995).

Las ciclinas tipo A pueden interaccionar con CDKA y CDKB, actuando en la fase S y en la transición G2/M; las ciclinas tipo B controlan la progresión del ciclo celular durante la mitosis, y se asocian con CDKBs (Van Leene et al., 2010).

Las ciclinas tipo D de plantas, así como las de mamíferos y levaduras son fundamentales en el inicio o reinicio del ciclo celular, su expresión está asociada a la proliferación celular y responden fuertemente a señales mitogénicas como lo son las fitohormonas, factores de estrés, concentración de azúcares y a señales internas como velocidad de crecimiento o tamaño de la célula (Menges & Murray, 2002). Se asocian con CDKA y actúan en G1 y en la transición G1/S. Además, se ha observado que estas ciclinas se expresan de manera diferencial en ciertos tejidos y etapas del desarrollo de la planta. Por ejemplo, en maíz se ha evidenciado la expresión diferencial de las ciclinas D2, D4 y D5 durante la germinación; además, se ha comprobado la asociación de este tipo de ciclinas con proteínas como KRPs y PCNA en este proceso fisiológico (Menges et al., 2005). Así mismo, aunque las ciclinas tipo D se encuentran clasificadas dentro del grupo de ciclinas llamadas originalmente como proteínas de G1, se ha demostrado que algunas de las ciclinas D de plantas se expresan constitutivamente en todo el ciclo celular (Kono et al., 2002).

Las ciclinas no solamente activan a las CDKs al inducir un cambio en la conformación de sus sitios catalíticos, sino que también contribuyen a la selección de sustratos específicos, localización subcelular y regulación de la estabilidad del complejo.

### **1.2.1.3 Regulación del complejo Cyc/CDK**

El ciclo celular eucariótico está regulado en múltiples puntos, pero en la mayoría de estos participa la activación de las CDKs, esto implica no solo la formación de

diferentes complejos Cyc/CDKs, sino también la intervención de mecanismos regulatorios de la actividad de cinasa del complejo. Los complejos Cyc/CDKs son regulados a diferentes niveles: a nivel de expresión de genes, nivel post-transcripcional, presencia de la proteína, modificaciones post-traduccionales, localización subcelular y la interacción con otras proteínas (Murray, 2004)

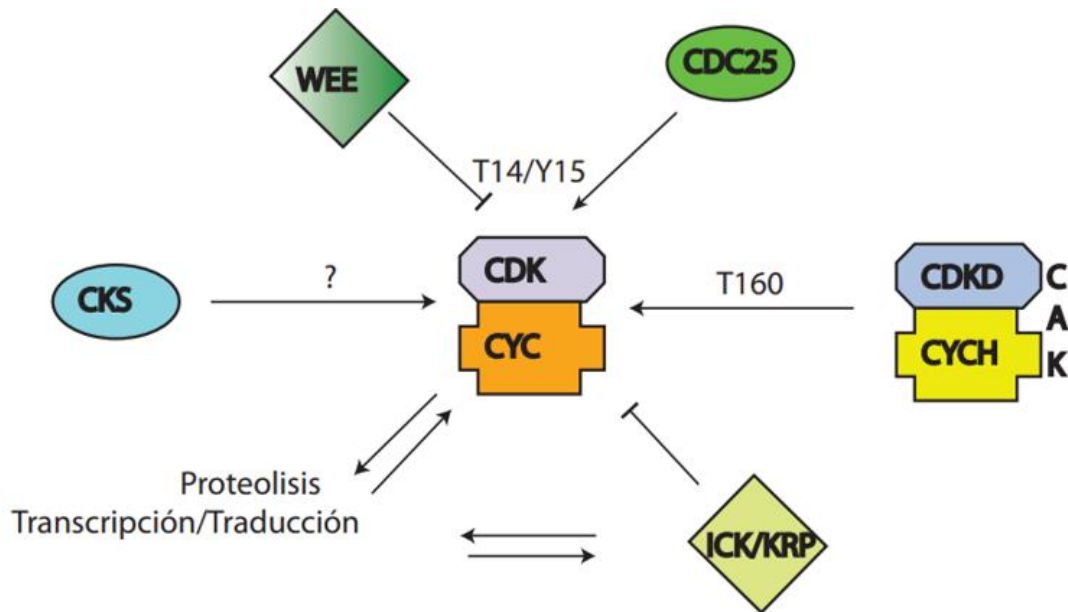


Figura 5. Regulación de la actividad de CDK. + Representa eventos inhibitorios. ← Representa eventos activadores. (Modificado de Ciemerych y Sicinski, 2005)

El monómero de CDK carece de actividad. La actividad de las CDKs se lleva a cabo de una manera compleja, pues son fosforiladas/desfosforiladas por cinasas/fosfatasa específicas. Una de estas modificaciones la realiza la cinasa activadora de CDK (CAK), este complejo proteico está compuesto por la ciclina H, la cinasa CDK7 y la proteína de ensamblaje Mat1, el cual activa al complejo ciclina/CDK por fosforilación en el residuo Thr 160 (Ciemerych & Sicinski, 2005). Mientras que la fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 por la cinasa Wee1 interfiere con la correcta unión de ATP y, por lo tanto, inhibe la actividad de las CDKs, en mamíferos estas fosforilaciones inhibitorias son eliminadas por la acción de la fosfatasa Cdc25 (Figura 5) (Dissmeyer et al., 2009). En el caso de plantas, solo se ha descrito la fosforilación de dichos residuos sobre CDKA.

Además, la actividad puede ser regulada por la asociación directa al complejo de diversas proteínas, tales como, la proteína CKS (subunidad de CDK) que actúa como factor de acoplamiento del sustrato al complejo, las proteínas inhibidoras de CDKs (ICK/KRPs) siendo inhibidores que bloquean o inhiben el ensamblaje de los complejos CDK/ciclina en respuesta a señales de desarrollo y anti-mitógenos regulando negativamente la actividad en la fase G1. PCNA es otra proteína que se asocia a estos complejos, pero aún no se entiende el papel de esta interacción en la regulación del ciclo celular (Inzé & De Veylder, 2006; Magyar et al., 2013; Vandepoele et al., 2002).

### **1.3 PCNA**

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) dentro de los procesos celulares es una de las proteínas con mayor importancia en las células eucariotas. Es una proteína que se identificó inicialmente en sueros de pacientes con lupus eritomatoso y cuya síntesis estaba relacionada con el estado proliferativo de las células (Miyachi et al., 1978). Posteriormente fue descubierta como una proteína que se expresaba de forma diferencial durante el ciclo celular, aunque bajo el nombre de ciclina (Bravo & Celis, 1980)

A pesar de la continua evolución del material genético a lo largo de millones de años PCNA ha retenido sus características en cuanto a estructura y función en eucariontes y arqueas. Análisis genómicos de esta proteína en diferentes especies (mamíferos, insectos y plantas) concluyen que es una proteína altamente conservada a nivel de secuencia, estructura y función (Stoimenov & Helleday, 2009).

Se ha demostrado inclusive que PCNA de levadura y *Drosophila* puede ser sustituida por PCNA de mamíferos en ensayos de replicación de DNA siendo estas funcionales para la replicación de DNA en los sistemas analizados (Bauer & Burgers, 1988).

### 1.3.1 Estructura

La estructura cristalográfica de la proteína de levaduras y humanos proporciona una clara idea del rol funcional de PCNA en los procesos replicativos. Pertenece a la familia de *pinzas deslizantes* del DNA, que incluye a la subunidad  $\beta$  de la DNA polimerasa (pol) III de *E. coli* y el fago T4. Este grupo de proteínas tiene la característica de poseer una estructura de anillo que favorece la habilidad de interactuar con la molécula del DNA (Kelman, 1997).

Estudios del cristal proteico han mostrado que PCNA es un complejo homotrimérico, en el que se distingue en su estructura dos distintas caras (Figura 5), una anterior por donde interactúa de manera inicial con el DNA y una posterior, por donde se anclan las DNA polimerasas (Moldovan et. al., 2007).

El anillo consiste en tres monómeros, cada uno está conformado de 2 dominios independientes, el dominio N-terminal referido como dominio A y el extremo C-terminal, dominio B. Cada dominio está unido a través de un conector flexible llamado asa conectora de interdominios (IDCL). Para formar la estructura final de anillo, 3 monómeros se organizan en forma de cabeza-cola, con el dominio A de una subunidad interactuando con el dominio B de la subunidad adyacente (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

La estructura forma un anillo hexagonal con simetría alrededor del DNA con un diámetro interno de 3.4 nm. En todas las especies estudiadas, PCNA es una proteína ácida con punto isoeléctrico bajo.

Mientras que el potencial electrostático general de PCNA es negativo, la superficie interna del anillo está cargada positivamente dada la presencia de varios residuos de lisina y arginina, así como una estructura secundaria favorecida de  $\alpha$  helices. El análisis mutacional de PCNA de levadura sugiere que los residuos cargados positivamente en el centro de la pinza crean una superficie de unión con el DNA, facilitando el paso de este, que posee una carga negativa, a través de PCNA y su subsecuentemente deslizamiento de la pinza a lo largo de esta estructura (McNally et.al., 2010).

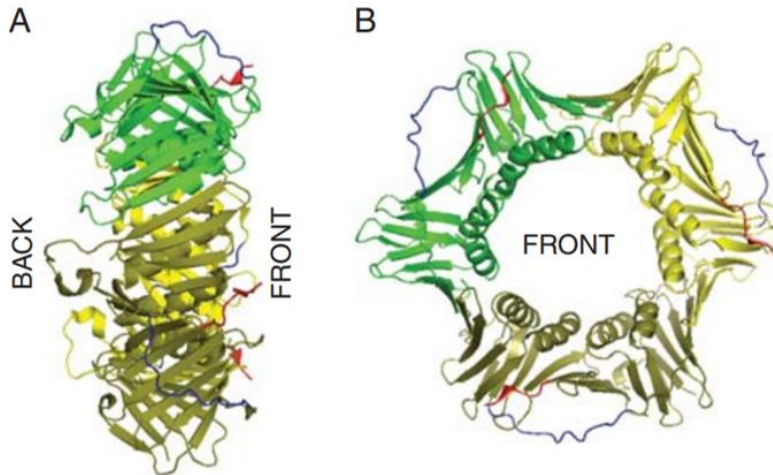


Figura 6. Estructura del trímero de PCNA de *Arabidopsis thaliana*. El modelo de AtPCNA se adaptó del banco de datos de proteínas (número de pdb: 2ZVV). Se utilizaron diferentes colores para cada subunidad: verde, amarillo y oliva. El loop de conexión entre dominios y el extremo C se colorearon en azul y rojo, respectivamente. (A) y (B) presentan las vistas lateral y frontal del anillo PCNA, respectivamente. El modelo fue generado usando el software PyMol (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

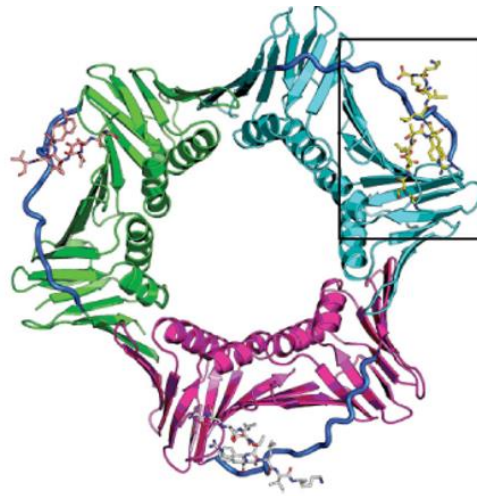
### 1.3.2 Interactividad

El anillo de PCNA posee un frente y reverso distintivos. El frente de PCNA está involucrado en interacciones proteína-proteína y contiene el IDCL (Jónsson, Hindges, & Hübscher, 1998). La función celular de PCNA es completamente dependiente de estas interacciones y hay una lista creciente de proteínas que se unen al frente de PCNA. Esta lista incluye proteínas involucradas en la replicación de DNA, reparación, control del ciclo celular, remodelación de cromatina, transcripción. PCNA interactúa con casi todas estas proteínas a través de un surco hidrofóbico localizado en la parte delantera de PCNA en el IDCL. Es importante mencionar que cada monómero contiene un sitio equivalente de unión y esto permite que 3 proteínas se una al trímero de PCNA simultáneamente.

Con respecto a la parte reversa del anillo, no existe aún evidencia de unión con alguna proteína. Esto podría deberse a que PCNA utiliza la parte posterior de su anillo para juntarse con otro anillo de PCNA, formando así el doble trímero. Este doble trímero se ha observado en humanos, mas no se descarta su presencia en otros organismos dado que se presencia parece ser clave para que se lleva a cabo



la replicación y reparación del DNA, debido a que pueden unirse a varias proteínas esenciales a la vez para estos procesos. Por ejemplo, la DNA polimerasa  $\delta$  y CAF-1 son necesarias para la replicación, y siendo que la DNA polimerasa, por su tamaño, abarca todo el frente del anillo, es muy difícil que CAF-1 se uniera, a menos que PCNA tuviera otro frente al que pueda asociarse. Adicionalmente, las mutantes que no pueden formar el doble trímero de PCNA por delección de los aminoácidos necesarios para anclar ambas estructuras activan la señalización de muerte celular (Kim & Lee, 2008; Naryzhny et.al., 2005).



*Figura 7. Región de interacción de PCNA: IDCL. Estructura cristalina del homotrímero AtPCNA1 donde cada subunidad esta representada por diferente color y la región IDCL (Leu 118-Tyr133) de cada unión de color azul, dicha zona es por donde interactúan 3 péptidos con el motivo APIM. La estructura homotrímica de PCNA interactúa al mismo tiempo con 3 péptidos (International Union of Crystallography). (Hara, 2018).*

El análisis de las proteínas que se unen a PCNA ha revelado un motivo canónico conservado de interacción peptídica a PCNA (PIP) que está definido como Q-X-X-(M/L/I)-X-X-F-(Y/F); la posición 1 la conforma una glutamina, un residuo hidrofóbico (usualmente leucina, isoleucina o metionina) en la posición 4, un par de residuos aromáticos en la posición 7 y 8, así como complementación del motivo con otros aminoácidos en las posiciones restantes de manera indistinta (E. Warbrick et.al., 1995; E. Warbrick, 1998).

La primera estructura cristalográfica de PCNA unida al motivo PIP consenso fue entre PCNA de humanos y la proteína “checkpoint” del ciclo celular p21, mediante

el motivo canónico PIP de esta última (QTSMTDFY) (Emma Warbrick, 1998). Esta estructura reveló claramente cómo PCNA reconoce al motivo consenso PIP (Figura 7): la glutamina en la posición 1 se une a un pequeño surco en la cara frontal del anillo de PCNA llamado "pocket Q". Los residuos en las posiciones 4 a 8 forman una hélice  $\alpha$  corta en la que la metionina, fenilalanina y tirosina en la posición 4,7 y 8, respectivamente se insertan en un gran depósito hidrófobo en la parte frontal del PCNA llamado "enchufe de tres horquillas" debido a su parecido con una toma de corriente. Además, los residuos que flanquean el motivo PIP en su lado C-terminal forman una hoja  $\beta$  antiparalela extendida con residuos del IDCL extendido de PCNA (Boehm & Washington, 2016; E. Warbrick et al., 1995).

