



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE KRP1;1 Y KRP4;2 SOBRE LA ACTIVIDAD DE CINASA ASOCIADA A
PCNA DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Estefany Damaris Guerrero Molina



CDMX.

AÑO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jorge Manuel Vázquez Ramos
VOCAL: Profesor: José Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO: Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño
1er. SUPLENTE: Profesor: Nuria Victoria Sánchez Puig
2º SUPLENTE: Profesor: Javier Axosco Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

SUPERVISOR TÉCNICO:

QA. Javier Axosco Marín

SUSTENTANTE:

Estefany Damaris Guerrero Molina

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por mi formación académica, profesional y personal.

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos por permitirme ser parte de su grupo de investigación, así como por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado Dr. Eleazar Martínez Barajas y Dra. Martha Patricia Coello Coutiño por sus comentarios y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Aurora Lara Núñez y Dr. Elpidio García Ramírez por sus consejos y apoyo.

Al financiamiento otorgado para la realización del trabajo experimental por parte de los siguientes programas:

- ✓ Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9130
- ✓ Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9124
- ✓ Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205219.
- ✓ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por permitirme ser parte del programa “Apoyo para ayudante de investigador Nivel III o Emérito del Sistema Nacional de Investigadores”

Índice

Abreviaturas.....	6
Índice de figuras y tablas.....	8
Resumen.....	10
Introducción.....	12
El maíz.....	12
Germinación.....	14
El ciclo celular.....	15
Regulación del ciclo celular en plantas.....	18
Cinasas dependientes de ciclinas.....	19
Ciclinas de plantas.....	20
Regulación de complejos Cyc/CDK.....	22
Antígeno nuclear de proliferación celular.....	23
Familias de proteínas inhibidoras del ciclo celular.....	27
Antecedentes directos.....	31
Justificación.....	33
Hipótesis.....	33
Objetivos.....	33
General.....	33
Particulares.....	33
Metodología.....	34
Resultados.....	38
Abundancia proteica y estructura fisiológica de PCNA.....	38

PCNA y KRP co-purifican con complejos CDK/CycD.....	39
PCNA co-precipita con CDKA, CDKB1;1, CycD y KRPs.....	41
Las asociaciones de PCNA con CDKA, CDKB1;1 y CycD son diferenciales en la germinación de maíz.....	43
La actividad de cinasa asociada a PCNA es inhibida por KRP1;1 y KRP4;2 durante la germinación de maíz.....	44
Discusión.....	47
Conclusiones.....	52
Perspectivas.....	52
Anexos.....	53
Referencias.....	55

Abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
CAK	Cinasa activadora de CDK
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CID	Dominio de inhibición de CDKs
CKS	Subunidad regulatoria de CDKs
Cyc	Ciclina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA pol	DNA polimerasa
DP	Proteína de dimerización con E2F
E2F	Factor de unión al promotor E2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ET	Extracto total
GST	Glutación S transferasa
ICK	Proteína inhibidora de CDK
IDCL	Asa conectora de interdominios
IP	Inmunoprecipitado
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
KRP	Proteína relacionada a Cip/Kip
mRNA	RNA mensajero
MW	Marcador de masa molecular

p13 ^{Suc1}	Análogo de CKS de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PIP	Motivo de interacción de proteínas con PCNA
RBR	Proteína relacionada a retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Figuras y tablas

Figura 1. Estructura del grano de maíz.

Figura 2. Curva de toma de agua de la semilla en la germinación.

Figura 3. Representación de las fases del ciclo celular.

Figura 4. Comparación de ciclinas de *Arabidopsis thaliana* y animales.

Figura 5. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.

Figura 6. La actividad de las cinasas dependientes de ciclina es regulada a múltiples niveles.

Figura 7. Árbol filogenético de la secuencia proteica de PCNA y la subunidad beta de distintas especies.

Figura 8. Estructura homotrimérica de PCNA.

Figura 9. Inhibición de distintos complejos Cyc/CDK por miembros de la familia Cip/Kip.

Figura 10. Organización estructural de KRPs de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 11. Abundancia proteica y estructura fisiológica de PCNA.

Figura 12. Construcción de columna de afinidad empleando como proteína de anclaje a p13^{Suc1}.

Figura 13. PCNA se asocia a complejos CDK/CycD y KRPs.

Figura 14. La asociación de PCNA con CDKA, CDKB1;1 y Cycs D es diferencial en la germinación de maíz.

Figura 15. La actividad de cinasa asociada a PCNA es inhibida por KRP1;1 y KRP4;2 durante la germinación de maíz.

Tabla 1. Taxonomía del maíz.

Tabla 2. Proteínas reguladoras del ciclo celular que contienen motivos de unión a PCNA.

Tabla 3. Preparación de geles de poliacrilamida al 12%

Tabla 4. Título de anticuerpos empleados.

Tabla 5. Complejos dinámicos de CycD/CDKs.

Anexo 1. Secuenciación del gen *suc1* en el vector pGEX-4T2.

Resumen

La germinación es un proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla que permite el despertar metabólico de las células, lo cual a su vez permitirá la culminación de la primera ronda de división celular; desde este punto de vista la germinación se encuentra íntimamente relacionada con la progresión del ciclo celular, el cual es un proceso unidireccional, irreversible y altamente regulado cuya finalidad será la obtención de dos células hijas genéticamente idénticas. Los principales factores proteicos que regulan la progresión del ciclo celular son los complejos ciclinas-cinasas dependientes de ciclina (Cyc/CDK), los cuales fosforilan proteínas claves del ciclo celular. Los complejos Cyc/CDK son regulados a diferentes niveles, desde modificaciones postraduccionales activadoras y/o inhibitorias hasta su asociación con otras proteínas que modulan su actividad, por ejemplo, su unión con proteínas inhibidoras KRPs (proteínas relacionadas a KIP) o bien con el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).

PCNA es una proteína homotrimérica altamente conservada entre especies eucariontes, cuya función típica se ha descrito como factor de procesividad de la DNA polimerasa δ , sin embargo, se ha observado que PCNA participa en diferentes procesos celulares al permitir la agregación de otras proteínas. En plantas, diversos estudios han mostrado empleando metodologías tanto *in vitro* como *in vivo*, que PCNA es capaz de asociarse con proteínas reguladoras del ciclo celular como lo son CDKA, KRPs y diferentes ciclinas D; sin embargo, en maíz, se desconoce si estas asociaciones son diferenciales o se mantienen a lo largo de la germinación, así como también se desconoce, el efecto de las KRPs en la actividad de cinasa de los complejos Cycs/CDKs asociados a PCNA.

En el presente proyecto se determinó la asociación de PCNA con CDKA, CDKB, CycD3;1, CycD4;2, CycD5;3, CycD6;1 y KRPs, las cuales muestran patrones diferenciales de asociación con PCNA durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Por otro lado, se mostró el efecto inhibitorio de KRP1;1 y KRP4;2, en la actividad de cinasa de los complejos Cycs/CDKs asociados a PCNA. Para lograr esto, se emplearon extractos proteicos obtenidos de ejes embrionarios de maíz

germinados, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PCNA y se determinaron las proteínas asociadas mediante ensayos de western blot. Por último, se realizaron ensayos de actividad de cinasa asociada a PCNA, adicionando KRP1;1 y KRP4;2 recombinante, para determinar su efecto sobre la actividad.

Introducción

El maíz

En México la domesticación del maíz se remonta a miles de años, los primeros grupos recolectores nómadas obtenían el Teocintle de las tierras fértiles de lo que hoy en día se conoce como el estado de Guerrero. A través de los años, los humanos aprendieron sobre el ciclo de vida de la planta y se realizó una manipulación selectiva por lo que al pasar los años las plantas de maíz se veían favorecidas al obtener mazorcas más grandes y con más semillas, éstas no se liberaban de forma solitaria por lo que la propagación de la especie dependería completamente del humano, por ello la historia del maíz y de los humanos en México se construyó a la par (Vela, 2011).

En México el principal producto agrícola es el maíz con 10,542,955 hectáreas sembradas, esta planta es empleada tanto para el consumo directo del humano, derivados como jarabes, almidones y dextrosa, así como para la alimentación de animales bovinos (INEGI, 2017) por lo que el estudio de esta planta ha resultado de alto impacto económico, científico, político, social y cultural.

La planta de maíz generalmente es de tallo único que crece hasta aproximadamente 2.5 metros de altura con cerca de 20 hojas largas y estrechas que crecen individualmente desde los nodos a lo largo del tallo. Tras la fecundación pueden generar 1 o 2 mazorcas.

La importancia económica y científica de los cereales ha motivado una gran historia de investigación sobre su genética, desarrollo y evolución. La secuencia completa del genoma del arroz es emblemática de una transición a la genómica de alto rendimiento y la biología computacional que también ha penetrado en el estudio de muchos otros cereales como el maíz (Paterson, Freeling, and Sasaki 2005).

Al maíz se le ha considerado uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, además se ha desarrollado un conjunto de herramientas citogenéticas, métodos para la genética, y marcadores de fenotipo caracterizados, esto hace que el maíz sea un buen

modelo de estudio más allá de la biología de las plantas. Los principales descubrimientos en las áreas de transposones, impronta y biología cromosómica provinieron del trabajo en maíz (Nannas and Dawe 2015).

El maíz tiene un genoma grande, rico en transposones, de aproximadamente 2.1 Gpb, organizado en 10 cromosomas y contiene 39,591 genes que codifican a proteínas (http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Annotation/#assembly).

En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica aceptada del maíz.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Genero	Zea
Especie	Zea mays

Los principales componentes de la semilla de maíz se muestran en la figura 1, entre ellos destacan:

- **Pericarpio:** Forma la cubierta cerosa de la semilla, es la pared del ovario.
- **Endospermo:** Tejido de reserva que alimenta al embrión durante la germinación. Este tejido constituye el mayor volumen de la semilla (82%) y está formado principalmente de almidón.
- **Embrión:** Tejido compuesto de diferentes células que darán lugar a la formación de la planta, la parte superior del eje embrionario contiene un grupo de células conocidas como meristemo apical del tallo de las cuales al dividirse se genera el tallo y las primeras hojas (cotiledones), por el contrario, en la parte inferior se tiene al meristemo apical de la raíz que generará la raíz primaria y posteriormente raíces secundarias.

• Estructura del grano de maíz.

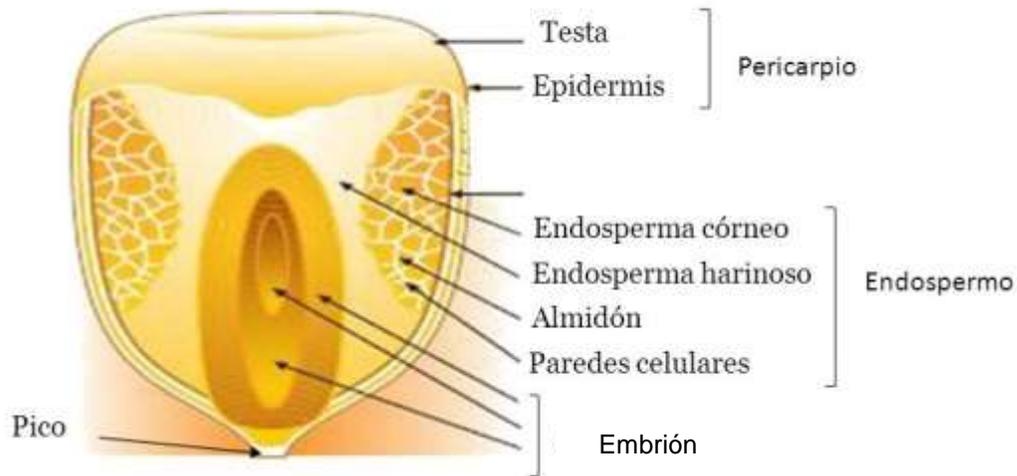


Figura 1. Estructura del grano de maíz. Tomada de <http://delmaiz.info/caracteristicas/>

Germinación.

La germinación de semillas es esencial para la perpetuación de cualquier especie de planta superior. Desde el punto de vista fisiológico se considera que la germinación es un proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla lo cual produce que las células en los tejidos se alarguen y la radícula logre protruir (Nonogaki, Bassel, and Bewley 2010). Desde el punto de vista bioquímico, la germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de los procesos de desarrollo. Esto implica que las semillas ya contienen, o deben adquirir pronto, la memoria bioquímica para el programa morfogénico que recrea una planta. En este sentido, la germinación involucra que las células pasen de un estado metabólico inactivo a uno activo que culminará con la primera ronda de división celular sin la necesidad de protruir la radícula (Vázquez-Ramos and Sánchez 2003).

El proceso germinativo se ha estudiado para tratar de entender los procesos moleculares que ocurren desde el momento en que la semilla entra en contacto con agua (imbibición), hasta el establecimiento de la planta en eventos post-germinativos. Para tratar de describir lo anterior se toma como modelo la curva de

toma de agua de semillas no dormantes, tal como el maíz, la curva consta de 3 fases (Figura 2):

- **Fase 1:** En esta fase ocurre una toma rápida de agua con lo que las membranas celulares comienzan a re-hidratarse, inicia la reparación de los organelos como las mitocondrias, así como la reparación del DNA dañado a causa de la desecación de la semilla. Además, comienza la síntesis de proteínas a partir de mRNAs almacenados durante la maduración de la semilla.
- **Fase 2:** Es una fase en la cual el ingreso de agua es restringido por lo que los niveles de agua permanecen constantes. Los procesos mencionados en la fase 1 continúan y se incrementan, además, comienza la síntesis de mRNAs de *novo* y por ello la producción de proteínas se incrementa. La replicación del DNA comienza y concluye durante esta etapa. La división celular ocurre en la etapa final de esta fase dando por concluido el ciclo celular y por ello la germinación.
- **Fase 3:** Es una fase post-germinativa, ocurre un segundo periodo de toma de agua rápida. En esta etapa ocurre la elongación radicular, así como la movilización de reservas de carbohidratos provenientes del endospermo hacia el eje embrionario.

El ciclo celular

El establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento y, por lo tanto, su estudio durante la germinación es fundamental. Los procesos bioquímicos de las células durante la germinación como las síntesis de proteínas y de DNA indican la fase preparativa G1 para que las células entren al ciclo celular. La finalidad del ciclo celular es la obtención de dos células hijas genéticamente idénticas, para ello se requiere que las células dupliquen su contenido de DNA y que se dividan. Este proceso es altamente regulado por lo que es unidireccional e irreversible.

