



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Actividad de la proteína intrínsecamente desordenada p15^{PAF} en el replisoma o cómo el desorden orchestra la replicación celular

Susana Barrera Vilarmau

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Química teòrica i Modelització computacional
Facultat de Química, Universitat de Barcelona

Actividad de la proteína intrínsecamente desordenada p15^{PAF} en el replisoma o cómo el desorden orchestra la replicación celular

Doctoranda:

Susana Barrera Vilarmau



Director de tesis:

Dr. Ramon Crehuet Simon

Institut de Química avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)



Tutor de tesis:

Dr. Fermín Huarte Larrañaga

Facultat de Química (UB)



**Actividad de la proteína
intrínsecamente desordenada
p15^{PAF} en el replisoma
o cómo el desorden orquesta la replicación
celular**

Tesis doctoral

Susana Barrera Vilarmau

Institut de Química Avançada de Catalunya
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Solo sé seguir.

Las tres S (lema) del linaje de los aquitanos. «Aquitania», de Eva García Sáenz de Urturi, Premio Planeta 2020

Índice

I. Prefacio.....	13
II. Resumen.....	19
Replicación del DNA: p15^{PAF} como directora de orquesta.....	21
Replicación del DNA: p15^{PAF} como directora d'orquesta.....	23
DNA replication: p15PAF as an orchestra conductor.....	25
III. Actividad de la proteína intrínsecamente desordenada p15^{PAF} en el replisoma.....	29
0. Contexto biológico y bioquímico.....	31
0.1. La replicación del DNA.....	33
0.1.1. Qué es la replicación.....	33
0.1.2. Cómo ocurre la replicación.....	34
0.2. El replisoma.....	37
0.2.1. Función del replisoma.....	37
0.2.2. El replisoma de <i>E. coli</i>	38
La pinza b.....	41
0.2.3. El replisoma eucariota.....	43
0.3. Proteínas más importantes del replisoma eucariota.....	48
0.3.1. La helicasa CMG.....	48
0.3.2. La Polimerasa alfa-primasa.....	48
0.3.3. Las DNA polimerasas epsilon y delta.....	49
0.3.4. La abrazadera PCNA y el cargador de la abrazadera RFC.....	50
0.4. PCNA.....	52
0.4.1. Estructura de PCNA.....	53
PIP-box.....	57
0.4.2. Funciones de PCNA en la replicación eucariótica del DNA.....	59
Replicación del DNA.....	59
Reparación del DNA.....	61
Mantenimiento de las estructuras cromosómicas.....	63
Apoptosis.....	63
0.4.3. Cuestiones no resueltas.....	63
0.5. Bibliografía adicional para este capítulo.....	65
1. Difusión de PCNA en el DNA.....	67
1.1. Conocimiento previo sobre el desplazamiento de PCNA en el DNA.....	69
1.1.1. Movimiento de las pinzas deslizantes en el DNA.....	69
Modos de traslocación de proteínas en el DNA.....	69
Difusión de pinzas deslizantes en el DNA.....	71
1.1.2. Movimiento de PCNA en el DNA.....	73
Naturaleza electrostática de la difusión de PCNA en el DNA.....	73
Detalles mecanicistas de la difusión de PCNA.....	74

<i>Unificando ideas contradictorias</i>	74
1.1.3. <i>Modelo precedente de la interacción hPCNA-dsDNA</i>	76
<i>Orientación de PCNA respecto al DNA</i>	77
<i>Consecuencias de la interacción PCNA-DNA</i>	77
1.2. <i>Estudio de las bases estructurales del deslizamiento de hPCNA en el dsDNA</i>	80
1.2.1. <i>Caracterización de la interacción entre PCNA y el DNA</i>	80
<i>Estudio de la estructura cristalina y de las interacciones en solución del complejo PCNA-DNA</i>	81
<i>Estudio computacional de la interacción PCNA-DNA</i>	84
1.2.2. <i>Análisis del sistema PCNA-DNA</i>	89
<i>Contactos en el sistema PCNA-DNA</i>	89
<i>Orientación de PCNA durante su difusión en el DNA</i>	89
<i>Posición del DNA en el complejo PCNA-DNA</i>	92
<i>Modo polimerización del sistema PCNA-DNA</i>	94
<i>PCNA-DNA y Pol δ</i>	95
<i>PCNA-DNA y RFC</i>	97
1.2.3. <i>Propuesta de modelo del deslizamiento de PCNA en el DNA: mecanismo de «rueda dentada»</i>	98
<i>Deslizamiento en modo «rueda dentada»</i>	98
<i>Consecuencias de la interacción PCNA-DNA</i>	100
<i>Ventajas de la combinación de técnicas experimentales y herramientas computacionales</i>	102
1.2.4. <i>Tentativa de refutación del modelo de deslizamiento en «rueda dentada» propuesto</i> . 103	
<i>Interacciones electrostáticas pinza-DNA</i>	104
<i>Simetría del sistema PCNA-DNA</i>	105
<i>Inclinación de las pinzas</i>	107
<i>Mecanismo de difusión de PCNA</i>	108
1.3. <i>Compendio de resultados y conclusiones</i>	110
2. Regulación de PCNA	115
2.1. <i>Modificaciones postraduccionales de PCNA</i>	117
2.1.1. <i>Tipos de MPT en PCNA</i>	117
2.1.2. <i>Consecuencias de las MPT en PCNA: regulación de PCNA</i>	117
<i>La monoubiquitinación de PCNA regula la síntesis translesión</i>	119
<i>La poliubiquitinación promueve el cambio de plantilla</i>	120
<i>Las monoubiquitinaciones simultáneas en PCNA promueven una ruta de tolerancia al daño no caracterizada</i>	120
<i>Estructura de PCNA modificada con ubiquitina</i>	120
<i>Otras modificaciones de PCNA</i>	121
2.1.3. <i>Modificaciones de la pared del anillo interno de PCNA</i>	122
<i>La superficie deslizante de PCNA</i>	122
<i>Importancia de la superficie deslizante de PCNA durante la replicación</i>	123
2.2. <i>Estudio computacional de la acetilación de la lisina 20 de la superficie deslizante de PCNA</i>	126
2.2.1. <i>Acetilación de la pared interna de PCNA</i>	126
2.2.2. <i>Caracterización computacional de la acetilación de K20</i>	129
<i>Simulaciones de dinámica molecular de PCNA acetilada en K20 y cargada sobre el DNA</i>	130
<i>Diferencias entre PCNA acetilada en K20 y sin acetilar</i>	131
2.2.3. <i>Análisis de la acetilación de K20</i>	135

2.3. Interacción entre PCNA y p15 ^{PAF}	142
2.3.1. <i>Quién es p15^{PAF}</i>	142
<i>Qué son y qué hacen las proteínas intrínsecamente desordenadas</i>	144
<i>Papeles fisiológicos de las IDP</i>	148
<i>Funciones de p15</i>	154
2.3.2. <i>Regulación de PCNA por p15</i>	157
2.3.3. <i>Unión de p15 a PCNA</i>	159
2.3.4. <i>Estudio estructural de la acetilación en K20 de PCNA en presencia de p15</i>	162
2.4. Orientando la terapia contra el cáncer hacia la superficie deslizante de PCNA.....	164
2.5. Compendio de resultados y conclusiones.....	166
3. Modulación de la superficie de deslizamiento de PCNA por p15.....	169
3.1. Conocimiento previo de la interacción PCNA-p15.....	171
3.1.1. <i>El complejo PCNA-p15</i>	171
3.1.2. <i>Consecuencias biológicas de la interacción p15-PCNA</i>	177
3.2. Estudio biofísico y bioquímico del sistema PCNA-DNA-p15.....	179
3.2.1. <i>Caracterización de la interacción PCNA-DNA-p15</i>	179
<i>Estudio de la estructura cristalina y de las interacciones en solución del complejo PCNA-DNA-p15</i>	179
<i>Estudio de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15</i>	186
<i>Estudio bioquímico de la inhibición de la actividad de la holoenzima pol η-PCNA por p15</i>	195
3.2.2. <i>Análisis del sistema ternario PCNA-DNA-p15</i>	200
3.2.3. <i>Intercambio entre Pol δ y Pol η para hacer el baipás de una lesión en el DNA</i>	208
3.3. Compendio de resultados y conclusiones.....	211
4. Estabilización de la forma cerrada del anillo de PCNA por p15.....	215
4.1. Apertura del anillo de PCNA por RFC.....	217
4.2. Estudio de la estabilización de las interfaces entre subunidades del anillo de PCNA.....	224
4.2.1. <i>Parámetro de estabilidad</i>	224
<i>Factores de temperatura</i>	225
<i>Desviación cuadrática media posicional (RMSD)</i>	226
<i>Fluctuación de la desviación cuadrática media posicional (RMSF)</i>	228
<i>RMSF: parámetro para definir la estabilidad interfacial en el estudio</i>	229
4.2.2. <i>Caracterización de las interfaces entre subunidades de PCNA</i>	230
4.2.3. <i>Análisis de la estabilidad de los diferentes sistemas</i>	232
4.2.4. <i>Caracterización y análisis de la interacción entre RFC y el sistema PCNA-p15</i>	240
4.2.5. <i>El «efecto grapa» de p15 en PCNA</i>	245
4.3. Compendio de resultados y conclusiones.....	246
5. Recapitulación.....	249
Castellano.....	251
Catalá.....	255
English.....	259
IV. Miscelánea.....	263

Acrónimos y abreviaturas.....	265
Material Complementario.....	267
Artículos científicos publicados.....	277
<i>Sobre esta tesis.....</i>	<i>277</i>
<i>Durante el transcurso de esta tesis.....</i>	<i>278</i>
Herramientas computacionales e informáticas.....	281
V. Bibliografía.....	283

I. Prefacio

Esta tesis está enmarcada en el campo de la Biología estructural computacional.

La Biología estructural es una rama de la Biología molecular, la Bioquímica y la Biofísica que estudia, mediante múltiples y diversas técnicas experimentales, la estructura de las macromoléculas biológicas, el origen de esta estructura y la relación con su función biológica. La Biología computacional es la rama de la Biología que estudia los sistemas biológicos mediante el diseño, estudio y aplicación de algoritmos computacionales. Los sistemas estudiados abarcan desde la escala molecular a los ecosistemas, pasando por las células, el sistema nervioso, y los sistemas sociales. La Biología estructural computacional es, pues, la rama de la Biología molecular, la Bioquímica y la Biofísica que estudia la estructura de las macromoléculas biológicas focalizada en el análisis de datos, modelado matemático y simulación computacional para investigar la relación estructura-función.

La sinergia entre métodos experimentales y computacionales está haciendo crecer el conocimiento de las implicaciones de la estructura proteica en su función y en su relación con otras biomoléculas de su contexto biológico, desarrollando la comprensión de los procesos biológicos a niveles atómicos y mecanicistas, creando una historia más allá de los datos estructurales.

Y apelando a lo mejor de los dos mundos, la aspiración de esta tesis es, mediante el empleo combinado de técnicas experimentales y herramientas computacionales, contribuir al entendimiento del funcionamiento de la proteína PCNA, centro de la actividad del tráfico de proteínas dentro del replisoma, maquinaria fundamental para la vida de la célula.

Los resultados procedentes de estudios experimentales presentados en esta tesis han sido obtenidos y analizados por los grupos experimentales colaboradores:

- el grupo del Dr. Alfredo De Biasio, al comienzo de esta tesis en el Laboratorio de Biología estructural del Sincrotrón Eletta de Trieste (Italia), y después en el Instituto de Biología química y estructural de la Universidad Leicester de la Universidad de Leicester (Reino Unido), encargado de los estudios cristalográficos
- el grupo del Dr. Francisco J. Blanco, del CIC bioGUNE de Derio (España), encargado de los estudios de RMN
- el grupo del Dr. Giovanni Maga, del Instituto de Genética molecular (IGM-CNR) de Pavía (Italia), encargado de los estudios bioquímicos

Para facilitar la comprensión de la estructura de esta tesis, aclararé algunas cosas.

El capítulo cero es una introducción general para poner a PCNA en contexto. Para ello se explica la replicación del DNA, que es el proceso en el que interviene, y qué es el replisoma, que es la maquinaria de la que forma parte. El capítulo termina profundizando en la particular estructura y múltiples funciones de PCNA.

Y una vez que sabemos su función, vamos a intentar darle una explicación estructural.

La secuencia de los cuatro capítulos de esta tesis nos llevan desde el funcionamiento de PCNA, esto es, cómo se desliza por el DNA, pasando por la regulación de su función, dos de las múltiples que tiene la célula, que son la acetilación de la lisina 20 y la interacción con p15^{PAF}, para después estudiar dos de las funciones de p15^{PAF} sobre PCNA.

Los capítulos uno, tres y cuatro tienen todos la misma estructura. Comienzan con un marco teórico al que sigue la exposición de la investigación realizada durante esta tesis (llamado "estudio"). El estudio desarrolla tanto los resultados computacionales como los experimentales, aunque estos últimos hayan sido obtenidos por los grupos colaboradores. El planteamiento es dar una idea conjunta del trabajo más que explicar de manera detallada solo la parte computacional, pues el propósito final es explicar el mecanismo biológico que tiene lugar, y así queda reflejado con las diferentes propuestas de funciones y funcionamientos. Después se presenta un compendio de todos los resultados y conclusiones conseguidas.

El capítulo dos es un poco diferente porque está dividido en dos partes; por un lado, la acetilación de la lisina 20 de PCNA, y por otro, la proteína intrínsecamente desordenada p15^{PAF}. La primera parte tiene la misma estructura que los otros tres capítulos, pero la segunda parte, aunque tiene un pequeño estudio, es una introducción a p15^{PAF}, luego sirve de puente entre el capítulo uno, dedicado a PCNA, y el capítulo tres, dedicado a la interacción entre PCNA y p15^{PAF}.

La estructura secuencial de la tesis y la estructura de cada capítulo hacen que se pueda tanto leer la tesis de principio a fin como una historia concatenada, como leer cada capítulo de manera independiente y aislada, con su principio, desarrollo y fin.

En toda la tesis hay un gran trabajo de búsqueda y estudio bibliográfico para respaldar, dar contexto, poder hipotetizar mecanismos y formular propuestas, en definitiva, para crear una historia, una aventura, la de p15^{PAF} con PCNA para orquestar el replisoma. Porque vamos a hombros de gigantes y porque creo que mi tesis doctoral debe rellenar lo que no permiten los moldes de las publicaciones científicas.

II. Resumen

Replicación del DNA: p15^{PAF} como directora de orquesta

PCNA, la abrazadera deslizante eucariota, juega un papel esencial en el metabolismo del ácido nucleico como componente de la maquinaria de replicación y reparación. Una de las funciones bien establecidas de PCNA es su papel como factor de procesividad para las DNA polimerasas delta (Pol δ) y epsilon (Pol ϵ).

Las abrazaderas deslizantes, de forma toroidal, rodean el DNA y atan las polimerasas y otros factores a la plantilla genómica para una síntesis rápida y procesiva. PCNA puede deslizarse bidireccionalmente a lo largo del dúplex reconociendo el DNA a través de una zona de residuos básicos dentro del canal del anillo dispuestos en una espiral a derechas que coincide con el giro helicoidal del DNA en forma B. PCNA se desliza rastreando la columna vertebral del DNA mediante un mecanismo de «rueda dentada» basado en interacciones polares efímeras que mantienen la orientación de la pinza invariante en relación con la doble hélice. La mutación de residuos en esta interfaz de interacción PCNA-DNA hace desfavorable el inicio de la síntesis de DNA por Pol δ , por lo tanto, es necesaria una pinza orientada correctamente en el DNA para el ensamblaje de una holoenzima pol δ -PCNA competente en replicación.

El anillo presenta dos superficies distintas estructural y funcionalmente, la cara exterior y la cara del interior del anillo, y ambas pueden recibir modificaciones postraduccionales que controlan su función en la replicación y la reparación del DNA y otros procesos celulares fundamentales. La superficie interna del anillo de PCNA está, sorprendentemente, altamente regulada para controlar la resistencia al daño en el DNA, y es crucial para la función de PCNA como factor de procesividad durante la replicación. La superficie deslizante, en la cara interior de PCNA, se puede modular (i) a través de la acetilación de lisina, lo que desencadena la degradación de PCNA durante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) o la estimulación de la reparación por recombinación homóloga (HR), o (ii) mediante la unión de p15^{PAF}, lo que desactiva el baipás de lesión (TLS) en el DNA.

p15^{PAF} es una proteína intrínsecamente desordenada que regula la replicación del DNA y el baipás de una lesión interactuando con PCNA. p15^{PAF} atraviesa el canal del anillo de PCNA, uniendo su dominio PIP-box al bolsillo hidrofóbico de la cara frontal de la pinza y estableciendo contactos también con la superficie deslizante de la abrazadera para asomar su cola N-terminal por la cara trasera. Cuando p15^{PAF} ocupa dos subunidades del homotrímero de PCNA, el DNA dentro del canal del anillo se une a la subunidad que queda desocupada y no desplaza a p15^{PAF} de la pared del anillo interno de PCNA.

Cuando p15^{PAF} está unida a PCNA, se reduce la superficie deslizante disponible de la abrazadera, así que p15^{PAF} puede estar funcionando como un cinturón que abrocha el DNA a PCNA durante la síntesis por la polimerasa replicativa Pol δ . Esta restricción de la superficie deslizante, sin embargo, necesita ser eliminada para un baipás eficaz de la lesión del DNA por parte de la polimerasa de síntesis translesión Pol η .

Todas las pinzas deslizantes son estables en forma de anillo cerrado y, por lo tanto, deben cargarse activamente en las uniones cebador/plantilla del DNA, colocándolas exactamente en el lugar y posición correctas para una replicación procesiva. La apertura y carga de PCNA la lleva a cabo el cargador de la pinza RFC. Una vez en el DNA, PCNA se vuelve a sellar alrededor del DNA y entonces el cargador de la pinza es expulsado. Cuando PCNA ya no es necesaria anclada en el

DNA, el complejo RFC es el encargado de retirarla abriéndola y soltándola fuera de la doble hebra.

Pero la flexibilidad intrínseca de PCNA hace que tenga cierta predisposición a estar en estado abierto separando dos de sus subunidades a través de su interfaz. Esto, que favorece la apertura del anillo por parte de RFC para lograr el ensamblado alrededor del DNA, puede ser un problema para mantenerla cerrada en la unión cebador/plantilla.

De hecho, la estabilidad de las interfaces entre subunidades de PCNA disminuye cuando se une al DNA después de ser cargada por RFC, y dicha estabilidad solo la ve recuperada cuando p15^{PAF} se ancla por su dominio PIP-box a sus bolsillos hidrofóbicos, grapando así las subunidades de la pinza e impidiendo su salida prematura del complejo con el DNA.

Además de estabilizar la forma cerrada del anillo de PCNA, cuando p15^{PAF} está anclada a su cara frontal, impide que RFC se aproxime, se una a ella y la desenganche de la unión cebador/plantilla.

p15^{PAF} es una proteína pequeña y prácticamente sin estructura secundaria, pero es una pieza fundamental de la enorme y compleja maquinaria del replisoma organizando las actividad de su centro neurálgico, la pinza deslizante PCNA.

Replicació del DNA: p15^{PAF} com a directora d'orquestra

PCNA, l'abraçadora lliscant eucariota, juga un paper essencial en el metabolisme de l'àcid nucleic com a component de la maquinària de replicació i reparació. Una de les funcions ben establertes de PCNA és el seu paper com a factor de processivitat per a les DNA polimerases delta (Pol δ) i epsilon (Pol ϵ).

Les abraçadores lliscants, de forma toroïdal, envolten el DNA i lliguen les polimerases i altres factors a la plantilla genòmica per a una síntesi ràpida i processiva. PCNA pot lliscar bidireccionalment al llarg del dúplex reconeixent el DNA a través d'una zona de residus bàsics dins del canal de l'anell disposats en una espiral a dretes que coincideix amb el gir helicoïdal del DNA en forma B. PCNA llisca rastrejant la columna vertebral del DNA mitjançant un mecanisme de roda dentada basat en interaccions polars efímeres que mantenen l'orientació de la pinça invariant en relació amb la doble hèlix. La mutació de residus en aquesta interfície d'interacció PCNA-DNA fa desfavorable l'inici de la síntesi de DNA per Pol δ , per tant, cal una pinça orientada correctament al DNA per a l'assemblatge d'una holoenzima pol δ -PCNA competent a replicació.

L'anell presenta dues superfícies diferents estructuralment i funcionalment, la cara exterior i la cara de l'interior de l'anell, i totes dues poden rebre modificacions posttraduccionals que controlen la seva funció en la replicació i la reparació del DNA i altres processos cel·lulars fonamentals. La superfície interna de l'anell de PCNA està, sorprenentment, altament regulada per controlar la resistència al dany al DNA, i és crucial per a la funció de PCNA com a factor de processivitat durant la replicació. La superfície lliscant, a la cara interior de PCNA, es pot modular (i) a través de l'acetilació de lisina, cosa que desencadena la degradació de PCNA durant la reparació per escissió de nucleòtids (NER) o l'estimulació de la reparació per recombinació homòloga (HR), o (ii) mitjançant la unió de p15^{PAF}, la qual cosa desactiva el baixpass de lesió (TLS) al DNA.

p15^{PAF} és una proteïna intrínsecament desordenada que regula la replicació del DNA i el baixpass d'una lesió interactuant amb PCNA. p15^{PAF} travessa el canal de l'anell de PCNA, unint el seu domini PIP-box a la butxaca hidrofòbic de la cara frontal de la pinça i establint contactes també amb la superfície lliscant de l'abraçadora per treure la cua N-terminal per la cara posterior. Quan p15^{PAF} ocupa dues subunitats de l'homotrimer de PCNA, el DNA dins el canal de l'anell s'uneix a la subunitat que queda desocupada i no desplaça p15^{PAF} de la paret de l'anell intern de PCNA.

Quan p15^{PAF} està unida a PCNA, es redueix la superfície lliscant disponible de l'abraçadora, així que p15^{PAF} pot estar funcionant com un cinturó que corda el DNA a PCNA durant la síntesi per la polimerasa replicativa Pol δ . Aquesta restricció de la superfície lliscant, però, necessita ser eliminada per a un baixpass eficaç de la lesió del DNA per part de la polimerasa de síntesi translesió Pol η .

Totes les pinces lliscants són estables en forma d'anell tancat i, per tant, s'han de carregar activament a les unions encebador/plantilla del DNA, col·locant-les exactament al lloc i posició correctes per a una replicació processiva. L'obertura i càrrega de PCNA la duu a terme el carregador de la pinça RFC. Un cop al DNA, PCNA es torna a segellar al voltant del DNA i llavors el carregador de la pinça és expulsat. Quan PCNA ja no és necessària ancorada al DNA, el complex RFC és l'encarregat de retirar-la obrint-la i deixant-la anar fora del doble fil.

Però la flexibilitat intrínseca de PCNA fa que tingui certa predisposició a estar en estat obert separant dues de les subunitats a través de la seva interfície. Això, que afavoreix l'obertura de

Replicació del DNA: p15^{PAF} com a directora d'orquestra

l'anell per part de RFC per aconseguir l'acoblament al voltant del DNA, pot ser un problema per mantenir tancada a la unió encebador/plantilla.

De fet, l'estabilitat de les interfícies entre subunitats de PCNA disminueix quan s'uneix al DNA després de ser carregada per RFC, i aquesta estabilitat només la veu recuperada quan p15^{PAF} s'ancora pel seu domini PIP-box a les butxaques hidrofòbiques, grapanent així les subunitats de la pinça i impedit-ne la sortida prematura del complex amb el DNA.

A més d'estabilitzar la forma tancada de l'anell de PCNA, quan p15^{PAF} està ancorada a la cara frontal, impedeix que RFC s'aproximi, s'uneixi a ella i el desenganxament de la unió encebador/plantilla.

p15^{PAF} és una proteïna petita i pràcticament sense estructura secundària, però és una peça fonamental de l'enorme i complexa maquinària del replisoma organitzant les activitats del seu centre neuràlgic, la pinça lliscant PCNA.

DNA replication: p15^{PAF} as an orchestra conductor

PCNA, the eukaryotic sliding clamp, plays an essential role in nucleic acid metabolism as a replication and repair machinery component. One of the well-established functions of PCNA is its role as a processivity factor for delta (Pol δ) and epsilon (Pol ϵ) DNA polymerases.

The toroidal shaped sliding clamps surround the DNA and bind polymerases and other factors to the genomic template for rapid and processive synthesis. PCNA can slide bi-directionally along the duplex by recognizing the DNA through a zone of basic residues within the ring channel arranged in a right-hand spiral that coincides with the helical turn of the B-DNA. PCNA slides along the spinal backbone of DNA through a "cogwheel" mechanism based on ephemeral polar interactions that maintain the orientation of the clamp invariant relative to the double helix. The mutation of residues in this PCNA-DNA interaction interface makes the initiation of DNA synthesis by Pol δ unfavourable; therefore, a correctly oriented clamp on the DNA is necessary to assemble a competent pol δ -PCNA holoenzyme replication.

The ring has two structurally and functionally distinct surfaces, the outer face and the inner face of the ring, both of which can undergo post-translational modifications that control their role in DNA replication and repair and other fundamental cellular processes. The inner surface of the PCNA ring is surprisingly highly regulated to fine-tune resistance to DNA damage and is crucial for PCNA's function as a processivity factor during replication. The sliding surface, on the inner face of PCNA, can be modulated (i) through lysine acetylation, which triggers PCNA degradation during nucleotide excision repair (NER) or stimulation of recombination repair homologous (HR), or (ii) by binding of p15PAF, which inactivates the lesion bypass (TLS) in DNA.

p15PAF is an intrinsically disordered protein that regulates DNA replication and lesion correction by interacting with PCNA. p15PAF crosses the channel of the PCNA ring, binding through its PIP-box domain to the hydrophobic pocket on the clamp's front face and making contact with the sliding surface of the latter to show its N-terminus tail on the back face. When p15PAF occupies two subunits of the PCNA homotrimer, the DNA within the ring channel binds to the unoccupied subunit and does not displace p15PAF from the inner ring wall of PCNA.

When p15PAF is bound to PCNA, the available sliding surface of the clamp is reduced, so p15PAF may function as a belt that binds DNA to PCNA during synthesis by the replicative polymerase Pol δ . However, this sliding surface restriction needs to be removed for efficient bypass of DNA damage by the translesion synthesis polymerase Pol η .

All sliding clamps are stable in a closed ring shape. Therefore, they must be actively loaded onto the DNA primer/template junctions and placed precisely for processive replication.

The RFC clamp loader carries out the opening and DNA-loading of PCNA. Once surrounding the DNA, RFC closes PCNA before leaving the complex.

When PCNA is no longer needed around the DNA, the RFC complex removes it by opening it and releasing it away from the double-strand.

The intrinsic flexibility of PCNA predisposes it to the open state, which facilitates its opening by RFC during the DNA-loading and release phase. However, the PCNA tendency to the open state results problematic during the primer/template junction phase.

Interestingly, the interfacial stability between PCNA subunits decreases when it binds to DNA after being loaded by RFC, and its stability is only recovered when p15PAF anchors by its

PIP-box domain to PCNA hydrophobic pockets, thus stapling the cells clamp subunits and preventing their premature exit from the complex with DNA.

In addition to stabilizing the closed form of the PCNA homotrimer ring, p15PAF blocks RFC from binding PCNA and disengage it from primer/template junction.

p15PAF is a small protein and has almost no secondary structure, but it is a fundamental piece of the vast and complex machinery of the replisome organizing the activities of its nerve centre, the PCNA sliding clamp.

III. Actividad de la proteína intrínsecamente desordenada p15^{PAF} en el replisoma

0. Contexto biológico y bioquímico

El proceso de replicación del DNA es el mecanismo que permite al material genético duplicarse, es decir, sintetizar una copia idéntica de sí mismo. De esta manera, a partir de una molécula de DNA única, se obtienen dos moléculas exactas (o casi, pues si siempre fuera así, no habría ni evolución ni enfermedades genéticas, pero no entraremos en este tema).

Esta duplicación del material genético se produce de acuerdo con un mecanismo semi-conservador, ya que los dos polímeros complementarios del DNA original, al separarse, sirven de molde para la síntesis de sendas nuevas cadenas complementarias, de forma que cada nueva doble hélice contiene una de las cadenas del DNA original y otra de nueva síntesis. Gracias a la complementación entre las bases que forman las secuencias de cada una de las dos cadenas, el DNA tiene la importante propiedad de reproducirse idénticamente, dando lugar a dos nuevas doble hélices en cada proceso de replicación que son idénticas, lo que permite que la información genética se transmita correctamente de una célula madre a las células hijas. Esto es la base de la herencia del material genético y es un evento fundamental para la vida.

De manera general y muy simple, la molécula de DNA se abre como una cremallera por ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias en puntos determinados llamados orígenes de replicación. Las proteínas iniciadoras de la replicación reconocen secuencias de nucleótidos específicas en esos puntos y facilitan la fijación de otras proteínas que permitirán la separación de las dos hebras de DNA formándose una horquilla de replicación. Un gran número de enzimas y proteínas intervienen en el mecanismo molecular de la replicación, formando el llamado complejo de replicación o replisoma. Estas proteínas y enzimas son homólogas en eucariotas y arqueas, pero difieren en bacterias.

De todo el conjunto de proteínas que forman parte de una horquilla de replicación, la pinza o abrazadera deslizante es estructuralmente ubicua en todos los reinos de la vida. El representante eucariota es PCNA, un homotrímero anular que rodea el DNA, donde actúa como un andamio para reclutar proteínas involucradas en su replicación y reparación, así como en la remodelación de la cromatina y la epigenética. La presencia de PCNA en tantos e importantes procesos para la transmisión y estabilidad del material genético hace de ella una proteína central en la célula.

0.1. La replicación del DNA

0.1.1. Qué es la replicación

La replicación celular es el proceso mediante el cual se sintetiza una copia idéntica de la molécula de DNA de una célula empleando el DNA existente como molde. Este proceso ocurre solo una vez en la vida de cada célula y es importantísimo que ocurra fielmente y sin errores.

Las características que definen a la replicación es que es semidiscontinua, bidireccional y semiconservativa. En el DNA procariota hay un único punto de origen para la replicación, y en el DNA eucariota hay múltiples, pero en todos ellos la replicación ocurre igual y mantiene estas tres propiedades.

La replicación es un proceso altamente coordinado, en el que las cadenas parentales se desenrollan y replican simultáneamente. Cada una de las dos hebras de DNA sirve como molde para sintetizar una nueva cadena complementaria; el resultado son dos moléculas de DNA nuevas, cada una de las cuales tiene una cadena recién sintetizada y una cadena vieja. Como cada nueva molécula de DNA conserva la mitad del material genético original, este modo de replicación se llama semiconservativa.

En el origen de replicación, las dos hebras que forman la molécula de DNA bicatenario se separan, dando lugar a una estructura en forma de ojal llamada horquilla de replicación, capaz de avanzar en las dos direcciones separando cada vez más longitud de DNA. Que el avance se dé en las dos comisuras de esta horquilla es lo que da la propiedad de bidireccionalidad a la replicación del DNA.

Una hebra de DNA es polar porque sus extremos son diferentes; el extremo que tiene un grupo fosfato es el 5' y el que tiene un grupo hidroxilo -OH es el extremo 3'. En la doble hélice de DNA, las dos hebras o cadenas tienen polaridad o sentidos opuestos; una de ellas tiene polaridad 5' → 3' y la otra la contraria, 3' → 5'. Es por esto que se dice que las dos cadenas de DNA son antiparalelas.

Las nuevas cadenas de DNA siempre se sintetizan en sentido 5' → 3', y, puesto que las dos cadenas de DNA deben ser antiparalelas, la cadena que actúa como molde ha de leerse siempre en sentido 3' → 5'. Si los nuevos nucleótidos se agregan en la cadena naciente en el sentido 5' → 3', en la horquilla la replicación se llevará a cabo de manera continua desde el lado 3' y en sentido 3' → 5' en una de las dos líneas de cada comisura, pero en la otra no puede ser así, pues el lado que va quedando expuesto con el avance de la horquilla es el 5'. Si las dos cadenas fuesen sintetizadas continuamente a medida que se desplaza la horquilla de replicación, una tendría que ser sintetizada en la imposible dirección 3' → 5'. Para solventar este problema y que ambas cadenas hijas se sinteticen simultáneamente, esta cadena molde 5' → 3 se replica en pequeños fragmentos en sentido contrario al de apertura de la doble hélice en la horquilla de replicación; estos fragmentos son conocidos como fragmentos de Okazaki en honor a sus descubridoras/es. La hebra que se sintetiza de manera discontinua, esta cuya síntesis en dirección 5' → 3' transcurre en sentido opuesto al movimiento de la horquilla, se llama hebra retrasada o rezagada, y la otra, sintetizada de manera continua, es decir, aquella cuya síntesis en dirección 5' → 3' transcurre en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación, es la líder, adelantada o conductora. Debido a esta diferente posibilidad en el avance, la cadena líder solo necesita un cebador, pero la cadena rezagada necesita muchos, uno al comienzo de cada fragmento

de Okazaki. Y como una de las dos cadenas de la doble hélice se sintetiza de manera continua y la otra de manera discontinua, decimos que la replicación es semidiscontinua.

La replicación es una reacción de polimerización del DNA que requiere la acción de: las DNA polimerasas, que son enzimas que catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre nucleótidos, para lo que requieren un molde (cada una de las dos hebras del DNA parental actuará, como hemos dicho, como tal); una molécula cebadora, el cebador o iniciador, con un grupo hidroxilo libre en la posición 3' para poder comenzar a añadir nucleótidos; los desoxinucleótidos trifosfato, claro; y Mg^{2+} . El nucleótido entrante es seleccionado por apareamiento con el correspondiente de la hebra molde y, tras la reacción, impulsada energéticamente por la hidrólisis de pirofosfato, en la cadena en síntesis hay un nuevo 3'-OH libre.

La eficiencia catalítica de las DNA polimerasas depende fundamentalmente de su procesividad, que se refiere a su capacidad de elongar una cadena polidesoxinucleotídica durante muchos nucleótidos antes de disociarse del complejo que forma con el sustrato; se da en número de nucleótidos e indica el número de estos que es capaz de añadir en cada evento. Al final podemos verla como una medida del tiempo que la DNA polimerasa permanece unida al DNA.

0.1.2. Cómo ocurre la replicación

La replicación del DNA es conceptualmente sencilla, pero compleja en su mecánica. La replicación es semiconservativa y da lugar a dos moléculas de DNA hijas que contienen una cadena original y un material de nueva síntesis; es ordenada y secuencial, se inicia en unos puntos fijos del cromosoma, y el crecimiento de la cadena de DNA se produce de manera simultánea al desenrollamiento de la doble hélice original; como otros procesos de biosíntesis, la replicación del DNA utiliza sustratos activos, los desoxirribonucleósido 5'-trifosfatos (dNTP); es bidireccional, pues la necesidad de extender cadenas de DNA de polaridad opuesta dentro de una horquilla hace que una cadena crezca en el sentido del movimiento de la horquilla y la otra en el de la contraria; es discontinua, pues el hecho anterior hace que una de las hebras, la rezagada, tenga que sintetizarse a trozos. La replicación es mucho más exacta que cualquier otro proceso catalizado por enzimas.

De los tres procesos de la replicación, esto es iniciación, elongación y terminación de la cadena, el que conocemos mejor es el de elongación. Los componentes proteicos que se sabe actúan en la horquilla de replicación o cerca de ella son: DNA polimerasas, proteínas de unión al DNA de cadena única o hebra simple (este DNA se suele designar como ssDNA, del inglés *single strand DNA*), helicasas, primasa, topoisomerasas y DNA ligasa. Algunas de estas enzimas son de por sí conjuntos proteicos de múltiples subunidades.

El DNA se replica por medio de enzimas conocidas como DNA polimerasas dependientes de DNA o simplemente DNA polimerasas, y los estudios iniciales de la replicación del DNA definieron dos requerimientos básicos para su función. Primero, todas las DNA polimerasas necesitan un molde: la reacción de polimerización está dirigida por una cadena molde de DNA que actúa como modelo para la síntesis de la nueva cadena según las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick. Segundo, es necesario un cebador. Un cebador, o también iniciador, es un segmento de cadena (complementario del molde) con un grupo 3'-hidroxilo libre al cual pueden añadirse nucleótidos.; dicho de otro modo, parte de la cadena nueva ya tiene que encontrarse en su lugar pues todas las DNA polimerasas, sin excepción, únicamente son capaces de añadir nucleótidos a una cadena preexistente, de ahí la necesidad de un trozo

que actúe como inicio. Los cebadores son a menudo oligonucleótidos de RNA en lugar de DNA; enzimas especializadas sintetizan los cebadores donde y cuando son requeridos.

Después de añadir un nucleótido a una cadena de DNA en crecimiento, la DNA polimerasa o se disocia, o bien se traslada a lo largo del molde y añade otro nucleótido. La disociación y reasociación de la polimerasa pueden limitar la velocidad global de polimerización, y el proceso es generalmente más rápido si la polimerasa añade nucleótidos sin disociarse del molde. El número medio de nucleótidos añadidos antes de que una polimerasa se disocie define su procesividad. Las DNA polimerasas muestran una gran variación en su procesividad; algunas solo añaden unos pocos nucleótidos antes de disociarse, mientras que otras añaden muchos miles.

Las DNA polimerasas, entonces, utilizan el ssDNA como molde sobre el que catalizan la síntesis de la hebra complementaria a partir de los desoxinucleótidos trifosfato apropiados mediante la formación de enlaces fosfodiéster; la reacción tiene lugar por medio del ataque nucleofílico del grupo 3'-OH del final de la cadena de DNA naciente sobre el fosfato α de un nucleósido trifosfato entrante. Esta reacción, la de replicación, que sería reversible, es impulsada energéticamente por la hidrólisis subsecuente del pirofosfato PP_i que se eliminó. Los nucleótidos entrantes se seleccionan de acuerdo con su capacidad para formar apareamientos Watson y Crick con el molde de DNA de modo que la cadena recién sintetizada forme una hélice estable con la hebra molde. Como casi todas las DNA polimerasas conocidas pueden agregar un nucleótido solo en el grupo 3'-OH libre de un polinucleótido apareado, la cadena de DNA se extiende, como ya hemos dicho, solo en sentido 5' → 3'.

Dada la necesidad de grupos hidroxilo 3' y de sustratos dNTP 5', la DNA polimerasa puede catalizar el crecimiento de la cadena de DNA tan solo en una dirección: 5' → 3', lo cual significa que va del extremo 5' hacia el extremo 3'. Sin embargo, ya que las dos cadenas del DNA están en una disposición antiparalela, es decir, tienen polaridades opuestas, y las dos se replican en la misma horquilla, debe existir un mecanismo para la replicación de la cadena con sentido 3' → 5'. Este mecanismo conlleva la acción de una DNA polimerasa que replica en la misma dirección del movimiento de la horquilla y otra que efectúa la replicación retrógrada en la horquilla.

La replicación del DNA, que se produce en las horquillas de replicación y siempre procede en ambas direcciones desde el punto donde se inicia, es bidireccional, es decir, las dos hebras parentales (las dos del DNA original) se replican en sentidos diferentes. La hebra de DNA recién sintetizada que se extiende en dirección 5' → 3' del movimiento de la horquilla de replicación, llamada, como ya hemos dicho, hebra adelantada o conductora, se sintetiza en forma continua en su dirección 5' → 3' a medida que avanza la horquilla de replicación. La otra cadena nueva, llamada hebra retrasada o rezagada, también se sintetiza en su dirección 5' → 3', sin embargo, solo puede hacerse en forma discontinua, como fragmentos de Okazaki, a medida que el DNA de hebra simple parental se expone en la horquilla de replicación; después, los fragmentos de Okazaki son unidos covalentemente por la enzima DNA ligasa.