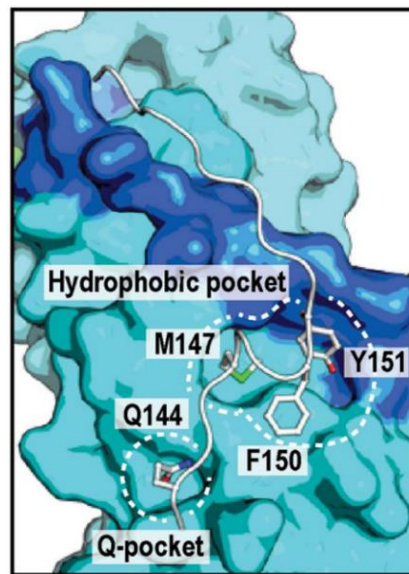


Figura 8. Unión de motivo canónico PIP de p21 con PCNA La estructura de p21 unida a PCNA se muestra como un tubo de plata (entrada de PDB 1axc; Gulbis et al., 1996). Los residuos consenso en PIP se muestran en representación de palo y están etiquetados. PCNA se muestra como una representación de superficie (Hara, 2018).

Además, este motivo canónico presenta variantes o secuencias no canónicas que han sido reportadas en la familia de las DNA polimerasas de la familia Y. Este grupo de motivos se caracteriza por el remplazo del residuo en la posición 1 u 8 por cualquier aminoácido, por lo que conservan dos de las tres regiones esenciales de interacción (Hishiki et al., 2009).

Otra secuencia de interacción a PCNA es el denominado motivo de interacción a PCNA del homólogo de AlkB y consta de 5 residuos consenso (K/R)-(F/Y/M)-(L/I/V/A)-(L/I/V/A)-(K/R), los cuales ya han sido identificado en varias proteínas de interacción a PCNA. Se ha identificado que el péptido APIM se une al sitio de unión previsto para el motivo PIP de manera muy similar, esto debido a la conformación propia de los motivos. Los residuos de fenilalanina y leucina, así como los residuos hidrofóbicos que preceden a los motivos en cuestión son cruciales para la unión al sitio hidrofóbico de PCNA, siendo inclusive esenciales para la interacción global (Hara et al., 2018).

Por otro lado, un estudio demostró que proteínas en el citoplasma no contenían el motivo canónico PIP, sin embargo, contenían una secuencia conocida como caja KA (K-A-(A/L/I)-(A/L/Q)-X-X-(L/V)) que les permitía interactuar con la región del C-terminal de PCNA. Esto resulta interesante puesto PCNA presenta un modo de interacción diferencial con proteínas en el núcleo y en el citoplasma (Naryzhny & Lee, 2010).

Los motivos están localizados frecuentemente en el extremo C-terminal o en una región flexible de la proteína a interactuar con PCNA. Esto permite a la proteína una interacción estable con PCNA, mas no restringe el movimiento, permitiendo cierta flexibilidad con respecto a su orientación en el anillo. Se cree que la unión de las proteínas ocurre de manera competitiva y es dependiente de la concentración local de la proteína, además de la afinidad de los motivos de las distintas proteínas para PCNA.

Tabla 2. Motivos de interacción a PCNA

<b>Motivos canónicos PIPM/PIP</b>	<b>Q-X-X-(L/I/M/V)-X-X-(F/Y)-(F/Y)</b>
<b>Motivos no canónicos PIPM/PIP</b>	<b>X-X-X-(L/I/M/V)-X-X-(F/Y)-(F/Y) Q-X-X-(L/I/M/V)-X-X-X-X</b>
<b>Motivo caja KA</b>	<b>K-A-(A/L/I)-(A/L/Q)-X-X-(L/V)</b>
<b>Motivos APIM</b>	<b>(K/R)-(F/Y/W)-(L/I/V/A)-(L/I/V/A)-(K/R)</b>

### **1.3.3 Función**

PCNA actúa como una plataforma molecular para interacciones proteína-proteína en numerosos procesos celulares como la replicación de DNA, reparación de DNA, control del ciclo celular, remodelación de la cromatina, cohesión de cromátidas hermanas entre otros. PCNA es una proteína nuclear y su transporte al núcleo es mediado por la importina  $\beta$ , en donde cumple con la mayor parte de sus funciones. Así mismo, cuando ésta no se encuentra implicada en la replicación de DNA, compromete a las células a un arresto en el ciclo celular y a la reparación del DNA dañado, o cuando la reparación no es posible, la ausencia o bajos niveles de PCNA pueden conducir a las células a apoptosis. Adicionalmente, esta proteína puede sufrir modificaciones post-traduccionales involucradas en la regulación de los procesos celulares antes ya mencionados (Maga, 2003).

#### **1.3.3.1 Replicación del DNA**

El control de la replicación del DNA es un punto clave en el apropiado funcionamiento de la célula, llegando a influenciar la estabilidad del genoma. La duplicación del material genético está mediado por un complejo proteico dinámico llamado replisoma. La duplicación del material genético que ocurre en la fase S del ciclo celular está coordinada con otros procesos celulares, por ejemplo, la mitosis. En eucariontes superiores, este proceso requiere la participación de una gran cantidad de proteínas esenciales, tales como helicasas, topoisomerasas, proteínas de unión a cadena sencilla (RPA), el factor de replicación C (RFC), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), las DNA polimerasas, la DNA primasa y DNA ligasas.

Inicialmente PCNA se describió como un factor que estimulaba la actividad e incrementaba la procesividad de las DNA polimerasas tipo  $\delta$  y  $\epsilon$ , actuando como un “sliding clamp” o pinza móvil que rodea al DNA de manera dependiente del factor de replicación C (RFC) permitiendo la entrada de la DNA polimerasa a la horquilla de replicación.

La sola presencia de esta proteína en la horquilla de replicación permite el recambio de DNA pol  $\alpha$ , única polimerasa que contiene una actividad de DNA primasa asociada proveyendo los cebadores para la iniciación de la síntesis de DNA. por las polimerasas que continuarán con la síntesis de DNA (DNA pol  $\delta/\epsilon$ ).

La unión de PCNA con el extremo final 3' del primer, favorece una señal de reclutamiento de las replicasas de alta procesividad, DNA pol  $\delta/\epsilon$ , ambas presentan actividad de polimerasa de 5'a 3' en la cadena líder, así como actividad de exonucleasa para procesos de reparación, además de su actividad en la cadena líder, la DNA pol  $\delta$  posee actividad en la síntesis de los fragmentos de Okazaki en la cadena retardada.

En conclusión, posterior al cargado de las polimerasas en PCNA y subsecuentemente DNA, el complejo logra deslizarse a través de las hebras correspondientes permitiendo la síntesis de DNA, ocurriendo concomitantemente en la hebra líder y retardada, de manera continua y discontinua, respectivamente.

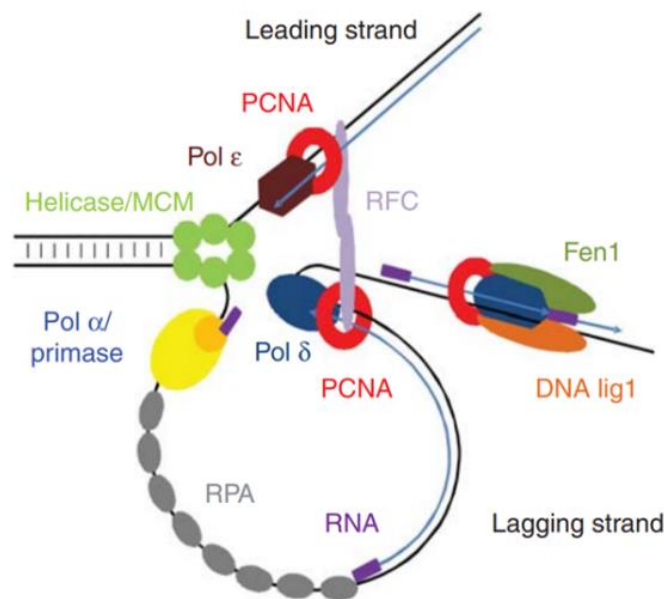


Figura 9. Modelo de la replicación de DNA en eucariotes. Representada la función de PCNA en la síntesis de DNA y en la maduración de los fragmentos de Okazaki (Modificado de Burgers, 2009).

Es de destacar que la localización del anillo de PCNA en el DNA es ideal para permitir que esta proteína funcione en la estabilización, el reclutamiento y el

intercambio dinámico (debido a las diferencias en las afinidades y las constantes de interacción) de varias proteínas de replicación, lo que hace que PCNA sea un coordinador clave del proceso de replicación.

### **1.3.3.2 Control del ciclo celular**

PCNA interactúa con varias proteínas eucariotas del ciclo celular. Los análisis bioquímicos de PCNA en animales mostraron la interacción de esta proteína con el complejo ciclina A-CDK2. La generación de un complejo ternario sugiere que PCNA actúa como un enlace entre CDK2 y sus sustratos, estimulando la fosforilación de estos, por ejemplo, de RFC y DNA lig 1. Esto representa un mecanismo de regulación al reclutar proteínas específicas a los sitios de replicación de DNA (Koundrioukoff et al., 2000).

Por otro lado, se observó que cuando hay daño en el DNA, la diferenciación o el envejecimiento celular, PCNA se encuentra formando un complejo cuaternario entre p21 y el complejo CDK/Cyc (Xiong et.al., 1992). Este complejo impide la progresión hacia la fase S. Una posible explicación de este impedimento es que p21 previene que PCNA se una a la maquinaria del ciclo celular o a la de la replicación, por otro lado, la formación del complejo favorece la cercanía de p21 con su blanco de inhibición directo (CDK).

La unión de PCNA con p21 *in vitro* resulta en la inhibición de la replicación de DNA debido al bloqueo de la asociación entre PCNA y la DNA polimerasa en cuestión (Waga et.al., 1994).

Otro aspecto a considerar de la unión de estas proteínas recae en que recientemente se demostró que p21 se degradaba de una manera dependiente de CRL4<sup>CDT2</sup> (tipo E3 ligasa) en respuesta al daño en el DNA causado por algunos factores genotóxicos (por ejemplo, radiación UV y metil metano sulfonato), y la interacción de p21 con PCNA era un requisito previo para esta proteólisis (Soria & Gottifredi, 2010).

Este esquema nos permite visualizar un escenario en donde PCNA es un transductor, así como un blanco de señales positivas y negativas. La unión de PCNA con los complejos Cyc/CDK ayuda a llevar a estas proteínas regulatorias hacia sus sustratos, mientras que el rompimiento de estas interacciones por la unión competitiva de p21 es una señal de arresto del ciclo. Además, se ha visto que el reclutamiento de PCNA a los sitios de replicación es regulado por fosforilación de la Ligasa 1 y dependiente del ciclo celular (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

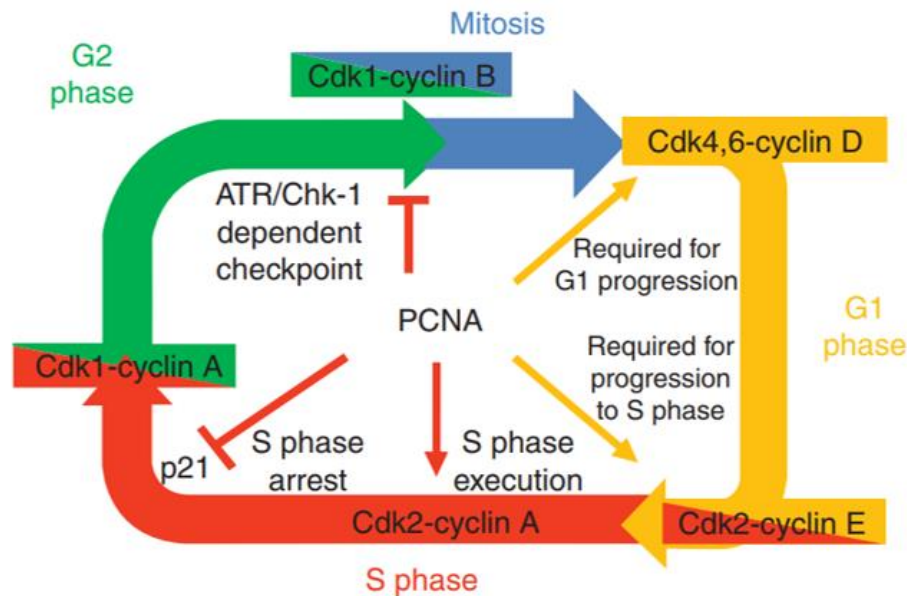


Figura 10. Modelo de interacción de PCNA con proteínas durante el ciclo celular, basado en estudio de PCNA en mamíferos. PCNA forma complejos con complejos CDK-ciclina, así como con proteínas de punto de control crítico, transduciendo señales positivas (indicadas como flechas) y señales negativas (indicadas como barras en T) (Adaptado de Maga y Hubscher, 2003).

## 1.4 Inhibidores de CDKs

### 1.4.1 Inhibidores de CDKs en mamíferos

En adición a los mecanismos ya señalados, la actividad de las CDKs es regulada por pequeñas proteínas, generalmente conocidas como CKIs, las cuales inducen el arresto del ciclo celular (detención del ciclo celular) o retrasan la progresión del ciclo celular en respuesta a señales intracelulares o extracelulares (Verkest et. al., 2005).

En mamíferos, las CKIs están bien caracterizados e inducen el arresto del ciclo celular en respuesta a señales antiproliferativas como inhibición por contacto, inanición de suero y diferenciación celular. De acuerdo con su estructura y especificidad de acción, las CKIs se dividen en dos familias: INK4 (Inhibitors of CK4) y Cip/kip (kinase inhibitory protein) (Sherr & Roberts, 1999).

La primera clase incluye a las proteínas p15, p16, p18 y p19, son exclusivas de la fase G1 y tienen la habilidad de formar complejos e inhibir a CDK4 y CDK6. Los inhibidores INK4 son proteínas de bajo peso molecular en cuya secuencia se encuentran muchas repeticiones de ankirina y sólo se une a la subunidad con actividad de cinasa, pero no a las ciclinas (Pavletich, 1999).

Los inhibidores Cip/Kip son p21, p27 y p57 e inhiben un amplio espectro de complejos Cyc/CDK en la transición G1/S formando inclusive complejos ternarios (Leibovitch et.al., 2003). La región N-terminal de estos inhibidores contiene un dominio de aproximadamente 65 residuos, el cual consiste en dos subdominios separables para unirse a la ciclina y a la CDK (Chen et.al., 1995).

También funcionan como ensambladores y estabilizadores de los complejos ciclina D-CDK4/6 en el citoplasma y los tres miembros de la familia transportan a los complejos CycD/CDK al núcleo de la célula, debido a que tanto las ciclinas tipo D como la CDK4 carecen de señal de localización nuclear. Por lo tanto, estos inhibidores regulan la proliferación celular a través de su interacción física con las CDKs en el núcleo y se requieren a bajas concentraciones para la formación del complejo Cyc/CDK y a altas concentraciones para inhibir la actividad de la CDK, promoviendo un cambio conformacional en su sitio catalítico, inhibiendo con ello la actividad de cinasa. (Leibovitch et al., 2003; Zhou et.al., 2003).

Recientemente se ha publicado que p21 ayuda al complejo Cyc/CDK a entrar a núcleo a través de la inhibición de la fosforilación de ciclina D en el residuo de treonina 286, fosforilación que es importante para la exportación de ciclina D a citoplasma para su posterior degradación.