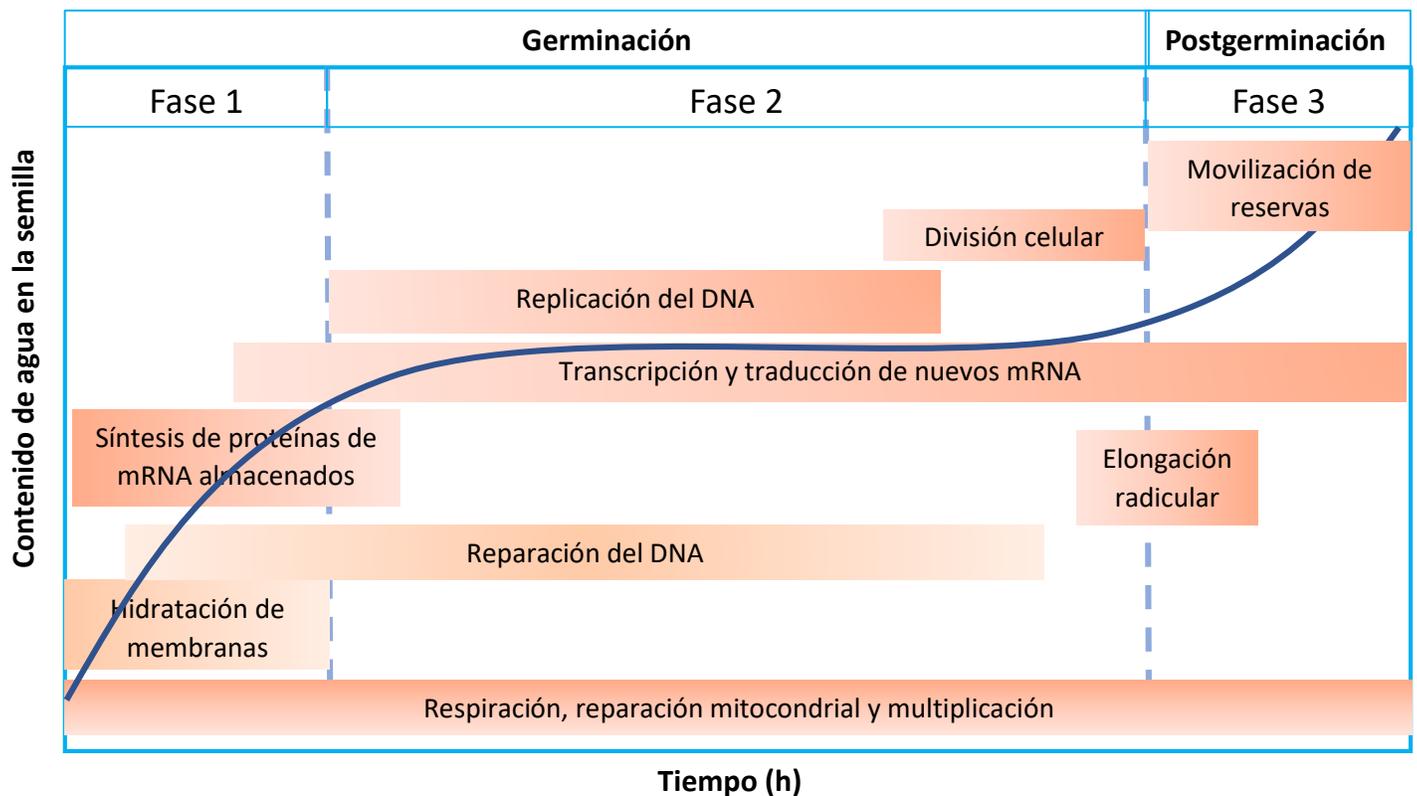


Figura 2. Curva de toma de agua de la semilla en la germinación. Modificado de (Nonogaki, Bassel, and Bewley 2010).

Para poder estudiar los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante el ciclo celular, éste se divide típicamente en dos fases, la interfase y la mitosis (Figura 3). La interfase se divide a su vez en tres etapas:

1. Fase G1: Durante esta etapa las células perciben las señales medioambientales, los nutrientes presentes en el medio, así como la presencia de hormonas y factores de crecimiento. Además, las células crecen con la finalidad de obtener un tamaño suficiente para poder generar dos células hijas. Ocurre la síntesis de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular y las células deciden si son capaces de comprometerse a una ronda de división celular, al poder generar la energía suficiente para llevar a cabo el proceso (Vázquez-Ramos and Sánchez 2003).

2. Fase S: El proceso principal que se lleva a cabo durante la fase S es la duplicación del DNA de las células, para esto se requiere que se establezcan y avancen las horquillas de replicación. Por otro lado, comienza la transcripción de genes para la producción de proteínas necesarias en las siguientes fases (Vázquez-Ramos and Sánchez 2003).

3. Fase G2: Durante esta fase se revisa que el DNA recién sintetizado sea perfectamente complementario a la hebra madre. Esta fase ocurre en conjunto con la fase S, es decir la maquinaria de replicación es capaz de detectar si se ha cometido un error, de ser así, las DNA polimerasas en su función 3' exonucleasa puede repararlo (Yurieva and O'Donnell 2016) o bien se reclutan proteínas de reparación (Moldovan, Pfander, and Jentsch 2007).

4. Mitosis: Se subdivide a su vez en profase, metafase, anafase, telofase y la citocinesis. Durante la profase los cromosomas replicados se condensan y el huso mitótico comienza a formarse fuera del núcleo. En la metafase el huso mitótico reúne a todos los cromosomas en el plano ecuatorial. Durante la anafase, las cromátidas hermanas de cada cromosoma replicado se separan de forma sincrónica y el huso las arrastra hacia los polos opuestos de la célula. En la telofase, se reconstituye la envoltura nuclear alrededor de cada conjunto de cromosomas. Finalmente, ocurre la citocinesis en la cual se lleva a cabo la división del citoplasma, por lo que la célula se divide en dos (Alberts *et al*, 2005).

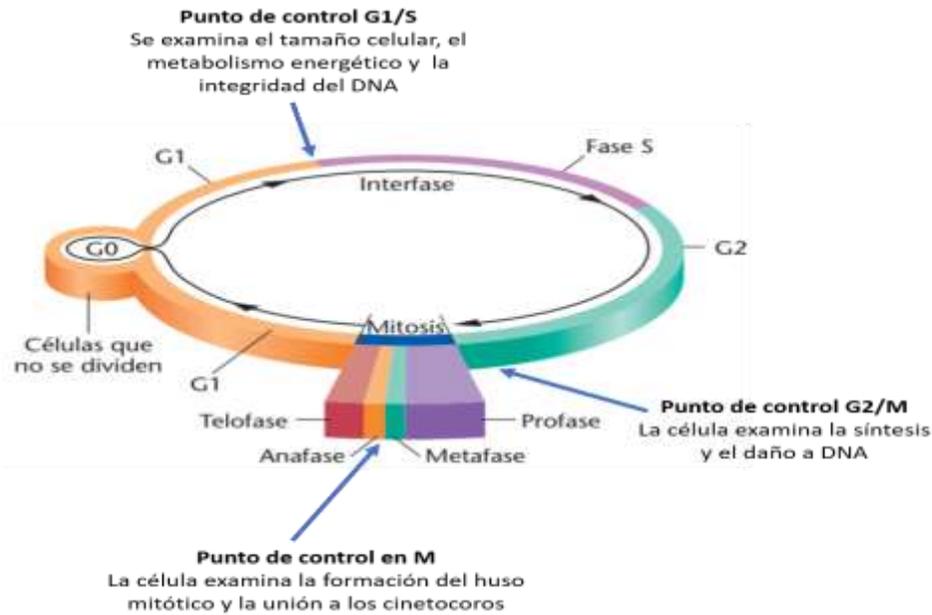


Figura 3. Representación de las fases del ciclo celular. Modificado de (Klug, Cummings, and Spencer 2006)

Regulación del ciclo celular en plantas.

El ciclo celular al ser un proceso tan complejo e importante para las células, se encuentra altamente regulado, lo que ocurre a distintos niveles: 1) transcripcional, 2) a nivel de proteínas y 3) modificaciones postraduccionales de estas.

En los organismos eucariontes, incluyendo a las plantas, los principales reguladores proteicos del ciclo celular son los complejos Ciclinas/Cinasas dependientes de ciclinas (Cyc/CDK). Los complejos Cyc/CDK controlan las diferentes transiciones de fase: G1 a S, G2 a M y metafase a anafase durante la mitosis, estos complejos se encargan de fosforilar proteínas claves en momentos específicos del ciclo celular para permitir su avance.

En el primer punto de control, durante la transición de la fase G1 a la fase S, los complejos CycD/CDK son translocados al núcleo donde fosforilan a la proteína represora RBR (Retinoblastoma related), en conjunción con complejos CycE/CDKA y, como consecuencia de la hiperfosforilación resultante, RBR es separado liberando al factor transcripcional E2F-DP, el cual queda activado para favorecer la

transcripción de genes blancos necesarios para la progresión de la fase S (Figura 5) (Jonson and Walker 1999).

El segundo punto de control se encuentra en la transición G2 a M en donde se revisa que el DNA se encuentre correctamente copiado, si el DNA tiene algún tipo de daño se induce el arresto de las células en la fase G2. En plantas se ha encontrado que el daño a DNA es percibido por proteínas cinasas que fosforilan y activan al factor represor *Suppressor Of Gamma Response 1* (SOG1), lo que genera una disminución en la expresión de factores transcripcionales MYB activadores que tienen como genes blanco proteínas necesarias para la mitosis, además se induce la expresión de proteínas represoras de complejos Cyc/CDKs, como KRPs y SIAMESE-Related, por lo que la actividad de CDKs disminuye. En adición a ello las proteínas MYB de tipo represoras se estabilizan reprimiendo por completo la expresión de Cycs y CDKs mitóticas. El conjunto de todos estos mecanismos da como resultado el arresto de las células en G2. Por el contrario, si todo el DNA se encuentra en condiciones óptimas los complejos CycB/CDKBs fosforilan a factores MYB represores y son degradados vía proteasoma, permitiendo el avance del ciclo celular (Umeda, Aki, and Takahashi 2019).

El último punto de control se encuentra en la transición de metafase a anafase en la cual las células perciben si los microtúbulos se encuentran correctamente unidos al cinetocoro de los cromosomas, de ser así el complejo promotor de anafase (APC) degrada proteínas como las ciclinas tipo B y la segurina para permitir la progresión de la mitosis (Tin Su 2001).

Cinasas dependientes de ciclina.

Las CDKs son proteínas cinasas de serina y treonina que requieren de las ciclinas para ser funcionales. En plantas existen dos tipos de CDKs involucradas en la regulación del ciclo celular, las tipo A y las tipo B, siendo estas últimas exclusivas de plantas (Inzé and Veylder 2006).

Las CDKs tipo A dentro de su secuencia primaria contienen un motivo de unión a ciclina constituido por los aminoácidos P-S-T-A-I-R-E, dada la expresión y actividad

constitutiva de CDKA y la restricción en la expresión de los genes de CDKB hasta la fase tardía de S, se puede asumir que la mayoría de la actividad de cinasa encontrada en la fase G1 es provista por los complejos de CDKA (Jager et al. 2005). Sin embargo, la unión de CDKA con distintas ciclinas varía con el avance del ciclo, por ello se sugiere que estas cinasas se encuentran involucradas en la proliferación celular (Inzé and Veylder 2006). Además, se ha observado que la actividad de CDKA no se encuentra restringida a la transición G1/S pues al asociarse a otras ciclinas como las tipo A pueden actuar en la transición G2/M (Jager et al. 2005).

Por otro lado, el grupo de CDKs tipo B contienen motivos de unión a ciclina distintos, CDKB1 contiene el motivo PPTALRE mientras que CDKB2 tiene el motivo PPTTLRE. Los genes que codifican a las CDKs tipo B están altamente regulados por lo que la expresión de CDKB1 comienza en la fase S, teniendo un pico de expresión, niveles de proteína y actividad de cinasa máxima en G2/M. Por otro lado, la expresión de CDKB2 se limita a G2 y mitosis (Jager et al. 2005).

Ciclinas de plantas.

Las ciclinas, como su nombre lo sugiere, fueron descritas como proteínas cuya abundancia fluctúa a lo largo del ciclo celular (Evans et al. 1983). Las ciclinas son necesarias para la activación de las CDKs, además, modifican su estabilidad, su localización y proveen especificidad hacia el sustrato de fosforilación (Inzé and Veylder 2006).

A través de la evolución las plantas han acumulado un mayor número de genes que codifican para distintas ciclinas, quizá con la finalidad de responder más eficientemente ante condiciones ambientales (Figura 4). En *Arabidopsis thaliana* se han reconocido hasta 10 familias de ciclinas, sin embargo, las más estudiadas son las tipo A, B y D (Wang et al. 2004).

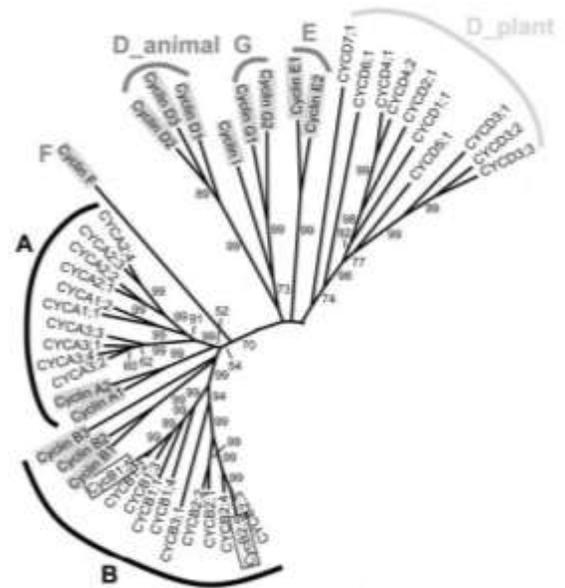


Figura 4. Comparación de ciclinas de *Arabidopsis thaliana* (sin resaltar) y animales (recuadros grises). Modificado de (Wang et al. 2004).

Las 10 ciclinas tipo A de *Arabidopsis thaliana* se asocian a CDKA durante la fase S y en la transición G2/M, por otro lado las 9 ciclinas tipo B regulan la entrada y salida de la mitosis (Wang et al. 2004).

Ciclinas tipo D

Típicamente las ciclinas tipo D se asocian con el inicio o reinicio del ciclo celular en respuesta a señales externas como fuente carbonada, fitohormonas y diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Figura 5) (Świątek et al. 2002).

Las ciclinas D contienen una región conservada de 250 aminoácidos repartidos en dos dominios: el amino terminal que corresponde a los primeros 100 aminoácidos altamente conservados, conocidos como caja ciclina amino terminal que se sabe, es la región por la cual interaccionan con las CDKs; por otro lado, el carboxilo terminal es una región menos conservada y que incluso se encuentra ausente en algunas ciclinas D. La mayoría de las ciclinas D de plantas contiene un motivo denominado LxCxE presente en el amino terminal, que sirve para interaccionar con RBR, el cual es un sustrato de fosforilación de complejos CycD/CDKA en la transición G1/S (Inzé and Veylder 2006).

La mayoría de las ciclinas tipo D se unen a CDKA para regular la transición G1/S (Inzé and Veylder 2006), sin embargo, en maíz se ha observado su asociación con CDKB (Godínez-Palma et al. 2017). En *Arabidopsis thaliana* existen 10 tipos de ciclinas D, mientras que en arroz se han reportado 14 y en maíz 17, donde todas conservan el dominio amino terminal y la caja ciclina, necesaria para la unión con CDKs (Buendía-Monreal et al. 2011).

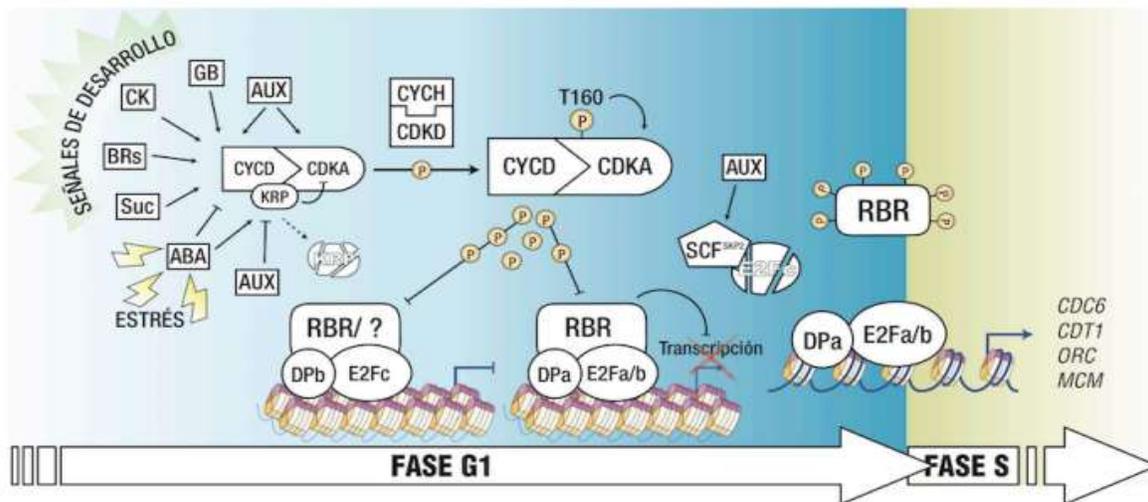


Figura 5. Regulación de la transición G1/S del ciclo celular en plantas.
Tomado de (Garza-Aguilar et al. 2014)

Regulación de complejos Cyc/CDK

Existen diferentes mecanismos que regulan la actividad de las CDKs, entre ellos se encuentran: asociación a diferentes ciclinas o a otras proteínas, ya sean inhibitoras como Proteínas relacionadas a Kip (KRPs), o moduladoras como la Subunidad reguladora de las CDKs (CKS) o pueden unirse con el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA). Otra forma de regular la actividad de los complejos Cyc/CDK es mediante modificaciones postraduccionales tales como fosforilaciones activadoras o inhibitoras, por ejemplo, para que los complejos CycD/CDKA sean activos durante la transición G1/S se requiere una fosforilación activadora en el residuo T160 y la remoción de las fosforilaciones inhibitoras en T14 y Y15 (Figura 6) (Dewitte and Murray 2003).