Dado que la DNA polimerasa requiere que exista un grupo 3'-OH libre para extender una cadena de DNA, para poder iniciarse la síntesis en la horquilla de replicación (y en los fragmentos de Okazaki) se requieren unos puntos de partida. Para ello se emplean segmentos de RNA de 1 a 60 nt (la longitud depende de cada especie), los ya mencionados cebadores o iniciadores, que son complementarios a una cadena molde de DNA y que proporcionan ese grupo 3'-OH libre, punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Es necesario, porque las DNA polimerasas no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de DNA de la

nada, sino que solo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente. En *E. coli* este RNA cebador es sintetizado por la enzima primasa, que tiene actividad RNA polimerasa. Se requieren numerosos cebadores para la síntesis de la hebra rezagada, pero solo uno para iniciar la síntesis de la hebra adelantada. Sin embargo, el DNA maduro no contiene RNA, así que el RNA cebador es después eliminado y reemplazado por DNA.

El término cadena líder identifica la cadena hija que se extiende en la misma dirección que la horquilla de replicación, y la cadena que se sintetiza hacia atrás, en sentido contrario que el avance de la horquilla, se denomina cadena retardada o rezagada. La síntesis de la cadena líder se produce simultáneamente con el desenrollamiento de la doble cadena original. Sin embargo, la síntesis de la cadena retardada solo puede tener lugar después de que se haya desenrollado una parte de ella, dejando al descubierto una región del molde de DNA de una sola cadena. Debido a que la síntesis de ambas cadenas conductora y retardada se produce en la horquilla, la polimerasa de la cadena retardada debe permanecer en ella; en consecuencia, la cadena retardada se sintetiza de manera discontinua, mediante una serie de fragmentos cortos, mientras que la síntesis de la cadena conductora puede producirse sin interrupción.

A diferencia de la DNA polimerasa, la primasa puede iniciar la síntesis de una cadena de polinucleótido posicionando primero un ribonucleótido 5'-trifosfato (rNTP) opuesto a su base de DNA complementaria, y luego extenderlo a partir del grupo hidroxilo 3' de este rNTP. Una vez polimerizados varios ribonucleótidos para formar un RNA cebador, la primasa se aparta del camino desplazada por la DNA polimerasa, y esta añade un 5' desoxirribonucleótido al extremo 3' del cebador de RNA para continuar añadiendo luego dNTP en su dirección habitual 5' → 3'.

Cuando el extremo 3' del fragmento de Okazaki en crecimiento alcanza el extremo 5' del fragmento de Okazaki sintetizado previamente, deben ocurrir tres cosas: 1) la eliminación del RNA cebador y la consecuente 2) sustitución de los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos, y 3) la unión covalente del extremo 3' del fragmento de Okazaki recién sintetizado con el extremo 5' del fragmento sintetizado previamente. Intervienen entonces, en el caso de *E. coli*, otras dos enzimas, la DNA polimerasa I y la DNA ligasa.

0.2. El replisoma

0.2.1. Función del replisoma

El proceso de replicación es iniciado en los orígenes de replicación por proteínas altamente reguladas y quinasas del ciclo celular¹⁻³ y, una vez comienza, la replicación de ambas cadenas del dúplex de DNA es llevada a cabo por muchas proteínas diferentes y enzimas que funcionan de manera excelentemente coreografiada^{4,5}. Muchas de estas proteínas se unen entre sí formando el replisoma. Luego en la replicación del DNA, se denomina replisoma o complejo de replicación al conjunto de proteínas que forman parte de una horquilla de replicación.

Esta maquinaria de replicación celular está compuesta por numerosas proteínas diferentes entre las que siempre se incluyen una helicasa, una primasa (que junto a otras proteínas forma el primosoma), DNA polimerasas, una proteína llamada, en general, abrazadera deslizante, un cargador de esa abrazadera, y las proteínas de unión a cadena simple (en general, las proteínas SSB por sus siglas en inglés). Las proteínas iniciadoras que se unen a los orígenes de replicación, las topoisomerasas y las ligasas, por ejemplo, no forman parte del replisoma. Algunas proteínas centrales en el proceso de replicación del DNA actúan de manera dinámica, entrando y saliendo del replisoma en una horquilla de replicación en movimiento, y muchas otras proteínas actúan después de que la horquilla haya pasado para concentrarse en las bases mal emparejadas y para reparar y ligar los fragmentos de Okazaki.

El cromosoma de *E. coli* es una molécula de DNA superenrollado de 4.6×10^6 pb. Dado que la DNA polimerasa requiere un molde de hebra simple, otras proteínas participan en la replicación del DNA al localizar el sitio de iniciación de la replicación, desenrollar el DNA y evitar la rehibridación de las hebras simples, pues el acceso a las cadenas de DNA que han de actuar como molde requiere la separación de las dos cadenas parentales. Las helicasas son un grupo diverso de enzimas que desenrollan el DNA durante la replicación, transcripción y otros procesos, y funcionan desplazándose a lo largo de una hebra de un ácido nucleico de doble hélice, de modo que desenrollan mecánicamente la hélice a medida que se mueven, utilizando la energía libre de la hidrólisis de NTPs. Algunas helicasas se desplazan a lo largo de la hebra parental rezagada molde en la dirección $5' \rightarrow 3'$ mientras hidrolizan ATP (o GTP o CTP, pero no UTP) y algunas helicasas se mueven en la dirección $3' \rightarrow 5'$. La separación de las cadenas crea una tensión estructural en la hélice del DNA que se relaja por la acción de otras enzimas, las topoisomerasas. Las hebras de DNA separadas que se encuentran por detrás de una helicasa que avanza no se rehibridan para formar un dsDNA (DNA de doble cadena; en inglés, *double strand* DNA) porque se recubren con la proteína de unión al DNA monocatenario (las proteínas SSB) que las estabilizan. La cubierta con SSB también evita que el ssDNA forme estructuras secundarias y lo protege de las nucleasas (pero el DNA debe estar libre de las SSB antes de ser replicado por la DNA polimerasa).

Toda síntesis de DNA, tanto de la hebra líder como la retrasada, requiere la síntesis previa de segmentos cortos de RNA llamados cebadores. La síntesis del iniciador o cebador en *E. coli* está mediada por un ensamble de proteínas, conocido como primosoma, que debe estar unido al DNA antes de que lleguen las DNA polimerasas. El primosoma es impulsado en la dirección $5' \rightarrow 3'$ a lo largo de la hebra retrasada del molde de DNA (o sea, hacia la horquilla de replicación), en parte, por la hidrólisis de ATP catalizada por la helicasa. Este movimiento, que desplaza la SSB a su paso, es opuesto a la dirección en que se lee el molde durante la síntesis de la cadena de

DNA. En consecuencia, el primosoma invierte momentáneamente su migración para permitir que la primasa sintetic RNA cebador en la dirección 5' → 3'. Para iniciar cada fragmento de Okazaki se requiere, por tanto, el primosoma. Finalmente, los cebadores de RNA son eliminados y reemplazados por DNA; en *E. coli*, esta es una de las muchas funciones de la DNA polimerasa I. Después de la eliminación del cebador de RNA y del relleno del hueco con DNA, queda una mella en la cadena azúcar-fosfato en forma de un enlace fosfodiéster roto; estas mellas son selladas por enzimas denominadas DNA ligasas.

El replisoma eucariótico es mucho más complicado que los replisomas bacteriano y vírico, como puede esperarse de un genoma tan complejo y con tamaño tan grande como el de una célula eucariota (por ejemplo, en los seres humanos, el genoma nuclear comprende aproximadamente 3.2 billones de nucleótidos, es decir, 3.2×10^{12} pb). Las proteínas centrales del replisoma eucariótico, también las de arqueas con las que comparten ancestro, evolucionaron independientemente de las de bacterias y, por lo tanto, tienen arquitecturas y mecanismos de acción distintos^{6,7}. Las proteínas del núcleo del replisoma de eucariotas incluyen: una helicasa CMG (siglas que corresponden a las iniciales de los nombres en inglés de sus componentes más importantes) de once subunidades, la DNA polimerasa alfa-primasa (Pol α), la DNA polimerasa epsilon (Pol ϵ) de la cadena líder, la DNA polimerasa delta (Pol δ) de la cadena rezagada, la pinza o abrazadera deslizante PCNA, el cargador de la pinza deslizante RFC y la proteína de unión a cadena simple (SSB en general, como ya hemos visto) RPA (siglas en inglés de Proteína de Replicación A).

Una excepción a la evolución independiente son las pinzas (o abrazaderas) deslizantes y los cargadores de las pinzas, las cuales son homólogas en los tres dominios de la vida^{8,9}. La abrazadera y cargador de la abrazadera pueden haber evolucionado para un uso no replicativo en LUCA (siglas en inglés de *Last Universal Common Ancestor*, último ancestro común universal) y, más tarde en la evolución, después de la división entre bacterias y arquea/eucariotas, haber sido reclutadas para la replicación celular¹⁰.

Hay muchas otras proteínas que viajan con la horquilla de replicación eucariótica, algunas de las cuales son conocidas por estar implicadas en puntos de control de la regulación de la horquilla o en la sujeción del nucleosoma, pero muchas tienen funciones aún desconocidas y no tienen análogos bacterianos¹⁰.

La replicación del DNA es un evento único en la vida y debe ir desde el principio hasta el final sin fallos, a diferencia de las otras vías informativas de transcripción y traducción basadas en ácidos nucleicos, que pueden permitirse fallar a veces y luego comenzar de nuevo. Pero la replicación del genoma no solo debe acabarse, también debe hacerlo con exquisita alta fidelidad, sin dejar errores, o extremadamente pocos, para preservar las especies.

0.2.2. El replisoma de *E. coli*

En *E. coli* la holoenzima Pol III cataliza la síntesis de las hebras adelantada y retrasada. Esto se lleva a cabo en una sola partícula multiproteica, el replisoma, que contiene dos enzimas Pol III. En algunos otros procariontes y en los eucariontes, dos polimerasas diferentes sintetizan la hebra adelantada y la rezagada, pero al igual que la Pol III, ambas son parte de un replisoma multiproteico (Figura 1).

Horquilla de replicación bacteriana

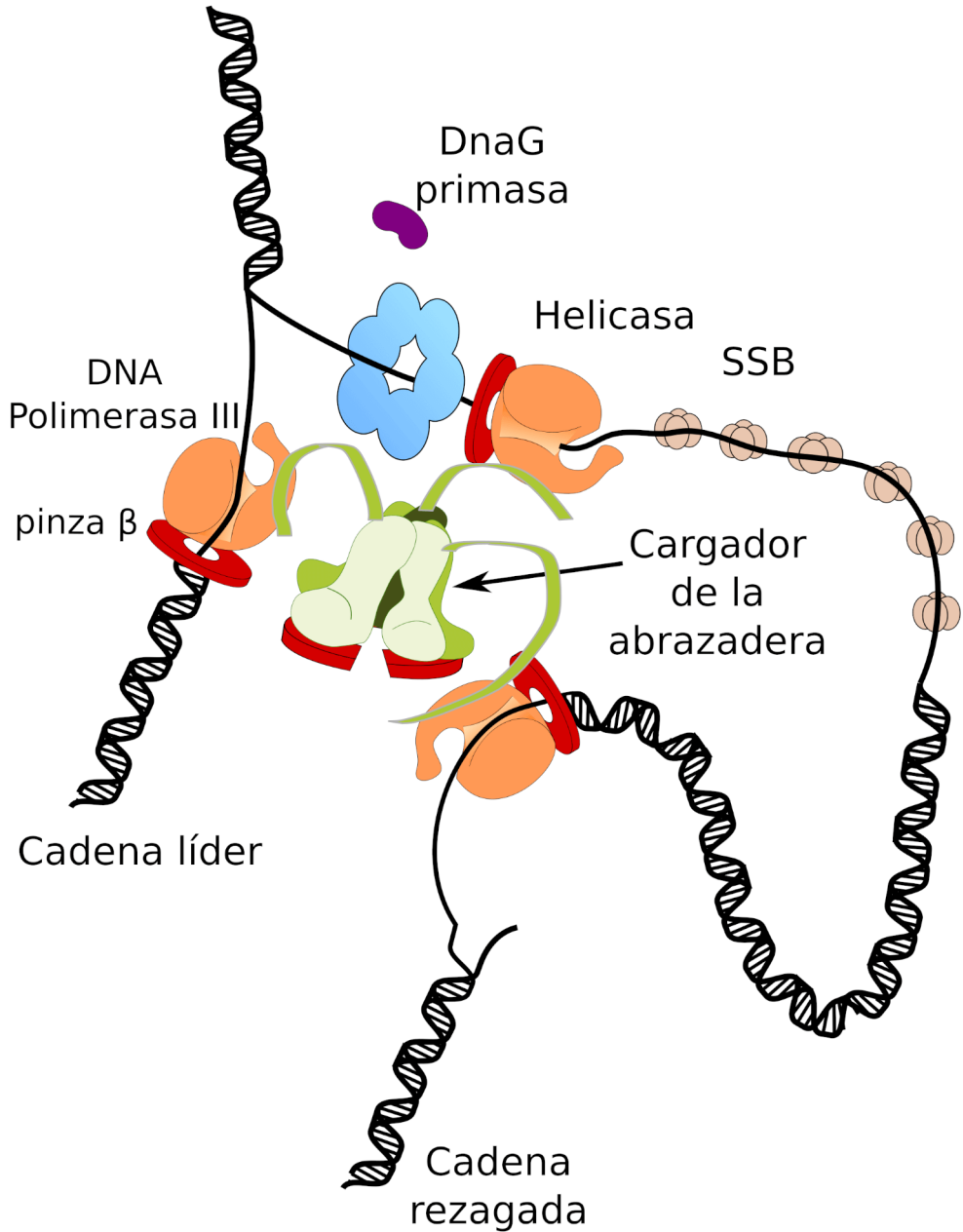


Figura 1: Horquilla de replicación bacteriana. Inspirado en Zhang et. al. 2016¹⁰.

Para que el replisoma se mueva como una subunidad única en la dirección $5' \rightarrow 3'$ a lo largo de la hebra adelantada, la hebra retrasada debe formar un bucle. Después de completar la síntesis de un fragmento de Okazaki, la holoenzima de la hebra retrasada se ubica en un cebador nuevo cerca de la horquilla de replicación y reinicia la síntesis. El resultado de este proceso es una hebra adelantada continua y una serie de fragmentos de Okazaki cebados por RNA separados por mellas de hebra simple. Los cebadores de RNA son reemplazados por DNA por medio de una reacción de desplazamiento de mella catalizada por Pol I.

Cuando se purificó la DNA polimerasa I de *E. coli* se observó que estaba formada por una sola cadena polipeptídica de $M_r = 103.000$, y que además de su actividad polimerasa, la enzima purificada posee dos actividades nucleasa: la $3'$ exonucleasa, que degrada el DNA de cadena única a partir del extremo $3'$, y la $5'$ exonucleasa, que degrada el DNA con apareamiento de bases a partir del extremo $5'$. La $3'$ exonucleasa realiza una función de "corrección de pruebas" para mejorar la exactitud con la que se copia el molde de DNA. Esta actividad eliminará los nucleótidos con un apareamiento de bases incorrecto desde el extremo $3'$ en crecimiento de una cadena polidesoxinucleotídica, proporcionando a la actividad polimerasa una segunda posibilidad de insertar el nucleótido correcto especificado por el molde. La actividad $5'$ exonucleasa permite a la enzima realizar la reacción de traslación o desplazamiento de mella, es decir, la eliminación de ribonucleótidos del extremo $5'$ del RNA cebador acoplada con la extensión simultánea del extremo $3'$ del fragmento de Okazaki de la cadena retardada mediante la incorporación de desoxirribonucleótidos, de manera que los ribonucleótidos se eliminan a medida que la polimerasa los va sustituyendo por desoxirribonucleótidos, y la sensación es que es la mella la que se va trasladando. Una vez eliminados todos los ribonucleótidos del cebador, la DNA polimerasa llega a una estructura que no puede cerrar, es decir, un hueco, la mella, con un extremo $3'$ hidroxilo y un extremo $5'$ fosfato. Es la DNA ligasa la que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre estos extremos, sellando las mellas de la hebra retrasada.

Una subunidad de la DNA polimerasa II dimérica elonga la cadena líder y la otra la cadena retardada. Si las dos moléculas de polimerasa no estuvieran asociadas, la terminación de cada fragmento de Okazaki haría que se disociara la polimerasa de la cadena retrasada y el retardo en la unión de una nueva polimerasa haría imposible que se mantuviera con la cadena conductora. La DNA polimerasa I y la DNA ligasa están ahora inactivas, y estarán así hasta que el extremo $3'$ del nuevo fragmento de Okazaki alcance al RNA cebador todavía unido al extremo $5'$ del fragmento de Okazaki sintetizado previamente, momento en el que la traslación de mella de la DNA polimerasa I degradará el RNA cebador y extenderá el nuevo fragmento de Okazaki. Al mismo tiempo, la acción continuada del primosoma va exponiendo más DNA de cadena única y sintetizando otro RNA cebador para la síntesis del siguiente fragmento de Okazaki.

La primasa es la enzima que sintetiza estos pequeños fragmentos de RNA cebador, de unos 10 nucleótidos, sobre la cadena rezagada, complementarios a la hebra de DNA molde que se copia durante la replicación. La primasa tiene la particularidad de no necesitar cebador para comenzar la síntesis de la nueva hebra de DNA, al contrario que la DNA polimerasa III, que sí necesita un punto de partida (un grupo $3'$ -OH libre) en la síntesis $5' \rightarrow 3'$ de la hebra molde para agregar los nuevos desoxinucleótidos. Como ya se ha dicho, estos fragmentos de RNA son luego retirados por Pol I gracias a su actividad exonucleasa $5' \rightarrow 3'$ y rellenados con fragmentos de DNA, también por Pol I pero gracias, claro, a su actividad polimerasa $5' \rightarrow 3'$. Finalmente, como también hemos dicho, todos estos segmentos discontinuos de DNA, los fragmentos de Okazaki, son unidos por una ligasa.

La primasa se asocia con otras proteínas de la horquilla de replicación y al menos dos de ellas son helicasas, es decir, enzimas que catalizan el desenrollamiento de los ácidos nucleicos de doble cadena. Cada cadena del DNA original tiene su propia helicasa; la que se asocia con la cadena retardada forma complejos con la primasa como parte de una unidad denominada primosoma. El desenrollamiento de las cadenas del DNA parental catalizado por la helicasa requiere la hidrólisis simultánea de ATP, que proporciona la energía necesaria para abrir la doble cadena de DNA. El proceso de desenrollamiento deja al descubierto el DNA original de una sola cadena. Si este DNA no se estabiliza de alguna forma, podría producirse un apareamiento intracatenario entre secuencias de bases complementarias, así que estas bases deben permanecer en una conformación de cadena única, de forma que puedan aparearse con los nucleótidos que llegan para formar las cadenas hijas. La proteína SSB, también denominada proteína desestabilizadora de la hélice, se une al DNA para estabilizar una estructura en la que las superficies de enlaces de hidrógenos de las bases del DNA tienen una orientación espacial dirigida hacia los nucleótidos que llegan.

El núcleo de la enzima Pol III se disocia del molde de DNA después de replicar solo ≈ 12 residuos, esto es, tiene una capacidad de procesamiento, o procesividad, de 12 residuos. Sin embargo, la holoenzima Pol III tiene una capacidad de procesamiento >5000 residuos debido a la presencia de la subunidad β . La subunidad β , o, más conocida, pinza β , forma un anillo alrededor del DNA que actúa como una abrazadera deslizante, pues rodea al DNA y puede moverse a lo largo de éste evitando que la holoenzima Pol III se disperse y asegurándose que permanece unida al DNA molde. Un dispositivo multiproteico, el cargador de la abrazadera, es el que abre la abrazadera para que pueda envolverse alrededor del DNA y anclarse la polimerasa, y después separa la abrazadera del DNA de forma que pueda disociarse la polimerasa en el momento adecuado.

El DNA original está forzado topológicamente, ya sea por la naturaleza circular del cromosoma, como ocurre en la mayor parte de los procariontes, ya sea por su unión a las proteínas cromosómicas como ocurre en los eucariotes. Como consecuencia del desenrollamiento de la doble cadena de DNA con el avance de la horquilla de replicación, se va generando un enrollamiento por encima de ésta que provoca una tensión de torsión que debe aliviarse para poder continuar con el desenrollamiento de las cadenas. Las topoisomerasas son las enzimas que alivian la tensión por encima de la horquilla separando transitoriamente las cadenas de DNA, lo que permite la relajación de la estructura mediante la rotación libre de las hebras, y facultan que se vuelvan a formar los enlaces fosfodiéster rotos.

Una característica fascinante de la replicación del DNA es la coordinación de la función de las diversas proteínas de este gran complejo de forma que las cadenas de DNA se sintetizan a la vez que se desenrolla el dúplex original, y claro, la síntesis de las cadenas líder y retardada se produce a la misma velocidad, además de copiarse las secuencias molde con una exactitud que no tiene parangón con ningún otro proceso bioquímico.

La pinza β

La holoenzima DNA polimerasa III contiene diez cadenas polipeptídicas diferentes. Las subunidades α , ϵ y θ constituyen la polimerasa central o núcleo, teniendo α la actividad polimerasa, y ϵ la actividad 3' exonucleasa. La proteína τ , dimérica, dimeriza la holoenzima, manteniendo juntas las polimerasas de las cadenas conductora y retardada de forma que avanzan juntas en la horquilla de replicación a pesar de que la polimerasa de la cadena retardada se mueve en direc-

ción opuesta al movimiento de la horquilla. La subunidad χ cambia los RNA cebadores a DNA. La subunidad β , conocida como pinza β , se identificó al principio como una proteína esencial para la procesividad de la DNA polimerasa, es decir, esencial para su capacidad de permanecer unida al molde durante muchos ciclos de adición de nucleótidos.

La polimerasa central, una vez en el DNA molde, permanece unida para alargar una cadena cebadora solo unos 10-20 nucleótidos. Sin embargo, β adhiere la enzima al DNA y la hace deslizar fácilmente a su largo, permitiéndola incorporar varios miles de nucleótidos por episodio de unión; así que β convierte a la DNA polimerasa III de una enzima que incorpora unos pocos nucleótidos por evento de unión, a una enzima muy procesiva, que permanece unida durante miles de reacciones de incorporación.

La estructura por difracción de rayos X de una pinza β , determinada por John Kuriyan a principios de los noventa¹¹, reveló que es un dímero compuesto por monómeros en forma de C que forman una estructura con forma de rosquilla de $\approx 80 \text{ \AA}$. El hueco central de $\approx 35 \text{ \AA}$ de diámetro es mayor que los diámetros de 20 \AA y 26 \AA del B-DNA y el A-DNA, respectivamente (la estructura común del DNA es B-DNA, y las hélices híbridas que contienen cebadores de RNA y DNA presentan una conformación similar al A-DNA). Cada una de las dos subunidades de la pinza β forma tres dominios de estructura similar, de modo que el anillo dimérico tiene pseudosimetría 6. La superficie interna del anillo tiene α hélices con cargas positivas, mientras que en la cara externa son negativas.

Los estudios de construcción de modelos en los que una hélice de B-DNA se engasta en el hueco central de la pinza β indican que las hélices α del interior de la proteína se extienden a lo largo de los surcos mayor y menor del DNA en lugar de entrar en ellos, por lo que se piensa que la pinza β está diseñada para minimizar su asociación con el DNA, lo que le permite deslizarse con libertad a lo largo de la doble hélice.

El DNA de *E. coli* se replica a una velocidad de $\approx 1000 \text{ nt/s}$. Por lo tanto, durante la síntesis de la hebra retrasada, la holoenzima DNA polimerasa debe recargarse sobre la hebra molde aproximadamente cada segundo (pues los fragmentos de Okazaki tienen $\approx 1000 \text{ nt}$ de longitud). Esto requiere que una pinza β nueva, que promueva la capacidad de procesamiento de la Pol III, se instale alrededor de la hebra retrasada molde casi cada segundo. El complejo γ de la holoenzima Pol III, también conocido como cargador de la abrazadera porque abre la abrazadera β dimérica para colocarla alrededor del molde de DNA de un modo dependiente de ATP, forma un puente entre los dos núcleos de Pol III del replisoma a través de los segmentos C-ter de sus dos subunidades.

Una vez que la abrazadera β es cargada sobre el DNA, el núcleo de Pol III se une más estrechamente que el complejo γ a la abrazadera β y, por lo tanto, lo desplaza para permitir que continúe la replicación procesiva del DNA. Cuando la replicasa encuentra un fragmento de Okazaki previamente sintetizado, esto es, cuando la brecha entre dos fragmentos de Okazaki sintetizados en forma sucesiva queda reducida a una mella, el núcleo de Pol III libera el DNA y pierde su afinidad por la abrazadera β . La subunidad γ y el núcleo de la Pol III pueden entonces iniciar rápidamente la síntesis de un fragmento de Okazaki nuevo debido a que están próximas a la hebra retrasada molde por medio de su unión al núcleo de Pol III comprometido en la síntesis de la hebra líder (que permanece sujeta al DNA por medio de su abrazadera β asociada). Esto, por supuesto, debe estar precedido por la carga de una pinza β nueva sobre el molde de DNA en la vecindad del cebador recién sintetizado. La abrazadera deslizante que se mantiene

alrededor del fragmento de Okazaki completo probablemente tiene como función el reclutamiento de Pol I y la DNA ligasa para reemplazar con DNA el cebador de RNA en el fragmento de Okazaki sintetizado con anterioridad y sellar la mella remanente.

El cargador de la abrazadera contiene tres copias de la subunidad tau¹² que tiene una extensión C-terminal que no se requiere para el cargado de la abrazadera pero que une la DnaB helicasa y la DNA Pol III¹³, por tanto, el replisoma bacteriano tiene tres Pol III unidas a un cargador de abrazadera central que también se adhiere a la helicasa hexamérica rodeando la cadena rezagada^{12,14}. El empleo de tres Pol III en una horquilla de replicación fue algo inesperado, ya que hay solo dos cadenas de DNA para replicar. Estudios de molécula única *in vivo* e *in vitro* indican que dos de las tres Pol III actúan en la cadena rezagada^{14,15}, y ya que la cadena rezagada tiene numerosos sitios cebados, el uso de múltiples polimerasas puede ser una ventaja¹⁰.

Pero ¿cómo actúa el cargador de la abrazadera para enrollar la pinza β alrededor del DNA y comenzar la síntesis procesiva? El complejo γ , ensamblaje llamado cargador de la pinza por Mike O'Donnell¹⁶, contiene una copia de cada una de las proteínas δ , δ' , χ y φ , y dos o tres subunidades γ , y es la proteína γ la que realmente se une a β y lleva a cabo la apertura del anillo que conduce al enganche de la pinza. Se requiere ATP pero, sorprendentemente, no debe hidrolizarse para que se abra el anillo β o para su posicionamiento alrededor del DNA. En vez de esto, un cambio conformacional impulsado por la unión del ATP hace que el complejo se una al DNA y que la proteína γ abra el anillo. Una vez que el DNA se ha encerrado en el círculo de la abrazadera, se hidroliza el ATP unido y se cierra el anillo β .

La primasa de *E. coli* interacciona con la DnaB helicasa para el cebado, pero no forma parte integral del replisoma en movimiento, sino que la primasa repetidamente se une y suelta de DnaB durante la actividad de cebado y el movimiento de la horquilla¹⁷.

0.2.3. El replisoma eucariota

Muchas de las proteínas del replisoma de bacterias y eucariotas no están relacionadas ni en secuencia ni en estructura^{6,7,18}, así que la organización y el funcionamiento interno de los replisomas bacteriano y eucariótico puede ser bastante diferente (Figura 2).

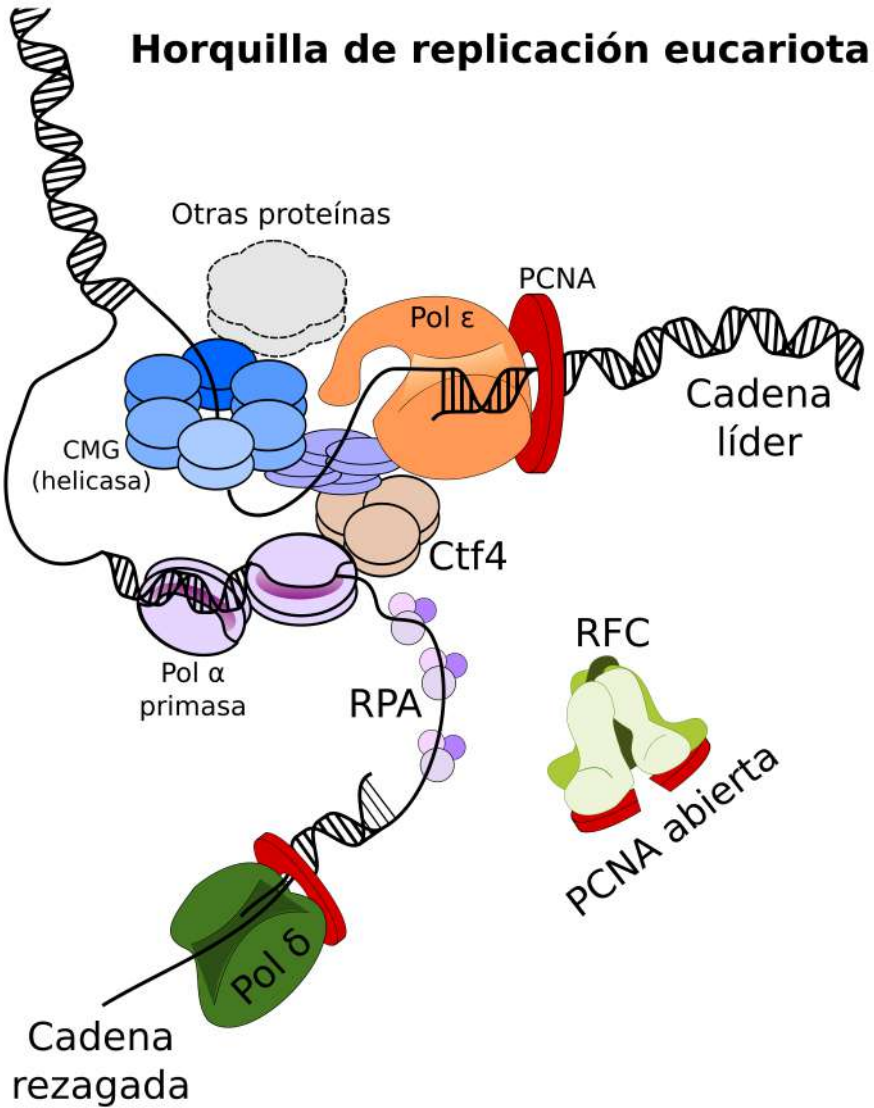


Figura 2: Horquilla de replicación eucariota. Inspirado en Zhang et. al. 2016¹⁰.

Los mecanismos de replicación en procariontes y eucariontes son muy similares, a pesar de que el sistema eucarionte es inmensamente más complejo en términos de cantidad y organización de DNA que se replica y el número de proteínas requeridas (estimado en más de 27 en levaduras y mamíferos), y algunos de los complejos proteicos implicados están conservados funcional y estructuralmente.

En las células eucariontes tienen lugar varias formas diferentes de replicación del DNA, pues las animales, por ejemplo, contienen, además de DNA nuclear, DNA mitocondrial, y las vegetales también DNA cloroplástico.

La velocidad del movimiento de la horquilla de replicación en los eucariotas, unos 50 nt/s, es solo una vigésima parte de la observada en *E. coli*, pero los cromosomas eucarióticos son casi siempre mucho mayores que los cromosomas bacterianos, por ello, la presencia de múltiples orígenes de replicación es lo que posibilita que el proceso de la replicación del genoma completo ocurra a una velocidad aceptable.

También, en las células eucarióticas hay varios tipos de DNA polimerasas y, entre otras cosas, se diferencian en sus localizaciones intracelulares y sus propiedades cinéticas. La DNA polimerasa γ está situada en las mitocondrias, tiene una procesividad elevada y participa en la replicación del DNA mitocondrial; los cloroplastos tienen una enzima similar. La polimerasa β , que se encuentra en el núcleo, tiene una procesividad baja y se disocia del molde tras un paso de incorporación de nucleótido; esta enzima interviene en la reparación del DNA. Las tres enzimas principales involucradas en la replicación del DNA nuclear son las polimerasas α , δ y ϵ . La DNA polimerasa α (Pol α), como todas las DNA polimerasas, replica el DNA mediante la extensión de un cebador en dirección $5' \rightarrow 3'$ guiada por un molde de ssDNA. Pol α es solo moderadamente procesiva (polimeriza ≈ 100 nucleótidos de una vez). Está formada por múltiples subunidades y una de ellas tiene actividad primasa, lo que indica que está involucrada en la iniciación de la replicación del DNA. Del complejo pol α /primasa, la subunidad primasa sintetiza pequeños fragmentos de RNA de unos 10 nucleótidos sobre la cadena rezagada, los cebadores o iniciadores, complementarios a la hebra de DNA que se copia durante la replicación, y después la Pol α los alarga incorporando desoxirribonucleótidos. Sin embargo, esta polimerasa carece de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ correctora de errores, lo que la hace inadecuada para la síntesis fiel de DNA. La DNA polimerasa α probablemente actúa solamente en la síntesis de cebadores cortos para los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada.

A continuación, los cebadores son alargados por la DNA polimerasa δ (Pol δ). Pol δ no se asocia con una primasa como Pol α , y contiene un sitio activo $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa, es decir, tiene actividad exonucleasa correctora de errores. Además, la procesividad de la Pol δ es esencialmente ilimitada (puede replicar la longitud completa de un molde de DNA), pero solo cuando forma un complejo con la correspondiente abrazadera deslizante eucariota, llamada antígeno nuclear de células en proliferación, proteína conocida por las siglas de su nombre en inglés PCNA. PCNA desempeña un papel comparable al de la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli*, formando una abrazadera circular que rodea el DNA y potencia mucho la procesividad de la polimerasa, y estas dos proteínas accesorias, las abrazaderas o pinzas eucariota y procarionte, están relacionadas estructuralmente. La estructura por difracción de rayos X de la PCNA, también determinada por Kuriyan¹⁹, es sorprendentemente parecida a la de la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli*, aunque la homología de secuencia primaria no sea significativa ni siquiera en regiones con similitud estructural.

Si para la síntesis de DNA se requiere que Pol δ forme un complejo con PCNA, PCNA deberá estar cargada sobre el DNA. El homólogo eucarionte del complejo γ de *E. coli* (el cargador de la abrazadera) carga PCNA sobre la hebra molde cerca del cebador y permite que Pol δ se una y extienda de forma procesiva la nueva hebra de DNA. Este cargador de la abrazadera es el factor de replicación C (o RFC, por sus siglas en inglés) en eucariotas y facilita la formación de complejos de replicación activos. Las subunidades del complejo RFC presentan una notable similitud de secuencia con las subunidades del complejo de carga de la abrazadera (γ) bacteriano.

El replisoma eucariótico tiene algunas características en común con el replisoma bacteriano, pero también muchas diferencias importantes. Una de estas diferencias es que el cargador de la abrazadera RFC no se asocia de manera estable con ningún componente del replisoma eucariótico, así que no se considera una parte integral del mismo. Esto contrasta con el replisoma bacteriano donde el cargador de la abrazadera es el organizador central del replisoma. Pero ambos replisomas utilizan abrazaderas deslizantes que proporcionan procesividad a sus respectivas polimerasas¹⁰.

Aunque hay más, otra distinción del replisoma eucariótico comparado con el de *E. coli* es el empleo de dos DNA polimerasas diferentes para las cadenas líder y rezagada; aunque, también hay que decir, no se conoce que la Pol δ de la cadena rezagada eucariótica viaje con el replisoma, en fuerte contraste con los sistemas *E. coli*, fago T4 y fago T7 en los que la polimerasa rezagada sí viaja con la horquilla.

La DNA polimerasa ϵ (Pol ϵ) se asemeja a Pol δ pero es muy procesiva en ausencia de PCNA; tiene actividad 3' \rightarrow 5' exonucleasa que degrada el ssDNA a oligonucleótidos de 6 o 7 residuos en lugar de hacerlo a mononucleótidos como en el caso de la actividad exonucleasa de la Pol δ , y puede reemplazar a Pol δ en algunas situaciones, como la reparación del DNA. A pesar de que Pol ϵ es necesaria para la viabilidad de levaduras, su función esencial puede ser llevada a cabo solo por el C-ter no catalítico de su subunidad catalítica de 256kDa, por tanto, parece que, al menos en levadura, la Pol ϵ tiene una función esencial de control, pero no una función catalítica. Pol ϵ puede actuar también en la horquilla de replicación, tal vez con un papel análogo al de la DNA polimerasa I bacteriana, eliminando los cebadores de los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada.

Un miembro adicional de la familia de las proteínas polimerasas es la enzima viral transcritasa inversa, una DNA polimerasa que utiliza como molde RNA en vez de DNA.

Los cromosomas eucariontes contienen numerosos orígenes de replicación, y cada uno de estos segmentos de DNA o unidades de replicación asociados con un origen de replicación, se llaman replicones. Agrupamientos de 20-30 replicones se activan de manera simultánea para comenzar la replicación. Durante este proceso, los replicones que ya se replicaron se distinguen de los que aún no lo hicieron, pues el DNA cromosómico de una célula se replica una y solo una vez por ciclo celular. En levaduras la iniciación de la replicación de DNA tiene lugar en las llamadas secuencias de replicación autónomas (ARS son sus siglas en inglés), que son secuencias conservadas de 11 pb adyacentes a DNA que se desenrolla fácilmente. Pero igual que en procariontes, se requiere una helicasa para preparar el DNA para la replicación, y un análogo a las SSB, que en eucariontes es la proteína RPA (siglas en inglés de proteína de replicación A), para recubrir el ssDNA resultante y mantenerlo desenrollado.

Entonces, ayudada por una gran cantidad de proteínas accesorias, la DNA pol α /primasa comienza a sintetizar una hebra de DNA nueva y después es reemplazada por la Pol δ para ex-

tender la cadena. La replicación del DNA procede en cada dirección a partir del origen de replicación hasta que cada horquilla de replicación colisiona con otra del replicón adyacente. Pero, a diferencia del DNA procarionte, el eucarionte está empaquetado en nucleosomas. Experimentos con histonas marcadas indican que los nucleosomas justo por delante de la horquilla de replicación se desensamblan y las histonas liberadas se asocian inmediatamente con las moléculas de DNA hijas emergentes.

El RNA cebador de los fragmentos de Okazaki eucariontes se elimina por medio de la acción de dos enzimas, la Rnasa H1 y la endonucleasa flap-1 (más conocida como FEN1, sus siglas en inglés); la primera elimina la mayoría de los RNA y deja solo un 5'-ribonucleótido adyacente al DNA que después es eliminado por la acción de la segunda. El segmento excindido es posteriormente reemplazado por DNA por la Pol δ .

0.3. Proteínas más importantes del replisoma eucariota

0.3.1. La helicasa CMG

La helicasa eucariótica es un complejo proteico de 11 subunidades llamado CMG^{20,21}; la "C" hace referencia a la proteína Cdc45^{22,23}, la "M" al complejo Mcm de seis subunidades en forma de anillo heterohexamérico^{24,25}, y la "G" representa al complejo heterotetramérico GINS²⁶, y juntas forman el ensamblado que es la enzima helicasa activa^{20,21}.