### 1.4.2 Inhibidores de CDKs en plantas

Los primeros inhibidores de CDKs en plantas se identificaron en *Arabidopsis* (ICK1-ICK7), mediante ensayos de doble híbrido para identificar proteínas de asociación a la CDKA;1 (Y. Zhou et.al., 2002). Son denominados ICK/KRPs (Inhibitors of CDKs/ Kip related proteins). en plantas, estos inhibidores presentan similitud en su extremo C-terminal con el dominio N-terminal del inhibidor p27<sup>kip1</sup> de mamíferos. Además del dominio conservado, las proteínas ICK/KRP son muy diferentes con respecto a las CKIs de mamíferos y levaduras (Wang et.al., 2006).

El rol de las ICK/KRPs durante el ciclo celular sugiere que presentan una regulación temporal dependiendo de la fase del ciclo celular observada. Cabe destacar que la expresión de los genes de ICK/KRP también son regulados por fitohormonas, bajas temperaturas y por estrés salino.

Se ha reportado la existencia de 7 genes que codifican ICKs en *Arabidopsis*, las cuales se han clasificado en 2 grupos por sus interacciones diferenciales con otras proteínas del ciclo celular, en específico su interacción con CDKA, sin embargo, se sabe que las 7 tienen interacción con ciclinas D, lo cual sugiere un papel importante de todas ellas en la fase G1 (De Veylder et al., 2001; Y. Zhou et.al., 2002). La interacción es a través del dominio de interacción/inhibición de CDK/ciclina (referida como CID) localizado en la región carboxilo terminal. Adicionalmente, algunas ICK/KRPs son capaces de transportar a proteínas como CDKS o CycD al núcleo mediante su asociación previa en el citoplasma.

ICK1 fue el primer inhibidor de CDK identificado y caracterizado en términos de sus propiedades bioquímicas y funcionales en *Arabidopsis thaliana*. ICK1 interacciona con, e inhibe al complejo CycD/CDKA y su expresión es inducida por ácido abscísico, sugiriendo un posible mecanismo por el cual esta fitohormona puede inhibir la proliferación celular (De Veylder et al., 2001).

Empleando como base las secuencias proteicas de ICK/KRPs de *Arabidopsis*, álamo y arroz se han encontrado motivos conservados, se han identificado 9 motivos consenso, y aunque la función de muy pocos es conocida son de ayuda

para su estudio funcional. El motivo 1 es requerido para la interacción con CDKA y para la inhibición de la actividad de CDK en plantas, el motivo 2 es una región que parece ser importante para la interacción con CycD, el motivo 7 confiere localización nuclear, además de especificar un patrón de localización subnuclear puntual.

Hay muchas posibles razones por las que las plantas podrían tener múltiples inhibidores de CDKs. Estas pueden atacar distintas clases de complejos Cyc/CDK, o bien pueden participar en la regulación de la actividad de las CDKs en respuesta a diferentes señales ambientales y de desarrollo o podrían tener una acción tejido específica (Lui et al., 2000).

La sobreexpresión de miembros de ICK/KRPS resultó en fenotipos como reducción del tamaño de las plantas, hojas aserradas, disminución del número de células y células alargadas, corroborando que este grupo de proteínas funcionan como inhibidores de ciclo celular, probablemente a nivel de las transiciones G1/S como G2/M (Acosta et.al., 2011).

## **ANTECEDENTES**

En el grupo de trabajo, se determinó que existen dos genes que codifican para PCNA, en donde la secuencia del marco de lectura abierta es idéntica en ambos y solo difieren en las regiones 3' y 5' no traducibles. Se ha aislado el cDNA de PCNA de maíz (Zm PCNA), que codifica para una proteína de 263 aminoácidos y con un peso molecular de 29342 Da. A nivel de aminoácidos tienen un 62% de identidad y 91% de similitud con la secuencia de PCNA de humanos. PCNA de maíz contiene un dominio de unión a DNA entre los residuos de arginina 61 y arginina 80, el cual tiene un 65% de identidad y 100% de similitud con una región equivalente de PCNA de humanos; además, conserva los sitios de unión a ciclina D y p21. (López et.al.,1995).

Posteriormente se realizó la producción de la proteína recombinante de ZmPCNA en el vector pPROEX™ HTb, lo que le confiere un tag de cola de histidinas para su purificación (Tesis, Rosas Carballo, 1999), así mismo se llevó a cabo la generación del anticuerpo anti-PCNA específico con ayuda de la proteína previamente producida (Herrera et.al., 2000).

Durante la germinación del maíz, la replicación del DNA comienza a las 12 h después de la imbibición. PCNA está presente desde la semilla seca y su nivel de proteína aumenta desde el inicio de la imbibición y se estabilizan en el momento en que comienza la replicación, sin embargo, cuando la germinación es estimulada por benciladenina (BA), la concentración máxima de la proteína se presenta a las 6 h de germinación, coincidiendo con el inicio de la replicación del DNA bajo estas condiciones. Cuando la germinación es inhibida con ácido abscísico (ABA) , la cantidad de proteína no cambia de forma importante durante la imbibición y, en este caso, la replicación del DNA se inhibe (Herrera et.al., 2000).

PCNA es una proteína identificada en extractos de maíz durante la germinación, por lo que se analizó su presencia en diversos compartimentos, ubicándola no sólo

como una proteína nuclear unido a la cromatina, sino que se encontró también en el citoplasma (Figura 11) (Tesis, Martínez Mata, 2011).

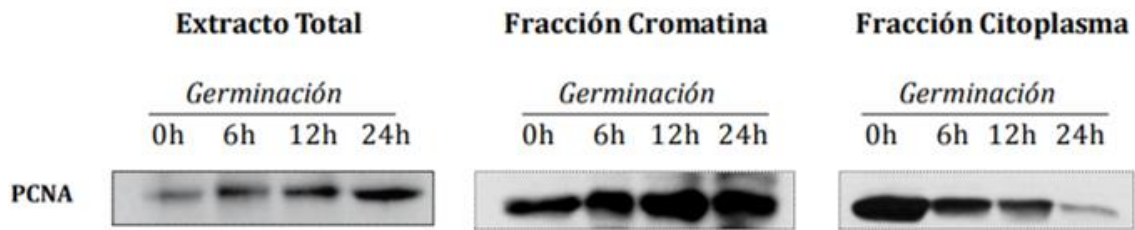


Figura 11. Inmunodetección de PCNA en las fracciones celulares durante la germinación de maíz (Tesis, Martínez Mata, 2011).

Durante la germinación se encontró actividad de cinasa asociada a PCNA sobre RBR e Histona H1 (Sánchez et.al., 2004) sugiriendo que dicha actividad puede deberse a complejos CDKA/CycD.

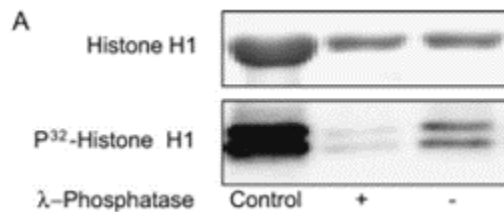


Figura 12. Actividad de cinasa asociada a PCNA sobre Histona H1. Carril 1 y 3: La proteína histona (H1) fue fosforilada por la proteína cinasa asociada a PCNA usando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP, carril 2: La histona H1, así mismo, fue marcada radiactivamente y se utilizó como sustrato para la fosfatasa lambda. La histona H1 se separó mediante SDS-PAGE, se tiñó para detectar proteínas y se expuso para autorradiografía (Sánchez et.al., 2004).

Al estudiar la interacción de la proteína con miembros del ciclo celular, se ha reportado que en extracto totales de ejes embrionarios de maíz los inmunoprecipitados de PCNA co-inmunoprecipitan con proteínas tipo CDKA con motivo PSTAIRE, este complejo presenta actividad de cinasa sobre la proteína RBR, siendo más relevante en las primeras horas de germinación (0-6 h), que corresponden a la fase G1 del ciclo celular, además, conforme transcurre el tiempo de germinación, la actividad va disminuyendo (Sánchez et.al., 2002).



PCNA de *Arabidopsis* puede unirse a péptidos sintéticos derivados de la proteína p21 (Strzalka et.al., 2009), como la división celular está regulada por la maquinaria molecular que se ha conservado evolutivamente de hongos a mamíferos (incluidas las plantas), esta interacción no solo indica una alta similitud estructural y funcional entre los PCNA animales y vegetales, sino que también puede sugerir la existencia de una proteína similar y análoga en función a p21 animal que puede estar involucrado en la regulación del ciclo celular de la planta.

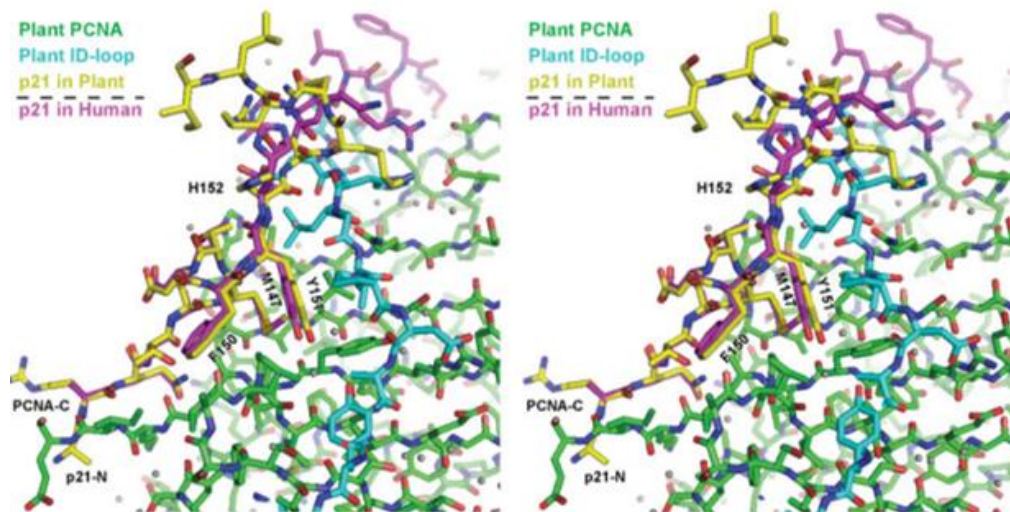


Figura 14. Interacción entre AtPCNA1 y el péptido p21. Modelo cristalográfico del sitio de unión del péptido p21 con PCNA. Los átomos de carbono del IDCL son de color cian, el péptido de p21 en la interacción entre PCNA de plantas y este se muestra de color amarillo, mientras que con PCNA de humanos de color magenta (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

No hay proteína p21 en las plantas, sin embargo, existe una familia de proteínas relacionadas con la familia Cip/Kip presente en mamíferos de la cual es parte p21, como lo son las KRPs, que contiene una secuencia de aminoácidos presente en dicho inhibidor, por lo cual podrían estar relacionadas con su actividad inhibitoria, inhibiendo la actividad de la cinasa en los complejos de CycD/CDK en plantas (Acosta et al., 2011). En el grupo de trabajo, inicialmente se llevó a cabo la producción de un anticuerpo general para las KRPs lo que permitió estudiar el comportamiento y función de este grupo de proteínas durante la germinación.

Para el aislamiento de un inhibidor de CDKs se realizó un análisis de las secuencias de Arabidopsis, arroz y un EST de maíz, encontrando motivos muy conservados en el extremo carboxilo de las ICKs de estas especies, por lo que se generó con ayuda de oligos específicos un producto con alta semejanza en esta región. El resultado final tras la sobreexpresión fue una secuencia de aminoácidos que presentó un alto grado de identidad con KRP4;2 de maíz (88%), con lo que se generó un anticuerpo el cual se validó y purificó de forma correcta (de Jesús Juárez, et.al., 2008)

En ejes embrionarios de maíz se expresa constitutivamente, una proteína de aproximadamente 22 kDa que tiene similitud de 61 % con ICKs de otras especies de plantas. Además, durante la germinación de maíz, los niveles de la proteína inmunodetectada con el anticuerpo se mantiene constante y estos niveles no se modifican durante la germinación en presencia de BA y ABA.

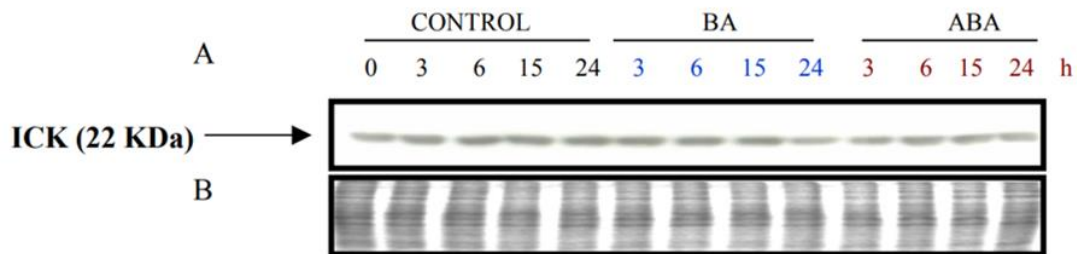


Figura 15. Nivel de proteína ICK durante la germinación. Extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz embebidos por 0, 3, 6, 15, y 24 h en la presencia/ausencia de BA o ABA, se utilizó el anticuerpo anti-ZmICK 1:1000.

Posteriormente se determinó en maíz, a partir de un análisis *in silico*, la presencia de 9 genes que codifican para KRPs, los parámetros principales son la homología en secuencia a los genes de ICK/KRPs de Arabidopsis y arroz, así como la preponderante presencia del dominio CID.

La nomenclatura actual se obtuvo a partir de la relación filogenética entre maíz y arroz. A partir de un análisis bioinformático con 40 diferentes especies de plantas, se generó un árbol filogenético que ubicó a las Zm KRPs en dos de las tres clases en que se clasifican (B y C) (Tesis, Rosas-Bringas, 2015). A la fecha no se ha descrito alguna correlación entre la clase a la que pertenece la familia de inhibidores y su implicación funcional. La familia de genes de ICK/KRPs de maíz se expresan

diferencialmente a nivel del transcrito, sugiriendo una posible función en distintos procesos durante el desarrollo de la planta.

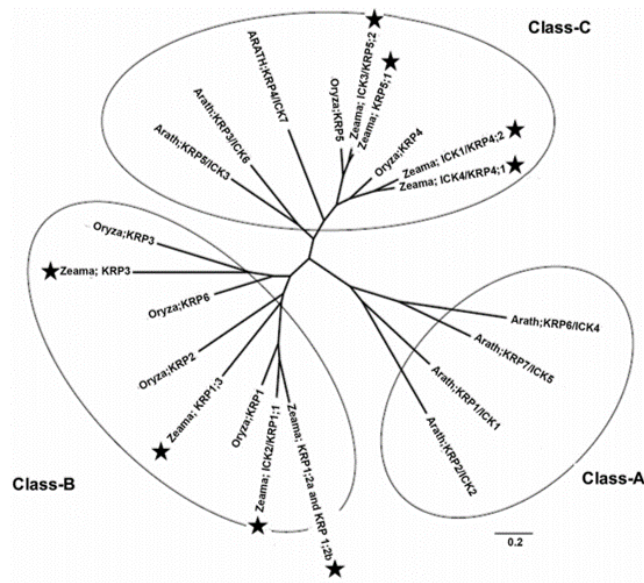


Figura 16. Análisis filogenético y de secuencia de la familia ICK / KRP del maíz. (A) Las secuencias de aminoácidos ICK / KRP de longitud completa de Arabidopsis, Oriza sativa y Zea mays se alinearon y se produjo un árbol filogenético utilizando el software MEGA4. Las estrellas indican proteínas de maíz ICK / KRP.