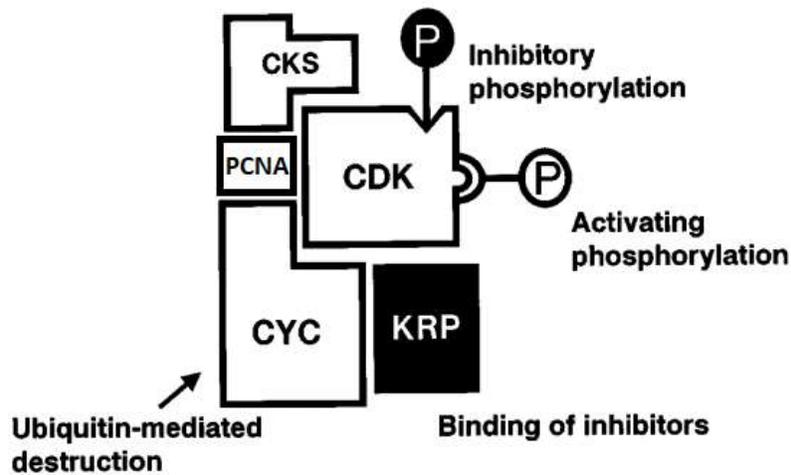


Figura 6. La actividad de las cinasas dependientes de ciclina es regulada a múltiples niveles. Modificado de (Dewitte and Murray 2003)

Antígeno Nuclear de Proliferación Celular.

El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) es una proteína altamente conservada entre especies eucariontes (Figura 7), esta proteína se encuentra presente en levaduras, plantas y animales (Stoimenov and Helleday 2009). En

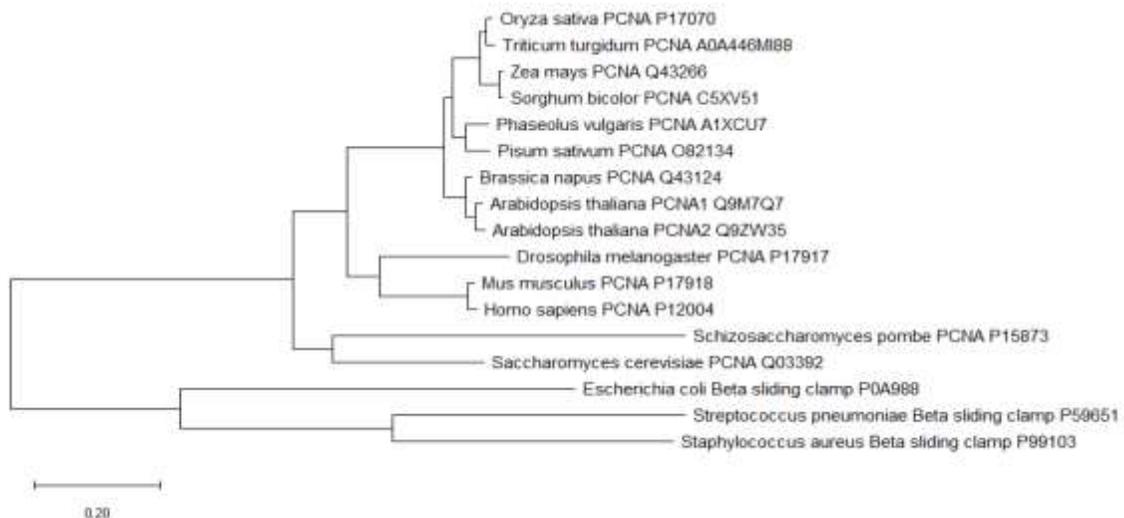


Figura 7. Árbol filogenético de la secuencia proteica de PCNA y la subunidad beta de distintas especies. Secuencias tomadas de www.uniprot.org

organismos procariontes existe una proteína homóloga funcional conocida como subunidad β la cual no tiene una secuencia proteica similar a PCNA, sin embargo, su estructura tridimensional resulta muy similar (Krishna et al. 1994). Aunque inicialmente PCNA fue descrita en pacientes con lupus eritematoso sistémico, hoy en día se conoce con mayor profundidad su función.

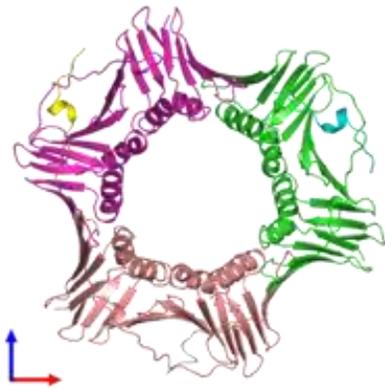


Figura 8. Estructura homotrimérica de PCNA. Tomado de (Hishiki et al. 2009)

La estructura funcional de PCNA de humano fue cristalizada desde 1994 y se determinó que tiene forma de anillo, donde el amino terminal de cada monómero se une al carboxilo terminal del siguiente mediante una región denominada connecting loop formando un homotrímero. La región del connecting loop permite mantener la orientación adecuada del anillo para su función, ya que las caras frontal y posterior no son equivalentes (Figura 8).

El diámetro externo de PCNA mide 80 Å mientras que el interno mide 30 Å y está enriquecido en aminoácidos cargados positivamente, lo cual le confiere la capacidad de interactuar con los fosfatos presentes en el DNA (Krishna et al. 1994).

En plantas la secuencia y estructura de PCNA se conserva, cada monómero de PCNA en maíz consta de 263 aminoácidos que corresponden a una masa de 29.3 kDa. Interesantemente en *Arabidopsis* existen dos proteínas PCNA, PCNA1 con una masa de 29.1 kDa y PCNA2 con 29.2 kDa, y contienen un 96.96% de identidad entre ellas, por ello en *Arabidopsis* PCNA puede formar homotrímeros o heterotrímeros (Strzalka and aggarwal 2013).

La función más estudiada de PCNA en diferentes organismos eucariontes como levaduras, animales y plantas es ser factor de procesividad para la DNA polimerasa δ , aunque también es capaz de asociarse a otras DNA polimerasas como la ϵ y las

reparativas β , λ , η , κ y ι (Vivona and Kelman 2003; Strzalka and Ziemienowicz 2010). Sin embargo, PCNA se encuentra involucrado en la regulación de múltiples procesos celulares, desde la replicación, la reparación del daño a DNA por distintos mecanismos, la cohesión de las cromátidas hermanas, la remodelación de la cromatina y el control del ciclo celular (Stoimenov and Helleday 2009; Li et al. 2018).

Se ha observado que PCNA participa en la regulación del ciclo celular al unirse a complejos Cyc/CDK que son activos, sin embargo no se conoce con claridad cuál es la función de esta interacción, sin embargo, se ha especulado de su posible implicación en el reconocimiento de sustratos específicos (Sánchez et al. 2002; Vázquez-Ramos and Sánchez 2003).

Se ha descrito que PCNA funciona como plataforma molecular al ser capaz de reclutar a distintas proteínas facilitando que éstas interactúen entre sí. Las proteínas que se unen a PCNA contienen el motivo conservado QXXZXXAA (PIP; PCNA interacting protein), donde X representa un aminoácido indistinto, Z un aminoácido alifático, ya sea L, I ó M y A un aminoácido aromático (F o Y). Existen variaciones de este motivo, por ejemplo, el motivo PIP like en el cual se puede excluir algún aminoácido aromático o la glutamina inicial. Además, existe otro motivo llamado APIM (AlkB homologue 2 PCNA interacting motif) el cual consta de los aminoácidos (K/R)-(F/Y/W)-(L/I/V/A)-(L/I/V/A)-(K/R). Algunas proteínas reguladoras del ciclo celular que contienen alguno de estos motivos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Proteínas reguladoras del ciclo celular que contienen motivos de unión a PCNA.

Organismo	Proteína	PIP	PIP like	APIM	Posición	Referencia
Mamífero	p21	QTSMTDFY			144-164	(Hara et al. 2018)
	Pol η		MQTLESFF		701-713	
	Pol ι		KGLIDYYL		446-458	
	Pol κ		KHTLDIFF		862-870	
	ZRANB3			RFLVK	1069-1078	
	ABH2			RFLVK	1-7	

	TFIIS-L			KFVIR	1-7	
	Topo II α			KFVVK	962-971	
	RAD51B			KFLAR	228-237	
Maíz	CycD2;2a		QEKI		294-297	(Gutiérrez, Quiroz-Figueroa, and Vázquez-Ramos 2005)
	CycD3;1a		QPWM		122-125	(Garza-Aguilar et al. 2019)
	CycD4;2		QEAI		280-283	(Lara-Núñez, De Jesús, and Vázquez-Ramos 2008)
	CycD5;3b			RWIIK	95-99	(Lara-Núñez, De Jesús, and Vázquez-Ramos 2008)
	CDKA1;1	QNVMEAFF			200-194	(Sánchez et al. 2002)
	CDKB1;1	QQLLHIF			247-253	(Garza-Aguilar et al. 2019)
	KRP1;1		IQEFF		210-214	(Garza-Aguilar et al. 2019)
	KRP4;2	QAFIDKY			166-172	(Garza-Aguilar et al. 2019)

Familias de proteínas inhibidoras del ciclo celular.

En mamíferos, la actividad de las cinasas dependientes de ciclina en parte es regulada por la expresión específica de proteínas inhibidoras llamadas inhibidores de CDKs (CKIs), las cuales se encuentran involucradas en procesos de diferenciación y quiescencia. A través de la comparación de secuencias primarias se han establecido dos familias de CKIs, la familia CIP/KIP y la familia INK4, estas tienen claras diferencias en su mecanismo de acción (McConnell et al. 1999).

La familia INK4 consta de las proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, estas proteínas se unen específicamente a CDK4 y CDK6 inhibiendo su actividad catalítica de forma alostérica, compitiendo por el sitio de unión de las ciclinas, lo que evita la formación del complejo Cyc/CDK y se previene la hiperfosforilación de RB, por ello esta familia promueve el arresto del ciclo celular en la fase G1 (Quereda et al. 2015).

Por otro lado, los miembros de la familia Cip/Kip son p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, todos comparten un dominio de 31 aminoácidos conocido como Dominio de Inhibición de Cinasa (KID) que se encuentra en el amino terminal de la proteína.

Estas proteínas son capaces de asociarse e inhibir a diferentes complejos Cyc/CDKs por lo que no son específicos de una fase del ciclo celular (Figura 9). Los miembros de la familia Cip/Kip

pueden inhibir la actividad de cinasa de CDK de al menos dos formas distintas, por un lado, se unen al sitio de unión a ATP de la CDK impidiendo la entrada del ATP necesario para la actividad de CDK, y por otro lado la unión de los miembros de la familia Cip/Kip con la CDK genera un cambio conformacional de la cinasa modificando el sitio catalítico (Pavletich et al. 1999).

Se ha mostrado que las proteínas Cip/Kip también pueden funcionar como ensambladores de complejo Cyc/CDKs en el citoplasma y promueven su importación nuclear ya que ni las ciclinas ni las CDKs contienen señales de

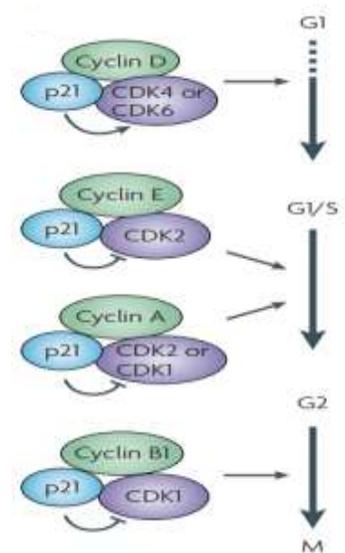


Figura 9. Inhibición de distintos complejos Cyc/CDK por miembros de la familia Cip/Kip. Tomado de (Abbas et al. 2009)

localización nuclear, además evita que sean exportadas nuevamente al citoplasma al inhibir a la exportina de complejos Cyc/CDK mNPAP60 (Coqueret, 2003).

Interesantemente, se ha sugerido que estas proteínas tienen otras funciones, además de inhibir complejos Cyc/CDK. Por ejemplo, se ha observado que p21^{Cip1} se puede asociar a PCNA en el mismo sitio que la DNA polimerasa δ por lo que se abate su capacidad de actuar como factor de procesividad, inhibiendo directamente la síntesis de DNA (Strzalka and Ziemienowicz 2010).

Las plantas no poseen a las proteínas inhibidoras de las familias Ink4 y Cip/Kip, sin embargo, se han encontrado proteínas que contienen el Dominio de Inhibición de Kinasa (KID) en el carboxilo terminal; dada la similitud de este dominio entre plantas y mamíferos se ha decidido llamar Kip Related Protein (KRP) a las proteínas de plantas (De Veylder et al. 2001). Estas proteínas se encuentran relacionadas con el arresto del ciclo celular en respuesta a estímulos internos y externos (Verkest et al. 2005).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 7 genes de KRPs (Figura 10) donde las 7 conservan el KID en el carboxilo terminal (cuadros 1 y 2, sitio de unión con CDK cuadro 1, posible sitio de unión con las ciclinas D, cuadro 2), mientras que de los demás motivos conservados no se ha determinado su función; no existe similitud en el resto de la proteína. KRP2, KRP5 y KRP6 contienen un motivo PEST que típicamente se ha asociado a un motivo de señalización para degradación vía proteasoma. KRP2, KRP4, KRP5 y KRP7 contienen una secuencia de localización nuclear. Finalmente, KRP6 y KRP7 contienen un sitio consenso para la fosforilación por CDKs (S/TPXK/R) en el extremo amino terminal (De Veylder et al. 2001). La expresión de KRPs es diferencial durante el ciclo celular, KRP3 y KRP5 muestran un pico de expresión en la fase S, KRP4 durante G2, KRP1 en la transición G2/M, KRP6 durante la transición M/G1, mientras que KRP2 y KRP7 mantiene sus niveles constantes durante todo el ciclo celular (Menges et al. 2005).

