

00581

UNAM  
POSGRADO  6



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de la regulación  
de PCNA durante la germinación de maíz**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**  
PRESENTA:  
MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F. 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Doctor Jorge Vázquez Ramos y fue aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas por el siguiente jurado:

<b>Presidente</b>	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
<b>Vocal</b>	Dr. Alejandro García Carrancá
<b>Vocal</b>	Dr. Mario Rocha Sosa
<b>Vocal</b>	Dr. Roberto Coria Ortega
<b>Secretario</b>	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
<b>Suplente</b>	Dra. María Imelda López Villaseñor
<b>Suplente</b>	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jorge Vázquez por la dirección de este trabajo y por todo el apoyo brindado.

A los doctores Marco Villanueva y Roberto Coria, miembros de mi comité tutorial.

A los miembros del jurado por la revisión de esta tesis.

Al doctor Javier Plasencia por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al doctor Mario Rocha por permitirme trabajar en su laboratorio durante el tiempo que estuvo cerrada la Universidad.

A CONACyT por las becas otorgadas durante el desarrollo de este trabajo (No.113422 y 113912).

## DEDICATORIAS

A mis padres, María Luisa y Esteban por todo el cariño y el amor que me han dado.

A Carlos e Ignacio por el gran apoyo que me han brindado en todo momento.

A mis amigas Manuelita, Juliana, Carmen, Gaby y Dulce, por darme su amistad incondicional.

A mis compañeros y amigos del departamento de Bioquímica, especialmente a Ruth, Edu, Faby, Gaby Toledo, Ivonne, Luz María, Pilo, Dairo, Erick, Paco, Alma, Ricardo, Cesy, Andrea, Nora y José Juan.

A Felipe por haberme dado el beneficio de la duda y por ser un gran ejemplo para mí.

A Rive por su amistad.

A Lety y Rocío por ayudarme a resolver los problemas administrativos.

A la señora Licha por ayudarme a sacar ejes embrionarios y por todo el cariño que me ha dado.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1.1 Germinación	11
1.2 Replicación de DNA	13
1.3 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)	15
1.3.1 Función de PCNA	17
1.3.2 Proteínas asociadas a PCNA	17
1.4 Ciclo celular	19
1.4.1 Generalidades del ciclo celular	19
1.4.2 Fase G1	20
1.4.3 Fase S	21
1.4.4 Fase G2	22
1.4.5 Fase M	22
1.4.6 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs)	23
1.5 Ciclo celular en plantas	24
1.5.1 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (ICKs) de plantas	27
1.6 Antecedentes	28

<b>Hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos</b>	<b>32</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
2.1 Clonación de PCNA en marco de lectura	33
2.2 Sobreexpresión y purificación de PCNA	35
2.3 Obtención de anticuerpos anti-PCNA	36
2.4 Cuantificación de proteínas	36
2.5 Ensayos de citometría de flujo	37
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1 Obtención de anticuerpos dirigidos contra PCNA de maíz y asociación de PCNA con una ciclina tipo D	38
3.1.1 Obtención de un anticuerpo dirigido contra PCNA de maíz	38
3.1.2 Complejos formados por PCNA durante la germinación de maíz	41
3.1.3 Efecto de hormonas en la asociación de PCNA con una proteína tipo ciclina durante la germinación de maíz	44
3.2 Asociación de una cinasa dependiente de ciclina a PCNA	47
3.2.1 Asociación de PCNA con una cinasa dependiente de ciclina (Cdk)	47
3.2.2 Caracterización de la cinasa asociada a PCNA	48
3.2.3 Actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación de maíz	49
3.2.4 Artículo "PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize"	50
3.3 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre el ciclo celular y la actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación de maíz	68
3.3.1 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre el ciclo celular durante la germinación de maíz	68
3.3.2 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre Cdk A	73
3.3.3 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre la actividad de Cdk A asociada a PCNA	74



<b>DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>89</b>
6.1 Artículo "Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination"	89
<b>REFERENCIAS</b>	<b>98</b>

## RESUMEN

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína esencial para el metabolismo del DNA ya que estimula la actividad e incrementa la procesividad de las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ . En mamíferos, PCNA se asocia con una gran cantidad de proteínas que participan en el metabolismo del DNA y con proteínas que tienen funciones importantes en la regulación del ciclo celular.

En plantas, poco se conoce acerca de los complejos que forma PCNA. En este trabajo se estudiaron y caracterizaron los complejos proteicos que forma PCNA durante la germinación de maíz y el efecto que tienen los fitorreguladores benciladenina (BA) y ácido abscísico (ABA). Mediante inmunoprecipitación y cromatografía de filtración en gel se determinó que durante la germinación PCNA se encontró en forma de monómero, trímero y formando complejos con ciclina D y con dos cinasas dependientes de ciclina (Cdks), una de 36 kDa y otra de 32 kDa. Las cinasas asociadas a PCNA son Cdks tipo A, ya que fueron reconocidas por un anticuerpo dirigido contra el dominio de unión a ciclina (PSTAIRE) conservado en este tipo de Cdks, fueron capaces de fosforilar a la proteína de retinoblastoma de maíz (Zm RBR), un sustrato para Cdks tipo A y su actividad se afectó por inhibidores químicos específicos para Cdks como roscovitina y olomoucina.

La composición de los complejos formados por PCNA varía dependiendo del estado celular que tienen las células de las semillas en la germinación, al inicio la mayor parte de las células estuvieron en la fase G1 del ciclo celular y PCNA se asoció a ciclina D, conforme la germinación avanzó y se inició la replicación del DNA, los niveles del complejo entre PCNA y ciclina D disminuyeron al igual que la actividad de cinasa asociada a PCNA. Cuando la germinación se aceleró en presencia de BA, la replicación del DNA se inició 6 h antes respecto a la germinación control y el complejo de PCNA-ciclina D desapareció más rápidamente, pero la actividad de cinasa asociada a PCNA sobre Zm RBR no se afectó. No obstante, en la germinación tardía la cinasa fue capaz de fosforilar a una proteína endógena de 60 kDa asociada al complejo de PCNA. Por otra parte, ABA inhibió la germinación al detener a las células de las semillas en la fase G1 del ciclo celular, bajo estas condiciones la formación de los complejos de PCNA con ciclina D se comportaron de manera similar que con BA, pero la cinasa permaneció activa y además de fosforilar a Zm RBR también fosforiló a la proteína endógena de 60 kDa.

Este estudio indica que la conservación de algunas proteínas que regulan el ciclo celular en plantas y mamíferos, es reflejada en las interacciones que tienen estas proteínas.

## ABSTRACT

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is an essential protein for DNA metabolism as it stimulates the activity and increases the processivity of the DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$ . In mammals, PCNA interacts with a proteins that are known to have enzymatic activity in nucleic acids metabolism as well as with proteins involved in cell cycle regulation.

There is limited information about the ability of plant PCNA to interact with various proteins. In this work we studied and characterized the protein complexes formed by PCNA during maize germination and the effect the phytohormones benziladenine (BA) and abscisic acid (ABA). By immunoprecipitation and gel filtration chromatography, we determined that during maize germination, PCNA was found as a monomer as well an homotrimeric protein, forming a complex with cyclin D and two cyclin dependent kinases (Cdks), with approximate molecular masses of 36 kDa and 32 kDa. These associated kinases are type A-Cdks, as they were recognized by an antibody directed against the PSTAIRE sequence present in maize Cdk-A kinases. This kinase activity phosphorylated the maize retinoblastoma protein (Zm RBR), a substrate for type A-Cdks and was inhibited by roscovitine and olomoucine, two specific Cdks inhibitors.

The composition of the protein complexes formed by PCNA varied depending of the cellular state during maize germination; during early germination the most of the cells of the seeds were in G1 phase and PCNA was found associated to cyclin D, but once the germination has advanced and DNA replication started, the levels of the complex PCNA-cyclin D decreased as well as the kinase activity associated to PCNA. When germination was accelerated in presence of BA, DNA replication started six hours before than in non-stimulated germination, and the complex PCNA-cyclin D dissociated early, but kinase activity on Zm RBR was not affect. However, during late germination the kinase phosphorylated an unknown 60-kDa protein. Although, ABA inhibited maize germination by arresting the cell cycle in G1 phase, the PCNA-cyclin D complexes showed the same composition as in germination in presence of BA, however the kinase activity on Zm RBR was not lost and the phosphorylated 60kDa protein was also observed.

This study indicates that the conservation observed in some proteins involved in cell cycle regulation in plants and mammals, is reflected in the interactions among these proteins.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Germinación

La producción de semillas es un proceso que algunas plantas realizan para poder originar una nueva planta; para ello, una vez que se produce, la semilla tiene que germinar.

La germinación se inicia con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la iniciación de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula (Bewley y Black, 1994); durante este proceso ocurren cambios en las semillas, tales como hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular. El resultado de estos eventos es la conversión de un embrión deshidratado, con un metabolismo casi nulo, a un embrión con un metabolismo activo y vigoroso.

La germinación es afectada tanto por factores extrínsecos como por factores intrínsecos. Los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones ambientales como la cantidad de agua disponible, la temperatura y el oxígeno. Dentro de los factores intrínsecos se encuentran los fitorreguladores u hormonas vegetales, tales como las giberelinas, auxinas, citocininas y ácido abscísico.

Los fitorreguladores controlan varios procesos del desarrollo y crecimiento de las semillas incluyendo la detención del crecimiento antes de la maduración y la acumulación y almacenamiento de reservas.

Las giberelinas inducen la germinación por expresión de genes que codifican para enzimas hidrolíticas capaces de degradar las reservas almacenadas en el endospermo para que puedan ser utilizadas por las semillas (Bewley y Black, 1994).

El ácido abscísico (ABA) inicialmente se describió como un factor que induce abscisión en las hojas y frutos. Ahora se sabe que el ABA mantiene el balance hídrico cuando hay un déficit, a través de la inducción del cierre de los estomas. Durante la embriogénesis, el ABA previene la germinación antes que la semilla madure e induce la síntesis de proteínas que le confieren tolerancia a la desecación. Existe evidencia de que la embriogénesis ocurre en presencia de ABA, pero la germinación se inhibe. También se ha reportado que el ABA inhibe la síntesis de DNA (Robertson *et al.*, 1990).

Las citocininas son hormonas que mejoran el crecimiento de la planta al estimular la división celular, su concentración se incrementa durante el desarrollo de la semilla y decae en la maduración; esta distribución temporal es consistente con la función que tienen las citocininas de controlar el desarrollo de las semillas. En la germinación, las citocininas inducen la activación de algunas proteínas que participan en la regulación del ciclo celular (Cruz-García, *et al.*, 1998; D'Agostino y Kieber, 1999) y en la replicación del DNA (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990).

Cuando una semilla reúne las condiciones antes mencionadas se inicia la germinación. La transición del desarrollo embrionario a la germinación necesita de cambios en la expresión genética. La expresión de genes que codifican para proteínas de reserva y para enzimas que están involucradas en la síntesis de material de reserva durante la maduración del embrión se reprime, mientras que la expresión de los genes que codifican para enzimas involucradas en la germinación, iniciación del crecimiento y la subsecuente movilización de reservas debe de ser activada (Bewley y Black, 1994). Al respecto se ha reportado que la síntesis de proteínas durante las primeras horas de germinación en semillas de maíz, pino y trigo, se debe tanto a la presencia de RNAs mensajeros preformados durante el desarrollo de las semillas, como a transcritos sintetizados de novo (Martín *et al.*, 1981; Datta *et al.*, 1983; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1984; Masumori *et al.*, 1992; y Bewley y Black, 1994); sin embargo, la función de los RNAs preformados es rápidamente reemplazada por los RNAs sintetizados de novo (Caers *et al.*, 1979).

Al inicio de la germinación, las células de las semillas deben prepararse para reactivar su metabolismo. En maíz se ha reportado que durante la maduración de las semillas, la mayoría de las células del embrión quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacmard, 1974). Al inicio de la germinación, las células reactivan el ciclo celular para iniciar la replicación del DNA y para la división celular posterior.

Estudios realizados con ejes embrionarios de maíz indican que durante las primeras horas de imbibición (0-8 h) hay síntesis de DNA de tipo reparativa, la cual tiene la finalidad de sustituir al DNA dañado durante la maduración, deshidratación y almacenamiento de las semillas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986), y de tipo organelar (Zlatanova *et al.*, 1987). La síntesis de DNA de tipo replicativa es un evento tardío que se inicia después de las 12 h de imbibición (Baíza *et al.*, 1989).

El proceso de división celular se inicia después de las 28 h de imbibición; sin embargo, la división celular no se presenta simultáneamente en todas las células meristemáticas del eje embrionario (Baíza *et al.*, 1986). Se ha reportado que las primeras mitosis ocurren en las células meristemáticas del mesocótilo después de las 28 h de imbibición; posteriormente, la división celular también se presenta en raíces seminales a las 32 h y en raíces primarias a las 36 h de imbibición (Baíza *et al.*, 1989). Con la división celular se continúa la protrusión radicular, que en maíz inicialmente ocurre por elongación (Baíza *et al.*, 1989). Es en este momento cuando se desencadena la proliferación celular para permitir el crecimiento del eje embrionario y dar origen a una nueva plántula.

### **1.2 Replicación de DNA**

La replicación del DNA es uno de los eventos más importantes dentro del ciclo celular. En eucariotes superiores, este proceso requiere la participación de una gran cantidad de proteínas esenciales, tales como helicasas, topoisomerasas, proteínas de unión a cadena sencilla (RPA), el factor de replicación C (RFC), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), las DNA polimerasas, la DNA primasa y DNA ligasas (figura A).

## INTRODUCCIÓN

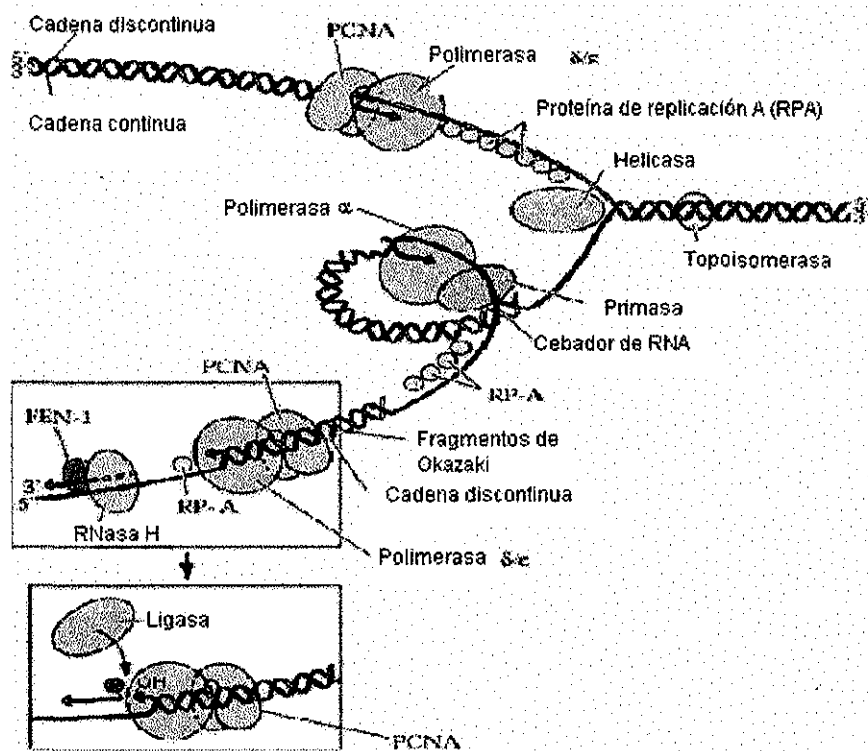


Figura A. Modelo de la replicación del DNA en eucariotes.  
Proteínas que participan en la replicación (Buchanan, 2000)

Para que la replicación se inicie se requiere de la acción de las helicadas, enzimas que desenrollan la doble cadena de DNA (Kornberg, 1988) y de esta manera permiten la apertura del DNA para que una de las cadenas pueda servir como molde para originar la nueva cadena de DNA.

Una vez que las cadenas de DNA quedan separadas, la proteína de replicación A (RPA) se une fuertemente al DNA de cadena sencilla para protegerlo y además evitar que se vuelva a formar la doble cadena. RPA es un complejo heterotrimérico formado por subunidades de 70, 32 y 14 kDa (Wold y Kelly, 1988; Wold, 1997), que además de estabilizar al DNA de cadena sencilla también estimula la actividad de las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\delta$  (Kenny *et al.*, 1989).

Las DNA polimerasas son las enzimas que se encargan de sintetizar la nueva cadena de DNA. En mamíferos existen varios tipos de polimerasas, las cuales actúan en diferentes etapas de la replicación del DNA. El complejo DNA polimerasa  $\alpha$ /primasa es el único capaz de iniciar la síntesis de novo de DNA, ya que sintetiza el cebador o primer de RNA para generar un extremo

3'OH, permitiendo con ello que otra DNA polimerasa inicie la elongación de las cadenas continua y discontinua de DNA (Prelich y Stillman, 1988; Waga y Stillman, 1994). Este proceso requiere de una alternancia entre la DNA polimerasa  $\alpha$ /primasa y las DNA polimerasas replicativas ( $\delta$  o  $\epsilon$ ). Este cambio ocurre debido a que la polimerasa  $\alpha$  es poco procesiva y se disocia del DNA después de que se sintetiza el cebador (Tsurimoto *et al.*, 1990a; Weinberg *et al.*, 1990; Murakami *et al.*, 1993).

La DNA polimerasa  $\delta$  participa en la síntesis de DNA tanto de la cadena continua como de la discontinua (Zlotkin *et al.*, 1996). Además tiene una actividad intrínseca de exonucleasa 3'-5', lo que le permite corregir errores introducidos durante el proceso sintético para mantener la alta fidelidad de la replicación de DNA (Byrnes *et al.*, 1976).

Algunos estudios han demostrado la participación de la DNA polimerasa  $\epsilon$  en la síntesis replicativa de DNA (Lee *et al.*, 1991; Turchi *et al.*, 1994).

Además de las polimerasas, la replicación del DNA requiere de la participación de una RNasa H1 y/o Fen 1, y de una DNA ligasa. Estas proteínas participan en la maduración de los fragmentos de Okazaki. La proteína Fen 1 es una exo/endonucleasa 5'-3' que remueve los cebadores de los fragmentos de Okazaki; la RNasa H1 también participa en la remoción de los cebadores. La DNA ligasa promueve la unión covalente de los fragmentos de Okazaki para así permitir la formación de cadenas de DNA maduras (Turchi *et al.*, 1994; Robert *et al.*, 1997).

Proteínas clave involucradas en el ensamblaje de las polimerasas replicativas a la horquilla de replicación, son el factor de replicación C (RFC) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). RFC es un complejo formado por 5 subunidades (p140, p40, p38, p37 y p36) (Ellison y Stillman, 1998) y su unión al DNA es un prerrequisito para ensamblar a las polimerasas replicativas al templado de DNA (Tsurimoto y Stillman, 1990b; Lee y Hurwitz, 1990). El extremo 3'OH del cebador es reconocido por RFC, su unión al DNA desplaza a la DNA polimerasa  $\alpha$ /primasa de la horquilla de replicación y promueve la asociación de PCNA con el DNA, lo que a su vez permite que la polimerasa  $\delta$  pueda ensamblarse a la horquilla de replicación.

### 1.3 Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) inicialmente se identificó como una proteína nuclear reconocida por auto-anticuerpos de pacientes con lupus eritomaso sistémico y cuya



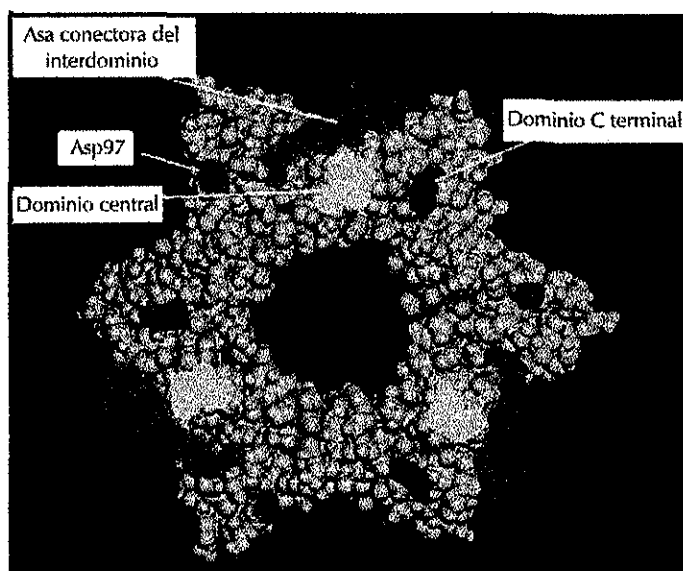
## INTRODUCCIÓN

síntesis estaba relacionada con el estado proliferativo de las células (Miyachi *et al.*, 1978). Dos años después, Bravo y Celis (1980) identificaron una proteína que se sintetizaba durante la fase S del ciclo celular, a la que llamaron ciclina. Trabajos posteriores demostraron que PCNA y ciclina eran la misma proteína por lo que se le quedó el nombre de PCNA (Mathews *et al.*, 1984).

PCNA es una proteína que está altamente conservada en levaduras, insectos, animales y plantas (Matsumoto *et al.*, 1987, Bauer y Burgers, 1988, Suzuka *et al.*, 1989) y en todas las especies se ha demostrado que tiene un peso molecular de alrededor de 29 kDa.

Estudios de cristalografía han mostrado que PCNA es un complejo homotrimérico, el cual forma un anillo hexagonal (figura B). Cada monómero tiene una región llamada asa conectora del interdominio, en la cual se unen una serie de proteínas que contienen un dominio conocido como de interacción a PCNA (PIP).

En todas las especies estudiadas, PCNA es una proteína ácida con *pI* bajo (Kelman y O'Donnell, 1995). La distribución de cargas sobre el anillo es asimétrica, existe un potencial electrostático negativo en la parte externa del anillo y un potencial positivo en la cavidad central del anillo, lo que permite formar un complejo estable con el DNA.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura B. Estructura de PCNA.

Localización de dominios funcionales de PCNA. En color verde se presenta el dominio central (Asp 41-His44), en café el asa conectora del interdominio (Leu 121-Glu 132) y en rojo el residuo de Asp 97 y el dominio C terminal (Lys254-Glu256) (Tsurimoto, 1998).

### 1.3.1 Función de PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína esencial para el metabolismo del DNA ya que tiene funciones importantes en procesos celulares como la replicación del DNA, su reparación y el control del ciclo celular (Prelich y Stillman, 1988; Shivji *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 1992).

Inicialmente se describió como un factor que estimulaba la actividad e incrementaba la procesividad de las DNA polimerasas tipo  $\delta$  y  $\epsilon$  (Tan *et al.*, 1986; Prelich *et al.*, 1987, Burgers, 1991). En esta función actúa como un "sliding clamp" o pinza móvil que rodea al DNA de manera dependiente del factor de replicación C (RFC) y así permite la entrada de la DNA polimerasa a la horquilla de replicación, a la que estimula.

### 1.3.2 Proteínas asociadas a PCNA

En los últimos años una serie de reportes han demostrado que en células de mamíferos, PCNA se asocia a un gran número de proteínas (Tabla 1) que participan en el metabolismo del DNA, como las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ , RFC, Fen 1, DNA ligasa 1, DNA topoisomerasa, MLH1, MSH2, XP-G y DNA metil transferasa (Burgers, 1991; Tsurimoto, 1990; Li, *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 1997, Umar *et al.*, 1996; Gary *et al.*, 1997 y Chuang *et al.*, 1997). Por lo anterior, se ha propuesto que PCNA es una proteína que además de ser un factor de procesividad de las DNA polimerasas, sirve de plataforma que permite el reclutamiento de estas proteínas a la horquilla de replicación o bien al DNA con fragmentos de cadena sencilla (Kelman y Hurwitz, 1998 ).

PCNA también se asocia a proteínas que tienen funciones importantes en el control del ciclo celular como la ciclina D, proteínas cinasas dependientes de ciclina (Cdks) y p21 (Xiong *et al.*, 1992; Waga *et al.*, 1994; Koundriockoff *et al.*, 2000). La ciclina D es una proteína que se asocia y activa a una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) (Sherr, 1994). Las Cdks son una familia de proteínas cinasas que regulan el ciclo celular (ver generalidades del ciclo celular). Se ha encontrado a PCNA formando un complejo cuaternario con la ciclina D, Cdk y p21. El significado fisiológico que tiene la formación de este complejo no ha sido determinado, pero es probable que contribuya en la coordinación entre la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA (Paganó *et al.*, 1994; Tsurimoto, 1998).

INTRODUCCIÓN

Proteínas que interacciona con PCNA	Función	Efecto de PCNA sobre la proteína de unión	Organismo donde se estudió la interacción	Referencias
-------------------------------------	---------	---	---	-------------

**REPLICACIÓN**

DNA polimerasa $\delta$	Síntesis de DNA (cadena continua y discontinua); reparación de DNA.	Estimulación de su procesividad	Humanos y levaduras	Burgers, 1991; Zhang, 1998
DNA polimerasa $\epsilon$	Síntesis y reparación de DNA; punto de control en ciclo celular.	Estimulación de su procesividad	Humanos y levaduras	Burgers, 1991;
RFC (factor de replicación C)	Posicionador de PCNA en el extremo 3' OH del molde cebador, ATPasa.	Estimulación de su actividad de ATPasa	Humanos y levaduras	Tsurimoto y Stillman, 1990; Zhang <i>et al.</i> , 1999
FEN1 (flap endonucleasa)	Exonucleasa 5'-3' del cebador de DNA y fragmentos de Okazaki.	Estimulación de su actividad de endonucleasa	Humanos	Li <i>et al.</i> , 1995 y Wu <i>et al.</i> , 1996
DNA ligasa I	Une los fragmentos de Okazaki de DNA.	Afecta la síntesis de DNA por pol $\delta$ y $\epsilon$	Humanos	Levin <i>et al.</i> , 1997

**CICLO CELULAR**

p21 (CIP1, WAF1)	Inhibidor de la actividad del complejo ciclina/Cdk	Inhibe selectivamente la replicación del DNA	Humanos	Waga <i>et al.</i> , 1994
Ciclina D	Ciclina de G1; activa a Cdk	Inhibe la replicación de DNA	Humanos	Xiong <i>et al.</i> , 1992
Cdk2	Cinasa que participa en la transición G1/S y G2	Desconocido	Humanos	Koundriockoff <i>et al.</i> , 2000

**REPARACIÓN DEL DNA**

GADD45	Desconocida; detención del crecimiento y gen inducido por daño al DNA.	Desconocido	Humanos	Hall <i>et al.</i> , 1995
MyD118	Desconocido; gen de respuesta a la diferenciación terminal.	Desconocido	Humanos	Vairapandi <i>et al.</i> , 1996
MLH1, MSH2	Reparación de DNA cuando hay mal apareamiento de bases.	Estimula la reparación del mal apareamiento de bases	Humanos y levaduras	Umar <i>et al.</i> , 1996
XP-G	Endonucleasa; escisión-reparación.	Estimula la reparación de DNA por escisión de nucleótidos. Induce resíntesis del DNA	Humanos	Gary <i>et al.</i> , 1997
DNA metil-transferasa	Metilación de citosinas en el DNA.	Blanco de un DNA sintetizado	Humanos	Chuang <i>et al.</i> , 1997
Uracil-DNA glicosilasa	Reparación del DNA por escisión de bases; remueve un uracilo del DNA.	Desconocido	Humanos	Muller y Cardonna, 1996

Tabla 1. Proteínas que se asocian a PCNA (Modificada de Tsurimoto, 1998)

## 1.4 Ciclo celular

### 1.4.1 Generalidades del ciclo celular

La división celular es un proceso fundamental que todos los organismos vivos realizan, pero solo los eucariotes han hecho uso de una separación temporal entre la replicación del DNA (fase S) y la segregación de los cromosomas (fase M); ambas etapas están divididas por las fases G1 y G2 respectivamente. En la fase G1 del ciclo celular, se determina si las células tienen las condiciones tanto ambientales como los factores de crecimiento necesarios para iniciar la replicación del DNA; en la fase G2 se revisa que todo el DNA haya sido duplicado fielmente (Hartwell y Weinert, 1989). De esta manera se asegura que la segregación del material genético sea correcta.

Las principales proteínas que controlan el ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y sus subunidades reguladoras llamadas ciclinas. Debido a la importante función que tienen, las Cdks deben ser finamente reguladas. Como su nombre lo indica, requieren de una ciclina para ser activadas. La ciclina, además de activar a la Cdk, también ayuda a su estabilización, a su localización celular y le confiere especificidad de sustrato (Pines, 1995). La actividad del complejo es también regulada por fosforilación y desfosforilación y el complejo es totalmente activo solo después de que es fosforilado en la Thr 160 ó 161 (Draetta *et al.*, 1988; Krek y Nigg, 1991) y desfosforilado en Thr14 y Tyr 15 (Gould y Nurse, 1989).

En mamíferos existen varias clases de ciclinas y Cdks que actúan en diferentes etapas del ciclo celular. Las Cdks han sido clasificadas de acuerdo a los aminoácidos que tienen en el sitio de unión a ciclinas (tabla 2). Las Cdks responsables para la progresión de la fase G1 y entrada a la fase S son las Cdk4 y Cdk6, las cuales son activas en presencia de las ciclinas tipo D; en la transición G1/S el complejo activo está formado por Cdk2 unida a ciclina E principalmente; posteriormente se requiere de la función de Cdk2 unida a ciclina A en la fase S; en la fase G2/M el complejo activo es el de Cdk1 (ó Cdc2) unido a ciclina A o bien unido a ciclina B. La función de cada uno de los complejos en las diferentes etapas del ciclo celular permite que los procesos se realicen de manera controlada y ordenada para que la división celular se lleve a cabo exitosamente.

## INTRODUCCIÓN

Tipos de Cdk	Dominio de unión a ciclina	Ciclina asociada	Fase donde actúa
Cdk1	EGVPSTAIRESILLKE	A, B	G2/M
Cdk2	EGVPSTAIRESILLKE	A, E	G1/S, S
Cdk3	EGVPSTAIRESILLKE	(?)	G1?
Cdk4	GGLPV/ISTVREVALLR	D	G1/S
Cdk5	EGVPSSALREICLLKE	p35	DIFERENCIACIÓN NEURONAL
Cdk6	EGMPLISTREVAVLRH	D	G1
Cdk7	NI/FTALRE	H	TODO EL CICLO CELULAR (?)

Tabla 2. Clasificación de las cinasas dependientes de ciclina de humanos.

( Modificada de Hutchison *et al.*, 1995 )

### 1.4.2 Fase G1

En la fase G1 del ciclo celular, las células son capaces de integrar la información sobre la disponibilidad de nutrientes, condiciones ambientales, estado de desarrollo, así como también la información intracelular para determinar si van a proliferar. Estos eventos ocurren antes del punto de restricción ( R ); si los factores de crecimiento son insuficientes las células no pasan este punto y entran en un estado quiescente (G0). Cuando las células tienen los factores necesarios para proliferar, se rebasa el punto R y las células se preparan para iniciar el ciclo celular.

La integración de esta información opera a través de controles que repercuten directamente sobre las ciclinas de tipo D, cuya transcripción es totalmente dependiente de suero o factores de crecimiento (Matsushime *et al.*, 1991; Ajchenbaum *et al.*, 1993; Ando *et al.*, 1993).

Las ciclinas tipo D se unen y activan a las cinasas dependientes de ciclinas Cdk4/6, las cuales fosforilan a la proteína de retinoblastoma (pRB) (Sherr, 1993, 1994). pRB es la proteína que controla la entrada a ciclo celular mediante la inhibición del factor transcripcional E2F (Grana et al., 1998; Stiegler et al., 1998) y el reclutamiento de la histona desacetilasa (HDAC1) (Ferreira et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). E2F y HDAC1 se pueden unir simultáneamente a pRB, pero solo cuando está en su estado hipofosforilado (Ferreira et al., 1998).

El reclutamiento de HDAC 1 por pRB permite la desacetilación de histonas, lo que provoca que se asocien fuertemente al DNA, impidiendo con ello que los factores transcripcionales puedan activar la transcripción (Ferreira et al., 1998).

E2F al estar unido a pRB es inactivo, pero cuando pRB es fosforilado por el complejo ciclina D/Cdk4/6, E2F se libera, lo que permite la activación de la transcripción de genes como E2F, Cdk2 y Cdk4, ciclina A, D y E, pRB, HDAC y muchos de los genes que son requeridos para la síntesis de DNA como PCNA, la DNA polimerasa  $\alpha$  y la ribonucleótido reductasa (Black y Azizkhan, 1999). Una vez que pRB ha sido fosforilada, la ciclina D se degrada y la cinasa se inactiva lo que permite la entrada a la fase S del ciclo celular (Sherr, 1994).