Por medio de ensayos de precipitación por columna (pull-down), se demostró que existía interacción entre las 7 KRPs de Arabidopsis y las coexpresiones de la proteína CycD2 con CDKA y CDKB, sugiriendo la presencia del complejo ternario, así como la funcionalidad de las KRPs (Nakai et al., 2006)

Posteriormente, a partir de la secuencia de miembros de la familia de ICK/KRPs de maíz se llevó a cabo la producción de dos KRPs recombinantes (ZmKRP1;1 y ZmKRP4;2) que representan la clase B y C, respectivamente de la filogenia previamente obtenida. Así mismo, se ha demostrado, mediante ensayos de pull-down como los que se presentan en este proyecto con proteínas recombinantes, la interacción de ambas KRPs con CDKA, CycD2;2 y CycD6;1. Así como la inhibición de la actividad cinasa de complejos inmunoprecipitados de las ciclinas D2;2, D4;2, D5;3 y D6;1 en presencia exógena de las KRPs *in vitro* mencionadas anteriormente (Godínez-Palma et al., 2017).



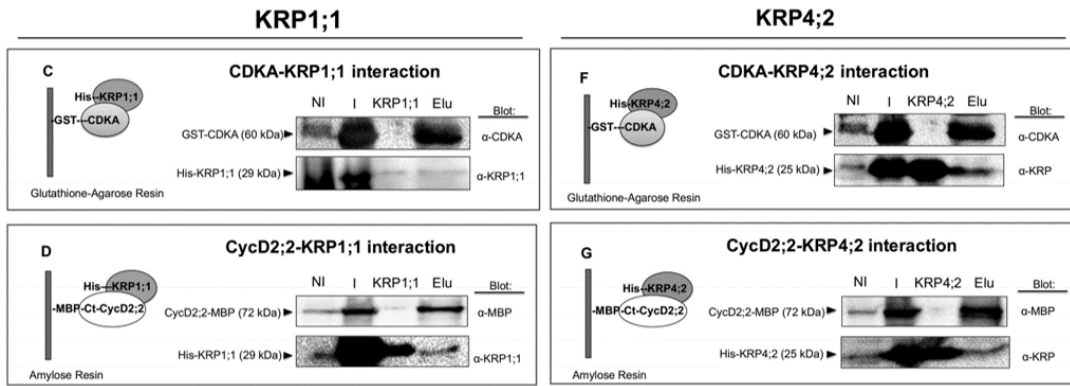


Figura 17. Ensayos de interacción *in vitro* entre CycD2; 2, CDKA, KRP1;1 y KRP4;2 utilizando diferentes resinas para purificar y coeluir complejos de proteínas recombinantes. NI: no inducido (no se agregó IPTG); I: inducido (IPTG añadido para la inducción de proteínas); KRP1; 1: His-KRP1 purificado (agregado como control positivo para la identificación de KRP); KRP4;2: His-KRP4;2 purificado (agregado como control positivo para la identificación de KRP); Elu: elución de proteínas unidas a resina.

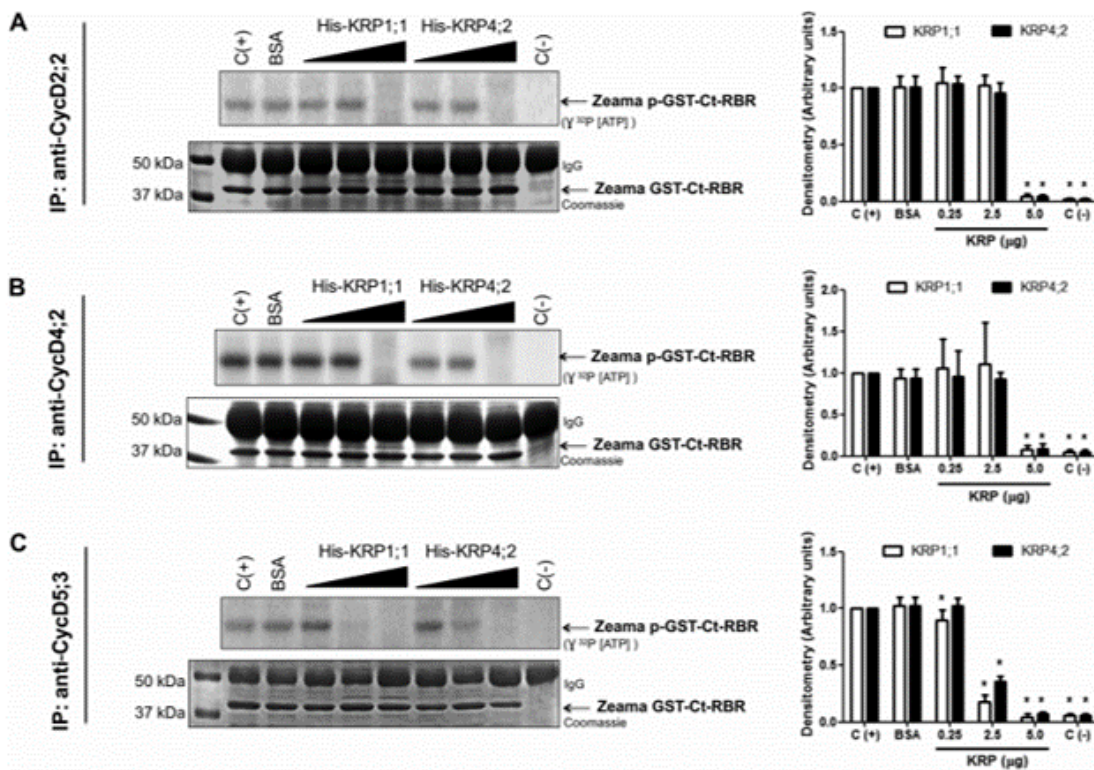


Figura 18. Inhibición de la actividad de la cinasa en los complejos CycD-CDK por KRP1;1 y KRP4;2. Efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa en (A) complejos CycD2;2-CDK, (B) complejos CycD4;2-CDK, (C) Complejos CycD5;3-CDK. Carril 1: marcadores de masa molecular de proteínas. Carril 2: inmunoprecipitado (IP) utilizando el correspondiente anticuerpo anti-CycD sin KRP recombinante. Carril 3: IP usando el correspondiente anticuerpo anti-CycD incubado con 5.0 µg de BSA. Carriles 4-6 (KRP1;1), 7-9 (KRP4;2): IP que usan los anticuerpos anti-CycD correspondientes incubados con 0.25, 2.5 o 5.0 µg de la KRP recombinante correspondiente respectivamente. Carril 10: IP que usa anticuerpos anti CycD sin GST-Ct-RBR o KRP agregado. Se usaron geles teñidos con azul de Coomassie como control de carga.

Por último, el antecedente directo a este trabajo es aquel en donde se analizó la actividad cinasa asociada a PCNA sobre la proteína relacionada con retinoblastoma (RBR) que fue inhibida por un péptido que contiene el extremo carboxilo de la proteína KRP4;2 de maíz de una manera dosis-dependiente, lo que indica la asociación de PCNA a heterodímeros activos de Cyc/CDK que son susceptibles a la inhibición de KRP (de Jesús Juárez et.al., 2008) . Sin embargo, ninguna interacción PCNA-KRP ha sido demostrada hasta ahora en ningún modelo de plantas.

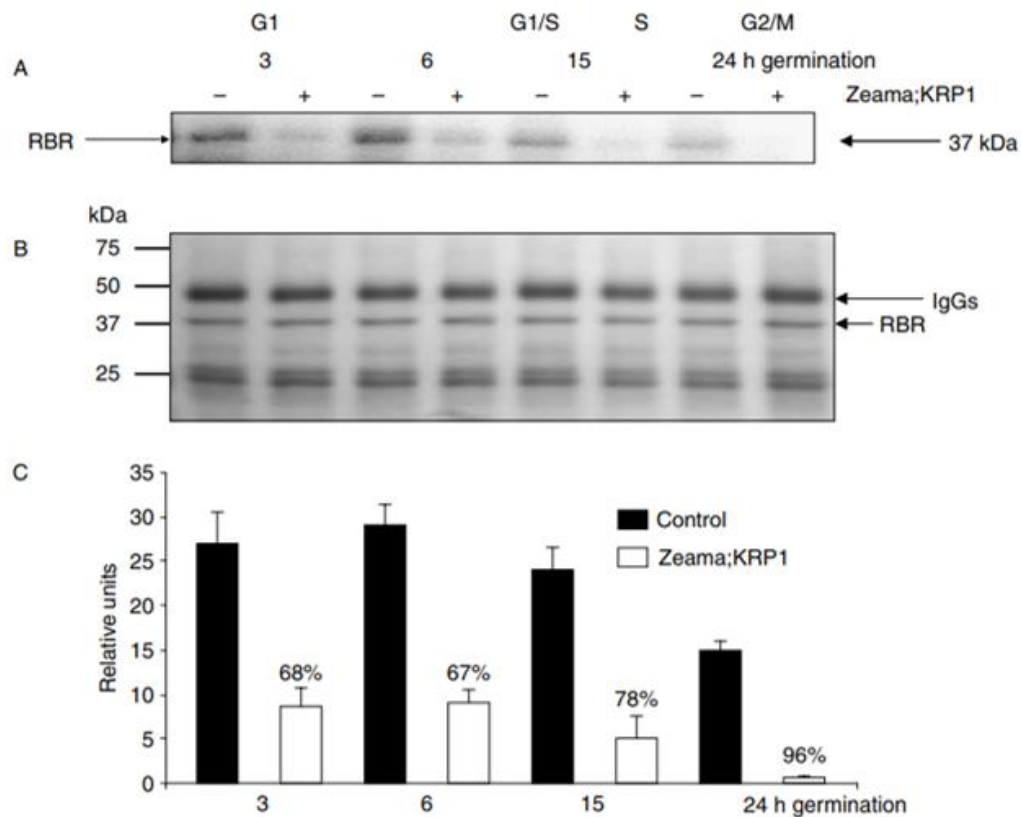


Figura 19. Inhibición de la actividad cinasa asociada a PCNA por un péptido de Zm KRP4;2. Los ejes embrionarios del maíz se embebieron durante 0, 3, 6, 15 y 24 h, y la actividad de cinasa asociada a PCNA se obtuvo de los extractos de proteínas correspondientes mediante inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-PCNA. (A) Actividad cinasa medida en presencia o ausencia de polipéptido de Zm KRP4;2 en diferentes tiempos de germinación; (B) gel teñido que muestra la cantidad de proteína RBR (relacionada con retinoblastoma) cargada; (C) análisis de densitometría que relaciona la señal de actividad de la cinasa con la cantidad de proteína RBR cargada; los números indican el porcentaje de inhibición por el polipéptido KRP.

## **JUSTIFICACIÓN**

PCNA actúa como plataforma molecular para numerosas interacciones proteína-proteína importantes en la regulación del ciclo celular, también es un elemento clave en la fase S en la replicación.

En mamíferos se ha reportado la formación de un complejo cuaternario entre PCNA, p21, CDK y ciclinas D, lo que sugiere un modelo de regulación del ciclo celular. p21 bloquea la progresión hacia la fase S, inhibiendo un amplio espectro de complejos ciclina-CDK en la transición G1/S, por otro lado, cuando PCNA-p21 se encuentra sobre el DNA, bloquea la asociación de PCNA con DNA polimerasa delta, deteniendo la síntesis de DNA en mamíferos.

Aunque no se han identificado homólogos de p21 en plantas, se ha observado que PCNA de plantas puede interactuar con Hsp21, sugiriendo la presencia de proteínas similares en función a esta última involucrados en la regulación del ciclo celular, como son las KRPs capaces de interactuar y precisar un modelo de regulación no antes expuesto.

## **HIPOTESIS**

PCNA interactúa con diversas proteínas de ciclo celular generando complejos regulatorios a este proceso; la interacción entre KRPs y PCNA sugiere la formación de un complejo regulatorio capaz de inhibir la actividad de los complejos Cycs/CDKs asociados a esta plataforma.

## **OBJETIVOS**

- Objetivo general

Demostrar la interacción *in vitro* entre PCNA y diversas proteínas claves del ciclo celular (KRPs y CDKs), así como el papel de éstas en la actividad de los complejos asociados a PCNA.

- Objetivos particulares

- Estandarizar las condiciones de purificación de la proteína de anclaje (PCNA-His)
- Establecer los controles negativos para la técnica de interacción *in vitro* a utilizar
- Demostrar las interacciones *in vitro* de MBP-CycD2;2 y PCNA-His
- Demostrar las interacciones *in vitro* de GST-CDKA;1 o GST-CDKB1;1 y PCNA-His
- Demostrar las interacciones *in vitro* de GST-KRP1;1 o GST-KRP4;2 y PCNA-His
- Analizar la actividad de complejos asociados a PCNA en presencia de la KRP4;2 o KRP1;1

## **MATERIALES Y METODOLOGÍA**

- Material biológico

Cepas: *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pPROEX-HTb ZmPCNA, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pMAL-c5X ZmCycD2;2, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pGEX-4T2 ZmCDKA;1, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pGEX-4T2 ZmCDKB1;1, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pGEX-4T2 ZmKRP1;1 y *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP transformadas con el vector pGEX-4T2 ZmKRP4;2

Anticuerpos: anti-PCNA, anti-MBP, anti-GST, anti-CDKA, anti-CDKB1;1 y anti-KRP

- Metodología
  - Expresión de las proteínas recombinantes

Los plásmidos pPROEX-HTb, pMAL-c5X y pGEX-4T2 con el inserto correspondiente se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RILP. Las cepas crecieron en medio LB con los antibióticos correspondientes de selección (Ampicilina 100ug/ml), los precultivos (4 mL) fueron incubados por 16-18 h a 37°C con agitación constante, posteriormente se añadieron a un volumen de 200-250 mL de medio LB e incubados a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una DO medida a 600 nm dentro del rango de 0.4-0.6. La expresión de las proteínas recombinantes fue inducida mediante la adición de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 hasta 1.0 mM a un cultivo bacteriano de *E. coli* BL21. Una vez adicionado el IPTG se dejó incubando por 2 h hasta 18 h a 37°C en agitación constante, se tomó muestra de 1 mL anterior y posterior a la adición del análogo de lactosa verificándose en un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie con el objetivo de observar la integridad y expresión de la proteína recombinante. Los volúmenes de cultivo y los tiempos de sobreexpresión variaron dependiendo de la construcción empleada.

- Cromatografía de afinidad para las proteínas recombinantes.

#### Proteínas fusionadas a cola de Histidina (6x-His)

La producción de la proteína recombinante PCNA-His se llevó a cabo en un volumen total de 200 mL de medio LB. La inducción se realizó por 2 h a 37°C con una concentración de 0.5 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante el empleo de la resina Ni-NTA (QIAGEN) como a continuación se describe: después de centrifugar el extracto bacteriano a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió con buffer de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0) al cual se adicionó en fresco 1 mM benzamidina y 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y se incubó por 30 minutos en hielo con 1 mg/mL de lisozima, el lisado se sonicó cinco veces por ciclos de 20 segundos a una amplitud de 20% en un equipo Vibra Cell VC505 y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se aplicó a la columna equilibrada correspondiente. Se llevó a cabo inicialmente 1 lavado de 25 mL con buffer de lisis que contenía el doble de concentración de imidazol seguido de un lavado de 25 ml con buffer de lisis. Las proteínas recombinantes fueron eluidas con buffer de lisis con 300 mM de Imidazol, pH 8.0.