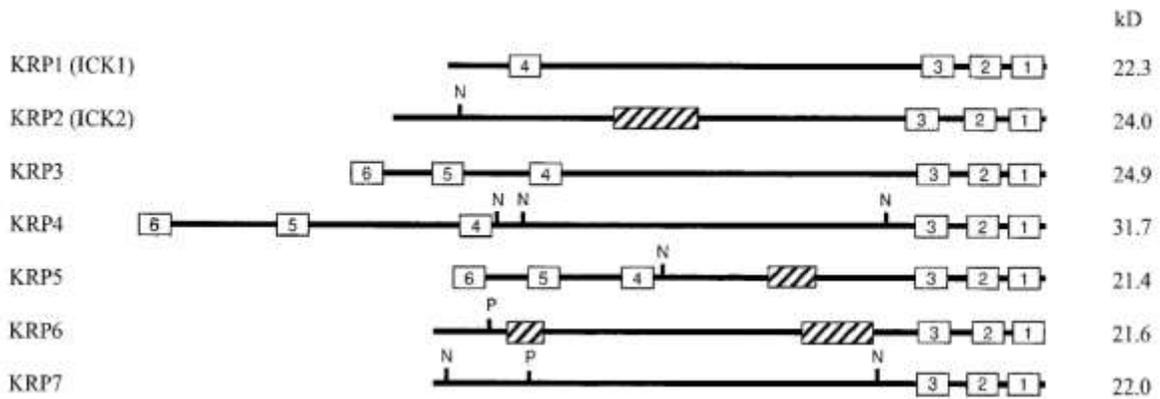


Figura 10. Organización estructural de KRPs de *Arabidopsis thaliana*. Las secuencias conservadas se indican en cuadros numerados del 1-6, cuadro 1 sitio de unión a CDK, cuadro 2 sitio de unión a Cyca D, cuadros 3-6 motivos que se desconoce su función. N, señal de localización nuclear. P, sitio consenso de fosforilación por CDK. Dominios PEST marcados en cuadros con diagonales. Tomado de (De Veylder et al. 2001).

En diferentes plantas se han encontrado genes correspondientes a KRPs que se han clasificado dentro de tres grupos; el grupo A que corresponde a KRPs presentes únicamente en plantas dicotiledóneas, el grupo B contiene KRPs exclusivas de plantas monocotiledóneas y en el grupo C se han colocado las KRPs compartidas entre plantas mono y dicotiledóneas (Godínez-Palma et al. 2017).

En maíz se han reportado 8 secuencias putativas que corresponde a KRPs, las cuales contienen diversos motivos conservados incluyendo el KID. A diferencia de las KRPs de *Arabidopsis thaliana*, solo KRP1;3 y KRP3 contienen secuencia PEST, mientras que KRP1;1, KRP1;2, KRP1;3 y KRP5;1 contienen secuencia de localización nuclear. Interesantemente todas las KRPs de maíz contienen sitios de fosforilación por CDKs (Godínez-Palma et al. 2017).

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que las KRPs son capaces de inhibir la actividad de cinasa de complejos Cyca D/CDKs (Godínez-Palma et al. 2017; De Veylder et al. 2001; Nakai et al. 2006). Además, al igual que los miembros de la familia CIP/KIP, se ha observado que son capaces de unirse a CDKs en el citoplasma y facilitar su transporte hacia el núcleo (Zhou et al. 2006; Bird et al. 2007; Boruc et al. 2010).

Por otro lado, se ha visto que las KRPs son sustrato de fosforilación de diversos complejos Cyc/CDK en *Arabidopsis* y en maíz. Dependiendo del sitio donde se coloque la fosforilación, las KRPs son marcadas para degradación vía proteasoma o bien pueden activarse e inhibir a complejos CycD/CDKs con mayor facilidad (Verkest et al. 2005; Godínez-Palma et al. 2017).

Por otro lado, existe una familia de inhibidores de CDKs en plantas conocidos como SIAMESE-RELATED (SMR), los cuales se asocian e inhiben a diferentes complejos Cyc/CDKs en *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa*. Estas proteínas se descubrieron a través de sus funciones que favorecen la progresión de una versión modificada del ciclo celular conocida como endoreduplicación en *Arabidopsis*. Por otro lado, SMR5 y SMR7 inhiben la división mitótica en respuesta al daño a DNA (Kumar et al. 2015).

Se han encontrado 17 miembros de SMR en *Arabidopsis*, de forma *in vitro* se ha demostrado que pueden inhibir la actividad de cinasa de CDKA1 y de CDKB1;1 mostrando que son inhibidores reales de CDKs. Además, la sobreexpresión de SMRs en plantas transgénicas solo suprime la mitosis sin suprimir la replicación del DNA (Kumar et al. 2015).

No se conoce el mecanismo por el cual las SMR inhiben la actividad de cinasa de las CDKs, sin embargo se sabe que contienen un motivo de unión a CDKs, dos secuencia redundantes de localización nuclear y un sitio putativo de unión a ciclinas conservado entre las KRPs, el cual no es requerido para la función de inhibición de las SMRs (Kumar et al. 2015).

Antecedentes directos

Ya que el maíz es una especie de gran relevancia agrícola en México, se ha empleado como modelo biológico de estudio. Se sabe que la proliferación de las células presentes en los ejes embrionarios de maíz durante la germinación es asincrónica, por lo cual es complicado establecer con claridad la temporalidad de las fases del ciclo celular, sin embargo, se ha determinado que la mayoría de las células en el embrión seco se encuentran en la etapa G1, tras las primeras 12 h de imbibición comienza la fase S y después de las 24 h se pueden observar las primeras figuras mitóticas (Sánchez et al. 2004).

El grupo de investigación se ha centrado en tratar de entender la regulación del ciclo celular, el cual es vital para que las semillas puedan germinar y establecer la planta, esto con la finalidad de preservar la especie. Un punto clave para la regulación del ciclo celular son las interacciones proteína-proteína, por lo que durante las últimas dos décadas se han realizado diferentes estudios sobre las interacciones entre las principales proteínas reguladoras del ciclo celular como CDKs, ciclinas, KRPs y PCNA.

Se sabe que PCNA se encuentra asociado en complejos con ciclinas D de maíz. Se han reportado asociaciones de PCNA con CycD2;2, CycD3;1, CycD4;2 y CycD5;3 (Lara-Núñez, De Jesús, and Vázquez-Ramos 2008; Becerril et al. 2012; Gutiérrez, Quiroz-Figueroa, and Vázquez-Ramos 2005), Garza-Aguilar tesis de doctorado, 2018). De estas asociaciones solo con CycD3;1 se ha probado que está presente a lo largo de la germinación de maíz (Garza Aguilar, Tesis de doctorado, 2018), mientras que con CycD4;2, PCNA se encuentra en la cromatina a distintas horas de germinación (Martínez Mata, Tesis de licenciatura, 2011). Además, por ensayos de interacción *in vitro* con proteínas recombinantes se demostró que PCNA es capaz de interactuar directamente, con CDKB1;1, KRP1;1 y KRP4;2 (Lemus, tesis de licenciatura 2019).

Mediante ensayos de exclusión molecular se determinó que PCNA es capaz de co-eluir con complejos de diferentes masas moleculares que cambian a lo largo de la germinación. En estos complejos están presentes las proteínas CDKA, CDKB1;1 y

CycD3;1, (Garza-Aguilar et al. 2019). Adicionalmente, se sabe que los complejos de PCNA/CDKA son activos a lo largo de la germinación al fosforilar un sustrato fisiológico como la proteína RBR (Sánchez et al. 2002).

Por otro lado, se ha estudiado a la familia de inhibidores de CDKs (KRPs). La expresión y la acumulación de KRPs no cambian durante las primeras 24 h de imbibición de ejes embrionarios de maíz (de Jesús Juárez et al. 2008). La expresión de KRP1;1 y KRP4;2 no varía a lo largo de la germinación. KRP1;2, KRP1;3, KRP3 y KRP4;1 no se encuentran presentes en los ejes de semilla seca y solo se observa su expresión tras 24 h de imbibición, sin embargo, en células de tejidos diferenciados su expresión está presente (Godínez-Palma et al. 2017).

A nivel de proteína, no se tiene registro de la acumulación de cada KRP por separado a lo largo de la germinación de maíz, sin embargo, se ha visto que KRP1;1 interacciona directamente con CDKA, CycD2;2 y CycD6;1 mientras que KRP4;2 interacciona con CDKA y CycD2;2 pero no con CycD6;1, lo cual indica la especificidad de las KRPs y que su papel no es redundante (Godínez-Palma et al. 2017). Además, se probó su efecto sobre la actividad de cinasa asociada a diferentes complejos y se mostró que las KRPs son capaces de inhibir la actividad de cinasa asociada a CycD2;1, a p13^{Suc1} y a PCNA de forma diferencial (de Jesús Juárez et al. 2008).

En otro estudio se demostró que se requieren diferentes cantidades de KRP1;1 y KRP4;2 para inhibir la actividad de cinasa asociada a CycD2;2, CycD4;2, CycD5;3 y CycD6;1, (Godínez-Palma et al. 2017).

Por otra parte, en el grupo de investigación, se ha reportado que mediante ensayos de pull down empleando extractos proteicos de ejes embrionarios de maíz y usando como proteína de anclaje la proteína p13^{Suc1}, se pueden obtener complejos de CDKA, CDKB1;1 o CycD3;1, esto debido a que p13^{Suc1} es un análogo de las proteínas Cyclin-dependent kinases regulatory subunit (CKS) de plantas, las cuales tienen afinidad por las cinasas dependientes de ciclinas. Mediante esta técnica es posible observar a otras proteínas que se encuentren interactuando con las CDKs

como las ciclinas u otras proteínas reguladoras (Axosco, Tesis de licenciatura, 2014).

Justificación

El antígeno nuclear de proliferación celular es una proteína clave para la progresión del ciclo celular. Se ha mostrado que PCNA es capaz de asociarse a proteínas reguladoras del ciclo celular como CDKs, CycDs, y KRPs tanto *in vitro* como *in vivo*, donde los complejos CDKA/PCNA son activos a lo largo de la germinación de maíz, además se ha observado que PCNA se encuentra en complejos de diferentes masas moleculares que varían durante la germinación, por lo que será importante demostrar la posible formación de diferentes complejos PCNA/CycDs/CDKs a lo largo de la germinación de maíz en los cuales podrían estar presentes las KRPs; será también relevante determinar el efecto inhibitorio de las KRPs sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA en la germinación de maíz.

Hipótesis

La asociación de PCNA con diversas CycDs será diferencial a lo largo de la germinación. Por otro lado, las proteínas KRP1;1 y KRP4;2 tendrán un efecto inhibitorio diferencial sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA a lo largo de la germinación de maíz.

Objetivo general

Identificar la asociación de PCNA con Cycs D y CDKs en la germinación de maíz y determinar el efecto de las KRPs sobre la actividad cinasa asociada a PCNA a lo largo de la germinación de maíz.

Objetivos particulares

- Corroborar la abundancia de PCNA a lo largo de la germinación de maíz.
- Mostrar la presencia de trímeros y dobles trímeros de PCNA en la germinación de maíz.
- Determinar la asociación de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular.

- Determinar si las asociaciones de PCNA con proteínas reguladoras del ciclo celular varían a lo largo de la germinación.
- Mostrar la actividad de cinasa asociada a PCNA en la germinación.
- Mostrar el efecto de KRP1;1 y KRP4;2 sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA en la germinación.

Metodología

Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida como se indica en la tabla 3, se colocaron en una cámara para electroforesis con 1L de buffer de electrodos (TRIS-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%), se cargaron las muestras proteicas desnaturalizadas a 85°C en buffer de carga (TRIS-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol y β mercaptoetanol 100 mM) y se separaron por 90 min a 100 V.

Gel concentrador		Gel separador	
H ₂ O	2.52 mL	H ₂ O	3.5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.81 mL	Acrilamida/Bisacrilamida 30%	4.0 mL
TRIS-HCl 1.0 M pH 6.8	1.66 mL	TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	50 μ l	SDS 10%	100 μ l
Persulfato de amonio 10%	50 μ l	Persulfato de amonio 10%	100 μ l
TEMED 99.5%	5 μ l	TEMED 99.5%	8 μ l

Western Blot

Los geles obtenidos tras la electroforesis SDS-PAGE se colocaron en una cámara húmeda de transferencia con membranas de Immobilon-P^{SQ} (Merck Millipore) con tamaño de poro de 0.2 μ m y 1L de buffer de transferencia (TRIS-HCl 25 mM, Glicina 192 mM pH 8.3). Las muestras se transfirieron a 60 V y 350 mA por 1h. Las

membranas se bloquearon por 1h a temperatura ambiente en agitación con una solución al 3% de leche semi descremada en PBS 1X. El PBS se diluyó 1:10 partiendo de un stock 10X (NaCl 1.30 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 18 mM pH 7.4), agregando 1% de tween y 400mM NaCl extra. Se retiró la leche y posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo respectivo en el título mostrado en la tabla 4 en una solución de leche semidescremada al 3%, toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-tween-NaCl por 10 min cada uno, se incubaron con anticuerpo secundario (Jackson Immuno Research) (1:15000) o Clean Blot (Thermo Scientific) para los ensayos de inmunoprecipitación (1:500) por 3h a 4°C en agitación. Para la detección se empleó el fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad).

Tabla 4. Título de anticuerpos empleados		
Anticuerpo	Título	Observaciones
α-PCNA	1:1000	
α-CDKA	1:500	
α-CDKB	1:500	
α-CycD3;1	1:500	
α-CycD4;2	1:500	
α-CycD5;3	1:500	La incubación del anticuerpo primario se realizó con una solución de leche semidescremada al 3% con PBS + tritón al 0.1% y los lavados se realizaron únicamente con PBS.
α-CycD6;1	1:500	

Imbibición de ejes embrionarios de maíz

Con ayuda de una navaja se extrajeron los ejes embrionarios de semillas secas de maíz variedad Chalqueño y se retiró el excedente de endospermo. Los embriones fueron desinfectados con NaClO al 0.2% en agitación constante por 5 minutos, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua desionizada estéril, se colocaron en papel filtro estéril para remover el exceso de agua. Se colocaron 30 ejes por

tratamiento con buffer de imbibición (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 % w v⁻¹ sacarosa, 10 mM MgCl₂) y se incubaron por 0, 6, 12, 18, 24 o 36 h en oscuridad a 25°C.

Extracción de proteína total

Ejes embrionarios embebidos, se molieron en morteros congelados hasta la obtención de una masa homogénea, se agregaron 3 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 70 mM pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, KCl 25 mM, Na₂EDTA*2H₂O 5 Mm pH 8.0, sacarosa 250 mM, β-mercaptoetanol 15 mM, tritón 0.2%, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y una tableta de inhibidores de proteasas complete (Roche), se colocó en tubos ependorff y se centrifugaron a 12000 rpm por 30 min a 4°C. Se recolectó la fase soluble y se volvieron a someter a otra ronda de centrifugación, nuevamente se recolectó la parte soluble, se alicuotó y cuantificó mediante el método de Bradford.

Ensayo de entrecruzamiento

Se colocaron 60 µg de extracto proteico de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 y 24h en tubos ependorff, se agregó 1.5 % de formaldehído y se incubó a temperatura ambiente por 90 min. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción añadiendo buffer de carga-SDS y se prepararon para electroforesis de acrilamida.

Ensayo de competencia

Anticuerpo anti-PCNA se incubó toda la noche a 4°C con 50 µg de proteína recombinante His-PCNA o 50 µg de BSA como proteína no competidora. Se realizó un western blot con extractos proteicos entrecruzados y se efectuó la inmunodetección con los anticuerpos competidos.

Preparación de columnas de afinidad

Se realizó la sobreexpresión de la proteína recombinante GST-p13^{Suc1} con IPTG (0.1 mM) a partir de un cultivo de bacterias *E. coli* BL21 con una densidad óptica de 0.6 en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Se centrifugó a 6000 rpm por 5 min a 4°C, el pellet se resuspendió en PBS, se agregó lisozima (1 µg/mL) y se incubó por

30 min en hielo. Se sónico por 5 ciclos de 20 s encendido y 20 s apagado, a una amplitud de 20%. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C y la fracción soluble se clarificó por filtración (Poro 0.45 µm). El filtrado se incubó con 1 mL de resina Glutación Sefarosa 4B (GE Healthcare) por 1 h a 4°C en agitación, se lavó 4 veces con PBS y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Ensayos de interacción de proteínas: Pull-Down

Se añadieron extractos proteicos (500 µg) de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos de germinación a las perlas con proteína recombinante GST-p13^{Suc1}-glutathione-sepharose, la mezcla se incubó 4 horas a 4°C en un agitador rotatorio. Después de la incubación, se retiró el sobrenadante y las perlas fueron lavadas cinco veces con PBS. Los complejos proteicos se eluyeron con glicina 0.2 M, pH 2.0. Finalmente, las muestras se neutralizaron con cristales de TRIS, se añadió buffer de carga para SDS-PAGE y se calentaron a 85°C, se realizó la electroforesis y ensayos de Western blot con las muestras obtenidas.