Las ciclinas tipo E se acumulan en la fase G1 tardía, formando un complejo activo con Cdk2 que acelera la fosforilación de pRB (Koff et al., 1992; Resnitzky y Reed, 1995). Si bien en sus fases iniciales el paso de G1 a S requiere del complejo Cdk4/ciclina D, el complejo Cdk2/ciclina E activo es vital para culminar con la transición G1/S.

### 1.4.3 Fase S

La ciclina E es degradada al inicio de la fase S (Koff et al., 1992). En este momento se empiezan a sintetizar las ciclinas tipo A, las cuales se asocian y activan a Cdk2 para permitir la progresión de la fase S (Pagano et al., 1992). No se conoce exactamente cual es la función de esta cinasa; sin embargo, se ha determinado por ensayos de inmunoinhibición y sobreexpresión de ciclina A, que es una proteína esencial para la iniciación y la progresión de la fase S (Girard et al., 1991; Resnitzky et al., 1995).

El complejo Cdk2/cyclin A se ha encontrado unido a los focos de replicación (Cardoso et al., 1993). Además, se ha demostrado que fosforila a la subunidad pequeña de la proteína de replicación A (RPA) (Pan et al., 1994); se ha propuesto que después de que la replicación se lleva a cabo, Cdk2-ciclina A fosforila a RPA, lo que ocasiona que RPA se disocie del DNA y se transloque

a citoplasma, por lo que de esta manera se evita una segunda ronda de replicación. Los niveles de Cdk2/ciclina A decrecen al inicio de la fase G2, lo que permite que RPA se desfosforile y que pueda unirse nuevamente al DNA, posiblemente para participar en la reparación del DNA.

También durante la fase S, Cdk2/ciclina A forma un complejo cuaternario con p107, una proteína estructuralmente relacionada con pRB que también une a E2F. Es posible que la actividad de Cdk2/ciclina A sea necesaria para mantener hiperfosforilada a p107 para que continúe la transcripción de los genes de fase S (Shirodkar *et al.*, 1992; Devoto *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993).

#### 1.4.4. Fase G2

Para entrar a mitosis, se debe activar el factor promotor de mitosis (MPF), compuesto por Cdk1/ciclina B (Nurse, 1990). La ciclina B se empieza a acumular al final de la fase S y se une a Cdk1; sin embargo, la unión de ciclina B no es suficiente para activar a Cdk1, ya que el complejo se mantiene en un estado inactivo durante la fase G2, esto debido a que Cdk1 es fosforilada por las cinasas Wee/Myt en los residuos de tirosina 15 y treonina 14, lo que provoca su inhibición (Dunphy, 1994; Morgan, 1995). Después de que se realiza correctamente la replicación del DNA, el complejo Cdk/ciclina B es desfosforilado en los residuos de tirosina 15 y treonina 14 por la fosfatasa Cdc25 (Millar *et al.*, 1991), lo que permite tener un complejo activo.

#### 1.4.5 Fase M

Durante la mitosis ocurren una serie de cambios morfológicos que permiten que se lleve a cabo la citocinesis, como la ruptura y disgregación de la envoltura nuclear, la condensación de cromosomas y la separación de las cromátidas hermanas. El complejo Cdk1/ciclina B fosforila algunos de los componentes que regulan reorganización de la arquitectura de la célula durante la mitosis; así por ejemplo, Cdk1/ciclina B fosforila las subunidades de la lámina nuclear para que se de el desensamblaje de la envoltura nuclear (Peter *et al.*, 1990); también fosforila a la proteína histona H1 para que se disocie del DNA (Jerzmanowski y Cole, 1992; Reeves, 1992), lo que permite la acción de la topoisomerasa II para la condensación de la cromatina. Otro sustrato del complejo MPF es la proteína caldesmon, cuya fosforilación debilita su interacción con actina, induciendo con ello la disociación de los microfilamentos (Yamashiro *et al.*, 1990). Finalmente, se ha propuesto que la disminución de la transcripción durante mitosis puede ser mediada por Cdk1/ciclina B (Gottesfeld *et al.*, 1994).

Por otra parte, tanto Cdk1/ciclina A como Cdk1/ciclina B son capaces de incrementar la formación de microtúbulos de centrosomas aislados (Booher y Beach, 1988; Ohta *et al.*, 1993), eventos que preparan a la célula para dividirse.

La salida de mitosis requiere de la separación de los cromosomas, el desensamblaje del huso mitótico y la citocinesis. El inicio y coordinación de estos procesos están controlados por el complejo promotor de anafase (APC)/ciclosoma, el cual induce la separación de los cromosomas y el desensamblaje del huso mitótico por medio de la degradación de inhibidores de anafase; además, promueve la salida de mitosis mediante la degradación de las ciclinas mitóticas. La degradación de las ciclinas A y B dependen de una pequeña secuencia que conservan estas proteínas llamada caja de destrucción; este dominio es similar pero no idéntico entre la ciclina A y B, diferencia que permite que la degradación de estas ciclinas sea de manera secuencial, primero se degrada ciclina A en metafase y posteriormente se degrada ciclina B en anafase. (Koepp *et al.*, 1999).

#### **1.4.6 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs)**

La actividad de los complejos Cdk/ciclinas, además de ser regulada por fosforilación, es controlada por proteínas inhibidoras de Cdks (CKIs). En células de mamíferos, dos clases de CKIs, la familia de las proteínas Cip/Kip y la familia de las proteínas Ink4, pueden detener el ciclo celular en respuesta a señales extracelulares e intracelulares (Harper y Elledge, 1996).

Los miembros de la familia de las proteínas Ink4, son: p15, p16, p18 y p19; estas proteínas inhiben solamente a los complejos Cdk4/6-ciclina D. Los inhibidores de este tipo se unen a las Cdks y previenen la unión de su ciclina y de ATP (Brotherton *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998). La proteína p15 es inducida por TGF- $\beta$  para detener el ciclo en G1; la proteína p16 se acumula progresivamente con la edad de las células; por otro lado p18 y p19 son expresadas durante el desarrollo fetal y pueden tener funciones importantes en el proceso de diferenciación terminal.

Las proteínas de la familia Cip/Kip incluyen a p21, p27 y p57, las cuales inhiben a los complejos Cdk2/ciclina E y Cdk4/6 ciclina D involucrados en el control de las fases G1 y G1/S. Las CKIs son reguladas a muchos niveles. La proteína p21 es controlada a nivel transcripcional por p53, un factor transcripcional que detiene el ciclo celular en respuesta a daño de DNA (Harper y Elledge, 1996). Este factor transcripcional también es importante en la activación de p15 (Hannon y Beach, 1994).



En algunos tipos celulares, las señales extracelulares inducen cambios en los niveles de p27 (Kato *et al.*, 1994), algunas veces a nivel traduccional (Hengst y Reed, 1996) o bien por inhibición de la degradación dependiente de ubiquitinación (Pagano *et al.*, 1995).

Los primeros estudios acerca de la función de estas proteínas mostraron que se unen al complejo Cdk/ciclina ya formado, lo que provoca un cambio conformacional en su sitio catalítico, inhibiendo con ello la actividad de cinasa. Sin embargo, Labaer *et al.*, (1997), demostraron que p21 y p27 se unen a las ciclinas y a las Cdks y promueven el ensamblaje del complejo Cdk/ciclina. Al respecto, Zhang *et al.* (1994) sugieren que p21 puede actuar como un factor de ensamblaje cuando solo una molécula del inhibidor se une al complejo Cdk/ciclina y que la inactivación de la cinasa requiere de más de una molécula de p21. Sin embargo, Hengst *et al.* (1998) reportan que la completa inhibición del complejo Cdk/ciclina se presenta con una sola molécula de p21, por lo que la inactivación de la cinasa esta determina por la fracción del complejo Cdk/ciclina que se asocia a p21 y no por la estequiometría del inhibidor unido a la cinasa.

Recientemente se ha publicado que p21 ayuda al complejo Cdk/ciclina a entrar a núcleo. Además, se ha reportado que p21 promueve la acumulación nuclear del complejo Cdk/ciclina a través de la inhibición de la fosforilación de ciclina D en el residuo de treonina 286, fosforilación que es importante para la exportación de ciclina D a citoplasma para su posterior degradación (Alt *et al.*, 2002 ).

### 1.5 Ciclo celular en plantas

En plantas, los mecanismos básicos que controlan el ciclo celular se han conservado; sin embargo, su regulación es diferente debido a que las células de las plantas son totipotenciales y están controladas por fitohormonas (Jacobs, 1995, Coenen y Lomax, 1997; Meyerowitz, 1997). Los trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana*, tabaco, alfalfa, chícharo y maíz han demostrado que en plantas existen cinco tipos de Cdks y por lo menos cuatro familias de ciclinas (Renaudin *et al.*, 1996; Joubes *et al.*, 2000) que han sido clasificadas en cinco grupos: A, B, D y H de acuerdo a la homología que presenta su dominio de ciclinas con las ciclinas de mamíferos (Renaudin *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000).

Las ciclinas tipo A y B son ciclinas mitóticas (Reichheld *et al.*, 1996; Mironov *et al.*, 1999). La ciclina A de *A. thaliana*, maíz y soya parece actuar en la transición G2/M (Hata *et al.*, 1991;

## INTRODUCCIÓN

Renaudin *et al.*, 1994), mientras que la ciclina B se acumula durante la fase G2 y al inicio de la fase M. La destrucción de las ciclinas A y B en un punto específico durante la mitosis es esencial para que el ciclo celular concluya exitosamente (Huntley y Murray, 1999).

Las ciclinas tipo D, al igual que las de humanos, también presentan una expresión dependiente del ciclo celular y controlan la entrada a ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento y nutrientes (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). Existen varios tipos de ciclinas D. En *A. thaliana* la ciclina D3 es inducida por citocininas; además, explantes de hojas de plantas que sobreexpresan ciclina D3 pueden iniciar y mantener la división celular en ausencia de citocininas, implicando con ello que su expresión es necesaria para la activación del ciclo celular (Soni *et al.*, 1995; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

La sacarosa también está implicada en la regulación de estas proteínas; el gen de ciclina D4 de *A. thaliana* es inducido por sacarosa, así como también los genes de ciclina D2 y ciclina D3 (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que las ciclinas tipo D de plantas, tienen un papel importante como mediadores de los estímulos ambientales para iniciar el ciclo celular.

Recientemente, en tabaco se aislaron dos genes de ciclinas tipo D con características inusuales; ya que su transcrito se acumula durante la mitosis, lo cual no es común para este tipo de proteínas (Sorrell *et al.*, 1999). Las ciclinas tipo H han sido recientemente caracterizadas en álamo y arroz (Yamaguchi *et al.*, 2000).

Las cinasas dependientes de ciclina (Cdk) de plantas han sido aisladas y clasificadas en cinco grandes grupos de acuerdo a la conservación del motivo de unión a la ciclina (Tabla 3).

Tipos de Cdk	Dominio de unión a ciclina	Ciclina asociada	Fase donde actúa	Especies en donde se han descrito
Cdk A	<b>PSTAIRE</b>	D	G1/S, G2/M	<i>A. thaliana</i> , <i>Antirrhinum majus</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Pisum sativum</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>
Cdk B	<b>PPTALRE, PPPTLRE</b>	A, B	G2/M	<i>A. thaliana</i> , <i>Antirrhinum majus</i> , <i>Medicago sativa</i> y <i>Oryza sativa</i>
CdkC	<b>PITAIRE</b>	ND	ND	<i>A. thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i> y <i>Medicago sativa</i>
CdkD	<b>N(I/F)TALRE</b>	H?	ND	<i>A. thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>
CdkE	<b>SPTAIRE</b>	ND	ND	<i>Medicago sativa</i>

Tabla3. Clasificación de las cinasas dependientes de ciclina de plantas. (Modificada de Mironov *et al.*, 1999).

## INTRODUCCIÓN

La Cdk tipo A de plantas es estructuralmente homóloga a cdc2 de mamíferos, ya que conserva los aminoácidos PSTAIRE en el motivo de unión a ciclina. Sin embargo, a diferencia de la cdc2 de mamíferos, los niveles del transcrito y de la proteína Cdk A no presentan una expresión preferencial en alguna fase del ciclo celular y son detectados a niveles muy bajos en células de tejidos no proliferativos (Colasanti *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1991; Hirt *et al.*, 1993). Se ha determinado que Cdk A es activa en las fases G1/S y G2/M del ciclo celular (Mironov *et al.*, 1999; Joubes, 2000).

Actualmente, se han aislado los genes de Cdk A en maíz, arroz, alfalfa, soya, chícharo, tabaco y *A. thaliana* (Colasanti *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1992; Hirt *et al.*, 1993; Miao *et al.*, 1991; Fober *et al.*, 1994; Setiady *et al.*, 1996). En maíz se han aislado dos genes de Cdk A y estudios tipo "Southern blot" sugieren que hay más de dos genes para esta cinasa (Colasanti *et al.*, 1991).

En tabaco, la ciclina D y la ciclina A pueden unirse a Cdk A *in vivo*, formando complejos capaces de fosforilar *in vitro* a pRB de tabaco (Nakagami, *et al.*, 1999). En *A. thaliana*, las ciclina D2 y D3 son capaces de interactuar con Cdk A y ambos complejos pueden fosforilar a la proteína histona H1 (Healy, *et al.*, 2001).

Las Cdk tipo B poseen un motivo de unión a ciclina divergente, PPTALRE o PPTTLRE, por lo que se han dividido en dos subgrupos, Cdk B1 y Cdk B2 respectivamente. Estas proteínas son específicas de plantas y se han estudiado en alfalfa, chícharo y *A. thaliana* (Feiler y Jacobs, 1991; Newman *et al.*, 1994; Magyar *et al.*, 1997). Su patrón de expresión a nivel transcripcional, traduccional y su actividad son dependientes del ciclo celular y únicamente actúan en la transición G2/M (Mironov *et al.*, 1999). Cdk B puede ser activada tanto por ciclina A como por ciclina B (Huntley y Murray, 1999).

Recientemente se han identificado otras tres familias de Cdk (Cdk C, Cdk D y Cdk E). Estas proteínas han sido poco caracterizadas y su función en el ciclo celular no es muy clara. La Cdk C se ha encontrado en chícharo y alfalfa, ambas cinasas han sido caracterizadas por su motivo de unión a ciclina PITAIRE, también presente en una Cdk 9 de humanos (Lapidot-Lifson *et al.*, 1992). La Cdk C de alfalfa se expresa constitutivamente en cultivos celulares sincronizados (Magyar *et al.*, 1997), sin embargo, Mironov *et al.*, (1999) argumentan que no hay señal por hibridación *in situ* de Cdk C de *A. thaliana* en células que se están dividiendo. La función de estas cinasas podrá ser determinada cuando se logre conocer su subunidad reguladora.

Las Cdk's tipo D de plantas son homólogos funcionales de las cinasas activadoras de Cdk's (CAK), tienen el motivo N(I/F)TALRE en su dominio de unión a ciclinas y presentan similitud con Cdk7 de humanos. Solo dos miembros de estas proteínas han sido estudiados en plantas. Cdk D de arroz es capaz de fosforilar a CdkA de arroz, a Cdk2 de humanos y al dominio C-terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II de *A. thaliana*, semejante a como lo hace la Cdk7 (Serizawa *et al.*, 1995).

En alfalfa se ha encontrado otra Cdk que no comparte ninguna característica con las otras Cdk's, ya que su dominio de unión a ciclina es SPTAIRE, por lo que se ha clasificado como Cdk tipo E. La función de esta proteína en el ciclo celular aún no ha sido determinada (Magyar *et al.*, 1997).

### 1.5.1 Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas de plantas (ICKs)

Las proteínas inhibidoras de Cdk's (ICK) de plantas han sido poco estudiadas. El primer inhibidor fue identificado en *A. thaliana* (ICK1), este gen tiene homología con la región amino terminal del inhibidor de Cdk's de humanos tipo p27. La caracterización de ICK1 indica que es capaz de interaccionar e inhibir al complejo Cdk A/Ciclina D3 de *A. thaliana*. ICK1 es inducido por ácido abscísico (ABA) y su inducción inhibe la actividad de Cdk A; lo anterior sugiere un mecanismo por el cual ABA puede inhibir la división celular (Wang *et al.*, 1998).

Se ha reportado que plantas transgénicas que sobreexpresan ICK1 muestran una inhibición significativa en su crecimiento, una reducción en el número de células y una alteración en la morfología de las hojas. Lo anterior sugiere que la función de ICK1 es importante para el control de la proliferación en la planta (Wang *et al.*, 2000).

ICK2 es otro inhibidor aislado de *A. thaliana* que interacciona e inhibe a Cdk A. Estudios *in vitro* indican que es un inhibidor más potente que ICK1 y su patrón de expresión en la planta es diferente a ICK1 (Lui *et al.*, 2000).

Recientemente, se ha publicado que en *A. thaliana* existen dos grupos de inhibidores de Cdk's. El grupo A que comprende a los inhibidores ICK1, ICK2, ICK6 e ICK7, los cuales se asocian con Cdk A y con las ciclinas D1, D2, y D3; mientras que el grupo B (ICK4, ICK5 e ICKcr), se asocian con las ciclinas D pero no con Cdk A (Zhou *et al.*, 2002).

## 1.6 Antecedentes

En maíz, se ha determinado que en la etapa final de la embriogénesis un alto porcentaje (80 %) de las células meristemáticas del eje embrionario quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Daltour y Jacquard, 1974; Conger y Carabia, 1976). Esto implica que al inicio de la germinación, estas células tienen que reactivar su ciclo celular y prepararse para que se lleve a cabo la primera ronda de división celular y con ello se desencadene la proliferación celular para originar una nueva plántula.

Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en donde se han estudiado algunas proteínas que tienen funciones importantes en el ciclo celular y en el metabolismo de DNA durante la germinación de maíz.

Se ha determinado que al inicio de la germinación ocurren procesos de reparación de DNA y no es sino hasta después de las 12 h que se inicia la replicación del DNA nuclear, por lo que podemos decir que en este momento las células están en la fase S del ciclo celular; consecuentemente, la primera ronda de división celular se inicia alrededor de las 28 h (Baiza, 1989). Cuando la germinación se lleva a cabo en presencia de una citocinina como es la benciladenida (BA), se estimula y adelanta la replicación de DNA, provocando que ésta se inicie entre las 4 y 6 h después de la imbibición y que la aparición de las primeras figuras mitóticas ocurra hacia las 15 h (Reyes- Jiménez *et al.*, 1991).

Algunas de las proteínas de ciclo celular que han sido estudiadas en maíz son la ciclina D, ciclina B y E2F; estas proteínas están presentes en la semilla seca y cuando se inicia la germinación la concentración de algunas de ellas fluctúa; así por ejemplo, los niveles de la ciclina D se incrementan en las primeras horas de germinación y después de las 15 h (cuando una gran población celular está en fase S) se empieza a degradar gradualmente hasta que desaparece totalmente hacia las 24 h; cuando la germinación es estimulada con BA, la proteína se acumula en tiempos más tempranos respecto a los encontrados en germinación normal y por lo tanto su degradación se inicia alrededor de las 6 h (Cruz-García *et al.*, 1998).

Otra proteína que ha sido estudiada es el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Se ha aislado el cDNA de PCNA de maíz (Zm PCNA), el cual codifica para una proteína de 263 aminoácidos y con un peso molecular de 29 342 Da. A nivel de aminoácidos Zm PCNA tiene un 95 % de identidad y 99 % de similitud con la secuencia de PCNA de arroz y 62 % de identidad y

INTRODUCCIÓN

91 % de similitud con la secuencia de PCNA de humanos. PCNA de maíz contiene un posible dominio de unión a DNA entre los residuos de arginina 61 y arginina 80, el cual tiene un 65 % de identidad y 100 % de similitud con una región equivalente de PCNA de humanos; además, conserva los sitios de unión a ciclina D y a p21 (López et al., 1995 y 1997).

ZmPCNA MLELRVQGS LLKKVLEAIR ELVNDANFDC SGTGFSLQAM DSSHVALVAL LLRAEGFEHY  
HsPCNA MFEARLVQGS ILKKVLEALK DLINZACWDI SSSGVNLQSM DSSHVSLVQL TLRSEGFDTY  
OsPCNA MLELRVQGS LLKKVLEAIR ELVTDANFDC SGTGFSLQAM DSSHVALVAL LLRSEGFERY

ZmPCNA RCDRNLSMGM NLNNMAKMLR CAGNDDIITI KADDGSDTVT FMFESPKQDK IADFEMKLM  
HsPCNA RCDRNLMGV NLTSMSKILK CAGNEDIITL RAEDNADTLA LVFEAPNQRK VSDYEMKLM  
OsPCNA RCDRNLSMGM NLNNMAKMLR CAGNDDIITI KADDGSDTVT FMFESFNQDK IADFEMKLM

ZmPCNA IDSEHLGIPD SEYQAVRMP SSEFMRICRD LSSIGDTVI SVTKEGVKFS TSGEIGSANI  
HsPCNA LDVEQLGIPE QEYSCVVKMP SGEFARICRD LSHIGDAVVI SCAKDGVKFS ASGELGNANI  
OsPCNA IDSEHLGIPD SEYQAVRMP SSEFSRICRD LSSIGDTVII SVTKEGVKFS TAGDIGTANI

ZmPCNA VCRQNTIDK PEEATTIEMQ EPVSLTFALR YMNSFTKASS LSEQVTISLS SELPVVVEYK  
HsPCNA KLSQTSNVDK EEEAVTIEMN EPVQLTFALR YLNFFTKATP LSSTVTLSMS ADVPLVVEYK  
OsPCNA VCRQKRTVDK PEDATTIEMQ EPVSLTFALR YMNSFTKASP LSEQVTISLS SELPVVVEYK

ZmPCNA IAEMGYIRFY LAPKIEDEE MKP  
HsPCNA IADMGHLKYY LAPKIEDEEG S  
OsPCNA IAEMGYIRFY LAPKIEDEE MKS



Figura C. Análisis de la secuencia de PCNA de maíz.

Comparación de los dominios funcionales de PCNA de maíz (ZmPCNA) con PCNA de humanos (HsPCNA) y PCNA de arroz (OsPCNA). En rojo se muestran los dominios de unión a ciclina D; en rosa se muestra el asa conectara del interdominio necesario para la estimulación de la DNA polimerasa  $\delta$  y para la unión de p21, Fen 1 ó DNA ligasa I; subrayado se muestra el dominio central y el ácido aspartico (97), importante para la unión de RFC.

## INTRODUCCIÓN

La proteína de PCNA está presente en semilla seca y se incrementa durante la germinación presentando un nivel máximo alrededor de las 20 h, tiempo en el cual está ocurriendo la replicación del DNA; sin embargo, cuando la germinación es estimulada por BA, la concentración máxima de la proteína se presenta a las 6 h de germinación, coincidiendo con el inicio de la replicación del DNA bajo estas condiciones. Cuando la germinación es inhibida con ABA, la cantidad de proteína no cambia de forma importante durante la imbibición y, en este caso, la replicación del DNA se inhibe (Herrera *et al.*, 2000).

En mamíferos, PCNA es una proteína que ha sido estudiada por muchos grupos de investigación; actualmente se sabe que es capaz de formar un complejo cuaternario con ciclina D, Cdk y p21 y además puede asociarse con otras proteínas que participan en el metabolismo del DNA. El cDNA de PCNA se ha aislado de arroz, zanahoria, *Catharanthus roseus* y tabaco (Suzuka *et al.*, 1989; Kodama *et al.*, 1991; Hata *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1994); sin embargo, los reportes de PCNA en plantas se han enfocado básicamente a estudiar la regulación y expresión del gene, por lo que hay pocos estudios acerca de los complejos que forma la proteína. Por lo anterior, este proyecto está enfocado a determinar las asociaciones que presenta PCNA durante la germinación de maíz, así como el efecto que tienen algunos fitorreguladores (que aceleran o inhiben la germinación) sobre la formación de estos complejos.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que PCNA de maíz conserva los dominios de unión a ciclina D caracterizados en PCNA de mamíferos, formará un complejo con ciclina tipo D y su cinasa respectiva (Cdk A), el cual variará en su composición durante el desarrollo del ciclo celular que ocurre en la germinación de maíz.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los complejos proteicos que forma PCNA durante la germinación de maíz y determinar el efecto que tienen algunos fitorreguladores que inhiben o estimulan la germinación, sobre la formación de estos complejos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener anticuerpos policlonales dirigidos contra PCNA de maíz.
- Determinar si PCNA se asocia a una ciclina tipo D en maíz.
- Estudiar el comportamiento del complejo PCNA-ciclina, durante la germinación de maíz en ausencia y presencia de BA o ABA.
- Caracterizar la actividad de cinasa asociada a los complejos formados con PCNA.
- Determinar la actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación de maíz y la germinación estimulada o inhibida por fitorreguladores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presentan los materiales y métodos que no están reportados en el artículo. El presente trabajo se realizó con ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* cv. Chalqueño).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron: Un anticuerpo policlonal dirigido contra la ciclina D1 de humanos (H-295 de Santa Cruz Biotechnology Inc.); un anticuerpo policlonal dirigido contra la secuencia PSTAIRE de Cdc2 de humanos (sc-53 de Santa Cruz Biotechnology Inc.); un anticuerpo monoclonal dirigido contra PCNA de humanos (PC-10 de Santa Cruz Biotechnology Inc.), este anticuerpo sólo se utilizó para identificar a Zm PCNA recombinante y el anticuerpo policlonal dirigido contra PCNA de maíz, obtenido en este trabajo.

### 2.1 Clonación de PCNA en marco de lectura

El cDNA de PCNA de maíz (Zm PCNA) (López *et al.*, 1995) fue amplificado por PCR para obtener un cDNA en marco de lectura. Para realizar el PCR se utilizaron los siguientes cebadores:

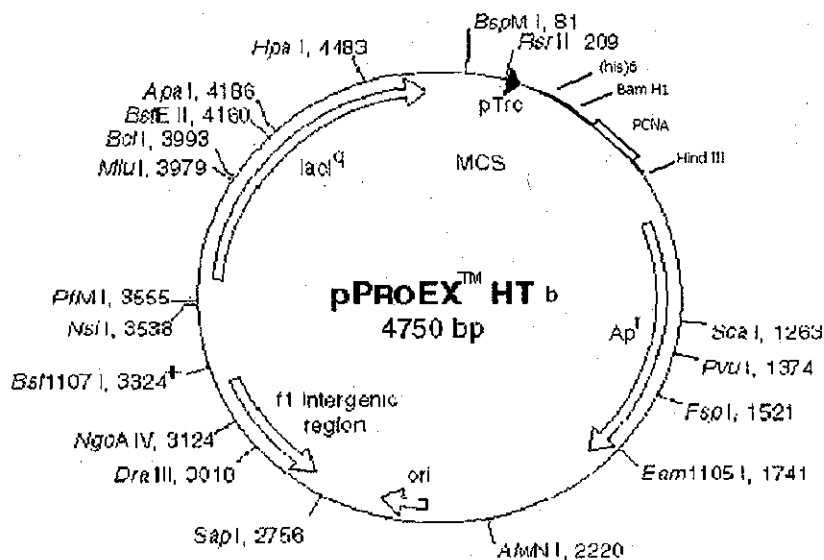
"Forward" 5' TGAAAGCTTTCATGGCTTCATCTC 3'

"Reverse" 5'GCCGGATCCATGTTGGAGCTGCCGGCTT 3'

La reacción de PCR se realizó con 100 ng de plásmido que contenía el cDNA de Zm PCNA, 0.28  $\mu$ M de cada uno de los cebadores, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, amortiguador de PCR (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl pH 8.3) y 1.65 U de Taq Polimerasa (Boehringer Mannheim). Las condiciones de amplificación para los 3 primeros

ciclos fueron: 1 min a 94°C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; para los siguientes 27 ciclos fueron 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72 °C.

Los cebadores tenían secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción Bam HI y Hind III respectivamente, lo que permitió la clonación del producto de PCR en marco de lectura en el vector de expresión pPROEX HTb (Gibco-BRL), el cual tiene la característica de adicionar una secuencia de 6 histidinas extras en la región amino terminal de la proteína clonada (figura D). Con este vector recombinante se transformaron células de *E coli* BL21 pLys. Las células se cultivaron en medio LB con 50 µg/µl de ampicilina.



**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Figura D. Esquema del vector pPROEX HTb.

Vector que se utilizó para la clonación de Zm PCNA en marco de lectura.

Para corroborar la presencia del cDNA de PCNA en las células transformadas, las colonias resistentes a ampicilina fueron transferidas a una membrana de nylon (hybond N<sup>+</sup>) para realizar un "Southern blot". La membrana fue hibridada con el cDNA de Zm PCNA, el cual fue marcado con α-P<sup>32</sup> dCTP (1.1 MBq), para ello se utilizó el equipo de Random Primer de NEN.

La hibridación se realizó con el amortiguador de 0.3 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2, 0.7 % de SDS y 1 mM de EDTA a 60 °C. La membrana se lavó dos veces con una solución de 0.1 % de SDS y 0.1 X de SSC (3 M de NaCl, 0.3 M de Citrato de Na, pH 7) a 60 °C, posteriormente la membrana se expuso a una película de rayos X. De las colonias positivas se purificó el plásmido y se determinó la presencia del cDNA de PCNA por experimentos tipo "Southern blot" siguiendo las condiciones descritas anteriormente.

## 2.2 Sobreexpresión y purificación de PCNA

Para sobreexpresar a PCNA de maíz en *E coli*; las células transformadas con el cDNA de PCNA se cultivaron en medio LB con 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ampicilina a 30 °C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 0.6; después se adicionó al cultivo 0.5 mM de IPTG para inducir la expresión de PCNA. Las células se incubaron por 3 h más.

La presencia de la proteína de PCNA se determinó por medio de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 11 % teñido con azul de Coomassie y por ensayos de "western blot", utilizando un anticuerpo dirigido contra PCNA de humano.

La purificación de la proteína se realizó utilizando el sistema de expresión ProExt™ HT (Gibco-BRL). El paquete celular se resuspendió en 40 ml de amortiguador de lisis que tenía 50mM de Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM de  $\beta$ -mercapto etanol, 80 mg de lisozima y 1 tableta de inhibidores de proteasas Complete™ (Boehringer) y se incubó por 2 h a 4 °C en agitación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10,000 rpm por 15 minutos.

La clonación en marco de lectura en el vector pPROEX HTb generó una proteína de fusión con una secuencia que codifica para 6 histidinas extras en la región amino terminal de la proteína clonada, lo que permitió la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad con una columna de níquel. El extracto soluble se pasó a través de una columna de níquel previamente equilibrada con un amortiguador que tenía 20 mM de Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM de  $\beta$ -mercapto etanol, 100 mM de KCl, 10 % de glicerol y 20 mM de imidazol. El PCNA recombinante fue eluído de la columna con el mismo amortiguador pero que contenía 100 mM de imidazol.

### 2.3 Obtención de anticuerpos anti-PCNA

Como la proteína PCNA de maíz tiene una secuencia altamente conservada entre eucariotes, esta proteína tuvo que acoplarse a hemocianina para dar una mayor respuesta inmune. Para realizar el acoplamiento se disolvieron 2 mg de hemocianina (Sigma) en 1 ml de PBS (1.37 M de NaCl, 27 mM de KCl, 100 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y 20 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). A esta solución se adicionó 1 ml de solución que contiene 2.5 % de glutaraldehído diluido en PBS y se incubó por 12 h a temperatura ambiente. Después se eliminó el exceso de glutaraldehído por centrifugación en tubos centrífuga de corte molecular 100 kDa. La proteína PCNA recombinante (400  $\mu\text{g}$ ) diluida en 90  $\mu\text{l}$  de PBS se mezcló con la solución de hemocianina y esta solución se incubó por 12 h a temperatura ambiente.

Para hacer la primera inmunización, dos preparaciones de PCNA acoplada a hemocianina (800  $\mu\text{g}$ ) fueron mezcladas con 500  $\mu\text{l}$  de adyuvante completo de Freund. Una segunda inmunización se realizó a los 8 días, pero con adyuvante incompleto. La inmunización se realizó en conejos vía intramuscular durante 7 semanas repitiendo el esquema anterior.

Los anticuerpos fueron titulados por "western blot" utilizando 5  $\mu\text{g}$  de PCNA recombinante y 20  $\mu\text{g}$  de extracto total de proteína de maíz.

### 2.4 Cuantificación de proteínas

Para la determinación de la cantidad de ciclina D y Cdk A durante la germinación control y en presencia de hormonas, se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína total de maíz. La cuantificación de la proteína se realizó por el método de Bradford y se corroboró que cada muestra tuviera la misma cantidad de proteína mediante geles teñidos por Coomassie.