CMG se forma durante la activación de un origen de replicación en una reacción en varios pasos (revisado en ^{1-3,5}) que se produce en dos fases distintas del ciclo celular, la fase G1 y la fase S. Esta enzima es la encargada de separar las dos hebras del DNA parental para que queden expuestas para realizar una copia de cada una de ellas.

Se piensa que las helicasas replicativas en forma de anillo de todos los tipos celulares, desde bacterias hasta eucariotas, desenrollan el DNA por un mecanismo de exclusión estérica²⁷⁻³²: una de las cadenas del DNA entra en el poro central de la enzima mientras que la otra cadena es excluida, y cuando la helicasa rastrea el ssDNA, actúa como una cuña que abre y divide el dúplex parental.

0.3.2. La Polimerasa alfa-primasa

Las polimerasas son enzimas capaces de polimerizar ácidos nucleicos, pero las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis de DNA *de novo* y requieren un sitio cebado preexistente (es decir, una unión o empalme 3' ss/ds). Así, la iniciación de la replicación de las cadenas líder y rezagada requiere una enzima primasa que sintetice el iniciador de RNA para comenzar la síntesis de DNA. Como la cadena líder se extiende en la dirección del movimiento de la horquilla, solo necesita ser cebada una vez; pero debido a la estructura antiparalela del DNA, la cadena rezagada es extendida en la dirección opuesta al desenrollado de la horquilla, y esto requiere la formación de múltiples fragmentos, los de Okazaki, cada uno iniciado por un cebador sintetizado por una primasa. Los fragmentos de Okazaki son solo de 100-200 nucleótidos en eucariotas, y por lo tanto los eventos de cebado deben ser frecuentes.

Las primasas sintetizan una sección corta de RNA de una docena de nucleótidos o menos. ¿Por qué se utiliza RNA para el iniciador o cebador y no DNA? La respuesta a esta pregunta no está resuelta, pero hay algunas posibilidades razonables. Una es que los rNTPs (ribonucleósidos trifosfato, los monómeros precursores del RNA) están en concentración 10 o 100 veces más altas en las células que los dNTPs (desoxinucleósidos trifosfato, monómeros precursores del DNA)³³. La condensación inicial de dos nucleótidos durante la síntesis *de novo* de un cebador requiere la proteína para unir dos nucleósido trifosfato, y la concentración más alta de rNTPs puede haber favorecido el uso de RNA sobre el de DNA. Otra posible razón es que la síntesis *de novo* del cebador es un proceso con una inherente baja fidelidad³⁴⁻³⁶, por consiguiente, el uso de RNA para la formación del cebador podría servir como un marcador conveniente para su eliminación y reemplazo definitivo por DNA por una polimerasa de alta fidelidad.

La primasa eucariota es una enzima de cuatro subunidades que contiene, en subunidades separadas, la actividad RNA primasa y la DNA polimerasa, al contrario que la primasa de subunidad única bacteriana³⁷⁻³⁹. Esta enzima es la que se llama DNA polimerasa alfa-primasa, pero siempre se la designa simplemente como Pol α . Pol α fue la primera polimerasa eucariota des-

cubierta, y cuando se vio que también contenía una actividad primasa inherente⁴⁰, se pensó que este complejo podría realizar la síntesis de las cadenas líder y rezagada, y por muchos años se pensó que Pol α era la única polimerasa replicativa eucariótica¹⁰.

Pol α termina la síntesis de DNA después de unos 20 nucleótidos^{41,42}, pero Pol α se volverá a unir y la continuará; y así, por ciclos repetidos de extensión, puede producir cadenas de DNA de muchas kilobases. Pero, en presencia de polimerasas replicativas, Pol α actúa como una primasa y sintetiza un cebador híbrido RNA/DNA de 20-30 nucleótidos⁴² que después es capturado y extendido por DNA polimerasas replicativas procesivas⁴³. Estudios estructurales de la subunidad polimerasa de Pol α indican que distingue la forma A del RNA-DNA de la forma B del DNA-DNA, y que la enzima puede no unirse bien al dsDNA de forma B¹⁰.

Después, la eliminación del RNA es llevada a cabo por la endonucleasa FEN1 o por la nucleasa Dna2, y reemplazado con DNA por Pol δ ^{44,45}. Por qué Pol α tiene una DNA polimerasa no se sabe. De hecho, la primasa de arqueas consiste solo de dos pequeñas subunidades de cebado de RNA, homólogas a estas de Pol α , y que no contienen las subunidades DNA polimerasa⁴⁶.

Se conoce desde hace mucho que Pol α se une a una proteína homotrimérica llamada Ctf4⁴⁷, que es un componente del cargador de la abrazadera RFC, y ayuda a estabilizar la asociación de Pol α con el replisoma^{48,49} haciendo de puente entre la helicasa CMG de la cadena líder y la Pol α de la cadena rezagada a través de dos de sus homotrimeros. El tercer protómero de Ctf4 está disponible para unirse a una tercera proteína. El descubrimiento de que Ctf4 se une a un pequeño péptido consenso, encontrado, por cierto, también en muchas proteínas que se unen a la abrazadera PCNA, la cual actúa, como veremos en detalle, como una plataforma para las interacciones dinámicas con sus muchas proteínas asociadas, daría a Ctf4, si actúa de manera similar, la posibilidad de proceder como el núcleo o centro de actividad del tráfico de proteínas dentro del replisoma^{6,50}.

0.3.3. Las DNA polimerasas epsilon y delta

Las eucariotas usan dos DNA polimerasas diferentes para la síntesis de la cadena líder y la rezagada, Pol epsilon y Pol delta, respectivamente⁵¹⁻⁵³. Ambas contienen una exonucleasa 3'→5' correctora de errores. Pol δ fue la primera identificada como la polimerasa replicativa a partir de estudios bioquímicos de la replicación del virus 40 de simio (SV40)⁵⁴. Otros estudios mostraron que Pol α sintetizó los sitios cebados para ambas cadenas, líder y rezagada, y que la replicación masiva fue llevada a cabo por una segunda DNA polimerasa, la Pol δ , junto con sus factores accesorios PCNA y el factor de replicación C (RFC)⁵⁴.

Pero aunque la replicación del DNA de SV40 solo requiere Pol α y Pol δ , estudios genéticos identificaron Pol epsilon como la tercera DNA polimerasa que es esencial para la replicación celular⁵⁵. La asignación de Pol ϵ a la cadena líder y Pol δ a la cadena rezagada se logró gracias a varios experimentos del laboratorio de Kunkel y colaboradoras/es^{51-53,55-57}. Estas investigaciones fueron extendidas a la levadura *S. pombe* con conclusiones similares⁵⁸. Otros estudios bioquímicos de polimerasas mostraron que Pol δ funciona con la nucleasa FEN1 para procesar eficientemente los fragmentos de Okazaki y proporcionar una mella que se pueda después ligar, pero Pol ϵ no es capaz de hacer esta reacción, apoyando el papel de Pol δ en la cadena rezagada^{59,60}.

Pol ϵ es estimulada para la síntesis del DNA por la abrazadera PCNA, pero no hay motivos de unión a PCNA obvios en sus subunidades, o, al menos, los puntos de contacto entre Pol ϵ y PCNA no se han identificado con claridad¹⁰.

Hay seis familias de polimerasas (A, B, C, X, Y, RT) y las regiones catalíticas de las DNA polimerasas α , δ y ϵ muestran la estructura de las polimerasas de la familia B⁶¹⁻⁶³: están compuestas de tres subdominios (que se llaman dedos, palma y pulgar por su apariencia) que tienen la forma de una mano derecha, en la que la palma contiene el sitio activo, donde tres residuos ácidos conservados se unen a dos iones metálicos para ser el centro catalítico de la polimerización del DNA^{64,65}. Pol ϵ contiene una característica distinta no presente en Pols δ y Pol α ; tiene un dominio de procesividad⁶² que cierra el hueco entre los dedos y el pulgar, y de este modo rodea completamente el sustrato de DNA¹⁰, y quizás sea éste el motivo por el que no se une directamente a PCNA. Aunque, según un trabajo de Zuanning Yuan y colaboradoras/es sobre la estructura de criomicroscopía electrónica de Pol ϵ , parece que sí es estimulada para la síntesis del DNA por PCNA por interacción con esta a través del motivo PIP de una de sus cuatro subunidades (la llamada Pol2)⁶⁶.

0.3.4. La abrazadera PCNA y el cargador de la abrazadera RFC

La primera proteína circular que rodea el DNA descubierta fue la pinza beta de *E. coli*^{11,67} y desde entonces se han encontrado numerosas proteínas que circundan o abrazan el DNA para llevar a cabo su función. El estudio bioquímico inicial identificando la abrazadera demostró que la pinza β se une al dsDNA y se desliza a su largo y además puede resbalar al final de DNA lineal⁶⁸. La prueba de que β era una proteína circular llegó pronto con la estructura cristalográfica, mostrando un homodímero que forma un anillo con un agujero de diámetro suficiente para rodear el dsDNA¹¹. La pinza o abrazadera eucariótica es PCNA (Figura 3). Su estructura cristalográfica^{69,70} mostró una proteína homotrimérica de subunidades compuestas de dos subdominios globulares¹¹. Todas estas pinzas se unen a las DNA polimerasas y las mantienen en el DNA para otorgarles una alta procesividad¹⁰.

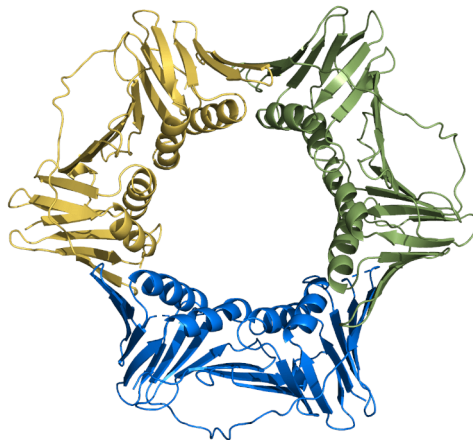


Figura 3: Representación de Jane Richardson o *cartoon*, PDBID 1AXC.

Muchos estudios posteriores de PCNA mostraron que también una numerosas proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad genómica, incluyendo proteínas de reparación de bases desapareadas, factores de ensamblado del nucleosoma, nucleasas, ligasa, DNA polimerasas baipás, y quinasas del ciclo celular⁷¹.

Las abrazaderas o pinzas deslizantes requieren un cargador de la abrazadera de cinco subunidades que usa ATP para ensamblar la pinza al sitio cebado⁹. En eucariotas, el cargador de la abrazadera se denomina RFC y fue descubierto como una proteína accesoria de la polimerasa en el sistema de replicación de DNA de SV40⁵⁴. Las subunidades de los cargadores de abrazadera de bacteria y eucariotas son homólogos entre sí y están en la familia AAA+ de ATPasas (que son ATPasas asociadas con diversas actividades celulares)^{72,73}. La primera estructura resuelta fue la del cargador de la abrazadera de *E. coli*⁷³; después vinieron las de levadura y fago T4⁷⁴⁻⁷⁶. Estos cargadores de abrazadera de diversos organismos tienen una estructura y mecanismo de acción similares, con los sitios de ATP localizados en la interfaz entre subunidades y una arquitectura estratégica que organiza los cambios estructurales en un complejo multiproteico que es necesario para abrir la abrazadera, posicionarla en el sitio cebado, y cerrarla alrededor del DNA¹⁰.

En la estructura de RFC de levadura unida a PCNA, las cinco subunidades cargadoras de la abrazadera están dispuestas en una espiral a derechas con los dominios AAA+ mantenidos juntos. Estos dominios AAA+ contienen un hueco entre dos de las subunidades que permite al DNA pasar a una cámara central formada por todos los dominios AAA+ de las cinco subunidades.

Se requiere ATP para que RFC abra PCNA. Tres sitios de ATP se localizan en las interfaces de subunidades de RFC, y residuos de ambas subunidades en cada sitio ATP son esenciales para la hidrólisis nucleotídica. En la apertura del anillo de PCNA, un sitio cebado puede pasar a través del hueco en PCNA y entre los dominios AAA+ de las subunidades RFC1 y RFC5 para encajar en la cámara interior de RFC. El sitio de unión a DNA de RFC (y también del cargador de la abrazadera bacteriano) contiene residuos de unión a DNA conservados localizados en giros en los cinco dominios AAA+^{74,77}. La especificidad, dependiente de la estructura del sitio cebado e independiente de la secuencia, se ve facilitada por el collar pentamérico que forman las subunidades de RFC y que no tiene abertura para el DNA, y que, por tanto, el DNA debe doblarse de manera brusca del lado del cargador de pinza. La unión ssDNA/dsDNA de un sitio cebado contiene la flexibilidad necesaria para esta curva cerrada (que en realidad, en el sitio cebado es ssDNA/dsDNA-RNA), pero no el dsDNA que es demasiado rígido. La unión del DNA induce a las cinco subunidades a adoptar un giro que sigue de cerca el DNA dúplex, y esto organiza los residuos del sitio ATP en una conformación activa^{76,78}. Después, la hidrólisis de ATP permite expulsar el cargador de la abrazadera y cerrar el anillo de PCNA alrededor del sitio cebado para su uso por la DNA polimerasa (u otras enzimas)¹⁰.

0.4. PCNA

La abrazadera deslizante del DNA eucariótica, equivalente a la abrazadera (o pinza) β bacteriana, es el antígeno nuclear de células en proliferación, en inglés *proliferating cell nuclear antigen*, cuyas siglas, PCNA, le dan el nombre por el que es conocida esta proteína.

Desde su descubrimiento a fines de la década de 1970, nuestra visión de PCNA y sus funciones en la replicación del DNA y el mantenimiento del genoma se ha ampliado considerablemente. PCNA se identificó originalmente como el objetivo de un anticuerpo autoinmune, es decir, como un antígeno, de ahí parte de su nombre, derivado de pacientes con lupus eritematoso sistémico⁷⁹. Posteriormente se demostró que esta proteína se produce predominantemente en núcleos de células proliferantes y transformadas⁸⁰⁻⁸². A mediados de la década de 1980, se sugirió la participación de PCNA en la replicación del DNA en función de su patrón de tinción a lo largo del ciclo celular⁸³ y Bravo y Celis, en ese momento, la llamaron Ciclina por su aparición periódica⁸⁰. Cuando estudios posteriores demostraron que PCNA y Ciclina eran la misma proteína de 29kDa⁸², se dejó el término ciclina para describir la familia de proteínas envuelta en la regulación del ciclo celular que unen quinasas CDK (CDK son las siglas en inglés de *cyclin-dependent kinases*). En células fuera de fase S, fase en la que se expresa PCNA, su expresión aumenta después de ser irradiadas con luz UV debido a la implicación de la pinza en el proceso de reparación del DNA^{84,85}.

La evidencia definitiva de un papel para PCNA en la replicación del DNA se produjo un par de años después con el descubrimiento de que PCNA es un factor esencial para la replicación del SV40 *in vitro*^{86,87}. Ya que esta replicación del DNA imita a la de los cromosomas mamíferos, se hipotetizó que PCNA es requerida de manera general para la replicación del DNA cromosómico. Estudios bioquímicos y genéticos posteriores en levadura demostraron que PCNA es, en efecto, esencial para la replicación del DNA cromosómico⁸⁸⁻⁹⁰. Pronto se vio que PCNA era una proteína auxiliar para la DNA polimerasa delta (Pol δ) que aumenta su actividad haciéndola más procesiva⁹¹⁻⁹³. Posteriormente, se demostró que PCNA es un factor auxiliar también para la DNA polimerasa épsilon (Pol ϵ)^{55,94-96}. A principios de la década de 1990, ya se asignó a PCNA el papel de factor de procesividad de las polimerasas replicativas eucariotas⁹⁷.

Comparaciones de los procesos de elongación en *E. coli*, fago y sistemas eucarióticos han revelado que el aparato de replicación está altamente conservado en términos de estructura y función⁹⁸. Factores llamados abrazaderas deslizantes del DNA existen en común en todos los sistemas en los tres dominios, y hacen a las polimerasas sintetizar largas cadenas de DNA eficientemente. A pesar de la poca homología de secuencia entre las pinzas de bacterias, arqueas y eucariotas, todas ellas tienen estructuras generales muy similares formando un anillo que rodea el DNA bicatenario. Estas abrazaderas deslizantes son más conocidas por su capacidad de conferir alta procesividad a las DNA polimerasas involucradas en la replicación y reparación normal del DNA, pero lo cierto es que hacen mucho más que eso; forman plataformas móviles en el DNA que reclutan muchas de las enzimas involucradas en la replicación, reparación y recombinación del DNA⁹⁹.

La estructura cristalina de rayos X de PCNA eucariota se determinó por primera vez en 1994⁷⁰ y en los últimos 25 años se han determinado otras varias de la abrazadera unida a péptidos derivados de sus proteínas de unión (PDB ID: 1RXM, 6O09, 6T7Y, 6GWS, 5MAV, 2ZVM, 2ZVL, entre muchas otras). Y más recientemente, también se han determinado las estructuras de rayos X y de baja resolución de PCNA unida a socias proteicas de longitud completa (por ejem-

plo, PDB ID: 2IZO, 6T8H, 3P83, 6KNC, 6KNB, 7KC0, 1UL1). Todas estas estructuras han proporcionado información muy valiosa sobre cómo PCNA reconoce a las proteínas que se unen a ella y las recluta para la horquilla de replicación.

A medida que se identificaron más y más socios que interactúan con PCNA, quedó claro que no es simplemente un factor de procesividad para las polimerasas replicativas. En un artículo de revisión sobre PCNA, Moldovan y colaboradoras/es la llaman “el Maestro de la horquilla de replicación”¹⁰⁰, metáfora adecuada para enfatizar que PCNA coordina el reclutamiento de muchas proteínas en los sitios de replicación del DNA y, en muchos casos, regula sus actividades, desempeñando así un papel fundamental en una amplia gama de procesos nucleares. PCNA Interactúa y regula las actividades de muchas proteínas involucradas en la maduración de fragmentos de Okazaki^{101,102}, reparación de desajustes¹⁰³, reparación de escisión de nucleótidos¹⁰⁴ y síntesis translesión¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. También interactúa con proteínas involucradas en otros procesos como el control del ciclo celular¹⁰⁹⁻¹¹¹, la cohesión de las cromátidas hermanas¹¹², la herencia epigenética¹¹³ y la proteólisis específica de la fase S¹¹⁴. A principios de la década de 2000, PCNA ya se ve como una proteína concentradora importante que es crítica para organizar y orquestar eventos en la horquilla de replicación y otros sitios de síntesis de DNA^{97,100,115-120}.

p53 es un factor de transcripción, componente clave de la respuesta celular al daño en el DNA, y que ha sido llamado “el guardián del genoma”¹²¹⁻¹²⁴. La exposición de la célula a daño en el DNA causa un aumento en el nivel de la forma activa de p53, y altos niveles de p53 afectan la transcripción de varios genes y provocan la detención del ciclo celular, mientras que las células que carecen de la proteína no pueden detenerse después de sufrir la lesión (revisado en Cox 1995¹²⁵). Tras la exposición a luz UV, la célula expresa p53 y esto activa la expresión de varios genes; dos de estos genes codifican para dos proteínas, p21 (un factor inhibidor de quinasa dependiente de ciclina) y GADD45, que se unen a PCNA durante el proceso de reparación¹²⁶, cuya expresión también es estimulada por p53^{127,128} y por la radiación UV¹¹⁹.

Y aún existe un nivel más en cuanto al número de procesos o funciones en los que PCNA se ve implicada. Desde principios de la década de 2000, ha quedado claro que la regulación de varios procesos metabólicos del DNA se rigen por las modificaciones postraduccionales de PCNA, especialmente la ubiquitinación y la SUMOilación^{129,130}. La ubiquitinación de PCNA promueve la síntesis translesión a través del reclutamiento de polimerasas de síntesis translesión en horquillas de replicación estancadas¹³¹, y la SUMOilación inhibe la recombinación mediante el reclutamiento de anti-recombinasas en sitios de síntesis de DNA^{132,133}.

0.4.1. Estructura de PCNA

Las pinzas deslizantes son proteínas que rodean el DNA bicatenario y, debido a su papel crítico, se encuentran en los tres dominios de la vida. Aunque estas proteínas tienen poca similitud de secuencia y diferentes estados oligoméricos, todas poseen una estructura tridimensional general similar en forma de anillo de pseudosimetría de orden 6. Las abrazaderas deslizantes bacterianas forman homodímeros, mientras que las abrazaderas deslizantes de arqueas y eucariotas forman homotrímeros y heterotrímeros. Como ya hemos dicho, estas pinzas deslizantes funcionan como plataformas para reclutar y regular varias enzimas que actúan en la replicación y reparación del DNA, como las polimerasas, nucleasas y ligasas¹⁰⁰. Su sorprendente similitud estructural demuestra la importancia evolutiva de tener tales andamios para llevar las diferentes proteínas a los sitios de síntesis de DNA⁹⁷.

La primera evidencia de la estructura de la pinza deslizante llegó del estudio de la subunidad β de la Pol III de *E. coli*. En una serie de elegantes experimentos se mostró que la subunidad β se unía firmemente a un plásmido circular pero rápidamente se disociaba deslizando al final tras la linearización del plásmido, lo que sugiere que la subunidad β se une al DNA de manera topológica, rodeándolo^{67,119}. Debido a su estructura en anillo cerrado, las pinzas deslizantes tienen que ser cargadas alrededor del dúplex por el cargador de la abrazadera, llamado RFC en eucariotas, un complejo pentamérico que utiliza ATP para abrir y cerrar la pinza alrededor del DNA^{74-76,78}. En el caso de PCNA, en ausencia del cargador de la pinza RFC la pinza deslizante puede mantener la replicación procesiva de Pol δ en un DNA lineal con extremo de doble cadena, pero no en un molde circular cerrado¹³⁴, lo que sugiere que PCNA podría enhebrarse en el extremo de la molécula de dsDNA hasta alcanzar el extremo 3' final, donde interaccionar con Pol δ para iniciar la síntesis de DNA procesiva¹¹⁹, pero que es imprescindible RFC para ensamblarlo en la unión cebador-plantilla de la horquilla de replicación. También se utilizaron experimentos de entrecruzamiento como estrategia diferente para demostrar la propiedad deslizante de PCNA¹³⁵.

Las estructuras de las PCNA humana⁶⁹ y de levadura⁷⁰ son muy similares la una a la otra y a la subunidad β de *E. coli*. La PCNA eucariota es un homotrímero con cada monómero compuesto por dos dominios independientes plegados de manera similar, conectados por un bucle llamado bucle de conexión entre dominios (de manera abreviada IDCL, por sus siglas en inglés)⁷⁰. En cada monómero, el dominio 1 o dominio A está compuesto por los residuos 1 a 117 (el N-ter), el dominio 2, o dominio B, está compuesto por los residuos 135 a 258 (el C-ter). Los dominios A y B se mantienen unidos mediante una hoja β que se extiende en el límite entre ellos en cada subunidad. Las tres subunidades se ensamblan de la cabeza a la cola con el dominio A de una subunidad interactuando con el dominio B de la subunidad adyacente; esta interacción se estabiliza a través de una hoja β extendida en cada interfaz entre subunidades compuesta de cadenas β del dominio A de una subunidad y cadenas β del dominio B de una subunidad adyacente. Los seis dominios estructurales forman un anillo con una capa externa de seis láminas β (tres láminas β entre dominios y tres láminas β entre subunidades) y una capa interna de 12 hélices α que recubren el orificio central del anillo, dos de cada dominio¹³⁶.

El anillo de PCNA tiene un diámetro de unos 80 Å y el orificio central de unos 35 Å, más ancho que el diámetro del DNA en forma de B (≈ 20 Å)^{11,137}, luego suficiente para albergarlo. En todas las especies estudiadas, PCNA es una proteína ácida con un bajo pI¹¹⁹, con una distribución de cargas en el anillo asimétrica. Si bien el potencial electrostático general de PCNA es negativo, pues hay un fuerte potencial negativo en la superficie externa, la superficie interna, es decir, la cavidad central, está cargada positivamente debido a la presencia de residuos de lisina y arginina en estas hélices α . La superficie negativa puede prevenir interacciones no específicas con el DNA, y la cavidad interna, con estas cargas positivas localizadas, puede formar interacciones electrostáticas con el dúplex de DNA cargado negativamente, facilitando su paso a través del orificio central primero⁹⁹, y, tras el ensamblado alrededor del DNA por el cargador de la pinza, estabilizar el complejo.

El sitio de interacción más relevante es el IDCL (siglas de su nombre en inglés *interdomain connecting loop*), bucle que va desde L121 a E132 en cada subunidad de PCNA y que es reconocido por varias proteínas. Que esta estructura exista comúnmente en todas las abrazaderas deslizantes del DNA conocidas, indica un papel esencial en la función de PCNA. De hecho, análisis de mutaciones en esta región han revelado que es necesaria para la síntesis de DNA por Pol δ ¹³⁸⁻¹⁴²; sin embargo, las interacciones con RFC o Pol ϵ no están afectadas^{138,139}.

Otras varias proteínas de interacción con PCNA, como p21 y FEN1, también reconocen este bucle¹⁴³⁻¹⁴⁵. El bucle también puede funcionar para mantener la estructura del anillo o para proporcionar flexibilidad a PCNA para llevar a cabo la apertura y cierre del anillo y poder ser cargado sobre el DNA¹⁴⁶. Otro bucle importante es la cola C-terminal que sobresale en la cara frontal de PCNA desde cada monómero. Delecciones en esta zona afectan especialmente la habilidad para estimular la RFC ATPasa, indicando que la cola C-ter interacciona con el cargador de la abrazadera RFC^{69,147}, necesario para su unión al DNA. La otra DNA polimerasa dependiente de PCNA, Pol ϵ , interacciona con esta región C-ter de PCNA¹³⁹, así como p21, FEN1 y GAD-D45^{95,139,148,149}.

Muchas proteínas de unión a PCNA contienen un motivo de unión común, llamado PIP-box^{143,150}, de secuencia consenso Q-xx-(h)-x-x-(a)-(a), donde h representa residuos con cadenas laterales moderadamente hidrofóbicas (por ejemplo, L, I, M), a representa residuos con alta hidrofobicidad con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, F, Y) y x es cualquier residuo. Otro motivo de unión a PCNA, K-A-(A/L/I)-(A/L/Q)-x-x-(L/V), denominado KA-box, es diferente del clásico PIP-box y también se presenta en varias proteínas que interactúan con PCNA¹⁵¹.

El trímero de PCNA es estable tanto en solución como en el DNA. En solución, la K_d de disociación de PCNA en monómeros es 20 nM^{152,153}, y el trímero permanece estable a 500 mM de NaCl¹¹⁹. PCNA es también estable en el DNA con una vida media observada de 22 minutos^{152,153}. Ya se demostró hace 25 años que la sustitución de un único aminoácido, una Tyr por Ala, en la interfaz entre subunidades causa que PCNA sea un monómero¹⁵⁴. También se mostró que esta PCNA monomérica no puede ser ensamblada alrededor del DNA y no es capaz de ayudar a Pol δ en la replicación¹⁵⁴. Además, la sustitución de una Ser por Pro en la lámina β de la interfaz entre monómeros resultó en la monomerización de la proteína⁹⁰. Pese a que se han identificado varios residuos en la estructura de PCNA como importantes en la estabilidad de las interfaces, se necesita profundizar más en la función específica de sus residuos aminoácidos y en la naturaleza exacta de la interacción que estabiliza la estructura proteica¹¹⁹.

Aunque las pinzas deslizantes de bacterias, arqueas y eucariotas son todas proteínas en forma de anillo con pseudosimetría de orden 6, existen diferencias, en el número de dominios que comprenden cada subunidad y la forma en que las subunidades se ensamblan para formar el anillo. La pinza deslizante bacteriana, la pinza β , es un homodímero y cada subunidad contiene tres dominios¹¹; PCNA es un homotrímero que cada subunidad contiene dos dominios⁷⁰; y la abrazadera deslizante de arqueas, que también se llama PCNA como la eucariota, es un trímero en forma de anillo con dos dominios por subunidad, pero en algunas especies es un homotrímero y en otras es un heterotrímero.

PCNA tiene aproximadamente 30Å de ancho y sus caras frontal y trasera son distintas. Muchas de las proteínas de replicación, como las DNA polimerasas y las DNA ligasas, realizan sus operaciones en el DNA precisamente en la frontal⁹⁹. La cara frontal apunta en la dirección de la síntesis de DNA y contiene el C-ter de cada monómero, así como el dominio IDCL, y la mayoría de las proteínas que interactúan con PCNA lo hacen en un bolsillo hidrofóbico que tiene cerca de este dominio^{69,155,156}. La unión en la cara frontal permite que estas proteínas que interactúan con PCNA accedan al extremo terminal del cebador en el DNA que se replica. El papel de la cara trasera de PCNA está menos claro. Esta cara apunta lejos de la dirección de síntesis de DNA, y contiene varios bucles extendidos y la lisina-164, un sitio de ubiquitinación y SUMOilación¹²⁹. Luego parece que la cara posterior es un sitio de modificación postraduccional de PCNA y se ha sugerido que a estas modificaciones se unen a proteínas específicas, funcio-

nando entonces como centro reclutador de factores proteicos en las horquillas de replicación para mantener estas en reserva hasta que se necesiten en la cara frontal de PCNA^{99,157-159}.

Las modificaciones postraduccionales de PCNA son eventos críticos en la regulación de los procesos metabólicos del DNA en los que participa PCNA. Estas modificaciones cambian la especificidad de unión de PCNA y, en algunos casos, actúan para reclutar proteínas específicas. Las modificaciones postraduccionales de PCNA mejor caracterizadas son la ubiquitinación y la SUMOilación de la mencionada lisina-164^{129,131}, y se han determinado las estructuras cristalinas de rayos X de algunas de estas formas modificadas de PCNA (PDB ID: 3PGE, 3TBL)¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. La ubiquitinación de PCNA en esta posición promueve la síntesis translesión mediante el reclutamiento de polimerasas de síntesis translesión, que a su vez contienen los llamados motivos PIP, así como motivos de unión a ubiquitina en sus colas C-terminales. La SUMOilación de PCNA en esta posición inhibe la recombinación mediante el reclutamiento de una anti-recombinasa^{132,133} que contiene un motivo similar a PIP que se une en la cara frontal de PCNA, así como un motivo de unión a SUMO¹⁶⁰.

Los modelos derivados tanto de los datos de difracción de rayos X¹⁶¹ como de las simulaciones de dinámica molecular¹⁶² de diferentes abrazaderas unidas al DNA, proporcionan una fuerte evidencia de que el DNA se inclina significativamente lejos del eje de simetría del anillo a medida que pasa a través del orificio central de PCNA para contactar con estos residuos cargados positivamente en las hélices α .⁹⁷ El DNA forma un ángulo de 22° en el caso de la pinza β y de 40° en el caso de PCNA¹⁶³. Además, el análisis de imágenes de microscopía electrónica de partículas individuales de otros complejos que contienen PCNA también muestra que el DNA se inclina cuando pasa a través del orificio central del anillo de PCNA^{164,165}.

Estudios de molécula única han demostrado que PCNA puede difundir o moverse a lo largo del DNA bicatenario en dos modos distintos¹⁶⁶; el primer modo implica rotación y traslación, ya que rastrea el paso de giro helicoidal del dúplex de DNA, y el segundo implica una traslación más rápida que no supone el seguimiento del paso de giro helicoidal¹⁶⁶. A medida que PCNA difunde a lo largo del DNA, la mayoría de las veces el anillo gira siguiendo el paso helicoidal (la frecuencia de giro de la doble hélice se denomina paso helicoidal, frecuencia helicoidal o paso de giro). Esta rotación asegura que las polimerasas y otras proteínas unidas a PCNA se posicionen de manera adecuada con respecto a la hélice de DNA a medida que el complejo de proteínas se mueve a lo largo de ella. Sin embargo, una pequeña fracción de las veces, PCNA se transloca a lo largo del DNA sin seguir el paso de giro del DNA, movimiento que permite que PCNA se deslice más rápidamente. Esta flexibilidad angular, rotacional y traslacional de PCNA en el DNA le permite una gran libertad para acomodar las muchas y diversas proteínas con las que debe interactuar además de un posicionamiento óptimo respecto al DNA de las proteínas unidas a PCNA⁹⁷.

Como hemos dicho, muchas proteínas de unión a PCNA contienen un motivo de unión común llamado PIP-box^{143,150}. El descubrimiento de la naturaleza superpuesta de los sitios de unión de estas proteínas de unión a PCNA inmediatamente llevó a pensar que las diferentes compañeras se deben unir y disociar secuencialmente para llevar a cabo sus funciones^{143,150}. Efectivamente, PCNA juega un papel de coordinación para numerosas proteínas implicadas en muchos procesos que incluyen DNA. Como consecuencia de su interacción con PCNA, i) varias enzimas aumentan su eficiencia catalítica; ii) proteínas con baja especificidad de secuencia con el DNA utilizan PCNA como un adaptador para facilitar la interacción; iii) PCNA facilita la interacción entre complejos ciclina-CDK y sus sustratos. Parece entonces que la célula utiliza PCNA

para reclutar las proteínas requeridas al sitio concreto en el momento adecuado, pero, ¿cómo están coordinadas estas interacciones? En la Table 3 de Maga 2003¹¹⁵ se pueden ver las afinidades de distintas compañeras de PCNA, todas en el rango nanomolar; Pol δ , Pol ϵ , RFC y p21 muestran las interacciones más fuertes, mientras que FEN1 y Lig1 unen con afinidad algo más baja¹¹⁵, pero todas generalmente muy similares, lo que indica que algún nivel adicional de regulación debe existir.

Un posible mecanismo, apoyado por datos experimentales, es la regulación de los niveles de expresión y la localización celular de las diferentes proteínas que interactúan con PCNA. Un buen ejemplo de ello es la dinámica de p21 y PCNA durante el ciclo celular^{126,167}. Otro posible mecanismo de regulación podría estar en la estructura homotrimérica de PCNA la cual, en principio, puede permitirle unir diferentes proteínas simultáneamente. Hay algunas evidencias indirectas que sugieren esto; p21, por ejemplo, se une a PCNA con estequiometría 3:1 ocupando todos los sitios de unión posibles en el trímero, lo que puede prevenir otras interacciones⁶⁹. GADD45, sin embargo, se une a PCNA con estequiometría 2:1, dejando así un sitio de unión libre para que interactúen otras proteínas¹⁶⁸. También la regulación puede darse a través de tener diferentes modos de unión a PCNA. En ausencia de DNA, FEN1 y Apn2 interactúan con PCNA principalmente a través del IDCL; sin embargo, cuando PCNA rodea al DNA, el dominio C-ter de PCNA llega a ser más importante para la unión de estas dos proteínas^{169,170}. El cambio entre los sitios de unión alternativos podría ser otra manera en la que PCNA puede regular sus interacciones. Una subunidad de la PCNA heterotrimérica de la arquea hipertermófila *Sulfolobus solfataricus* interactúa con la polimerasa mientras que las otras dos subunidades interactúan con los homólogos de Lig1 y FEN1¹⁷¹. Modificaciones postraduccionales de PCNA y sus proteínas de unión, como la acetilación, la SUMOización o la fosforilación, pueden también regular positiva o negativamente la interacción.

PIP-box

La mayoría de las proteínas que interactúan con PCNA lo hacen dentro de un bolsillo hidrofóbico en la cara frontal de la pinza cerca del dominio IDCL^{69,156}, lo que les permite acceder al extremo del cebador del DNA que se replica. En la cara frontal del anillo de PCNA hay tres de estos bolsillos hidrofóbicos equivalentes en sendas subunidades de la pinza y las proteínas que interactúan aquí generalmente contienen uno o más motivos de interacción con PCNA conservados llamados motivos PIP, PIP-box o simplemente PIP (por *PCNA-interacting peptide*)^{115,143,150}.

PIP-box es una corta secuencia consenso de ocho aminoácidos con el patrón *QXXhXXaa*, donde *h* es un residuo hidrofóbico alifático, *a* hidrofóbico aromático, y *X* cualquier residuo¹⁴³, con una glutamina conservada en la posición 1, un residuo alifático conservado (leucina, isoleucina o metionina) en la posición 4 y dos residuos aromáticos conservados adyacentes (fenilalanina o tirosina) en las posiciones 7 y 8⁹⁷. Las cadenas laterales aromáticas conservadas del motivo PIP se unen dentro del bolsillo hidrofóbico de PCNA compuesto por isoleucina-128 en el dominio IDCL y prolina-234 y prolina-253 en el dominio 2 de cada monómero. La comparación de las estructuras cristalinas de rayos X de PCNA en presencia y ausencia de un motivo PIP unido muestra que el esqueleto de la isoleucina-128 se mueve $\approx 4 \text{ \AA}$ y su cadena lateral $\approx 5 \text{ \AA}$. Este cambio conformacional es necesario para acomodar el residuo aromático de la posición 8 del motivo PIP-box¹⁷².

Los análisis estructurales de alta resolución por cristalografía de rayos X indican similitudes en el modo de unión general de varias PIP-box^{69,155,173,174}. Los estudios iniciales que establecieron la importancia de la interacción PIP-box con PCNA establecieron que la carencia de tal motivo hacía disminuir de manera significativa la unión a PCNA^{102,175,176}. Y a pesar de las similitudes estructurales entre sus motivos PIP, los péptidos p21 y FEN1, por ejemplo, muestran una diferencia de casi 1000 veces en su afinidad de unión^{102,155,175,177}, así que otras características moleculares deben contribuir a la unión general entre PCNA y aquellas socias que contienen un motivo PIP¹⁷⁸.

El sitio de interacción PIP-box solo contiene 8 aminoácidos y, aunque estos residuos son necesarios para la unión, los residuos que flanquean este sitio de interacción pueden contribuir más a la afinidad general¹⁷⁸. Las estructuras cristalinas de rayos X del complejo PCNA-p21 indican que las interacciones se extienden más allá del motivo PIP-box consenso, lo que probablemente contribuye a una mayor afinidad. Curiosamente, el péptido PL, por ejemplo, tiene una afinidad cercana a la de p21 a pesar de las escasas similitudes -con el motivo PIP consenso¹⁷⁸.

Pedley y colaboradoras/es evaluaron el impacto que tiene la unión del ligando en PCNA¹⁷⁸. El objetivo de su estudio era dilucidar los detalles de las características moleculares y dinámicas que dictan la especificidad dentro del sitio de interacción de PCNA para PIP-box para comprender el impacto en la formación y estabilización del complejo proteico. Llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de diferentes péptidos PIP-box unidos a PCNA y cada uno de los ensamblajes estructurales resultantes presentaba diferencias significativas con la estructura cristalina de PCNA-PIP. Los resultados sugirieron además que la dinámica de PCNA optimizó las interacciones entre el ligando y conformaciones específicas de la pinza para facilitar la formación de complejos más favorable.

Aunque PIP-box no es estrictamente necesario para la unión de algunas proteínas a PCNA^{151,179}, la hipótesis general es que sirve como punto de anclaje y orienta los contactos para que la proteína interactúe de manera apropiada con otros sitios de unión de la superficie¹⁷⁸.