Inmunoprecipitación

Se conjugaron por 3 h a 4°C 5 µL de anticuerpo α-PCNA o α-KRP con 20 µL de proteína A magnetizada (Millipore), agregando 450 µL de PBS con inhibidores (Benzamidina 1mM y PMSF 1mM). Se realizó un lavado y se agregó 500 o 1500 µg de extracto proteico, se incubó toda la noche en agitación a 4°C. Los inmunocomplejos se recuperaron empleando un rack magnético y se lavaron 3 veces con PBS. Una vez obtenidos los complejos se emplearon para ensayo de actividad de cinasa o para western blot agregando buffer de carga-SDS.

Ensayo de actividad de cinasa

Los complejos obtenidos mediante inmunoprecipitación se lavaron con 450 µl de buffer de cinasa (Tris-HCl 70 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, EGTA 5 mM, ATP 20 µM). Posteriormente, se incubaron con 20 µl de buffer de cinasa con 4 µCi de [γ-³²P] ATP por 30 min a 30°C. Como sustrato de fosforilación se empleó 1µg de histona H1 recombinante (BioLabs). Las reacciones se detuvieron agregando buffer de carga-SDS. Las muestras se desnaturalizaron a 85°C por 5

min y se separaron mediante un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. Tras la electroforesis se enjuagaron los geles para retirar el exceso de SDS, se tiñeron con Azul Coomassie por 10 min y se dejaron desteñir en agua toda la noche. Los geles se secaron al vacío a 80°C durante 1.5 h y luego se expusieron durante 48 h a la placa de detección de Europio (Kodak). La detección se realizó escaneando la placa de Europio utilizando el equipo Personal Imager FX (Bio-Rad).

En los ensayos de inhibición de actividad de cinasa, los complejos se preincubaron con roscovitina (20 µg), GST-KRP1;1 o GST-KRP4;2 (5 µg) durante 30 min a 30°C antes de la incorporación de [γ -³²P] ATP y se prosiguió como en los ensayos anteriores.

Resultados.

Abundancia proteica y estructura fisiológica de PCNA.

Se ha reportado que en la germinación de maíz la acumulación proteica de PCNA se incrementa gradualmente desde las 0 h hasta las 15-20 h después de la imbibición, tras lo cual se mantiene constante (Herrera et al. 2000); para comprobar esto, se realizó un ensayo de Western blot empleando extractos proteicos totales de ejes embrionarios de maíz embebidos a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18 y 24 h). Como puede observarse en la Figura 11A, el anticuerpo anti-PCNA es capaz de reconocer dos bandas donde una corresponde a la masa teórica de la proteína (29 kDa), que parece aumentar gradualmente y establecerse después de las 12 h de germinación de forma similar a lo reportado, mientras que la otra banda corresponde a una proteína de 31 kDa, la cual podría tratarse de alguna forma modificada postraduccionalmente de PCNA.

La literatura muestra que la forma funcional de la proteína PCNA es un trímero (Naryzhny, Zhao, and Lee 2005; Strzalka and aggarwal 2013). Para mostrar en el sistema de estudio la presencia de dicha estructura a lo largo de la germinación, se realizó un ensayo de entrecruzamiento, empleando como agente entrecruzante formaldehído al 1.5% en extractos totales de 0, 12 y 24 h de germinación, posteriormente se realizó un western blot (Figura 11B) en el cual se observó la

presencia de 3 bandas que corresponden a masas de 29, 87 y 174 kDa, las cuales corresponden con las masas teóricas del monómero, el trímero y un posible doble trímero de PCNA respectivamente. Para comprobar que las bandas detectadas por el anticuerpo corresponden a formas de PCNA, se realizó un ensayo de competencia (Figura 11C), el cual muestra una disminución en el reconocimiento de estas bandas únicamente en el carril en el cual se colocó el anticuerpo competido con su antígeno (His-PCNA), esto muestra que las bandas inmunodetectadas corresponden a formas de PCNA. Como control de carga se muestra la membrana teñida con rojo de Ponceau.

PCNA y KRP co-purifican con complejos CDK/CycD.

Previamente se ha mostrado mediante ensayos de Pull Down empleando como proteína de anclaje a p13^{Suc1} proveniente de *Schizosaccharomyces pombe*, que es posible obtener complejos proteicos que contienen CDKA, CDKB y CycD3;1 a lo largo de la germinación de maíz (Axosco Marín, tesis de licenciatura, 2014), por lo que se decidió indagar si en estos complejos están presentes KRPs y PCNA, proteínas que se sabe pueden interactuar con proteínas reguladoras del ciclo celular (Godínez-Palma et al. 2017; Herrera et al. 2000; Sánchez et al. 2002; Lara-Núñez, De Jesús, and Vázquez-Ramos 2008). Para ello se corroboró que el vector pGEX-4T2 contiene como inserto al gen *suc1*, mediante un ensayo de restricción, empleando las enzimas *BamHI* y *NotI* que reconocen sus secuencias blanco en el sitio de clonación múltiple del vector por lo que se obtuvieron dos bandas, una de 4332 pb correspondiente al vector vacío y otra de 266 pb correspondiente al gen *suc1*. También se realizó otro ensayo de restricción, empleando las enzimas *BamH* y *XbaI*, donde esta última escinde al gen *suc1* obteniendo dos bandas de 4800 pb y 226 pb respectivamente (Figura 12A). Finalmente, la construcción fue secuenciada en las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la UNAM, mostrando que el gen *suc1* se encuentra en el vector y que la secuencia es correcta (Anexo 1).

Una vez que el plásmido fue verificado, se produjo la proteína recombinante p13^{Suc1}, para ello, se transformaron células de *E. coli* BL21 y se dejaron crecer hasta una

densidad óptica de 0.6. Posteriormente se realizó la inducción de la proteína recombinante con IPTG. La figura 12B muestra una banda correspondiente a la sobreexpresión de la proteína recombinante GST-p13^{Suc1} en una masa de 34 kDa. Esta proteína fue purificada por afinidad y en la figura 12C se muestra las distintas fracciones del proceso de purificación. Finalmente, la proteína se utilizó para la construcción de una columna de afinidad con GST-p13^{Suc1} unida a la resina Glutati6n-Sefarosa.

Tras la construcci6n de la columna de afinidad se realizaron los ensayos de Pull Down, con la finalidad de mostrar la asociaci6n de PCNA y KRPs con las CDKs que se asocian a p13^{Suc1}. Para ello se emplearon extractos proteicos de ejes embrionarios de ma6z embebidos por 0, 6, 12, 18, 24 y 36 h. Como se muestra en la figura 13A, PCNA y KRP co-purifican con los posibles complejos CDKs/Cyc a lo largo de la germinaci6n, lo cual sugiere la interacci6n de estas prote6nas, as6 como la formaci6n de distintos complejos.

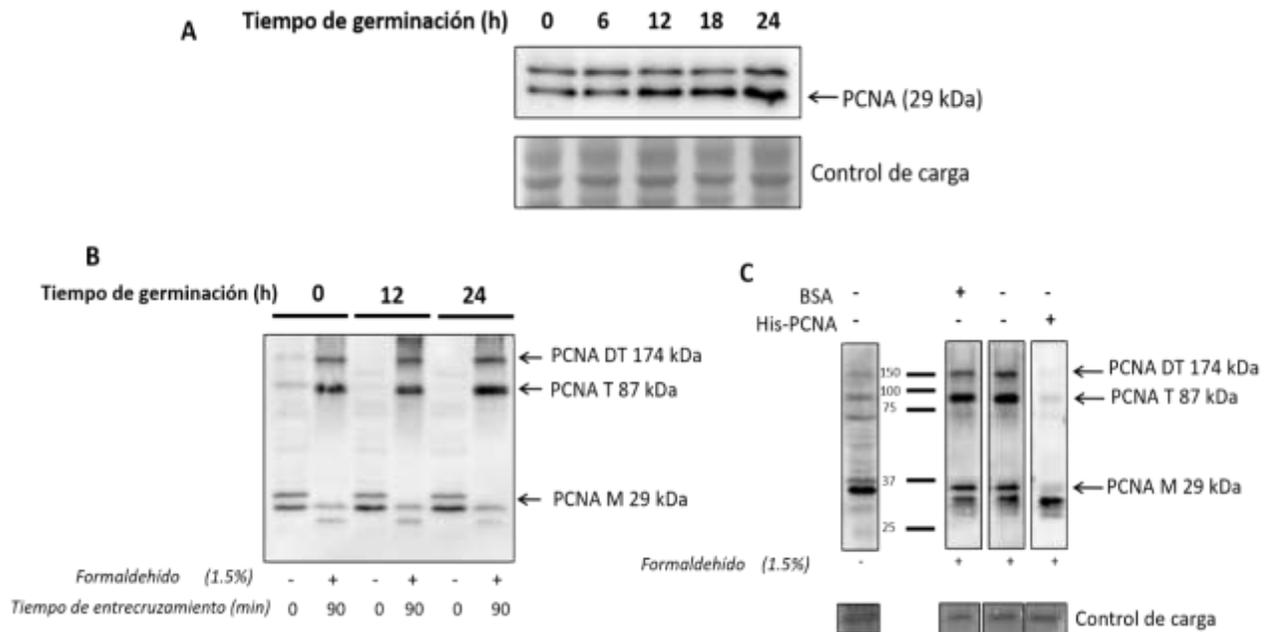


Figura 11. Abundancia proteica y estructura fisiol6gica de PCNA. (A) Western blot inmunodetectando a PCNA de extractos proteicos totales de ejes embrionarios de ma6z embebido por 0, 6, 12, 18 y 24 h. Como control de carga se muestra el gel te6ido con Azul Coomassie (B) Ensayo de entrecruzamiento con formaldeh6do 1.5% empleando extractos de 0, 12 y 24 h de imbibici6n. (C) Ensayo de competencia con extractos entrecruzados con formaldeh6do, la inmunodetecci6n se realiz6 con anticuerpo anti-PCNA competido con 50µg de His-PCNA recombinante o con BSA. Se muestra la disminuci6n de la se6al en las bandas correspondientes al mon6mero, al tr6mero y al doble tr6mero de PCNA. Como control de carga se muestran las membranas te6idas con Rojo de Ponceau.

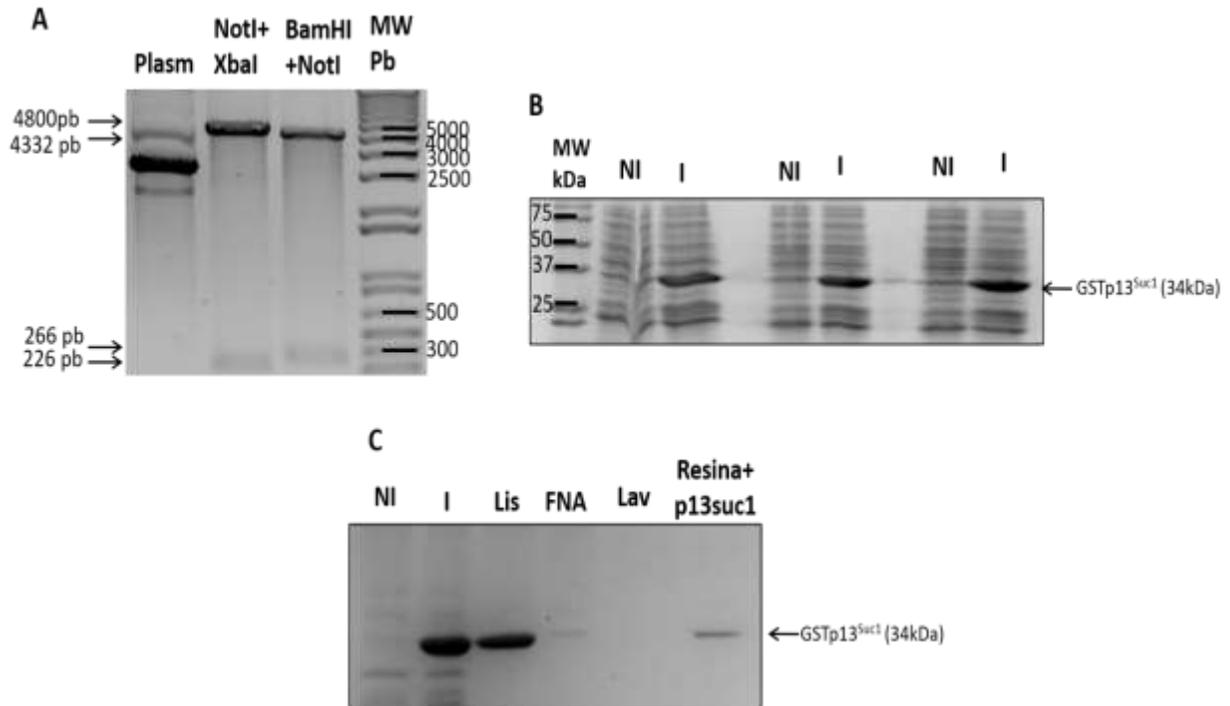


Figura 12. Construcción de columna de afinidad empleando como proteína de anclaje a p13^{Suc1}. (A) Ensayo de restricción empleando plásmido pGEX-4T2 y las enzimas indicadas en cada carril, se muestran las bandas correspondientes al inserto y al vector abierto. Plasm, plásmido; MW marcador de masa en pares de bases. (B) Ensayo de inducción empleando 0.1 mM de IPTG en células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector. Se muestra el gel con 3 cultivos independientes teñido con Azul Coomassie. Se observa una banda inducida en la masa correspondiente a GST-p13^{Suc1} (34kDa). NI, proteínas de células no inducidos; I, proteínas de células inducidas; MW, marcador de masa molecular en kDa. (C) Gel de purificación de GST-p13^{Suc1}. NI, proteínas de células no inducidas; I, proteínas de células inducidas; Lis, proteínas de las células lisadas; FNA, fracción no adsorbida en la columna; Lav, lavado final; Resina + p13^{Suc1}, resina con p13^{Suc1} adsorbido empleada en los siguientes experimentos.

PCNA co-precipita con CDKA, CDKB1;1, CycD y KRPs.

Se ha observado que PCNA es capaz de interactuar con una gran cantidad de proteínas involucradas en diversos procesos fisiológicos, por ejemplo la replicación del DNA (Bravo et al. 1987; Acharya et al. 2011), la reparación del DNA, en el proceso de la glucólisis, así como con proteínas reguladoras del ciclo celular (Strzalka and Ziemienowicz 2010; Acharya et al. 2011; Leung et al. 2018; Naryzhny and Lee 2010). Para mostrar que PCNA puede asociarse a complejos con proteínas reguladoras del ciclo celular en maíz, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación empleando anticuerpo anti-PCNA en una mezcla de extractos proteicos de ejes

embrionarios embebidos por 0, 12 y 24 h. Para los ensayos de western blot se emplearon anticuerpos específicos para el reconocimiento de las proteínas de interés CDKA, CDKB1;1, CycD3;1, CycD4;2, CycD5;3, CycD6;1, KRP y PCNA (Figura 13B); en este ensayo se encontró que todas las proteínas mencionadas arriba son capaces de co-inmunoprecipitar con PCNA, lo cual sugiere que estas proteínas reguladoras del ciclo celular podrían encontrarse en distintos complejos con PCNA. A pesar de que se desconoce la avidéz de los anticuerpos por sus antígenos, pareciera existir interacciones menos favorecidas entre PCNA y CycD4;2, así como con CycD5;3.