La cuantificación de las proteínas utilizadas en los inmunoprecipitados también se realizó por el mismo método y se verificó que en cada ensayo se utilizara la misma cantidad de muestra, de tal manera que se aseguró que los cambios observados por "western blot" fueron debidos a un cambio real de la proteína de estudio.

## 2.5 Ensayos de citometría de flujo

El contenido de DNA de las células de la raíz de ejes embrionarios se determinó por citometría de flujo. Los meristemas de la raíz se cortaron finamente con una navaja en presencia de 1.5 ml de amortiguador que contiene 50 mM de Tris- HCl pH 7.5, 1 mM de  $MgCl_2$ , 0.1 % de tritón X-100 y 2 mg/ml de 4,6 diamidino-2- fenilindol (DAPI). La muestra se pasó a través de un filtro de nylon de 30  $\mu m$  para aislar los núcleos. Los núcleos teñidos fueron analizados en el citómetro de flujo Partec GMBH (Hahn Strabe 32, D-48161 Munster, Germany). En cada muestra se contaron 1500 núcleos a una velocidad de 10 núcleos por segundo. Los datos fueron procesados en el programa Multicycle versión 2.53, Phoenix Flow Systems.

## RESULTADOS

### 3.1 Obtención de anticuerpos dirigidos contra PCNA de maíz y asociación de PCNA con una ciclina tipo D

Algunos de los resultados que se presentan a continuación se publicaron en el artículo

**“Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins.”**

**Herrera, I\*, Sánchez Jiménez, M.P\*, Molina, J., Plasencia, J. and Vázquez-Ramos, J. *Physiologia Plantarum* (2000) 110:127-134.**

El asterisco significa que los autores contribuyeron igualmente en el trabajo.

El artículo se anexa en el apéndice como referencia pero no como un requisito para la obtención del grado.

#### 3.1.1 Obtención de un anticuerpo dirigido contra PCNA de maíz

La primera parte de este proyecto se enfocó básicamente a la obtención y caracterización de un anticuerpo dirigido contra PCNA de maíz; para ello el cDNA de Zm PCNA se clonó en marco de lectura en el vector de expresión ProExt™ HTb; este vector tiene el promotor *lac* de manera que se pudo inducir la expresión de Zm PCNA con IPTG. Además la proteína recombinante sintetizada contiene una secuencia de 6 histidinas lo que permitió su purificación a través de una columna de níquel. En la figura 1 A se muestra la inducción de Zm PCNA en bacterias de *E coli* BL21 pLys; en el carril 3 y 4 se observa que Zm PCNA se expresan en mayor cantidad respecto a las

## RESULTADOS

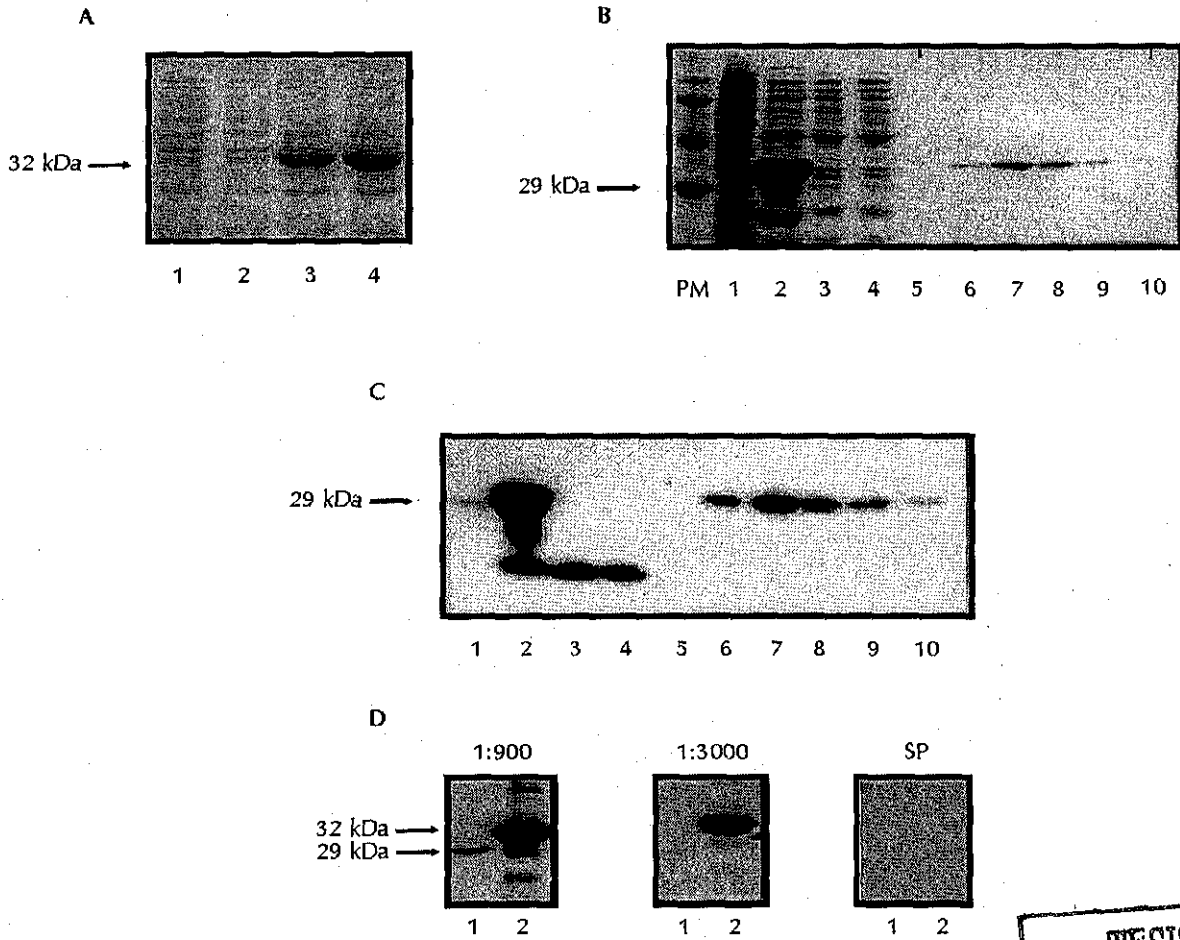
proteínas endógenas de *E. coli* (carriles 1 y 2); en la figura 1 B se presenta la purificación de Zm PCNA, en el carril 2 se muestra la inducción de Zm PCNA, en los carriles 3 y 4 las proteínas que no se unieron a la columna de níquel y en los carriles 6 al 10 se observa las fracciones de Zm PCNA purificadas.

Para confirmar que la proteína recombinante corresponde a PCNA, se realizó un "western blot" utilizando un anticuerpo heterólogo dirigido contra PCNA de humanos; en la figura 1 C se observa que la proteína purificada es reconocida por este anticuerpo, en este caso el anticuerpo reconoce además a una proteína de *E. coli* de bajo peso molecular; sin embargo, esta proteína sólo está presente en el extracto crudo y en las fracciones proteicas no unidas a la columna (carriles 2, 3, y 4). El PCNA recombinante tiene un peso molecular 3 kDa mayor que la proteína endógena de maíz (carriles 1 y 2), debido a los aminoácidos adicionales que le confiere el sistema de expresión.

La proteína recombinante se utilizó como inmunógeno para obtener anticuerpos dirigidos contra PCNA de maíz. Debido a que PCNA es muy conservada en mamíferos, fue necesario acoplar a PCNA con hemocianina, para tener una buena respuesta inmune; después de siete inoculaciones, se realizó la titulación del anticuerpo. En la figura 1 D se muestra que el anticuerpo es capaz de reconocer a la proteína recombinante y a la proteína endógena de maíz en una dilución 1:3000. El suero preinmune a una dilución 1:3000 no muestra reacción con PCNA recombinante ni con ninguna proteína de maíz.



RESULTADOS



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Sobreexpresión de Zm PCNA en bacterias y titulación de anticuerpos.

A) Inducción de Zm PCNA en células de *E. coli*, carril 1 y 2, extracto proteico de *E. coli*; carril 3 y 4, extracto proteico de *E. coli* transformada con PCNA e inducido con IPTG. B) Inducción de PCNA en células de *E. coli*, carril 1, extracto proteico de ejes de maíz germinados por 6 h; carril 2, extracto proteico de *E. coli* transformada con PCNA e inducido con IPTG; carriles 3 y 4, fracciones proteicas no unidas a la resina; carriles 5 al 10, fracciones proteicas eluidas de la columna de afinidad Ni NTA. C) "Western blot" de las mismas proteínas cargadas en B, usando un anticuerpo dirigido contra PCNA de humanos. D) Titulación de los anticuerpos dirigidos contra PCNA de maíz. El anticuerpo anti-PCNA y el suero preinmune (SP), se probaron con extractos proteicos de maíz, carril 1 y con PCNA recombinante purificada, carril 2.

### 3.1.2 Complejos formados por PCNA durante la germinación de maíz

Para estudiar los complejos que forma PCNA durante la germinación de maíz, se realizó un "western blot" bajo condiciones nativas con extractos proteicos de diferentes horas de germinación. En la figura 2 se observa que el anticuerpo dirigido contra PCNA de maíz detecta proteínas de 30 kDa, 100 kDa, 158 kDa y de 200 kDa, lo que sugiere que la banda de 30 kDa corresponde a la forma monomérica de PCNA, la banda de 100 kDa correspondería a la forma trimérica de PCNA y las bandas de alto peso molecular podrían representar complejos de PCNA con otras proteínas. Para probar lo anterior, se cortó la banda que corresponde al complejo de alto peso molecular (158 kDa) y se realizó una segunda corrida en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, el cual fue transferido a una membrana de PVDF e inmunodetectado con un anticuerpo dirigido contra ciclina D1 de humanos. En la figura 2 B se puede observar la presencia de una proteína tipo ciclina D de 52 kDa en los complejos de alto peso molecular.

Los resultados anteriores se corroboraron por ensayos de filtración en gel (figura 3); en estos ensayos se observa que cuando se utilizaron extractos proteicos de 3 h de germinación, PCNA co-eluye con ciclina D en las fracciones de 159 a 127 kDa. Cuando se utilizaron extractos proteicos de 6 h, PCNA co-eluye con ciclina D en las fracciones de 143 a 111 kDa; sin embargo, en extractos proteicos de 15 h sólo en la fracción de 159 kDa se observa las dos proteínas; lo que implica que si PCNA se une a ciclina D, el tamaño del complejo debe ser de alrededor de 159 kDa. En este caso, es probable que la asociación de ciclina D con PCNA sea muy débil debido a que después de las 6 h de germinación la ciclina D se empieza a degradar (ver figura 5).

## RESULTADOS

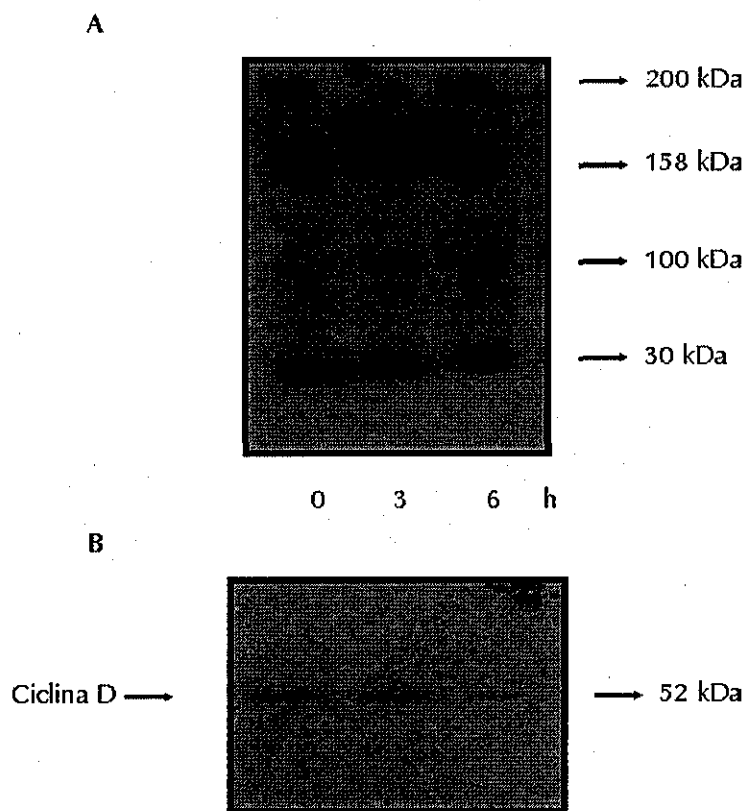


Figura 2. Formas oligoméricas de PCNA de maíz y presencia de ciclina D en los complejos que forma PCNA. A) "Western blot" realizado bajo condiciones nativas con el anticuerpo dirigido contra PCNA de maíz. 100  $\mu$ g de extractos proteicos de ejes germinados por 0, 3 ó 6 h se cargaron en cada carril. B) La proteína en la fracción de 150 kDa reconocida en (A) se corrió en un gel desnaturalizante para un análisis tipo "western blot" con anti-ciclina D.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

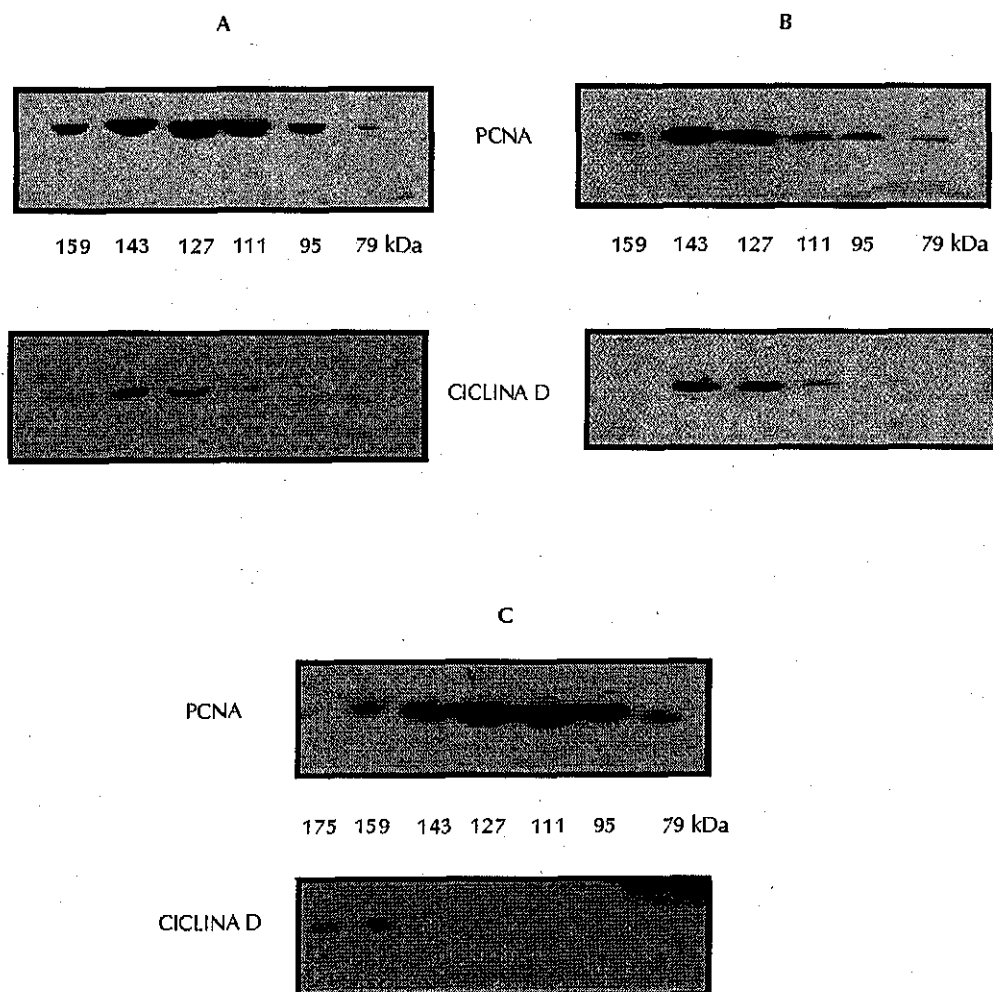


Figura 3. Detección de ciclina D en los complejos que forma PCNA durante la germinación.

Extractos proteicos de 1 g de ejes germinados por 3 h (A), 6 h (B) y 15 h (C) fueron separados por filtración en gel en una columna de Superdex 200. En cada fracción se determinó la presencia de PCNA y ciclina D por "western blot".

El resultado de la co-elución, sugiere que PCNA puede formar complejos con proteínas tipo ciclinas; sin embargo, existe la posibilidad de que la ciclina tipo D esté formando complejos del mismo tamaño pero con otras proteínas.

Para confirmar la asociación entre PCNA y ciclina D en maíz, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación, en el cual se inmunoprecipitó el extracto proteico de maíz con un anticuerpo dirigido contra la ciclina D1 de humanos. Los inmunoprecipitados se separaron en un gel desnaturante y se transfirieron a una membrana de PVDF para realizar un "western blot" con

## RESULTADOS

el anticuerpo anti-PCNA. Los resultados mostraron que PCNA de maíz se asocia a una proteína tipo ciclina D y esta asociación es específica, ya que no se observa co-inmunoprecipitación cuando se utiliza un suero preinmune (figura 4). También se realizó el experimento inverso, en el cual se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-PCNA; sin embargo, no fue posible detectar a la ciclina D en los inmunoprecipitados, debido a que tiene un peso molecular similar al de las IgGs (52 kDa), como se demostró en la figura 2.

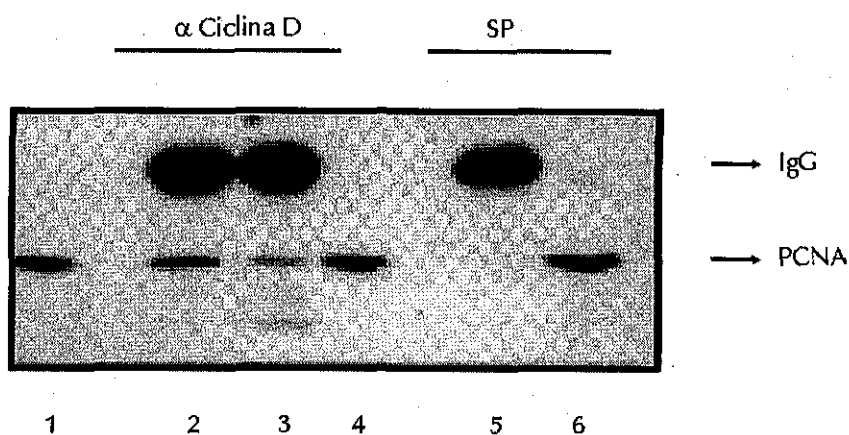


Figura 4. Asociación de PCNA con ciclina D

Extractos proteicos de ejes germinados por 3 h fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclina D ( $\alpha$  ciclina D) y suero preinmune (SP). Los inmunoprecipitados se separaron en un gel desnaturizante para la realización de un "western blot" con anti-PCNA. Carril 1, extracto total de maíz; carriles 2 y 3, inmunoprecipitados con anti-ciclina D, usando 50 y 25  $\mu$ g de extracto total respectivamente; carril 4, sobrenadante; carril 5, inmunoprecipitado con suero preinmune; carril 6, sobrenadante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.1.3 Efecto de hormonas en la asociación de PCNA con una proteína tipo ciclina durante la germinación de maíz

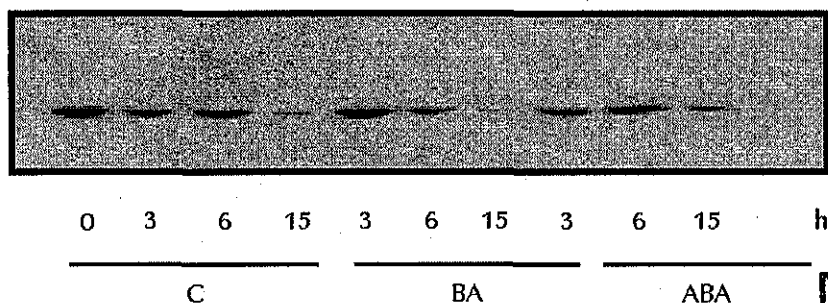
Para estudiar la asociación de PCNA con ciclina D durante la germinación normal y la germinación en presencia de BA o ABA, se determinaron los niveles de ambas proteínas bajo estas condiciones.

Durante la germinación normal la concentración de PCNA se incrementó conforme avanzó la germinación alcanzando un nivel máximo a las 20 h de imbibición. Los niveles de PCNA fueron afectados por ambas hormonas; la BA estimuló la acumulación de PCNA al inicio de la germinación observándose un pico de expresión máximo a las 6 h de imbibición (Herrera *et al.*, 2000); en

## RESULTADOS

contraste ABA inhibió la acumulación de PCNA, por lo que en presencia de esta hormona la cantidad de PCNA permaneció constante hasta las 24 h de imbibición (Herrera *et al.*, 2000).

Con respecto a la ciclina D, en la figura 5 se observa que la cantidad de esta proteína se mantienen relativamente constante hasta las 6 h de germinación normal, después de este tiempo se empieza a degradar ya que a las 15 h sólo se observaron niveles residuales de la proteína. Cuando la germinación se llevó a cabo en presencia de BA, la degradación de la ciclina se inició antes respecto a la germinación normal, pues hacia las 6 h se disminuyeron los niveles de esta proteína. En presencia de ABA, la ciclina D permanece constante hasta las 6 h, tal como sucede en la germinación normal; sin embargo, en este caso parece que la degradación es más lenta, ya que a las 15 h se detecta una concentración un poco mayor de ciclina D respecto a la germinación normal.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

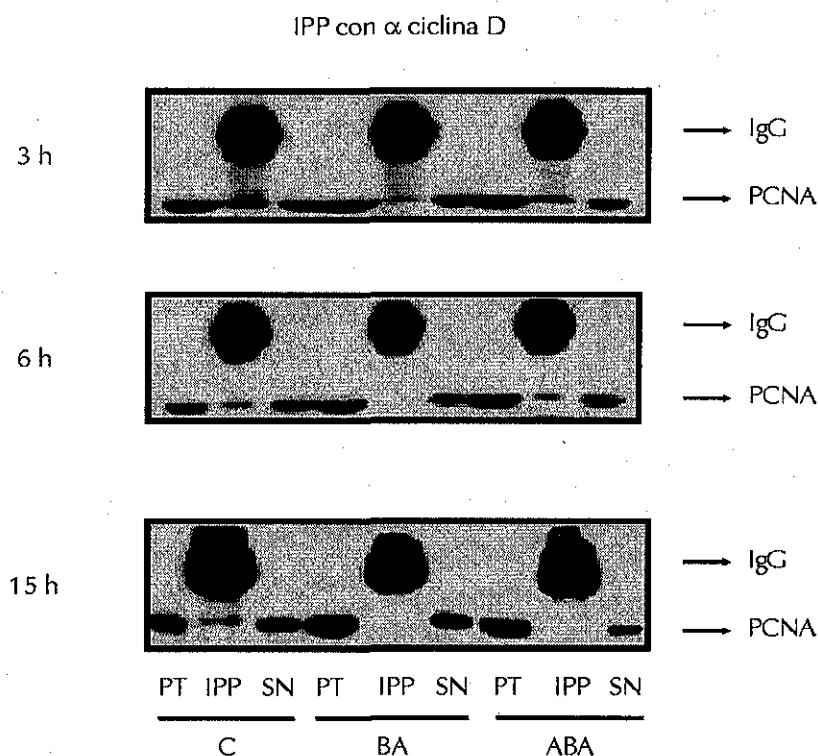
Figura 5. Cambios en los niveles de ciclina D durante la germinación de maíz, en ausencia y presencia de hormonas. 20 µg de extractos proteicos de maíz germinados por 0, 3, 6 y 15 h (control) y en presencia de benciladenina (BA) y ácido abscísico (ABA) fueron utilizados para determinar la presencia de ciclina D mediante ensayos tipo "western blot".

Para estudiar la asociación entre PCNA y ciclina D durante la germinación de maíz, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación (figura 6). El complejo está presente en las primeras 3 h de imbibición y su concentración disminuye gradualmente en tiempos tardíos de germinación; cuando se está llevando a cabo la replicación de DNA (15 h de imbibición) sólo hay una pequeña cantidad del complejo PCNA-ciclina D. Lo anterior es debido a que en este tiempo se está degradando la ciclina D.

RESULTADOS

Cuando la germinación se lleva a cabo en presencia de BA, el complejo de PCNA con ciclina D sólo se presenta a las 3 h de germinación, ya que a las 6 h no se detecta la presencia de este complejo; en este tiempo ya se está llevando a cabo la replicación del DNA, dado que la BA provoca que los eventos de la fase G1 del ciclo celular sean más rápidos (Cruz-García et al., 1998; Brault y Maldiney, 1999), por lo que el complejo desaparece horas antes (figura 6). La ausencia del complejo en este caso se debe a que la ciclina D se empieza a degradar después de las 3 h de imbibición (ver figura 5).

Un comportamiento similar ocurre cuando la germinación se lleva a cabo en presencia de ABA. A las 15 h el complejo PCNA-ciclina D ya no es detectable; sin embargo, bajo estas condiciones a las 15 h aún existe ciclina D detectable en los extractos, incluso en concentraciones un poco mayores respecto a la germinación normal.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Efecto de BA y ABA sobre los complejos que forma PCNA con ciclina D durante la germinación de maíz. 50  $\mu$ g de extractos proteicos de ejes germinados en presencia de BA, ABA o sin hormonas (C) por 3, 6 y 15 h fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ciclina D1. Los inmunoprecipitados se analizaron por ensayos tipo "western blot" con el anticuerpo anti-PCNA. PT, proteína total; IPP, inmunoprecipitados; SN, sobrenadantes.

### 3.2 Asociación de una cinasa dependiente de ciclina a PCNA

La caracterización de una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) que se asocia a PCNA se presenta en el siguiente artículo

**“PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize”.**

**María de la Paz Sánchez, Alma Torres, Maria Beatrice Boniotti, Crisanto Gutierrez and Jorge M. Vázquez-Ramos.**

**Plant Molecular Biology (2002). En prensa**

En este artículo se describe la caracterización de una cinasa dependiente de ciclina tipo A (Cdk A) que está asociada a PCNA, así como la determinación de su actividad durante la germinación normal de maíz.

#### 3.2.1 Asociación de PCNA con una cinasa dependiente de ciclina (Cdk)

Como se mencionó en el capítulo anterior, PCNA de maíz se puede encontrar en forma de monómero, trímero y formando complejos de alto peso molecular con otras proteínas. La composición de los complejos varía durante la germinación; los de alto peso molecular desaparecieron hacia las 15 h, en tanto que el de 100 kDa que podría corresponder al trímero de PCNA, se incrementó conforme avanzó la germinación (figura 7). Esta observación y los resultados del capítulo anterior indican que el complejo de alto peso molecular está formado por PCNA y ciclina D; sin embargo, por los tamaños de ambas proteínas (29 y 52 kDa respectivamente) se sugiere que en este complejo, PCNA está en forma trimérica ó bien que habría otra u otras proteínas que están asociadas a este complejo.

En mamíferos, PCNA forma un complejo cuaternario con ciclina D, p21 y Cdk4 (Xiong *et al.*, 1992). Debido a que PCNA de maíz también se asocia a una ciclina tipo D (Herrera *et al.*, 2000), es muy probable que en este complejo también se encuentre presente una Cdk.

Para estudiar la asociación de PCNA/Cdk, inicialmente se determinó la presencia de Cdk tipo A durante la germinación de maíz, esto debido a que en plantas se ha reportado que las ciclinas tipo D se unen y activan únicamente a las Cdk tipo A (Joubes *et al.*, 2000). El ensayo se realizó utilizando un anticuerpo dirigido contra el dominio de unión a ciclina “PSTAIRES” que está conservado en las Cdk tipo A de maíz (Colasanti *et al.*, 1991). En la figura 8 A se muestra que este anticuerpo reconoce dos proteínas en maíz, una de 32 y otra de 36 kDa. Los niveles de la



proteína de 36 kDa aumentaron gradualmente hacia las 24 h, en cambio la proteína de 32 kDa se detectó únicamente durante las primeras horas de germinación y desapareció hacia las 15 h. El corrimiento electroforético de ambas proteínas no se afectó cuando los extractos fueron tratados con una fosfatasa alcalina, lo que elimina la posibilidad de que ambas bandas sean debidas a un estado diferencial de fosforilación de una misma proteína (figura 8 B).

La asociación entre PCNA y Cdk tipo A se estudió mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. En estos ensayos se observó que el anticuerpo anti-PCNA de maíz fue capaz de inmunoprecipitar tanto a PCNA (figura 9 A) como a las dos Cdk tipo A presentes en maíz (figura 9 B) y esta interacción es específica, ya que el suero preinmune no inmunoprecipitó ninguna proteína (figura 9 A y B, carril 2).

Debido a que p13<sup>Suc1</sup> es una proteína que se ha utilizado como una herramienta para purificar el complejo activo Cdk1/ciclina B en animales y en plantas, además de que se ha reportado que se une fuertemente a una Cdk tipo A (Brizuela *et al.*, 1987, De Veylder *et al.*, 1997), se realizó un ensayo de "pull down" con la proteína p13<sup>Suc1</sup> para hacer un análisis comparativo entre la cinasa asociada a PCNA y la cinasa asociada a p13<sup>Suc1</sup>. En la figura 9 C, se observa que p13<sup>Suc1</sup> solo se asoció a la proteína de 36 kDa.

### 3.2.2 Caracterización de la cinasa asociada a PCNA

Para corroborar que la proteína asociada a PCNA es una cinasa, se realizaron ensayos de actividad, utilizando como fuente de cinasa los inmunoprecipitados con anti-PCNA y como sustratos a la proteína histona H1, un sustrato utilizado para determinar la actividad de Cdk en mamíferos y al extremo carboxilo terminal (que contiene los aminoácidos 558 al 683) de la proteína de Retinoblastoma de maíz (Zm RBR), un sustrato de las Cdk tipo A (Boniotti y Gutierrez, 2001). En la figura 10 A, se observa que la cinasa asociada a PCNA fosforila a la histona H1; además, una proteína de 60 kDa que co-inmunoprecipita con PCNA también es fuertemente fosforilada, pero sólo cuando no se adiciona histona H1 al ensayo (figura 10 A, carriles 4-6). La cinasa asociada a PCNA también fue capaz de fosforilar a Zm RBR, ya que la región carboxilo terminal contiene varios sitios de fosforilación por Cdk (figura 10 B). En ningún caso se observa fosforilación en los inmunoprecipitados con suero preinmune.

La Cdk de plantas son sensibles a inhibidores de cinasas como son los análogos de ATP como la roscovitina y la olomoucina (Planchais *et al.*, 2000). Para determinar si la actividad de cinasa

presente en los inmunoprecipitados de PCNA es de una Cdk, se realizaron ensayos de actividad en presencia de roscovitina (figura 11 A) y olomoucina (figura 11 B).

La cinasa asociada a PCNA fue inhibida en un 50 % por roscovitina, al igual que la cinasa asociada a p13<sup>Suc1</sup>. En este caso, la actividad asociada a p13<sup>Suc1</sup> fue mayor que la actividad asociada a PCNA, lo que indica que Cdk A de maíz tiene una mayor afinidad por p13<sup>Suc1</sup>, y que solo una pequeña fracción de la Cdk A está unida a PCNA. PKI, un inhibidor de cinasas dependientes de AMPc, no fue capaz de inhibir a las cinasas asociadas a PCNA y a p13<sup>Suc1</sup>. La olomoucina, un inhibidor menos potente que la roscovitina, también inhibió drásticamente la actividad de cinasa asociada a PCNA, pero a una concentración de 30  $\mu$ M (figura 11 B). Los resultados anteriores corroboran que la cinasa asociada a PCNA es una Cdk tipo A.

### 3.2.3 Actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación de maíz

Durante la germinación, la actividad de cinasa presente en los inmunoprecipitados de PCNA cambia. En la figura 12 A, se muestra que la actividad de Cdk asociada a PCNA se incrementa gradualmente en las primeras 6 h de germinación; conforme la germinación avanza (15-24 h), la actividad disminuye dramáticamente alcanzando niveles muy bajos. En cambio, la actividad asociada a p13<sup>Suc1</sup> tiene un comportamiento totalmente diferente, ya que está presente al inicio de la germinación y se incrementa conforme la germinación avanza (figura 12 B). Los resultados anteriores indican que la actividad de Cdk A se incrementa conforme avanza la germinación; sin embargo, sólo en las primeras 6 h de germinación está asociada a PCNA; después de este tiempo la cinasa se disocia, en cambio en los ensayos de "pull down" con p13<sup>Suc1</sup> se observó que su actividad se incrementa.