#### Proteínas fusionadas a MBP

La producción de la proteína recombinante MBP-CycD2;2 se llevó a cabo en un volumen total de 200 mL de medio LB, a lo largo de todo el proceso se añadió glucosa a los medios en una concentración final de 2%. La inducción se realizó por una noche a 23°C con una concentración de 0.1 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante el empleo de la resina Maltosa Binding Protein (New England Biolabs), como a continuación se describe: después de centrifugar el extracto bacteriano a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió con buffer de lisis (1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) al cual se adicionó en fresco 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y se incubó para lisar las bacterias con 1 mg/mL de lisozima por 30 minutos en hielo, el lisado se sonicó cinco veces por ciclos de 20 segundos a

una amplitud de 20% en un equipo Vibra Cell VC505 y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se aplicó a la columna equilibrada correspondiente. Se llevó a cabo 1 lavado de 50 mL con buffer de lisis para posteriormente eluir a la proteína con el buffer de lisis suplementada con 10 mM de maltosa.

### Proteínas fusionadas a GST

La producción de la proteína recombinante GST-KRP1;1, GST-KRP4;2, GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1 se llevó a cabo en un volumen total de 250 mL de medio LB. La inducción se realizó por 4 h a 37°C con una concentración de 1 mM de IPTG. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante el empleo de la resina glutatión sefarosa 4B (GE Healthcare) como a continuación se describe: después de centrifugar el extracto bacteriano a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) al cual se adicionó en fresco 1 mM de DTT (ditioetriol), 1 mM benzamidina, 5 mM ácido ε-aminocaproico, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 10 mM NEM (N-etilmaleimida) y 1 tableta del cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini, y se incubó por 30 minutos en hielo con 1 mg/mL de lisozima. Posteriormente, se adiciono 1% de Sarcosyl (N-lauril sarcosinato de sodio), el lisado se sonicó 4 veces por ciclos de 20 segundos a una amplitud de 20% en un equipo Vibra Cell VC505, con un mezclado intermedio al proceso favoreciendo el lisado homogéneo, después se adicionó 2% de Triton X-100 y 0.5% de Tween 20, y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se aplicó a la columna equilibrada correspondiente. Se llevaron a cabo inicialmente 2 lavados de 20 mL con buffer de lisis que contenían adicionalmente 0.5% Triton X-100/ 0.3% Tween 20 y 0.1% Triton X-100/ 0.1% Tween 20, respectivamente, finalmente se realizó un lavado de 20 ml con buffer de lisis. Las proteínas recombinantes fueron eluidas con 10 mM de glutatión reducido en Tris-HCl, pH 8.0 en conjunto con la batería de inhibidores descritos.

\*Durante el proceso de purificación de cada proteína recombinante se recolectaron muestras de 750  $\mu$ l de cada fracción (filtrado o input, lavados inicial, lavado final y eluatos) con el fin de monitorear que el proceso se haya llevado de forma correcta. Estas fueron evaluadas por Western Blot.

- Interacción *in vitro* de proteínas recombinantes

Después de sobreexpresar las proteínas recombinantes, como se indica en el apartado correspondiente para cada construcción, el pellet de cada cultivo se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0), al cual se le adicionó en fresco 1 mM de DTT (ditrioetriol), 1 mM benzamidina, 5 mM ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 10 mM NEM (N-etilmaleimida) y 1 tableta del cocktail de inhibidores de proteasas cOmplete Mini y en el caso de interacciones con proteínas fusionadas a GST se adicionó 1 mM de DTT en fresco. Los extractos de células transformadas y sobreexpresadas de las proteínas a interaccionar se mezclaron en proporciones iguales en un único tubo. A partir de este punto se llevó a cabo la preparación de la muestra con las condiciones establecidas para las proteínas con tag de GST para asegurar la integridad de estas proteínas debido a su inestabilidad. Para el ensayo de interacción la muestra obtenida tras la segunda centrifugación y filtrado se incubó en agitación durante 18 h a 4°C. Finalmente las muestras se purificaron mediante una columna con resina de Níquel con las condiciones descritas para proteínas fusionadas a cola de histidinas, tratándose de PCNA-His de nuestra proteína de anclaje.

- Ensayos de actividad de cinasa

Los inmunocomplejos asociados a PCNA fueron resuspendidos en 20  $\mu$ l de amortiguador de cinasa (70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP). Como sustrato se utilizó 1  $\mu$ g de Histona H1 (BioLabs). La reacción se llevó a cabo por 30 minutos a 30°C y fue detenida al adicionar buffer de carga de proteínas. Las muestras fueron desnaturalizadas a 85°C por 5 min y los productos de reacción se resolvieron en un SDS-PAGE. Los geles se secaron por vacío a 80°C por 1.5 h y posteriormente



fueron expuestos por 24 h a una placa de Europio. La detección se logró utilizando el cassette de la placa de EUROPIO (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y la película fue escaneada usando el equipo Personal Imager FX (Bio-Rad). Para los ensayos de inhibición de cinasa, los inmunocomplejos fueron preincubados con la respectiva proteína recombinante GST-KRP4;2 o GST-KRP1;1 (5 µg), durante 30 minutos a 30°C antes de la adición del amortiguador de cinasa y sustrato. El proceso de detención de la reacción, desnaturalización, resolución y revelado se llevo a cabo bajo la misma metodología antes descrita.

- Técnicas generales

### Electroforesis de proteínas

Para verificar la presencia de proteínas y para los ensayos de Western Blot se utilizó la técnica de SDS-PAGE. El gel al 10 % se preparó como se indica en Schägger, 2006 y se corrió a 80 volts hasta que el frente de corrida pasara al gel concentrador, luego a 130 volts durante el corrimiento en el gel separador. Se utilizaron dos amortiguadores para la electroforesis que fueron: Buffer de cátodo (100 mM de Tris-HCl, pH 8.45, 100 mM Tricina, 0.1% SDS) y Buffer de ánodo (200 mM Tris, pH 8.9). Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga 1X (SDS 2%, 2mM β-mercaptoetanol, glicerol 4%, 40 mM Tris HCl, pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%)

### Western Blot

Para los ensayos de Western Blot las muestras se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Millipore) en el equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 350 mAmp durante 1 hora en baño de hielo, se utilizó como amortiguador de transferencia una mezcla de 25 mM de Tris y 200 mM de Glicina. Las membranas se bloquearon con una disolución al 5% de leche-PBS 1X y 0.5% Tween 20 durante 1 h en agitación y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido al título correspondiente en una disolución al 5% de leche-PBS 1X y 0.1% Tween 20, durante 18 h a 4°C en agitación constante. Tras el tiempo de incubación se

realizaron 3 lavados con PBS 1X y 0.1% Tween 20 de 10 minutos cada uno, posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-conejo) acoplado a una peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación, finalmente se llevaron a cabo 3 lavados como se indicó previamente para continuar con el proceso de revelado. Las membranas se bañaron con 2 ml de solución de detección por quimioluminiscencia Western Blotting Reagente (Millipore). Las imágenes se obtuvieron con el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad) en el programa Image Lab.

## **RESULTADOS**

- Análisis in silico de las secuencias

Las secuencias proteicas de maíz fueron obtenidas a partir del número de acceso ya conocido por trabajo previo en el laboratorio en la página: <https://www.maizegdb.org/>.

De primera instancia mediante análisis *in silico* con el programa Geneious 4.8.5 se buscó la presencia de motivos de unión a PCNA de todas las secuencias proteicas de maíz a analizar, se clasificaron mediante lo reportado en la literatura como motivos PIP-box si presentaban el motivo completo, fraccionado (si se encuentran las dos regiones del motivo separadas) o incompleto (si se encuentra solo uno de los dos fragmentos esenciales del motivo) y como motivos APIM si presentaban la secuencia de 5 aminoácidos necesaria o si inclusive fallaran en un residuo. No se analizó la presencia de motivos KA-box en las secuencias debido a que estas son específicas de proteínas que interactúan en el citoplasma y están relacionadas con procesos ajenos al ciclo celular como la glucólisis.

*Tabla 3. Motivos de unión a PCNA identificados en proteínas de ciclo celular.*

<b>PROTEÍNA</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>MOTIVO PIP-BOX</b>	<b>Motivo APIM</b>
<b>CDKA;1</b>	GRMZM2G008327_T01	QXXL (131-134, 200-203)	
		YF (286-287)	
<b>CDKB1;1</b>	GRMZM2G495626_T03	QXXL (167-170)	<b>KGILK (175-179)</b>
		YF (321-322)	<b>IYIVR (89-93)</b>
		QXXLXXF (247-253)	
<b>CycD2;2a</b>	GRMZM2G075117_T02	QXXI (294-297, 316-319)	<b>KYLDK (279-283)</b>
		YF (214-215)	
<b>KRP1;1</b>	GRMZM2G101613_T01	<b>IXXFF (210-214)</b>	<b>RFASK (224-228)</b>
<b>KRP4;2A</b>	GRMZM2G037926_T01	<b>QXXIXY (164-170)</b>	

Inicialmente, para demostrar la interacción *in vitro*, se utilizó como técnica la purificación individual de cada proteína recombinante, la correspondiente incubación de las eluciones previamente obtenidas y la posterior co-purificación de la mezcla, sin embargo esta técnica no reveló ninguna interacción, pues no se observó la coelución esperada, esto se explica por la naturaleza e inestabilidad de las proteínas a analizar, por lo cual se decidió utilizar una metodología previamente evaluada en el laboratorio en la que las proteínas interaccionan desde el momento de lisis de las bacterias que sobreexpresan a las mismas y la posterior interacción evaluando la interacción por un proceso de copurificación.

- Purificación de las proteínas recombinantes

Todas las construcciones ya existían en el laboratorio, para su manipulación en este proyecto se extrajo plásmido, con el que se transformó a la cepa de mantenimiento generando el pertinente glicerol, y a la cepa de expresión con la finalidad de trabajar cada construcción en fresco. Previamente al análisis de interacción se indujeron las bacterias transformadas comprobando la capacidad de crecimiento e inducción de cada proteína recombinante, así como su integridad en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie (Anexo 1). El peso de cada proteína recombinante esperado se muestra en la siguiente tabla 4. Se realizó la predicción del tamaño de las construcciones con ayuda del programa informático Geneious 4.8.5.

*Tabla 4. Peso molecular esperado de las construcciones a evaluar*

<b>PROTEÍNA</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Peso proteína endógena</b>	<b>Tag adicional</b>	<b>Peso proteína recombinante</b>
<b>ZmPCNA</b>	GRMZM2G030523_T01	29 kDa	6X-His	33 kDa
<b>CDKA;1</b>	GRMZM2G008327_T01	34 kDa	GST	59 kDa
<b>CDKB1;1</b>	GRMZM2G495626_T03	37 kDa	GST	62 kDa
<b>CycD2;2a</b>	GRMZM2G075117_T02	39 kDa	MBP	74 kDa
<b>KRP1;1</b>	GRMZM2G101613_T01	26 kDa	GST	51 kDa
<b>KRP4;2a</b>	GRMZM2G037926_T01	21 kDa	GST	46 kDa

Se realizó la purificación de cada una de las proteínas a utilizar, a través de su TAG, a lo largo del proyecto con la finalidad de encontrar las condiciones idóneas para la obtención de cada una de ellas, realizando cada experimento de manera individual por duplicado, encontrando las condiciones adecuadas para la manipulación de cada proteína recombinante. Se monitoreó la purificación de cada una por Western Blot, como se muestra a continuación, se utilizaron las columnas empacadas con la resina correspondiente: PCNA-His (resina de Ni-NTA - QIAGEN) (Figura 20), MBP-CycD2;2 (resina de Maltosa – New England Biolabs) (Figura 21) y GST-KRP1;1, GST-KRP4;2, GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1 (resina de glutatión – GE Healthcare) (Figura 22).

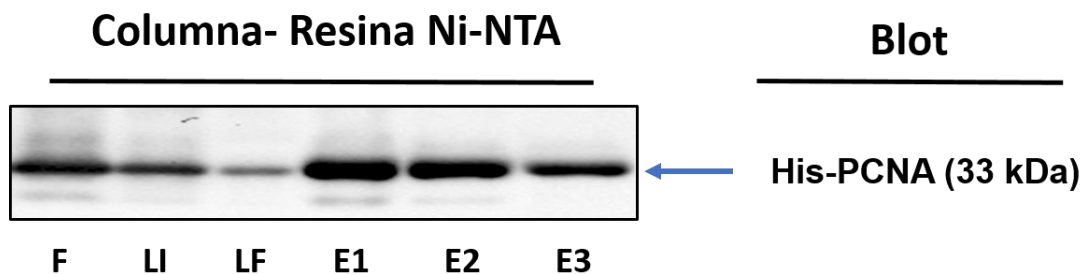


Figura 20. Purificación de PCNA-His por resina de Níquel-NTA. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo primario  $\alpha$ -PCNA 1:2000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

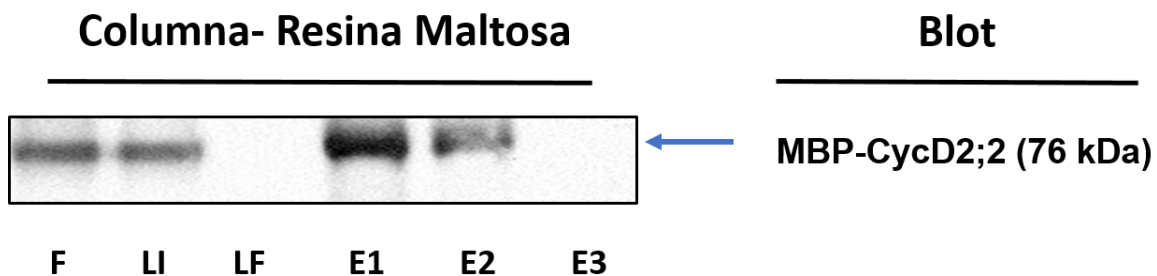


Figura 21. Purificación de MBP-CycD2;2 por resina de Maltosa. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -MBP 1:1000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

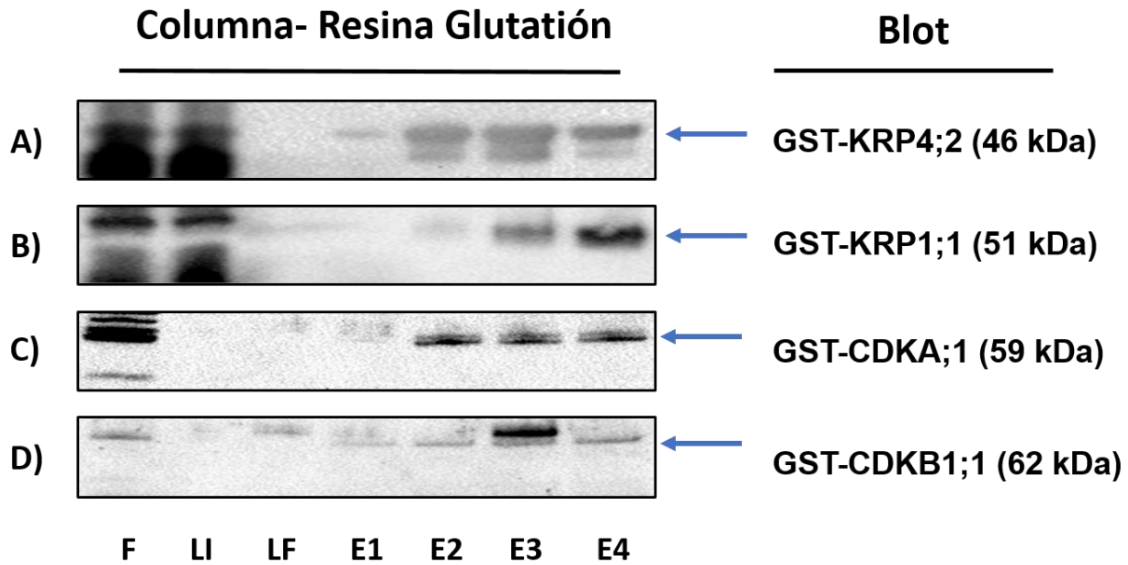


Figura 22. Purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST con resina de glutatión. Inmunodetección de A) GST-KRP4;2, B) GST-KRP1;1, C) GST-CDKA;1 y D) GST-CDKB1;1. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -KRP 1:1000,  $\alpha$ -CDKA 1:1000 y  $\alpha$ -CDKB 1:1000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

La proteína recombinante PCNA-His presentó la mayor expresión y facilidad de purificación en comparación a las proteínas de interacción, por lo cual se estableció esta construcción en conjunto con la resina Níquel-NTA como la proteína de anclaje en el proceso de co-purificación. La expresión de las proteínas con la etiqueta de GST, particularmente las KRPs representaron un reto para purificar debido a su pobre solubilidad, por ello también se consideró que la metodología propuesta de copurificación beneficiaría la capacidad de encontrarlas en las eluciones.