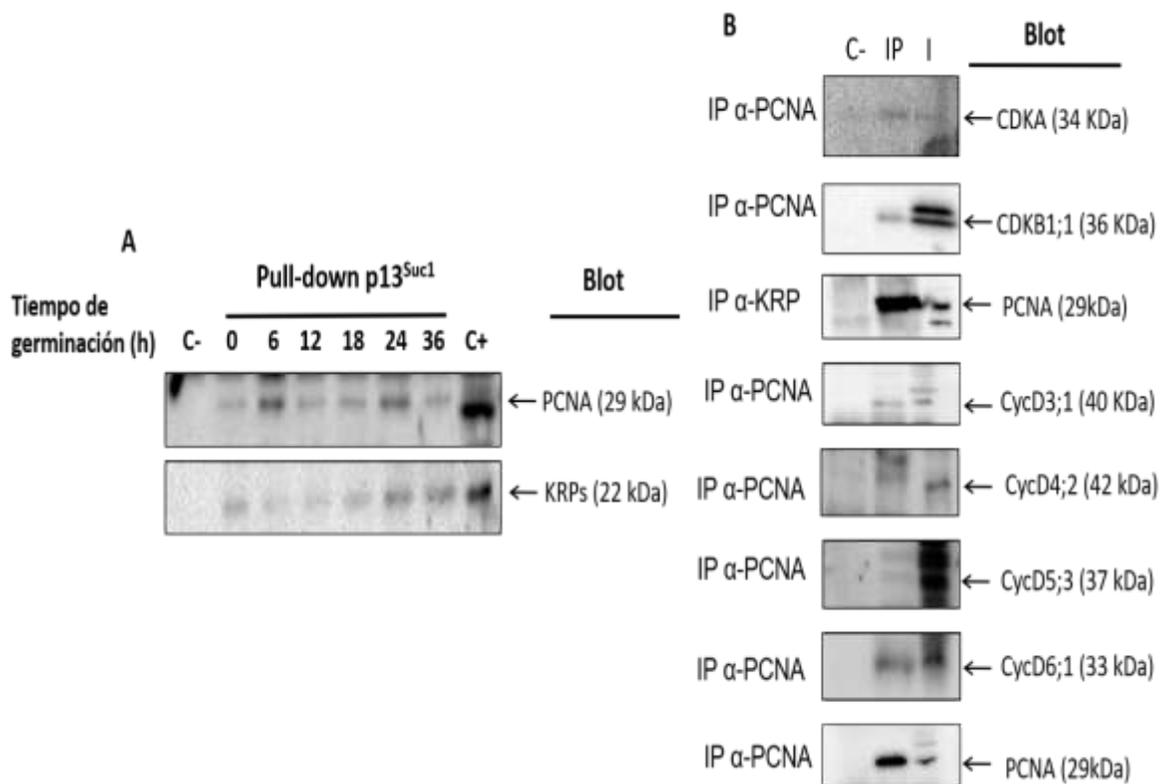


Figura 13. PCNA se asocia a complejos CDK/CycD y KRPs. (A) Ensayo de Pull Down empleando como proteína de anclaje a p13^{Suc1} en extractos totales de maíz embebidos por 0, 6, 12, 18, 24 o 36 h. C- perlas de la columna de afinidad sin extracto proteico de maíz; C+ extracto proteico total de ejes embrionarios de maíz. (B) Inmunoprecipitados empleando anticuerpo Anti-PCNA o Anti-KRP en una mezcla de extractos de 0, 12 y 24 h. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos Anti-CDKA, Anti-CDKB1;1, Anti-PCNA, Anti-CycD3;1, Anti-CycD4;2, Anti-CycD5;3 y Anti-CycD6;1. C- Resina + anticuerpo sin extracto proteico; IP, inmunoprecipitado; I, input extracto proteico de maíz. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Las asociaciones de PCNA con CDKA, CDKB1;1 y CycD son diferenciales en la germinación de maíz.

Para estudiar los complejos presentes de PCNA con proteínas del ciclo celular a lo largo de la germinación, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación empleando anticuerpo anti-PCNA. Se puede observar en la figura 14 que CDKA y CDKB1;1 muestran patrones diferenciales de asociación con PCNA. Con CDKA la asociación no varía en las primeras 12 h de imbibición y se produce un incremento notable a las 18 h, mientras que a las 24 h la asociación disminuye. Por otro lado, la asociación de PCNA con CDKB1;1 es alta en la semilla seca y disminuye a lo largo de la germinación, observando la menor asociación a las 6 y 24 h. La interacción de PCNA con Cycs D también muestra patrones diferenciales; la asociación de PCNA con CycD3;1 es baja a las 0, se incrementa a las 6h y disminuye hacia las 18 h. La asociación de CycD4;2 y PCNA es mínima a las 0 y se incrementa posteriormente hasta las 24 h, donde la asociación es mayor. CycD5;3 se asocia a PCNA de forma similar a CDKB1;1, es decir, su asociación es alta en semilla seca y disminuye a lo largo de la germinación. Por último, la asociación de CycD6;1 con PCNA parece mantenerse a niveles constantes a lo largo de la germinación (Figura 14).

Como control se determinó la cantidad de PCNA inmunoprecipitada y se observa que los niveles son los mismos a lo largo de la germinación (Figura 14).

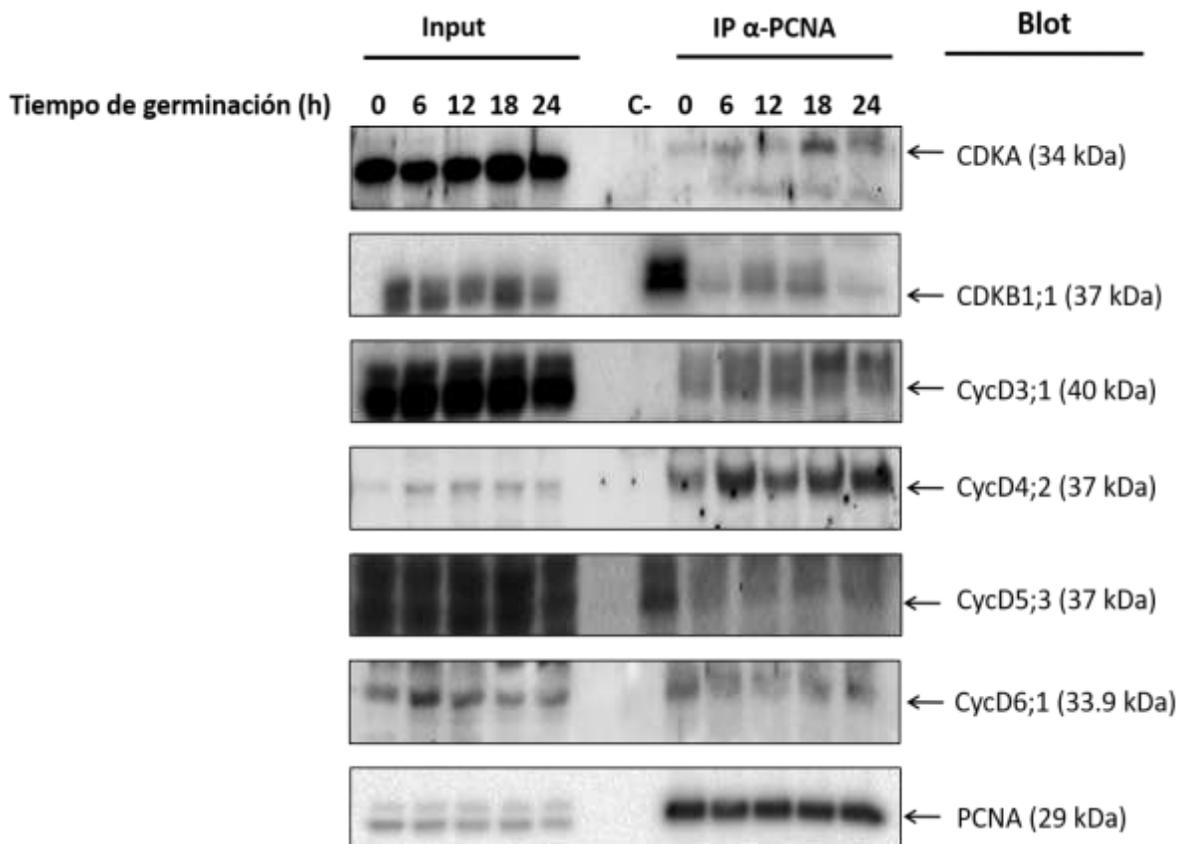


Figura 14. Asociación de PCNA con CDKA, CDKB1;1 y Cycs D es diferencial en la germinación de maíz. Ensayo de inmunoprecipitación empleando anticuerpo anti-PCNA con extractos proteicos de ejes embrionarios a lo largo de la germinación de maíz. La inmunodetección se realizó con anticuerpos específicos anti-CDKA, anti-CDKB1;1, anti-PCNA, anti-CycD3;1, anti-CycD4;2, anti-CycD5;2 y anti-CycD6;1. C- Resina + anticuerpo sin extracto proteico; IP, inmunoprecipitado; Input, extracto proteico de maíz. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La actividad de cinasa asociada a PCNA es inhibida por KRP1;1 y KRP4;2 durante la germinación de maíz.

Para corroborar la asociación de PCNA con KRPs, observada previamente (figura 13A), se realizaron también ensayos de inmunoprecipitación empleando anticuerpos anti-KRP con extractos proteicos de 0, 12 y 24 h de germinación y se realizó un western blot empleando para la detección anticuerpos anti-PCNA; como se observa en la figura 15A, esta asociación se mantiene a lo largo de la germinación.

Estudios previos han mostrado la existencia de complejos Cycs/CDKs activos asociados a PCNA en la germinación (Sánchez et al. 2002). En este trabajo se ha mostrado que PCNA se asocia a Cycs D, CDKA, CDKB1;1 y KRPs, lo cual sugiere la formación de diversos complejos PCNA/CycD/CDKs que podrían ser activos.

Para corroborar lo anterior, se estudió la actividad de cinasa asociada a PCNA visualizando la incorporación de ^{32}P a histona H1, el cual es un sustrato de complejos Cycs/CDKs (Harashima and Schnittger 2012; Sánchez et al. 2002), empleando como fuente de cinasa un inmunoprecipitado de PCNA de extractos proteicos de ejes embrionarios de 0, 12 y 24 h de imbibición. La figura 15B muestra que complejos con actividad de cinasa asociados a PCNA fueron capaces de fosforilar a histona H1. Para corroborar que la actividad observada proviene de una CDK, se agregó un inhibidor específico de CDKs, roscovitina (20 μM), el cual es un análogo de ATP por lo que compite con el sitio activo de las CDKs (Jimenez-Macedo et al. 2006; Nakai et al. 2006). En la figura 15B se muestra que la inhibición de la actividad de cinasa asociada a PCNA por la presencia de roscovitina es de 36%, lo que sugiere que la actividad de cinasa asociada a PCNA es proveniente de una cinasa del tipo CDK.

Por otro lado, se midió la actividad de cinasa asociada a PCNA en extractos de 0, 12 y 24 h de imbibición (Figura 15C, primeros 3 carriles), mostrando que los complejos Cyc/CDK asociados a PCNA son activos a lo largo de la germinación. En mamíferos se sabe que un inhibidor fisiológico de CDKs como p21 es capaz de interactuar con PCNA, lo cual tiene un efecto en su asociación con otras proteínas (Strzalka and Ziemienowicz 2010). En plantas no hay reportes que muestren la asociación de proteínas inhibitoras de CDKs (KRPs u otras) con PCNA y el efecto sobre los complejos Cycs/CDKs asociados a PCNA. En este trabajo se mostró la asociación de PCNA con KRPs; sin embargo, se desconoce el efecto de las KRPs sobre la actividad cinasa asociada a PCNA.

Para determinar el efecto de KRPs sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA, se realizaron ensayos de actividad, empleando como fuente de cinasa inmunoprecipitados de PCNA de extractos de 0, 12 o 24 h de imbibición a los que

se les agregaron 5µg de KRP1;1 o KRP4;2 recombinante. Como puede observarse en la figura 15C, ambas KRPs son capaces de inhibir la actividad de cinasa asociada a PCNA, también se puede observar que el nivel de inhibición cambia a lo largo de la germinación y que KRP1;1 es un inhibidor más potente que KRP4;2. En inmunoprecipitados de extractos de semilla seca la inhibición es de 25-30 %, con extractos de 12 h la inhibición se incrementa a 50-65 %, mientras que con los extractos de 24 h se observa la mayor inhibición, 75-85 % (KRP4;2-KRP1;1 respectivamente, Figura 15C). Con esto se muestra que KRP1;1 y KRP4;2 son capaces de inhibir la actividad de cinasa asociada a PCNA y que esta inhibición es diferencial a lo largo de la germinación de maíz.

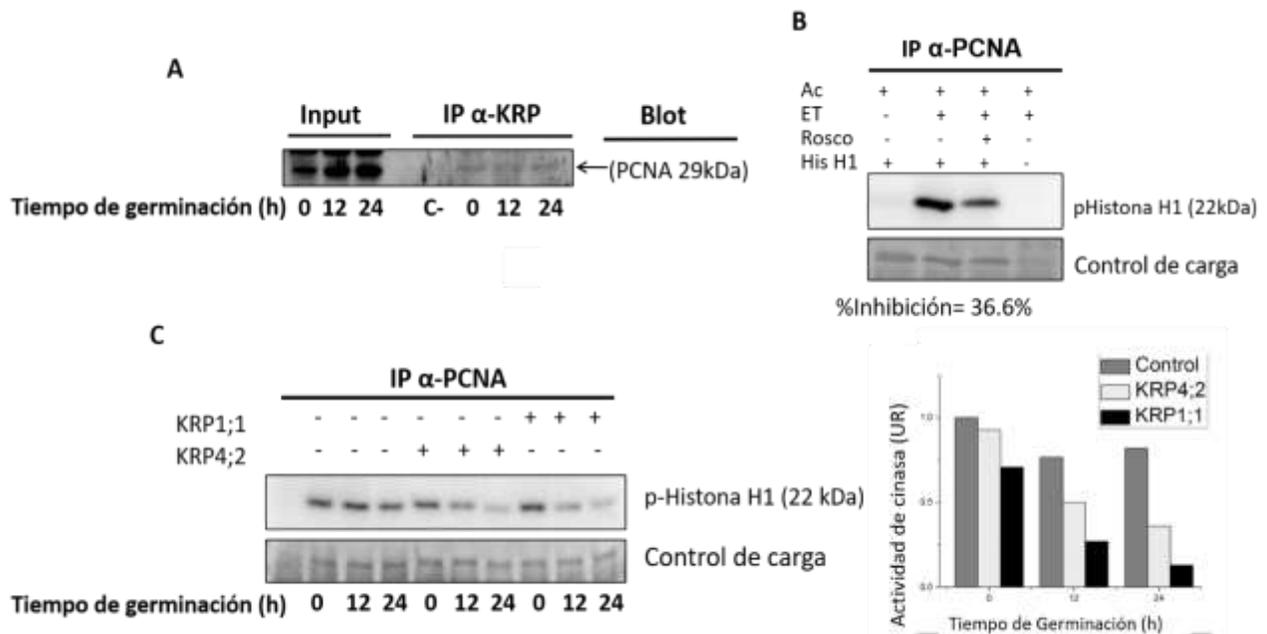


Figura 15. La actividad de cinasa asociada a PCNA es inhibida por KRP1;1 y KRP4;2 durante la germinación de maíz. (A) Ensayo de inmunoprecipitación empleando anticuerpo anti-KRP con extractos proteicos de ejes embrionarios embebidos por 0, 12 o 24 h, la detección se realizó con anticuerpo anti-PCNA. C- Resina + anticuerpo sin extracto proteico; IP, inmunoprecipitado; Input, extracto proteico de maíz. (B) Ensayo de inhibición de cinasa asociada a PCNA empleando roscovitina. La fuente de cinasa se obtuvo de un inmunoprecipitado de PCNA. Ac, anticuerpo; ET, extracto total proteico; Rosco, Roscovitina; His H1, Histona H1 que se empleó como sustrato de fosforilación. La señal observada se debe a la incorporación de ^{32}P . El gel teñido con Azul Coomassie como control de carga. (C) Ensayo de inhibición de cinasa asociada a PCNA empleando 5 µg de KRP1;1 o KRP4;2 recombinante en inmunoprecipitados de PCNA con extractos de 0, 12 o 24 h de germinación. La señal observada se debe a la incorporación de ^{32}P . El gel teñido con Azul Coomassie como control de carga. La grafica muestra la cuantificación densitométrica del ensayo de inhibición de cinasa asociada a PCNA con KRP. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Discusión.