En las interfaces proteína-proteína, el sitio de interacción es un bolsillo hidrofóbico poco profundo donde las socias de unión utilizan interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno a lo largo del borde del bolsillo para anclarse^{180,181}. Sin embargo, el sitio de interacción para PIP-box en PCNA es distinto. Primero, el sitio de interacción es adyacente al IDCL, una región altamente flexible de la proteína, y las simulaciones de dinámica molecular de complejos PCNA-péptido sugieren que la unión de un ligando estabiliza la conformación de los residuos 119-128 dentro del IDCL y que la transición de desordenado a ordenado del bucle puede contribuir a la selectividad general de los complejos PCNA-proteína. Una doble mutación por alanina dentro del IDCL de PCNA de levadura resultó en una disminución de la afinidad por FEN1, p15 y las DNA polimerasas δ y η ¹⁸² lo que indica que los residuos de IDCL juegan un papel crucial en la conformación del bolsillo de interacción con PIP-box¹⁷⁸.

Los efectos conformacionales inducidos por las modificaciones postraduccionales también pueden alterar la conformación del sitio de interacción con PIP-box. Por ejemplo, SUMO-PCNA complejada con DNA permite específicamente la unión de la helicasa Srs2 para llevar a cabo su función en la replicación y reparación del DNA¹³³, y T2AA tiene afinidad por PCNA monoubiquitinada en comparación con PCNA no modificada¹⁸³.

Duffy y colaboradoras/es estudiaron la mutación de la serina 228 en isoleucina (S228I) en PCNA, residuo que se encuentra en un sitio enterrado próximo al bolsillo de unión del motivo

PIP y provoca un trastorno autosómico recesivo¹⁸⁴ en el que la replicación del DNA parece proceder normalmente, pero la reparación por escisión de nucleótido (NER) está interrumpida¹⁸⁴, y observaron un gran cambio conformacional que transforma drásticamente el bolsillo de unión para PIP-box. La mutación altera notablemente la energía de unión para algunas compañeras de PCNA, mientras que p21, por ejemplo, solo se ve levemente afectada, luego el bolsillo de unión puede ajustar su conformación para acomodar algunos ligandos, lo que indica que es dinámico y flexible¹⁸⁵.

Los factores que controlan la unión de PIP a PCNA son críticos para la fisiología celular ya que una amplia y diversa gama de estas proteínas deben unirse a PCNA con coordinación espacio-temporal. Un ejemplo elegante de este equilibrio molecular es la PCNA de levadura mutada para una mayor afinidad por PIP-box, que exhibe graves defectos en la replicación y reparación del DNA¹⁷⁴. Por lo tanto, el paisaje conformacional del sitio de interacción con PIP-box en PCNA puede desempeñar un papel importante en la selección de ligandos y la estabilidad del complejo¹⁷⁸, y parece que las interacciones de las diferentes PIP-box con PCNA han evolucionado para tener un intercambio dinámico preciso entre todas ellas formando una gran red de interacción muy compleja¹⁸⁵.

0.4.2. Funciones de PCNA en la replicación eucariótica del DNA

La cantidad de PCNA en las células es más de diez veces la de Pol δ o RFC, por eso desde el principio se pensó que PCNA debe poseer papeles adicionales al de factor accesorio de la DNA polimerasa.

La identificación de PCNA como factor de procesividad para las DNA polimerasas replicativas la colocó en el corazón del replisoma, pero otros trabajos revelaron papeles adicionales para esta proteína en la coordinación de la compleja red de interacciones en la horquilla de replicación¹¹⁵.

Replicación del DNA

La replicación es un proceso extraordinariamente complejo y dinámico, de múltiples etapas, que se inicia en los orígenes de replicación¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. Es fundamental que cada origen de replicación se dispare solo una vez por ciclo celular, y PCNA juega un papel importante en que así sea. Antes de que un origen de replicación se active, se forma el llamado complejo de prerreplicación en el origen. La proteína Cdt1 es uno de sus componentes y se degrada en la fase S de manera dependiente de PCNA^{114,190,191}. Cdt1 contiene un motivo PIP especializado llamado PIP degron¹⁹¹ que se une a PCNA con mayor afinidad que los motivos PIP-box canónicos y es responsable de hacer que la proteína sea un sustrato para la ubiquitina ligasa E3 CLR4Cdt2. Cuando Cdt1 se une a un anillo de PCNA que se ha cargado en el DNA, CLR4Cdt2 facilita la poliubiquitinación de Cdt1 que conduce a su degradación. Esto garantiza que Cdt1 no esté disponible para volver a activar los orígenes una vez que se hayan accionado⁹⁷.

El complejo Pol- α /primasa sintetiza el primer cebador corto de RNA de entre diez y veinte nucleótidos^{192,193} tanto en la cadena líder como en la cadena rezagada¹⁹⁴. La terminación de la síntesis de un fragmento de Okazaki, sin embargo, requiere la intervención de las holoenzimas Pol ϵ y Pol δ procesivas (es decir, pol δ/ϵ , RFC y PCNA) respectivamente, luego la iniciación de la replicación continua de la cadena líder y la síntesis discontinua de la cadena rezagada requiere el cambio desde Pol α a Pol ϵ o Pol δ . Precisamente PCNA ha mostrado jugar un papel central en la coordinación de este proceso¹¹⁵. El trímero de PCNA tiene que ser abierto y después cerrado

alrededor de la cadena de DNA naciente por la actividad enzimática del cargador de la abrazadera RFC^{141,195,196}. RFC se une a la unión plantilla-cebador sintetizada por Pol α y cataliza la carga de PCNA de manera dependiente de ATP. RFC se une a la cara frontal del anillo de PCNA y la carga con esta cara mirando hacia el extremo 3' de la hebra del cebador¹⁶⁹. Esto asegura que las polimerasas y otras enzimas que interactúan con PCNA tendrán acceso al cebador terminal. Este evento de carga de PCNA desencadena el desplazamiento de Pol α y el subsecuente reclutamiento de Pol δ -o Pol ϵ - para una síntesis procesiva^{197,198}. Una nueva unión de Pol α es prevenida por la presencia de PCNA unida al extremo 3'-OH del DNA, el cual funciona como una señal de reclutamiento específica para Pol δ -o pol ϵ - procesivas.

La síntesis del fragmento de Okazaki se termina cuando la holoenzima Pol δ llega al extremo 5' de la siguiente porción de RNA del fragmento previamente sintetizado. Finalmente, proteínas especializadas son reclutadas y retiran la parte de RNA, rellenan el hueco y ligan los dos fragmentos adyacentes. Las dos proteínas de unión a PCNA FEN1 y Lig1 están implicadas en este proceso¹⁹⁹⁻²⁰¹. La competición por la unión a PCNA entre Pol δ , FEN1 (reclutada por PCNA para crear un dúplex mellado²⁰²) y Lig1 (la DNA ligasa I, que cataliza el sellado de la mella²⁰²) coordina el orden de acción de estas enzimas^{197,203}.

Existe una división del trabajo entre las DNA polimerasas replicativas en la horquilla de replicación eucariota. Como ya vimos, la cadena líder se sintetiza de manera continua por Pol ϵ , y la cadena rezagada se sintetiza de manera discontinua por Pol δ ^{51,52} (por esto, en la cadena líder solo se necesita cargar un anillo de PCNA, lo que ocurre cuando se dispara el origen y se ensambla la horquilla de replicación, y en la cadena rezagada se debe cargar un anillo de PCNA para cada fragmento de Okazaki). Los estudios bioquímicos que utilizan sistemas purificados y reconstruidos del complejo han demostrado que PCNA interactúa y afecta la síntesis de DNA por Pol δ y Pol ϵ de manera diferente²⁰⁴. Pol δ se une a PCNA con alta afinidad, mientras que Pol ϵ se une a PCNA con baja afinidad. Pol δ sintetiza DNA con baja procesividad, incorporando solo hasta seis nucleótidos antes de disociarse de la plantilla de DNA, sin embargo, en presencia de PCNA, su procesividad aumenta casi 100 veces. Por el contrario, Pol ϵ tiene una mayor procesividad intrínseca, incorporando aproximadamente 60 nucleótidos antes de la disociación; la presencia de PCNA aumenta su procesividad en aproximadamente seis veces. En general, en el DNA monocatenario cebado, con PCNA cargada, y recubierto con proteínas RPA, Pol δ y Pol ϵ tienen prácticamente la misma procesividad, incorporando hasta 600 nucleótidos por evento de unión al DNA⁹⁷.

Las interacciones diferenciales entre estas polimerasas y PCNA son, en parte, responsables de seleccionar las polimerasas apropiadas para la síntesis de las cadenas líder y retrasada²⁰⁵. PCNA favorece fuertemente la extensión de la cadena de DNA por Pol δ sobre la extensión por Pol ϵ en experimentos de competición *in vitro* en DNA monocatenario recubierto con RPA, situación análoga a la síntesis de DNA en la cadena rezagada. Sin embargo, esta preferencia por Pol δ sobre Pol ϵ se invierte en presencia del complejo de la helicasa CMG²⁰⁵, situación análoga a la síntesis de DNA de la cadena principal. El complejo pol δ -CMG sintetiza DNA entre cinco y 10 veces más lento que el complejo pol ϵ -CMG. Además, el complejo CMG utiliza selectivamente Pol ϵ en experimentos de competición, y Pol ϵ reemplaza fácilmente a Pol δ de un complejo pol δ -CMG activo. Por lo tanto, PCNA, junto con el complejo CMG, mantiene la división del trabajo entre Pol δ y Pol ϵ en la horquilla de replicación⁹⁷.

Reparación del DNA

El daño en el DNA hace que las horquillas de replicación se detengan, porque las DNA polimerasas clásicas, como Pol δ y Pol ϵ , no pueden incorporar eficazmente desoxinucleótidos en plantillas de DNA dañadas. Sin un medio para superar estos bloqueos de la replicación, el colapso de las horquillas resulta en roturas de la cadena de DNA, reordenamientos cromosómicos y muerte celular.

Si las células son irradiadas con luz UV, ocurren reacciones de reparación del DNA en el núcleo con acumulación de PCNA, incluso en células que no están en fase S^{51,52,84,85,89,90,144,191}. Estudios de reacciones de reparación por escisión de nucleótido *in vitro* (abreviado como NER, de *nucleotide excision repair*)^{149,206-208}, de reparación por escisión de base (BER, *base excision repair*)²⁰⁹⁻²¹² y de reparación de apareamiento erróneo o de desapareamiento de bases -errores de la replicación- (MMR o conocida habitualmente por el término en inglés reparación del *mismatch*)^{103,213} han indicado roles indispensables de PCNA como parte de la maquinaria de reparación junto con RFC y Pol δ/ϵ . Además, un estudio genético en levaduras demostró que PCNA es necesaria para los procesos de reparación post-replicación²¹⁴.

En NER, PCNA debe ayudar a reclutar las proteínas esenciales XP-G¹⁴⁹ y XP-A^{126,207,215} en el sitio de la lesión. Después de hacerse la escisión, PCNA puede promover la transición a los pasos siguientes uniendo Pol δ (o Pol ϵ) para volver a sintetizar la cadena complementaria y el subsecuente reclutamiento de Lig1 para el paso final de ligación. PCNA interacciona con las proteínas de unión al *mismatch* MSH2, MSH3 y MSH6 y mejora su especificidad de unión²¹⁶⁻²¹⁸, así que PCNA también tiene un rol en reclutar y coordinar las proteínas de reparación en la vía MMR. PCNA tiene funciones similares en BER *in vitro*, donde el paso de síntesis del DNA es dependiente de Pol δ y/o Pol ϵ ^{200,211,212,219-221}.

El daño en el DNA hace que las horquillas de replicación se detengan, porque las DNA polimerasas clásicas (las replicativas), como Pol δ y Pol ϵ , no pueden incorporar eficazmente desoxinucleótidos en plantillas de DNA dañadas. Sin un medio para superar estos bloqueos de la replicación, el colapso de las horquillas resulta en roturas de la cadena de DNA, reordenamientos cromosómicos y muerte celular.

Dependiendo del tipo de daño que se haya producido en el DNA, el contexto cromosomal y el momento particular del ciclo celular, PCNA puede ayudar a crear una ventana óptima para la acción de una vía concreta de reparación particular, permitiendo el acceso al DNA lesionado solo al conjunto de proteínas específico¹¹⁵. Además, la estrecha asociación de p21 con PCNA en el núcleo después del daño al DNA¹²⁶ sugiere que p21, junto a PCNA, puede enlazar la replicación del DNA, su reparación y la progresión del ciclo celular¹¹⁵.

Una vía alternativa para la tolerancia al daño en el DNA en células eucarióticas es la síntesis translesión (TLS de manera abreviada por sus siglas en inglés -*translesion synthesis*-), la cual se basa en polimerasas especializadas (como la DNA polimerasa zeta (Pol ζ), la DNA polimerasa eta (Pol η), la DNA polimerasa iota (Pol ι), la DNA polimerasa kappa (Pol κ) y Rev1²²²⁻²²⁵), capaces de continuar la síntesis de DNA en un molde dañado^{226,227}. Esta vía juega un papel fundamental en la fase S, donde, si hay un daño en el DNA, las horquillas de replicación se atascan en esos sitios dañados debido a la incapacidad de las polimerasas replicativas para replicar el DNA dañado. Ya que TLS requiere la interacción entre estas polimerasas TLS especializadas y la Pol δ y Pol ϵ replicativas, PCNA se presenta para reclutarlas en la horquilla de replicación y coordinar sus funciones.

Cuando se daña el DNA, el complejo de ubiquitinación se une a la lisina-164 en una o más subunidades de PCNA¹²⁹. PCNA modificada con ubiquitina (Ub-PCNA) juega un papel regulador importante en la síntesis translesión, actuando como una proteína central para reclutar las polimerasas no clásicas a las horquillas de replicación estancadas. Muchas de estas polimerasas no clásicas, incluidas Pol η , Pol κ y Pol ι , poseen motivos de unión a ubiquitinas en tándem y motivos PIP¹³¹. Todos estos motivos son importantes para permitir que las polimerasas no clásicas interactúen preferentemente con Ub-PCNA sobre PCNA no modificada y se ubiquen en las células conjuntamente con Ub-PCNA^{131,228-232}.

Los estudios estructurales y computacionales han demostrado que el resto ubiquitina de Ub-PCNA es dinámico, aunque ocupa predominantemente orientaciones en la parte posterior y lateral del anillo de PCNA^{159,233,234}. Esto permitiría a Ub-PCNA regular el acceso de las polimerasas no clásicas al terminal del cebador alterando la orientación de su ubiquitina unida. Por ejemplo, las polimerasas no clásicas pueden mantenerse en reserva sin afectar la actividad de las enzimas unidas en la cara frontal del anillo de PCNA cuando el resto de ubiquitina está en la parte posterior del anillo de PCNA, y pueden acceder al cebador cuando la ubiquitina se mueve hacia el lateral del anillo de PCNA y las acerca a la cara frontal⁹⁷.

Además de reclutar polimerasas no clásicas para las horquillas de replicación estancadas, PCNA y Ub-PCNA regulan su actividad catalítica. Las eficiencias catalíticas de Pol η , Pol κ y Pol ι se incrementan en presencia de PCNA¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. En el caso de Pol η y Rev1, la eficiencia catalítica de la incorporación de nucleótidos aumenta más en presencia de Ub-PCNA que en presencia de PCNA no modificada^{159,235,236}.

Además de la síntesis translesión, que es mutagénica (pues la lesión se salta, no se repara), otra vía para eludir las lesiones del DNA en la cadena molde durante la replicación del DNA es el *baipás* de daños sin errores. Aún se está definiendo el mecanismo detallado, pero parece que involucra un evento de cambio de plantilla por el cual las DNA polimerasas replicativas se mueven a la cadena hermana recién sintetizada y la usan como nuevo molde^{237,238} para desviarse del daño y reanudar la replicación normal en la horquilla.

Como en el caso de la síntesis translesión, el evento iniciador en el *baipás* del daño libre de error es la unión de una ubiquitina a la lisina-164 en una o más de las subunidades de PCNA para formar Ub-PCNA¹²⁹, estando así lista la pinza para reclutar el complejo necesario para formar cadenas de poli-ubiquitina unidas a lisina-63 en PCNA¹²⁹.

La cadena de poliubiquitina unida a lisina-63 de PCNA es necesaria para evitar el daño, pero se desconoce cómo facilita el proceso de cambio de plantilla. Lo cierto es que la presencia de estas cadenas de poliubiquitina en PCNA disminuye la formación de complejos entre Pol δ y PCNA, lo que impide que se produzca una replicación normal del DNA²³⁹. También disminuye la capacidad de Pol η para evitar las lesiones en el DNA, lo que impide la síntesis translesión. Este efecto no se debe a la disminución de la unión de Pol η a PCNA, sino a que PCNA queda atrapada en un complejo no productivo por las cadenas de poliubiquitina. Por tanto, el *baipás* del daño en el DNA sin errores puede verse facilitada por la poliubiquitinación de PCNA que inhibe las vías alternativas⁹⁷.

Mantenimiento de las estructuras cromosómicas.

PCNA muestra poco recambio en los sitios de replicación, lo que sugiere que permanece asociada a la maquinaria de replicación durante múltiples rondas de procesado del fragmento de Okazaki²⁴⁰.

Algunas proteínas de unión a PCNA, como el factor 1 de ensamblado de la cromatina CAF-1^{113,241,242} o el coactivador transcripcional p300²⁴³, tienen funciones de mantenimiento de la estructura de los cromosomas. Las secuencias CpG metiladas del genoma de mamíferos son hereditarias y afectan a la expresión de los genes, y la enzima responsable de la metilación del DNA y, por ende, de la herencia del estado de metilación, es MeCTR. Resulta que PCNA puede unirse también a MeCTR, lo que favorece la idea de que el mantenimiento del patrón de metilación en el genoma es también dependiente de PCNA^{167,244}.

Para una separación coordinada de los cromosomas replicados en las células hijas durante la mitosis, es necesaria la intervención de factores de cohesión. Uno de ellos, Ctf7p, encargado de la fidelidad de la transmisión de los cromosomas, une la estructura cromosomal mitótica a la maquinaria de replicación del DNA y, para ello, interacciona con PCNA¹¹².

Apoptosis

ING1 es otra proteína que puede unirse a PCNA para inhibir el crecimiento celular y/o la apoptosis. Es un potencial supresor de tumores y la isoforma p33^{ING1} contiene un motivo PIP que físicamente interacciona con PCNA²⁴⁵. Las células que expresan ING1 mutante no pueden unirse a PCNA y están protegidas de la apoptosis inducida por UV¹¹⁵.

0.4.3. Cuestiones no resueltas

PCNA interactúa con una gran variedad de proteínas, pero ¿cómo discrimina entre las diferentes socias? ¿Cómo regula PCNA cuándo una proteína debe ser reclutada para la horquilla de replicación o liberada de ella? El descubrimiento de la naturaleza superpuesta de los sitios de unión de las proteínas de unión a PCNA inmediatamente sugirió que las diferentes socias se deben unir y disociar secuencialmente para llevar a cabo sus funciones^{143,150}. Debido a que la mayoría de las PIP-box hacen contactos muy similares con PCNA, es poco probable que estos motivos PIP contribuyan mucho a esta especificidad. Excepciones a esta idea incluyen las DNA polimerasas de reparación y p21. Los motivos PIP de estas polimerasas se unen a PCNA con menor afinidad que los de las DNA polimerasas replicativas¹⁵⁶, y esto podría ser importante para evitar que las polimerasas de reparación se unan a PCNA antes de que esté monoubiquitinada. Por el contrario, el motivo PIP de p21 se une con mayor afinidad que los de las polimerasas replicativas¹⁵⁵, y esto podría ser importante para detener la replicación del DNA cuando hay un daño.

En la mayoría de los casos, la especificidad de PCNA por sus socias probablemente proviene, como ya hemos mencionado, de contactos fuera de PIP-box. Los contactos secundarios entre PCNA y proteínas de unión a PCNA que involucran regiones que flanquean el motivo PIP o en cualquier otro lugar de la proteína de unión a PCNA, probablemente juegan un papel importante en la especificidad. También PCNA puede tener diferentes modos de unión¹¹⁵. Por ejemplo, en ausencia de DNA, FEN1 y Apn2 interaccionan con PCNA principalmente a través del IDCL; sin embargo, cuando PCNA rodea al DNA, el dominio C-ter llega a ser más importante para la unión de las dos^{170,246}. El cambio entre los sitios de unión alternativos podría ser otra manera

en la que PCNA puede regular sus interacciones^{115,171}. Esto enfatiza la necesidad de la obtención de estructuras de PCNA unida a sus proteínas de unión de longitud completa y no solo con los péptidos PIP.

Además, el contacto con el DNA también puede desempeñar un papel importante en la especificidad, así como las modificaciones postraduccionales de PCNA y sus proteínas de unión como la monoubiquitinación, SUMOilación, acetilación o fosforilación, que regulan positiva o negativamente las interacciones de PCNA¹¹⁵. Asimismo, se han observado modificaciones postraduccionales de proteínas de unión a PCNA, tales como la fosforilación de p21 o FEN1, por ejemplo, que inhiben la unión a PCNA^{247,248}.

En la Tabla 3 de Maga & Hubscher 2003¹¹⁵ vimos las afinidades de diferentes socias por PCNA. Todas están en el rango nanomolar, incluso con algunas diferencias. Pol δ , Pol ϵ , RFC y p21 muestran las interacciones más fuertes, mientras que FEN1 y Lig1 unen con afinidad algo más baja, lo cual es consistente con estudios bioquímicos. Sin embargo, las generalmente afinidades similares para PCNA de sus socias indica que algún nivel adicional de regulación debe existir. Un posible mecanismo en la regulación del balance entre proteínas de interacción a PCNA, apoyado por datos experimentales, es la regulación de los niveles de expresión y la localización celular de las diferentes proteínas que interacción con PCNA¹¹⁵. Un buen ejemplo de ello es la dinámica de p21 y PCNA durante el ciclo celular^{126,167}. Otro posible mecanismo de regulación podría estar en la estructura homotrimérica de PCNA la cual, en principio, puede permitirle unir diferentes compañeras simultáneamente. Por ejemplo, p21 se une a PCNA con estequiometría 3:1, lo cual es consistente con la idea de que previene otras interacciones ocupando todos los sitios de unión posibles en el trímero⁶⁹, pero GADD45 se une a PCNA con estequiometría 2:1, dejando así un sitio de unión libre para que interaccionen otras proteínas¹⁶⁸. Por ejemplo, la unión simultánea de DNA polimerasa, FEN1 y DNA ligasa I a un único trímero de PCNA se ha observado en *S. solfataricus*¹⁷¹.

PCNA juega un papel de coordinación para numerosas proteínas implicadas en muchos procesos que incluyen DNA, y, como consecuencia de su interacción con PCNA, varias enzimas muestran un aumento de la eficiencia catalítica. Quizás, proteínas que tienen una baja especificidad de secuencia con el DNA usen PCNA como un adaptador para facilitar su interacción con su sustrato¹¹⁵ [Maga & Hubscher 03], pero también parece ser una de las maneras en que la célula recluta proteínas particulares al sitio específico en el momento concreto. Pero ¿cómo están coordinadas estas interacciones? Sin duda, necesitamos una visión mecanística del proceso.

Más allá de su importancia como factor de replicación y de su requerimiento en importantes procesos celulares, la pregunta más interesante e importante sobre la acción de PCNA es ¿cómo cambia sus compañeras de manera ordenada para organizar todos los procesos? ¿cuál es el mecanismo que permite regular espacial y temporalmente la habilidad de PCNA para bailar, usando la expresión de Giovanni Maga¹¹⁵, con la compañera adecuada en el momento conveniente?

0.5. Bibliografía adicional para este capítulo

- Fundamentos de Bioquímica; Voet, Voet, Pratt, Editorial Médica Panamericana, 2ª edición
- Lehninger. Principios de Bioquímica; David L. Nelson, Michael M. Cox, Editorial Omega, 4ª edición
- Bioquímica; Mathews, Van Holde, Ahern, Editorial Addison Wesley, 3ª edición
- A. Kornberg, T.A. Baker, DNA Replication, second ed., W.H. Freeman, New York, 1992.

1. Difusión de PCNA en el DNA

PCNA juega un papel esencial en el metabolismo del ácido nucleico como componente de la maquinaria de replicación y reparación. Una de las funciones bien establecidas de PCNA es su papel como factor de procesividad para las DNA polimerasas delta (Pol δ) y epsilon (Pol ϵ).

Las abrazaderas deslizantes, de forma toroidal, rodean el DNA y atan las polimerasas y otros factores a la plantilla genómica para una síntesis rápida y procesiva. Sabíamos que pueden deslizarse bidireccionalmente a lo largo del dúplex, pero el mecanismo molecular del deslizamiento de estas pinzas sobre el DNA era desconocido hasta que, mediante cristalografía, RMN y simulaciones de dinámica molecular, mostramos que la PCNA humana reconoce el DNA a través de una zona de residuos básicos dentro del canal del anillo dispuestos en una espiral a derechas que coincide con el giro helicoidal del DNA en forma B. A la vista de nuestros resultados, la propuesta es que PCNA se desliza rastreando la columna vertebral del DNA mediante un mecanismo de «rueda dentada» basado en interacciones polares de corta duración que mantienen la orientación de la pinza invariante en relación con la doble hélice. La mutación de residuos en esta interfaz de interacción PCNA-DNA hace desfavorable el inicio de la síntesis de DNA por Pol δ , por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que es necesaria una pinza orientada correctamente en el DNA para el ensamblaje de una holoenzima PCNA-Pol δ competente en replicación.

1.1. Conocimiento previo sobre el desplazamiento de PCNA en el DNA

La estructura anular y su interacción relativamente débil con el DNA permite a PCNA y a las otras pinzas o abrazaderas deslizantes formar un círculo cerrado alrededor de la doble cadena de nucleótidos y ser capaces de moverse y difundir a lo largo de esta, pero se conoce muy poco sobre la naturaleza molecular de este proceso de difusión a pesar de ser su movimiento algo fundamental en su función.

Varias proteínas de unión a secuencias específicas del DNA tienen un grupo de α -hélices que se ajusta en los surcos de la doble hélice para formar contactos estrechos entre las bases nucleotídicas y los residuos aminoácidos. Cuando aún no se conocía la interacción entre PCNA y el DNA por la falta de una estructura cristalina del complejo debido a la dificultad para obtener cristales, ya se pensaba que las direcciones de los ejes de las α -hélices de la pinza relativas a los surcos del DNA, que difieren de la dirección de las α -hélices de proteínas de unión a secuencias específicas del DNA, denotaban una unión no específica. Las α -hélices de PCNA están posicionadas aproximadamente perpendicularmente al esqueleto de fosfatos del DNA y no forman contactos estrechos con el DNA⁹⁸, modo que se intuía necesario para permitir a PCNA deslizarse libremente en el DNA, de manera que los residuos básicos en las hélices parecen formar fuerzas de atracción con el DNA negativo y centrado en el anillo¹⁴⁶.

La eliminación por mutación de un único residuo de las α -hélices del interior del anillo cargado positivamente resulta en severos efectos en la síntesis de DNA por la Pol δ ²⁴⁹ sugiriendo la importancia de una distribución apropiada de los residuos cargados positivamente en la superficie interna¹⁴⁶.

1.1.1. Movimiento de las pinzas deslizantes en el DNA

Modos de traslocación de proteínas en el DNA

Distintos estudios teóricos y experimentales con pinzas deslizantes y con otras proteínas diferentes que se mueven a lo largo del DNA²⁵⁰⁻²⁶¹ han permitido una caracterización biofísica detallada del movimiento de difusión proteico a lo largo de la doble hélice, revelando varios mecanismos diferentes de traslocación proteica^{166,262}.

Estos mecanismos, que no son mutuamente excluyentes, comprenden: (i) salto unidimensional, donde la proteína se mueve a lo largo de la misma molécula de DNA a través de una serie de eventos microscópicos de disociación seguida de unión; (ii) salto bidimensional, o «a saltos», donde una proteína se mueve a distancias más largas (o incluso entre diferentes moléculas de DNA) por disociación y posterior unión en una ubicación distal; (iii) difusión o deslizamiento unidimensional, que implica una caminata aleatoria a lo largo del DNA sin disociación; y (iv) transferencia intersegmental, que implica el movimiento de un sitio a otro a través de un intermedio en forma de bucle (Figura 4).

El mecanismo de deslizamiento unidimensional o difusión se puede, a su vez, subdividir en movimiento helicoidal y movimiento no helicoidal de moléculas de proteína a lo largo del DNA en función de si la proteína rastrea la espiral de DNA o no.

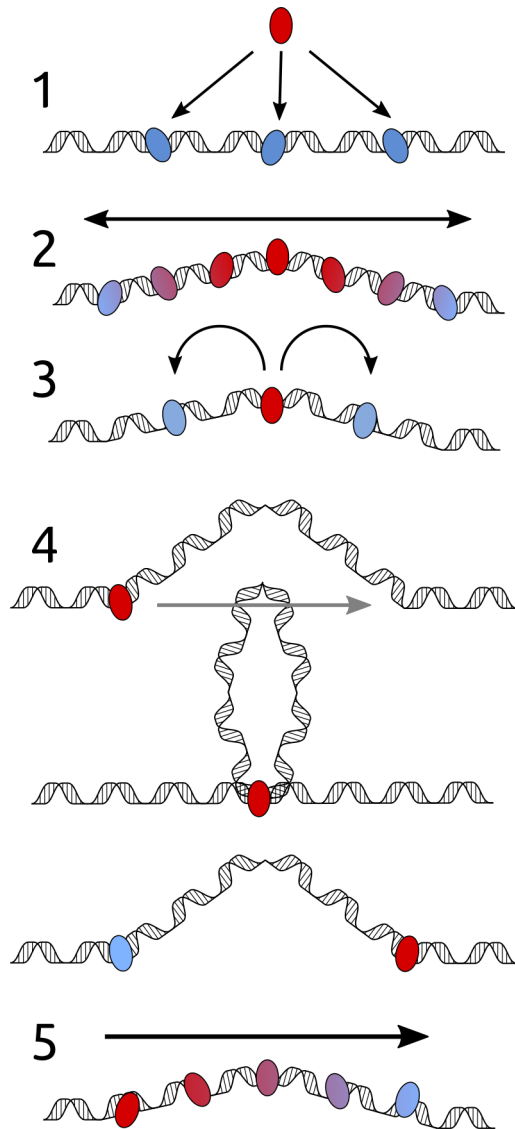


Figura 4: Las proteínas pueden alcanzar su objetivo en el DNA de diferentes maneras: 1) por colisión aleatoria, 2) por deslizamiento o difusión, 3) a saltos, ya sean monodimensionales o bidimensionales, 4) por transferencia intersegmental, o 5) por movimiento activo si necesitan, por ejemplo, energía derivada de la hidrólisis de ATP (figura adaptada de Gorman et. al. 2008²⁶²).

Michael Schurr señaló que la difusión de una proteína a lo largo del DNA sería sustancialmente más lenta si la proteína tuviera que girar alrededor de la hélice para rastrear la columna vertebral de fosfatos, en oposición al movimiento mucho más rápido esperado si el movimiento longitudinal no se acoplara a la rotación²⁶³. De hecho, para una proteína de tamaño medio, hay una diferencia de unas 1000 veces en el coeficiente de difusión predicho, dependiendo de si la proteína gira o no alrededor de la hélice para mantener el contacto con el esqueleto de fosfatos^{257,258,264}.

Muchas proteínas establecen contactos inespecíficos con el DNA a través de interacciones electrostáticas con el esqueleto de fosfato. Debido a que un surco del DNA, cualquiera de los

dos, es helicoidal, este movimiento longitudinal de una molécula de proteína de una posición a la siguiente debe ir acompañado, entonces, de un movimiento de rotación en relación al DNA para mantener un rastreo correcto. Por lo tanto, si arrastramos moléculas de DNA sobre una superficie donde tenemos moléculas de proteínas fijas, cualquier seguimiento del surco del DNA debería hacerlo rotar, y así es precisamente como Sakata-Sogawa y Shimamoto dieron un paso importante hacia la validación del modelo de Schurr cuando demostraron que la holoenzima RNA polimerasa de *E. coli* sigue el surco del DNA durante su movimiento traslacional o difusión monodimensional²⁶⁵. Varios son los estudios que dan coeficientes de difusión consistentes con esta difusión rotatoria y las predicciones del modelo de rotación de Schurr^{254,255,257,258,260}.

En cuanto a la difusión respecto al mecanismo «a saltos», mantener un contacto continuo con el DNA durante el deslizamiento podría, además, ser ventajoso, ya que evitaría que una proteína pierda potencialmente su sitio diana al saltar²⁶⁶, es decir, el seguimiento del esqueleto de fosfatos de un surco de la doble hélice sin disociación podría facilitar a la proteína la búsqueda del sitio donde tiene que llevar a cabo su función.

Los coeficientes de difusión unidimensionales para mecanismos deslizantes puros son independientes de la concentración de sal del medio; sin embargo, se espera que los coeficientes de difusión observados aumenten en función de la concentración salina si el modo de viaje involucra un componente de salto, pues las concentraciones de sal más altas promoverán una disociación más rápida del DNA²⁵⁷ al apantallar más eficazmente las interacciones inespecíficas entre el DNA y la proteína. Por lo tanto, el análisis de los coeficientes de difusión a diferentes concentraciones salinas se puede utilizar para distinguir el deslizamiento monodimensional del salto.

Difusión de pinzas deslizantes en el DNA

Desde la primera determinación de la estructura de una pinza deslizante del DNA, la pinza b bacteriana¹¹, la característica estructural conservada en todas las abrazaderas deslizantes de un gran canal central de diámetro significativamente más grande que el de la doble hélice de DNA de forma B ($\approx 35 \text{ \AA}$ vs $\approx 24 \text{ \AA}$) ha planteado cuestiones sobre la interacción de la abrazadera con el DNA y el mecanismo de deslizamiento. ¿Se une la pinza directamente al DNA? ¿o más bien prefiere levitar sin contacto directo con el DNA? ¿cómo se traslada a lo largo de la doble hélice de DNA?

La determinación de la estructura cristalográfica de la pinza b bacteriana unida a un sustrato de DNA cebado de 10pb (PDB ID: 3BEP)¹⁶³ iluminó aspectos clave de este problema.

La estructura en cuestión muestra la porción de DNA de doble cadena dentro del canal de la abrazadera con un ángulo de inclinación de $\approx 22^\circ$, creando contactos con residuos en el canal y con los bucles salientes en la cara trasera de la pinza. Pero también se establecen interacciones extensas entre la porción monocatenaria del DNA y el bolsillo de unión a proteínas PIP-box de otra molécula de pinza b cristalográficamente relacionada. Las/os autoras/es demostraron bioquímicamente que esta interacción intermolecular pinza b/ssDNA en el cristal es, en realidad, intramolecular en solución¹⁶³.

Este modelo del complejo pinza b-DNA en solución, propuesto por Georgescu y colaboradoras/es, es consistente con una pinza atrapada en la unión cebador-plantilla de DNA; no obstante, este arquetipo puede corresponder, por el resultado de la interacción entre el frag-

mento monocatenario del DNA y PIP-box, a una instantánea de la reacción de carga de la pinza más que al estado de delizado libre de la pinza en el dúplex de DNA.

Esta interacción b-ssDNA también fue observada por experimentos de molécula única²⁶⁷ y podría funcionar como un marcador de posición que mantiene la pinza b cerca del extremo 3' del DNA cebado antes de la unión de la polimerasa y la iniciación de la replicación del DNA¹⁶³. Curiosamente, un trabajo de criomicroscopía electrónica de Lamers y colaboradoras/es del núcleo catalítico del replisoma bacteriano (es decir, la pinza b unida a DNA, a la polimerasa PolIII, a la exonucleasa e, y el dominio de unión a polimerasa del cargador de la abrazadera)^{268,269} en los modos de polimerización y edición (o correctora de errores), muestra que los contactos entre la pinza y el DNA son distintos en las dos condiciones, y además diferentes de los observados en la estructura cristalográfica de la pinza b libre unida al DNA cebado de Georgescu.

A pesar de la conservación estructural, la ausencia de patrones de similitud de secuencia en las pinzas bacteriana y eucariótica no permite una simple correlación entre los sitios de unión a DNA en los dos sistemas. Por otro lado, los residuos cargados positivamente en el canal de la pinza están conservados en eucariotas, y un subconjunto de estos residuos actúa en la síntesis de DNA por Pol δ y en la carga de la pinza por el factor RFC^{161,249,270} (Figura 5); estas observaciones apuntan a la existencia de interacciones directas entre PCNA y el esqueleto fosfodiéster del DNA que son fundamentales para su función y que no han sido vistas en la pinza procarionta.

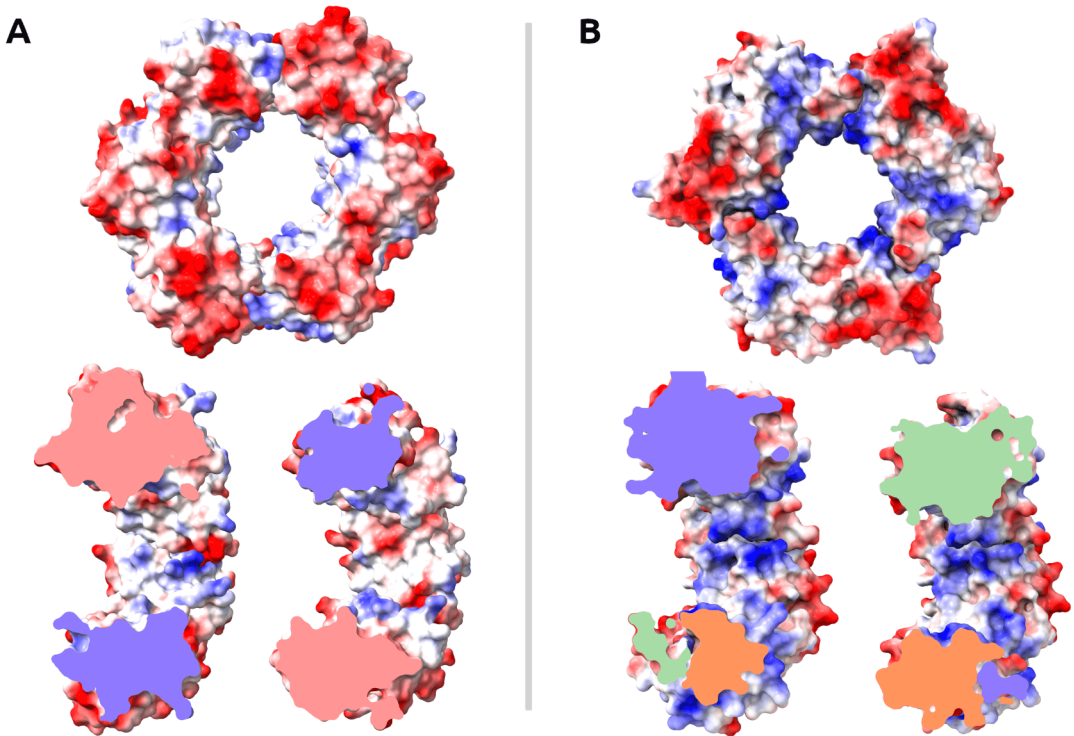


Figura 5: Distribución de cargas en la cara frontal y en la cara interna del anillo de la pinza β (A) y hPCNA (B).

Un primer trabajo sobre PCNA en la década de los 90 mostró que solo puede estar atrapada de manera estable en el DNA lineal cuando también se une la polimerasa δ en la unión cebador-plantilla²⁷¹. En posteriores estudios de medidas de entrecruzamiento UV de PCNA moviéndose en DNA de doble cadena se observó un alto grado de entrecruzamiento cuando el DNA era circular pero una reducción drástica con la linealización, lo que sugiere una rápida disociación de PCNA cuando llega al final del DNA¹³⁵.