### **3.2.4 Artículo**

#### **“PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize”**

María de la Paz Sánchez<sup>1</sup>, Alma Torres<sup>1</sup>, Maria Beatrice Boniotti<sup>2</sup>, Crisanto Gutierrez<sup>2</sup> and Jorge M. Vázquez-Ramos<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Avenida Universidad y Copilco, México 04510, DF, México. <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

## **"PCNA PROTEIN ASSOCIATES TO CDK-A TYPE PROTEIN KINASES IN GERMINATING MAIZE"**

María de la Paz Sánchez<sup>1</sup>, Alma Torres<sup>1</sup>, Maria Beatrice Boniotti<sup>2</sup>, Crisanto Gutierrez<sup>2</sup> and Jorge M. Vázquez-Ramos<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Avenida Universidad y Copilco, México 04510, DF, México. <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

Key words: PCNA, PSTAIRE kinase, maize, germination.

### **SUMMARY**

In higher eukaryotes, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) can be found associated to Cyclin D and Cdk4/6, the kinase complex responsible for cell cycle commitment in response to growth and mitogenic signals.

During maize germination, PCNA can be found in protein complexes between 131 and 163 kDa. The size of PCNA protein complexes seem to change during germination, so that by the time the S phase starts, a complex of MW 100 kDa (likely the homotrimeric ring) is the predominant one. PCNA complexes during early germination contain (any of) two PSTAIRE-containing protein kinases of MW 32 and 36 kDa that readily phosphorylate both histone H1 and maize retinoblastoma-related (RBR) proteins. Kinase activity in PCNA complexes is markedly inhibited by roscovitine and olomoucine, two known Cdk inhibitors. The protein p13<sup>Suc1</sup> only pulls down the 36 kDa PSTAIRE protein. Kinase activity in PCNA immunoprecipitates is maximal during early germination, before the onset of S-phase whereas kinase activity associated to p13<sup>Suc1</sup> reaches a peak at later times, when S phase is set on. We discuss the physiological repercussions of these findings.

### **INTRODUCTION**

The cell cycle in eukaryotes is controlled by a family of conserved cyclin-dependent protein kinases (Cdks) (Nigg, 1995). Cdks are a group of related serine/threonine kinases which are regulated both by association with the cyclin protein regulatory subunits and by specific phosphorylation/dephosphorylation events (Pines, 1995). In human cells, Cdk activity during early G1 depends on the presence of Cdk4/6 and a cyclin D type

protein to control cell cycle commitment in response to growth and mitogenic signals (Sherr, 1993; 1994). These complexes promote G1 progression by phosphorylating and thereby neutralizing the pRB protein. In the active, hypophosphorylated state, pRB binds and sequesters E2F/DP complexes, transcription factors required for S phase entry. Phosphorylated pRB releases E2F, thus allowing the activation of genes essential to continue the cycle (Sherr, 1994). Other proteins that associate to the Cyclin D-Cdk4 complex are PCNA and p21. PCNA, the proliferating cell nuclear antigen, is the DNA polymerase  $\delta$  (or  $\epsilon$ ) sliding clamp required for processivity (Tan *et al.*, 1986; Prelich *et al.*, 1987; Shivji *et al.*, 1992). The protein p21 appears to act either as an inhibitor or as a protein necessary for the assembly of cyclin D/Cdk4/6 complexes (Cheng *et al.*, 1999).

In plants, the basic mechanisms of cell cycle control are conserved (Gutierrez, 1998; den Boer and Murray, 2000; Meijer *et al.*, 2001). However, plants display a number of unique characteristics that include the reversibility of terminal differentiation and the control by plant hormones (Jacobs, 1995; Coenen and Lomax, 1997; Meyerowitz, 1997). Plant Cdks can be separated into two groups. The Cdk-A group contains a PSTAIRE sequence, similar to mammalian Cdk1 and Cdk2, with a perfectly conserved 16 residue cyclin interaction motif and the Cdk-B class which contains the variant forms PPTAIRE or PPTTLRE (Mironov *et al.*, 1999). Cdk-A plays a role in both the G1/S and the G2/M transitions, whereas expression of Cdk-B is restricted to G2/M (Fobert *et al.*, 1996; Huntley *et al.*, 1999). Contrary to the expression of mammalian Cdks, Cdk-A transcript or protein levels do not show much variation at any phase of the cell cycle and is detected at low levels in non-dividing tissues. Cdk-A genes have been identified in different plant species including maize, rice, alfalfa, soybean, pea, tobacco and Arabidopsis (Colasanti *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1992; Hirt *et al.*, 1993; Miao *et al.*, 1991; Fobert *et al.*, 1996).

Several D-type cyclins have been reported in plants and these can bind Cdk-A. In Arabidopsis, cyclins D2 and D3 interact with Cdk-A and phosphorylate histone H1 (Healy *et al.*, 2001). Cdk-A/cyclin D complexes expressed and purified from insect cells can phosphorylate tobacco RBR protein *in vitro* (Nakagami *et al.*, 1999). A Cdk-A/cyclin D complex that binds to and phosphorylates RBR has been recently identified in plant cell extracts and shown to be cell cycle regulated with a maximum activity late in G1 (Bonioffi Gutierrez, 2001).

PCNA is an essential component in all DNA metabolism transactions. It is a sliding clamp required for processive synthesis by DNA polymerases  $\delta$  (Tan *et al.*, 1986; Prelich *et al.*, 1987; Shivji *et al.*, 1992); it is required for DNA repair (Shivji *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994) and recombination (Kelman,

1997), interacting with multiple proteins. Unexpectedly, PCNA has been found associated to cyclin D/ Cdk complexes (Xiong *et al.*, 1992). *In vivo* experiments have suggested that this association may preclude unscheduled DNA replication (Pagano *et al.*, 1994).

Plant PCNA cDNAs have been isolated from rice, pea and maize (Suzuka *et al.*, 1989; Shimizu and Mori, 1998; López *et al.*, 1995, 1997) and shown to code for a highly conserved protein. In maize, two PCNA cDNAs have been reported, both showing a similar expression pattern in proliferating tissues and a virtually identical protein sequence (López *et al.*, 1997). During maize germination, PCNA protein is present at low levels in embryo axes of dry seeds and its amount gradually increases to reach a maximum by the time cells are entering the S phase (15-20h germination). If, however, embryo axes are imbibed in the presence of cytokinins, the S phase starts by 6h germination, a time at which PCNA has already reached its maximum (Herrera *et al.*, 2000).

Little is known about PCNA complexes in plants; however, we have reported the association of maize PCNA with a putative cyclin D; this association was only detectable during the first 15h germination and disappeared by the time DNA replication started (Herrera *et al.*, 2000). This putative cyclin D associated to a Cdk and the complex readily phosphorylated histone H1 (Cruz-García *et al.*, 1998).

Here we have studied PCNA-containing complexes present in germinating maize seeds and determined their size. We show that these complexes contain an associated kinase activity that is immunodetected by an antibody directed against the PSTAIRE sequence present in plant Cdk-A. Kinase activity is specifically inhibited by Cdk inhibitors like roscovitine and olomoucine. Finally, we compare the kinase activity in PCNA complexes with that activity associated to p13<sup>Suc1</sup>-agarose beads at different times during maize germination.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

Protein A-agarose and protease inhibitor cocktail tablets (Complete™) were from Roche; hyperfilm ECL, ECL western blotting kit, glutathione-Sepharose 4B, anti-rabbit IgG peroxidase conjugate and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP were from Amersham Pharmacia Biotech; histone H1, protein kinase A inhibitor peptide (PKI) and glutathione were from Gibco BRL, Life Technologies; Immobilon PVDF membranes were from

## RESULTADOS

Millipore; anti-PSTAIRES rabbit polyclonal IgG cat No. sc53 was from Santa Cruz Biotech; olomoucine (2(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurine) and roscovitine (2-(1-D, L-hydroxymethyl propylamine)-6-benzylamino-9-isopropylpurine) were from Sigma-Aldrich Chem.

### Protein extraction

Maize embryo axes were imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24 hours in imbibition buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.2, 2% sucrose and 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Protein extracts from axes were produced using Extraction Buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 0.2 % Triton X-10, 0.25 mM sucrose, 60 mM β-glycerolphosphate, 50 mM NaF, 200 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA and a tablet of protease inhibitor cocktail/50 ml buffer. Protein extracts were centrifuged at 150000g for 30 min at 4°C and protein concentration was determined by the method of Bradford.

### Superdex 200 Gel Filtration

The size of protein complexes formed by PCNA was determined by size-exclusion FPLC. A Superdex 200 column was used. The mobile phase was 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0.1 mM PMSF and 0.1 mM β-mercaptoethanol at a 0.75 ml/min flow rate. Molecular weight standards were Ferritin (450 kDa), Catalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) Bovine Serum Albumin (68 kDa) and Ovalbumin (45 kDa), acquired from Boehringer Mannheim.

### Western blot

Protein (20 μg) samples were fractionated by SDS-PAGE (11%) and gels were blotted onto PVDF membranes. Membranes were incubated with anti-maize PCNA polyclonal antibody (1:1500 dilution) or with anti-PSTAIRES polyclonal antibody (1:1500 dilution) for 12h at 4°C, washed twice in PBS buffer and once in PBS buffer containing 0.5 M NaCl, 15 min each at room temperature and subsequently, membranes were incubated for 2h with peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody in a 1:10,000 dilution. Membranes were washed again with PBS buffer and the peroxidase reaction was detected by the Enhanced Chemiluminescence method (ECL).

### Immunoprecipitation

Anti-maize PCNA antibodies were conjugated for 2h with Protein A-agarose (1:5 dilution) at room temperature using Buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 2.5 mM EDTA pH 8.0, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM NaF, 0.1% Triton X-100). Protein from extracts (200  $\mu$ g) was added and the mixture was incubated for 12h at 4°C with agitation; immunocomplexes were pelleted by centrifugation in a microfuge and washed 5 times with Buffer A. Bound proteins were eluted with SDS loading buffer and prepared for immunoblotting.

### P13<sup>Suc1</sup> pull down assays

Total protein (200  $\mu$ g) was incubated with p13<sup>Suc1</sup>-Sepharose beads overnight at 40°C; after incubation, beads were washed five times with buffer A and once with kinase assay buffer (see below). Resulting protein precipitates were used as the source of kinase activity.

### Kinase assays

Immunocomplexes or p13<sup>Suc1</sup> complexes were resuspended in 15  $\mu$ l of kinase buffer (70 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EGTA, 20  $\mu$ M ATP and 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP). As substrate, 40  $\mu$ g histone H1 or 4  $\mu$ g GST-ZmRBR-C (the C-terminal domain of maize RBR protein) fusion peptide per sample was added. Purification of GST-ZmRB fusion peptide was performed according to Ramirez-Parra *et al.* (1999). Reactions were performed for 30 min at 30°C and these were stopped by adding SDS loading buffer. After boiling for 5 min, the reaction products were separated by SDS-PAGE.



## RESULTS

### Protein complexes formed by PCNA during maize germination

Native polyacrylamide gels were used to find out the approximate size of the protein complexes in which PCNA can be found. Several clear protein bands were detected by western blot using a polyclonal antibody against maize PCNA (figure 1A). These bands corresponded to molecular sizes of 30 kDa (monomeric PCNA), roughly 100 kDa, probably corresponding to the homotrimeric ring characteristic of PCNA and bands of 160 kDa and around 200 kDa. These protein complexes showed some variations during germination, so that the higher molecular size bands virtually disappeared by 15h germination, whereas the 100 kDa band gradually increased during germination. Complexes of similar size were produced if gel filtration through Superdex 200 was used. PCNA was identified by immunoblotting in fractions corresponding to molecular sizes of 30, 60 and between 90 and 165 kDa, after fractionation of protein extracts from 3h imbibed maize embryo axes extracts (Figure 1B). Identical results were obtained after fractionation of protein extracts from 6h imbibed axes (not shown).

### PSTAIRES containing proteins are present in PCNA protein complexes

In metazoans, PCNA is found in G1 cells forming a complex with cyclin D and its associated Cdk (Cdk4/6, Xiong *et al.*, 1992). Evidence for an association of maize PCNA with a putative cyclin D has been reported earlier (Herrera *et al.*, 2000). The presence of a Cdk-type protein associated to PCNA was investigated in PCNA immunoprecipitates of germinating maize extracts, by using an antibody directed against the PSTAIRE sequence present in maize Cdk-A kinase (Colasanti *et al.*, 1991). First, we determined whether such a Cdk was present during germination. Using the anti-PSTAIRE antibody, two proteins of molecular sizes 36 and 32 kDa were detected (figure 2A) and their amount increased with time, although the smaller protein disappeared by 15 hours of germination. These two bands do not result from differentially phosphorylated forms of the same protein as treatment with alkaline phosphatase did not cause the disappearance or change in mobility of any band (figure 2B). This protein phosphatase did remove, however, the phosphate present in p-nitrophenyl-phosphate (result not shown). The recognition by an anti-PSTAIRE antibody of two proteins in maize extracts has been reported before (Colasanti *et al.*, 1993).

Association of PCNA and the PSTAIRE-containing proteins was determined by immunoprecipitating PCNA and detecting the presence of the accompanying Cdks using the anti-PSTAIRE antibody. Figure 3 shows that in extracts of axes imbibed for 6h, the anti-PCNA antibody bound PCNA protein (figure 3A, lane 2) that was associated to the two PSTAIRE containing proteins (Figure 3B, lane 2). Only a fraction of the PSTAIRE proteins and of PCNA were immunoprecipitated by the antibody (lanes 3, figures A and B). As a control, we determined the type of PSTAIRE containing Cdks that are pulled down by the p13<sup>Suc1</sup> protein. This protein strongly binds Cdks and was first characterized in yeast cells (Brizuela *et al.*, 1987). Agarose beads with bound p13<sup>Suc1</sup> were used and the associated protein kinase was identified by western blot using the anti-PSTAIRE antibody; only the 36 kDa protein was associated to p13<sup>Suc1</sup> beads (figure 3C).

### Cdk-type kinase activity in PCNA immunoprecipitates

To demonstrate that the proteins identified by the anti-PSTAIRE antibody are of Cdk type, we measured kinase activity in PCNA immunoprecipitates of protein extracts from 6h germinating maize using histone H1 as substrate. Histone H1 kinase activity was present in PCNA immunoprecipitates (figure 4, lanes 1-3). Incidentally, a 60 kDa protein that co-precipitated with PCNA was strongly phosphorylated but only if histone H1 was not added in the kinase assay (lanes 4-6). A phosphorylatable protein of similar size has been recently reported to bind and co-immunoprecipitate with cyclin D3 in *Arabidopsis*, and it was suggested that it is the cyclin D3 itself (Healy *et al.*, 2001).

Human pRB protein is an *in vivo* substrate of Cyclin-Cdks, and a maize retinoblastoma-related (RBR) protein has been isolated (Xie *et al.*, 1996). Therefore, we used the C-terminal fragment of maize RBR, which contains several putative Cdk phosphorylation sites, and is readily phosphorylated by plant Cdks (Bonioti and Gutierrez, 2001), as a substrate to measure kinase activity in PCNA immunoprecipitates from 6h imbibed maize axes. Figure 4B shows that the PSTAIRE containing kinases phosphorylated RBR protein. In this case, the endogenous 60 kDa protein that associates to PCNA in immunoprecipitates was phosphorylated in the presence of the exogenous substrate.

Cdk activity is sensitive to inhibitors such as roscovitine (Planchais *et al.*, 2000). Thus, to further determine whether the kinase activity present in PCNA immunoprecipitates is of a Cdk-type, we tested the effect of roscovitine (3  $\mu$ M) in kinase assays in both PCNA immunoprecipitates and p13<sup>Suc1</sup> pulled down proteins. Roscovitine reduced kinase activity, using RBR as substrate, to about 50% of control

activity associated to p13<sup>Suc1</sup> or to PCNA (Figure 5A). Kinase activity associated to p13<sup>Suc1</sup> was higher than activity in PCNA immunoprecipitates, probably indicating a higher amount and/or activity of associated Cdk. As an additional control, a well known inhibitor of cAMP-dependent kinases, PKI, was tested and found to have no effect on the PSTAIRE-containing kinase activity (figure 5A). Furthermore, another (less potent) Cdk inhibitor, olomoucine (Planchais *et al.*, 2000), also markedly reduced the PSTAIRE-containing kinase activity in PCNA immunoprecipitates when used at a 30  $\mu$ M concentration (figure 5B). Phosphorylation of the endogenous 60 kDa unknown protein (see above) was also substantially inhibited, indicating that this protein may be a substrate of the PSTAIRE containing Cdk.

Kinase activity in PCNA immunoprecipitates was compared to the activity that is pulled down by the p13<sup>Suc1</sup> protein during maize germination using maize RBR as substrate. Interestingly, PCNA-bound PSTAIRE kinases were increasingly active between 0 to 6h germination and then activity fell to very low levels by 15-24h germination (figure 6A). On the contrary, activity of the p13<sup>Suc1</sup>-bound kinase was low during early germination and then activity notably increased as germination advanced, up to 24h germination (figure 6B). These results suggest that the lower molecular size PSTAIRE kinase may be relevant to the kinase activity measured in PCNA immunoprecipitates, with little activity of the 36 kDa protein. On the other hand, the 36 kDa protein should be responsible for the activity associated to p13<sup>Suc1</sup> beads.

## DISCUSSION

This paper describes the association of maize PCNA in protein complexes of different sizes that vary during germination. Complexes of high molecular size (between 160 and 200 kDa) appear to be present during the early hours of germination (0-6h) and its amount is greatly reduced later on, by the time DNA replication is taking place during maize germination (Baiza *et al.*, 1989). At this time, the predominant form is a 100 kDa complex, probably the homotrimeric PCNA ring necessary to stimulate processive DNA replication. In mammalian cells, PCNA associates during G1 to cyclin D and Cdk4 (Xiong *et al.*, 1992) and this complex would have an estimated molecular size of around 170 kDa if PCNA were bound as a trimer, and of around 190 kDa if the p21<sup>cip1</sup> inhibitor were also present. The size of maize PCNA complexes found during early germination (0-6h), determined by both native gels and Superdex 200, falls within this range.

The physiological reason of the association of mammalian PCNA with the cyclin-kinase complex is not known, although *in vitro* evidence suggests that cyclin D may preclude the action of PCNA in the replication fork (Pagano *et al.*, 1994).

Little is known in plants about PCNA and its association with other proteins. A protein complex containing PCNA and cyclin D3 was found in non-proliferative pea tissues (Shimizu and Mori, 1998). Our previous work suggested that PCNA was associated to a putative cyclin D protein only during the early hours of germination, and this complex disappeared after 15 h germination (Herrera *et al.*, 2000). This timing coincides with the disappearance of the higher molecular size complexes found here, and with the onset of the S phase (Baiza *et al.*, 1989).

There is no evidence, to our knowledge, of an association of PCNA and a Cdk in plants. We have found that PCNA associates to protein complexes containing Cdks that possess the PSTAIRE sequence, the cyclin-binding motif in Cdk-A type kinases. In maize, two different A type Cdks have been reported, Cdk-A;1 and Cdk-A;2 (Colasanti *et al.*, 1991; Joubés *et al.*, 2000), both containing the PSTAIRE motif. Maize PCNA binds to the two types of PSTAIRE Cdks. Apparently, binding to both Cdks is in the same proportion to their abundance. In contrast, p13<sup>Suc1</sup> only binds the 36 kDa protein. This differential binding may explain the differential kinase activity found between these two kinase complexes during germination, as will be discussed below. Although we have classified PCNA associated Cdks as PSTAIRE containing, we are aware that the antibody against the PSTAIRE peptide may be able to recognize close variants such as SPTAIRE or PITAIRE, sequences found in some *Medicago sativa* Cdks (Mironov *et al.*, 1999). However, no evidence has been produced regarding the existence of proteins with these close variant motifs in maize cells.

The use of specific Cdk inhibitors has been very useful in the definition of the PCNA associated kinases as Cdks. Using maize RBR as substrate, Cdk inhibitors roscovitine and olomoucine markedly reduced the kinase activity associated to either PCNA or p13<sup>Suc1</sup>. Olomoucine, at the same concentration of roscovitine (3  $\mu$ M), was a poor inhibitor (result not shown), but at 30  $\mu$ M reduced kinase activity to very low levels. These inhibitors have been used in the past to demonstrate inhibition of G1/S and G2/M kinases in plant cells (Planchais *et al.*, 2000). Additionally, PKI, a cyclic AMP-dependent kinase inhibitor did not reduce kinase activity associated to either PCNA or p13<sup>Suc1</sup>.

Kinase activity in PCNA immunoprecipitates, using maize RBR as substrate, shows a distinct temporal activation to that associated to p13<sup>Suc1</sup> during maize germination. In PCNA complexes it is active before the S phase starts and both forms of the PSTAIRE kinase can be found; it is interesting that

## RESULTADOS

kinase activity increases in parallel with the increase in the amount of the 32 kDa PSTAIRE protein and, likewise, decreases as this kinase disappears. The p13<sup>suc1</sup> protein preferentially binds the 36 kDa PSTAIRE kinase and activity increases when the S phase starts. These results suggest that the 32 kDa PSTAIRE kinase bound to PCNA is mainly responsible for kinase activity in these complexes, while the 36 kDa PSTAIRE kinase is the activity in p13<sup>suc1</sup> complexes. Therefore, the two PSTAIRE kinases may participate in the regulation of distinct cell cycle stages during maize germination. Evidently, no Cdk is active without an associated cyclin. We have only indirect evidence that a D-type cyclin may be associated to PCNA (Herrera *et al.*, 2000) and no D-type cyclins have yet been reported in maize; however, the G1 state of cells in the 0-6h period of seed germination would point to the presence of G1 cyclins. More intriguing is the cyclin that may be present in p13<sup>suc1</sup> protein complexes. Since the 36 kDa PSTAIRE kinase is active mainly when cells are in the S phase, other D-, or perhaps A-type cyclins may be responsible for controlling transit through S phase during seed germination. Such associations have been found in tobacco cell cultures in which Cdc2a (a PSTAIRE-containing kinase) bound to both cyclin D- and cyclin A-type proteins (Nakagami *et al.*, 1999).

Acknowledgements: MPS received Grant Conacyt 113422. The authors acknowledge receiving grants PAPIIT-UNAM IN-206799 and Conacyt-CSIC E130-1239/2000 (to J.V.-R.), and grants BMC2000-1004 and 07G/0033/00 (to C.G.), as well as an institutional grant to Centro de Biología Molecular from Fundación Ramón Areces".

## REFERENCES

- Baiza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez E. 1989 DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* 135; 416-421.
- Boniotti, M. B. and Gutierrez, C. 2001 A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* 28; 341-350.
- Brizuela, L., Draetta, G., Beach, D. 1987 p13<sup>sup1</sup> acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *EMBO J.* 6; 3507-3514.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F. Roberts, J.M. and Sherr, C.J. 1999 The p21Cip1 and p27Kip1 CDK "inhibitors" are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18; 1571-1583.
- Coenen, C. and Lomax, T.L. 1997 Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools . *Trends Plant Sci.* 2; 351-356.
- Colasanti, J., Cho, S., Wick, S. and Sundaresan, V. 1993 Localization of the functional p34<sup>cdc2</sup> homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: association with predicted division sites. *Plant Cell* 5; 1101-1111.
- Colasanti, J., Tyers, M. and Sundaresan, V. 1991 Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34<sup>cdc2</sup> homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88; 3377-3381.
- Cruz-García, F., Zuñiga-Aguilar, J.J and Vázquez-Ramos J.J. 1998 Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 102; 573-581.
- Den Boer, B.G.W. and Murray, J.A.H. 2000 Control of plant growth and development through manipulation of cell-cycle genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11; 138-145.
- Fobert, P. R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E. S., Doonan, J. H. 1996 Distinct classes of cdc2-related gene are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* 8; 1465-1476.
- Gutierrez, C. 1998 The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1; 492-497.
- Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh-E, A. and Kikuchi, Y. 1992 Isolation and characterization of cDNA clones encoding cdc2 homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* 12; 865-876.

## RESULTADOS

- Healy, S.J.M., Menges, M., Doonan, J.H., and Murray, J. A .H. 2001 The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase *cdc2a* but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* 276; 7041-7047.
- Herrera, I., Sanchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J., and Vázquez-Ramos, J.M. 2000 Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* 110; 127-134.
- Hirt, H., Pay, A., Bogre, L., Meskiene, I and Heberle-Bors, E. 1993 *cdc2MsB*, a cognate *cdc2* gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant J.* 4; 61-69.
- Huntley, R. P., Murray, J. A.H. 1999 The plant cell cycle. *Curr. Op. Plant Biol.* 2; 440-446.
- Jacobs, T. W. 1995 Cell cycle control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46; 317-339.
- Joubés, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M and Renaudin, J.P. 2000 CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* 43; 607-620.
- Kelman, Z. 1997 PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14; 629-640.
- López, I., Khan, S., Vázquez, J. and Hussey P. J. 1995 Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Bioch. Biophys. Acta* 1260; 119-121.
- López, I., Khan, S., Vázquez, J. and Hussey P. J. 1997 The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programmes. *Bioch. Biophys. Acta* 1353; 1-6.
- Meijer, M. and Murray, J.A.H. 2001 Cell cycle controls and development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4; 44-49.
- Meyerowitz, E. M. 1997 Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88; 299-308.
- Miao, G., Hong, Z. and Verma, D. 1991 Two functional soybean genes encoding p34cdc2 protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90; 943-947.
- Mironov, V., Deveyder, L., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1999 Cyclin-dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell* 11; 509-521.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. and Shinmyo, A. 1999 Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with *cdc2/cyclin D* in vitro. *Plant. J.* 18; 243-252.
- Nigg, E.A. 1995 Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17; 471-480.

## RESULTADOS

- Pagano, M., Theodoras, A. M., Tam, S.W. and Draetta, G.F. 1994 Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Gene and Devel.* 8; 1627-1639.
- Pines, J. 1995 Cyclin and cyclin-dependent kinases: a biochemical. *Biochem. J.* 308; 697-711.
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. and Bergounioux, C. 2000 Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters* 476; 78-83.
- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. and Stillman B. 1987 Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 326; 517-520.
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. 1999 The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acid Res.* 27; 3527-3533.
- Sherr, C. J. 1993 Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73; 1059-1065.
- Sherr, C. J. 1994 G1 phase progression cycling on cue. *Cell* 79; 551-555.
- Shimizu, S. and Mori, H. 1998 Changes in protein interactions of cell cycle-related genes during the dormancy to growth transitions in pea axillary buds. *Plant Cell Physiol.* 39; 1073-1079.
- Shivji, K. K., Kenny, M. K. and Wood, R.D. 1992 Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69; 367-374.
- Smith, M.B., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.-Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Formace, A.J. 1994 Interaction of the p53 regulated protein GADD45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266; 1376-1380.
- Suzuka, I., Daidoji, H., Matsuoka, M., Kadowaki, K-I., Takasaki, Y., Nakane, P.K. and Moriuchi, T. 1989 Gene for proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86; 3189-3193.
- Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G., and Downey, K. M. 1986 An auxiliary protein for DNA polymerase- $\delta$  from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.* 261; 12310-12316.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J. and Gutiérrez, C. 1996 Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* 15; 4900-4908.
- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. 1992 D-Type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71; 505-514.



## LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. PCNA complexes during maize germination. A) Protein extracts from 0, 3, 6 and 15h imbibed maize axes were separated by native polyacrylamide gel electrophoresis and prepared for immunoblot analysis using the anti-maize PCNA antibody. B) Superdex 200 gel filtration of protein extracts from 3h-imbibed maize axes. Protein from the different fractions after gel filtration were electrophoresed and prepared for western blotting using the anti-maize PCNA antibody. Molecular size markers (Boehringer Mannheim) were Ferritin, 450 kDa, Catalase, 240 kDa, Aldolase, 158 kDa, bovine albumine 68 kDa and ovoalbumin, 45 kDa. FN, fraction number.

Figure 2. Detection of a PSTAIRE-containing Cdk during maize germination. Protein extracts from maize embryo axes imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24h were electrophoresed and treated for western blotting using the anti-PSTAIRE antibody (A). Protein extracts from 6h-imbibed axes were incubated with alkaline phosphatase for 30 min and then treated as in (A) for western blot using the anti-PSTAIRE antibody (B); lane 1, total protein; lanes 2 and 3, 1U and 2U of alkaline phosphatase.

Figure 3. PSTAIRE-containing Cdks co-immunoprecipitate with PCNA. Protein extracts from 6h-imbibed maize axes were immunoprecipitated using the anti-PCNA antibody (figs A and B) or proteins were pulled down with p13<sup>Suc1</sup> (3C). Proteins were separated by SDS-PAGE and immunodetected with anti-PCNA antibody (A) or anti-PSTAIRE antibody (B): Lane 1, total protein; lane 2, immunoprecipitate; lane 3, supernatant after immunoprecipitation; lane 4, as in lane 2 but no antibody was added; lane 5, supernatant (no antibody); lane 6, preimmune serum. Fig. 3C, proteins were immunodetected with anti-PSTAIRE antibody: lane 1, total protein; lane 2, p13<sup>Suc1</sup>- bound PSTAIRE protein.

Figure 4. Kinase activity in PCNA immunoprecipitates. PCNA immunoprecipitates, using protein from 6h-imbibed maize axes, were used as the source of kinase activity. (A) Histone H1 as substrate, 50 (lane 1), 100 (lane 2) or 200  $\mu$ g (lane 3) total protein. Lanes 4-6, same assay except that histone H1 was omitted in the reaction mixture. Lane 7, kinase activity in immunoprecipitates, using pre-immune serum. (B) GST-ZmRBR-C protein (4  $\mu$ g) as substrate in the presence of the PCNA immunoprecipitate (lane 1) or using pre-immune serum (lane 2).

Figure 5. Effect of Cdk inhibitors on PCNA and p13<sup>Suc1</sup>-associated kinase activity. (A) proteins were pulled down with p13<sup>Suc1</sup> (lanes 1-3) or immunoprecipitated with anti-PCNA (lanes 4-6) and samples were assayed for kinase activity using GST-ZmRB-C as substrate in the presence of roscovitine (Ros, lanes 2 and 5), PKI (lanes 3 and 6) or nothing (control, lanes 1 and 4).

RESULTADOS

(B) PCNA immunoprecipitates were also assayed for kinase activity using two different concentrations of olomoucine (Olo), 15 and 30  $\mu$ M.

Figure 6. Kinase activity in PCNA immunoprecipitates and p13<sup>Suc1</sup> agarose beads during maize germination. Protein extracts from maize axes imbibed for 0, 3, 6, 15 and 24h (PCNA) or 0, 5, 10 and 24h (p13<sup>Suc1</sup>) were immunoprecipitated with anti-PCNA antibody (6A) or pulled down with p13<sup>Suc1</sup> beads (6B) and kinase activity was assayed using GST-ZmRb-C as substrate. Immunoblot to show the amount of PCNA in the different immunoprecipitates (6C). Immunoblot to show the amount of the PSTAIRE kinase in pull downs (6D).

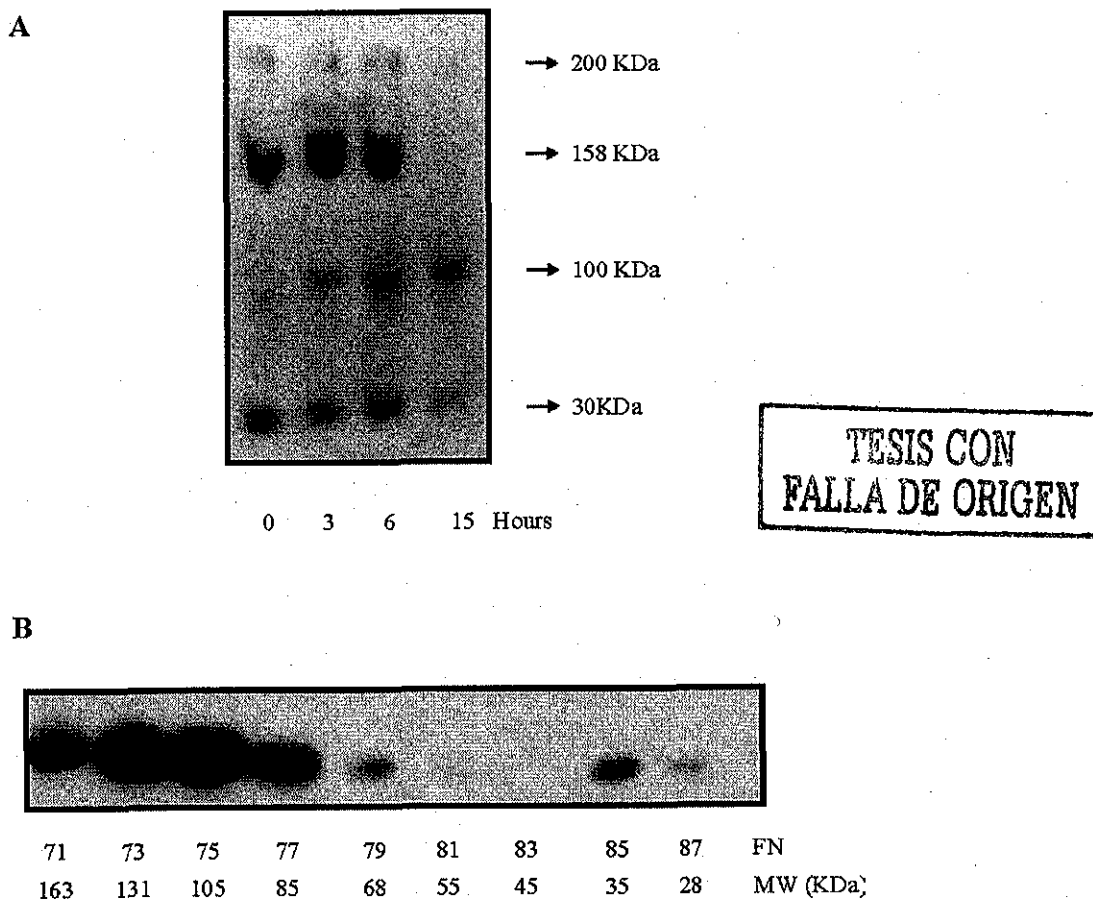


Figure 1. PCNA complexes during maize germination.