- Controles de purificación inespecíficos con columna de anclaje

Como primer paso para determinar la especificidad de la técnica, se realizaron las cromatografías de afinidad con la resina de Ni-NTA (QIAGEN) y las proteínas MBP-CycD2;2, GST-KRP1;1, GST-KRP4;2, GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1 para determinar que no existiera una unión inespecífica de estas proteínas recombinantes, carentes de la cola de histidinas como etiqueta con la resina de níquel. Cabe destacar que cada experimento se realizó por duplicado para

corroborar cada resultado. Como se puede observar en la figura 23, la purificación mediante esta resina fue específica sólo para PCNA-His y no para aquellas que tienen como tag a GST o MBP. Por lo tanto, es adecuado el uso de PCNA recombinante como proteína de anclaje.

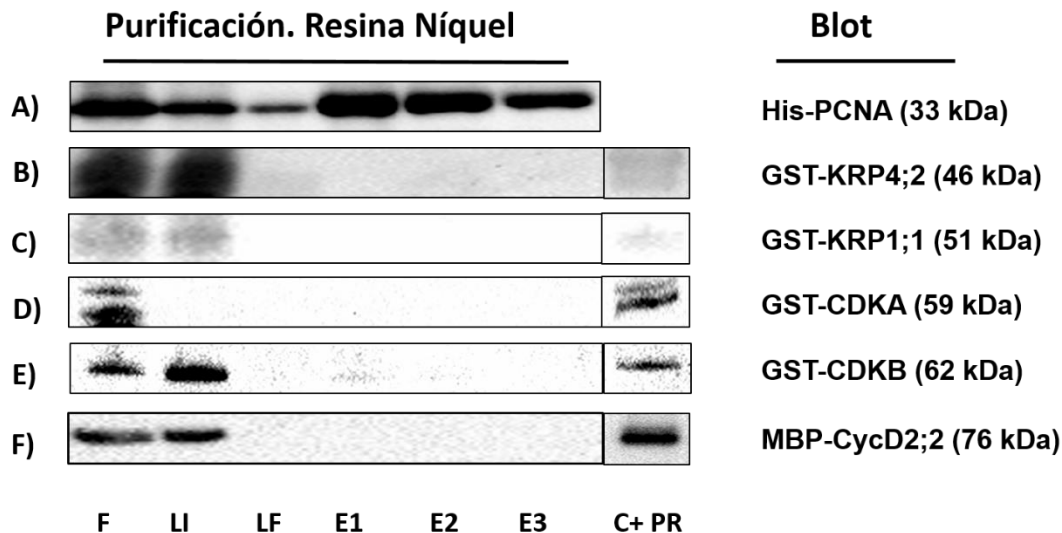


Figura 23. Solo PCNA-His se ancla a la resina de Níquel. Inmunodetección de la afinidad de A) PCNA-His, B) GST-KRP4;2, C) GSTKRP1;1, D) GST-CDKA;1, E) GST-CDKB1;1 y F) MBP-CycD2;2. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones), C+ PR (Proteína recombinante previamente purificada). Título del anticuerpo  $\alpha$ -PCNA 1:2000,  $\alpha$ -KRP 1:1000,  $\alpha$ -CDKA 1:1000,  $\alpha$ -CDKB 1:1000 y  $\alpha$ -CycD 1:1000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

- Controles de interacciones *In vitro* inespecíficas

Como siguiente control de la técnica, se realizó un ensayo de interacción de GST y MBP (etiquetas de las proteínas de unión) con PCNA-His para descartar que alguno de los tags pudieran interactuar con la proteína de anclaje, ya que su unión tanto a PCNA o a la resina podría resultar en un falso positivo en las interacciones mostradas. Así mismo, cada experimento se realizó por duplicado para corroborar cada resultado. Como se puede observar en la figura 24 ni GST ni MBP interactuaron con PCNA-His o la columna de Níquel, ya que ninguna de las dos proteínas problema se observan en las eluciones, pues no se co-purificaron.

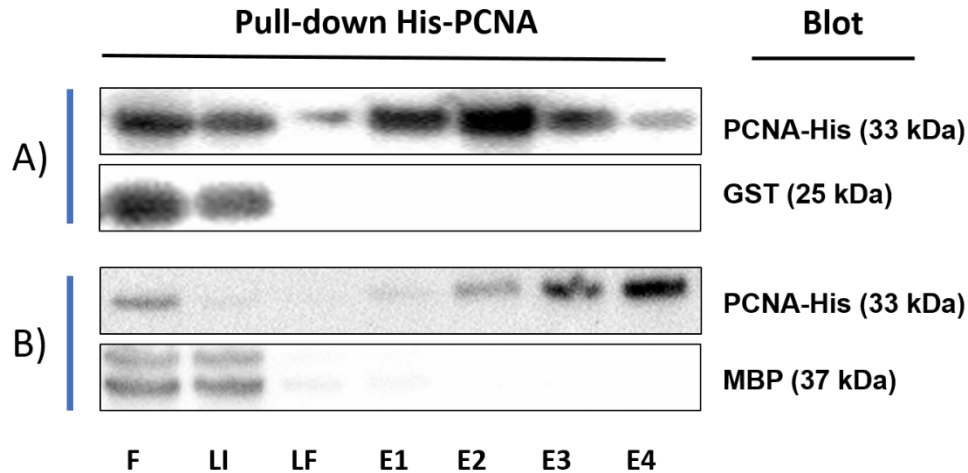


Figura 24. Interacción *in vitro* utilizando a PCNA-His como proteína de anclaje. Controles de purificación inespecíficos con la columna de anclaje. A) Interacción con GST y B) Interacción con MBP. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -MBP 1:1000 y  $\alpha$ -GST 1:1000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

- Técnica de interacción *in vitro*

Las interacciones *in vitro* que se estudiaron en el presente trabajo fueron aquellas en las que se utilizó a PCNA-His como proteína de anclaje en el proceso de co-purificación, debido al uso de columnas con resina de Níquel y en donde se evaluaron como proteínas de unión a ZmGST-KRP1;1, ZmGST-KRP4;2, ZmGST-CDKA;1 y ZmGST-CDKB1;1. Cada experimento se realizó por duplicado.

Como primer paso previo a la demostración de las interacciones deseadas, para determinar la capacidad de la técnica, se realizó un control positivo en el que se demuestre, una interacción previamente ya establecida. Así, se analizó la interacción entre PCNA y CycD2;2 reportada anteriormente en el grupo (Gutiérrez et al., 2005) mediante ensayos de inmunoprecipitación CycD2;2 a partir de un extracto proteico de ejes embrionarios de maíz a las 6h post-imbibición. Como se observa en la figura 25, en los eluatos están presentes las dos proteínas, lo que confirma que existe una interacción entre estas proteínas, concluyendo que la



técnica es adecuada para el análisis de la interacción específica de PCNA con otras proteínas.

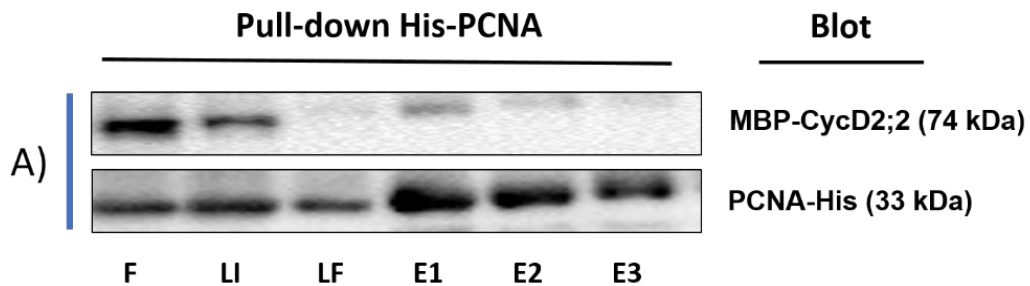


Figura 25. Interacción *in vitro* utilizando a PCNA-His como proteína de anclaje. Controles de interacciones *in vitro* inespecíficas. A) Interacción con MBP-CycD2;2. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -MBP 1:1000 y  $\alpha$ -PCNA 1:2000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

Posteriormente, mediante la técnica ya validada, se demostraron las interacciones de interés, como se observa en las figuras 26 y 27.

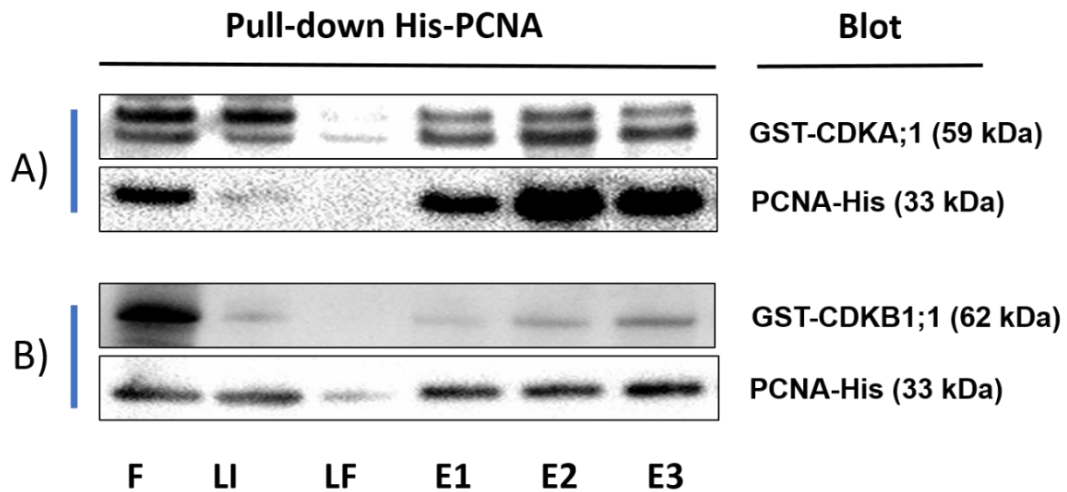


Figura 26. Interacción *in vitro* ente PCNA-His y GST-CDKs. A) Interacción con GST-CDKA;1 y B) Interacción con GST-CDKB1;1. Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), Ei (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -CDKA 1:1000, anticuerpo  $\alpha$ -CDKB 1:1000 y  $\alpha$ -PCNA 1:2000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

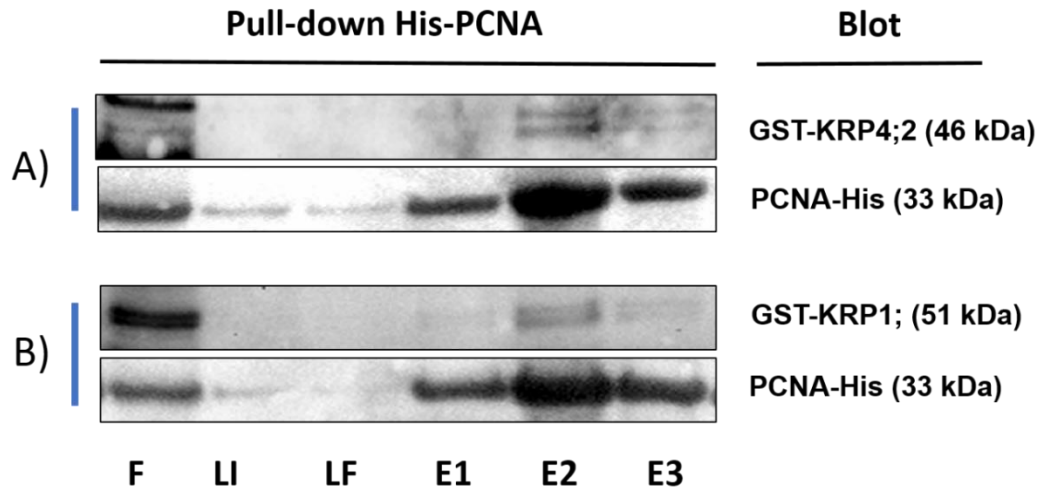


Figura 27 Interacción *in vitro* entre PCNA-His y GST-KRPs. A) Interacción con GST-KRP4;2 y B) Interacción con GST-KRP1;1 Las fracciones que se cargaron en el gel son: F (Input de la fracción soluble agregada a la columna), LI (Lavado Inicial), LF (Lavado Final), E1 (Eluciones). Título del anticuerpo  $\alpha$ -KRP 1:1000 y  $\alpha$ -PCNA 1:2000. Título del anticuerpo secundario  $\alpha$ -Conejo 1:15000.

- Ensayos de inhibición de la actividad de cinasa

Tras demostrar las interacciones planteadas, mediante ensayos de actividad de cinasa *in vitro* se determinó el efecto inhibitorio de las proteínas Zm KRP1;1 Y Zm KRP4;2 recombinantes sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, utilizando como sustrato a Histona H1 (Biolabs). Se utilizaron inmunoprecipitados de extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz germinados por 6 horas, debido a que es el tiempo en que la actividad de cinasa muestra un pico de actividad estandarizado previamente en el grupo de trabajo.

La técnica que se utilizó tenía parámetros establecidos para las concentraciones de proteína empleadas e inclusive la inhibición de los complejos inmunoprecipitados con anti-PCNA han sido validados mediante la adición de BSA no observando un cambio en la actividad intrínseca. Por otro lado, se ha demostrado mediante los mismos ensayos que la actividad de cinasa no era afectada por la proteína GST de manera individual.