En un modelo derivado de la estructura cristalográfica de PCNA de levadura unida a un cebador de DNA de 10pb, el DNA en el canal de la pinza sobresale desde la cara trasera con un ángulo de inclinación de $\approx 40^\circ$, se mantiene en su lugar por un contacto cristalino¹⁶¹, y chocaría con PCNA si se alargara hasta la cara frontal. La interfaz PCNA-DNA solo muestra alguna complementariedad de carga y los residuos proteicos involucrados no se solapan perfectamente con aquellos encontrados que tienen un efecto en la carga de la pinza por RFC o en la función de Pol δ ^{249,270}, haciendo difícil atribuir este modelo a un estado funcional del complejo PCNA-DNA.

1.1.2. Movimiento de PCNA en el DNA

En el trabajo de Anna B. Kochaniak y colaboradoras/es¹⁶⁶ se emplearon experimentos de molécula única para mostrar que PCNA se mueve a lo largo del DNA usando dos modos distintos de difusión. En uno de ellos, la pinza sigue el paso helicoidal del dúplex de DNA dando como resultado un movimiento rotacional de la proteína alrededor del DNA. En el segundo modo, la proteína experimenta un movimiento más rápido predominantemente traslacional y sin giro. Sus trayectorias muestran, además, que PCNA se mueve a lo largo del DNA en los dos sentidos, sin sesgo direccional, lo que sugiere un avance aleatorio a lo largo del dúplex¹⁶⁶. Asimismo, obtienen una dependencia lineal entre la distancia recorrida y el tiempo, con el coeficiente de difusión como constante de proporcionalidad, lo que confirma la naturaleza difusiva del movimiento de la proteína¹⁶⁶.

Naturaleza electrostática de la difusión de PCNA en el DNA

El movimiento traslacional de una proteína como PCNA a lo largo del DNA podría ser explicado, fundamentalmente, por dos mecanismos diferentes: i) de deslizamiento monodimensional, o ii) «a saltos»²⁵⁰. Una proteína deslizante mantiene contacto electrostático continuo con el dúplex de DNA mientras difunde; por otro lado, una proteína saltadora se cambia de sitio brincando transitoriamente del DNA, difundiéndose en disolución, y después volviéndose a unir al dúplex, interrumpiendo, por tanto, el contacto electrostático con el DNA. Eso sí, la forma cerrada del anillo de PCNA alrededor del DNA cuando lleva a cabo su función determina que la completa discociación tendría que pasar, entonces, por la apertura del anillo.

La diferencia entre el diámetro interno del anillo de PCNA (3,5 nm) y el diámetro del dúplex de DNA (2,4 nm) permitiría que las cargas en las superficies de la proteína y del DNA pudieran ser apantalladas por contraiones de la disolución para posibilitar una interrupción efectiva de las interacciones electrostáticas, tal y como se hace necesario en el modelo «a saltos». Según dicho modelo, una elevada concentración salina disminuirá la afinidad de unión y aumentará la fracción de tiempo que la proteína no está electrostáticamente interactuando con el DNA; como resultado de ello, la proteína será capaz de difundir durante tiempos más largos antes de volverse a unir al DNA, llevando a un incremento efectivo de la constante de difusión medida.

En el modelo de deslizamiento, sin embargo, las interacciones electrostáticas se mantienen y la constante de difusión es, entonces, independiente de la fuerza iónica del medio.

Anna B. Kochaniak y colaboradoras/es determinaron el coeficiente de difusión de PCNA a lo largo del DNA a diferentes concentraciones salinas y resultó aumentar solo 2.2 veces al aumentar 13 veces la fuerza iónica¹⁶⁶, luego solo una pequeña fracción de las interacciones carga-carga es interrumpida en el amplio rango de fuerza iónica que estudiaron, de forma que PCNA mantiene los contactos electrostáticos con el DNA cuando se mueve a lo largo del mismo¹⁶⁶. Por tanto, podemos decir que el movimiento de PCNA en el DNA sigue un mecanismo de deslizamiento monodimensional, también llamado deslizamiento difusivo o simplemente difusión, y no «a saltos»¹⁶⁶.

Detalles mecanicistas de la difusión de PCNA

Con la evidencia del trabajo de Kochaniak de que PCNA se desliza a lo largo del DNA mientras mantiene contacto electrostático con el dúplex, ahora falta conocer los detalles del mecanismo de este movimiento.

Para describir el deslizamiento de PCNA se pueden imaginar dos escenarios: 1) la proteína sigue el paso de giro helicoidal del DNA, como una tuerca en un tornillo, resultando en una rotación completa alrededor del dúplex cada 10.5 pb²⁷², o 2) la proteína se mueve a lo largo del DNA desacoplada del paso de giro, como una arandela en un tornillo. Estos son los dos modos distintos de difusión ya mencionados, el rotacional (o helicoidal, dijimos) y el traslacional (o no helicoidal), al hablar del modelo de rotación de Schurr²⁶³. Para cada uno de estos dos escenarios, el coeficiente de difusión máximo se describe por la ecuación de Einstein para el movimiento Browniano²⁷³, y de nuevo Anna B. Kochaniak y colaboradoras/es se encargaron de encontrar evidencia experimental de uno u otro. Su valor experimental del coeficiente de difusión está muy próximo al predicho para un modelo de deslizamiento helicoidal, proponiendo que PCNA rota alrededor del DNA cuando se desplaza¹⁶⁶.

Pero aún faltaba confirmar si PCNA sigue o no la hélice cuando se mueve a lo largo del DNA. Para ello, Anna B. Kochaniak y colaboradoras/es llevaron a cabo estudios en medios de diferente viscosidad de manera que se vieran afectadas de manera desigual las componentes rotacional y traslacional de la difusión de PCNA. La diferente sensibilidad del coeficiente de difusión con el peso molecular del viscosígeno, además de una dependencia no lineal de este coeficiente con la viscosidad, confirma la conclusión de que la pinza rastrea o sigue el paso helicoidal del DNA mientras se mueve¹⁶⁶. Sin embargo, sus experimentos con otra técnica, la de fluorescencia de Qdot, con distintos complejos de PCNA, funcionalizando PCNA para aumentar sus dimensiones y ver cómo afecta a su movilidad, daban coeficientes de difusión dependientes del tamaño de PCNA, resultados consistentes con una forma no helicoidal de difusión, es decir, PCNA se mueve sin seguir la hélice y en aparente contradicción con los resultados aludidos antes¹⁶⁶.

Unificando ideas contradictorias

Todas estas observaciones experimentales contradictorias pueden ser explicadas si pensamos en un modelo en el que la proteína usa ambos modos.

Para describir cuantitativamente este modelo bimodal y justificar los resultados, Kochaniak y colaboradoras/es simularon dos tipos de paseos al azar, uno en el que PCNA hace un paseo regular en el DNA cambiando de manera uniforme entre los dos modos de difusión, helicoidal y la difusión no helicoidal, y otro en el que PCNA hace un paseo aleatorio cambiando de manera eventual entre los dos modos. La comparación cuantitativa de los datos experimentales que ob-

tuvieron con los valores teóricos esperados para la difusión helicoidal y no helicoidal y las simulaciones sugirió que PCNA pasa el 97-99% de su tiempo deslizando helicoidalmente a lo largo del DNA, y durante el restante 1-3% del tiempo utiliza el modo de deslizamiento, mucho más rápido, de naturaleza no helicoidal¹⁶⁶.

Por tanto, un escenario con PCNA exclusivamente utilizando un modo helicoidal o un modo no helicoidal de difusión fue inconsistente con sus observaciones experimentales, y el modelo en el que PCNA emplea los dos modos de difusión sí fue consistente, por ello Kochaniak y colaboradoras/es propusieron un modelo de difusión de PCNA en el DNA en el cual PCNA alterna entre dos modos de difusión, un modo corresponde al deslizamiento helicoidal, empleado la mayor parte del tiempo, en el que PCNA sufre una rotación completa cada 10.5 pb, y un segundo modo que corresponde a un estado que permite un seguimiento no helicoidal a lo largo del DNA, mucho más rápido que el arrastre rotacional, pero empleado con menos frecuencia¹⁶⁶.

La existencia de dos modos de traslación puede ayudar a PCNA a llevar a cabo sus múltiples funciones biológicas. El modo de deslizamiento helicoidal podría usarlo cuando está sujetando una polimerasa a la unión cebador-plantilla de DNA. Como la polimerasa necesita mantener una posición fija relativa al esqueleto fosfodiéster cerca del extremo 3' del cebador, y el deslizamiento helicoidal proporciona precisamente una orientación fija de PCNA respecto al paso helicoidal, tal y como demuestran nuestros resultados y veremos más adelante, este modo (de deslizamiento helicoidal) puede contribuir a mejorar la estabilidad general de la holoenzima. Además, el seguimiento de la hélice permitirá a Pol δ anclada a PCNA tener siempre accesible el último residuo de la hebra en crecimiento del DNA cebado, sobre el que se tiene que dar la reacción de polimerización, en la posición y orientación adecuadas en el centro catalítico de la polimerasa. Por otro lado, PCNA podría usar la difusión no helicoidal de manera intermitente para acelerar la difusión hasta llegar al siguiente molde-cebador.

Y es que también se puede pensar que quizás es precisamente la polimerasa unida la que hace que el modo de difusión de PCNA sea el rotacional siguiendo la hélice y que, al soltarse cuando acaba la síntesis, eso deja de ser así y entonces PCNA comienza a moverse de manera traslacional no helicoidal por el fragmento de doble hélice de DNA completado por la polimerasa saliente, en rápida búsqueda de la siguiente polimerasa para así unirse y continuar con la replicación, provocando dicha unión el cambio al movimiento rotacional.

Pero además, el modo de difusión no helicoidal permitiría a la abrazadera cambiar su posición relativa respecto a la hélice de DNA, y esta libertad rotacional puede ser necesaria cuando se une a PCNA una encima cuya orientación relativa con respecto al DNA óptima necesita ser una diferente a la empleada por la enzima anterior para comenzar su actividad catalítica. Así que el modo de difusión helicoidal sería necesario para que PCNA lleve a cabo su función y el no helicoidal sería imprescindible para que PCNA encuentre rápidamente la disposición adecuada para dar lugar a una holoenzima funcional.

De todas formas, aunque los estudios de molécula única nos aportan pruebas del modo con componente helicoidal y lineal de la difusión de PCNA en el DNA, y las estructuras de las pinzas de bacteria y levadura conocidas proporcionan una visión importante de los detalles moleculares de la interacción pinza-DNA, no pueden ilustrar el mecanismo de deslizamiento. Para describir los movimientos de la pinza a nivel atómico, la mejor aproximación es que los datos estructurales y experimentales estén integrados con simulaciones de dinámica molecular.

1.1.3. Modelo precedente de la interacción hPCNA-dsDNA

En el primer estudio computacional de la PCNA humana (hPCNA), Ivanov y colaboradoras/es analizaron la interacción de la pinza con un DNA de doble hebra de 28 pb¹⁶². La simulación comenzó con el DNA en el centro de la abrazadera en una posición arbitraria con el eje helicoidal perpendicular al plano del anillo y, al terminar la trayectoria, el DNA estaba inclinado respecto al eje de dicho plano, rompiendo la simetría del aro de PCNA y enlazando a varios residuos básicos que recubren el canal de la pinza con el esqueleto de fosfatos a lo largo del surco menor del DNA.

Vamos a verlo con un poco de detalle.

Estas primeras simulaciones de dinámica molecular (DM) del sistema hPCNA-dsDNA (y, de ahora en adelante, ya simplemente PCNA-DNA) permitieron caracterizar computacionalmente la interacción entre los dos componentes y revelaron que la abrazadera rodea la doble cadena de DNA con un ángulo de $\approx 20^\circ$ respecto al eje del DNA¹⁶². Esta inclinación facilita la formación de un gran número de interacciones electrostáticas entre el esqueleto fosfodiéster del DNA y los residuos lisina y arginina cargados positivamente que revisten la superficie interna del canal de PCNA. Ivaylo Ivanov y colaboradoras/es observaron que el proceso de ruptura y formación de contactos en la cara interna de PCNA es muy dinámico, con la existencia de competición entre diferentes residuos proteicos por el mismo fosfato del DNA.

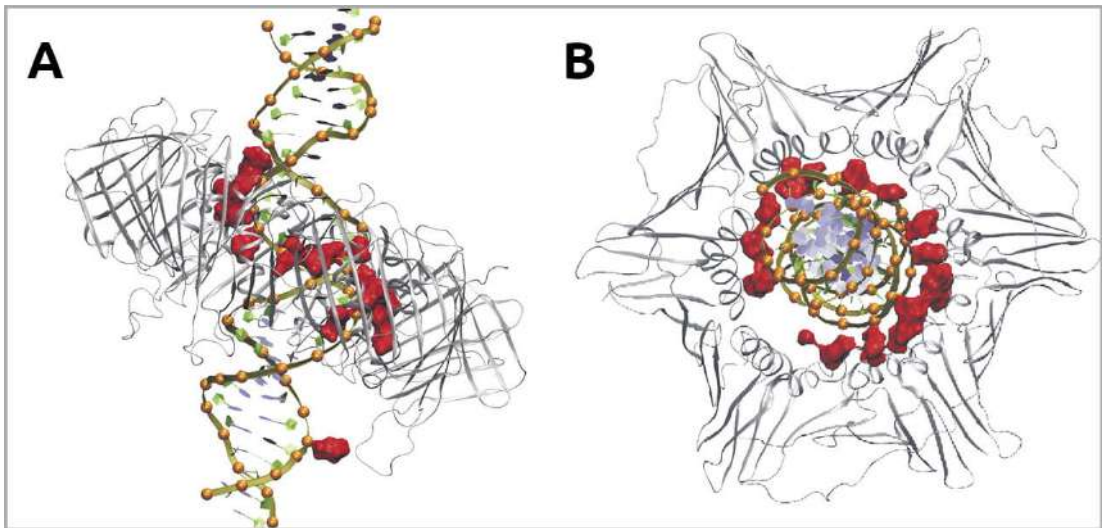


Figura 6: Interacciones de PCNA con dsDNA: vista lateral (A) y vista superior (B) del complejo hPCNA-dsDNA donde se muestran los fosfatos del DNA como esferas naranjas y los residuos básicos arginina y lisina de PCNA que están hasta 6Å de distancia de los fosfatos como superficies rojas. Vemos la relación entre la inclinación del anillo de PCNA respecto al DNA y las interacciones entre la columna vertebral del ácido nucleico y la superficie interna de deslizamiento de la abrazadera cargada positivamente (Figura de Ivanov 2006 utilizada con autorización¹⁶²).

Aunque la escala de tiempo de las simulaciones DM de Ivanov fue demasiado corta (25 ns) para observar la traslocación de PCNA, los resultados ya sugirieron que la pinza no está asociada de manera estable en un único punto al DNA¹⁶². El gran número de interacciones proteína-DNA que se dan a lo largo de las dos hebras del surco menor proponen una imagen en la cual la pinza sigue el paso helicoidal del DNA mientras se desplaza. La naturaleza dinámica de estas interacciones PCNA-DNA puede permitir que un número suficiente de ellas se rompan transitoria-

mente para mantener un estado en el cual la pinza PCNA esté más perpendicular al DNA; durante esos breves momentos, las interacciones PCNA-DNA pueden no ser suficientemente extensas para forzar a la pinza a seguir helicoidalmente a lo largo del esqueleto fosfodiéster, permitiéndole moverse rápidamente en un modo no helicoidal, tal y como ya vimos al hablar del trabajo de Kochaniak¹⁶⁶.

Orientación de PCNA respecto al DNA

A falta de una estructura cristalográfica de PCNA cargada en el dsDNA, las simulaciones de Ivanov del complejo revelaron esta inesperada y sorprendente inclinación de $\approx 20^\circ$ del eje del DNA respecto al plano de PCNA. Además, la doble hélice se aleja de su posición inicial en el centro de la abrazadera deslizante para formar contactos con residuos básicos de la proteína (arginina y lisina) que recubren la superficie interna del anillo de PCNA, por lo tanto, la hélice ya no está orientada simétricamente con respecto a PCNA¹⁶². Obtuvieron observaciones análogas para PCNA de *A. fulgidus*, donde el ángulo de inclinación también se acerca a esos 20° al final de la simulación¹⁶².

Los cambios observados en la orientación y posición de la doble hélice de DNA con respecto a PCNA provienen principalmente de dos factores estructurales intrínsecos. El primero, la estructura relativamente rígida de la abrazadera deslizante, que preserva un diámetro de agujero central de PCNA ($\approx 35 \text{ \AA}$) significativamente más grande que el diámetro de la hélice dsDNA en la forma B canónica ($\approx 24 \text{ \AA}$), que lleva a la exigencia de un acercamiento del DNA hacia la cara interna de PCNA para establecer interacciones más intensas¹⁶². El segundo, la necesidad de maximizar las interacciones entre los residuos proteicos cargados positivamente localizados en las hélices α de la superficie interna de PCNA y el esqueleto fosfodiéster del DNA cargado negativamente, que lleva a una orientación inclinada, energéticamente más favorable para PCNA en el dsDNA¹⁶². Parece que la asociación perpendicular al surco menor, fruto de la orientación inclinada y en oposición a la unión paralela al surco mayor o al surco menor visto en muchas proteínas de unión a DNA, promueve la formación de interacciones proteína-DNA no específicas y previene distorsiones significativas en la estructura del ácido nucleico.

Además, el diámetro interno del anillo de PCNA es suficientemente grande para permitir al solvente pasar libremente a través, como observan en sus simulaciones Ivanov y colaboradoras/es¹⁶², y competir con los residuos de la proteína por establecer contactos con el DNA. De hecho encontraron que el proceso de rotura y formación de contactos a lo largo de la superficie interna de PCNA es muy dinámico, con competición entre diferentes residuos proteicos por los grupos fosfodiéster del DNA.

Consecuencias de la interacción PCNA-DNA

La escala temporal de aquellas primeras simulaciones es insuficiente para muestrear de manera exhaustiva los movimientos globales de la pinza con respecto al DNA o el proceso de deslizado a lo largo del DNA, sin embargo, los resultados son increíblemente sugerentes de por qué la abrazadera es capaz de deslizarse libremente a pesar del hecho de formar amplios contactos con el esqueleto de ácido nucleico. La respuesta está en 1) la competición entre residuos cargados en la superficie interna de PCNA para formar interacción con las dos cadenas de DNA a lo largo de un tramo del surco menor, y además 2) esto acoplado a la habilidad del anillo para inclinarse y rotar parcialmente alrededor del DNA. Pero aunque el tamaño limitado de las simulaciones de Ivanov excluye una prueba computacional más definitiva de los contactos y la movi-

idad, los resultados son completamente consistentes con la propuesta de una asociación más cercana del dsDNA a una subunidad dada de PCNA y que esto puede influenciar en la dinámica de la superficie externa de la abrazadera.

Además, su análisis de componentes principales indica precisamente esto último, pues hizo destacar la idea de que los movimientos globales de la abrazadera deslizante con respecto al DNA parecen estar bien correlacionados con los movimientos internos dentro del anillo de PCNA¹⁶².

Ya se ha sugerido ampliamente que PCNA puede coordinar las actividades de sus proteínas asociadas o formando complejos ternarios con una o más de ellas, o entregando intermedios de DNA de una enzima a la siguiente en la vía de replicación o reparación que corresponda^{115,119,143,188}. Ambos mecanismos están basados en modelos en los que PCNA rodea al DNA, quizás de manera que PCNA es perpendicular al eje del DNA y que este se encuentre situado en el centro del anillo (Figura 7). En esta orientación y localización, los tres sitios de unión a PIP-box de PCNA, cada uno emplazado en la cara delantera de una subunidad homotrímica de PCNA, son equivalentes. Sin embargo, las simulaciones de Ivanov y colaboradoras/es muestran a PCNA unida al DNA de manera asimétrica, principalmente, como ya hemos dicho, interactuando a través de residuos cargados positivamente en las hélices α que revisten el interior del anillo de PCNA, y con estos residuos interactuando con el esqueleto fosfato a lo largo del surco menor del DNA; como este modo de unión causa que el plano del anillo de PCNA se incline $\approx 20^\circ$ con respecto al eje helicoidal del DNA, se rompe la simetría del trímero de PCNA. Este resultado tiene grandes implicaciones para el mecanismo por el cual PCNA interacciona de manera exclusiva con múltiples proteínas.

Sin embargo, la falta de datos estructurales experimentales de la interacción PCNA-DNA y la corta escala de tiempo de las simulaciones hicieron que Ivanov no pudiera proponer un mecanismo molecular para el deslizamiento de la pinza en el DNA. El asunto seguía pendiente, hasta ahora.

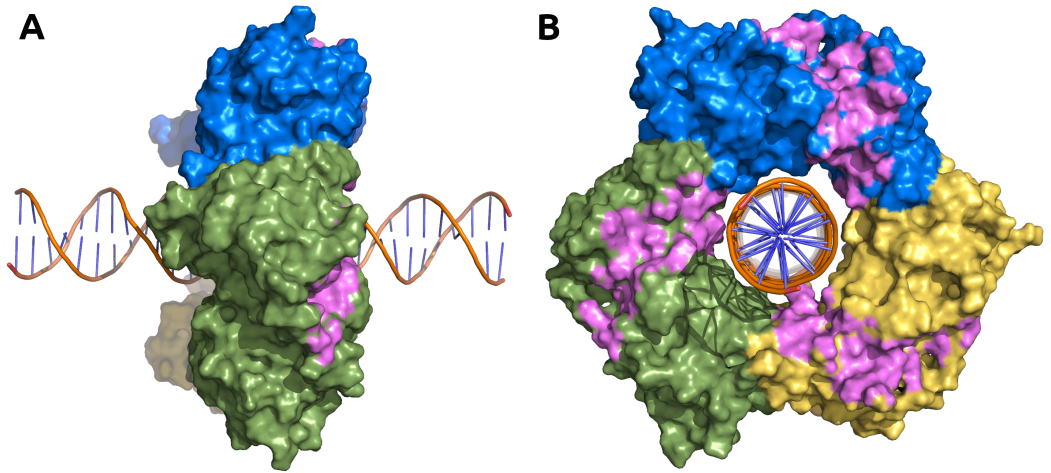


Figura 7: vista lateral (A) y frontal (B) de hPCNA con el dsDNA situado en el centro del anillo interno y perpendicular a la pinza; se muestran en azul, amarillo y verde las tres subunidades de hPCNA y en rosa sus bolsillo de unión a PIP-box. Con esta disposición, el sistema tiene simetría ternaria y los tres bolsillos son equivalentes.

1.2. Estudio de las bases estructurales del deslizamiento de hPCNA en el dsDNA

Ya sabemos que las abrazaderas o pinzas deslizantes rodean el DNA y anclan o sujetan las DNA polimerasas y otras proteínas y factores a la plantilla genómica. También sabemos que PCNA difunde a lo largo del DNA utilizando dos modos de difusión, uno traslacional menos frecuente y desacoplado del paso helicoidal del DNA, y otro rotacional, que emplea predominantemente y que está acoplado al giro de la hélice. Sin embargo, el mecanismo molecular de la difusión de PCNA en el DNA aún es desconocido. Como acabamos de ver, Ivanov y colaboradores/es dieron una primera idea de cómo es la interacción entre PCNA y el DNA, pero sigue haciendo falta un modelo estructural que explique su movimiento a lo largo del DNA a nivel molecular.

Gracias al trabajo realizado en el transcurso de esta tesis doctoral, utilizando cristalografía, RMN y simulaciones de dinámica molecular, hemos podido ver que la pinza PCNA humana (hPCNA, aunque se usará hPCNA o PCNA indistintamente) reconoce el DNA a través de un conjunto de residuos básicos dentro del canal del anillo dispuestos en una espiral a derechas que coincide con la frecuencia helicoidal (también llamada paso de giro o paso helicoidal) del DNA de forma B.

Con los resultados de este estudio proponemos que PCNA se desliza siguiendo el esqueleto de DNA con un mecanismo de «rueda dentada» basado en interacciones polares efímeras, el cual mantiene la orientación de la pinza relativa al DNA invariante. Diversas mutaciones en residuos en la interfaz PCNA-DNA ya han mostrado perjudicar la iniciación de la síntesis de DNA por la DNA polimerasa δ (Pol δ), y nuestros hallazgos sugieren que una pinza correctamente orientada en el DNA, consecuencia del establecimiento de las interacciones correctas, es necesaria para el ensamblaje de la holoenzima PCNA-pol δ de replicación.

Vamos a verlo.

1.2.1. Caracterización de la interacción entre PCNA y el DNA

Por la labilidad inherente de la interacción PCNA-DNA, no ha sido fácil la caracterización biofísica y estructural de esta interfaz, por eso, cómo las pinzas eucarióticas reconocen el DNA ha permanecido en controversia y hasta ahora no había sido propuesto un mecanismo molecular del deslizamiento de PCNA en el DNA.

A día de hoy, con la determinación de la estructura cristalográfica de PCNA humana unida a un DNA de doble cadena de 10 pb de longitud (PDB ID: 6GIS), el análisis de las perturbaciones de las señales de espectros de RMN en solución de PCNA inducidas por el DNA, y la caracterización de las interacciones en simulaciones de dinámica molecular (DM), hemos conseguido mostrar que PCNA reconoce la estructura del DNA a través de un conjunto de residuos básicos dentro del canal del anillo organizados para encajar en el paso de giro del DNA-B estableciendo interacciones polares efímeras con fosfatos consecutivos del DNA. Las cadenas laterales de los residuos que interactúan son capaces de cambiar entre fosfatos adyacentes de manera no coordinada, respaldando un mecanismo de deslizamiento helicoidal en el cual la pinza rota y se ladea manteniendo una orientación fija relativa al esqueleto de DNA. Esto tiene implicaciones en cómo funciona la holoenzima PCNA-pol δ , en la replicación del DNA y también en la carga de la pinza por RFC.

Estudio de la estructura cristalina y de las interacciones en solución del complejo PCNA-DNA

Se obtuvieron cristales del complejo hPCNA-dsDNA con una resolución de 2.8 Å (Tabla complementaria 1) y se determinó la estructura cristalográfica (PDB ID: 6GIS) en la que la molécula de DNA de 10 pb se enhebra a través del anillo de PCNA con su eje longitudinal formando un ángulo de 15° con el eje C3 del anillo (Figura 8, Figura complementaria 1). En esta caso, no hay contactos en la estructura cristalina entre el DNA y moléculas relacionadas con la simetría como ocurría en el caso de la pinza β. Los altos factores de temperatura del DNA obtenidos (Tabla complementaria 1) son compatibles con una ocupación parcial del dsDNA y/o con la existencia de una subpoblación de complejos PCNA-DNA con una orientación del DNA ligeramente diferente.

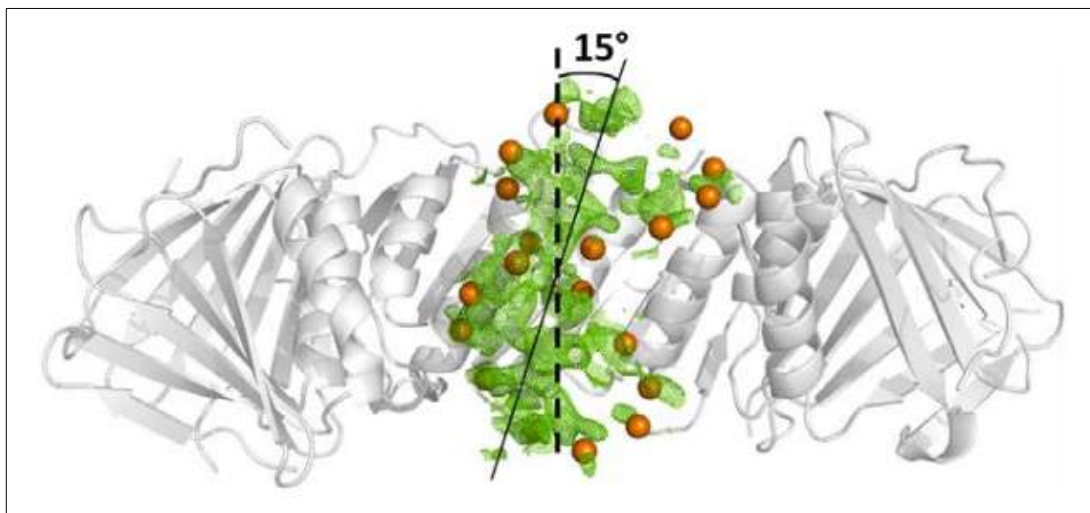


Figura 8: Vista lateral del mapa de densidad electrónica de difracción de rayos-X del complejo hPCNA-dsDNA antes de añadir el DNA al modelo (contorneado a 1,3 σ). El DNA está inclinado 15° respecto al eje de simetría C3 del PCNA.

La interfaz del complejo implica las cadenas laterales de cinco residuos básicos de PCNA (K20, K77, R149, H153 y K217) distribuidos en cuatro α -hélices de una subunidad de PCNA, y la cadena lateral de otro residuo (K80) en la α -hélice más próxima de la subunidad adyacente (Figura 9). Como podemos ver en la figura, las cadenas laterales de estos residuos de PCNA de la interfaz PCNA-DNA forman una espiral a derechas que coincide estrechamente con el paso de giro del DNA-B y están implicadas en contactos polares con cinco fosfatos consecutivos de una única cadena del dsDNA.

La interfaz dinámica PCNA-DNA observada en el cristal, delatada por esos elevados factores de temperatura, se observa también en el análisis de RMN de la unión en solución entre PCNA y el DNA de doble cadena (Figura 10). La valoración de PCNA con dsDNA muestra una unión débil ($K_D \approx 0.7$ mM) en el interior del anillo. Las perturbaciones del desplazamiento químico (CSP de sus siglas del inglés, *chemical shift perturbation*) de los grupos amida del esqueleto proteico son pequeñas (CSP < 0.06 p.p.m.), y la tasa de intercambio químico τ_{ex} es rápida, lo que es consistente con la baja afinidad de la interacción y está en concordancia con los resultados cristalográficos.

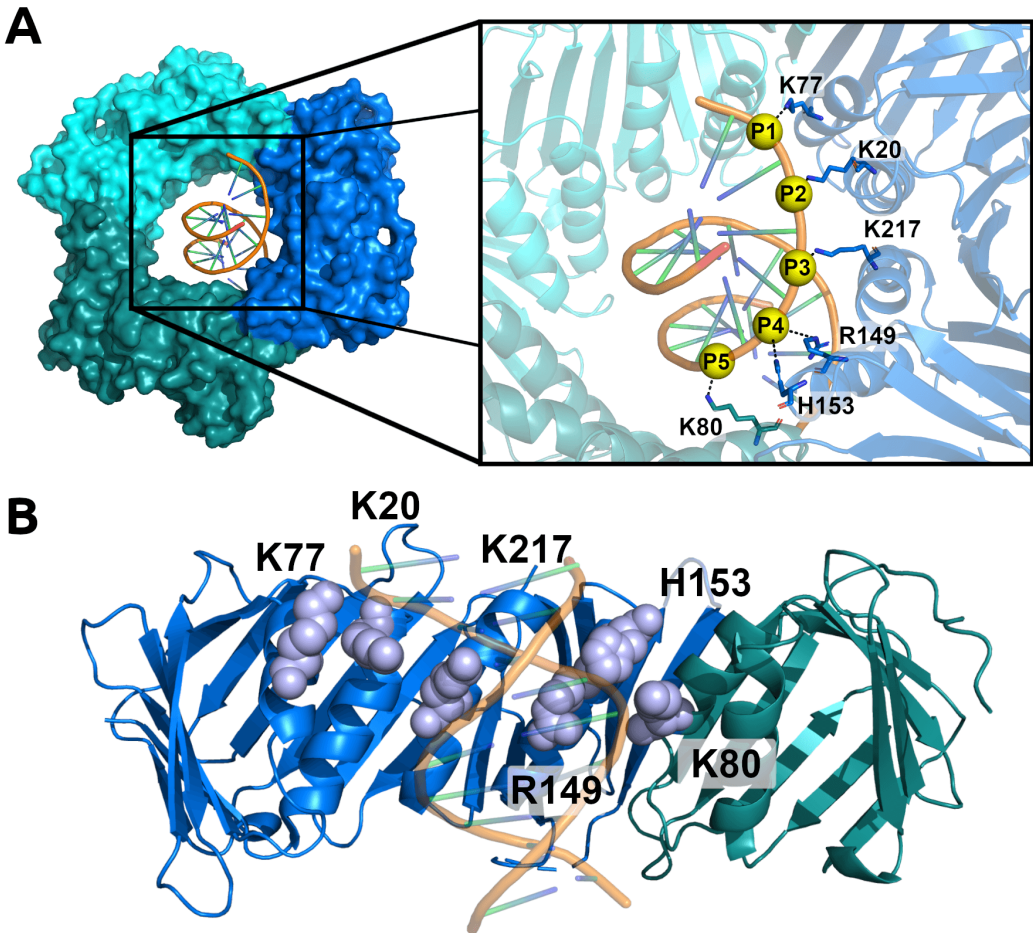


Figura 9: Estructura cristalina de resolución 2,8 Å de hPCNA unida a un dúplex de DNA de 10 pb. PCNA y DNA se muestran en representación de superficie y cinta, respectivamente. Las subunidades de PCNA están coloreadas en diferentes tonos de azul y el DNA en naranja. En la ampliación del complejo en representación de cinta, vemos la interacción (representada como líneas discontinuas) entre las cadenas laterales de residuos de PCNA y los fosfatos del DNA (las distancias entre nitrógenos de cadenas laterales de aminoácidos y los correspondientes fósforos del DNA son menores de 5 Å).

Se probó también la unión de PCNA al sustrato cebador/plantilla (también unión P/T, por sus siglas del inglés *primed-template*) de DNA cebado (pDNA) (Tabla complementaria 2) que fue ya anteriormente cristalizado junto a la pinza β bacteriana por Georgescu¹⁶³, y donde el ssDNA se anclaba al bolsillo de unión a proteínas principal de la pinza, el bolsillo de unión a PIP-box, compitiendo así por la unión de la DNA polimerasa a PCNA¹⁶³. Nuestros experimentos de RMN muestran, sin embargo, que el pDNA se une a la pared interior del canal de PCNA pero no a PIP-box (Figura 11), sugiriendo esto que las pinzas bacteriana y eucariótica reconocen el cebador o iniciador de DNA de manera diferente.

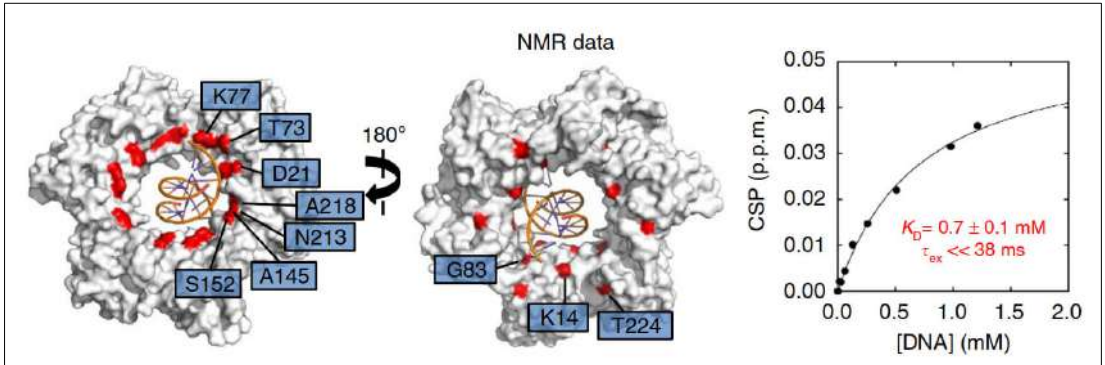


Figura 10: Análisis de RMN. Izquierda: vistas frontal y posterior de la superficie de PCNA. Están señalados en rojo los residuos de PCNA cuyos desplazamientos químicos de los grupo amida se ven significativamente perturbados por la adición de DNA. Se muestra en color naranja la posición cristalográfica del DNA. La región de interacción en el canal de la abrazadera se superpone con la que se ve en la estructura cristalina. Derecha: perturbación del desplazamiento químico de la señal de la amida del residuo T73 de PCNA a diferentes concentraciones de DNA. El ajuste se realizó utilizando un modelo de unión de un solo sitio. Se indican las constantes de disociación extrapoladas y de tiempo de intercambio.

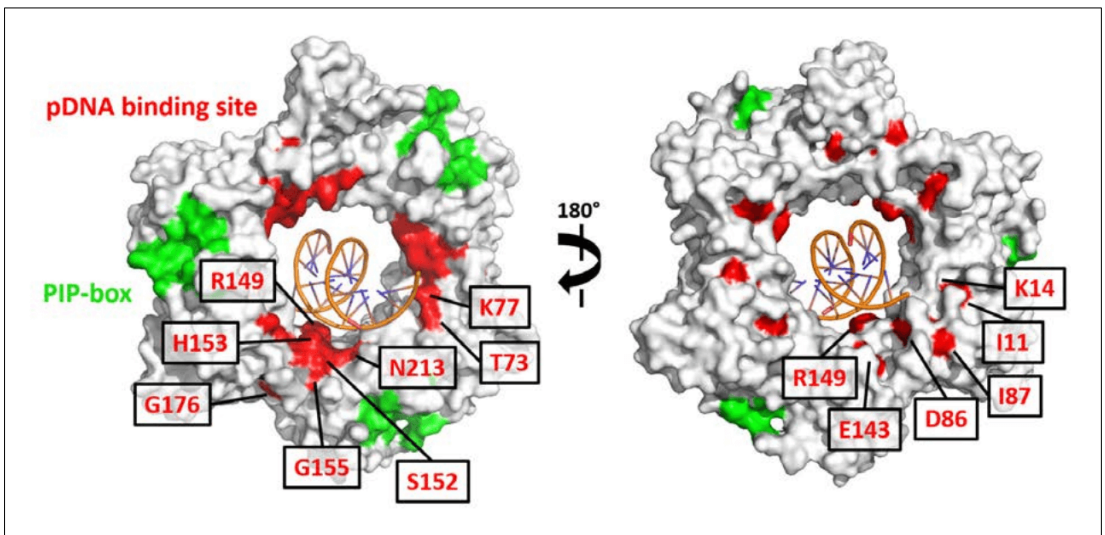


Figura 11: Mapa de RMN de los sitios de unión del pDNA en la superficie del PCNA (izquierda, cara frontal; derecha, cara trasera). Los residuos de PCNA cuyas señales de RMN se ven significativamente perturbadas por el pDNA ($CSP >$ promedio + 2 desviaciones estándar) están coloreados en rojo y se etiquetados. Los residuos que pertenecen al sitio de unión a PIP-box están coloreados en verde. El DNA se muestra en la posición cristalográfica del complejo PCNA-dsDNA.

Estudio computacional de la interacción PCNA-DNA

Además de la obtención de la estructura cristalográfica, inexistente hasta entonces, y de los experimentos del sistema PCNA-DNA en solución por RMN, se llevaron a cabo diferentes simulaciones de dinámica molecular de sendos sistemas PCNA-DNA, uno con dsDNA de 10 pb y otro con dsDNA de 30 pb. Todas las dinámicas se hicieron por duplicado y en todos los casos se llega a convergencia, mejorando los resultados anteriores de Ivanov¹⁶².

El sistema con el dúplex de DNA de 10 pb es análogo al empleado en los estudios de cristalografía y RMN, y las coordenadas iniciales para las DM se tomaron, precisamente, de la estructura cristalográfica obtenida (PDB ID: 6GIS). El sistema que tiene el dúplex de DNA de 30 pb se obtuvo a partir de este primero, el que tiene un DNA de 10 pb, por extensión de 10 pb de las dos hebras de DNA por cada uno de sus dos lados usando el programa COOT²⁷⁴.