**Figura 7. Complejos que forma PCNA durante la germinación de maíz**

RESULTADOS

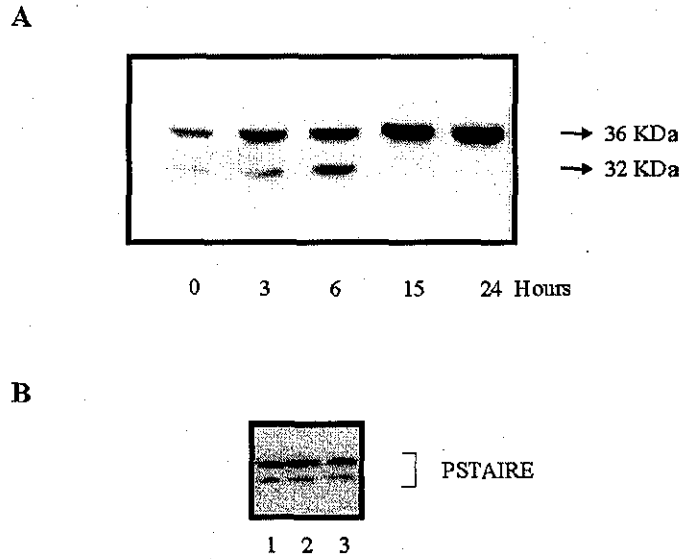
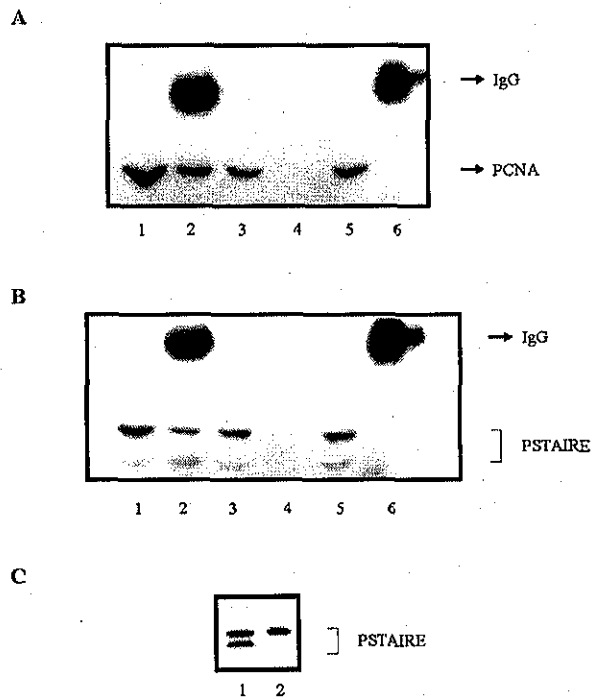


Figure 2. Detection of a PSTAIRE-containing Cdk during maize germination

**Figura 8. Detección de una Cdk que contiene el dominio PSTAIRE durante la germinación de maíz**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figure 3. PSTAIRE-containing Cdks co-immunoprecipitate with PCNA

**Figura 9. Co-inmunoprecipitación de PCNA con Cdks**

RESULTADOS

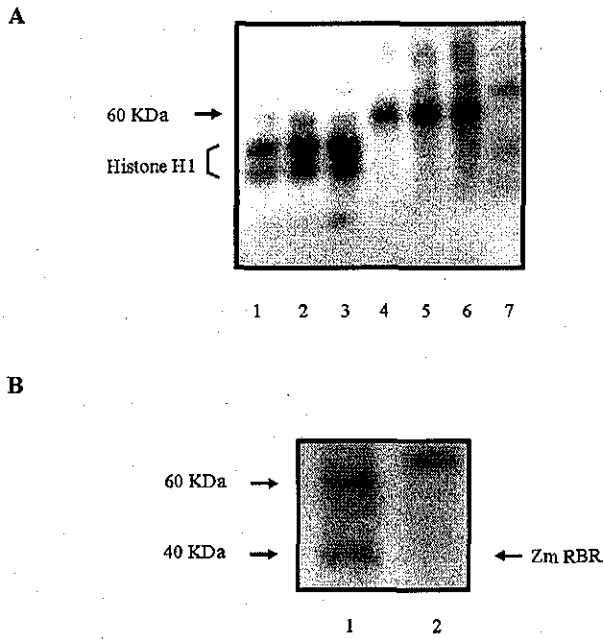


Figure 4. Kinase activity in PCNA immunoprecipitates

Figura 10. Actividad de cinasa presente en los inmunoprecipitados de PCNA

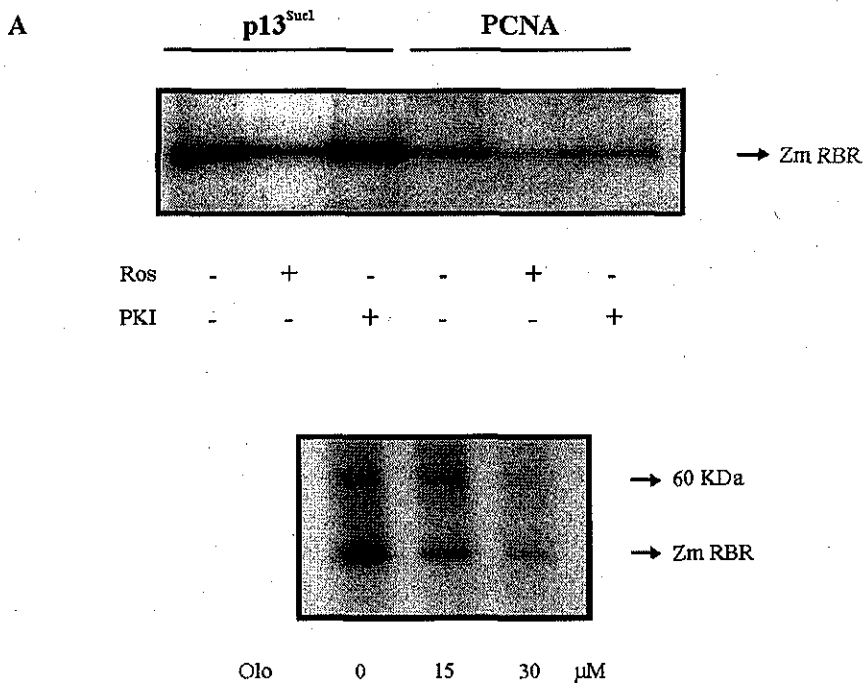


Figure 5. Effect of Cdk inhibitors on PCNA and p13<sup>Suc1</sup>-associated kinase activity

Figura 11. Efecto de inhibidores de Cdks sobre las cinasas asociadas a PCNA y p13<sup>Suc1</sup>.

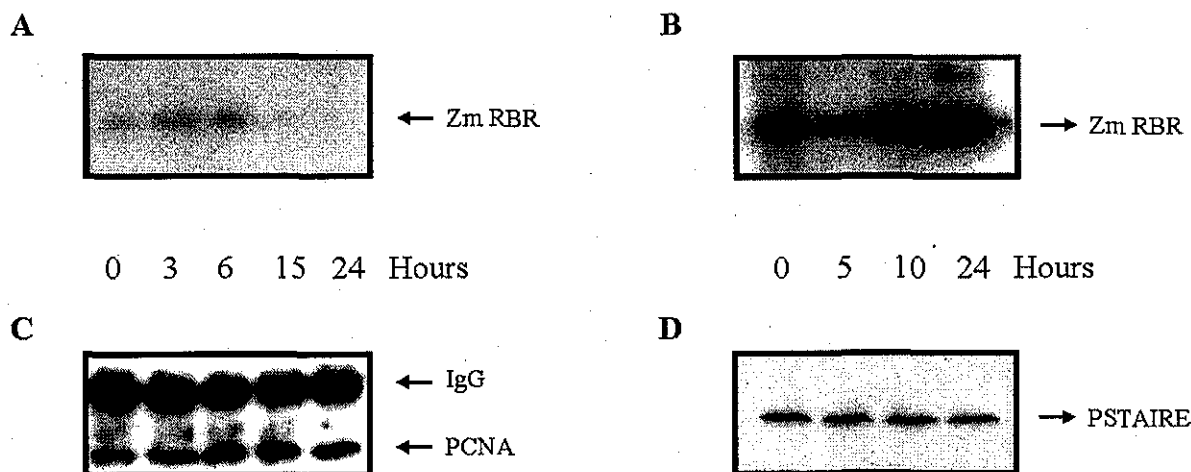


Figure 6. Kinase activity in PCNA immunoprecipitates and p13<sup>suc1</sup> agarose beads during maize germination.

**Figura 12. Actividad de cinasa asociada a PCNA y p13<sup>suc1</sup> durante la germinación de maíz**

**3.3 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre el ciclo celular y la actividad de cinasa asociada a PCNA durante la germinación de maíz**

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**3.3.1 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre el ciclo celular durante la germinación de maíz**

Cuando las semillas de maíz se ponen bajo condiciones óptimas para germinar, la reactivación del ciclo celular no se presenta simultáneamente en todas las células del eje embrionario. Se ha reportado que las primeras figuras mitóticas aparecen en las células meristemáticas del mesocótilo y de la raíz (Baíza *et al.*, 1989), lo que indica que las células de estos tejidos son las primeras que reactivan su ciclo celular.

Para determinar la fase del ciclo celular en la que se encuentran estas células durante la germinación de maíz, se realizaron ensayos de citometría de flujo. Al final de la embriogénesis la mayor parte de las células de la semilla quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacmard, 1974), por lo que durante las primeras horas de germinación estas células inician su

## RESULTADOS

ciclo celular y se preparan para dividirse. Los estudios de citología indican que en las primeras horas de germinación (6 h) solo hay síntesis de DNA de tipo reparativo y que la replicación del DNA es un evento tardío (Baíza *et al.*, 1989).

El análisis de citometría de flujo muestra que a las 6 h de germinación el 77 % de las células tienen un contenido de DNA 2 C, lo que indica que esta población está en la fase G1 (figura 13). Conforme avanza la germinación el porcentaje de células en G1 disminuye, a las 15 h el 63 % de las células están en G1, por lo que el 35 % de las células han replicado su DNA y han pasado a la fase G2; en tanto que a las 24 h de germinación hay un ligero aumento de las células en G1 (68 %) y disminuye la fracción de células en G2 (19 %); mientras que el resto de las células están en la fase S. Es posible que el aumento de las células en G1 a las 24 h se deba a que una pequeña población esté reiniciando otro ciclo celular; opcionalmente, otro grupo celular podría estar iniciando el ciclo.

En maíz, la reactivación del ciclo celular y el avance de éste durante la germinación es afectada por hormonas: La BA estimula la replicación del DNA y la acumulación de algunas enzimas que participan en el ciclo celular (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990; Cruz-García *et al.*, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999), consecuentemente, la germinación se lleva a cabo más rápidamente. Por otro lado, el ABA tiene un efecto inhibitorio sobre la replicación de DNA y la división celular (Robertson *et al.*, 1990).

Cuando la germinación ocurre en presencia de la BA (figura 14), se observó que a las 6 h el porcentaje de células en G1 (74 %) es similar respecto a lo observado en la germinación normal; sin embargo, el contenido de células en G2 fue ligeramente mayor (25 %). Conforme avanzó la germinación, se observó que la BA acelera el avance del ciclo celular ya que a las 15 h sólo el 58 % de las células permanecieron en G1 y el 40 % replicaron su DNA por lo que están en G2. A las 24 h la población en G1 se mantuvo constante; sin embargo, el porcentaje de células en G2 disminuye a un 30 %, pero se incrementó el porcentaje de las células están en fase S (12 %). Lo anterior indica que hay una población que está entrando a un segundo ciclo celular.

La germinación es inhibida por el ABA. A las 6 h de imbibición la población en G1 fue igual que en el control (77 %) y el 21 % de las células se observaron en G2 (figura 15). Conforme avanza la germinación, a las 15 y 24 h el porcentaje de células en G1 se mantuvo en 68 % y el resto de la población se encontró en G2 (26 %) o en S (5 %). Estos resultados claramente indican que el ABA detiene el ciclo celular en la fase G1.

RESULTADOS

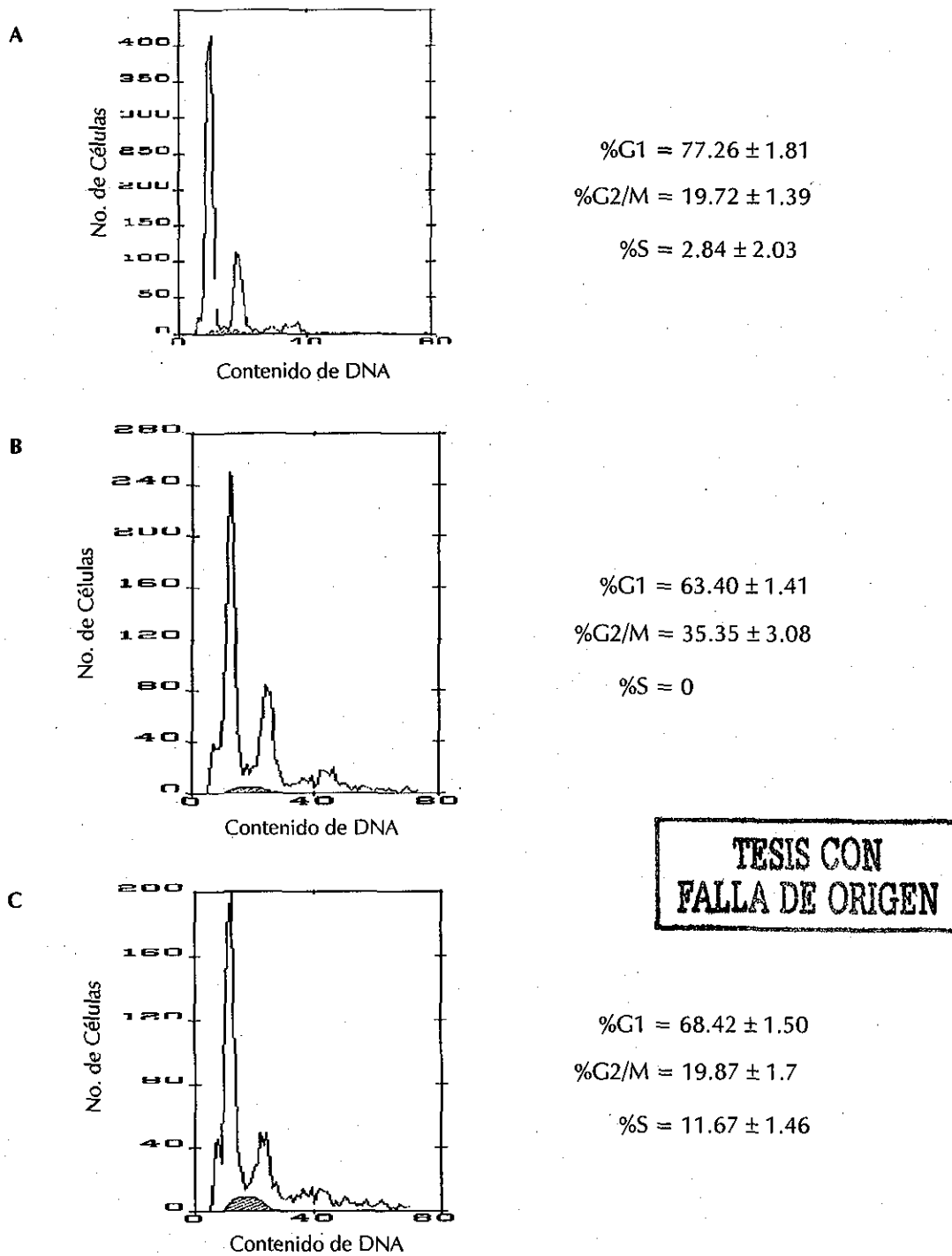
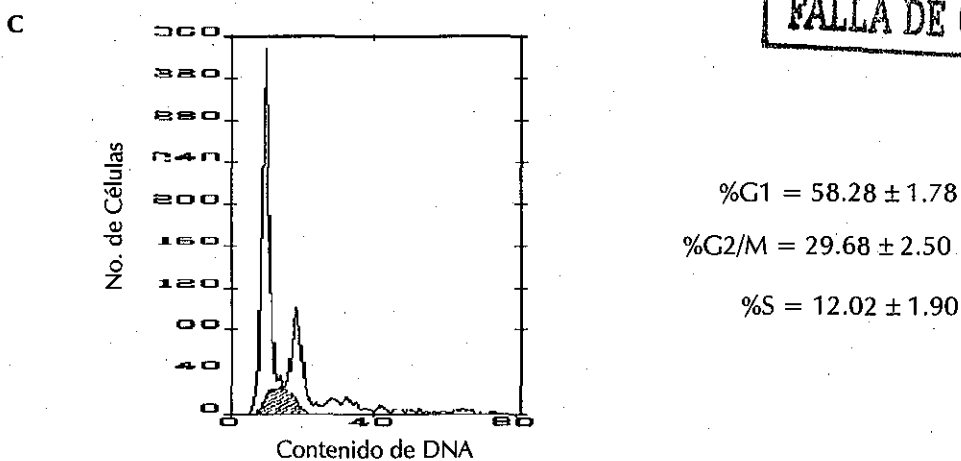
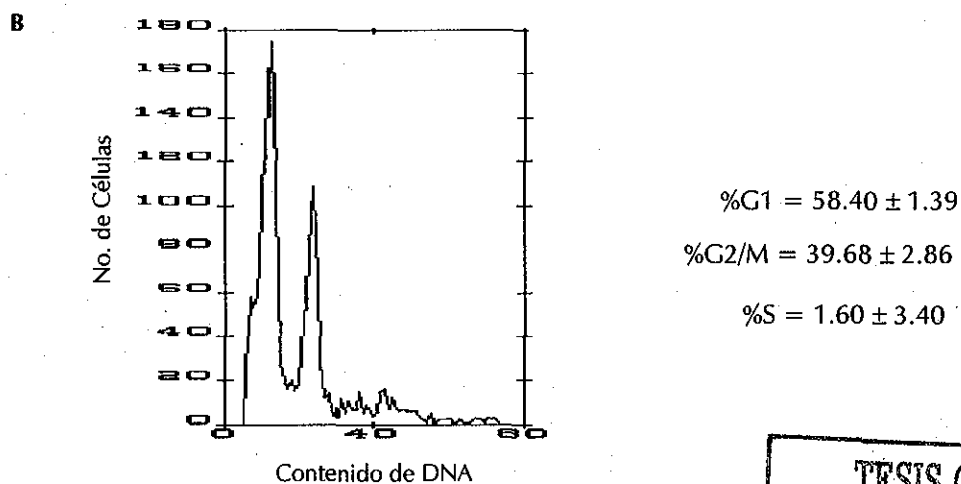
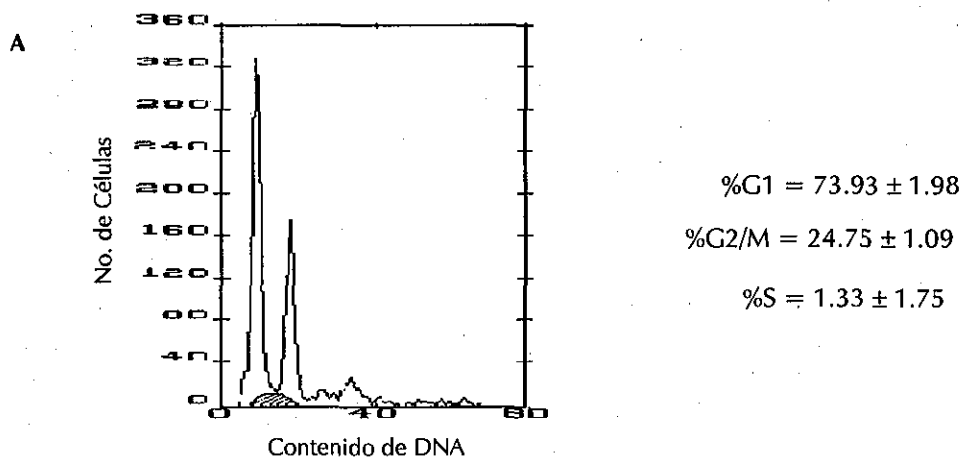


Figura 13. Fases del ciclo celular durante la germinación de maíz.

Contenido de DNA en las células meristemáticas de la raíz de ejes embrionarios germinados por 6 h (A), 15 h (B) y 24 h (C). El área sombreada indica el número de células en fase S.

RESULTADOS



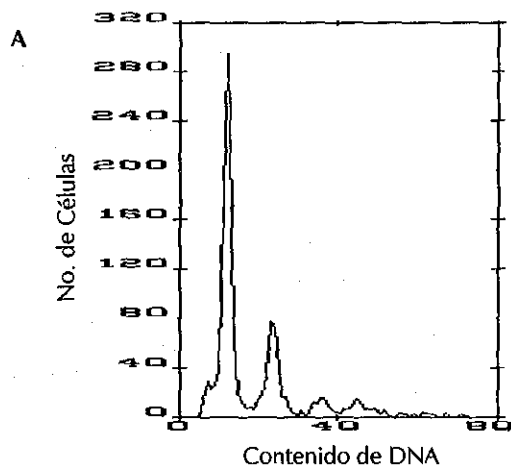
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 14. Efecto de BA sobre el ciclo celular durante la germinación de maíz.

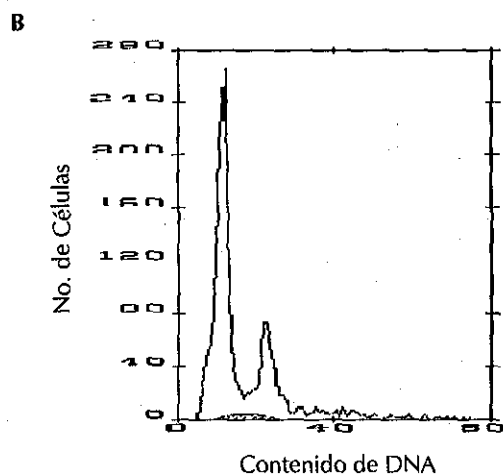
Contenido de DNA en las células meristemáticas de la raíz de ejes embrionarios germinados en presencia de BA por 6 h (A), 15 h (B) y 24 h (C). El área sombreada indica el número de células en fase S.



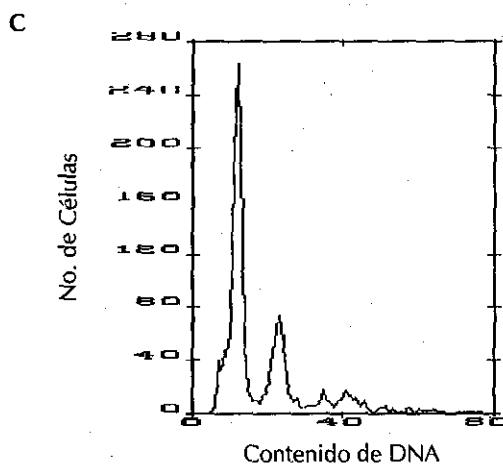
RESULTADOS



$\%G1 = 77.18 \pm 2.60$   
 $\%G2/M = 20.82 \pm 1.68$   
 $\%S = 1.98 \pm 2.25$



$\%G1 = 68.40 \pm 3.77$   
 $\%G2/M = 25.65 \pm 2.53$   
 $\%S = 5.90 \pm 4.90$



$\%G1 = 67.87 \pm 1.90$   
 $\%G2/M = 26.67 \pm 1.15$   
 $\%S = 5.47 \pm 2.90$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 15. Efecto de ABA sobre el ciclo celular durante la germinación de maíz.

Contenido de DNA en las células meristemáticas de la raíz de ejes embrionarios germinados en presencia de ABA por 6 h (A), 15 h (B) y 24 h (C). El área sombreada indica el número de células en fase S.

## RESULTADOS

	CONTROL			BA			ABA		
	% G1	% S	% G2/M	% G1	% S	% G2/M	% G1	% S	% G2/M
<b>6 h</b>	77.26 ± 1.81	2.84 ± 2.03	19.72 ± 1.39	73.93 ± 1.98	1.33 ± 1.75	24.75 ± 1.09	77.18 ± 2.6	1.98 ± 2.25	20.82 ± 1.68
<b>15 h</b>	63.40 ± 1.41	0	35.35 ± 3.08	58.4 ± 1.39	1.60 ± 3.4	39.68 ± 2.86	68.4 ± 3.77	5.9 ± 4.9	25.65 ± 2.53
<b>24 h</b>	68.42 ± 1.50	11.67 ± 1.46	19.87 ± 1.7	58.28 ± 1.78	12.02 ± 1.9	29.68 ± 2.5	67.87 ± 1.9	5.47 ± 2.9	26.67 ± 1.15

Tabla 4. Comparación del porcentaje de células que están en fase G1, S y G2/M del ciclo celular a las 6, 15 y 24 h de germinación en presencia o ausencia de hormonas.

### 3.3.2 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre Cdk A

En el capítulo anterior se demostró que el anticuerpo anti PSTAIRE reconoce dos proteínas, una de 36 kDa y otra de 32 kDa; nuestros datos sugieren que son dos Cdks tipo A. La Cdk de 36 kDa se acumula gradualmente conforme avanza la germinación, en cambio la Cdk de 32 kDa desaparece hacia las 15 h.

Cuando la germinación ocurre en presencia de BA, la proteína de 36 kDa siguió un comportamiento similar al control, pues su nivel se incrementó gradualmente conforme avanzó la germinación; sin embargo, la BA evitó que la Cdk A de 32 kDa se degradara, ya que se detectó aún a las 24 h de germinación (Figura 16). Un comportamiento similar se observa en extractos germinados con ABA. Sin embargo, a diferencia de la germinación normal, tanto la BA como el ABA promovieron la aparición de una proteína de 34 kDa a las 15 y 24 h de germinación, que podría representar un estado de fosforilación diferencial.

## RESULTADOS

Es notable que la cantidad de las Cdk durante la germinación no sea diferente en presencia de BA y ABA; sin embargo, como se determinó en los ensayos de citometría de flujo, la BA estimula el avance del ciclo celular y el ABA lo inhibe. Es probable que el efecto de estas hormonas sobre las Cdk se vea reflejado más bien en la actividad de las cinasas, y no en la cantidad de proteína.

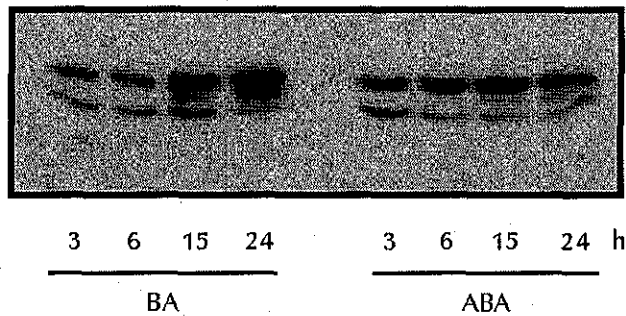


Figura 16. Efecto de la BA y el ABA sobre la expresión de Cdk A.

20  $\mu$ g de extractos proteicos de maíz germinados por 3, 6, 15 y 24 h en presencia de benciladenina (BA) o ácido abscísico (ABA) fueron utilizados para la determinación de Cdk A, mediante ensayos tipo "western blot".

### 3.3.3 Efecto de benciladenina y ácido abscísico sobre la actividad de Cdk A asociada a PCNA

Para determinar el efecto que tienen la BA y el ABA sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA se realizaron ensayos de actividad, en los cuales se utilizaron los inmunoprecipitados de PCNA de extractos proteicos de ejes germinados por 3, 6, 15 y 24 h en presencia o ausencia de BA o ABA como fuente de cinasa y el extremo carboxilo terminal de Zm RBR como sustrato. Cuando la germinación ocurre en presencia de BA, se observó que la cinasa asociada a PCNA fue capaz de fosforilar a Zm RBR sólo en las primeras 6 h de germinación (figura 17). Sin embargo, a las 15 y 24 h de germinación, la cinasa asociada a PCNA si estaba activa, ya que fue capaz de fosforilar

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

a una proteína de 60 kDa que coimmunoprecipitó con PCNA. Lo anterior sugiere que en tiempos tardíos de la germinación, la Cdk asociada a PCNA probablemente esté asociada a otra ciclina, lo que le permite tener una afinidad diferente por otro sustrato.

Cuando la germinación se inhibe con ABA (figura 17), la cinasa asociada a PCNA estuvo activa hasta las 24 h de imbibición; sin embargo, a las 24 h además de fosforilar a Zm RBR, también fue capaz de fosforilar a la proteína de 60 kDa que co-inmunoprecipitó con PCNA.

Los resultados anteriores sugieren que ABA inhibe la germinación por medio de la detención del ciclo celular en la fase G1, lo cual indica que bajo estas condiciones los complejos que forma PCNA son típicos de fase G1. Lo anterior coincide con el hecho de que BA estimula el ciclo celular, por lo que bajo estas condiciones la cinasa asociada a PCNA es capaz de fosforilar a Zm RBR sólo hasta las 6 h de germinación.

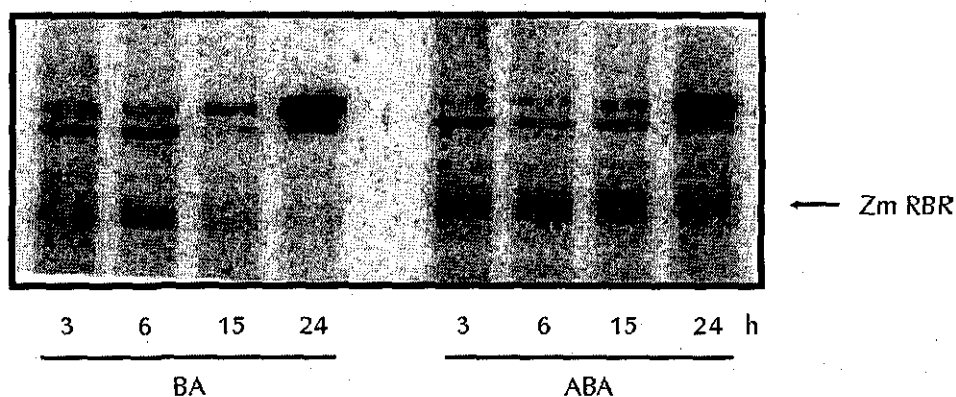


Figura 17. Efecto de la BA y el ABA sobre la actividad de Cdk A asociada a PCNA.

Actividad de cinasa presente en los inmunoprecipitados de PCNA de extractos proteicos de maíz germinados por 3, 6, 15 y 24 h en presencia de benciladenina (BA) o ácido abscísico (ABA).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSIÓN

El presente capítulo esta dividido en dos partes:

En la primera parte se discuten los resultados obtenidos acerca de los complejos proteicos que forma PCNA durante la germinación de maíz.

En la segunda parte, se discute el efecto que tienen las fitohormonas en la germinación de maíz, específicamente sobre el ciclo celular y los complejos proteicos que forma PCNA.