En la figura 28 se muestra la fosforilación de la Histona H1 por las cinasas asociadas a PCNA, se observó que hay una relación dosis-respuesta en el efecto inhibitorio de ambas KRPs sobre esta actividad de cinasa, así como una inhibición diferencial entre las dos KRPs analizadas. El ensayo se realizó por duplicado para la proteína KRP1;1 y por triplicado para KRP4;2, con los resultados conjuntos se realizó la densitometría correspondiente teniendo como resultado que a la concentración máxima ensayada se alcanzó hasta un 50% de la inhibición de la actividad de cinasa para ambas proteínas.

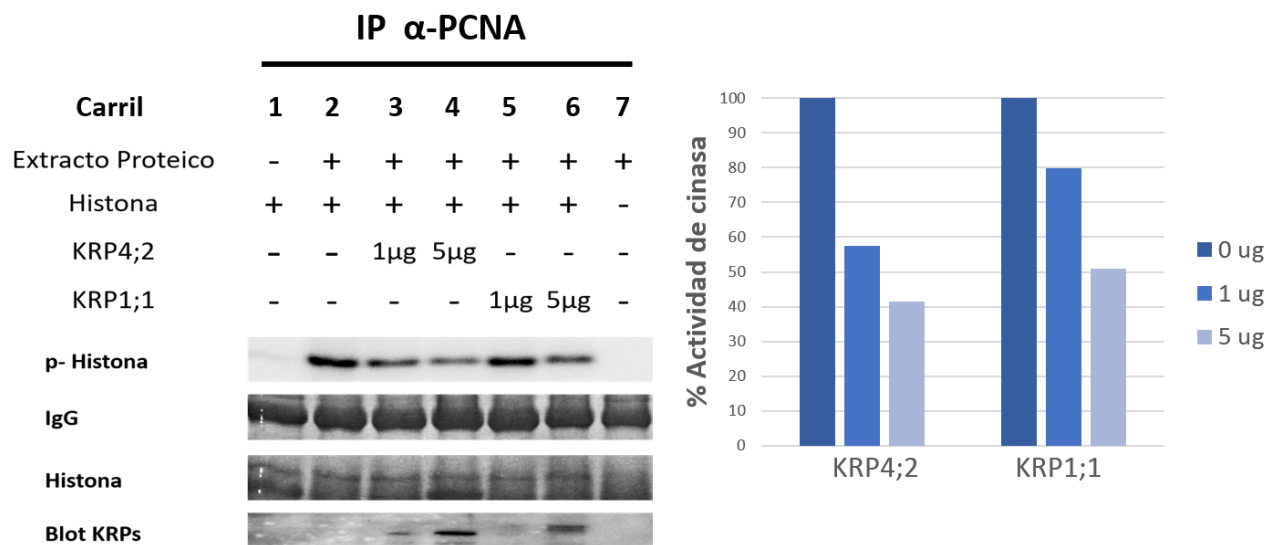


Figura 28. Efecto de Zm KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa en inmunoprecipitados de anti-PCNA, utilizando a histona H1 como sustrato. Carril 1: control negativo sin extracto proteico; carril 2: control positivo de la actividad cinasa sin inhibidores; carriles 3 y 4, inhibición de la actividad de cinasa por KRP4;2 concentración 1 y 5  $\mu$ g respectivamente; carriles 5 y 6, inhibición de la actividad de cinasa por KRP1;1, concentración 1 y 5  $\mu$ g respectivamente; carril 7: control negativo sin sustrato.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Al analizar *in silico* las secuencias proteicas de los componentes del ciclo celular a interactuar con PCNA, se encontró la presencia tanto de motivos conservados de unión así como las variantes de estos, sugiriendo la capacidad de las proteínas de interactuar.

El análisis de la estructura primaria mostró que CDKA;1 y CDKB1;1 tienen motivos PIP incompletos, estos se caracterizan por poseer una de las dos partes esenciales del motivo canónico. Aun cuando por este aspecto la unión podría ser débil se ha demostrado que la posesión de alguna de las regiones es suficiente para que se dé la interacción. Por otro lado, tanto la KRP1;1 como la KRP4;2 mostraron la presencia de motivos PIP no canónicos, ya que carecen solo uno de los aminoácidos del motivo completo, siendo un residuo aromático para ambos. Se ha reportado que este tipo de interacción es bastante similar a la que se da cuando está presente al motivo canónico completo. Cabe destacar que estas variaciones en los motivos de unión ejercen importancia en la competencia presente por los sitios de interacción con PCNA, por lo cual la idea de sugerir una unión no individual sino del complejo con la plataforma favorece la presencia de todos los componentes en un mismo momento celular.

La técnica que se utilizó durante este proyecto se estandarizó previamente en el grupo de trabajo, estableciendo condiciones que permitieran mediante sobreexpresión, liberación celular, incubación y cromatografía de afinidad de proteínas recombinantes determinar estas interacciones. La técnica se validó para el proyecto a realizar, se demostró inicialmente la robustez con la proteína recombinante PCNA como proteína de anclaje, a partir de una interacción previamente reportada en el grupo y la literatura como lo es la de CycD2;2 (Gutiérrez et al., 2005). Posteriormente se realizaron los controles de interacción *in vitro* inespecífico de las proteínas recombinantes con la columna de anclaje, corroborando que ninguna región de las construcciones tenga afinidad por la resina de Níquel y finalmente se realizaron controles de interacción de los TAG *in vitro* con

PCNA-His demostrando que las interacciones observadas fueran debido a las proteínas esperadas y no mediante una interacción con las etiquetas de las construcciones generando falsos positivos. Con estos controles se confirmó que las interacciones observadas eran debido a la unión única entre las proteínas en cuestión.

En cuanto a PCNA, se sabe que proporciona procesividad a las DNA polimerasas replicativas durante el proceso de replicación, así mismo se conoce la participación de la plataforma en los diversos procesos de reparación del DNA. Sin embargo, también parece funcionar como una plataforma para las proteínas de ciclo celular ya que interactúa con las cinasas dependientes de ciclinas y las ciclinas en animales y en plantas. Además, se ha demostrado la importancia de la interacción de PCNA con la proteína p21<sup>kip1</sup> durante la replicación (Waga et al., 1994).

La estructura homotimérica característica de PCNA le otorga 3 sitios putativos de unión, confiriéndole la capacidad de interacción con una diversidad de componentes al mismo tiempo, la posible formación de un doble homotrímero le otorga una estructura funcional que favorece la capacidad de actuar con una gama de proteínas de alto peso molecular. Un aspecto para destacar de esta plataforma es la amplia superficie de contacto lo que favorece compartimentos tales que permiten la actividad en los diversos procesos celulares en los que está implicada.

La estructura en forma de anillo de PCNA en maíz se ha observado a lo largo de la germinación y tanto en el núcleo como en el citoplasma. PCNA en ejes embrionarios de maíz durante la germinación ha coeluido con un conjunto de CycDs y CDKs en fracciones de peso molecular alto y variable, lo que refuerza la teoría de PCNA como proteína central para diversos complejos donde sus componentes fluctúan a lo largo de cada etapa fisiológica.

En ejes embrionarios de maíz, se han reportado las interacciones, mediante inmunoprecipitados de anti-PCNA, con CycDs, CDKA y CDKB1;1. Esta metodología no representa la interactividad de manera directa con PCNA, puesto que cabe la posibilidad de que la unión se lleve a cabo mediante un componente secundario.

Por ello, la metodología empleada en este proyecto demuestra y fortalece la unión uno a uno de las diferentes proteínas analizadas, el conocimiento de estas interacciones individuales favorece la adaptación de PCNA en un modelo dinámico de interacción durante procesos celulares.

Por otro lado, la generación de un complejo ternario entre PCNA, CycD y CDK, se confirmó mediante los ensayos de actividad, ya que se estableció que el inmunoprecipitado con anti-PCNA presenta la actividad de cinasa sobre histona H1, por lo cual debe estar presente al menos un complejo Cyc/CDK.

Considerando que en mamíferos se ha encontrado una familia ya caracterizada de inhibidores de CDKs extensa, en particular un miembro de esta familia, p21 que puede interaccionar con distintos componentes del ciclo celular, entre ellos PCNA, entonces debido a que estas proteínas no están conservadas en plantas, resultó importante analizar a los análogos funcionales en estos organismos, la familia de las ICK/KRPs. La caracterización de este grupo ha destacado la conservación de los principales dominios de unión a las CDKs y a las ciclinas, presentes en p21 de mamíferos, mapeados en el dominio C-terminal en plantas. Estos análisis han permitido estimar la capacidad de inhibir a los complejos Cyc/CDK de manera similar en plantas como en animales.

Se ha comprobado la capacidad de dos miembros de esta familia de inhibir la actividad cinasa del complejo Cyc/CDK, sin embargo, esta inhibición es diferencial con respecto a los distintos complejos que los dos tipos de CDKs en maíz y las cuatro CycD analizadas pueden formar. Cada una de las KRPs analizadas presentan no solo inhibición sino incluso interacción diferencial frente a los complejos CycDs/CDKs (Godínez-Palma et al., 2017), por lo cual se propone que los motivos adicionales encontrados en la parte N-terminal de las ICK-KRPs podrían determinar la especificidad hacia los diferentes complejos CycD/CDK. Alternativamente, estos dominios podrían interaccionar con otras proteínas aún no descritas.

Se realizó un alineamiento de las KRPs que se trabajaron con p21, encontrando semi-conservada la región de unión con las ciclinas y CDKs, por lo tanto, el sitio de inhibición necesario para estos complejos está presente.

En la figura 27 se muestra por primera vez de manera *in vitro* la interacción directa entre PCNA y dos miembros de la familia KRP de maíz (KRP1;1 y KRP4;2), la figura demuestra la coelución de ambas proteínas de la columna de afinidad que retiene a PCNA, lo que confirma su interacción, y sugiere un mecanismo no descrito de inhibición del ciclo celular para las KRPs. Por otro lado, la asociación de PCNA a una proteína G2-M putativa, como lo es CDKB1;1 representa un hallazgo, que sugiere la actividad de la plataforma durante todo el ciclo celular acoplando a los componentes claves en cada fase del ciclo.

Con las interacciones reportadas en este trabajo y las previamente conocidas, se puede sugerir la capacidad de PCNA como una plataforma molecular en el ciclo celular, que favorecería la formación y localización de los complejos necesarios para la procesividad del ciclo celular sugiriendo la promoción de la actividad de estos. En la figura 28 se observa la inhibición de la actividad de la cinasa asociada a PCNA de los ejes embrionarios del maíz al ser expuesta a concentraciones crecientes de cualquiera de las KRPs, la actividad se reduce importantemente con la máxima concentración de KRP, lo que indica que la cinasa asociada a PCNA es del tipo CDK. Se sugiere la presencia de un complejo cuaternario en el inmunoprecipitado, sin conocerse si éste es estable o transitorio. No se puede comprobar si las KRP se unen al complejo a través del complejo Cyc/CDK o PCNA o inclusive si la unión es tanto con el complejo Cyc/CDK como con PCNA.

La diversidad de los complejos que están asociados a PCNA a lo largo de la germinación representan una variable adicional a la capacidad de inhibir de las KRPs, por lo que la dinámica de los complejos ternarios y cuaternarios que se pueden formar genera un amplio espectro de posibilidades de inhibición.

La familia de las KRPs puede ejercer su acción al no permitir la aparición de complejos debido al bloqueo de formación de estos, gracias a la competencia de los

sitios de unión con PCNA o CDKs. Además de la capacidad de inhibir a los diversos complejos cinasa, se puede analizar la capacidad de inhibir la actividad de PCNA como factor de procesividad de las polimerasas.



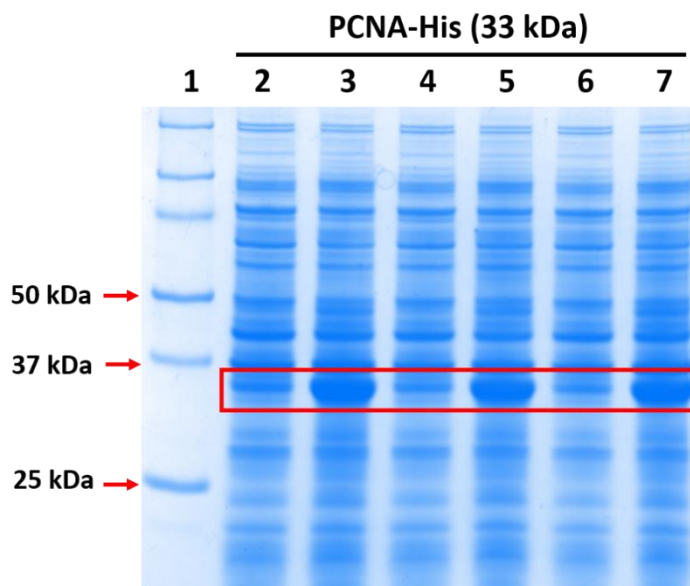
## **CONCLUSIONES**

- PCNA de maíz interactúa de manera directa tanto con CDKA1;1 y CDKB1;1 *in vitro*
- PCNA de maíz interactúa de manera directa tanto con KRP1;1 y KRP4;2 *in vitro*
- La actividad de cinasa asociada a PCNA es inhibida por KRP4;2 y KRP1;1 de manera diferencial en extractos proteícos de ejes embrionario de maíz en germinación.

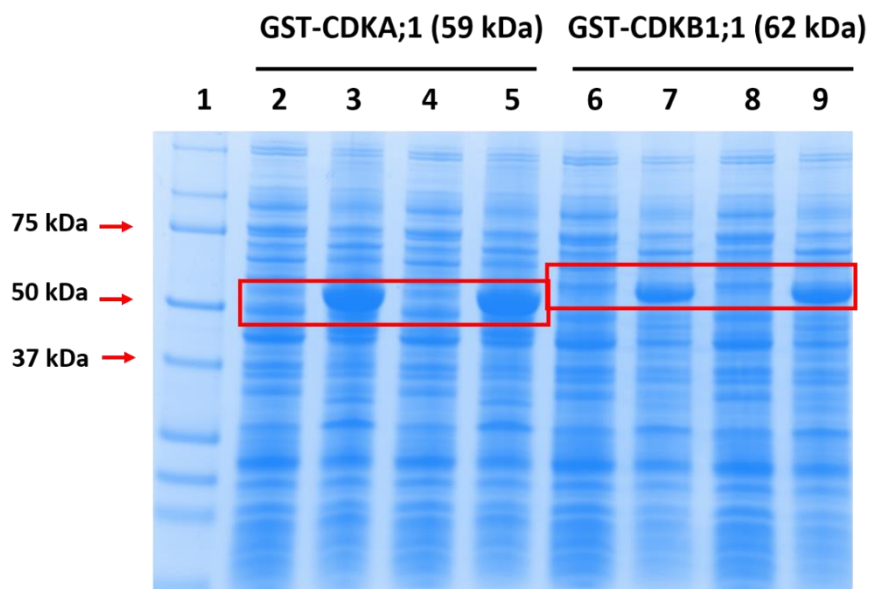
## **PERSPECTIVAS**

- Estudiar la actividad cinasa de complejos asociados a PCNA en presencia de KRPs a lo largo de la germinación de maíz.
- Analizar la interacción de PCNA con diversos juegos de proteínas del complejo cuaternario establecido anteriormente, para evaluar la competencia y afinidad por el sitio de interacción de PCNA.
- Estimar la actividad cinasa de complejos CycD/CDKs en presencia de KRPs como inhibidor, en extractos de compartimentos celulares durante la germinación.