El antígeno nuclear de proliferación celular es una proteína homotrimérica que participa en diferentes procesos celulares como la replicación, al unirse a las DNA polimerasas δ y ϵ para funcionar como factor de procesividad (Acharya et al. 2011; Bravo et al. 1987), la reparación del daño a DNA (Sau, Liefshitz, and Kupiec 2019; Moggs et al. 2000), el control del ciclo celular, el mantenimiento y remodelación de la cromatina (Li et al. 2018; Janke et al. 2018), la cohesión de las cromátidas hermanas (Moldovan, Pfander, and Jentsch 2006), e incluso está involucrado en procesos como la transcripción y la glucólisis (Naryzhny and Lee 2010; Ohayon et al. 2016).

En maíz la abundancia proteica de PCNA es baja en la semilla seca y aumenta gradualmente hasta alcanzar su punto máximo entre las 15 y 20 h después de la imbibición (Herrera et al. 2000). Este patrón de acumulación proteica se puede observar en la figura 11A.

En células de animales, PCNA puede formar estructuras cuaternarias al unir dos trímeros de PCNA por la cara posterior de los anillos, cuando se suprime la capacidad de las células de ensamblar dobles trímeros la proliferación se ve seriamente afectada dando como resultado el arresto de las células en G1 y si el arresto continua se produce muerte celular (Naryzhny, Zhao, and Lee 2005). En plantas, solo en maíz se ha estudiado la presencia del doble trímero de PCNA, encontrando que esta estructura se puede formar (Becerril et al. 2012), sin embargo no se conocía si esta estructura se mantiene a lo largo de la germinación; la figura 11 muestra la presencia de una banda correspondiente al doble trímero y una correspondiente al trímero de PCNA que se mantienen a lo largo de la germinación de maíz, lo cual era de esperarse pues se sabe que la unidad mínima funcional de PCNA es un trímero. Además, los ensayos de competencia demuestran que las bandas detectadas corresponden a formas de PCNA. Esta proteína no tiene una función catalítica, más bien funciona como una plataforma molecular que permite la agregación de múltiples proteínas. No se conoce la función del doble trímero de PCNA, pero se especula que la estructura cuaternaria podría generar una mayor

superficie de contacto proveyendo mayor cantidad de sitios a los cuales las proteínas puedan unirse.

Previamente se ha reportado que la proteína p13^{Suc1}, homóloga funcional de CKS de maíz, es capaz de asociarse a las cinasas dependientes de ciclinas (CDKA y CDKB1;1) a lo largo de la germinación, además en estos complejos se encuentra presente CycD3;1 (Axosco, tesis de licenciatura, 2014). En este estudio se mostró que además PCNA y KRPs pueden estar presentes en estos complejos a lo largo de la germinación, mostrando la posible formación de complejos multiméricos donde PCNA y KRP podrían estar actuando como reguladores de complejos CycD/CDKs (Figura 13A).

Se ha estimado que existen cientos de proteínas capaces de unirse a PCNA (Hara et al. 2018), y se han clasificado en proteínas de ciclo celular, proteínas implicadas en reparación y replicación del DNA, proteínas implicadas en transcripción y remodelación de cromatina (Prosperi 2006) entre otras. Existen diferentes motivos con los cuales las proteínas se unen a PCNA, el más estudiado es el motivo PIP, sin embargo, existen otros motivos como PIP like, APIM y la caja KA (Moldovan, Pfander, and Jentsch 2006; Hara et al. 2018). En la tabla 2 se presentan algunas proteínas reguladoras de ciclo celular estudiadas en este trabajo que contienen al menos un motivo de unión a PCNA. En la figura 13B se demuestra que las cinasas dependientes de ciclina de plantas (CDKA y CDKB1;1), así como 4 tipos de CycD (CycD3;1, CycD4;2, CycD5;3 y CycD6;1) y KRPs se pueden asociar en complejos con PCNA de forma fisiológica, cabe resaltar que las interacciones *in vivo* de CDKB1;1 y CycD6;1 con PCNA no habían sido reportadas. Es posible que todas estas interacciones se encuentren mediadas por los motivos de interacción a PCNA.

Dado que proteínas reguladoras del ciclo celular son capaces de asociarse a PCNA, y esta proteína se encuentra presente en complejos de diferentes masas moleculares co-eluyendo con CDKs y Cycls, que varían a través de la germinación (Garza-Aguilar et al. 2019), surge la pregunta de si estas interacciones CycD/PCNA y CDKs/PCNA se mantienen en la germinación. Las asociaciones con PCNA parecen cambiar en el transcurso de la germinación (Figura 14); si bien, la función

de estas asociaciones (CycD/PCNA, CDK/PCNA) siguen siendo una incógnita, se especula que PCNA al ser una plataforma molecular podría permitir el ensamble y desensamble de complejos proteicos con el DNA, lo cual facilitaría la unión de los complejos CycD/CDKs con sus sustratos de fosforilación posicionados sobre el DNA, por ejemplo a las proteínas RBR y E2F, en donde la ciclina provee la especificidad hacia los sustratos. Por otro lado, las proteínas que se unen a PCNA pueden competir por los lugares de unión generando un recambio de proteínas unidas a PCNA y por ende con el DNA, dependiendo del momento del ciclo celular en el que se encuentre la célula, lo cual explicaría por qué las diferentes ciclinas D tienen un patrón de asociación con PCNA particular (Prosperi 2006; Vázquez-Ramos and Sánchez 2003). Por otro lado, recientemente se ha reportado que PCNA también puede funcionar como “secuestrador” de proteínas impidiendo que realicen su función (Davarinejad et al. 2019), basado en ello quizá PCNA se asocia fuertemente en la semilla seca a CDKB secuestrándola y conforme avanza la germinación se libera para ejercer su actividad de cinasa típica de G2/M, o bien es posible que dentro de estos complejos se encuentre presente un inhibidor como las KRPs (Figura 15A) reprimiendo la actividad de cinasa, sin embargo primero queda por demostrar si estos complejos CDKB/PCNA son activos en tiempos tempranos de la germinación de maíz.

Cabe mencionar que en las figuras 13 y 14 algunas bandas presentan una migración afectada con respecto a las presentes en los extractos totales (input), esto podría deberse a un efecto dado por la cantidad de inmunoglobulinas presentes en los inmunoprecipitados, las cuales están ausentes en los inputs; o bien tratarse de algún tipo de modificación postraducciona que solo se presenta en las proteínas que se encuentran en complejos y que se enriquecen por efecto de la inmunoprecipitación.

Por otro lado, en la figura 15A se muestra la asociación de PCNA con las KRPs a lo largo de la germinación, sugiriendo la posible formación de complejos cuaternarios CycD-CDK-PCNA-KRP. Dado que la formación de los complejos CycD/CDKs es

dinámica los complejos mostrados en la Tabla 5 podrían estar presentes durante la germinación, quizás a diferentes tiempos y/o zonas del eje embrionario.

Tabla 5. Complejos dinámicos de CycD/CDKs	
CycD3;1-CDKA-PCNA	CycD4;2-CDKA-PCNA
CycD3;1-CDKB1;1-PCNA	CycD4;2-CDKB1;1-PCNA
CycD3;1-CDKA-PCNA-KRP	CycD4;2-CDKA-PCNA-KRP
CycD3;1-CDKB1;1-PCNA-KRP	CycD4;2-CDKB1;1-PCNA-KRP
CycD5;3-CDKA-PCNA	CycD6;1-CDKA-PCNA
CycD5;3-CDKB1;1-PCNA	CycD6;1-CDKB1;1-PCNA
CycD5;3-CDKA-PCNA-KRP	CycD6;1-CDKA-PCNA-KRP
CycD5;3-CDKB1;1-PCNA-KRP	CycD6;1-CDKB1;1-PCNA-KRP

Ensayos de actividad de cinasa empleando como fuente de enzima un inmunoprecipitado de PCNA mostraron complejos CycD/CDKs activos, lo cual se corroboró en un experimento independiente donde se agregó un inhibidor selectivo de CDKs, la roscovitina (Nakai et al. 2006). La figura 15B muestra que los complejos ternarios se forman y son activos, además de que la actividad de cinasa proviene de una CDK semejante a lo reportado previamente (Sánchez et al. 2002).

Finalmente, como se muestra en la figura 15C las proteínas KRP1;1 y KRP4;2 son capaces de inhibir la actividad de cinasa asociada a PCNA, similar a lo reportado por Lemus-Enciso (tesis de licenciatura, 2018), sin embargo, en este estudio se muestra que esta inhibición es diferencial a lo largo de la germinación (Figura 15C), lo cual podría deberse a la variación en la composición de los complejos que como ya se sugirió, deben de ser altamente dinámicos, por lo que podrían estar presentes otras proteína que permitan una unión más eficiente de las KRPs, implicando que algunos complejos sean más ó menos susceptibles a ser inhibidos por KRPs. Por otro lado, se ha mostrado que la capacidad de inhibición de las KRPs depende de su estado de fosforilación (Godínez-Palma et al. 2017) por lo que quizá

fisiológicamente estas proteínas se encuentren más activas en tiempos como 12 y 24 h de imbibición permitiéndoles inhibir a los complejos Cyc/CDKs/PCNA con mayor facilidad que a 0 h.

Además, los resultados de la figura 15C sugieren la formación de complejos cuaternarios puesto que el inmunoprecipitado se realizó con anticuerpos contra PCNA y estos inmunoprecipitados tienen actividad de cinasa, lo que implica la presencia de una CDK y una ciclina y esta actividad disminuye específicamente por la adición de KRPs indicando que estas están interactuando con los complejos. Quizás sea esta una función fundamental de PCNA en G1 y S durante la germinación de maíz, conducir a los complejos ciclina/cinasa a los sitios donde se encuentran sus proteínas blanco y a la vez promover el control de su actividad al permitir la conformación de estructuras proteicas complejas.

Conclusiones

- ✓ PCNA forma trímeros y dobles trímeros en la germinación de maíz.
- ✓ PCNA se asocia a proteínas reguladoras del ciclo celular como CDKA, CDKB1;1, CycD3;1, CycD4;2, CycD5;3, CycD6;1 y KRPs durante la germinación de maíz.
- ✓ La asociación de PCNA con las proteínas reguladoras del ciclo celular estudiadas es diferencial a lo largo de la germinación de maíz.
- ✓ Los complejos Cyc/CDK asociados a PCNA son activos durante la germinación de maíz.
- ✓ La actividad de cinasa asociada a PCNA es susceptible a ser inhibida por KRP1;1 y KRP4;2.
- ✓ La inhibición de la actividad de cinasa asociada a PCNA por KRP1;1 y KRP4;2 es diferencial a lo largo de la germinación de maíz.

Perspectivas

- ✓ Determinar la actividad de cinasa de complejos CDKA/PCNA y CDKB1;1/PCNA en la germinación de maíz.
- ✓ Definir si existe diferencia en la actividad de complejos Cyc/CDKs asociados y no asociados a PCNA.
- ✓ Identificar experimentalmente las regiones por las cuales interaccionan las proteínas reguladoras del ciclo celular y PCNA.

Anexos

Anexo I. Secuenciación del gen *suc1* en el vector pGEX-4T2

```
790                               800                               810                               820
A T G T C G A A A A G T G G T G T G C C A C G T C T T T T A A C T G C T T
p13 suc1
C A T G T C G A A A A G T G G T G T G C C A C G T C T T T T A A C T G C T T
C A T G T C G A A A A G T G G T G T G C C A C G T C T T T T A A C T G C T T
C A T G T C G A A A A G T G G T G T G C C A C G T C T T T T A A C T G C T T
C A T G T C G A A A A G T G G T G T G C C A C G T C T T T T A A C T G C T T

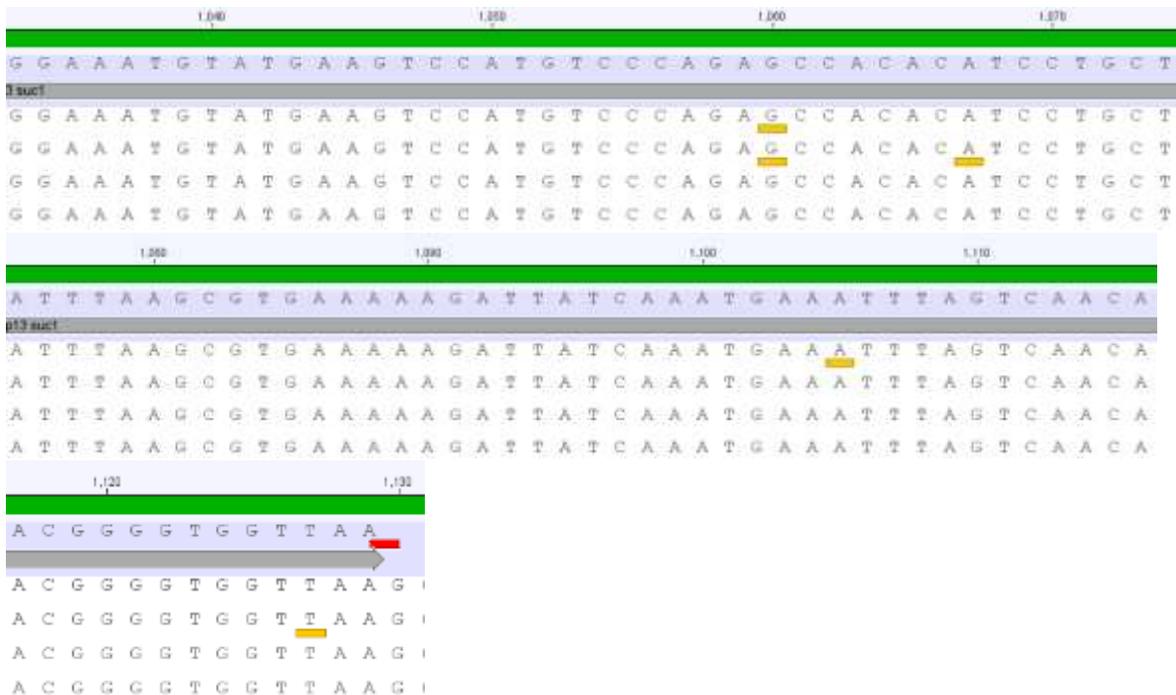
830                               840                               850                               860
C T G A G C G T G A A C G T C T A G A G C C A T T C A T T G A T C A A A T C C A T
t
C T G A G C G T G A A C G T C T A G A G C C A T T C A T T G A T C A A A T C C A T
C T G A G C G T G A A C G T C T A G A G C C A T T C A T T G A T C A A A T C C A T
C T G A G C G T G A A C G T C T A G A G C C A T T C A T T G A T C A A A T C C A T
C T G A G C G T G A A C G T C T A G A G C C A T T C A T T G A T C A A A T C C A T

870                               880                               890                               900
T A T T C T C C T A G A T A T G C T G A T G A T G A A T A T G A A T A T C G A C A
uc1
T A T T C T C C T A G A T A T G C T G A T G A T G A A T A T G A A T A T C G A C A
T A T T C T C C T A G A T A T G C T G A T G A T G A A T A T G A A T A T C G A C A
T A T T C T C C T A G A T A T G C T G A T G A T G A A T A T G A A T A T C G A C A

910                               920                               930                               940
T G T T A T G T T A C C A A A A G C A A T G C T A A A A G C G A T A C C C A C C G A
suc1
T G T T A T G T T A C C A A A A G C A A T G C T A A A A G C G A T A C C C A C C G A
T G T T A T G T T A C C A A A A G C A A T G C T A A A A G C G A T A C C C A C C G A
T G T T A T G T T A C C A A A A G C A A T G C T A A A A G C G A T A C C C A C C G A
T G T T A T G T T A C C A A A A G C A A T G C T A A A A G C G A T A C C C A C C G A

950                               960                               970                               980                               990
T T A T T T C A A T C C A G A G A C T G G A A C G C T T C G A A T C C T T C A A G A
l3 suc1
T T A T T T C A A T C C A G A G A C T G G A A C G C T T C G A A T C C T T C A A G A
T T A T T T C A A T C C A G A G A C T G G A A C G C T T C G A A T C C T T C A A G A
T T A T T T C A A T C C A G A G A C T G G A A C G C T T C G A A T C C T T C A A G A
T T A T T T C A A T C C A G A G A C T G G A A C G C T T C G A A T C C T T C A A G A

1,000                               1,010                               1,020                               1,030
A G A A G A A T G G A G A G G A C T T G G A A T T A C T C A A A G T C T G G G A T G
suc1
A G A A G A A T G G A G A G G A C T T G G A A T T A C T C A A A G T C T G G G A T G
A G A A G A A T G G A G A G G A C T T G G A A T T A C T C A A A G T C T G G G A T G
A G A A G A A T G G A G A G G A C T T G G A A T T A C T C A A A G T C T G G G A T G
A G A A G A A T G G A G A G G A C T T G G A A T T A C T C A A A G T C T G G G A T G
```