### COMPLEJOS PROTEICOS QUE FORMA PCNA DURANTE LA GERMINACIÓN DE MAÍZ

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es un factor de procesividad esencial que estimula a las DNA polimerasas replicativas (Prelich *et al.*, 1987, Burgers, 1991) y para realizar su función tiene que formar un homotrímero. Su estructura revelada por cristalografía de rayos X, indica que es un anillo hexagonal con una cavidad central en donde se amolda el DNA; esta estructura permite tener una variedad de sitios para que otras proteínas puedan interaccionar. Se ha demostrado que el PCNA es capaz de unir tanto proteínas que participan en el metabolismo del DNA como proteínas que regulan el ciclo celular (Kelman, 1997); la relevancia fisiológica que tiene la formación de estos complejos no se conoce totalmente, aunque se sabe que PCNA estimula algunas de las proteínas que participan en la replicación del DNA al interaccionar con ellas (Tsurimoto, 1998). Además, se ha reportado que la interacción de p21 con PCNA es un mecanismo de inhibición de la función de PCNA

sobre la replicación del DNA (Waga *et al.*, 1994) y se ha sugerido que lo mismo ocurre cuando ciclina D se une a PCNA (Pagano, *et al* 1994).

Aun cuando PCNA es una proteína de bajo peso molecular (29 kDa), resulta ser una molécula muy interesante por su capacidad de unir a una gran cantidad de proteínas y afectar la actividad o función de éstas. Se ha sugerido que PCNA es una proteína que sirve como plataforma para el reclutamiento de otras proteínas y así facilitar el acceso de estas a sus proteínas blanco (Kelman y Hurwitz, 1998).

En plantas se han aislado varios cDNAs ortólogos de PCNA; sin embargo, los estudios se han enfocado básicamente a la caracterización del gen y su patrón de expresión, por lo que hay pocos reportes acerca de los complejos que forma PCNA. Actualmente existen sólo dos reportes en los que se demuestra la interacción de Fen1 y de una topoisomerasa con PCNA (Van Hop *et al.*, 1999 y Kimura *et al.*, 2001) y solo un reporte en donde se muestra la interacción de PCNA con proteínas de ciclo celular (Shimizu y Mori, 1998).

PCNA de maíz tiene alta identidad con la proteína de mamíferos (López *et al.*, 1995). La proteína recombinante es capaz de estimular la actividad de las DNA polimerasas de maíz (Rosas, 1999); durante la germinación, los niveles de la proteína endógena se incrementa de manera concomitante con el inicio de la replicación del DNA (Herrera *et al.*, 2000). Lo anterior indica que en maíz se conserva la función de PCNA.

La pregunta que nos llevó a realizar este proyecto fue: ¿Cuál es el estado de oligomerización de PCNA y con qué proteínas interactúa a lo largo de la germinación de maíz?

En este trabajo se demostró que en ejes embrionarios de maíz, PCNA se encuentra tanto en forma de monómero como de trímero y formando complejos de alto peso molecular (160 y 200 kDa) (figura 7). Durante la germinación siempre está presente la forma monomérica de PCNA, en tanto que el homotrímero de PCNA está en niveles muy bajos en semilla seca y se incrementa gradualmente conforme la germinación avanza, lo cual coincide con los tiempos en los que se lleva a cabo la replicación del DNA (Baiza *et al.*, 1989); esto sugiere que al igual que en otros sistemas, el homotrímero es la forma funcional en maíz.

Es probable que durante la replicación del DNA, PCNA se encuentre asociado a las proteínas que participan activamente en este proceso, por lo que el homotrímero, sería capaz de asociarse a proteínas que participan en la replicación y formar complejos de muy alto peso molecular. Por ensayos de filtración en gel, se determinó que PCNA forma complejos

entre 300 kDa y 450 kDa (Torres, 2002); sin embargo, aún no se han caracterizado las proteínas que forman parte de este complejo.

Al estudiar los complejos proteicos que forma PCNA mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, se observó que al menos 10 proteínas de diferentes tamaños se asocian a PCNA (dato no presentado); sin embargo, en estos ensayos no se logró inmunoprecipitar a todo el PCNA presente en los extractos proteicos a pesar de utilizar un exceso de anticuerpo, lo anterior sugiere que hay poblaciones de PCNA que forman un tipo de complejo y que al mismo tiempo coexisten otras poblaciones formando otro u otros complejos en donde PCNA no puede interactuar con los anticuerpos.

En la caracterización de los complejos que forma PCNA se determinó que el complejo de 160 kDa contiene una ciclina tipo D; la conservación de los motivos de unión a ciclina D que tiene PCNA de maíz (López *et al.*, 1995), sugiere que la asociación entre PCNA y ciclina D es directa.

El complejo de PCNA con ciclina D está presente en las primeras horas de germinación (figura 6) y conforme ésta avanza, el complejo tiende a desaparecer, lo cual se debe a la degradación de ciclina D (figura 5). La disociación del complejo se da cuando se inicia la replicación del DNA. Al respecto se ha reportado que en chícharo, PCNA forma complejos con ciclina D, preferentemente en células que no se están dividiendo (Shimizu y Mori, 1998).

Los datos anteriores sugieren que durante la germinación de maíz existen dos formas de PCNA, la forma no replicativa, en la cual PCNA se asocia a ciclina D y/o a otras proteínas de ciclo celular y la forma replicativa, en donde PCNA estaría como trímero formando complejos con proteínas propias de replicación.

El tamaño del complejo formado por PCNA y ciclina D es de aproximadamente 160 kDa. Si consideramos el tamaño de PCNA (29 kDa) y el de la ciclina D (52 kDa), se tendría un complejo de 81 kDa; lo anterior indica que en este complejo PCNA se une a ciclina D en su forma trimérica ó bien que existen otras proteínas que se asocian al complejo. En mamíferos, la ciclina D es una proteína que se une y activa a Cdk4 o 6 (Sherr, 1994), por lo que es probable que en maíz se conserve un complejo proteico similar al reportado por Xiong *et al.* (1992) quienes demuestran que en células de mamíferos, PCNA, ciclina D, p21 y Cdk4 interactúan para formar un complejo cuaternario.

Las Cdk4/6 son cinasas típicas de G1, las cuales se caracterizan por su dominio de unión a ciclinas "PV/ISTVRE" y cuya función es la de fosforilar a Rb (Sherr, 1994). En plantas no hay

ortólogos de estas cinasas; sin embargo, existen las cinasas Cdk tipo A que realizan la función de Cdk4/6. Las Cdk tipo A de plantas son activadas por ciclinas D en la fase G1 del ciclo celular y son capaces de fosforilar a Zm RBR, una proteína homóloga a Rb mamíferos (Bonnioti *et al.*, 2001). Este tipo de cinasas son activas también en la fase G2, por lo que se sugiere que además de unirse a ciclinas tipo D, también se unen a ciclinas de G2 como son las ciclinas A y B (Huntley y Murray, 1999). Las Cdk tipo A no conservan el dominio de unión a ciclina que tienen Cdk4/6; en cambio tienen la secuencia "PSTAIRES" en su dominio de unión a ciclina, secuencia que está presente en las cinasas de G2 de mamíferos (Cdk1).

En este trabajo, a través de la utilización de un anticuerpo que reconoce la región de unión a ciclinas de Cdk A (PSTAIRES), se demostró que en ejes embrionarios de maíz están presentes dos proteínas tipo Cdk A durante la germinación de maíz, una de 36 kDa y otra de 32 kDa (figura 8). Las diferencias en el corrimiento electroforético de estas proteínas no son debido a un estado de fosforilación diferencial, ya que esta conducta no cambió cuando se incubaron en presencia de una fosfatasa alcalina. En maíz se han aislado dos genes de Cdk tipo A (Cdk A, 1 y Cdk A, 2); el análisis de secuencia predice que el gen de Cdk A, 1 codifica para una proteína de 34 kDa y el de Cdk A, 2 codifica para una proteína de 31 kDa. Ambas proteínas conservan el dominio de unión a ciclina "PSTAIRES" (Colasanti, 1991). Es probable que las dos proteínas que reconoce el anticuerpo anti PSTAIRES sean los productos de estos genes; sin embargo, los tamaños moleculares de estas proteínas (36 kDa y 32 kDa) no coinciden con los señalados por Colasanti, quizá debido a un corrimiento electroforético anómalo.

Los niveles de estas cinasas cambian durante la germinación, la CdKA de 36 kDa está presente en semilla seca y se incrementa gradualmente conforme avanza la germinación; en cambio, la CdKA de 32 kDa se encuentra principalmente en las primeras 6 h de germinación. Curiosamente, cuando en los ensayos se utilizaron lotes nuevos de semillas que no tenían mucho tiempo de almacenamiento, se observó a la proteína de 32 kDa hasta las 15 h de germinación (dato no presentado). Aparentemente la degradación de esta proteína es más rápida cuando las semillas han envejecido; es probable que el mecanismo de degradación de las proteínas sea más activo en las semillas envejecidas, y que éste contribuya a una germinación pobre.

La relevancia fisiológica del comportamiento de la Cdk A de 32 kDa se desconoce; sin embargo, los datos obtenidos indican que es una proteína cuya función se requiere para la germinación, de lo contrario en la germinación acelerada por BA la degradación de la proteína debería de



observarse en las primeras 3 h de germinación, hecho que no sucede, ya que bajo estas condiciones la Cdk está presente hasta las 24 h de germinación.

Las dos Cdk's presentes en maíz son capaces de asociarse con PCNA (figura 9). En la literatura se reporta que la unión de Cdk's a PCNA puede darse de dos maneras, una a través de su asociación con la ciclina D como ha sido reportado (Xiong *et al.*, 1992) y otra puede ser una unión directa sin la necesidad de tener una ciclina (Koundrioukoff *et al.*, 2000). Es difícil pensar que ambos tipos de Cdk's se unan a la misma molécula de PCNA, ya que al tener características similares deben de reconocer una misma región de PCNA o de ciclina para formar el complejo, por lo que lo más probable es que cada cinasa se asocie con una molécula diferente de PCNA y así se tengan dos tipos de complejos diferentes.

La actividad de cinasa asociada a PCNA es de una Cdk tipo A debido a que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra la región de unión a ciclina de las Cdk's tipo A de plantas (PSTAIRE) (figura 9), es capaz de fosforilar al péptido de Zm RBR, el sustrato natural de este tipo de cinasas, y a la histona H1 (figura 10); además, es sensible a roscovitina y olomoucina, dos inhibidores de Cdk's tipos A de plantas (Planchais *et al.*, 2000) y no se inhibe con PKI, un inhibidor de cinasas dependientes de AMPc (figura 11).

Es de notar que en los ensayos de actividad en los cuales no se adicionó ningún sustrato, la cinasa asociada a PCNA fosforila a una proteína de 60 kDa que también se asocia al complejo de PCNA (figura 10 A carriles 4, 5 y 6). En *A. thaliana* se ha reportado que el complejo ciclina D3/Cdk A fosforila a una proteína de 60 kDa y los autores especulan que esta fosforilación puede ser el resultado de una fosforilación de la ciclina D3 (Healy *et al.*, 2001). En maíz, hasta el momento no se han aislados los genes de ciclinas tipo D; sin embargo, es probable que también exista una familia de ciclinas tipo D y que la proteína de 60 kDa sea una ciclina diferente a la que reconoce el anticuerpo anti-ciclina D1 de humanos, de 52 kDa (utilizado en este trabajo). Lo anterior sugeriría que la Cdk asociada a PCNA sería activada por diferentes ciclinas tipo D.

Las cinasas dependientes de ciclina tipo cdk1/ciclina B han sido tradicionalmente purificadas a través de su capacidad de unión a p13<sup>suc1</sup> (Brizuela *et al.*, 1987). En *A. thaliana* se ha reportado que p13<sup>suc1</sup> es capaz de unirse al complejo activo de Cdk A (De Veylder *et al.*, 1997). En maíz, al realizar un análisis comparativo entre la cinasa asociada a PCNA y la cinasa asociada a p13<sup>suc1</sup>, se observó que ambas cinasas se comportan de manera similar frente a los inhibidores químicos de Cdk's (figura 11); sin embargo, la actividad de cinasa asociada a p13<sup>suc1</sup> es mayor que la asociada

a PCNA, lo que indica que sólo una pequeña fracción de la Cdk A total presente en las células de las semillas se une a PCNA y el resto de la proteína se une a p13<sup>suc1</sup>.

La actividad de la cinasa asociada a PCNA sobre Zm RBR está presente solo en las primeras 6 h de germinación, ya que a tiempos posteriores sólo hay una actividad residual; mientras que la actividad de cinasa asociada a p13<sup>suc1</sup> presenta un comportamiento opuesto; es decir, es ligeramente activa en las primeras horas de germinación pero conforme ésta avanza la actividad se incrementa (figura 12). La proteína p13<sup>suc1</sup> se une solamente a la cinasa de 36 kDa y los resultados indican que la actividad de esta proteína se incrementa gradualmente conforme avanza la germinación, quizá implicando que la cinasa asociada participa primordialmente en las fases S y G2/M del ciclo celular. La razón por la que la proteína asociada a PCNA solo presente actividad en las primeras horas de germinación puede ser debido: 1) A que la cinasa de 32 kDa es la que contribuye con la actividad de cinasa, por lo que al degradarse (después de las 6 h) ya no hay actividad ó 2) A que la cinasa de 36 kDa se disocia del complejo después de las 6 h. Ambos casos son factibles, aunque el último es interesante, ya que alrededor de las 15 h de germinación las células de las semillas inician la replicación del DNA, por lo que probablemente PCNA tenga que formar otro tipo de complejos.

Finalmente, la proteína p21 es una proteína que originalmente se reportó como inhibidora de Cdks y de la replicación del DNA, ya que tiene la capacidad de unir tanto a PCNA como al complejo Cdk4/ciclina D al mismo tiempo (Waga et al., 1994 ). Al inicio de este proyecto no había ningún reporte de inhibidores de Cdks en plantas, por lo que no se contempló la posibilidad de determinar la presencia de este tipo de proteínas en los complejos proteicos de PCNA. No se han encontrado ortólogos de esta proteína en plantas; sin embargo, en *A. thaliana* se han reportado los genes de una familia de inhibidores de Cdks del tipo p27; aparentemente estos inhibidores solo interaccionan con Cdk y no con PCNA ( Zhou, et al 2002). Es posible que estos inhibidores formen parte del complejo de PCNA, pero que la interacción sea a través de su asociación a Cdks.

## EFFECTO DE HORMONAS SOBRE EL CICLO CELULAR Y LOS COMPLEJOS QUE FORMA PCNA DURANTE LA GERMINACIÓN

Al final de la embriogénesis, la mayor parte de las células de la semilla quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacmard, 1974), por lo que al inicio de la germinación se reactiva el ciclo celular. Sin embargo, no todas las células de la semilla reactivan su ciclo celular al mismo tiempo; los trabajos de Baíza *et al.* (1989), indican que las células meristemáticas del mesocótilo y de la raíz son las primeras que reactivan su ciclo celular, por lo que a las 15 h inician la replicación del DNA. El contenido de DNA de las células meristemáticas de la raíz a las 15 h de germinación indica que el 63 % de las células están en la fase G1 y el 35 % ya han replicado su DNA (figura 13). En este momento el complejo formado entre PCNA, ciclina D y Cdk ha desaparecido, lo que indica que este complejo es propio de fase G1.

Las hormonas vegetales son señalizadores químicos que controlan el crecimiento y desarrollo de una planta, algunas hormonas estimulan la proliferación celular mientras que otras la inhiben y promueven diferenciación. Se ha descrito que la BA estimula la acumulación de algunas ciclinas de fase G1, la replicación del DNA y la actividad de Cdk1 (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990; Cruz-García *et al.*, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Brault y Maldiney, 1999). Por otro lado, ABA tiene el efecto opuesto, ya que inhibe replicación del DNA y estimula la acumulación de inhibidores de Cdk (Robertson *et al.*, 1990 y Wang *et al.*, 1998).

La acción de estas hormonas sobre proteínas del ciclo celular permite regular varias etapas del desarrollo de la planta. Durante la germinación de maíz, BA estimula la replicación del DNA (Vázquez-Ramos y Reyes, 1990) y la acumulación de PCNA (Herrera *et al.*, 2000), por lo que bajo estas condiciones la replicación del DNA se inicia 6 u 8 h antes con respecto a la germinación control. Lo anterior coincide con lo que se observa en la figura 14, en donde se muestra que a las 15 h de germinación en presencia de esta hormona, el porcentaje de células que han replicado su DNA (40 %) es mayor que el obtenido en la germinación normal.

El ABA tiene un efecto opuesto al de la BA, los ejes embrionarios embibidos en presencia de ABA no germinan. El efecto inhibitorio de ABA se da a través de la inhibición del ciclo celular debido a que la mayor parte de las células (68 %) quedan detenidas en la fase G1 del ciclo celular y solo un 26 % parece estar en G2 (figura 15).

El efecto de las hormonas se ve reflejado en la concentración de las proteínas PCNA, ciclina D y CdkA. Durante la germinación en presencia de BA, PCNA se incrementa rápidamente alcanzando un pico máximo mucho antes que el observado durante la germinación normal; en cambio el ABA inhibe la acumulación de PCNA, por lo que bajo estas condiciones permanece en niveles bajos (Herrera *et al.*, 2000).

En cuanto a ciclina D, la BA promueve su degradación 6 h antes respecto a la germinación normal; en cambio, con ABA la degradación de ciclina D es más lenta que en el control (figura 5).

La cdk A de 36 kDa no es afectada por la BA durante la germinación, pero la BA inhibe la degradación de la proteína de 32 kDa, ya que ésta se observa incluso a las 24 h de germinación (figura 17). BA además induce la aparición de una proteína de 34 kDa en tiempos tardíos de la germinación (15 y 24 h), muy probablemente producto de un estado diferencial de fosforilación de la Cdk A. En presencia de ABA, la Cdk A de 32 kDa también se estabiliza y se induce la aparición de una probable banda de fosforilación diferencial semejante a la que aparece con BA. Sería importante conocer el estado de activación / inhibición que esta forma fosforilada de Cdk A represente, desde el punto de vista del estado fisiológico de las semillas en presencia de los fitorreguladores.

La acción de las hormonas sobre PCNA, ciclina D y Cdk A afecta a los complejos que estas proteínas forman. Como la ciclina D se degrada más rápidamente en presencia de BA, el complejo con PCNA sólo se forma en las primeras horas de la germinación, ya que a las 6 h ya no se detecta este complejo; así mismo la cinasa asociada a PCNA tiene actividad sobre Zm RBR solo en las primeras 6 h de germinación. Sin embargo, después de las 6 h de germinación la cinasa asociada sigue activa, solo que ya no utiliza como sustrato a Zm RBR, sino que su sustrato es la proteína de 60 kDa que inmunoprecipita con PCNA, y cuya naturaleza es desconocida.

Estos datos podrían ser contradictorios, debido a que la cinasa está activa aún después de que la ciclina D se ha degradado. Se ha reportado que PCNA de mamíferos es capaz de interactuar directamente con una Cdk, sin la necesidad de unirse previamente a una ciclina (Koundrioukoff *et al.*, 2000). Es probable que PCNA de maíz también pueda unirse directamente a una Cdk, por lo que la cinasa asociada a PCNA podría ser activada por otra ciclina, lo que permitiría que la cinasa cambiara de sustrato. Si este es el caso, indicaría que en la germinación tardía (15 a 24 h), PCNA esta formando un complejo con proteínas de ciclo celular pero de fase S o G2.

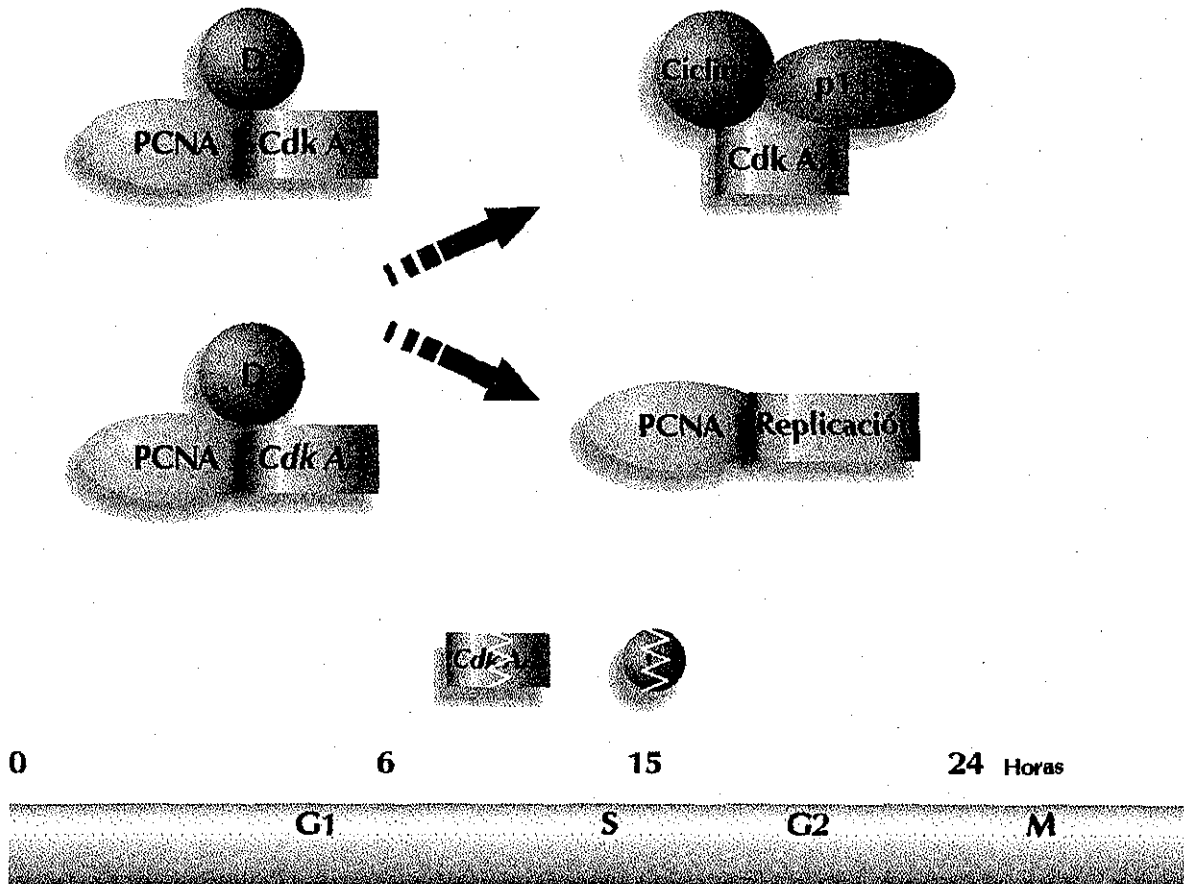
## DISCUSIÓN

El ABA inhibe la germinación al detener a las células en la fase G1 del ciclo celular; no obstante, el complejo de PCNA con ciclina D sólo se observa en las primeras horas de germinación, a pesar de que en este caso se inhibe la degradación de ciclina D. Sorprendentemente, la cinasa asociada a PCNA está activa hasta las 24 h de germinación y de manera interesante, a las 15 y 24 h de germinación la cinasa es capaz de fosforilar tanto a Zm RBR como a la proteína de 60 kDa. Es probable que el ABA, al detener el ciclo celular, por un lado evite que se disocie el complejo de PCNA con Cdk A que fosforila a Zm RBR y además promueva la formación de otro tipo de complejo (PCNA/Cdk) que utilice un sustrato diferente, por lo que bajo estas condiciones coexistirían ambos complejos.

¿Cuál es el mecanismo por el cual el ABA detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular?. Es probable que sea a través de la inducción de un inhibidor de Cdk (ICK); se ha reportado que ABA induce a ICK1, el cual es capaz de inhibir la actividad de cinasa asociada a p13<sup>suc1</sup> en *A. thaliana* (Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, bajo estas condiciones la cinasa asociada a PCNA está activa. Una respuesta probable a este dilema es que haya complejos ciclina D/ cinasas en los que no se encuentre presente PCNA y que estos sean principalmente el blanco de los inhibidores. En este sentido sería interesante determinar si el ABA afecta la actividad de cinasa asociada a p13<sup>suc1</sup>.

Con los resultados obtenidos de este trabajo se proponen los siguientes modelos.

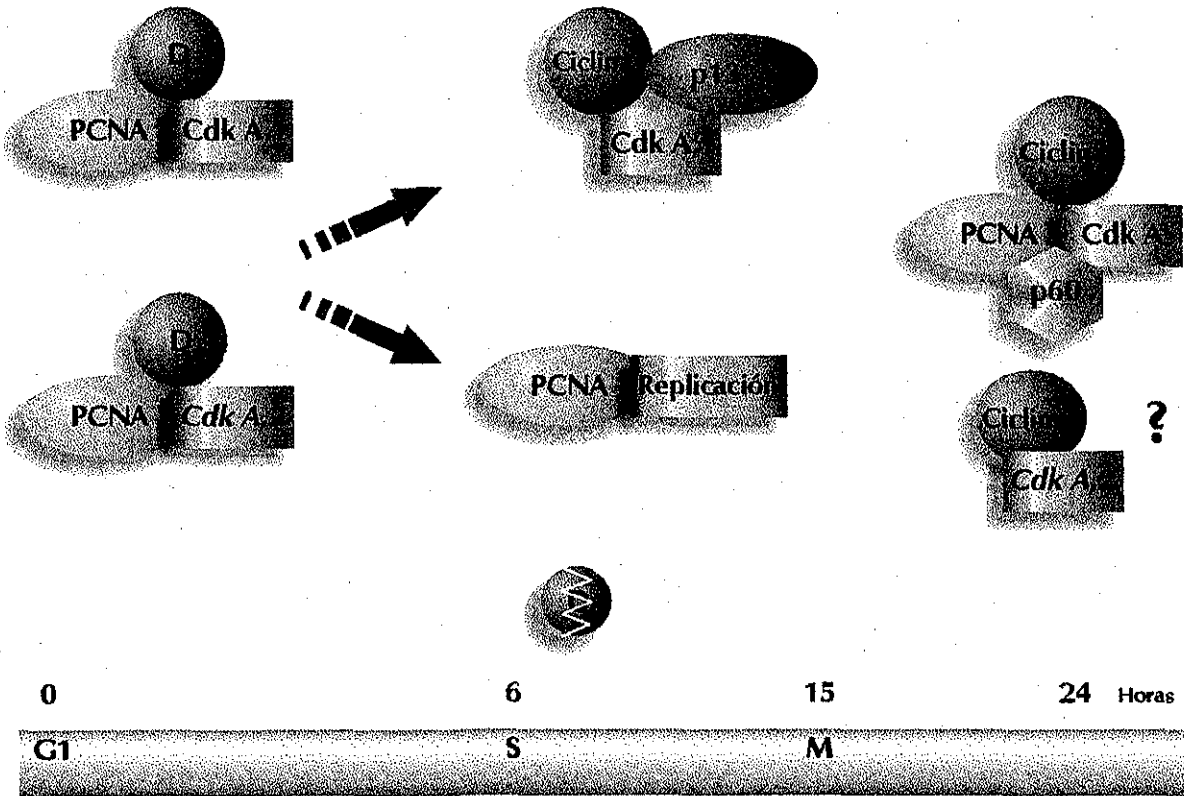
GERMINACIÓN CONTROL



Al inicio de la germinación, la mayor parte de las células están en la fase G1 del ciclo celular, en este momento PCNA forma complejos con ciclina D y con Cdk A de 36 kDa (Cdk A,1) y/o de 32 kDa (Cdk A,2). Conforme avanza la germinación la ciclina D y Cdk A,2 se degradan permitiendo con ello la desaparición del complejo y la pérdida de actividad de cinasa asociada a PCNA. Cuando se inicia la replicación del DNA, PCNA forma complejos con proteínas que participan en replicación del DNA (Replicación). Por otra parte, la Cdk A,1 también se disocia de PCNA, pero su actividad detectada por la unión a p13<sup>suc1</sup> se incrementa conforme avanza la germinación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

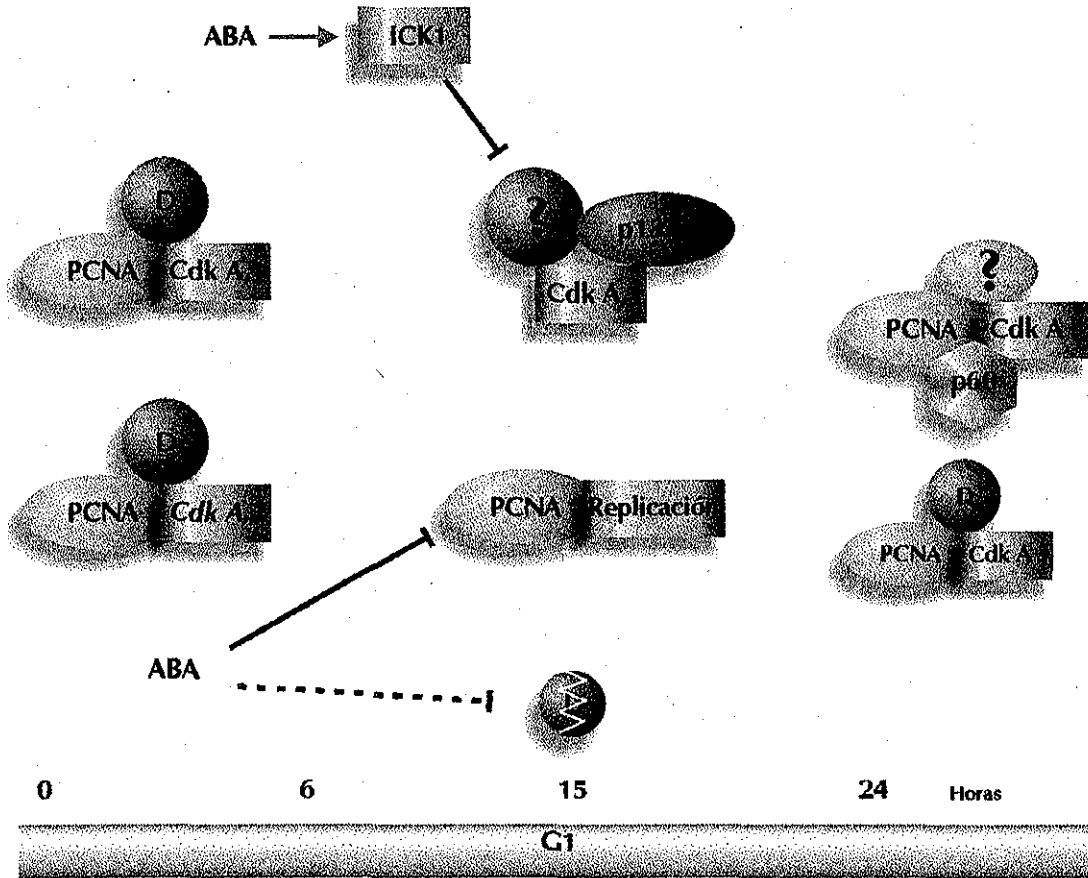
GERMINACIÓN CON BA



La BA acelera la germinación permitiendo con ello que la degradación de ciclina D se lleve a cabo más rápidamente respecto a la germinación normal. Bajo estas condiciones la replicación del DNA se inicia 6-8 h antes respecto a la germinación normal, por lo que el complejo de PCNA con ciclina D desaparece rápidamente; consecuentemente, la actividad de cinasa sobre ZmRBR asociada a PCNA solo se observa antes de que se inicie la replicación del DNA; sin embargo, en este caso la BA inhibe la degradación de la Cdk A de 32 kDa (Cdk A, 2). Conforme la germinación avanza, la cinasa asociada a PCNA cambia de ciclina por lo que ya no es capaz de utilizar como sustrato a Zm RBR, en cambio fosforila a una proteína de 60 kDa que se encuentra asociada al complejo de PCNA.

Es probable que la actividad de CdkA,1, que se puede unir a p13<sup>suc1</sup>, se incremente al igual como sucede en la germinación normal.

GERMINACIÓN CON ABA



Durante la germinación en presencia de ABA, ésta provoca la inhibición del ciclo celular deteniendo a las células en la fase G1, por lo que bajo estas condiciones la replicación del DNA también se inhibe. El complejo de PCNA con ciclina D solo se observa en las primeras horas de germinación a pesar de que ABA retrasa la degradación de ciclina D. Sin embargo, la cinasa asociada a PCNA está activa hasta las 24 h y es capaz de fosforilar tanto a Zm RBR como a la proteína p60 que está unida al complejo de PCNA; quizá en estos momentos PCNA forme dos complejos con Cdks, pero activadas por diferentes ciclinas, por lo que reconocería diferentes sustratos.

El mecanismo por el cual el ABA inhibe el ciclo celular puede ser a través de la inducción de la expresión del inhibidor ICK1, el cual inhibe a las Cdks. En este caso es probable que la cinasa afectada sea la que se une a p13<sup>suc1</sup> y no la que se une a PCNA.