Para los dos sistemas se siguió el mismo protocolo: 1) Primero se protonó el sistema usando AmberTools 15²⁷⁵, se solató en una caja dodecaédrica troncada de agua TIP3P de al menos 1.5 nm más allá de los átomos de la proteína o el DNA, y se añadieron tantos iones cloruro y sodio como para alcanzar una concentración de 100 mM, que es también la concentración experimental, y neutralizar el sistema. 2) Después, el sistema se minimizó y equilibró, con una distancia de corte para las interacciones electrostáticas de largo alcance (usando el método PME -*Particle-mesh Ewald*-) de 1 nm, durante 100 ps en el ensamble canónico NVT y durante 100 ps en el ensamble isotermodisipativo NPT; la energía de equilibración fue revisada en estos pasos y se ejecutaron con restricciones de posición en los átomos pesados (todos los que no son hidrógeno) del DNA y de la proteína. 3) Se corrieron simulaciones de 100 ns para el sistema con DNA de 10 pb y de 250 ns para el de 30 pb con GROMACS 5^{276,277} empleando el campo de fuerza parmBSC1 del grupo de Modesto Orozco²⁷⁸ y con pasos de integración de 2 fs; al calcular los promedios, los primeros 10 ns (o 50 ns en el caso del sistema con el DNA más largo) fueron tratados como equilibración y no considerados para la simulación de 100 ns (o 250 ns, respectivamente). 4) Por último, la estabilidad de las simulaciones fue verificada por inspección visual de las trayectorias y por representación de los valores de RMSD respecto a la estructura inicial (Figura 12).

Nuestras simulaciones de 100 ns de PCNA formando complejo con un dsDNA de 10 pb predicen una interacción altamente dinámica, en acuerdo con nuestras observaciones experimentales. En las trayectorias de DM, el DNA migra desde la posición que ocupa en la estructura cristalográfica, tomada como inicio de la misma (lo que se conoce en la jerga computacional como *frame 0*), a una posición alternativa, y, posteriormente, a una ubicación central con interacciones mínimas con la proteína, para finalmente colapsar en un estado estable. Este último estado puede obtenerse por desplazamiento del DNA en el modelo cristalográfico de dos bases a lo largo del eje helicoidal. (Figura 13A). El análisis de distancias de los contactos polares intermoleculares a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular de 100 ns indica que residuos de la cara trasera del anillo (S10, K14, N84) contribuyen también a conducir el DNA a este estado final (Figura 13B). Estas interacciones en la cara trasera son igualmente consistentes con el análisis de perturbaciones de RMN (Figura 11), lo que indica que, en solución, el DNA puede acceder a regiones de la pinza que difieren, aunque están relacionadas, con las observadas en la estructura de rayos-X (Figura 14).

A la vista de estos resultados de las simulaciones de PCNA unida a dsDNA de 10 pb, donde además de en la cara interna del anillo de PCNA hay contactos lábiles PCNA-DNA en las caras delantera y trasera, podemos anticipar que un dúplex de DNA de mayor longitud interactuará

simultáneamente y de forma dinámica con dos conjuntos de residuos de dos subunidades de PCNA que coinciden con la hélice B de DNA. Esta predicción se ve apoyada por nuestras simulaciones de dinámica molecular de 250ns del complejo formado por PCNA unida a un dsDNA de 30 pb que, teniendo el extremo deshilachado del dúplex de DNA más lejos del anillo de PCNA, se aproxima más al complejo fisiológico.

El DNA al final de estas trayectorias muestra varias interacciones con la pinza (Figura 15) y una inclinación más pronunciada ($\approx 30^\circ$) comparada con la cristalográfica (15°) y la de la simulación de dinámica molecular de 100ns con el DNA de 10 pb ($\approx 10^\circ$) (Figura 16). Este valor de 30° es también ligeramente mayor que el de 20° obtenido por Ivanov y colaboradoras/es con su simulación de 25 ns¹⁶². En nuestra simulación, sin embargo, y como ya intuían Ivanov y colaboradoras/es, encontramos que 25 ns eran insuficientes para que el sistema alcanzara una conformación estable.

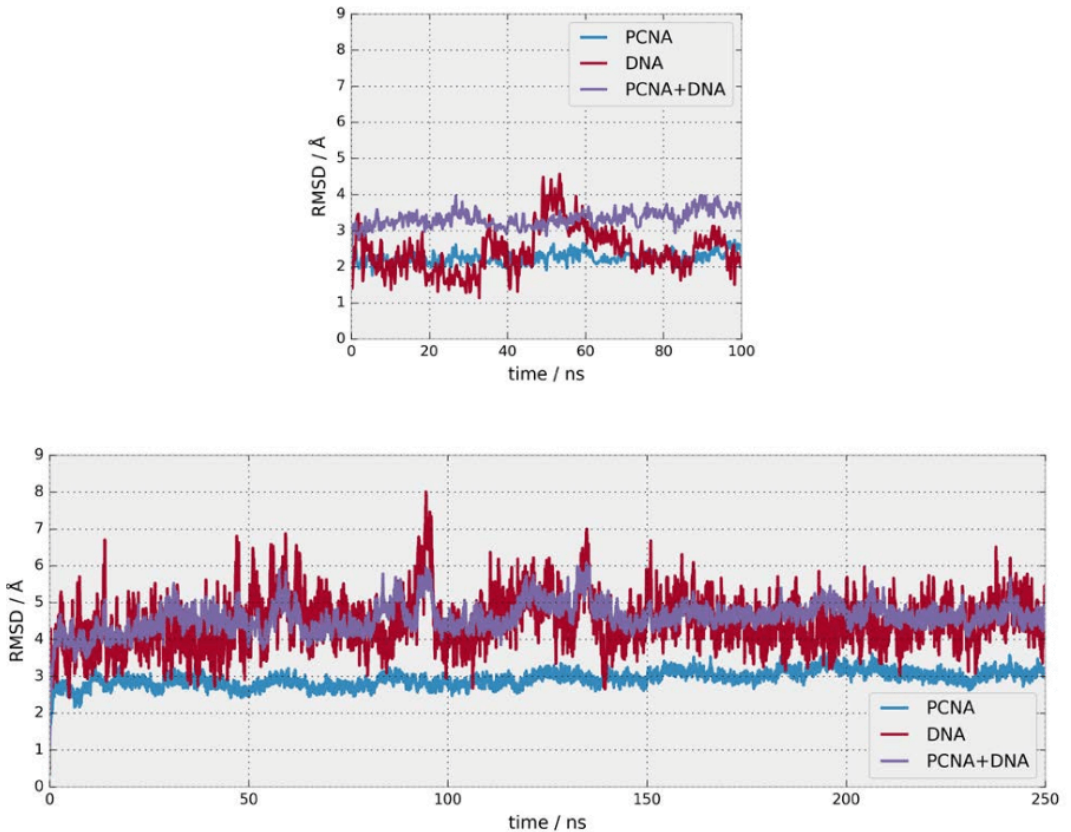


Figura 12: Desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos pesados del esqueleto de PCNA (en turquesa), el dúplex de DNA (en rojo) y el complejo PCNA-DNA (en morado) a lo largo de las trayectorias de DM, arriba la simulación de 100 ns (con DNA de 10 pb) y abajo la simulación de 250 ns (con DNA de 30 pb). En cada caso, el sistema se superpuso a la estructura inicial minimizada construida a partir de la estructura cristalográfica. El pico en los valores de RMSD del DNA alrededor de los 90 ns en la trayectoria más larga se debe a movimientos locales de los extremos del DNA.

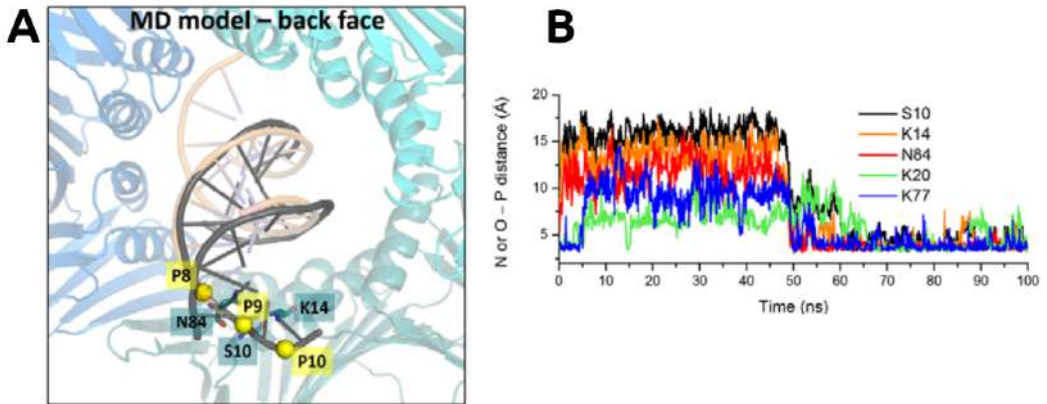


Figura 13: A) Interacciones en la cara posterior de la abrazadera en la trayectoria de DM del complejo PCNA-DNA con DNA de 10 pb; la posición cristalográfica del segmento de DNA se muestra en naranja, y en negro el DNA en la posición correspondiente al estado final de la simulación. B) Evolución de las distancias de nitrógeno (N) o del oxígeno (O) de la cadena lateral de los residuos S10, K14, N84, K20 y K77 de un monómero de PCNA a fósforos (P) del DNA en la trayectoria de DM del sistema PCNA-DNA con un DNA de 10 pb.

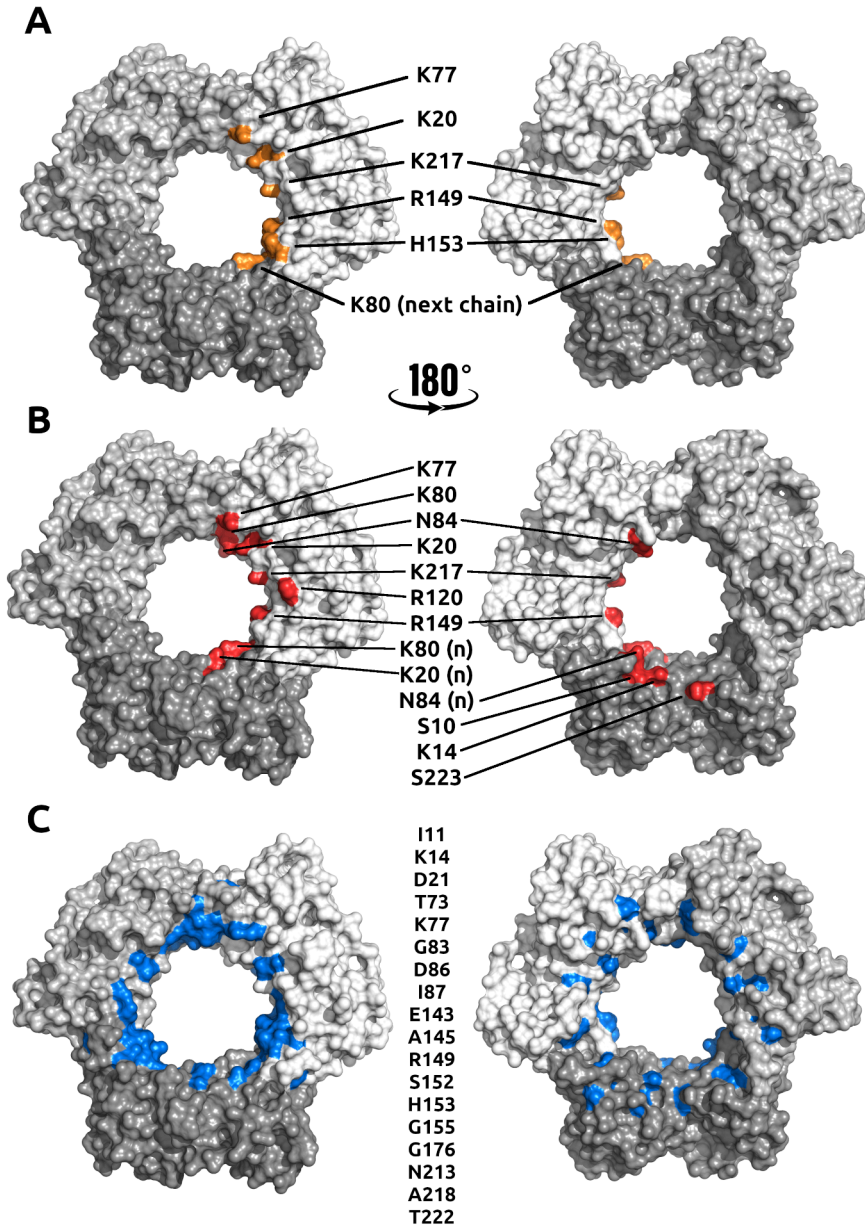


Figura 14: Vista de la cara frontal y trasera de PCNA mostrando los contactos establecidos entre residuos de PCNA y fósforos de los grupos fosfato del DNA obtenidos por las diferentes técnicas empleadas: cristalografía (A), simulaciones de dinámica molecular (B) y RMN. Los contactos que se establecen con las tres técnicas o son iguales o están relacionados, pues los residuos de PCNA que interaccionan vistos por DM o RMN, si difieren de los de cristalografía, o son residuos próximos o contiguos a estos últimos, o están en posiciones equivalentes en otra subunidad de PCNA.

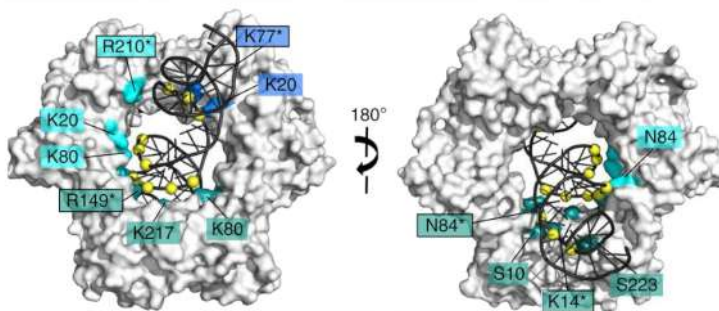


Figura 15: Vista frontal y trasera del complejo PCNA-DNA (con DNA de 30 pb) al final de la trayectoria de DM (de 250 ns). Están etiquetados los residuos de PCNA cuyas cadenas laterales están involucradas en contactos polares con fosfatos de DNA durante al menos el 25% de la trayectoria de DM; de estos, los residuos que se intercambian entre dos o tres fosfatos de DNA consecutivos durante más del 75% de la simulación de MD se indican encuadrados y con un asterisco. Los residuos que pertenecen a diferentes sub-unidades de PCNA están coloreados en distintos tonos de azul.

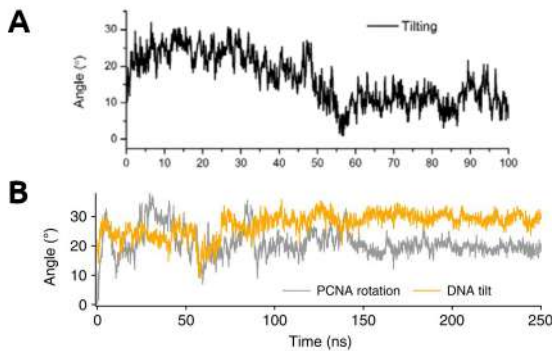


Figura 16: A) Evolución de la inclinación del DNA en relación con el eje de simetría C3 de PCNA en la simulación de DM de 100 ns donde el DNA del sistema PCNA-DNA tiene 10 pb. B) Evolución de la rotación (en gris) del anillo de PCNA y la inclinación (en amarillo) del DNA respecto al eje C3 del anillo de PCNA en la simulación del complejo PCNA-DNA con DNA de 30 pb.

1.2.2. Análisis del sistema PCNA-DNA

Todos estos resultados experimentales y computacionales permiten visualizar por primera vez las interacciones atómicas entre la PCNA humana y el dsDNA y seguir su evolución en el tiempo. Analicemos con más detalle estos resultados obtenidos y sus consecuencias y veamos que los datos apoyan un mecanismo de deslizamiento molecular que mantiene la orientación relativa de PCNA invariante respecto al esqueleto de DNA.

Contactos en el sistema PCNA-DNA

El gran número de contactos establecidos en el sistema PCNA-DNA proporciona una elevada estabilidad pues facilita el mantenimiento de la interacción, y el hecho que sean interacciones débiles hace que además sea un sistema muy flexible (Figura 17). Ambas cosas unidas, muchas interacciones débiles, proporcionan al complejo PCNA-DNA una gran variabilidad conformacional, es decir, un amplio abanico de posibilidades de interacción o conformaciones útiles para una unión funcional a diferentes proteínas diana, y esta es la característica que coloca a PCNA en el centro de la actividad del replisoma.

Orientación de PCNA durante su difusión en el DNA

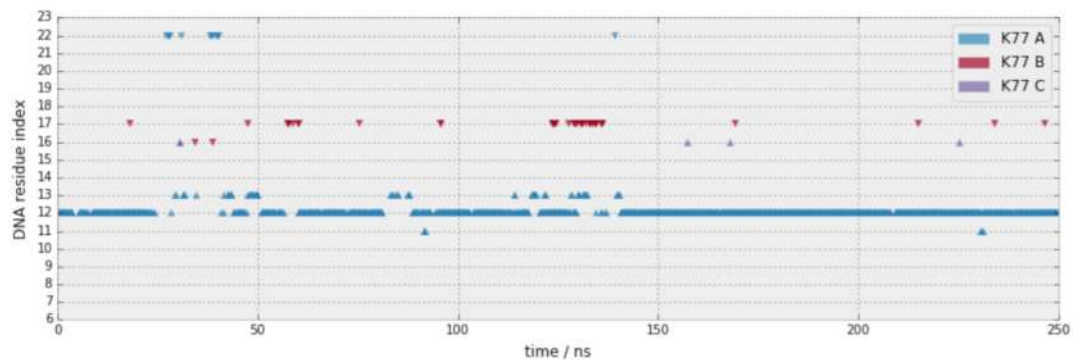
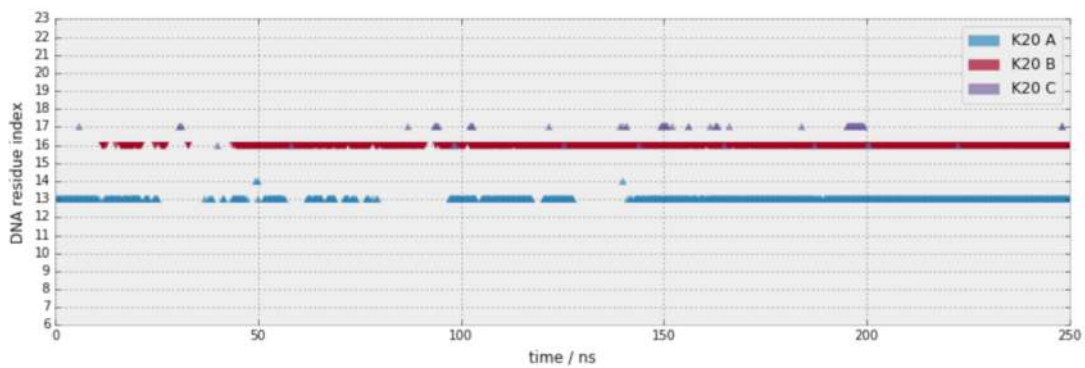
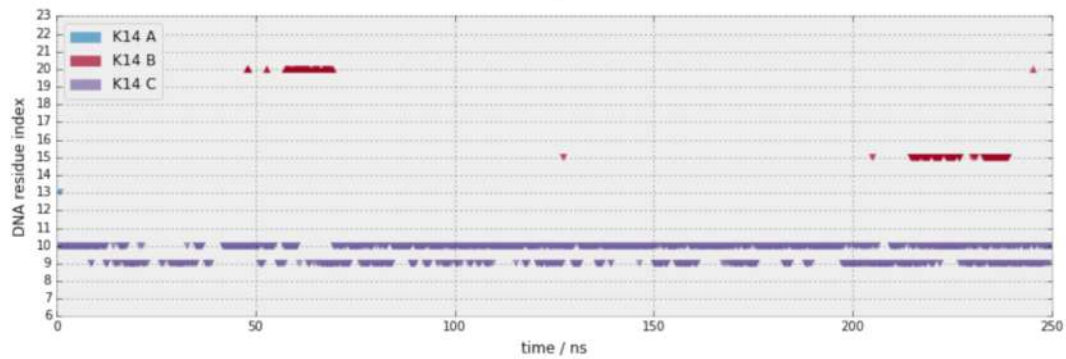
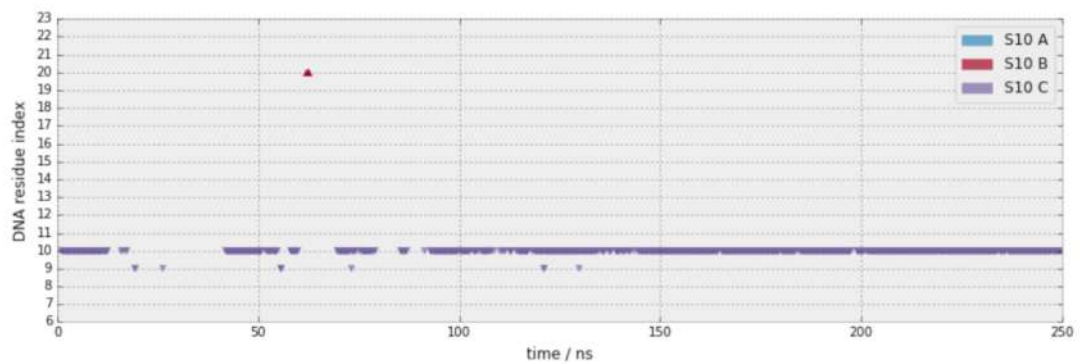
El hecho de que los residuos del interior del canal de PCNA implicados en las interacciones más importantes con el DNA (K20, K77, K80, R149 y K217) sean precisamente aquellos cuya pérdida por sustitución en estudios de mutación lleve a una disminución, incluso pérdida total, de la actividad polimerizadora de Pol δ y, por tanto, de la detención de la replicación, nos lleva a ir más allá del sencillo planteamiento de la importancia capital que tiene la presencia de estos residuos, y reflexionar sobre el papel primordial que tienen precisamente las interacciones que esos residuos establecen con el DNA y, por tanto, la labor fundamental de una correcta y definida colocación de PCNA en el DNA para que el proceso más importante para la vida, la replicación, tenga lugar.

El mantenimiento de las interacciones establecidas en la interfaz del complejo PCNA-DNA, donde el conjunto de residuos K20, K77, K80, R149 y K217 forma una hélice a derechas en la superficie interna del anillo de PCNA que coincide con el paso helicoidal del DNA de forma B y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular, será, pues, fundamental para el mantenimiento de la interacción estable con la Pol δ anclada a PCNA.

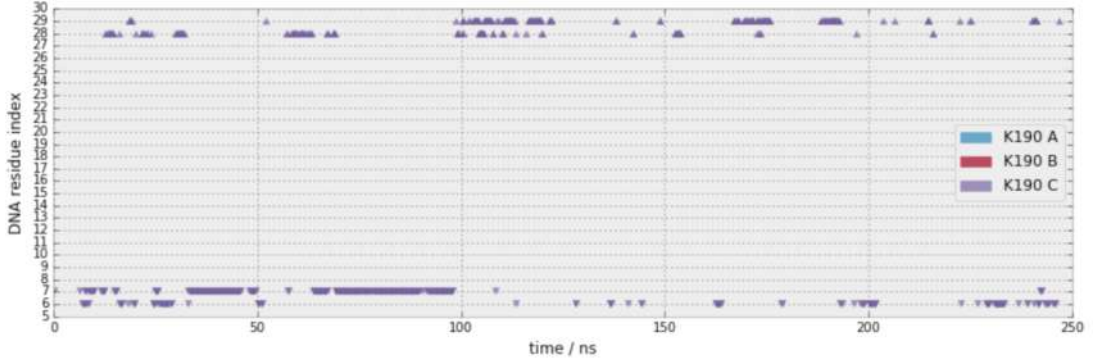
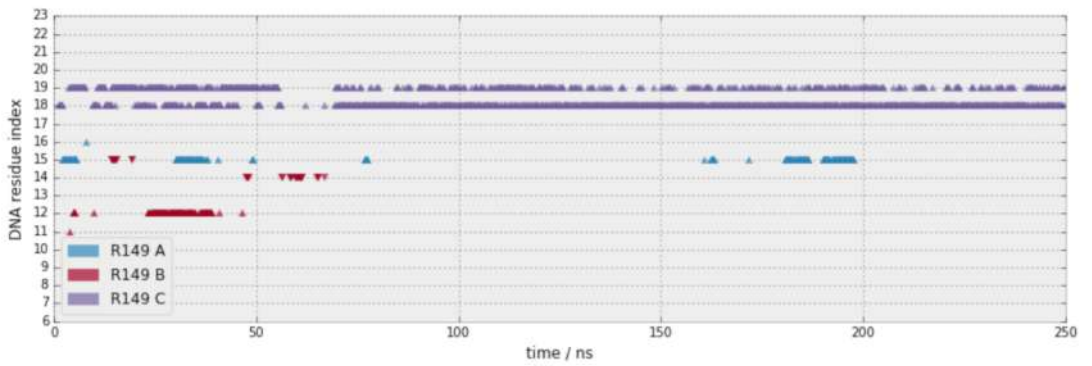
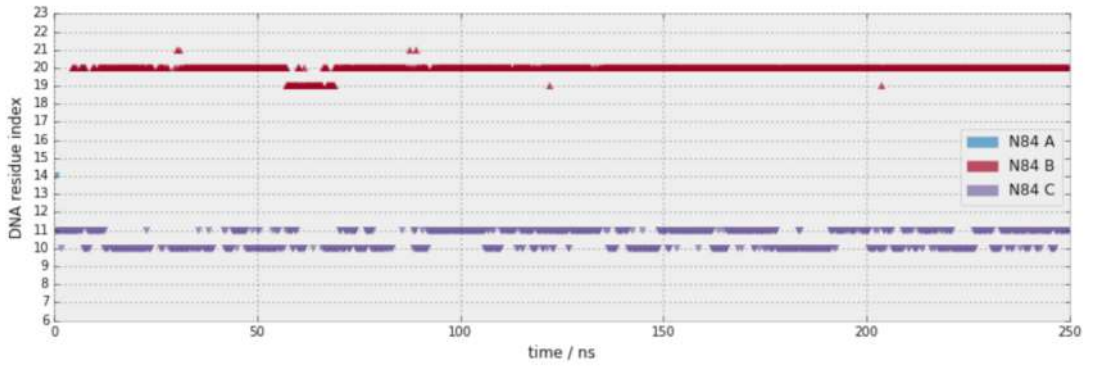
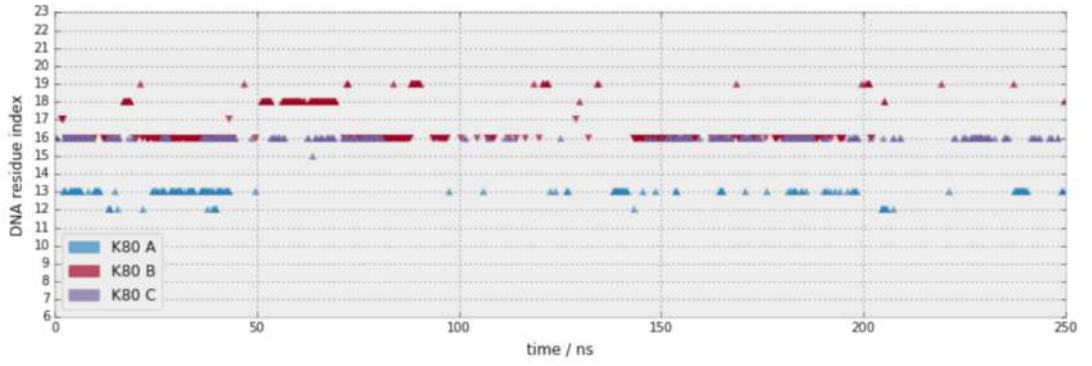
Y si es la interacción entre PCNA y el DNA la que provoca la inclinación de PCNA (inclinación de esos 30° que hemos visto que forma el eje del DNA con el plano del anillo de la pinza), ese posicionamiento de la abrazadera debe ser fundamental para el mantenimiento de la interacción con Pol δ y, por tanto, para la actividad de Pol δ anclada a PCNA. Y si la orientación correcta de PCNA en el DNA es esencial para la actuación de Pol δ sobre el DNA, debemos pensar en que esta orientación debe poder mantenerse mientras dure la replicación.

Pero es que, además, la inclinación de PCNA proporciona una asimetría al anillo que da como resultado una diferenciación entre los dominios de la cara delantera de la pinza de interacción con dominios PIP-box de proteínas diana, que ya no serán todos equivalentes, dando lugar a una sola posibilidad de colocación adecuada de la Pol δ para llevar a cabo su función.

1. Difusión de PCNA en el DNA



1.2. Estudio de las bases estructurales del deslizamiento de hPCNA en el dsDNA



1. Difusión de PCNA en el DNA

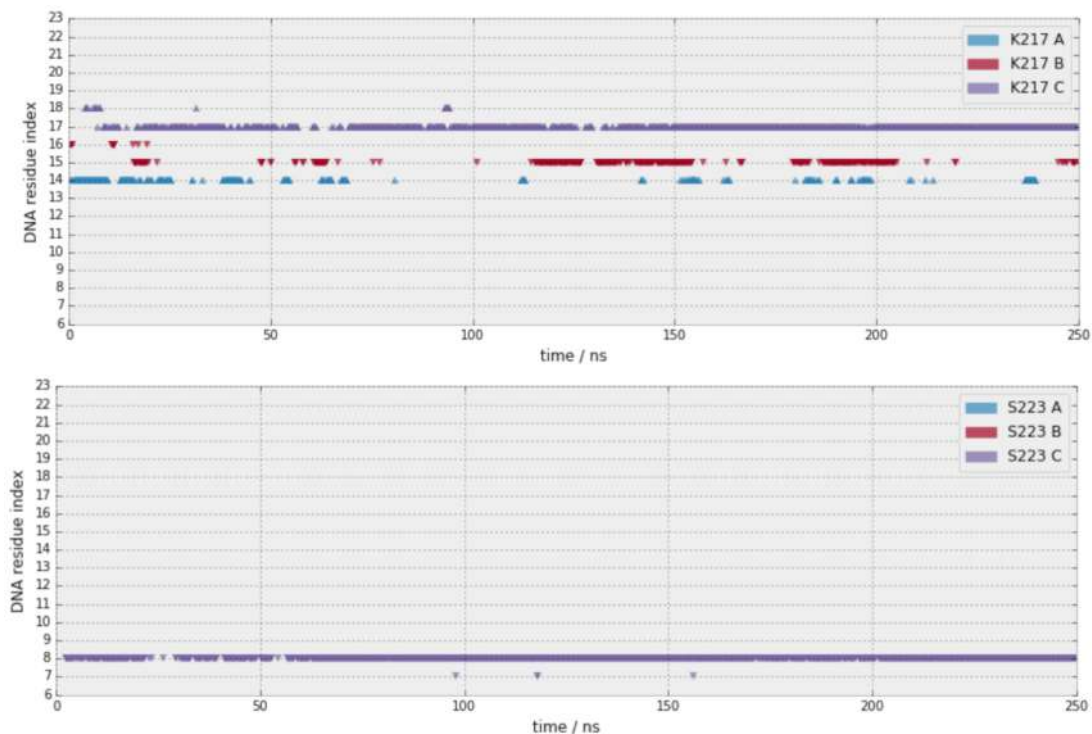


Figura 17: Evolución temporal de los contactos en la superficie de interacción del sistema PCNA-DNA con DNA de 30 pb a una distancia inferior a 4,7 Å: contactos entre el nitrógeno u oxígeno de la cadena lateral de los residuos indicados en cada leyenda y los fósforos de las dos hebras del DNA. Los residuos pertenecientes a cada una de las tres subunidades de PCNA se muestran etiquetados con A, B y C y además coloreados en turquesa, rojo y violeta, respectivamente. Los nucleótidos de las dos cadenas del dsDNA de 30 pb se numeran consecutivamente del 1 al 20, y sus contactos se diferencian por la orientación del vértice de los triángulos (apuntando hacia arriba para una hebra y hacia abajo para la otra).

Posición del DNA en el complejo PCNA-DNA

En todas las trayectorias visualizadas, el DNA no permanece en el centro del anillo de PCNA y se aproxima a una de sus subunidades, y este hecho contribuye también a la asimetría del complejo PCNA-DNA, pues si el DNA está más próximo a uno de los homotrímeros de PCNA está, entonces, más próximo a una zona de unión a PIP-box y más alejado de las otras dos (Figura 19 y 19). Luego esta asimetría debida a la proximidad del DNA a PCNA no solo sesgará la unión de la Pol δ a una subunidad concreta, además debe proporcionar a la polimerasa un susttrato, el DNA, a la distancia adecuada para encajar en su centro activo y actuar sobre él. Del mismo modo, una orientación concreta de PCNA respecto al DNA proporciona un ángulo de inclinación de este segundo respecto a la zona donde la polimerasa se unirá que será el adecuado para acoplarse también en el centro activo.

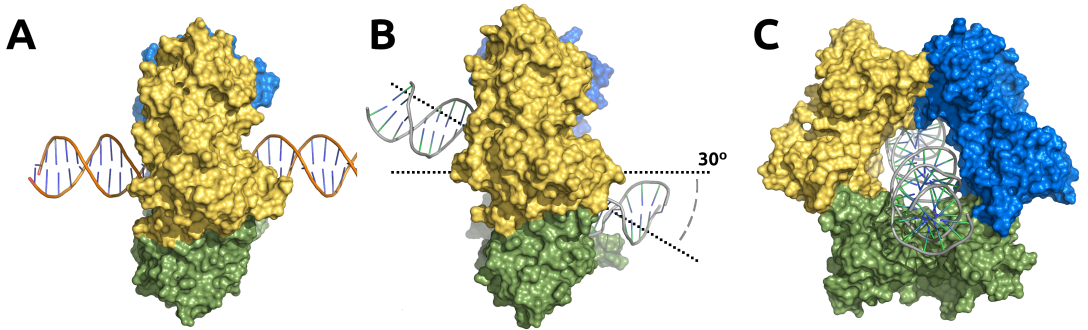


Figura 18: El ángulo de inclinación de la doble hélice de DNA en la trayectoria del sistema PCNA-DNA con el DNA de 30 pb pasa de cero grados al comienzo de la misma, cuando el eje del DNA coincide con el eje de simetría C3 del anillo (A), a 30° (B), provocando con ello la asimetría del sistema PCNA-DNA y, por tanto, la pérdida de equivalencia entre las regiones de unión a PIP-box de cada subunidad de PCNA. (C) Vista frontal.

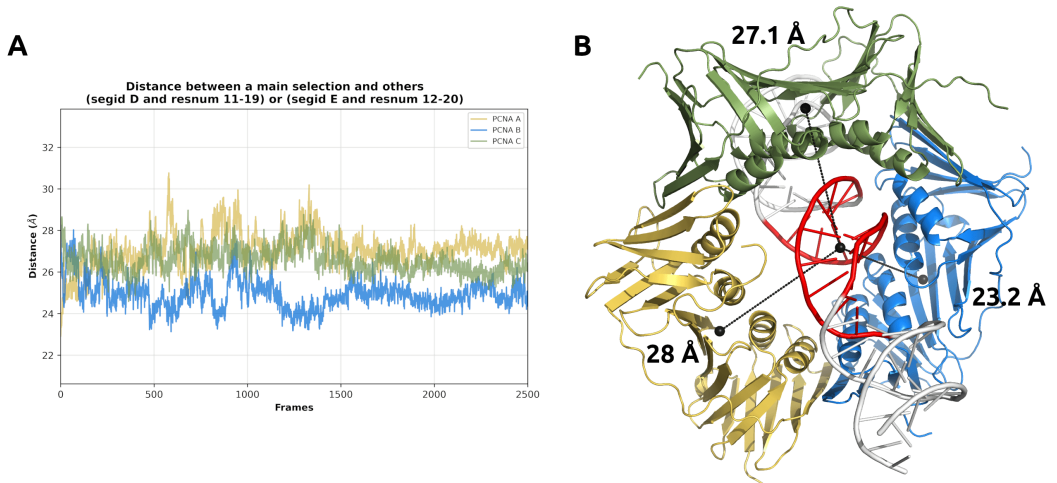


Figura 19: A) Distancia del centro de masas de la doble hélice de DNA al centro de masas de cada una de las subunidades de PCNA (en amarillo la A, en azul la B, y en verde la C) en la simulación de DM de 250 ns para el sistema PCNA-DNA con un DNA de 30 pb. B) Distancias entre el centro de masas del DNA y los centros de masas de las subunidades de PCNA en el momento de la trayectoria en el que son más diferentes. La gráfica muestra como el DNA acaba aproximándose más a una de las subunidades de PCNA pronto en la trayectoria para después permanecer alejado del centro del anillo.

Los resultados experimentales y las simulaciones de DM predicen una interacción muy dinámica entre PCNA y el DNA. De hecho, teniendo en cuenta la migración que hace en DNA a lo largo de las simulaciones, la posición que tiene en el estado final de la dinámica más corta (la que tiene el dsDNA de 10 pb) puede obtenerse a partir del modelo cristalográfico por desplazamiento del DNA de dos bases a lo largo del eje helicoidal ([Película complementaria 1](#)), y es que, siguiendo esta transformación o desplazamiento, la cadena de DNA que interacciona con una subunidad de PCNA interaccionará con residuos equivalentes en la subunidad adyacente (Figura 20)

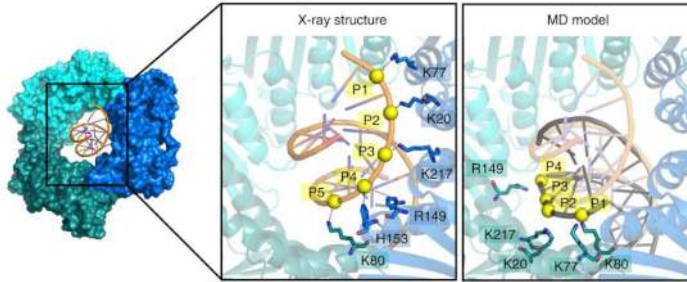


Figura 20: Interfaz de interacción del sistema PCNA-DNA del modelo de simulación de DM. La posición cristalográfica del segmento de DNA se muestra en naranja, mientras que en negro se muestra el DNA en la posición que tiene en el estado final de la trayectoria de DM de 100 ns del complejo PCNA-DNA (con DNA de 10 pb). Se muestra de nuevo el resultado de cristalografía para una mejor comparación.

Modo polimerización del sistema PCNA-DNA

Si las interacciones en la interfaz PCNA-DNA que encontramos en nuestros resultados experimentales perduran, como vemos en las simulaciones de dinámica molecular, entonces nuestros datos avalan un mecanismo de deslizamiento molecular que mantiene invariante la orientación relativa de PCNA respecto al esqueleto de DNA. Además, estos resultados de la interacción de PCNA con el DNA revelan diferencias sustanciales con los resultados del grupo de O'Donnell¹⁶³ sobre el sistema bacteriano, donde, como ya hemos visto, una porción de cadena única del DNA cebado se une a PIP-box de la pinza β y compite con la unión de la DNA polimerasa III, equivalente bacteriano de la Pol δ eucariota. Los nuestros, por el contrario, no sugieren una interacción entre el DNA y el sitio de unión de la polimerasa de PCNA, por lo que los modelos funcionales propuestos para la pinza β bacteriana basados en esta característica no pueden ser extendidos a las abrazaderas eucarióticas.