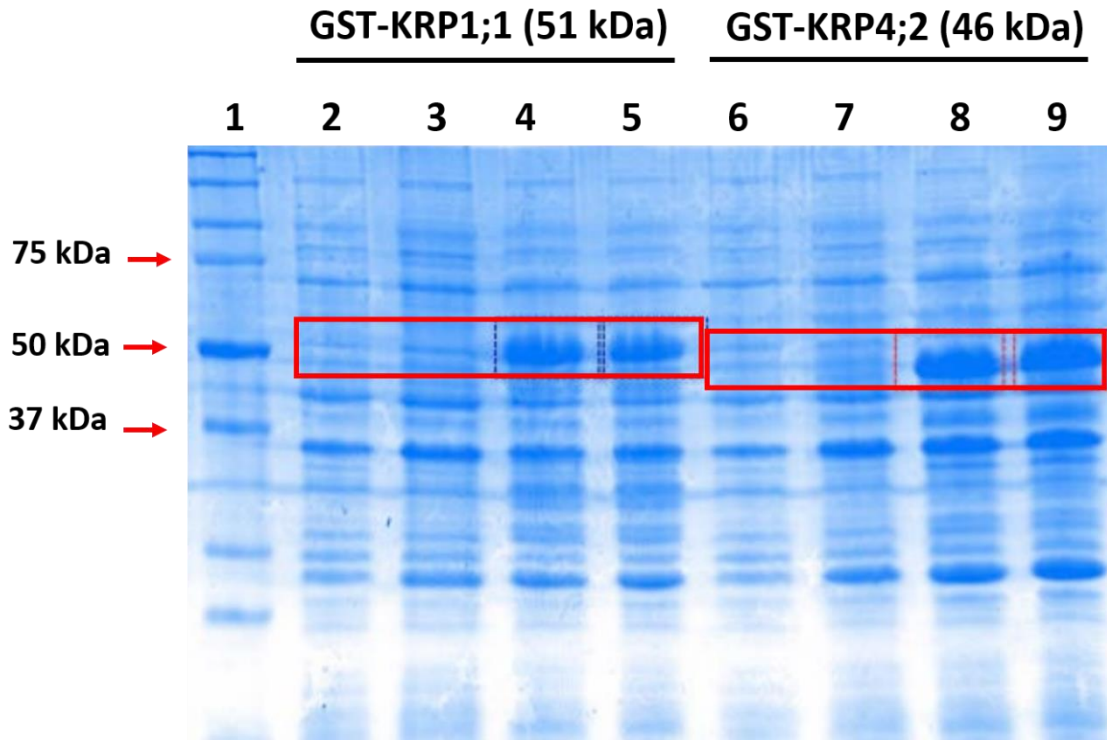
## ANEXOS



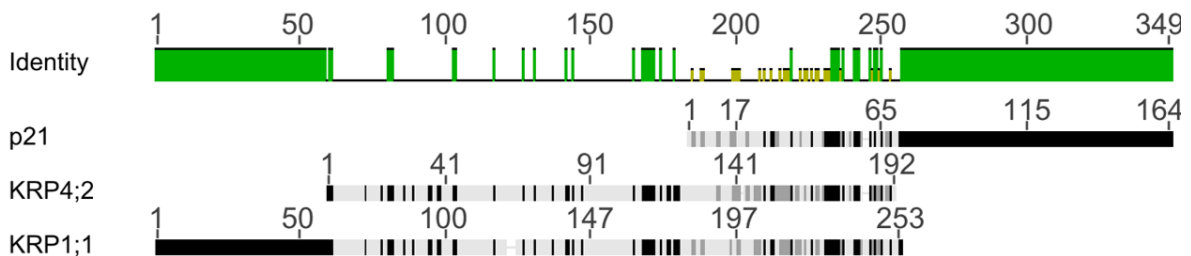
Anexo 1 Inducción de la proteína recombinante PCNA-His. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2, 4 y 6: Construcción con PCNA-His sin inducir. Carril 3,5 y 7: Construcción con PCNA-His inducida por 2 h.



Anexo 2 Inducción de las proteínas recombinantes GST-CDKA;1 y GST-CDKB1;1. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2 y 4: Construcción con GST-CDKA;1 sin inducir. Carril 3 y 5: Construcción con GST-CDKA;1 inducida por 3 h. Carril 6 y 8: Construcción con GST-CDKB1;1 sin inducir. Carril 7 y 9: Construcción con GST-CDKB1;1 inducida por 3 h.



Anexo 3 Inducción de las proteínas recombinantes GST-KRP1;1 y GST-KRP4;2. Carril 1: Marcador de masa molecular. Carril 2 y 6: BL21 Codon plus sin plásmido. Carril 3. Construcción con GST-KRP1;1 sin inducir. Carril 4 y 5: Construcción con GST-KRP1;1 inducida por 3 y 4 h respectivamente. Carril 7. Construcción con GST-KRP4;2 sin inducir. Carril 8 y 9: Construcción con GST-KRP4;2 inducida por 3 y 4 h respectivamente.



Anexo 4. Alineamiento de las proteínas KRPs con p21. Se observa que se conserva la región carboxilo de las KRPs la región de unión e inhibición de la proteína p21.

## **REFERENCIAS**

- Acosta, J. A. T., Fowke, L. C., & Wang, H. (2011). Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Annals of Botany*, *107*(7), 1141–1157.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcr034>
- B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K. R. and J. D. W. (1994). The Cell Division Cycle. In *In Molecular Biology of the Cell* (3rd ed., Vol. 22, pp. 863–910).  
[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0307-4412(94)90059-0)
- Bauer, G. A., & Burgers, P. M. (1988). The yeast analog of mammalian cyclin/proliferating-cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(20), 7506–7510.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.85.20.7506>
- Becerril, N., Martínez, M. Á., García, E., & Ramos, J. M. V. (2012). Chromatin bound PCNA is complexed with cell cycle protein regulators as determined by Chromatin Immunoprecipitation. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *56*(1), 10–14.
- Boehm, E. M., & Washington, M. T. (2016). R.I.P. to the PIP: PCNA-binding motif no longer considered specific: PIP motifs and other related sequences are not distinct entities and can bind multiple proteins involved in genome maintenance. *BioEssays*, *38*(11), 1117–1122.  
<https://doi.org/10.1002/bies.201600116>
- Bravo, R., & Celis, J. (1980). A Search for Differential Polypeptide Synthesis. *Journal of Cell Biology*, *84*(March), 795–802.
- Buendía-Monreal, M., Rentería-Canett, I., Guerrero-Andrade, O., Bravo-Alberto, C. E., Martínez-Castilla, L. P., & García, E. (2011). The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiologia Plantarum*, *143*(3).
- Burgers, P. M. J. (2009). Polymerase Dynamics at the Eukaryotic DNA Replication

- Fork, 284(7), 4041–4045. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800062200>
- Capron, A. (2003). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome: Molecular and Genetic Characterization of the APC2 Subunit. *The Plant Cell Online*, 15(10), 2370–2382. <https://doi.org/10.1105/tpc.013847>
- Chen, J. ., Jackson, P. K., Kirschner, M. W., & Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, 374, 376–388.
- Ciemerych, M. A., & Sicinski, P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene*, 24(17), 2877–2898. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208608>
- de Jesús Juárez, N., Mancilla, A., García, E., & Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination. *Seed Science Research*, 18(02), 67–75. <https://doi.org/10.1017/S0960258508975048>
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., ... Inzé, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(7), 1653–1668. <https://doi.org/10.1105/TPC.010087>
- Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2003). *The Plant Cell Cycle. Annual Review of Plant Biology* (Vol. 54). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836>
- Dissmeyer, N., Weimer, A. K., Pusch, S., De Schutter, K., Kamei, C. L. A., Nowack, M. K., ... Schnittger, A. (2009). Control of Cell Proliferation, Organ Growth, and DNA Damage Response Operate Independently of Dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 Homolog CDKA;1. *The Plant Cell*, 21(11), 3641–3654. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070417>
- Doebley, J. (2004). The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 37–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>
- Garza Aguilar, S. M., Sánchez Camargo, V. A., Godínez Palma, S. K., & Lara Núñez, A. (2014). Avances recientes en el estudio del ciclo celular, 32(2), 39–

47.

- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., & Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, *54*(3), 433–439.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90206-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90206-1)
- Godínez-Palma, S. K., Rosas-Bringas, F. R., Rosas-Bringas, O. G., García-Ramírez, E., Zamora-Zaragoza, J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Two maize Kip-related proteins differentially interact with, inhibit and are phosphorylated by cyclin D-cyclin-dependent kinase complexes. *Journal of Experimental Botany*, *68*(7), 1585–1597. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx054>
- Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant and Cell Physiology*, *46*(1), 166–173.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci007>
- Hara, K., Uchida, M., Tagata, R., Yokoyama, H., Ishikawa, Y., Hishiki, A., & Hashimoto, H. (2018). Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *74*(4), 214–221. <https://doi.org/10.1107/S2053230X18003242>
- Herrera, I., Sánchez, M. D. L. P., Molina, J., Plasencia, J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2000). Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiologia Plantarum*, *110*(1).
- Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., ... Sato, M. (2009). Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(16), 10552–10560.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M809745200>
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics*, *40*(1), 77–105.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>

Jónsson, Z. O., Hindges, R., & Hübscher, U. (1998). Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *The EMBO Journal*, *17*(8), 2412–2425.

<https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2412>

Kelman, Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene*, *14*(6), 629–640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>

Kim, B. J., & Lee, H. (2008). Lys-110 is essential for targeting PCNA to replication and repair foci, and the K110A mutant activates apoptosis. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, *100*(12), 675–686. <https://doi.org/10.1042/BC20070158>

Klug, W. S., Cummings, M. R., & Spencer, C. A. (2006). *Genética* (8a ed.). Madrid: Pearson Prentice Hall.

Kono, A., Umeda-hara, C., Lee, J., Ito, M., Uchimiya, H., & Umeda, M. (2002). Arabidopsis D-Type Cyclin CYCD4 ; 1 Is a Novel Cyclin Partner of B2-Type Cyclin-Dependent Kinase 1, *132*(July), 1315–1321.

<https://doi.org/10.1104/pp.103.020644.sect>

Koundrioukoff, S., Jónsson, Z. O., Hasan, S., De Jong, R. N., Van Der Vliet, P. C., Hottiger, M. O., & Hübscher, U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(30), 22882–22887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001850200>

Lara-Núñez, A., Jesús, N. De, & Vázquez-Ramos, J. M. (2008). Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones. *Physiologia Plantarum*, *132*(1).

Leibovitch, M. P., Kannengiesser, C., & Leibovitch, S. A. (2003). Signal-induced ubiquitination of p57Kip2 is independent of the C-terminal consensus Cdk phosphorylation site. *FEBS Letters*, *543*(1–3), 125–128.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00425-3)

- López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J., & Hussey, P. J. (1995). Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1260(1), 119–121. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)00192-6](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)00192-6)
- Lui, H., Wang, H., DeLong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., & Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant Journal*, 21(4), 379–385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00688.x>
- Maga, G. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3051–3060. <https://doi.org/10.1242/jcs.00653>
- Magyar, Z., Ito, M., Binarová, P., Mohamed, B., & Bogre, L. (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis. In J. Greilhuber, J. Dolezel, & J. F. Wendel (Eds.), *Plant Genome Diversity Volume 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes* (pp. 77–97). Vienna: Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_6)
- Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., ... Dudits, D. (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *The Plant Cell*, 9(2), 223–235. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.223>
- Martínez Mata, M. A. (2011). *Asociación de PCNA con proteínas del ciclo celular durante la germinación de maíz.*
- McNally, R., Bowman, G. D., Goedken, E. R., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2010). Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. *BMC Structural Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-10-3>
- Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41(4), 546–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>



- Menges, M., & Murray, J. A. H. (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant Journal*, *30*(2), 203–212. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01274.x>
- Miyachi, K., Fritzler, M. J., & Tan, E. M. (1978). Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *The Journal of Immunology*, *121*, 2228–2234.
- Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, *129*(4), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>
- Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell*, *116*(2), 221–234. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8)
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., & Sekine, M. (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters*, *580*(1), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.018>
- Nannas, N. J., & Kelly Dawe, R. (2015). Genetic and genomic toolbox of Zea mays. *Genetics*, *199*(3), 655–669. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.165183>
- Naryzhny, S. N., & Lee, H. (2010). Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters*, *584*(20), 4292–4298. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.021>
- Naryzhny, S. N., Zhao, H., & Lee, H. (2005). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) may function as a double homotrimer complex in the mammalian cell. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13888–13894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500304200>
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors,. *Journal of Molecular Biology*, *287*(5), 821–828. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1999.2640>
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view.

- Biochemical Journal*, 308(Pt 3), 697–711. <https://doi.org/10.1042/bj3080697>
- Rosas-Bringas, F. R. (2015). *Caracterización génica de la familia ICK/KRP de maíz*.
- Rosas Carballo, M. (1999). *Sobreexpresion y purificacion del antígeno nuclear de proliferacion celular : PCNA*.
- Sánchez, M. D. L. P., Gurusinghe, S. H., Bradford, K. J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2004). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 515–523. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri029>
- Sánchez, M. D. L. P., Torres, A., Boniotti, M. B., Gutierrez, C., & Vázquez-Ramos, J. M. (2002). PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Molecular Biology*, 50(2), 167–175. <https://doi.org/10.1023/A:1016029001537>
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). PERSPECTIVE CDK inhibitors : positive and negative regulators of G 1 -phase progression, (901), 1501–1512.
- Soria, G., & Gottifredi, V. (2010). PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair*, 9(4), 358–364. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2009.12.003>
- Stoimenov, I., & Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions*, 37(3), 605–613. <https://doi.org/10.1042/BST0370605>
- Strzalka, W., Oyama, T., Tori, K., & Morikawa, K. (2009). Crystal structures of the Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18(5), 1072–1080. <https://doi.org/10.1002/pro.117>
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*,

107(7), 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>

- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., ... De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, 6(397). <https://doi.org/10.1038/msb.2010.53>
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., & Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14(4), 903–916. <https://doi.org/10.1105/tpc.010445.primary>
- Vázquez-Ramos, J. M., & Sánchez, M. d. I. P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13(2), 113–130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>
- Verkest, A., Weini, C., Inzé, D., De Veylder, L., & Schnittger, A. (2005). Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiology*, 139(November), 1099–1106. <https://doi.org/10.1104/pp.105.069906.1>
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369, 574–578.
- Wang, H., Zhou, Y., & Fowke, L. C. (2006). The emerging importance of cyclin-dependent kinase inhibitors in the regulation of the plant cell cycle and related processes This review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Plant Cell Biology. *Canadian Journal of Botany*, 84(4), 640–650. <https://doi.org/10.1139/b06-043>
- Warbrick, E. (1998). PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 20(3), 195–199.
- Warbrick, E., Lane, D. P., Glover, D. M., & Cox, L. S. (1995). A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen.

*Current Biology : CB*, 5(3), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00058-3)

Xiong, Y., Zhang, H., & Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71(3), 505–514. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90518-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90518-H)

Zhou, Y., Fowke, L., & Wang, H. (2002). Plant CDK inhibitors: Studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Reports*, 20(10), 967–975. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0434-8>

Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., & Fowke, L. C. (2003). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216(4), 604–613. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0935-x>