## CONCLUSIONES

- En maíz, la aparición del homotrímero de PCNA coincide con el inicio de la replicación del DNA.
- PCNA de maíz se asocia a una proteína tipo ciclina D y a una proteína cinasa dependiente de ciclina (Cdk A)
- La cinasa asociada a PCNA es de tipo Cdk A, tanto por criterios inmunológicos, por preferencia de sustratos, así como por su respuesta a inhibidores químicos específicos.
- Durante la germinación, el complejo formado por PCNA y ciclina D desaparece cuando se inicia la replicación del DNA.
- La actividad de cinasa asociada a PCNA sobre Zm RBR, sólo se presenta en las primeras 6 h de germinación, cuando la mayor parte de las células están en la fase G1 del ciclo celular.
- La BA acelera la germinación, estimulando la progresión del ciclo celular.
- El ABA inhibe la germinación al detener a las células en la fase G1 del ciclo celular.
- Durante la germinación, la BA provoca una rápida desaparición de ciclina D y por lo tanto del complejo con PCNA. Semejante evento ocurre al inhibir la germinación con el ABA, sin embargo, en este caso la ciclina D no desaparece.
- La BA no tiene efecto sobre la actividad de cinasa asociada a PCNA que fosforila a Zm RBR; sin embargo, es capaz de inducir la formación de un complejo diferente que fosforila a otro sustrato. Por otro lado, la inhibición de la germinación por el ABA estabiliza la actividad de cinasa asociada a PCNA sobre Zm RBR y permite la formación de otro complejo con actividad de cinasa que utiliza otro sustrato.

## APÉNDICE

### 6.1 ARTÍCULO

“Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins.”

## Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins

Ivonne Herrera<sup>a,1</sup>, Maria de la Paz Sánchez<sup>a,1</sup>, Juan Molina<sup>b</sup>, Javier Plasencia<sup>a</sup> and Jorge M. Vázquez-Ramos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Av. Universidad y Copilco, México 04510 DF

<sup>b</sup>Colegio de Posgraduados, Chapingo, México

\*Corresponding author, e-mail: jorman@servidor.unam.mx

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

Received 1 September 1999; revised 3 March 2000

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) plays a fundamental role in DNA replication and repair and recently, it has been found associated to proteins that control the G1 phase of the cell cycle, such as cyclin D. Maize PCNA cDNA has been cloned and overexpressed in order to raise antibodies. The expression of PCNA has been followed during seed development and seed germination using the homologous antibodies. The protein was found at a constant level during seed development up to 48 days after pollination (DAP) and then the amount declined to very low levels, similar to those found in dry seeds. Upon germination, PCNA levels rose gradually reaching a peak by 20 h germination. Imbibition in the presence of cytokinins (Benzyladenine, BA) produced a sharp increase in amount during

the first 3–6 h germination, whereas imbibition in the presence of abscisic acid (ABA) did not alter the pattern of expression as compared with control seeds. Immunoprecipitation experiments showed that PCNA was associated to a putative cyclin D protein during germination and this association was altered by phytohormones. While the complex PCNA-cyclin D-like protein was present along the first 15 h of germination under control conditions, it was dissociated after 6 h if embryo axes germinated in the presence of BA or ABA. However, complex dissociation in the presence of BA was due to degradation of the putative cyclin D protein while in the presence of ABA the putative cyclin D was still present. These results are discussed in the context of seed germination and the cell cycle.

### Introduction

DNA metabolism is rapidly activated after seed imbibition with DNA repair and synthesis of organellar DNA taking place within the first hours of germination (Bewley and Black 1994). DNA replication is a late event, starting several hours after imbibition; however,  $\alpha$ - and  $\delta$ -replicative-type DNA polymerases as well as DNA primase and DNA ligase are present and apparently in an active state in dry seeds (Vázquez et al. 1991, García et al. 1997).

In maize, the phosphorylation of a primase-containing  $\alpha$ -type DNA polymerase coincides with both an increase in activity and with the time at which DNA replication is first observed in meristematic cells (12–15 h after imbibition) and has given evidence of post-translational control of DNA metabolism during germination (Coello and Vázquez-Ramos 1995). Phosphorylation of human DNA polymerase  $\alpha$  also correlates with the entry of cells into the S phase of the cell cycle (Nasheuer et al. 1991).

Activity of  $\delta$ -type DNA polymerases in eukaryotes largely depends on the presence of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an accessory protein required for processive chromosomal DNA synthesis (Tan et al. 1986, Prelich et al. 1987). Originally identified as an auto-antigen in patients with lupus erithematosus (Miyachi et al. 1978), PCNA is now recognized as a multi-functional protein that participates in events such as DNA replication (Prelich and Stillman 1988), DNA repair (Shijvi et al. 1992) and probably in the control of G1 phase of the cell cycle (Xiong et al. 1992, Waga et al. 1994).

PCNA is a highly conserved protein in all species studied ranging from mammals and insects to plants (Matsumoto et al. 1987, Bauer and Burgers 1988, Suzuka et al. 1989). In human cells, PCNA synthesis reaches a peak during S phase in the cell cycle (Morris and Mathews 1989) and remains at a constant level thereafter. In contrast, PCNA amount

Abbreviations – DAP, days after pollination.

declines to very low levels in quiescent and senescent cells. Upon addition of serum or mitogens, PCNA transcript and protein levels recover (Kelman 1997).

Through the action of RF-C, a protein that promotes assembly onto the DNA of the active, homotrimeric form of PCNA to produce a 'sliding clamp' (Tsurimoto and Stillman 1990), DNA polymerases  $\delta$  and  $\epsilon$  considerably increase their processivity during DNA replication. However, there is evidence that only 35% of all PCNA present associates to replication loci (Bravo and MacDonald-Bravo 1987).

Besides its role in DNA replication and repair, PCNA also associates with G1 cell cycle proteins like cyclin D, cyclin E, Cdk2, Cdk4 and p21 (Xiong et al. 1992, 1993, Waga et al. 1994), some of the most important regulators of the commitment to undergo the cell cycle. Its role in these associations has not been clearly elucidated, although it is speculated that PCNA is sequestered during G1 by cyclin D to avoid premature initiation of DNA replication (Pagano et al. 1994). Recent roles of PCNA in chromatin remodeling and in transcriptional control have also been proposed (Kelman 1997).

Plant PCNA genes have been cloned, and the corresponding sequences are highly conserved (Kodama et al. 1991, Suzuka et al. 1991, Hata et al. 1992, Matsumoto et al. 1994, Kelman 1997). The promoter region of rice PCNA gene has been sequenced and a 263 bp sequence upstream of the transcription start site has been proposed as necessary for expression (Kosugi et al. 1991). Recently, two DNA elements essential for the proliferating cell-specific transcriptional activity have been found in rice PCNA promoter, and these are bound by proteins that apparently confer meristematic tissue-specific expression (Kosugi and Ohashi 1997). Additionally, association of PCNA with a G1 cell cycle protein, cyclin D3, has also been found in pea axillary buds (Shimizu and Mori 1998).

Two PCNA cDNAs have been described in maize. These are almost identical in the coding sequences and although they differ by 40% in the 5' and 3' non-translated regions, they have a very similar expression pattern in proliferating tissues such as spikelets and root and shoot tips (López et al. 1995, 1997).

Maize seed germination accelerated either by adding cytokinins or by osmopriming seeds has been a thoroughly studied model in our laboratory. Under these conditions, the starting time for DNA replication is considerably advanced, from 12–15 h of imbibition in control germination, to only 4–6 h after accelerated germination, while the time of appearance of mitotic figures is also shortened (Reyes-Jiménez et al. 1991, Cruz-García et al. 1995). Benzyladenine (BA), a synthetic cytokinin, stimulates the activity of nuclear DNA polymerases and of protein kinases (Vázquez-Ramos and Reyes 1990, Zúñiga-Aguilar et al. 1995), and promotes the activation of a putative cyclin D-Cdk4 kinase complex during early germination (Cruz-García et al. 1998). The mechanism by which BA promotes such effects is unknown. Although recent evidence indicates that cells respond to cytokinins by promoting signal transduction using a system similar to the two-component regulators found in bacteria (Kakimoto 1996, Brandstatter and Kieber 1998), this system appears to be operative mainly in non-proliferating tissues.

On the other hand, induction of cyclin D3 mRNA (and cell proliferation) by cytokinins in *Arabidopsis* cell suspension cultures has recently been demonstrated (Riou-Khamlichi et al. 1999); this induction occurs in the absence of protein synthesis, involving a signal transduction event as a response to cytokinins.

In the present work, we report on the expression of maize PCNA during embryogenesis and germination and how expression during germination is modified by cytokinins in a cell cycle-related mode. The effect of abscisic acid (ABA) is also studied. PCNA association with a putative cyclin D protein during germination has been found, association that is also hormonally modulated. We discuss the results in terms of the role of PCNA in cell cycle events during early seed germination.

## Materials and methods

### Plant material

Maize seeds (*Zea mays* L. var. Chalqueño) with 95% germination were used. Embryo axes were hand-dissected from dry seeds and used immediately or kept at 4°C in a desiccator until use.

### Chemicals

Protein A-agarose, protease inhibitor cocktail tablets (Complete™), PCR kit, *Bam*HI and *Hind*III were from Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany); nylon transfer membranes (Hybond-N<sup>+</sup>), Hyperfilm ECL and ECL western blotting kit were from Amersham International PLC (Little Chalfont, UK); Immobilon PVDF membranes were from Millipore (Bedford, MA, USA); random primer extension reagent labeling system and ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (110 PBq mol<sup>-1</sup>) were from New England Nuclear, Du Pont (Boston, MA, USA); ampicillin and IPTG were from Research Organics Inc. (Cleveland, OH, USA); Keyhole limpet hemocyanin, complete Freund adjuvant, incomplete Freund adjuvant, lysozyme, protamine,  $\beta$ -mercaptoethanol and glutaraldehyde were from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA); anti-Cyclin D1 (H-295) rabbit polyclonal IgG against full-length human protein, cat. No. sc-753 and anti-PCNA (PC-10) mouse monoclonal IgG against human protein, cat. No. sc-056 were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA); goat anti-mouse IgG (H+L) Premium Quality peroxidase labeled, cat. No. 13871-017 and rabbit anti-goat IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate, cat. No. 19814-011 were from Gibco BRL, Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA). All other chemicals were from Gibco BRL.

### Cloning of PCNA cDNA into pPROEX HTb

The ZmPCNA1 cDNA (López et al. 1995) was amplified by PCR in order to obtain an in-frame cDNA using the following primers: 5'-GCCGGATCCATGTTGG-AGCTGCGGCTT and 5'-TGAAAGCTTTCATGGC-TTCATCTC. The PCR product was purified and ligated to the expression vector pPROEX HTb (Gibco-BRL) using

the *Bam*HI and *Hind*III sites present in the oligos used for amplification. Expression in this vector is under the control of the Lac Iq promoter and the recombinant protein is fused to a tail of 6 histidines in its amino end. *Escherichia coli* BL21 plys cells were transformed with this plasmid and grown in Luria-Bertani (LB) agar containing 50 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin. Resistant colonies were transferred to a nylon membrane and checked for the presence of ZmPCNA1.

For membrane hybridization, ZmPCNA1 cDNA was labeled with (α-P<sup>32</sup>)dCTP (1.1 MBq) using the random primer reaction kit (NEN) following the instructions of the manufacturer. Hybridization took place in a buffer containing 0.3 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.7% SDS and 1 mM EDTA at 60°C; the membrane was washed twice with 0.1 × SSC, 0.1% SDS (w/v) and exposed to an X-ray film. Cells from the positive colonies were grown, the plasmid was extracted, purified and checked for the presence of PCNA by Southern blot analysis following the conditions described above.

### Overexpression and purification of PCNA protein

Cells from a positive clone (PE-ZmP1) were grown in 150 ml LB containing ampicillin (50 µg ml<sup>-1</sup>) at 35°C with vigorous shaking (250 rpm) up to an optical density of 0.6. IPTG (0.5 mM) was added and the cells were further incubated for 3 h. The presence of PCNA was tested in an aliquot of the cell culture by SDS-PAGE and by western blot using an anti-human PCNA antibody (see below).

PCNA protein purification was followed using the ProExt™ HT Prokaryotic Expression System (Gibco-BRL) according to the instructions provided by the manufacturer. Briefly, after IPTG induction of PCNA, cells were collected and lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme, 100 µl ml<sup>-1</sup> protamine and protease inhibitor cocktail). The resulting suspension was centrifuged and the supernatant was passed through the Ni-NTA affinity column previously equilibrated with buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol and 20 mM imidazole). PCNA was eluted with buffer A containing 100 mM imidazole. All of these steps were performed at 4°C.

### Anti-maize PCNA antibodies

Antibodies against PCNA were raised using the recombinant protein coupled to Keyhole limpet hemocyanin (Jemmerson 1987) as follows: Hemocyanin (2 mg) was first dissolved in 0.8 ml water and then 0.2 ml PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl and 4.3 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2) was added. A total of 10 µl of 25% glutaraldehyde and 90 µl PBS were added and the protein solution was incubated for 12 h at room temperature with shaking. The excess of glutaraldehyde was removed by filtration through Centricon-100 tubes.

Purified recombinant PCNA (400 µg) was dissolved in 90 µl PBS and mixed with the hemocyanin solution and incubated 12 h at room temperature.

A rabbit was injected intramuscularly with two pooled preparations of PCNA (800 µg) coupled to hemocyanin, emulsified with 500 µl of complete Freund adjuvant. A second immunization was applied 8 days later, using incomplete Freund adjuvant and this scheme was repeated for further 7 weeks. Anti-PCNA antibodies were immunopurified by incubating the antiserum with recombinant PCNA bound to Immobilon filters and eluted. Antibody titration was followed by western blot.

### Protein extraction and western blot

Maize embryo axes were imbibed for 0, 3, 6, 10, 15, 20 and 24 h in imbibition buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2% sucrose, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 µg ml<sup>-1</sup> chloramphenicol) in the presence or absence of BA (1 µM) or ABA (20 µM). Maize embryo axes (germination experiments) or maize embryos from 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 and 64 days after pollination (DAP) were homogenized at 4°C with extraction buffer (70 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 0.25 mM sucrose, 15 mM β-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5 mM EDTA and protease inhibitor cocktail). Protein extracts were centrifuged at 150000 g for 30 min at 4°C and the protein amount was determined (Bradford 1976).

Proteins (20 µg per lane) were separated by SDS-PAGE electrophoresis (10%) for 2 h at 90 mA, the gels were washed with transfer buffer (20 mM Tris-HCl, pH 10.4, 150 mM glycine, 20% methanol) and proteins were transferred to PVDF filters (0.2 µm pore size) by means of a LKB Transblot apparatus for 1.5 h at 1 mA cm<sup>-2</sup> using the semi-discontinuous buffer system recommended by the manufacturers. Membranes were washed in PBS, transferred to saturation buffer (PBS containing 5% semi-skimmed milk and 0.6% Tween 20) for 1 h and then the first antibody was added to saturation buffer and incubated overnight at 4°C with gentle agitation. Membranes were washed twice in PBS and once in 0.5 M PBS-NaCl and then probed with the second antibody for 1 h at room temperature. Membranes were washed again and visualized using the Enhanced Chemiluminescence reagent (ECL, Amersham). The anti-human PCNA and anti-human cyclin D1 antibodies were used at a 1:1000 dilution; the anti-maize PCNA antibody was used at a 1:1500 dilution. All immunoblots were repeated at least 3 times.

### Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed according to Durán et al. (1984). Anti-human cyclin D1 or anti-maize PCNA at a 1:75 dilution was pre-treated with protein A-agarose and then diluted 10-fold with buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40 and protease inhibitor cocktail). Total protein (50 µg) was added and the mixture was incubated for 3 h at 4°C with gentle agitation; the resin was washed twice with buffer B (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl and 0.025% sodium azide) and once with buffer A. The bound complex was eluted with loading buffer for SDS-PAGE (Laemmli 1970) for immunoblot processing.

## Results

### Overexpression of PCNA and antibody production

ZmPCNA1 cDNA was cloned in frame into the ProEX HTb vector and then used to transform *E. coli* BL21plys. After inducing PCNA expression with IPTG, PCNA protein with an attached hexa-histidine tail was purified through a Ni-NTA affinity column; this was possible because the cloning of PCNA in the vector provides of a hexa-histidine tail. PCNA could be detected in protein extracts and in affinity purified fractions using an antibody against human PCNA (Fig. 1A,B).

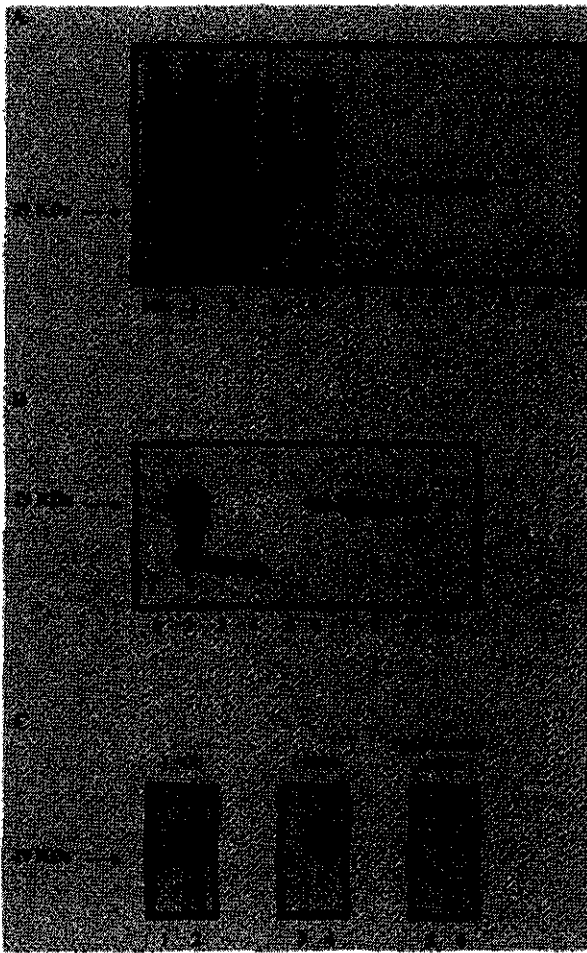


Fig. 1. Overexpression of PCNA and antibody production. PE-ZmP1 cells were grown in LB medium in the presence of ampicillin and IPTG. Cells were lysed and the protein was fractionated through a Ni-NTA affinity column. (A) Protein profile from: lane 1, protein extract from 6-h-imbibed maize axes; lane 2, protein extract from *E. coli* PE-ZmP1; lanes 3 and 4, proteins from fractions not bound to the resin; lanes 5-10, different fractions from the Ni-NTA affinity column. (B) Immunoblot of proteins in A, using an antibody against human PCNA. (C) Anti-maize PCNA antibody production. Purified recombinant maize PCNA was mixed with hemocyanin, injected to rabbits and the resulting antibody was tested using maize protein extracts at a 1:900 dilution (lane 1), or at a 1:3000 dilution (lane 3). Lanes 2 and 4, protein extracts from PE-ZmP1; lanes 5 and 6, immunoblot of maize and *E. coli* protein extracts, respectively, using pre-immune serum.

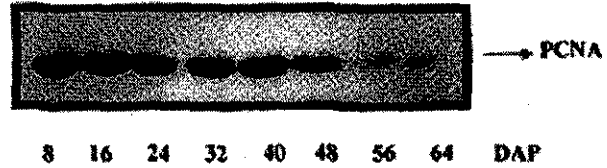


Fig. 2. PCNA expression during maize embryogenesis. Maize embryos isolated after 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 and 64 DAP were homogenized, protein extracts were fractionated through SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis, using the anti-maize PCNA antibody for immunorecognition.

Recombinant PCNA protein coupled to hemocyanin was injected into rabbits and the antibody recovered and immunopurified gave an antibody titer up to 1:3000 when used in western blot assays (Fig. 1C).

### Maize PCNA expression during embryogenesis and germination

We reported previously that PCNA gene was expressed in proliferating maize tissues such as shoots, roots and spikelets (López et al. 1997); however, no signal was obtained by northern blot analyses of mRNA from germinating maize axes or from embryos at different stages of seed development, indicating that the amount of PCNA message in these tissues is extremely low. RT-PCR experiments were performed and these showed that PCNA transcript could be detected only from RNA samples corresponding to 8 DAP and in RNA samples from 24 h of control germination and onwards (results not shown). On the other hand, PCNA protein was present during seed formation and seed germination. A considerable amount of PCNA protein could be observed at 8 DAP and the amount remained fairly constant during the following 40 days, declining thereafter to a minimum after 64 DAP (Fig. 2). Axes in dry seeds also contained a minor amount of PCNA, similar to that present at 64 DAP. After seed imbibition, the protein gradually increased, reaching a peak after about 20 h of germination (Fig. 3). DNA replication during maize germination starts by 15 h (Reyes-Jiménez et al. 1991).

### Hormonal modulation of PCNA expression

If maize embryo axes were imbibed in the presence of BA (1  $\mu$ M), PCNA protein levels increased significantly after 3 h

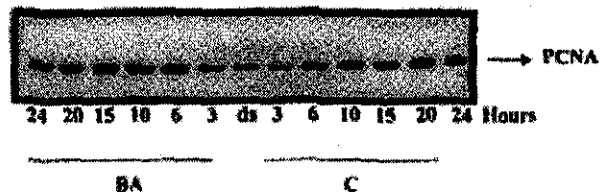


Fig. 3. PCNA expression during maize germination. Effect of BA. Embryo axes imbibed in the presence/absence of BA were imbibed for 3, 6, 10, 15, 20 and 24 h. protein extracts were fractionated through SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis using the anti-maize PCNA antibody. C, control; BA, benzyladenine; ds, axes from dry seeds.

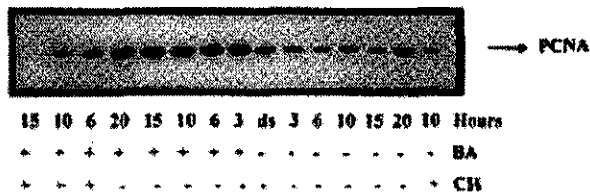


Fig. 4. De novo synthesis of PCNA during germination. This experiment was performed as described in Fig. 3, except that cycloheximide (CH) was added to the indicated samples at the beginning of the imbibition period and axes were imbibed for 6, 10 and 15 h. ds, axes from dry seeds.

of imbibition and by 6 h the amount of PCNA was similar to that found in the control after 20 h. No further increase in PCNA was observed at later times (Fig. 3). Reyes-Jiménez et al. (1991) showed that DNA replication starts by 6 h in BA-stimulated maize embryo axes. Addition of cycloheximide (CH, 10 µg ml<sup>-1</sup>), a protein synthesis inhibitor, to imbibing BA-treated maize axes prevented PCNA synthesis and the protein gradually disappeared and was not detectable after 15 h of imbibition (Fig. 4). This result indicated that both PCNA left over from embryogenesis and the de novo germination-synthesized PCNA had a fast turnover. The levels of PCNA in CH-treated axes were the same whether axes were incubated in the presence or absence of BA.

Abscisic acid (ABA) is a known inhibitor of seed germination and in maize and rye inhibits the onset of DNA replication (Vázquez-Ramos and Osborne 1986, Zarain et al. 1987). The amount of PCNA in axes imbibed in the presence of ABA remained at a level similar to that in control axes up to 20 h of germination and a slight decrease was observed by 24 h (Fig. 5), a result that correlated with the inhibition of DNA replication.

**PCNA and a putative cyclin D protein are part of a protein complex in maize axes**

Prior to DNA replication, PCNA is associated with cyclin D during the G1 phase (Matsuoka et al. 1994). We have reported in the past the presence of a putative cyclin D protein in maize embryo axes and its association with a putative Cdk 4, active protein kinase (Cruz-García et al. 1998). The apparent molecular mass of this putative cyclin was 52 kDa. *Arabidopsis* and alfalfa D-type cyclin cDNAs predict proteins of 39–42 kDa (Soni et al. 1995). However,

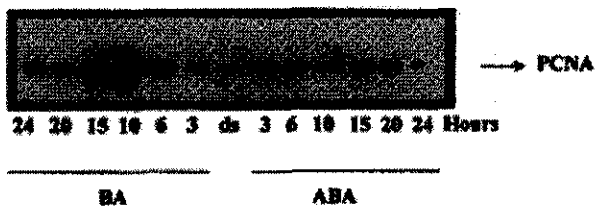


Fig. 5. Effect of ABA on PCNA expression. Embryo axes were imbibed in the presence of either BA or ABA as already described and proteins were prepared for immunoblot analysis. ds, axes from dry seeds.

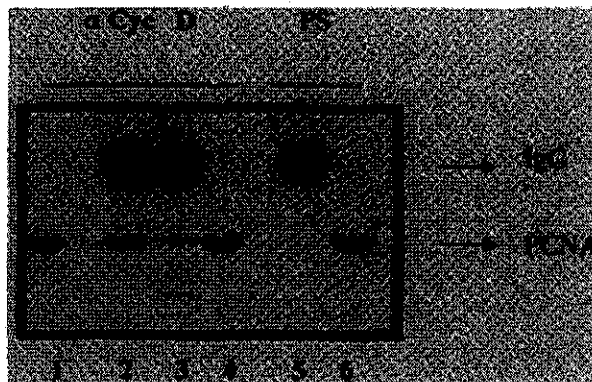


Fig. 6. Association between PCNA and a putative cyclin D. Protein extracts from 3-h-imbibed axes were immunoprecipitated using an anti-human cyclin D1 antibody and the resulting pellet was fractionated through SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis using anti-maize PCNA antibody for immunorecognition. Lane 1, total protein; lanes 2 and 3, immunoprecipitates using 1:50 or 1:100 dilutions, respectively, of the anti-cyclin D antibody; lane 4, protein in the supernatant from the experiment described in lane 2; lane 5, immunoprecipitation using pre-immune serum; lane 6, supernatant from experiment in lane 5.

Huntley et al. (1998) have just reported 50–55 kDa polypeptides for in vitro translated *Arabidopsis* cyclins D1, 2 and 3, reflecting an irregular electrophoretic mobility. The anti-human cyclin D antibody against the full-length protein used in this work must recognize some regions that are conserved in both the human and plant proteins, namely in the regions of aminoacids 103-126, 143-159 and especially in the 181-210 block (Soni et al. 1995, Renaudin et al. 1996).

Searching for an association between the putative cyclin D and PCNA, protein extracts from maize axes were immunoprecipitated using the anti-human cyclin D antibody and the resulting protein pellet was resolved through SDS-PAGE; then, a western blot was performed using the antibody against maize PCNA. Fig. 6 shows that the putative maize cyclin D protein associated with PCNA. The complementary experiment was also performed with similar results: the cyclin D-like protein was immunorecognized after precipitation with the anti-maize PCNA antibody; however, since cyclin D and the heavy chain of IgG could not be resolved in the gel, it was difficult to clearly detect the former (result not shown). It should be noted that not all PCNA is immunoprecipitated by the anti-cyclin D antibody since a considerable amount of protein remained in the supernatant, a result already reported in human PCNA immunoprecipitation experiments (Bravo and MacDonald-Bravo 1987). A band of a lower molecular mass was also observed in some of the immunoprecipitates, probably representing the low molecular weight IgG subunit.

Association between PCNA and the putative maize cyclin D protein was followed during germination of axes in the presence of BA or ABA. Under control conditions, both proteins remained associated during the 15-h period measured (Fig. 7A). However, in the presence of BA, the association between the putative cyclin D and PCNA gradually decreased (Fig. 7B), so that PCNA was no longer detectable by 15 h of germination in anti-cyclin D immuno-

precipitates. We reported previously that the putative cyclin D is degraded by 15 h of germination in the presence of BA (Cruz-García et al. 1998). A contrasting behavior was found for axes imbibed in the presence of ABA. Although PCNA and the cyclin D-like protein were associated only during the first 6 h of germination and by 15 h no PCNA was immunoprecipitated by the anti-cyclin D antibody (Fig. 7C).

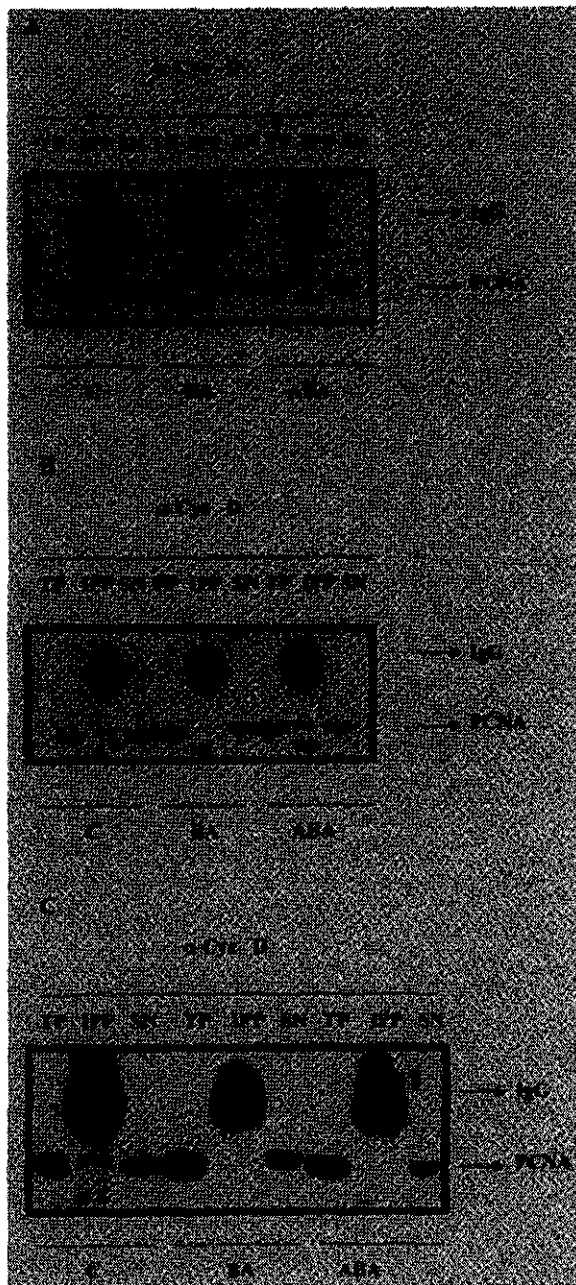


Fig. 7. Interaction of PCNA and the putative cyclin D during germination. Protein extracts from axes imbibed in the presence either of BA, ABA or none (control) for 3 h (A), 6 h (B) or 15 h (C) were immunoprecipitated using the anti-cyclin D antibody and pellets were fractionated through SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis using anti-maize PCNA antibody. TP, total protein; IPP, immunoprecipitate; SN, supernatant.

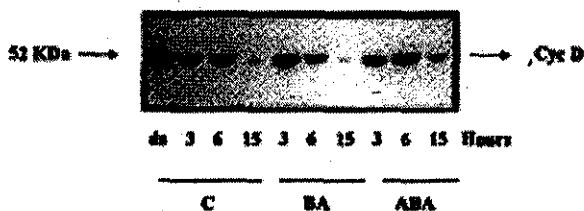


Fig. 8. Presence of a putative cyclin D during germination. Effect of phytohormones. Maize axes were imbibed for 3, 6 and 15 h in the presence either of BA, ABA or none (control). Proteins were extracted, fractionated through SDS-PAGE and prepared for immunoblot analysis using the anti-human cyclin D antibody.

the cyclin D-like protein was still present at 15 h of imbibition in the presence of ABA (Fig. 8).

### Discussion

Our results show that the amount of a cell proliferation marker such as PCNA is high at the initial stages of maize embryogenesis and declines to very low levels as seed maturation is reached, suggesting that if cell proliferation is needed during seed germination, new synthesis of this protein would be required. The gradual increase in PCNA protein that is observed during early maize germination indicates that this is indeed the case and also gives evidence that the reactivation of the cell cycle, very likely, plays a fundamental role for the following seedling establishment. The period of maximal accumulation of PCNA, between 15 and 20 h after imbibition, coincides with the time at which DNA replication is taking place in meristematic tissues (Baiza et al. 1989, Reyes-Jiménez et al. 1991). This correlation is strongly corroborated by the rapid accumulation of PCNA under conditions in which the germination process is accelerated by cytokinins, so that the protein peak is observed around the 3–6-h period of germination, the time at which DNA replication is already taking place under the accelerated conditions (Reyes-Jiménez et al. 1991, Cruz-García et al. 1995). Furthermore, only a residual increase in PCNA amount is observed if maize germination is inhibited by abscisic acid. These results would indicate that DNA metabolism is very responsive during seed germination. Incidentally, maize PCNA can stimulate a maize  $\delta$ -type DNA polymerase further corroborating its identity (M. Rosas and J. M. Vázquez-Ramos, unpublished results).