El contacto β -ssDNA visto por O'Donnell puede funcionar como un «marcador de posición» que mantiene la pinza β cerca del extremo 3' de las uniones P/T de DNA antes de la unión de la polimerasa y la iniciación de la replicación del DNA¹⁶³, hecho observado también por experimentos de molécula única²⁶⁷. La difusión rápida de PCNA humana en el DNA y el mecanismo de deslizamiento que proponemos ahora a la vista de nuestros resultados evitaría la necesidad de tal función de marcador de posición en la replicación del DNA por el complejo PCNA-pol δ , pues la orientación de PCNA y la disposición del complejo PCNA-DNA ya sería la adecuada para la formación de la holoenzima y para la actividad de Pol δ . La posición y orientación en la que queda el DNA en el anillo de PCNA hace que, al anclarse la polimerasa a través de su PIP-box, el material genético ya esté a la distancia y orientación adecuadas para que la enzima actúe sobre él.

Además, nuestros experimentos de RMN, donde probamos la unión de PCNA a un sustrato P/T, mostraron que el pDNA se une a la pared del interior del anillo de PCNA pero no a PIP-box.

Por tanto, parece que en nuestro sistema PCNA-DNA sí hemos pillado a PCNA en el modo o estado polimerización y no en edición como ocurre en el caso de la estructura de la pinza β bacteriana anclada a DNA, o que el modo edición de la Pol δ no necesite, como decimos, tal marcador de posición.

PCNA-DNA y Pol δ

Pol δ es una polimerasa de la familia B de polimerasas de cuatro subunidades (la catalítica p125 y las reguladoras p50, p66, y p12)^{227,279} que replica la cadena rezagada de DNA por asociación a PCNA, formando una holoenzima en la unión P/T de los fragmentos de Okazaki nacientes^{280,281}. Tres de las cuatro subunidades de la Pol δ humana pueden interactuar directamente con PCNA a través de las tres PIP-box de la cara frontal del homotrímero de la abrazadera^{148,282-286}.

Los primeros estudios ya mostraron que una única mutación en los residuos K20, K77, K80, R149 y K217 de PCNA reduce de manera severa la habilidad de Pol δ para incorporar un nucleótido entrante en la iniciación de la síntesis de DNA²⁴⁹, y ahora nuestros datos sugieren que estos residuos son críticos para el reconocimiento entre PCNA y el DNA y para la orientación de la pinza en el DNA (Figura 11 y Figura 20), luego esta orientación debe ser necesaria para la ensambladura de una holoenzima Pol δ funcional, capaz de iniciar la replicación de un fragmento de Okazaki cebado (Figura 21).

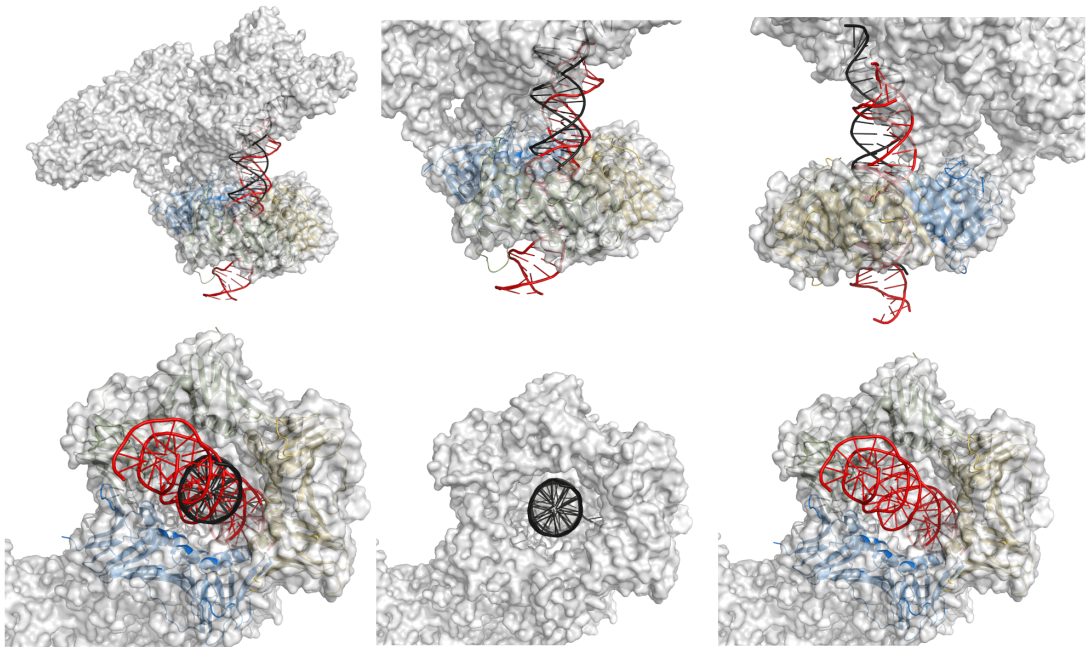


Figura 21: Distintas orientaciones del hipotético complejo PCNA - Pol Delta - DNA. Superposición en PCNA del último marco de la trayectoria del sistema PCNA-DNA (30 pb, color rojo) y la holoenzima Pol delta (PDB ID: 6TNY, DNA en color negro).

A diferencia de su homóloga de levadura, la Pol δ humana mantiene una asociación laxa con PCNA mientras replica el DNA, y por ello quizás una fracción significativa de holoenzimas Pol δ pueden disociarse antes de acabar un fragmento de Okazaki²⁸⁷. Si Pol δ se disocia prematuramente de la plantilla de la cadena rezagada, PCNA quedaría atrás en el DNA por algún tiempo, donde podría deslizarse libremente hasta que una molécula Pol δ entrante volviera a unirse para reanudar la síntesis en el extremo 3' del fragmento interrumpido. De esta forma, la manera en que el DNA se orienta y coloca en el anillo de PCNA debido a las interacciones establecidas, además de mostrarse necesaria para la actividad de la holoenzima, es fundamental para el

deslizamiento de la pinza en la búsqueda de la siguiente Pol δ pues además aseguraría que la polimerasa entrante encuentre a PCNA en la orientación correcta para reiniciar la síntesis de manera eficaz (Figura 22).

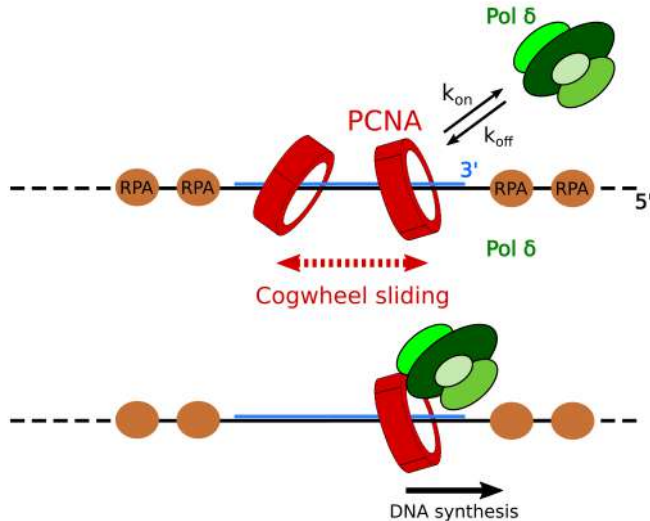


Figura 22: PCNA es cargada en la unión P/T de un fragmento de Okazaki naciente por el cargador de abrazadera RFC. El cebador híbrido de RNA-DNA del fragmento (mostrado en azul y negro) está bloqueado en ambos lados por la proteína de replicación A (RPA), que se une a la hebra molde (en color negro). La interacción de PCNA con el DNA imparte una orientación a PCNA que es competente para la unión de Pol δ y el inicio de la síntesis de DNA. Puede ocurrir una disociación prematura de Pol δ de PCNA y de la plantilla, y entonces, el mecanismo de deslizamiento de «rueda dentada» asegura que Pol δ capture a PCNA en la unión P/T del fragmento de Okazaki con la orientación correcta para reanudar la síntesis.

De acuerdo con su coeficiente de difusión ($\approx 1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$)¹⁶⁶, PCNA libre puede deslizarse sobre un fragmento de Okazaki completamente formado (100-150 nt) en menos de 0.2 ms, mientras que la incorporación de un nucleótido por Pol δ es mucho más lenta ($k_{\text{pol}} \approx 100 \text{ s}^{-1}$)²⁸⁷, lo que sugiere que el deslizamiento esporádico de PCNA fuera de la unión P/T de un fragmento sin terminar no disminuiría de forma significativa la replicación, es decir, el deslizamiento de PCNA no es el proceso limitante de la velocidad del proceso.

Cuando la holoenzima encuentra una lesión en el DNA, Pol δ se disocia de PCNA y esta es dejada atrás antes de unirse a una polimerasa de síntesis translesión especializada (TLS, por sus siglas en inglés) capaz de superar el daño y replicar más allá del mismo, y el mecanismo de deslizamiento de PCNA observado, con una orientación y posicionamiento determinados y mantenidos del DNA, podría ser importante también para el ensamblaje de complejos funcionales que implican polimerasas TLS.

Aún no ha sido determinada una estructura cristalina de alta resolución del complejo ternario PCNA-polimerasa-DNA, pues la de Claudia Lancey y Alfredo De Biasio es de criomicroscopía electrónica²⁸⁸, probablemente debido a la inherente flexibilidad del sistema, pero estructuras de microscopía electrónica de resolución media de PCNA unida a DNA y PolB o a la DNA ligasa, determinadas por Morikawa y colaboradoras/es^{164,165}, muestran que el dúplex de DNA que pasa a través de PCNA está inclinado. El trabajo computacional del grupo de Ivanov con el complejo PfuPCNA-PolB-DNA (Pfu de *Pyrococcus furiosus*) muestra que la colocación del núcleo de PolB durante el cambio conformacional desde el modo de polimerización al de edición

fuerza al DNA a inclinarse desde una cara del canal de PCNA a la otra²⁸⁹, lo que también evoca la flexibilidad de la interacción PCNA-DNA (Figura 23).

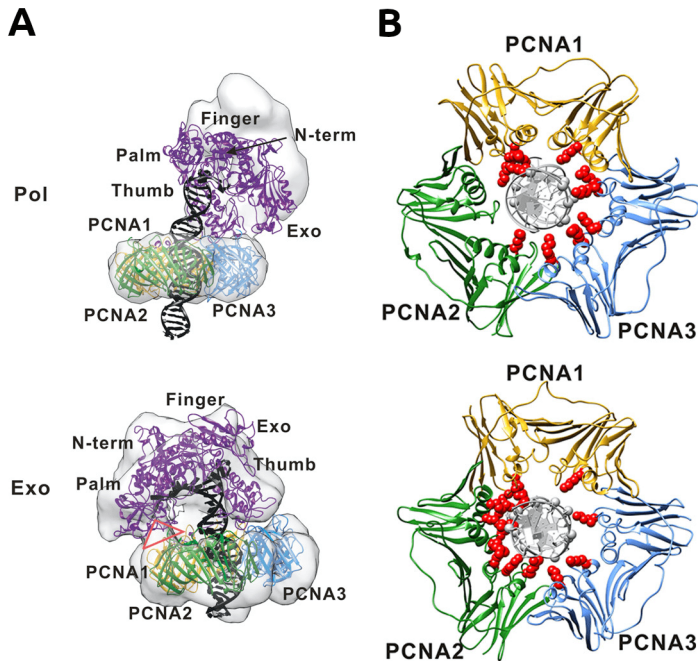


Figura 23: Las PolB y PCNA bacterianas colocan al DNA de la unión P/T en dos orientaciones distintas para cada uno de los modos de actuación, el de polimerización y el de edición. A) Modelos de resolución media de microscopía electrónica de la holoenzima PolB (pinza β unida a la polimerasa B) de *E. coli* unida al DNA en los modos de polimerización (Pol) y edición (Exo). B). (A) En esta vista azimutal, se aprecia cómo el DNA se aproxima más a subunidades diferentes de PCNA en el modo polimerización (Pol) y edición (Exo) de la holoenzima. Cada subunidad de PCNA se indica con un número y color diferente, y los grupos fosfato del DNA y los residuos cargados positivamente de PCNA involucrados en contactos persistentes entre ellos (presentes en más del 50% de la trayectoria de DM) se muestran como esferas grises y superficies rojas, respectivamente. (Figura utilizada con autorización de Xu et. al. 2016²⁸⁹).

Estas simulaciones de Xu et. al.²⁸⁹, muestran características de la interfaz pinza-DNA análogas a las observadas en nuestra estructura cristalográfica de la PCNA-DNA humana, donde cinco residuos cargados positivamente conservados se emparejan con cinco fosfatos consecutivos de una de las cadenas de DNA, lo que sugiere que esta interacción clave está conservada evolutivamente y debe estar presente en la holoenzima Pol δ .

PCNA-DNA y RFC

PCNA es cargada en el pDNA por el cargador de la abrazadera RFC, un complejo de cinco subunidades que realiza trabajos mecánicos a través de la unión de ATP e hidrólisis^{74-76,78}. La unión de ATP habilita a RFC para unir y abrir PCNA y anclarla a pDNA, y la hidrólisis de ATP lleva al cierre de PCNA y a la liberación de RFC del complejo PCNA-pDNA dejándolo libre para después poder asociarse a polimerasas y otros factores⁷⁶.

Mutaciones de los residuos R14, K20, R80 o K217 en PCNA de levadura (K14, K20, K80 y K217 en PCNA humana) provocan el ralentizado de la unión de pDNA al complejo RFC-ATP-PCNA y del posterior cierre de la pinza alrededor del pDNA después de la hidrólisis del ATP, y el

acelerado del resbalón de la pinza del pDNA²⁷⁰. Luego estos residuos, los implicados en la unión de la PCNA humana al DNA estableciendo algunas de las interacciones más importantes de la interfaz, pueden jugar un papel importante también en el cargado de la abrazadera guiando al DNA a través de la pinza abierta y hacia el cargador para formar un complejo preciso. Estos residuos pueden también asistir en la transición de la pinza desde la forma espiral abierta, necesaria para cargarse sobre el DNA, a la plana cerrada, promoviendo así la liberación de PCNA-pDNA del cargador de la pinza⁷⁶.

Por lo tanto, tras los resultados de Zhou e Hingorani²⁷⁰ sobre los residuos de PCNA fundamentales para su carga en el DNA por RFC y nuestros resultados sobre cómo la interacción con el DNA de los residuos de PCNA más importantes para la replicación dan lugar a una colocación y orientación concreta de la pinza, se puede concluir que una orientación adecuada de PCNA, fruto de las interacciones correctas, es fundamental para facilitar el cargado de la pinza en el DNA y la posterior liberación de RFC.

1.2.3. Propuesta de modelo del deslizamiento de PCNA en el DNA: mecanismo de «rueda dentada»

Como vimos, los datos de experimentos de difusión de molécula única sugieren que PCNA se mueve a lo largo del DNA usando dos modos distintos: acompañando rotacionalmente la hélice de DNA o, menos frecuentemente, por un movimiento más rápido desacoplado del paso de giro helicoidal¹⁶⁶.

Deslizamiento en modo «rueda dentada»

Nuestros resultados cristalográficos exponen una estructura del sistema PCNA-DNA asimétrica en la que el fragmento de DNA se aproxima inclinado a la cara del anillo interno de una de las tres subunidades de PCNA y donde el DNA presenta unos valores del factor de temperatura elevados que indican su gran movilidad en el interior del anillo, delatando la variedad inherente en el posicionamiento del DNA y/o la flexibilidad de la interacción entre los dos componentes del sistema. Los resultados de RMN en solución indican que la interacción del DNA con PCNA en el interior del anillo puede darse de manera equivalente con cualquiera de las tres subunidades proteicas y también que la interacción se extiende a las caras delantera y trasera de la pinza deslizante.

Además, nuestras simulaciones de dinámica molecular muestran que muchos de los residuos de PCNA en la interfaz de interacción PCNA-DNA pueden intercambiar aleatoriamente fosfatos de DNA adyacentes en una escala de tiempo inferior a los nanosegundos (Figura 24). Este proceso estocástico de cambio de la pareja de interacción generará eventualmente un estado donde se establecen simultáneamente un número suficiente de contactos de los residuos de PCNA de dicha interfaz con fosfatos adyacentes en una dirección del eje helicoidal dando como resultado una rotación neta de la proteína y el avance de un par de bases en el DNA (Figura 25).

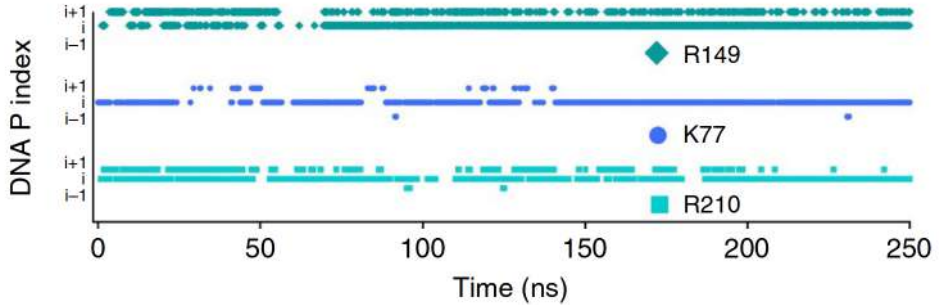


Figura 24: Evolución temporal de los contactos entre los nitrógenos de la cadena lateral de tres residuos de PCNA y átomos de fósforo del DNA en posiciones consecutivas ((i-1), i, (i+1)) de la interfaz de interacción PCNA-DNA en la trayectoria de DM del sistema PCNA-DNA con DNA de 30 pb.

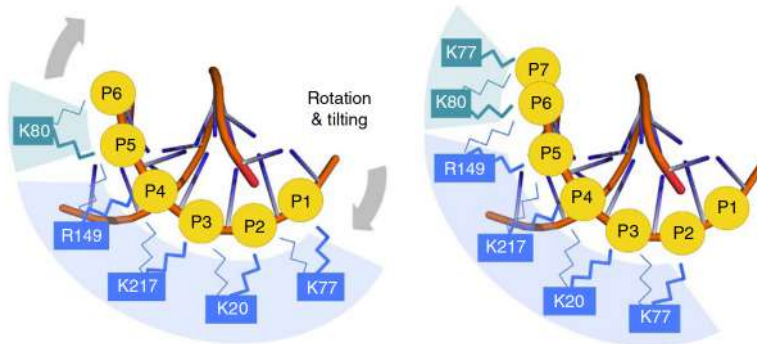


Figura 25: Las cadenas laterales que interactúan con fosforos (líneas gruesas) pueden cambiar rápidamente entre fosforos adyacentes de manera no coordinada (líneas finas). Cuando este proceso estocástico genera un estado en el que se establece simultáneamente un número suficiente de contactos electrostáticos con fosforos adyacentes en una dirección del eje helicoidal del DNA, se produce una rotación neta de la proteína dando como resultado el avance de un par de bases.

Este mecanismo de deslizamiento, que denominamos de «rueda dentada», permitiría a PCNA el seguimiento del esqueleto de fosforos del DNA (y, por tanto, el deslizamiento helicoidal) en los dos sentidos posibles manteniendo los contactos PCNA-DNA que conservan la pinza en una orientación definida relativa a la doble hélice (Figura 26); es decir, el mecanismo propuesto en base a nuestras evidencias experimentales y computacionales facultaría el seguimiento rotacional del DNA por parte de PCNA manteniéndola a la distancia y con la orientación adecuadas y constantes respecto al DNA exigidas para la interacción provechosa con las proteínas que se unen a PIP-box en general, y con Pol δ en particular.

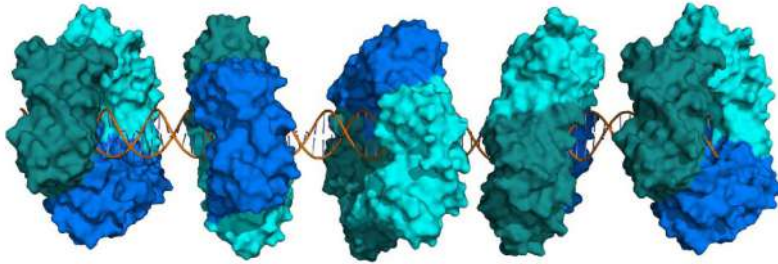


Figura 26: Propuesta de mecanismo de «rueda dentada» para el seguimiento bidireccional del esqueleto de la doble hélice de DNA por parte de PCNA. El coeficiente de difusión de PCNA ($1,16 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) implica que, en promedio, PCNA difunde por el DNA a una velocidad de 8 pb por microsegundo.

Por la simetría de la abrazadera, el DNA puede igualmente interactuar con tres sitios homólogos en el canal (y así lo demuestran, precisamente, nuestros resultados de RMN en solución). El cambio de sitio es generado por rotaciones de 120° alrededor del eje ternario del anillo y requiere la ruptura y reorganización de la interfaz pinza-DNA. Así, el cambio ocasional del DNA entre las tres posiciones equivalentes del homotrímero de PCNA puede ocurrir durante el movimiento y explicar el componente traslacional del deslizamiento de PCNA desacoplado del paso de giro helicoidal observado en el mencionado estudio de molécula única¹⁶⁶.

Por tanto, el mecanismo de «rueda dentada» propuesto tras nuestro estudio para la difusión de PCNA en el DNA es consecuencia del mantenimiento de las interacciones establecidas en la interfaz del complejo PCNA-DNA, donde el conjunto de residuos K20, K77, K80, R149 y K217 forma una hélice a derechas en la superficie interna del anillo de PCNA que coincide con el paso helicoidal del DNA y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular. Luego la orientación de PCNA es consecuencia de la interacción con el DNA y también lo es el mecanismo de difusión en modo «rueda dentada».

Para lograr una correcta interacción entre PCNA y cualquiera de sus proteínas diana, la aproximación de una de estas debe darse hacia un complejo PCNA-DNA con PCNA en la orientación correcta y requerida, por lo tanto, el mecanismo de «rueda dentada» proporciona una orientación adecuada permanente de PCNA mientras difunde. Así que la consecuencia de la orientación de PCNA en el DNA durante su movimiento es que siempre podrá ser encontrada por la Pol δ en la disposición idónea para formar una holoenzima funcional. (Figura 22 en la página 96).

Luego parece que ha quedado resuelto el problema del mecanismo molecular de la difusión de PCNA en el DNA y además hemos dado con las implicaciones funcionales que conlleva.

Consecuencias de la interacción PCNA-DNA

A la vista de todos estos resultados, parece evidente que la interacción entre PCNA y DNA es fundamental para el posicionamiento y la orientación de PCNA en el replisoma y que esto debe tener claras implicaciones en el desarrollo de su función. Una colocación concreta de PCNA sobre el DNA y su orientación respecto a él debe ser fundamental no solo para interactuar de manera adecuada con la proteína asociada en cada momento de la replicación y au-

mentar su procesividad, sino también para que esa proteína asociada adquiera la disposición óptima para realizar su actividad y, algo que resulta más interesante aún, quizás también para determinar precisamente qué proteína debe asociarse en cada momento.

Y si la interacción PCNA-DNA es la que determina el modo de movimiento de la pinza cuando difunde por la doble hélice, el modo de deslizamiento determinará que su disposición sea una u otra y además se mantenga en el tiempo. Luego el modo de movimiento de PCNA debe tener, por lo tanto, implicaciones importantes no solo en el mantenimiento de la actividad de la proteína asociada, sino también en la determinación de la proteína asociada a PCNA en cada momento. Y así, el cambio en el modo de movimiento podría contribuir, tras el cambio en la disposición entre PCNA y el DNA, a que se dé el cambio de socia y, por ende, el cambio de actividad en el replisoma.

Entonces,

- si la interacción en la interfaz PCNA-DNA 1) determina la adecuada colocación del DNA, tanto el ángulo que forma respecto al plano del anillo como la distancia al centro del mismo, en sus complejos ternarios con las diferentes proteínas catalíticas que intervienen en la replicación, lo que también 2) provoca una asimetría en el sistema PCNA-DNA que hace que los sitios de unión a PIP-box de PCNA a esas proteínas catalíticas no sean equivalentes y, por tanto, la unión a un sitio u otros sitios PIP-box no produciría el complejo ternario adecuado,
- si además es precisamente esa interacción lábil en la interfaz PCNA-DNA la que determina el modo de difusión a lo largo del DNA de PCNA, para que sea a) la simple difusión lineal rápida, que puede servir tanto para una búsqueda veloz de la siguiente socia como para un encuentro ágil con el siguiente ángulo y disposición adecuadas del DNA, o para que sea b) la difusión helicoidal, donde el ángulo y orientación adecuados de interacción con la socia correcta se mantienen,
- si también los residuos de la interfaz PCNA-DNA determinan la correcta función polimerizadora de Pol δ y de anclaje de RFC,

para que todo esto, tanto el cambio entre los dos modos de difusión como el mantenimiento de las interacciones y disposición correcta y funcional del complejo PCNA-DNA para cada enzima, se produzca de manera coordinada y la replicación ocurra de manera correcta y eficiente, parece cada vez más necesaria la actuación de algún otro componente del replisoma que orqueste estos cambios a través de la modulación de la superficie de interacción entre PCNA y el DNA.

Curiosamente, el sitio de interacción del DNA en la pared interna del anillo de PCNA se superpone parcialmente con el de p15^{PAF}, una proteína intrínsecamente desordenada que se sabe regula la TLS a través de su interacción con PCNA²⁹⁰⁻²⁹². La unión de p15^{PAF} podría modular el mecanismo de deslizamiento de PCNA y su dinámica, lo que haría a p15^{PAF} jugar un papel en la reparación del DNA y, quizás, en la orquestación de la replicación. Nos quedaremos ahora solo con esta idea y retomaremos el asunto más adelante.

Ventajas de la combinación de técnicas experimentales y herramientas computacionales

El empleo de estudios computacionales se ha convertido en una herramienta muy poderosa en Bioquímica, como así lo reconoció el Premio Nobel de Química de 2013 a Martin Karplus, Arieh Warshel y Michael Levitt «por el desarrollo de modelos multiescala para sistemas complejos»²⁹³.

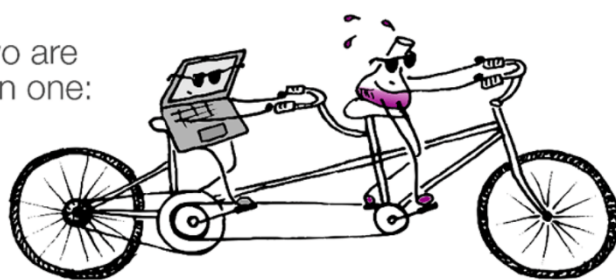
A medida que aumenta la precisión de los cálculos computacionales y las posibilidades de acceso a ordenadores más potentes, disminuye la cantidad de tiempo requerida para realizar cálculos complicados, y el uso de esto para investigar sistemas complejos se vuelve cada vez más atractivo y asequible. Particularmente en combinación con estudios experimentales, la aplicación de estudios *in silico* es una herramienta poderosa para investigaciones mecanicistas.

Por otro lado, la capacidad de los métodos computacionales para explorar a nivel atómico los sistemas biológicos con un alto grado de detalle y de manera no invasiva, son una aproximación excelente para la comprensión de los fenómenos que tienen lugar en el interior de la célula.

Los experimentos bioquímicos y espectroscópicos pueden usarse hasta cierto punto para investigar el mecanismo de actuación de un sistema, sin embargo, la complejidad de una reacción o interacción a nivel molecular y su naturaleza muchas veces fugaz puede hacer que la investigación de vías mecanicistas a través del experimento sea un auténtico desafío, si no imposible, al menos incompleto o sin resultado inequívoco. Es en estas circunstancias que la Química computacional puede proporcionar una información muy valiosa.

Varios son los ejemplos que demuestran cómo un enfoque combinado experimental y computacional puede proporcionar una visión mecanicista que con frecuencia no podría haber sido accesible con elevada certeza al utilizar solo uno de estos dos enfoques²⁹⁴⁻³⁰⁰. Uno que deja muy patente y manifiesta esta afirmación es precisamente nuestro trabajo sobre la difusión de PCNA en el DNA.

When two are
better than one:



Computation & Experiment in Synergy

Figura 27: Grafical abstract de Sperger et. al. 2016⁷⁰¹.

1.2.4. Tentativa de refutación del modelo de deslizamiento en «rueda dentada» propuesto

Daitchman y colaboradoras/es llevaron adelante un estudio, y a raíz del nuestro, en el que fueron investigadas y comparadas las interacciones entre cuatro de estas proteínas con forma de anillo, entre ellas PCNA humana, que comparten una arquitectura muy similar y la habilidad para difundir en secuencias de moléculas de dsDNA no específicas durante la regulación génica y la polimerización del DNA. Las proteínas estudiadas fueron las eucarióticas hPCNA y la proteína 9-1-1, la pinza β bacteriana, y gp45 del bacteriófago T4.

Estas cuatro proteínas tienen estructuras 3D muy similares aunque a) varían en tamaño hasta un 20%, b) hay diferencias considerables entre las formas de sus anillos internos y c) su identidad de secuencia es baja. Además, algunas de ellas son homotriméricas (PCNA y gp45), una de ellas es homodimérica (la pinza β), y la otra es un heterotrímero (la proteína 9-1-1) (Figura 28). Con su trabajo, Daitchman y colaboradoras/es encuentran que las proteínas toroidales difunden cuando están inclinadas respecto al eje del DNA y son capaces de rotar durante su traslocación, lo cual está en pleno acuerdo con resultados anteriores y también con nuestros resultados y conclusiones, pero que el acoplamiento entre la rotación y la traslación es bastante débil; además ven que su velocidad de difusión se ve afectada por la forma del anillo interno y, en menor medida, por sus propiedades electrostáticas, y que la ruptura de la simetría del potencial electrostático puede resultar en una desviación del DNA del centro del anillo y causar una difusión lineal más lenta³⁰¹.

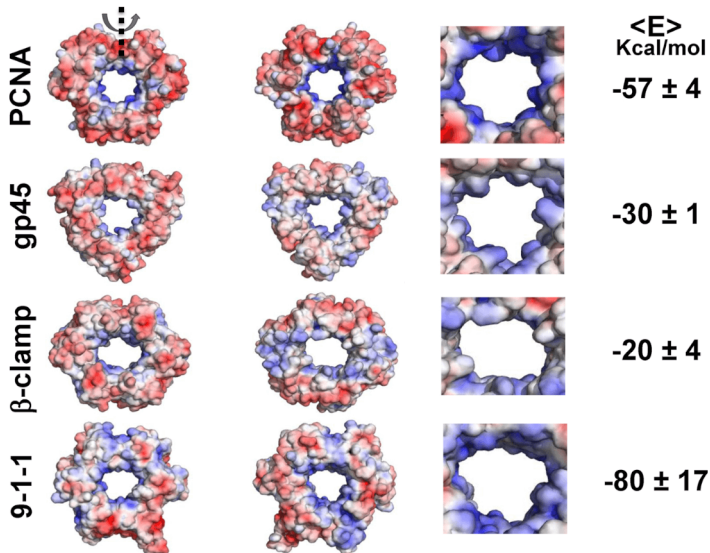


Figura 28: Mapas electrostáticos de las pinzas deslizantes PCNA, gp45, pinza beta y el complejo 9-1-1. De izquierda a derecha, se muestran los mapas electrostáticos de las proteínas se muestran de cara frontal, cara trasera y una ampliación de la parte interior del anillo en su cara trasera. El número de la derecha corresponde a la energía libre electrostática promedio del complejo proteína-DNA a una concentración salina 0,125 M. Figura utilizada con autorización de Daitchman et. al. 2018.

Por lo tanto, el análisis de la difusión lineal de Daitchman y colaboradoras/es de estas cuatro proteínas permite descifrar tres propiedades moleculares principales que gobiernan su velocidad de deslizamiento a lo largo del DNA: (i) el tamaño del anillo interno, (ii) el potencial elec-

trostático general de la proteína y (iii) la simetría geométrica y electrostática de la proteína³⁰¹. Hasta ahora, nada de esto supone un problema al modelo de «rueda dentada» propuesto con nuestro trabajo.

Interacciones electrostáticas pinza-DNA

Si bien los anillos internos de las cuatro proteínas estudiadas están todos cargados positivamente, la interacción electrostática con la carga negativa del DNA no parece gobernar, afirman Daitchman y colaboradoras/es, su velocidad de deslizamiento. Por ejemplo, encontraron que la forma más helicoidal de la pinza β impone restricciones en la dinámica del DNA que ralentizan su difusión. Aunque neutralizar los residuos cargados positivamente en el anillo interno de la pinza β aumenta su coeficiente de difusión D_1 , solo lo hace en pequeño grado, lo que sugiere que el potencial electrostático tiene un efecto menor en la velocidad de difusión que la geometría³⁰¹. De hecho, la pinza β está caracterizada por una velocidad de difusión intrínsecamente lenta, con un coeficiente de difusión 50 veces más bajo que el medido para PCNA¹⁶⁶. La superficie cargada negativamente del anillo externo tampoco parece afectar significativamente la velocidad de difusión lineal, aunque sí afecta al ángulo de inclinación de la pinza respecto al DNA³⁰¹.

Este papel minoritario que las interacciones electrostáticas entre las abrazaderas deslizantes y el DNA tienen en la difusión lineal queda, según los autores del mismo trabajo, también ilustrado por la dependencia débil del coeficiente de difusión lineal con la concentración salina³⁰¹. Conforme Daitchman y colaboradoras/es, 1) la dependencia débil entre el coeficiente de difusión y la concentración salina, 2) la observación de que el DNA está, según los resultados de sus simulaciones, centrado en el anillo interno, y 3) que PCNA sin carga puede también difundir a lo largo del DNA, sugiere que la interfaz electrostática PCNA-DNA es débil en comparación con las interfaces formadas por otras proteínas de unión a DNA, cuyos correspondientes valores de K_D son del orden de μM ³⁰². Su sugerencia de una interfaz electrostática PCNA-DNA débil está de acuerdo con nuestro valor experimental de K_D para PCNA-DNA de 0.7 mM y nuestros altos valores de los factores de temperatura del DNA en su complejo cristalizado con PCNA.

En lo que no hay concordancia es en la consecuencia que tiene, pues para Daitchman esto indica que las interacciones electrostáticas entre PCNA y DNA no tienen un efecto importante en la manera en que la primera difunde a lo largo del segundo, mientras que, según indican nuestros resultados, son precisamente esas interacciones las que marcan la disposición de PCNA en el DNA determinando la manera en la que se mueve.

Además afirman que la interacción electrostática PCNA-DNA no gobierna la velocidad de deslizamiento pero, si la interacción gobierna el modo de deslizamiento y es el modo de deslizamiento lo que determina la velocidad de la difusión de PCNA en el DNA, entonces son las interacciones electrostáticas las que en última instancia están dirigiendo la velocidad a la que se produce la difusión. De todos modos, esta conclusión de Daitchman y colaboradoras/es podría encajar más con la noción de que solo el efecto de las interacciones no puede explicar la velocidad de deslizamiento, pues, como ya ha sido anticipado la idea, p15^{PAF} puede estar interviniendo para modular el mecanismo de deslizamiento de PCNA y su dinámica actuando como modificadora de la geometría del anillo, como parece que tiene mayor importancia (entiéndase la geometría vs las interacciones electrostáticas) según el estudio de Daitchman.

También hay que resaltar que las simulaciones de Daitchman y colaboradoras/es, aunque con muchas más réplicas y trayectorias más largas que en nuestro estudio, son simulaciones de

DM grano grueso y no simulaciones de DM atómica como las nuestras, luego carecen de resolución suficiente como para observar en la interfaz PCNA-DNA las cadenas laterales de los residuos de PCNA más importantes para su función en el replisoma y difusión interaccionando con los fosfatos, y es por esto que pueden estar otorgando una importancia inferior a estas interacciones de la que realmente tienen.

Simetría del sistema PCNA-DNA

Daitchman y colaboradoras/es también estimaron la energía libre de unión electrostática de nuestra estructura cristalográfica (PDB ID: 6GIS), donde el DNA está más próximo a una de las subunidades de PCNA, y en complejos PCNA-DNA donde el DNA sí se encuentra en el centro del anillo de PCNA, y concluyeron que los puentes salinos formados en la interfaz PCNA-DNA de nuestra estructura son demasiado débiles y que, por tanto, durante la difusión lineal, el DNA tiende a mantenerse cerca del eje central en el anillo interno de la cavidad de PCNA (Figura 29), lo que defienden razonable dada la distribución simétrica de carga positiva alrededor de la superficie del anillo interno de PCNA, pinza β y gp45. De hecho, solo observaron una estrecha interacción del DNA con una subunidad dada de la pinza o cuando el potencial electrostático simétrico del interior del anillo fue roto por modificación de los residuos cargados de una o dos subunidades, o en el caso de la proteína heterotrimérica 9-1-1, con una distribución de cargas en el anillo interno asimétrica *per se*³⁰¹.

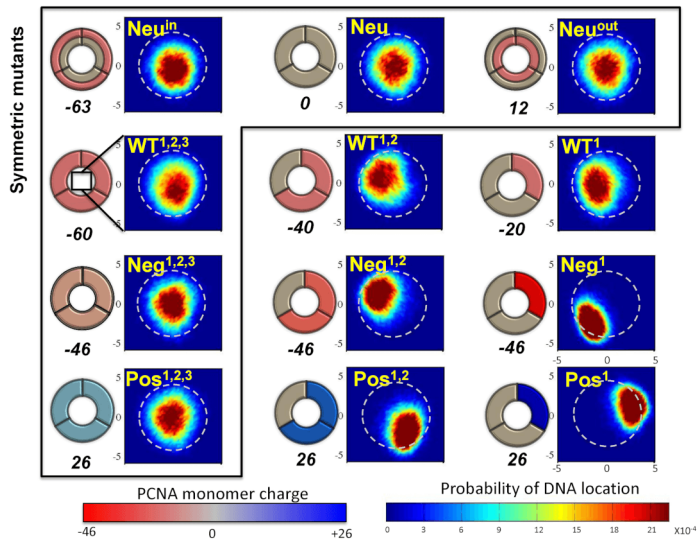


Figura 29: Esquemas y mapas de probabilidad de localización del DNA en el centro de distintas variantes de PCNA. El conjunto llamado Neu incluye variantes en las que se neutralizaron diferentes cargas y el conjunto WT incluye variantes cuyos monómeros llevan las mismas cargas que PCNA sin mutar. Figura reproducida con permiso de Daitchman et. al.³⁰¹.

Daitchman achaca nuestros resultados con un DNA desplazado de la posición central del anillo de PCNA a unas dinámicas demasiado cortas. Pero lejos de considerar que 250 ns sea tiempo insuficiente para que el sistema llegue a una conformación biológicamente relevante³⁰³⁻³⁰⁶, una simulación del mismo sistema mucho más larga (más de 1 μ s) y realizada no para rebatir el trabajo que se discute en esta sección sino como un intento de conseguir visualizar el giro de

PCNA rastreando la hélice, muestra el DNA abandonando también el centro del anillo para situarse próximo a una de las subunidades equivalentes de la pinza (Figura 30).