Anexo I. Secuenciación del gen *suc1* contenido en el plásmido pGEX-4T2. La secuencia sombreada en azul corresponde a la secuencia teórica del gen *suc1*. Las cuatro secuencias inferiores corresponden a la secuenciación empleando los oligos m13/pUC Rev (5'-GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA-3'), 2485 Rev (5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'), m13/pUC-40 For (5'-GTT TTC CCA GTC ACG TTG TA-3') y 2484 For (5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3') respectivamente. Los rectángulos rojos indican el inicio y fin de la secuencia del gen *suc1* y los rectángulos amarillos indican bases que fueron curadas mediante la comparación de las secuenciaciones con el programa Geneious Basic.

Referencias

- Abbas, Tarek, and Anindya Dutta. 2009. 'p21 in cancer: intricate networks and multiple activities', *Nature Reviews Cancer*, 9: 400.
- Acharya, Narottam, Roland Klassen, Robert E. Johnson, Louise Prakash, and Satya Prakash. 2011. 'PCNA binding domains in all three subunits of yeast DNA polymerase δ modulate its function in DNA replication', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 17927-32.
- Becerril, Nazul, Miguel Ángel Martínez, Elpidio García, and Jorge Manuel Vázquez Ramos. 2012. 'Chromatin Bound PCNA is Complexed with Cell Cycle Protein Regulators as Determined by Chromatin Immunoprecipitation', *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56: 10-14.
- Bird, David A., Miruna M. Buruiana, Yongming Zhou, Larry C. Fowke, and Hong Wang. 2007. 'Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized and show different localization patterns within the nucleoplasm', *Plant Cell Reports*, 26: 861-72.
- Boruc, Joanna, Evelien Mylle, Maria Duda, Rebecca De Clercq, Stephane Rombauts, Danny Geelen, Pierre Hilson, Dirk Inzé, Daniel Van Damme, and Eugenia Russinova. 2010. 'Systematic Localization of the Arabidopsis Core Cell Cycle Proteins Reveals Novel Cell Division Complexes', *Plant Physiology*, 152: 553-65.
- Bravo, Rodrigo, Rainer Frank, Patricia A. Blundell, and Heather Macdonald-Bravo. 1987. 'Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ ', *Nature*, 326: 515-17.
- Buendía-Monreal, Manuel, Ilenia Rentería-Canett, Octavio Guerrero-Andrade, Carlos E. Bravo-Alberto, León P. Martínez-Castilla, Elpidio García, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2011. 'The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns', *Physiologia Plantarum*, 143: 297-308.
- Davarinejad, Hossein, Monika Joshi, Narimane Ait-Hamou, Kim Munro, and Jean-François Couture. 2019. 'ATXR5/6 Forms Alternative Protein Complexes

- with PCNA and the Nucleosome Core Particle', *Journal of Molecular Biology*, 431: 1370-79.
- de Jesús Juárez, Natividad, Alfredo Mancilla, Elpidio García, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2008. 'Expression and activity of a Kip-related protein, Zeama;KRP1, during maize germination', *Seed Science Research*, 18: 67-75.
- De Veylder, Lieven, Tom Beeckman, Gerrit T.S. Beemster, Luc Krols, Franky Terras, Isabelle Landrieu, Els Van Der Schueren, Sara Maes, Mirande Naudts, and Dirk Inzé. 2001. 'Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis', *The Plant Cell*, 13: 1653-68.
- Dewitte, Walter, and James A.H. Murray. 2003. 'The Plant Cell Cycle', *Annual Review of Plant Biology*, 54: 235-64.
- Evans, Tom, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, and Tim Hunt. 1983. 'Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division', *Cell*, 33: 389-96.
- Garza-Aguilar, Sara Margarita, Sánchez Camargo Victor Allan, Godínez Palma Silvia Karina, and Lara Núñez Aurora. 2014. 'Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas.', *Revista de Educación bioquímica*, 32: 39-47.
- Garza-Aguilar, Sara Margarita, Javier Axosco-Marín, Aurora Lara-Núñez, Estefany Damaris Guerrero-Molina, Aldo Tonatiuh Lemus-Enciso, Elpidio García-Ramírez, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2019. 'Proliferating cell nuclear antigen associates to protein complexes containing cyclins/cyclin dependent kinases susceptible of inhibition by KRPs during maize germination', *Plant Science*, 280: 297-304.
- Godínez-Palma, Silvia K., Fernando R. Rosas-Bringas, Omar G. Rosas-Bringas, Elpidio García-Ramírez, Jorge Zamora-Zaragoza, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 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: 1585-97.

- Gutiérrez, Ruth, Francisco Quiroz-Figueroa, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2005. 'Maize Cyclin D2 Expression, Associated Kinase Activity and Effect of Phytohormones During Germination', *Plant and Cell Physiology*, 46: 166-73.
- Hara, Kodai, Masayuki Uchida, Risa Tagata, Hideshi Yokoyama, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, and Hiroshi Hashimoto. 2018. 'Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction', *Acta Crystallographica Section F*, 74: 214-21.
- Harashima, Hirofumi, and Arp Schnittger. 2012. 'Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria', *Plant Methods*, 8: 23.
- Herrera, Ivonne, María De La Paz Sánchez¹, Juan Molina, Javier Plasencia, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 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: 127-34.
- Hishiki, Asami, Hiroshi Hashimoto, Tomo Hanafusa, Keijiro Kamei, Eiji Ohashi, Toshiyuki Shimizu, Haruo Ohmori, and Mamoru Sato. 2009. 'Structural Basis for Novel Interactions between Human Translesion Synthesis Polymerases and Proliferating Cell Nuclear Antigen', *Journal of Biological Chemistry*, 284: 10552-60.
- Inzé, Dirk, and Lieven De Veylder. 2006. 'Cell Cycle Regulation in Plant Development', *Annual Review of Genetics*, 40: 77-105.
- Jager, Sarah M. de, Spencer Maughan, Walter Dewitte, Simon Scofield, and James A. H. Murray. 2005. 'The developmental context of cell-cycle control in plants', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 385-96.
- Janke, Ryan, Grant A. King, Martin Kupiec, and Jasper Rine. 2018. 'Pivotal roles of PCNA loading and unloading in heterochromatin function', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115: E2030-E39.
- Jimenez-Macedo, Ana Raquel, Dolores Izquierdo, Aixa Urdaneta, Begoña Anguita, and Maria-Teresa Paramio. 2006. 'Effect of roscovitine on nuclear

- maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes', *Theriogenology*, 65: 1769-82.
- Klug, W. S., M. R. Cummings, and C. A. Spencer. 2006. *Genética* (Madrid, España).
- Krishna, Talluru S. R., Xiang-Peng Kong, Sonja Gary, Peter M. Burgers, and John Kuriyan. 1994. 'Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA', *Cell*, 79: 1233-43.
- Kumar, Narender, Hirofumi Harashima, Shweta Kalve, Jonathan Bramsiepe, Kai Wang, Bulelani L. Sizani, Laura L. Bertrand, Matthew C. Johnson, Christopher Faulk, Renee Dale, L. Alice Simmons, Michelle L. Churchman, Keiko Sugimoto, Naohiro Kato, Maheshi Dassanayake, Gerrit Beemster, Arp Schnittger, and John C. Larkin. 2015. 'Functional Conservation in the SIAMESE-RELATED Family of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Land Plants', *The Plant Cell*, 27: 3065-80.
- Lara-Núñez, Aurora, Natividad De Jesús, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2008. 'Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones', *Physiologia Plantarum*, 132: 79-88.
- Leung, Wendy, Ryan M. Baxley, George-Lucian Moldovan, and Anja-Katrin Bielinsky. 2018. 'Mechanisms of DNA Damage Tolerance: Post-Translational Regulation of PCNA', *Genes*, 10: 10.
- Li, Min, Xiaohua Xu, Chou-Wei Chang, Li Zheng, Binghui Shen, and Yilun Liu. 2018. 'SUMO2 conjugation of PCNA facilitates chromatin remodeling to resolve transcription-replication conflicts', *Nature Communications*, 9: 2706.
- McConnell, Beth B., Fiona J. Gregory, Francesca J. Stott, Eiji Hara, and Gordon Peters. 1999. 'Induced Expression of p16^{INK4a} Inhibits Both CDK4- and CDK2-Associated Kinase Activity by Reassortment of Cyclin-CDK-Inhibitor Complexes', *Molecular and Cellular Biology*, 19: 1981-89.
- Menges, Margit, Sarah M. De Jager, Wilhelm Grisse, and James A.H. Murray. 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: 546-66.
- Moggs, Jonathan G., Paola Grandi, Jean-Pierre Quivy, Zophonías O. Jónsson, Ulrich Hübscher, Peter B. Becker, and Geneviève Almouzni. 2000. 'A CAF-1–PCNA-Mediated Chromatin Assembly Pathway Triggered by Sensing DNA Damage', *Molecular and Cellular Biology*, 20: 1206-18.
- Moldovan, George-Lucian, Boris Pfander, and Stefan Jentsch. 2006. 'PCNA Controls Establishment of Sister Chromatid Cohesion during S Phase', *Molecular Cell*, 23: 723-32.
- Moldovan, George-Lucian, Boris Pfander, and Stefan Jentsch. 2007. 'PCNA, the Maestro of the Replication Fork', *Cell*, 129: 665-79.
- Nakai, Tomohiro, Ko Kato, Atsuhiko Shinmyo, and Masami Sekine. 2006. 'Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase', *FEBS Letters*, 580: 336-40.
- Nannas, Natalie J., and R. Kelly Dawe. 2015. 'Genetic and Genomic Toolbox of *Zea mays*', *Genetics*, 199: 655-69.
- Naryzhny, Stanislav N., and Hoyun Lee. 2010. 'Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer', *FEBS Letters*, 584: 4292-98.
- Naryzhny, Stanislav N., Helen Zhao, and Hoyun Lee. 2005. 'Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) May Function as a Double Homotrimer Complex in the Mammalian Cell', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 13888-94.
- Nonogaki, Hiroyuki, George W. Bassel, and J. Derek Bewley. 2010. 'Germination—Still a mystery', *Plant Science*, 179: 574-81.
- Ohayon, Delphine, Alessia De Chiara, Nicolas Chapuis, Céline Candalh, Julie Mocek, Jean-Antoine Ribeil, Lamya Haddaoui, Norbert Ifrah, Olivier Hermine, Frédéric Bouillaud, Philippe Frachet, Didier Bouscary, and Véronique Witko-Sarsat. 2016. 'Cytoplasmic proliferating cell nuclear

- antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia', *Scientific Reports*, 6: 35561.
- Paterson, Andrew H., Michael Freeling, and Takuji Sasaki. 2005. 'Grains of knowledge: Genomics of model cereals', *Genome Research*, 15: 1643-50.
- Prosperi, Ennio. 2006. 'The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work', *The FASEB Journal*, 20: 833-37.
- Sánchez, María de la Paz, Sunitha H. Gurusinghe, Kent J. Bradford, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 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: 515-23.
- Sánchez, María de la Paz, Alma Torres, Maria Beatrice Boniotti, Crisanto Gutierrez, and Jorge M. Vázquez-Ramos. 2002. 'PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize', *Plant Molecular Biology*, 50: 167-75.
- Sau, Soumitra, Batia Liefshitz, and Martin Kupiec. 2019. 'The Yeast PCNA Unloader Elg1 RFC-Like Complex Plays a Role in Eliciting the DNA Damage Checkpoint', *mBio*, 10: e01159-19.
- Stoimenov, Ivaylo, and Thomas Helleday. 2009. 'PCNA on the crossroad of cancer', *Biochemical Society Transactions*, 37: 605-13.
- Strzalka, Wojciech, and chhavi aggarwal. 2013. 'Arabidopsis thaliana: Proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 possibly form homo- and hetero-trimeric complexes in the plant cell', *Plant Signaling & Behavior*, 8: e24837.
- Strzalka, Wojciech, and Alicja Ziemienowicz. 2010. 'Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation', *Annals of Botany*, 107: 1127-40.
- Świątek, Agnieszka, Marc Lenjou, Dirk Van Bockstaele, Dirk Inzé, and Harry Van Onckelen. 2002. 'Differential Effect of Jasmonic Acid and Abscisic Acid on Cell Cycle Progression in Tobacco BY-2 Cells', *Plant Physiology*, 128: 201-11.
- Tin Su, Tin. 2001. 'Cell cycle: How, when and why cells get rid of cyclin A', *Current Biology*, 11: R467-R69.

- Umeda, Masaaki, Shiori S. Aki, and Naoki Takahashi. 2019. 'Gap 2 phase: making the fundamental decision to divide or not', *Current Opinion in Plant Biology*, 51: 1-6.
- Vázquez-Ramos, Jorge M., and María de la Paz Sánchez. 2003. 'The cell cycle and seed germination', *Seed Science Research*, 13: 113-30.
- Verkest, Aurine, Christina Weini, Dirk Inzé, Lieven De Veylder, and Arp Schnittger. 2005. 'Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control', *Plant Physiology*, 139: 1099-106.
- Vivona, Jonathan B., and Zvi Kelman. 2003. 'The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins', *FEBS Letters*, 546: 167-72.
- Wang, Guanfang, Hongzhi Kong, Yujin Sun, Xiaohong Zhang, Wei Zhang, Naomi Altman, Claude W. dePamphilis, and Hong Ma. 2004. 'Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in Arabidopsis and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins', *Plant Physiology*, 135: 1084-99.
- Yurieva, Olga, and Mike O'Donnell. 2016. 'Reconstitution of a eukaryotic replisome reveals the mechanism of asymmetric distribution of DNA polymerases', *Nucleus (Austin, Tex.)*, 7: 360-68.
- Zhou, Yongming, Hesheng Niu, Federica Brandizzi, Larry C. Fowke, and Hong Wang. 2006. 'Molecular Control of Nuclear and Subnuclear Targeting of the Plant CDK Inhibitor ICK1 and ICK1-Mediated Nuclear Transport of CDKA', *Plant Molecular Biology*, 62: 261-78.