Of interest is the apparent short half-life of PCNA protein during germination, as treatment with cycloheximide has shown. Since no PCNA message was detected by northern blot, this result would indicate that PCNA is synthesized very efficiently, in a process that would require a continuous translation from a few, but stable, transcripts or, alternatively, regulation of PCNA accumulation by a tightly controlled *de novo* transcription and translation. RT-PCR results indeed indicate that there are very low levels of the transcript(s), detectable only after 24 h of germination under control conditions, suggesting *de novo* transcription of PCNA mRNA as germination advances. Apparently, the message would be virtually absent during late embryogenesis and in dry seeds.



PCNA turnover resembles the behavior of other cell cycle-related proteins during germination. We have recently reported that the putative cyclin D protein that has been studied here is also subjected to a rapid accumulation and degradation during accelerated germination (Cruz-García et al. 1998).

A certain amount of PCNA protein is present in dry seeds, as we have reported for other cell cycle-related proteins and activities in maize dry seeds, such as replicative-type DNA polymerases and DNA primase (Coello and Vázquez-Ramos 1995, García et al. 1997), DNA ligase (Vázquez et al. 1991), putative cyclin B, cyclin D, Cdk4 kinase, E2F and p53 proteins (Cruz-García et al. 1998) and p34<sup>cdc2</sup> kinase (Herrera-Teigeiro et al. 1999). It would appear that during the seed development program, there might be a decision to store a potential amount of cell cycle proteins that will be required and essential for the germination process. Another possibility, i.e. that protein products are not degraded due to the process of seed drying during late seed formation, seems unlikely since cell proliferation during seed embryogenesis takes place several weeks before, in the early stages of seed formation (Bewley and Black 1994). Regulation of these proteins, however, appears to differ during germination: DNA polymerase-primase complex, p34<sup>cdc2</sup> kinase and the putative cyclin B protein, remain present and at a constant level throughout germination, but their activity is modulated post-translationally (Coello and Vázquez-Ramos 1995, Cruz-García et al. 1998, Herrera-Teigeiro et al. 1999), whereas others like the putative p53 and cyclin D proteins disappear quickly during germination (Cruz-García et al. 1998); an E2F-like protein and the activity of DNA polymerases 1 and 3, do not seem to vary much (García et al. 1997, Cruz-García et al. 1998) and a protein like PCNA accumulates as germination advances, with a direct correlation with DNA replication (the present work).

Regulation of PCNA function during germination may not be restricted to its participation in DNA replication as we have found an association between PCNA and a putative cyclin D. Previously, we gave evidence of this protein as cyclin D mainly because it is recognized and immunoprecipitated by an antibody against human cyclin D1 (there are several conserved amino acid tracks common to both) and because it associates to a putative Cdk4 protein with kinase activity. This cyclin D-like protein disappears as germination advances and disappears more rapidly if germination is accelerated. The same behavior is found for the accompanying kinase activity (Cruz-García et al. 1998). The association of this protein with PCNA, as demonstrated by the immunoprecipitation of either the putative cyclin or PCNA by an antibody against the other, adds further evidence to its definition as cyclin D. The physiological significance of this association is not well understood. However, in mammalian systems it is speculated that the initiation of the S phase could be, at least partially, controlled by 'sequestering' PCNA (Pagano et al. 1994), a mechanism that would then appear to be well conserved among higher eukaryotes. In addition to this, the finding by Shimizu and Mori (1998) that PCNA and cyclin D form a complex in dormant axillary pea buds, but not in growing buds, is also suggestive

of PCNA being 'sequestered' in tissues with restricted proliferation, a metabolic state present during early seed germination.

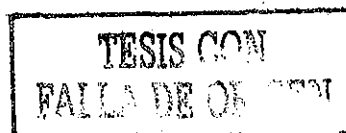
Association of PCNA with the putative cyclin D was modified if the germination timing was changed by the action of exogenous phytohormones. BA caused a rapid dissociation of the complex, very likely due to degradation of the putative cyclin D, a process that takes place at times when DNA replication is activated by BA (3–6 h of germination), probably indicating that PCNA is being released to join the replication apparatus. On the other hand, one would expect that inhibition of germination by exogenous ABA should have produced the opposite effect, allowing PCNA and the putative cyclin D to remain associated in a complex for a longer time. However, the complex dissociates by 15 h of germination in the absence of DNA replication and the putative cyclin D protein is still present. In mammalian cells, PCNA is inhibited by the p53-induced p21<sup>Cip1</sup> protein under conditions in which DNA replication is blocked or if chromosomal damage occurs (Kelman 1997). Recently, Wang et al. (1998) have demonstrated in *Arabidopsis* that ABA inhibits Cdc2-like histone H1 kinase activity through the induction of a p27-like kinase inhibitor, ICK1, a protein that also interacts with cyclin D3, suggesting a mechanism by which ABA could control the cell cycle in plants. It would be very interesting to find out whether ABA could also produce inhibition of DNA replication and the cell cycle during germination by inducing the accumulation of inhibitors such as p21 that could interfere with both PCNA and Cyclin D.

*Acknowledgements* – The authors acknowledge the receipt of grants from CONACYT (3407P-N and 113912) and from DGAPA (IN-209895).

## References

- Baiza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J Plant Physiol* 135: 416–421
- Bauer GA, Burgers PMJ (1988) The yeast analogue of mammalian cyclin/proliferating cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7506–7510
- Bewley JD, Black M (eds) (1994). *Seeds, Physiology of Development and Germination*, 2nd Ed. Plenum Press, New York, NY. ISBN 0-306-44748-7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Brandstatter I, Kieber JJ (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1009–1020
- Bravo R, MacDonald-Bravo H (1987) Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105: 1549–1556
- Coello P, Vázquez-Ramos JM (1995) Maize DNA polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur J Biochem* 231: 99–103
- Cruz-García F, Jiménez LF, Vázquez-Ramos JM (1995) Biochemical and cytological studies in osmoprimed maize seeds. *Seed Sci Res* 5: 15–23
- Cruz-García F, Zúñiga-Aguilar JJ, Vázquez-Ramos JM (1998) Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol Plant* 102: 573–581

- Durán N, Bach M, Puigdomènech P, Palau J (1984) Characterization of antigenic polypeptides of the RNP, Sm and SS-B nuclear antigens from calf thymus. *Mol Immunol* 21: 731-736
- García E, Orjuela D, Camacho Y, Zúñiga JJ, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM (1997) Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Mol Biol* 33: 445-455
- Hata S, Kouchi H, Tanaka Y, Mimimi E, Matsumoto T, Suzuka I, Hashimoto J (1992) Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating-cell nuclear antigen, DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein. *Eur J Biochem* 203: 367-371
- Horreari-Teigeiro I, Jiménez García LF, Vázquez-Ramos JM (1999) Benzyladenine promotes early activation of p34<sup>cdc2</sup>-like kinase(s) during maize germination. *Seed Sci Res* 9: 55-62
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jaer S, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bunnister AJ, Kouzarides T, Gutiérrez C, Doonan JH, Murray JAH (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* 37: 155-169
- Jermerson R (1987) Multiple overlapping epitopes in the three antigenic regions of horse cytochrome C. *J Immunol* 138: 213-219
- Kakimoto T (1996) CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985
- Kelman Z (1997) PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene* 14: 629-640
- Kodama H, Ito M, Ohnishi N, Suzuka I, Komamine A (1991) Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur J Biochem* 197: 495-503
- Kosugi S, Suzuka I, Ohashi Y, Murakami T, Arai Y (1991) Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* 19: 1571-1576
- Kosugi S, Ohashi Y (1997) PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* 9: 1607-1619
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- López I, Khan S, Vázquez J, Hussey P (1995) Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochim Biophys Acta* 1260: 119-121
- López I, Kahn S, Vázquez J, Hussey P (1997) The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programs. *Biochim Biophys Acta* 1353: 1-6
- Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PM (1987) Molecular cloning of cDNA encoding for rat cell proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J* 6: 637-642
- Matsumoto T, Hata S, Suzuka I, Hashimoto J (1994) Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 223: 179-187
- Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A (1994) D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 269: 11030-11036
- Miyuchi K, Fritzel MJ, Tan EM (1978) An autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234
- Morris GF, Mathews MB (1989) Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 264: 13856-13864
- Nasheuer HP, Moore A, Wahi AF, Wang TSF (1991) Cell cycle dependent phosphorylation of human DNA polymerase  $\alpha$ . *J Biol Chem* 266: 7893-7903
- Paganò M, Theodoras AM, Tam SW, Druetta GF (1994) Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev* 8: 1627-1639
- Prellich G, Stillman B (1988) Coordinate leading and lagging strand synthesis during DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* 53: 117-126
- Prellich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520
- Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi H, Rouzé P, Sauter M, Savouré A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JAH (1996) Plant cyclins: A unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* 32: 1003-1018
- Reyes-Jiménez J, Jiménez-García LF, González J, Vázquez-Ramos JM (1991) Benzyladenine stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Sci Res* 1: 113-117
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544
- Shijvi K, Kenny K, Wood R (1992) Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69: 367-374
- Shimizu S, Mori H (1998) Changes in protein interactions of cell cycle-related genes during the dormancy-to-growth transition in pea axillary buds. *Plant Cell Physiol* 39: 1073-1079
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved Retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103
- Suzuka I, Daidoji H, Matsuoka M, Kudowaki K-I, Takasaki Y, Nakane PK, Moriuchi T (1989) Gene for proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3189-3193
- Suzuka I, Hata S, Matsuoka M, Kosugi S, Hashimoto J (1991) Highly conserved structure of proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) gene in plants. *Eur J Biochem* 195: 571-575
- Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM (1986) An auxiliary protein for DNA polymerase  $\delta$  from fetal calf thymus. *J Biol Chem* 261: 12310-12316
- Tsurimoto T, Stillman B (1990) Functions of replication factor C and proliferating cell nuclear antigen: Functional similarities of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1023-1027
- Vázquez E, Montiel F, Vázquez-Ramos JM (1991) DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: A model relating defects in DNA metabolism in seeds to loss of germinability. *Seed Sci Res* 1: 269-273
- Vázquez-Ramos JM, Osborne DJ (1986) Analysis of the DNA synthesized during early germination of rice embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutat Res* 166: 39-47
- Vázquez-Ramos JM, Reyes J (1990) Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes. *Can J Bot* 68: 2590-2594
- Waga S, Hannon G, Beach D, Stillman B (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* 15: 501-510
- Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the replication and repair factor PCNA. *Cell* 71: 505-514
- Xiong Y, Hannon GI, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704
- Zarain M, Bernal I, Vázquez-Ramos JM (1987) Effect of benzyladenine on the DNA synthesis during early germination of maize embryo axes. *Mutat Res* 181: 103-110
- Zúñiga-Aguilar JJ, Gómez A, López I, Vázquez-Ramos JM (1995) Does benzyladenine stimulate DNA metabolism by modifying gene expression during maize germination? *Seed Sci Res* 5: 219-226



## REFERENCIAS

- Ajchenbaum, F., Ando, K., DeCaprio, J. A. and Griffin, J. D. 1993. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **268**: 4113-4119
- Ando, K., Ajchenbaum-Cymbalista, F. and Griffin, J. D. 1993. Regulation of G1/S transition by cyclin D2 and D3 in hematopoietic. *Cell.* **90**: 9571-9575
- Atl, J., Gladdenand, A., and Diehl, A. J. 2002. p21<sup>cip1</sup> promotes cyclin D nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J. Biol. Chem.* **277**:8517-8523
- Baiza, A., Aguilar, R., and Sánchez de Jiménez, E. 1986. Histones and the first cell cycle in maize germination. *Physiol. Plant.* **68**: 259-264
- Baiza, A., Vázquez-Ramos, J. M. and Sánchez de Jiménez, E. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *J. Plant Physiol.* **135**: 416-421
- Bauer, G. A. and Burgers, P. M. J. 1988. The yeast analog of mammalian cyclin/proliferating cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7506-7510
- Bewley, J. D., and Black, M. 1994. Seed physiology of development and germination. Plenum Press, New York and London. p.p. 147-191
- Black, A. R., and Azizkhan-Clifford, J. 1999. Regulation of E2F: a family of transcriptional factor involved in proliferation control. *Gene.* **237**: 281-302
- Boniotti, M. B. and Gutierrez, C. 2001. A cell cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* **28**: 341-50
- Booher, R., and Beach, D. 1988 Involvement of cdc13+ in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J.* **7**: 2321-2327

## REFERENCIAS

- Brault, M., and Maldiney, R. 1999. Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 403-412
- Bravo, R., and Celis, J. E. 1980. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J. Cell Biol.* **84**: 795-802
- Brizuela, L., Draetta, G., Beach, D. 1987. p13<sup>sup1</sup> acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *EMBO J.* **6**: 3507-3514
- Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P. J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B. O., and Archer, S. J. 1998. Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell cycle inhibitor p19<sup>INK4b</sup>. *Nature* **395**: 244-250
- Buchanan, Gruissem and Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant pphysiologists, pp.268
- Burgers, P.M. J. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J. Biol. Chem.* **266**: 22698-22706
- Byrnes, J. J., Downey, K. M., Black, V. L., and So, A. G. 1976. A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta. *Biochem.* **15**: 2817-2823
- Caers, L. I., Peumans, W. J. and Carlier, A. R. 1979. Preformed and newly synthesized RNA in germination wheat embryos. *Planta* **144**: 491-496
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H. and Nada-Ginard, B. 1993. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**: 979-992
- Coenen, C. and Lomax, T.L. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* **2**: 351-356.
- Colasanti, J., Tyers, M. and Sundaresan, V. 1991. Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34<sup>cdc2</sup> homologue from *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3377-3381
- Conger, B. V. and Carabia, J. V. 1976. Microspectrophotometric determination of the 2C and 4C nuclear complement in the root and shoot of the dormant maize embryo. *Environ. Exp. Bot.* **16**: 171-175
- Cruz-García, F., Zuñiga-Aguilar, J. J. and Vázquez-Ramos J. M. 1998. Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **102**: 573-581
- Chuang, L. S., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G. and Li, B. F. 1997. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21<sup>WAF1</sup>. *Science* **277**: 1996-2000
- D'Agostino, I.B. and Kieber, J. J. 1999. Molecular mechanisms of cytokinin action. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 359-364
- Datta, K., Marsh, L. and Marcus, A. 1983. Early growth of wheat axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology.* **72**: 394-397

## REFERENCIAS

- De Veylder, L. Engler, J. D. Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G., and Inzé, D. 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordial formation. *Planta* **208**: 453-462
- De Veylder, L. Segers, G. Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M., and Inzé, D. 1997. The *Arabidopsis* Cks1 at protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2a At and Cdc2b At. *FEBS lett.* **412**: 446-452
- Deltour, R. and Jacquard, M. 1974. Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* L. *Ann. Bot.* **38**: 329-334
- Devoto, S. H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T., Nevins, J. R. 1992. A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33cdk2 is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell.* **8**:167-76
- Draetta, G. and Beach, D. 1988. Activation of Cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: Cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement *Cell* **54**: 17-26
- Dunphy, W. G. 1994. The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* **4**: 202-207
- Ellison, V. and Stillman, B. 1998. Reconstitution of recombinant human replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J. Bio.l Chem.* **273**: 5979-5987
- Feiler, H. and Jacobs, T. 1991. Cloning of the pea cdc2 homologue by efficient immunological screening of PCR products. *Plant Mol. Biol.* **17**: 321-333
- Ferreira, P. C. G., Hermerly, A. S., Villaroel, R., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1991. The *Arabidopsis* functional homolog of the p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. *Plant Cell* **3**: 531-540
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. 1998. The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 10493-10498
- Fober, P.R., Coen, E. S., and Doonan, J. H. 1994. Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of gene during the cell cycle in plants. *EMBO J.* **13**: 616-624
- Gary, R., Ludwig, D. L. Cornelius, H. L., MacInnes, M. A. and Park, M. S. 1997. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.* **272**: 24522-24529
- Girard, F, Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell.* **67**: 1169-1179
- Gottesfeld, J.M., Wolf, V.J., Dang, T., Forbes, D.J., and Hartl, P. 1994. Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIIB component. *Science.* **263**: 81-84
- Gould, K. L., and Nurse, P. 1989. Protein tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature.* **342**: 39-45

## REFERENCIAS

- Grana, X., Garriga, J., and Mayol, X. 1998. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* **17**: 3365-3383
- Hall, P. A., Kearsley, J.M., Coates, P. J., Norman, D. G. Warbrick, E., and Cox, L. S. 1995. Characterization of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene*. **10**: 2427-2433
- Hannon, G. J., and Beach, D. 1994. p15<sup>INK4b</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$  induced cell cycle arrest. *Nature*. **371**: 257-261
- Harper, J. W., and Elledge, S. J. 1996. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**: 56-64
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. **246**: 629-634
- Hashimoto, J., Hirabayashi, T., Hayano, Y., Hata, S., Ohashi, Y., Suzuka, I., Utsugi, T., Toh-E, A. and Kikuchi, Y. 1992 Isolation and characterization of cDNA clones encoding *cdc2* homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.* **12**: 865-876.
- Hata, S., Kouchi, H., Suzuka, I., and Ishii, T. 1991 Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* **10**: 2681-2688
- Hata, S., Kouchi, H., Tanaka, Y., Minami, E., Matsumoto, T., Suzuka, I., and Hashimoto, J. 1992. Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell-nuclear antigen, DNA polymerase delta auxiliary protein. *Eur. J. Biochem.* **203**: 367-371
- Healy, S.J.M., Menges, M., Doonan, J.H., and Murray, J. A .H. 2001. The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase *cdc2a* but are differentially controlled. *J. Biol. Chem.* **276**: 7041-7047.
- Hengst, L., and Reed, S. I. 1996. Translational control of p27<sup>kip1</sup> accumulation during the cell cycle. *Science*. **271**: 1861-1864
- Hengst, L., and Reed, S. I., 1998. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **227**:25-41
- Herrera, I., Sanchez, M.P., Molina, J., Plasencia, J., and Vázquez-Ramos, J.M. 2000 Proliferating cell nuclear antigen expresión in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **110**: 127-134
- Hirt, H., Pay, A., Bogre, L., Meskiene, I. and Heberle-Bors, E. 1993. Cdc2MsB, a cognate *cdc2* gene from alfalfa complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast *cdc28* mutants. *Plant J.* **4**: 61-69
- Huntley, R.P., and Murray, J. A. H. 1999. The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 440-446
- Hutchinson, C., and Glover, D. M. 1995. Cell cycle control. *Frontiers in Molecular Biology.* pp.148
- Jacobs, T. W. 1995 Cell cycle control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 317-339
- Jerzmanowski, A., and Cole, R. D. 1992. Partial displacement of histone H1 from chromatin is required before it can be phosphorylated by mitotic H1 kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**: 8514-20

## REFERENCIAS

- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., and Renaudin, J. P. 2000. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**: 607-620
- Kato, J., Matsuoka, M., Polyak, K., Massagué, J., and Sherr, C. J. 1994 Cyclin AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**: 487-496
- Kelman, Z., and O'Donnell, M. 1995. Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps [published erratum appears in *Nucl. Acids Res* 1995 23: 4938]. *Nucl. Acids. Res.* **23**: 3613-3620
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, function and interactions. *Oncogene* **14**: 629-640
- Kelman, Z., and Hurwitz, J. 1998. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism?. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 236-238
- Kenny, M. K., Lee, S.H., and Hurwitz, J. 1989. Multiple functions of human single-stranded-DNA binding protein in simian virus 40 DNA replication: single-strand stabilization and stimulation of DNA polymerases alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 9657-9661
- Kimura, S., Suzuki, T., Yanagawa, Y., Yamamoto, T., Nakagawa, H., Tanaka, I., Hashimoto, J., and Sakaguchi, K. 2001. Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease-1 (FEN-1), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. *Plant J.* **28**: 643-53
- Kodama, H., Ito, M., Ohnishi, N., Suzuka, I., and Komamine, A. 1991. Molecular cloning of the gene for plant proliferating-cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Eur. J. Biochem.* **197**: 495-503
- Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. 1999. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* **97**: 431-4
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza B. R., and Roberts, J. M. 1992. Formation and activation of a cyclin E-Cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science.* **257**: 1689-1694
- Kornberg, A. 1988. DNA replication *The J. Biol. Chem.* **263**: 1-4
- Koundriockoff, S., Jónsson, O. Z., Hasan, S., Jong, R. N., Vliet, P., Hottiger, M., and Hübscher. 2000. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**: 22882-22887
- Krek, M. and Nigg, E. A. 1991. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* **10**: 3331-3341
- Lapidot-lifson, Y., Patinkin, D., Prody, C. A., Ehrlich, G., Seidman, S., Ben-Aziz, R., Benseler, F., Eckstein, F., Zakut, H., and Soreq, H. 1992. Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of cdc2 required in hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 579-583

REFERENCIAS

- Lee, S. H., and Hurwitz, J. 1990. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase  $\epsilon$ , Proliferating Cell Nuclear Antigen, and activator 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 5672-5676
- Lee, S. H., Pan, Z. Q., Kwong, A. D., Burgers, P. M. J. and Hurwitz, J. 1991. Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon in vitro. J. Biol. Chem. **266**: 22707-22717
- Levin, D. S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A. E. 1997. An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 12863-12868
- Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M. R. and Burgers, P. M. 1995. Lagging strand DNA synthesis at the eukariotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. J. Biol. Chem. **270**: 22109-22112
- López, I., Khan, S., Vázquez, J. and Huseey P. J. 1995. Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. Biochem. Biophys. Acta **1260**: 119-121.
- López, I., Khan, S., Vázquez, J. and Huseey P. J. 1997. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene family in *Zea mays* is composed of two members that have similar expression programmes. Biochem. Biophys. Acta **1353**, 1-6
- Lui, H., Wang, H., Delong, C., Fowke, L. C., Crosby, W. L., and Fobert, P. R. 2000. The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. Plant J. **21**:379-385.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., Harel-Bellan, A. 1998. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. Nature. **391**: 601-605
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolezi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Konez, C. and Dudits, D. 1997. Cell cycle synchronized alfalfa cells. Plant Cell **9**: 223-235
- Martín, C. and Northecote, D. H. 1981. Qualitative and quantitative changes in mRNA of castor beans during the initial stages of germination. Planta **151**: 189-197
- Masumori, M., Yamamoto, N. And Sasaki, S. 1992. Stored mRNA in pine seeds prolonged preservation in dry seeds and disappearance during germination. Plant Cell Physiol. **33**: 485-488
- Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B. R. Jr., and Garrels, J. I. 1984. The identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature **309**: 374-376
- Matsumoto, K., Hata, S., Suzuka, I., and Hashimoto, J. 1994. Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. **23**: 179-187
- Matsumoto, K., Moriuchi, T., Koji, T., and Nakane, P.M. 1987. Molecular cloning of cDNA encoding for rat cell proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. EMBO J. **6**: 637-642
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. 1991. Colony-stimulated factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell. **65**: 701-713



REFERENCIAS

- Meyerowitz, E. M. 1997. Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell*. **88**: 299-308
- Miao, G., Hong, Z. and Verma, D. 1991 Two functional soybean genes encoding p34cdc2 protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 943-947
- Millar, J.B., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C. and Russell, P. 1991. p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 10500-10504
- Mironov, V., Deveylder, L., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell*. **11**: 509-521
- Miyachi, K., Fritzler, M. J., and Tan, E. M. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* **121**: 2228-2234
- Morgan, D. O. 1995. Principales of CDK regulation. *Nature*. **374**: 131-134
- Muller, S. J. and Caradonna, S. 1996. Specific association of cyclin-like Uracil DNA-glycosilase with the proliferating cell nuclear antigen. *Exp. Cell. Res.* **226**: 346-355
- Murakami, Y., and Hurwitz, J. 1993. Functional interactions between SV40 T antigen and other replication proteins at the replication fork. *J. Biol. Chem.* **268**: 11008-11017
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. and Shinmyo, A. 1999. Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant. J.* **18**: 243-252
- Newman, T., de Bruijn, F. J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlogge, J., Raikhel, N., Somerville, S. Thomashow, M., Retzel, E. and Somerville, C. 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**: 1241-1255
- Newton, R. J. 1997. Abscisic acid effects on fronds roots of *Lemna minor* L. *Am. J. Bot.* **64**: 45-49
- Nigg, E. A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**: 471-480
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. **344**: 503-508
- Ohta, K., Shiina, N., Okumura, E., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Endo, S., Gotoh, Y., Nishida, E., and Sakai, H. 1993. Microtubule nucleating activity of centrosomes in cell-free extracts from *Xenopus* eggs: involvement of phosphorylation and accumulation of pericentriolar material. *J. Cell Sci.* **104**:125-137
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**: 961-971
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. **269**: 682-685

## REFERENCIAS

- Pagano, M., Theodoras, A. M., Tam, S.W. and Draetta, G.F. 1994. Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**: 1627-1639
- Pan, Z. Q., Amin, A. A., Gibbs, E., Niu, H., and Hurwitz, J. 1994. Phosphorylation of the p34 subunit of human single-stranded-DNA-binding protein in cyclin A-activated G1 extracts is catalyzed by cdk-cyclin A complex and DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**: 8343-8347
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., and Nigg, E. A. 1990. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* **61**: 591-602
- Pines, J. 1995a. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer Res.* **66**: 181-212
- Pines, J. 1995b Cyclins and cyclin-dependent kinas: biochemical view. *Biochem. J.* **308**: 697-711
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. and Bergounioux, C. 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* **476**: 78-83
- Prelich, G., and Stillman, B. 1988. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell.* **53**:117-126
- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. and Stillman B. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* **326**: 517-520
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M. B. and Gutierrez, C. 1999. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucl. Acid Res.* **27**: 3527-3533
- Reeves, R. 1992. Chromatin changes during the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 413-423
- Reichheld, J-P, Chaubet, N., Shen, W. H., Renaudin, J-P, and Gigot, C. 1996. Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle on *Nicotiana tabaccum* BY2 cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 13819-13824
- Renaudin, J. P., Doonan, J. H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T, Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D. A., Sundaresan, V. and Murray, J. A. H. 1996. Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B-, and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1003-1018
- Renaudin, J-P, Colasanti, J., Rime, H., Yan, Z., and Sundaresan, V. 1994. Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7375-7379
- Resnitzky, D., and Reed, S. I. 1995. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1 to S transition. *Mol. Cell Biol.* **15**: 3463-4369
- Resnitzky, D., Hengs, H. and Reed, S. S. 1994 Cyclin A-associated kinase activity is rate-limiting fir entrance into S phase and is negative regulated in G1 by p27. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4347-4352

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

REFERENCIAS

- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A., and Murray, J.A.H. 1999. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544
- Robert, A. B., Richard, S. M., and Leigh, A. H. 1997. Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J. Biol. Chem.* **272**: 4647-4650
- Robertson, J. M., Yeung, E. C., Reid, D. M., and Hubick, K.T. 1990. Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. 2. Mitotic activity. *J. Exp. Bot.* **42**: 339-350
- Rosas-Carballo, M. 1999. Sobreexpresión y purificación del antígeno nuclear de proliferación celular: PCNA. Tesis
- Russo, A. A., Tong, L., Lee, J. O., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. 1998. Structural basis for inhibition of the cyclin dependent kinase CDK6 by the tumour suppressor p16<sup>INK4a</sup>. *Nature*. **395**: 237-243
- Sánchez de Jiménez, E., and Aguiar, R. 1984. Protein synthesis patterns. *Plant Physiol.* **75**: 231-234
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., and Young, R. A. 1995. Association of CDK-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature*. **374**: 280-282
- Sherr, C. J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. **73**: 1059-1065
- Sherr, C. J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. **79**: 551-555
- Shimizu, S., and Mori, H. 1998. Changes in protein interactions of cell cycle-related genes during the dormancy-to-growth transition in pea axillary buds. *Plan Cell Physiol.* **39**: 1073-1079
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M., and Chittenden, T. 1992. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell*. **68**: 157-166
- Shivji, M. K. K., Kenny, M. K. and Wood, R. D. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**: 367-374
- Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H., and Murray, J. A. H. 1995. A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**: 85-103
- Sorrell, D. A., Combettes, B., Chaubet-Gigot, C., and Murray, J.A.H. 1999 Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cell. *Plant Physiol.* **119**: 343-351
- Stiegler, P., Kasten, M., and Giordano, A., 1998. The RB family of cell cycle regulatory factor. *J. Cell Biochem. Suppl.* **31**: 30-36
- Suzuka, T., Daidoji, H., Matsuoka, M., Kadowaki K-L., Takasaki, Y., Nakane, P. K. and Moriuchi, T. 1989. Gene for proliferating cell nuclear antigen (DNA polymerase  $\delta$  auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3189-3193

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS

- Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G., and Downey, K. M. 1986. An auxiliary protein for DNA polymerase- $\delta$  from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.* **261**: 12310-12316
- Tishkoff, D.X., Filosi, N., Gaida, G. M., and Kolodner, R. D. 1997. A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* RAD27 is distinct from DNA mismatch repair. *Cell.* **88**: 253-263
- Torres-Espinosa, A. 2002 Estudio de los complejos que forma PCNA durante la germinación de maíz. Tesis
- Tsurimoto, T. 1998. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* **1443**: 23-39
- Tsurimoto, T., Melendy, T., and Stillman, B. 1990 a. Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at SV40 DNA replication origin. *Nature.* **346**: 543
- Tsurimoto, T., and Stillman, B. 1990 b. Functions of replication factor C and proliferating cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1023-1027
- Turchi, J. J., Huang, L., Murante, R. S., Kim, Y., and Bambara, R. A. 1994. Enzymatic Completion of Mammalian Lagging-Strand DNA Replication *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9803-9807
- Umar, A., Buermeier, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M. and Kunkel, T. A. 1996. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at step preceding DNA resynthesis. *Cell.* **87**: 65-73
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Fornace, A. J., Hoffman, B., and Leibermann, D. A. 1996. The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Oncogene.* **12**: 2579-2594
- Van Hop, D., Gaikwad, A., Yadav, B. S., Reddy, K. M. Sopory, S., Mukherjee, S. K. 1999. Suppression of pea nuclear topoisomerase 1 enzyme activity by pea PCNA. *Plant J.* **19**: 153-162
- Vázquez-Ramos, J. M., and Osborne, D. J. 1986. Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Res.* **166**: 39-47
- Vázquez-Ramos, J. M., and Reyes, J. 1990. Stimulation of DNA synthesis and DNA polymerase activity by benzyladenine during early germination of maize axes. *J. Bot.* **68**: 2590-2594
- Waga, S., Hannon, G., Beach, D., and Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replications by interactions with PCNA. *Nature.* **369**: 574-578
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A., Crosby, W. L., and Fowke, L. C. 1998. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* **15**: 501-510
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L. C. 2000a. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**: 613-623

## REFERENCIAS

- Waga, S., and Stillman, B. 1994. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature*. **369**: 207-12
- Weinberg, D.H., Collins, K. L., Simancek, P., Russo, A., Wold, M. S., Virshup, D. M., and Kelly, T. J. 1990. Reconstitution of SV40 DNA replication with purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 8692-8696
- Wold, M. S. 1997. Replication protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 61-92
- Wold, M. S., and Kelly, T.J. 1988. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for *in vitro* replication of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 2523-2527
- Wu, X., Li, J., Li, X., Hsieh, C. L., Burgers, P. M., and Lieber, M. R. 1996. Processing of branched DNA intermediates by complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic. Acids, Res.* **24**: 2036-2043
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. **366**: 701-704
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. 1992. D-types cyclins associate with multiple protein kinase and the replication and repair factor PCNA. *Cell*. **71**: 505-514
- Yamaguchi, M., Fabian, T., Sauter, M., Bhalerao, R. P. Schrader, J., Sandberg, G., Umeda, M. and Uchimiya, H. 2000. Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant J.* **24**: 11-20
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R., and Matsumura, F. 1990. Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature*. **344**: 675-678
- Zhang, G., Gibbs, E., Kelman, Z., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. 1999. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1869-1874
- Zhang, P., Sun, Y., Zhang, I., Zhang, Y., and Lee, M. 1998. The interdomain connector of human PCNA is involved in a direct interaction with human polymerase  $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **273**: 713-719
- Zhou, y., Fowke, L. C. and Wang, H. 2002. Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Rep.* **20**: 967-975
- Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N., and Harlow, E. 1993. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* **7**: 1111-1118
- Zlatanova, J. S., Ivanov, P. S., Stoilov, L. M., Chimshirova, K. V., Stanchev, B. S. 1987. DNA repair precedes replicative synthesis during aearly germination in maize. *Plant Mol. Biol.* **10**: 139-144
- Zlotkin, T., Kaufmann, G., Jiang, Y., Lee, M.Y., Uitto, L., Syvaaja, J., Dornreiter, I., Fanning, E., and Nethanel, T., 1996. DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular- DNA replication. *EMBO J.* **15**: 2298-2305