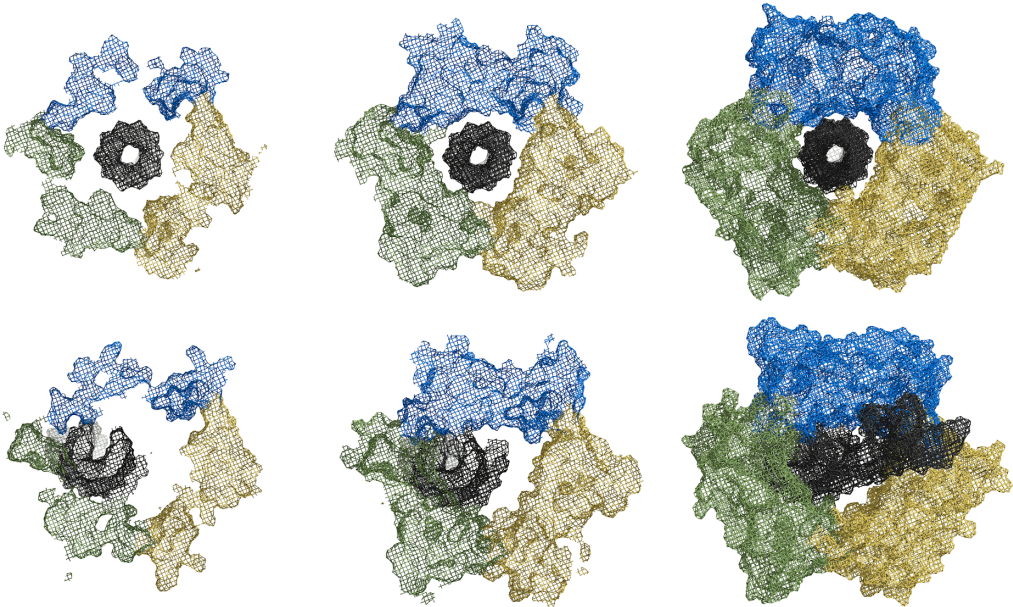


Figura 30: Diferentes cortes del mapa de densidades del sistema PCNA-DNA con un DNA de 30 pb. En el caso superior, el DNA es perpendicular al plano del anillo de PCNA y en el caso inferior el DNA forma un ángulo de 30° con el plano del anillo de PCNA. Es apreciable que el hueco libre que deja la doble hélice de DNA en el anillo interno de PCNA es superior cuando se aproxima inclinado hacia una de las tres subunidades de PCNA.

Una simulación de DM de 1 μ s ya sí entra en la escala de tiempo del orden de las reacciones enzimáticas³⁰⁷, y en esa dinámica, aunque no conseguimos ver el giro de PCNA (objetivo que tenía dicha simulación), el DNA también se acerca en la cara interna del anillo a una de las subunidades de PCNA.

De todos modos, que durante la difusión lineal de PCNA en el DNA este se encuentre en el centro del anillo como en las simulaciones de Daitchman no es incompatible con el modo de difusión de «rueda dentada» propuesto, pues este modo de difusión corresponde a la fracción helicoidal, mayoritaria por otro lado, del movimiento traslacional de la pinza a lo largo del DNA. Luego el estado que define Daitchman en su trabajo parece corresponder a la fracción de difusión lineal del movimiento traslacional de PCNA. Aún así, nuestras numerosas simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA en diferentes condiciones computacionales, así como otras precedentes como las de Ivaylo Ivanov, siempre muestran al DNA más próximo a una subunidad del homotrímero y no en el centro del anillo.

Pero es que, asimismo, esta predisposición del DNA a aproximarse a PCNA es la que determina, además de la asimetría del sistema -importante para la correcta colocación de la proteína PIP-box oportuna-, que la difusión lineal de la pinza se dé también con la doble hélice lejos del centro, produciéndose (la difusión lineal) por el cambio de subunidad de PCNA por parte del DNA pero manteniendo las mismas interacciones para conservar así la asimetría de la cara frontal de la abrazadera y su inclinación, verdadera moduladora de la velocidad de deslizamiento cuando no existe la intervención de otro componente en el sistema.

Luego aunque, *a priori*, parecía que el modelo conseguido por Daitchman y colaboradoras/es podría explicar el modo lineal de la difusión de PCNA y el nuestro el modo helicoidal, y los dos ser estados diferentes, complementarios y no excluyentes para explicar el movimiento de PCNA a lo largo del DNA, nuestros datos experimentales y computacionales, y también otros anteriores, parecen indicar que no es así y que realmente el DNA está alejado del centro en el sistema PCNA-DNA incluso en la difusión desacoplada del giro helicoidal.

Inclinación de las pinzas

Daitchman encontró ángulos de inclinación respecto al eje del DNA para las cuatro proteínas que estudiaron de $\approx 10^\circ \pm 5^\circ$ ³⁰¹. Considerando que este ángulo depende de la geometría y potencial electrostático del anillo interno, así como de la electrostática del anillo externo, cambiaron el ángulo de inclinación de las abrazaderas modificando el potencial electrostático por mutaciones y encontraron un pequeño ladeo de $\approx 5^\circ$ para una variante de PCNA cargada negativamente completamente y para una variante con el anillo interno neutralizado; por el contrario, midieron un ángulo de inclinación de $\approx 20^\circ$ para variantes estrictamente cargadas positivamente³⁰¹.

Encontraron también que la inclinación de PCNA aumenta para concentraciones salinas más altas³⁰¹, sugiriendo que la disminución de las interacciones electrostáticas entre PCNA y DNA puede afectar dicho ángulo, lo que coincide con su estudio de mutaciones. El valor del ángulo de inclinación encontrado por Daitchman y colaboradoras/es para las abrazaderas de su estudio, incluida PCNA, como acabamos de decir es $\approx 10^\circ$, valor bastante más pequeño que el de $\approx 22^\circ$ encontrado en la estructura cristalográfica de la pinza β con dsDNA de 10 pb¹⁶³ y mucho más reducido aún que el que encontramos en nuestras simulaciones ($\approx 30^\circ$).

Las estructuras cristalográficas de PCNA con DNA muestran ángulos de inclinación de 15° , como es el caso de la nuestra (PDB ID: 6GIS), 16° ^{164,165} o de $\approx 40^\circ$ ¹⁶¹. Sin embargo, nuestras simulaciones de dinámica molecular y las de Ivanoc proporcionan ángulos de inclinación de 30° o de 20° ¹⁶² respectivamente. Como ya se ha anotado, la desviación entre las simulaciones grano grueso con las que trabaja Daitchman y las nuestras, atomísticas, puede provenir del empleo de un modelo de baja resolución, principalmente porque las cadenas laterales no están explícitamente representadas; y con las de Ivanov, de la corta escala de tiempo en comparación con las nuestras. Pero Daitchman y colaboradoras/es opinan que nuestra dinámica de 250ns, a pesar de haber llegado a convergencia, sigue siendo demasiado corta y de ahí la discrepancia entre nuestros resultados y los suyos.

En nuestras simulaciones empleamos dsDNA de diferente número de pares de bases y vimos que el ángulo que toma PCNA respecto al eje del DNA depende de la longitud de la doble hebra ($\approx 10^\circ$ cuando usamos 10 pb, y $\approx 30^\circ$ cuando son 30 pb), y además empleamos un campo de fuerzas parametrizado para DNA, el parmBSC1. En el trabajo de Daitchman, las simulaciones corren con un campo de fuerzas de AMBER sin especificar y con una hebra de DNA de 200 pb que además representan como una molécula rígida y estática tal y como explican, evitando así una de las características fundamentales de la interacción, la flexibilidad.

Pero cierto es que podemos achacar los diferentes ángulos de inclinación obtenidos en los diferentes estudios a la flexibilidad inherente del sistema, y cierto es también que todos estos trabajos están de acuerdo en que las pinzas difunden a lo largo del DNA mientras están inclinadas respecto al eje del DNA, y que este ángulo de inclinación relativo al DNA se encuentra también en complejos proteína-pinza con más componentes^{289,308}. Cada proteína que se une a

PCNA para llevar a cabo su función en el replisoma necesitará un ángulo de inclinación del DNA y una distancia a este óptimas diferentes, pues sus centros catalíticos tienen diferentes geometría y posicionamiento respecto al dominio de unión a PCNA, luego encontrar diferentes inclinaciones de la pinza y colocaciones del DNA en el centro del anillo en las distintas estructuras cristalográficas y simulaciones de dinámica molecular indica que el sistema es muy flexible, algo indispensable para poder adecuar la estructura del complejo PCNA-DNA a cada polimerasa. Luego no se puede hablar de un ángulo de inclinación de PCNA correcto, ya que eso, que sea el correcto o no, dependerá del complejo y estado al que nos refiramos.

Pero si el problema es una longitud de trayectoria del sistema PCNA-DNA demasiado corta, a pesar de que los valores de RMSD nos indican el alcance de convergencia, la solución es fácil. Como ya se ha mencionado al hablar de la simetría del sistema en esta misma sección, buscando corroborar nuestro modelo de difusión de «rueda dentada» de PCNA a lo largo del DNA, pretendiendo para ello ver que PCNA llega a efectuar un giro en su movimiento, y antes del trabajo de Daitchman y colaboradoras/es, se corrieron trayectorias mucho más largas. La inspección visual y los valores de RMSD del sistema a lo largo de la trayectoria nos indicaron la convergencia del sistema y además que a los 250ns ya se había alcanzado. En ellas no vimos girar la pinza alrededor del DNA (más allá de unos pocos grados), pero siguen mostrando un ángulo de inclinación de PCNA en concordancia con los obtenidos en las simulaciones de 250ns, en las que el DNA tiene la misma longitud.

Mecanismo de difusión de PCNA

Según Daitchman y colaboradoras/es, de su estudio emerge a) que el mecanismo de difusión de PCNA a lo largo del DNA implica al anillo de la abrazadera en una combinación de rotación y traslación a lo largo del DNA, lo que concuerda con los dos modos de difusión ya publicados obtenidos a partir de los experimentos de molécula única de Kochaniak y colaboradoras/es¹⁶⁶, y b) que la rotación de PCNA a lo largo del DNA puede resultar en un coeficiente de difusión lineal pequeño independientemente del grado de acoplamiento entre la rotación y la traslación del anillo a lo largo del DNA³⁰¹.

En cualquier caso, nuestro trabajo proporciona un modelo que justifica el modo de difusión helicoidal de PCNA a lo largo del DNA, basado en múltiples resultados, experimentales y computacionales, en los que el DNA no permanece en el centro del anillo interno de PCNA y en los que se observan las múltiples, lábiles y concretas interacciones establecidas entre determinados residuos de la pinza y el esqueleto de fosfatos de la doble hélice. Aunque también es cierto que aún no hemos conseguido ninguna simulación de dinámica molecular en la que PCNA rote siguiendo el giro del DNA como pronostica nuestro modelo de modo de «rueda dentada».

Puede que el resultado de Daitchman se deba simplemente a que sus condiciones de simulación han encontrado otro modo o estado del sistema PCNA-DNA, aquel en el que difunde linealmente a lo largo del DNA manteniendo las mínimas interacciones, y que permite el traslado rápido de PCNA hacia otro sitio en el DNA, pero que no es eficaz para el encuentro adecuado con la enzima necesaria en el replisoma. O puede que sus resultados nos estén indicando que quizá debamos reconsiderar la idea de una rotación y traslación acopladas más que una combinación de dos modos.

La pregunta ahora entonces es ¿y si se produce la rápida difusión lineal solo cuando el DNA, de manera estocástica, queda colocado en el centro del anillo de PCNA donde las interacciones electrostáticas que se pueden establecer son simétricas y de la misma intensidad? ¿Y si la ori-

entación de la pinza en el DNA va después de la unión a otra proteína y no al revés, y es el hecho de estar unida PCNA a su proteína diana la que hace que el modo de difusión sea helicoidal con el DNA lejos de una posición central en el canal del anillo? ¿Y si para producirse el mecanismo de giro que evidencian nuestros resultados es necesaria la actuación de algún otro componente en el sistema?

1.3. Compendio de resultados y conclusiones

La estructura cristalográfica obtenida es la primera conseguida del sistema hPCNA-dsDNA (PDB ID: 6GIS) y muestra una molécula de DNA de cadena doble de 10 pb enhebrada a través de la PCNA humana, más próxima a una de las subunidades del homotrímero, y con su eje longitudinal formando un ángulo de 15° con el eje C3 del anillo.

El análisis de la estructura cristalográfica proporciona unos valores elevados de los factores de temperatura en la interfaz de contacto entre PCNA y el DNA, lo que es compatible con una ocupación parcial del canal de PCNA por el DNA y/o con la existencia de una subpoblación diferente del complejo PCNA-DNA donde el DNA se halle en una orientación ligeramente diferente. Esto indica la gran movilidad del DNA en el interior del anillo, es decir, delata la gran flexibilidad del sistema y la variedad inherente en el posicionamiento del DNA, así como la capacidad de acomodación del sistema PCNA-DNA a diferentes conformaciones.

Tal y como muestra la estructura cristalográfica, la interfaz del complejo PCNA-DNA implica las cadenas laterales de cinco residuos básicos de PCNA: cuatro (K20, K77, R149, H153 y K217) distribuidos en cuatro α -hélices de una subunidad de PCNA, y la cadena lateral de un quinto residuo (K80) en la α -hélice más próxima de la subunidad adyacente. Las cadenas laterales de estos aminoácidos de PCNA que forman el conjunto de residuos básicos del canal del anillo de reconocimiento del DNA, configuran una espiral a derechas que coincide estrechamente con el paso de giro o frecuencia helicoidal del DNA-B y están implicadas en contactos polares con cinco fosfatos consecutivos de una única cadena de dsDNA.

En la estructura cristalina no existen contactos entre el DNA y otras moléculas relacionadas con la simetría como ocurría en el caso de la pinza β .

Nuestros experimentos de RMN de la unión de PCNA al sustrato P/T de DNA muestran que el pDNA se une a la pared interior del canal de PCNA pero no a PIP-box. Tanto estos resultados como la inexistencia de contactos con moléculas cristalográficamente relacionadas sugieren que las pinzas bacteriana y eucariótica reconocen el cebador o iniciador de DNA de manera diferente.

La valoración de PCNA con dsDNA muestra una unión débil ($K_D \approx 0.7$ mM) en el interior del anillo. Las perturbaciones del desplazamiento químico de los grupos amida del esqueleto proteico son pequeñas, y la tasa de intercambio τ_{ex} es rápida, lo que es consistente con la baja afinidad de la interacción, y en concordancia con los resultados cristalográficos de valores altos de factores de temperatura del DNA.

Los residuos de PCNA que establecen contactos con el DNA en solución según los resultados de RMN son D21, T73, A145, S152, G155, G176 N213 y A218 en la cara frontal de la pinza, I11, K14, G83, I87, E143 y T224 en la cara trasera, y K77, D86, R149 y H153 en la cara interna.

Según los resultados de RMN, la interacción del DNA con una de las subunidades de PCNA se puede dar con igual probabilidad con cualquiera de las tres, es decir, la interacción en el interior del anillo puede darse de manera equivalente con cualquiera de las tres subunidades proteicas y además la interacción se extiende a las caras delantera y trasera de la pinza deslizante.

Nuestras simulaciones de 100 ns de PCNA formando complejo con un dsDNA de 10 pb predicen una interacción altamente dinámica, de acuerdo con todas nuestras observaciones experimentales.

Las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA, con dsDNA tanto de 10 pb (de 100 ns) como de 30 pb (de 250 ns), confirman la disposición vista en la estructura cristalográfica en la que el DNA se aproxima a la cara interna del anillo de PCNA y no permanece en el centro, e indican que los 25 ns de las simulaciones de Ivanov son insuficientes para que el sistema alcance una conformación estable.

A lo largo de la simulación de dinámica molecular de 100 ns del sistema PCNA-DNA, el DNA pasa de una posición inicial a una final que equivale al desplazamiento del DNA en la estructura cristalográfica de dos pares de bases a lo largo de su eje helicoidal. El análisis de distancias de los contactos polares intermoleculares a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular de 100 ns indica que residuos de la cara trasera del anillo (S10, K14, K84) contribuyen también a conducir el DNA al estado final en el que se ha producido este avance en dos pares de bases.

Las interacciones en la cara trasera de PCNA observadas en la trayectoria de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA son consistentes con las observadas tras el análisis de perturbaciones de RMN, lo que confirma que, en solución, el DNA puede acceder a regiones de la pinza que no se manifiestan en la estructura cristalográfica.

La simulación de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA de 250 ns apoya el resultado de una doble hélice de DNA interaccionando simultáneamente y de forma dinámica con dos conjuntos de residuos en dos subunidades adyacentes de PCNA, tanto en la cara interna del anillo, como en la frontal y en la trasera. Según los resultados de las simulaciones, los residuos de PCNA que establecen contactos con el DNA son: a) en el interior del anillo, K20, K80 y N84 de una subunidad, y R149, K217, K80 y N84 de la subunidad adyacente, b) en la cara frontal, R210 en una subunidad y K77 y K20 en la contigua, y c) en la cara trasera, S10 y S223 en un monómero y K14 en el de al lado.

Las simulaciones de dinámica molecular, tal y como ocurre en la estructura cristalográfica, muestran que los residuos del interior del canal de PCNA implicados en las principales interacciones con el DNA forman una hélice a derechas en la superficie interna del anillo de PCNA que coincide con el paso helicoidal del DNA de forma B y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular.

El DNA al final de las trayectorias de 250 ns, de longitud 30 pb, muestra una inclinación respecto al plano del anillo de PCNA más pronunciada ($\approx 30^\circ$) comparada con la de la estructura cristalográfica (15°), de 10 pb, la de nuestras simulaciones de 100 ns, también con el DNA de 10pb ($\approx 12^\circ$), y la de las simulaciones de Ivanov (20°), de 28 pb de longitud.

Nuestros estudios muestran, por un lado, que una longitud de DNA de 10 pb es insuficiente para tener un resultado, tanto experimental como computacional, acorde con la realidad, pues un fragmento tan pequeño comparado con el tamaño del anillo interno de PCNA puede moverse libremente pudiendo llegar a tomar posiciones que serían imposibles si la longitud fuera más larga, pues la estructura de la doble hélice penetraría en la de PCNA; y por otro lado, que hacen falta al menos 60 ns de simulación para que las dinámicas moleculares del sistema PCNA-DNA lleguen a convergencia y muestren valores de los parámetros biofísicos que podamos considerar como próximos a la realidad.

Las interacciones que se dan entre residuos de PCNA y fosfatos de DNA en la interfaz del complejo, además de ser fundamentales para el deslizamiento de la pinza, mantienen la orientación de la pinza invariante en relación con la doble hélice, y una pinza correctamente orientada en el DNA, consecuencia del establecimiento de estas interacciones adecuadas en la interfaz PCNA-DNA, es necesaria para el ensamblaje de una holoenzima PCNA-pol δ de replicación competente.

El gran número de interacciones débiles establecidas vistas con nuestra aproximación experimental y computacional proporciona al sistema PCNA-DNA una gran estabilidad y flexibilidad, características fundamentales para colocar a PCNA en el centro del replisoma.

La inclinación de PCNA anclada en el DNA provoca la asimetría del sistema y, por tanto, la ruptura de la equivalencia de los tres sitios de unión a PIP-box. Esta asimetría de la pinza y, en consecuencia, de sus sitios de unión a las diversas proteínas y factores con las que interactúa, podría ser determinante para establecer quién, cómo, cuándo y dónde se une a la pinza.

En todas las trayectorias obtenidas, tanto en las presentadas en esta tesis como en otras también analizadas pero no presentadas aquí, el DNA no permanece en el centro del anillo de PCNA y se aproxima a una de sus subunidades, hecho que contribuye también a la asimetría del complejo PCNA-DNA.

El posicionamiento del DNA más próximo a una subunidad de PCNA, así como la inclinación u orientación de ésta, debe proporcionar un DNA en la disposición adecuada para encajar en el bolsillo de Pol δ para que ésta actúe sobre él, y es por esto que en la replicación eucariota no es necesario un «marcador de posición» como ocurre en la bacteriana.

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que muchos de los residuos de PCNA en la interfaz de la interacción PCNA-DNA pueden intercambiar aleatoriamente fosfatos de DNA adyacentes en una escala de tiempo inferior a los nanosegundos. Este proceso estocástico de cambio de la pareja de interacción generará eventualmente un estado donde se establecen simultáneamente un número suficiente de contactos de los residuos de PCNA de dicha interfaz con fosfatos adyacentes en una dirección del eje helicoidal dando como resultado una rotación neta de la proteína y el avance de una par de bases del DNA.

Proponemos, por tanto, un mecanismo molecular de difusión de PCNA a lo largo del DNA al que denominamos de «rueda dentada» y en el que la pinza se desliza siguiendo el esqueleto de fosfatos mediante el establecimiento de interacciones polares efímeras en la interfaz del complejo entre los residuos K77, K20, K217, R149 (de una subunidad) y K80 (de la contigua) de PCNA con cinco fosfatos i consecutivos del esqueleto de DNA más intensas, e interacciones menos intensas entre esos mismos residuos y los fosfatos $(i+1)$ e $(i-1)$.

El mecanismo de tipo «rueda dentada» es consecuencia, pues, del mantenimiento de las interacciones entre los residuos de PCNA K20, K77, K80, R149 y K217 que forman una hélice a derechas en la superficie interna del anillo que coincide con el paso helicoidal del DNA y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular. Este mecanismo de deslizamiento permitiría a PCNA el seguimiento del esqueleto de fosfatos del DNA en los dos sentidos posibles, manteniendo los contactos PCNA-DNA que conservan la pinza en una posición definida relativa a la doble hélice, manteniéndola a la distancia y con la orientación adecuadas y constantes respecto al DNA exigidas para la interacción provechosa con las proteínas que se unen al bolsillo de unión a PIP-box en general, y con Pol δ en particular.

El mecanismo de «rueda dentada» proporciona una orientación adecuada permanente de PCNA mientras difunde para que Pol δ la encuentre en la disposición idónea para formar una holoenzima funcional. El cambio ocasional del DNA entre las tres posiciones equivalentes del homotrímero de PCNA, hecho apoyado también por nuestros resultados de RMN, podría explicar el componente desacoplado del paso de giro helicoidal del deslizamiento de PCNA, cambio que podría estar asociado a la liberación de Pol δ para un cambio también en la disposición de PCNA y, por tanto, de su socia.

Todo este conjunto de resultados y conclusiones muestra que un enfoque combinado de técnicas experimentales y herramientas computacionales puede proporcionar una visión mecanicista difícil de conseguir mediante el empleo de solo una de estas dos aproximaciones.

2. Regulación de PCNA

La pinza deslizante PCNA se encuentra en el corazón de la duplicación precisa de los genomas eucariotas.

Su anillo presenta dos superficies distintas estructural y funcionalmente, la cara exterior y la cara del interior del anillo. Dos décadas de estudios han dado a conocer muchas características de su cara externa, detalles que tienen que ver con su interacción con otras proteínas y las modificaciones postraduccionales que controlan su función en la replicación y la reparación del DNA y otros procesos celulares fundamentales.

La cara interna del anillo, dedicada, como hemos visto, a la interacción con el DNA, está evolutivamente conservada y sus residuos crean una superficie específica que reconoce la columna vertebral del DNA y permite a la pinza deslizarse siguiendo rotacionalmente la doble hélice.

La superficie deslizante se puede modular (i) a través de la acetilación de lisina, lo que desencadena la degradación de PCNA durante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) o la estimulación de la reparación por recombinación homóloga (HR), o (ii) mediante la unión de p15^{PAF}, lo que desactiva el baipás de lesión (TLS) en el DNA.

La superficie interna del anillo de PCNA está, sorprendentemente, altamente regulada para controlar la resistencia al daño en el DNA, y es crucial para la función de PCNA como factor de procesividad durante la replicación, y coloca a PCNA, aún más si cabe, como factor central para controlar la estabilidad genómica. El papel decisivo de esta cara de PCNA en la replicación plantea una nueva perspectiva en cuanto a la modulación de la pinza, y las modificaciones que en ella se den tendrán consecuencias en el mecanismo de deslizamiento de «rueda dentada» propuesto y posiblemente también en la función de PCNA en los procesos en los que está implicada como la replicación procesiva del DNA, NER, HR y TLS.

Desde un punto de vista estructural, estos hallazgos abren una nueva perspectiva sobre la función de PCNA y ofrecen oportunidades para desarrollar herramientas para manipular la respuesta al daño del DNA y emplearse como instrumento en el tratamiento del cáncer.

2.1. Modificaciones postraduccionales de PCNA

La modificación postraduccional (MPT) es un cambio químico ocurrido en una proteína después de su síntesis por los ribosomas (proceso de traducción). Es uno de los pasos finales de la síntesis de proteínas y, por lo tanto, de la expresión génica. Muchas proteínas no podrían ejercer sus funciones si no sufrieran estos cambios. Este cambio que supone la modificación postraduccional amplía las posibles funciones de la proteína al unirle otro grupo químico funcional (como un acetato, lípidos o glúcidos, por ejemplo), o provocando cambios estructurales (como la formación de puentes disulfuro). Otras modificaciones como la fosforilación, son parte habitual de los mecanismos para controlar el estado de funcionamiento de la proteína, por ejemplo activando o inactivando una enzima.

Las MPT ocurren mediante cambios químicos de los aminoácidos que constituyen la secuencia de las proteínas y pueden ser a) modificaciones que añaden grupos funcionales, como acilación (adición de grupo acilo), fosforilación (adición de grupo fosfato), metilación (adición de grupo metilo), glucosilación (adición de un glúcido), nitrosilación (adición de un grupo nitroxilo), prenilación (adición de moléculas hidrofóbicas), etc., o b) modificaciones que enlazan proteínas, como la SUMOilación (adición de la miniproteína SUMO, siglas de su nombre en inglés *small ubiquitin-related modifier*) o la ubiquitinación (adición de ubiquitina).

2.1.1. Tipos de MPT en PCNA

Las modificaciones postraduccionales generalmente modulan las funciones de sus proteínas diana creando, bloqueando o modificando las superficies de interacción³⁰⁹.

La abrazadera deslizante eucariótica, PCNA, actúa como una coordinadora central de operaciones en el DNA proporcionando una superficie de interacción multivalente para factores implicados en la replicación y reparación del DNA, la dinámica de la cromatina y la regulación del ciclo celular. MPT como la mono- y la poliubiquitinación, la SUMOilación, la fosforilación y la acetilación, no solo amplían aún más el repertorio de las socias vinculadas a PCNA, además estas modificaciones afectan la actividad de PCNA en el baipás de las lesiones durante la replicación del DNA, la regulación de vías de procesado del daño alternativas como la recombinación homóloga y la reparación por entrecruzamiento de cadenas del DNA, o influyen en la propia estabilidad de PCNA³⁰⁹.

2.1.2. Consecuencias de las MPT en PCNA: regulación de PCNA

Una replicación precisa del DNA es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. El daño en el DNA surge tanto por los productos del metabolismo celular como por fuentes exógenas, incluidas las especies reactivas de oxígeno, la radiación UV, rayos X, los compuestos químicos, etc., y las lesiones resultantes pueden alterar la replicación. Las células tienen múltiples mecanismos para reparar daños en el DNA y evitar el bloqueo de la horquilla de replicación, y entre todos engloban la llamada tolerancia al daño en el DNA³¹⁰.

La tolerancia al daño es modulada en las horquillas de replicación como primera barrera que asegura una replicación eficiente y procesiva del genoma; cuando ese daño no es convenientemente reparado, se producen mutaciones, y si después la célula no entra en apoptosis, la mutación puede ser fuente de patologías. Conocer los mecanismos funcionales de las rutas para

reparar estos daños y evitar el bloqueo de la horquilla de replicación es crucial para entender los procesos de pérdida de estabilidad genómica, característica de las células tumorales³¹¹.

La ruta de tolerancia al daño tiene un papel clave en proteger la viabilidad celular durante la replicación y lo hace de dos formas diferentes, bien promoviendo el uso de DNA polimerasas especializadas alternativas, o bien mediante el cambio de molde para evitar aquellas lesiones en el DNA que bloquean la síntesis procesiva normal. Ambas ramas de la tolerancia son controladas mediante la ubiquitinación de PCNA. Experimentos llevados a cabo en levadura muestran que las ubiquitin-proteasas Ubp10 y Ubp12, que actúan en las propias horquillas de replicación, revierten *in situ* la ubiquitinación de PCNA tan pronto como esta se produce, y, de esta forma, evitan tanto el reclutamiento de las DNA polimerasas de translesión como el cambio de molde en los sitios de síntesis *de novo* de DNA³¹¹.

El daño en el DNA se repara por escisión del trozo dañado seguida de resíntesis con el uso de una plantilla no dañada. No obstante, estos sistemas de reparación no operan con una eficacia total y a veces una DNA polimerasa replicadora encuentra una lesión, como es un dímero de pirimidinas o un sitioapurínico, que no se reparó. A causa de que estas lesiones constituyen obstáculos para la progresión de la DNA polimerasa, la maquinaria replicativa tiene que intentar copiar a través de la lesión o se ve forzada a detener la duplicación. Incluso si las células no pueden reparar estas lesiones, hay un mecanismo de seguridad que permite que la maquinaria replicativa se salte estos sitios de lesión. Este mecanismo se conoce como síntesis translesión. Aunque es muy propenso a cometer errores y, por ende, es muy probable que genere mutaciones, la síntesis translesión le ahorra a la célula el peor destino de tener un cromosoma duplicado de manera incompleta.

La síntesis translesión, o TLS por sus siglas en inglés, es catalizada por DNA polimerasas especializadas, distintas a las que intervienen en la replicación, que pueden insertar un nucleótido en el lugar de la lesión del DNA dañado.

Cuando las células se exponen a la radiación UV, se producen fundamentalmente dos tipos de lesiones en el DNA³¹²⁻³¹⁴, los llamados fotoproductos (PP por sus siglas en inglés), y los dímeros de ciclobutano y pirimidina (CPD por sus siglas en inglés). Los PP se arreglan rápidamente mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, mientras que los CPD se reparan mucho más lentamente³¹² y, en consecuencia, son un obstáculo importante para la replicación del DNA. Pol η , miembro de la familia Y de polimerasas, al igual que Pol ι , Pol κ y REV1, todas ellas con actividad TLS, es capaz de sortear los CPD de manera eficaz y precisa³¹³⁻³¹⁵, evitando la detención de la replicación del DNA inducida por luz UV y la mutagénesis. Sin embargo, la fidelidad de la síntesis de DNA por parte de Pol η en la plantilla no dañada es bastante baja³¹⁶. Debido a que las otras polimerasas TLS también catalizan la síntesis de DNA con baja fidelidad, TLS es generalmente una vía propensa a errores^{317,318} y, por lo tanto, debe controlarse de manera estricta en las células. Sin embargo, desde la perspectiva celular, el potencial para introducir mutaciones durante la síntesis translesión es menos peligrosa, como ya se ha indicado, que continuar el ciclo celular con un cromosoma incompletamente replicado.

La síntesis de translesión plantea varias cuestiones fascinantes que hasta el presente no tuvieron respuesta. ¿Cómo reconoce la polimerasa de síntesis translesión una horquilla replicativa detenida? ¿Cómo reemplaza esta enzima TLS a la polimerasa duplicadora normal en el complejo de replicación del DNA? Una vez que la síntesis del DNA se extendió a través de la lesión, ¿cómo retorna la polimerasa duplicadora normal y reemplaza a la enzima translesión en la horquilla replicativa? Las polimerasas TLS tienen poca procesividad, de modo que tal vez sencillamente se

disocien de la plantilla poco después de haber copiado a través de la lesión. No obstante, esta explicación todavía nos deja con el desafío de averiguar la manera en que la enzima procesiva normal es capaz de volver a entrar en la maquinaria de replicación²⁷².

En 2002, Hoedje y colaboradoras/es demostraron que PCNA está ubiquitinada y SUMOilada en respuesta al daño en el DNA¹²⁹ (Figura 31). Desde la publicación de ese trabajo inicial, múltiples estudios han hablado de la importancia de las modificaciones postraduccionales de PCNA en las rutas de tolerancia al daño en el DNA, dejando patente que el reclutamiento de proteínas a los sitios de replicación a través de interacciones con PCNA está regulado en algunos casos por sus MPT^{158,159,319-322}.

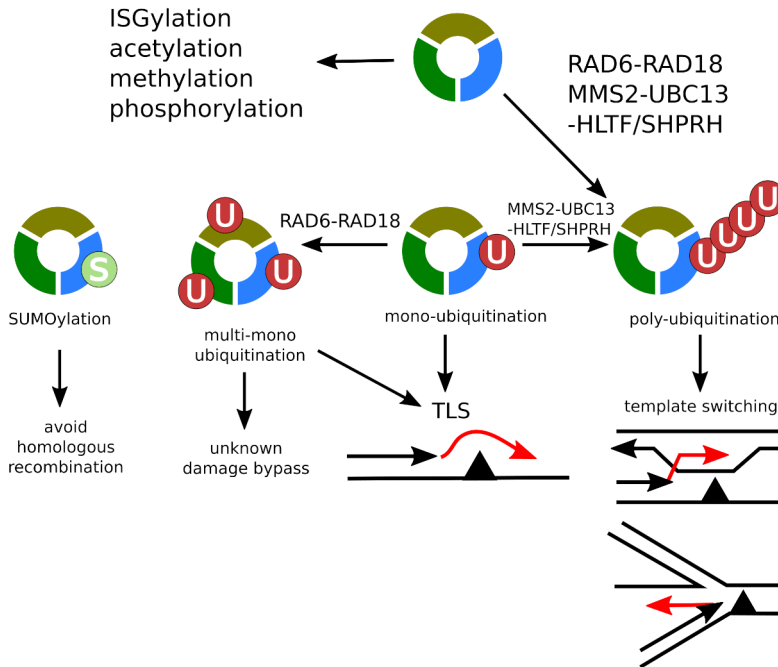


Figura 31: Modelo esquemático de las modificaciones postraduccionales de PCNA de mamíferos y sus consecuencias. S es la proteína SUMO y U es ubiquitina. Figura adaptada de Kanao et al. 2017³¹⁰.

La monoubiquitinación de PCNA regula la síntesis translesión

En las células de mamífero, PCNA puede monoubiquitinarse en la lisina 164 en respuesta a una horquilla de replicación bloqueada y el complejo RAD6-RAD18 es la enzima principal responsable de promover esta monoubiquitinación de PCNA^{129,228,230,323}. RAD18 prefiere interactuar con Pol η y juega un papel en su reclutamiento a sitios de DNA dañado en respuesta a la irradiación por luz UV^{230,324-327}. En ausencia de daño externo al DNA, es CRL4Cdt2 la que cataliza la monoubiquitinación de PCNA independientemente de RAD18 para promover la TLS en células no perturbadas³²⁸.

PCNA monoubiquitinada prefiere interactuar con las DNA polimerasas de la familia Y a través de los motivos de unión a ubiquitina: i) UBZ (siglas de su nombre en inglés *ubiquitinating-binding zinc finger*) en Pol η y Pol κ , y ii) UBM (*ubiquitinating-binding motif*) en Pol ι y REV1^{131,228,329,330}. PCNA monoubiquitinada estimula las actividades de estas polimerasas^{235,331}, que además de es-

tos dominios de unión a ubiquitina, Pol η , Pol ι y Pol κ , tienen dominios PIP que interactúan con PCNA³³²⁻³³⁶.

Además, Pol η estimula la monoubiquitinación de PCNA a través de sus motivos PIP ubicados en las regiones C-terminal y central^{325,331}, lo que lleva a la acumulación de PCNA monoubiquitinada en los sitios de DNA dañado.

La poliubiquitinación promueve el cambio de plantilla

La poliubiquitinación ligada al residuo K63 de PCNA promueve la reparación del DNA por cambio de plantilla³³⁷⁻³³⁹.

Un estudio sobre la poliubiquitinación de PCNA usando proteínas recombinantes de levadura mostró que para formar la cola de ubiquitinas en K63 en PCNA, el complejo Ubc13–Mms2–Rad5 agrega monómeros de ubiquitina paso a paso a PCNA monoubiquitinada por RAD6–RAD18³⁴⁰, lo que indica que la producción de PCNA poliubiquitinada requiere PCNA monoubiquitinada. Pero la poliubiquitinación de PCNA se produce independientemente de la monoubiquitinación, lo que indica que TLS mediada por PCNA monoubiquitinada y el cambio de plantilla activado por PCNA poliubiquitinada se promueven independientemente.

Las monoubiquitinaciones simultáneas en PCNA promueven una ruta de tolerancia al daño no caracterizada

Se ha visto en células humanas monoubiquitinaciones simultáneas en varias unidades de un anillo de PCNA (evento que llamamos multimonoubiquitinación)^{228,341}. *In vitro*, RAD18 prefiere catalizar la monoubiquitinación secuencial de una PCNA que ya tiene una o dos ubiquitinas en el anillo, en lugar de la monoubiquitinación de los anillos de PCNA no modificados³⁴². Las células que albergan niveles reducidos de PCNA multimonoubiquitinada muestran retrasos en la progresión de la fase S del ciclo celular después de irradiación con luz UV, así como una elevada sensibilidad a los rayos UV tanto en células con exceso de Pol η como en células con deficiencia³⁴¹. Estas observaciones sugieren que la multimonoubiquitinación simultánea de PCNA juega un papel importante en la superación de la detención de la replicación del DNA en las lesiones producidas por luz UV, no solo en la TLS mediada por Pol η , sino también a través de un mecanismo distinto desconocido.

Estructura de PCNA modificada con ubiquitina

La estructura cristalográfica de PCNA modificada con ubiquitina muestra que el resto de ubiquitina ocupa una posición en la cara posterior del anillo de PCNA (Figura 32), e interactúa principalmente con un bucle en la parte trasera de la pinza llamado bucle P (residuos 184-195)¹⁵⁹. Además, la unión de ubiquitina a PCNA no altera su conformación de manera significativa, lo que sugiere que el resto ubiquitina no actúa como modificador alostérico para aumentar la afinidad de PCNA por la polimerasa no clásica; en cambio, defiende un modelo más simple en el que el resto ubiquitina proporciona una superficie de interacción adicional a la que pueden unirse estas polimerasas⁹⁹.

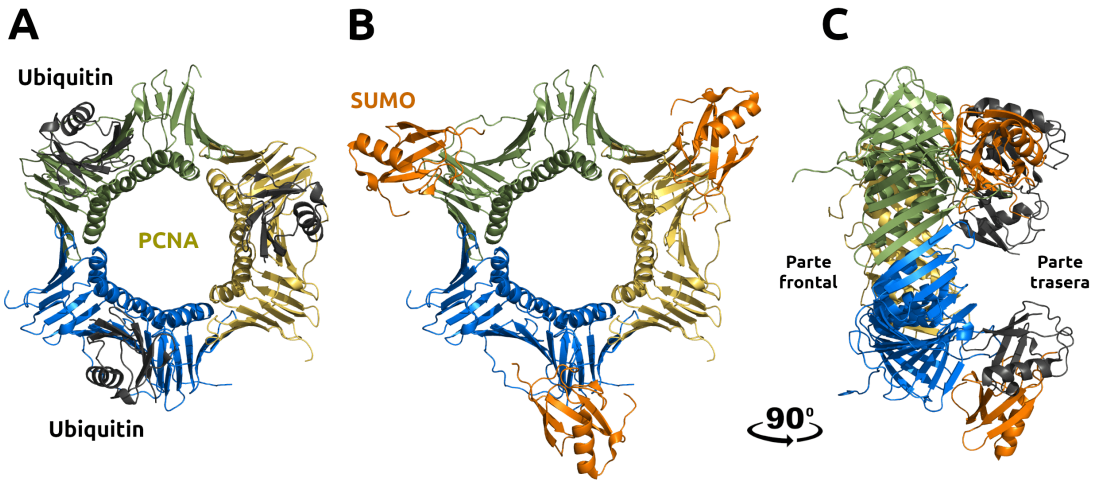


Figura 32: Diagrama de cintas de la estructura de PCNA modificada por la unión de ubiquitina (PDB ID: 3L10) (A) y por la unión de SUMO (PDB ID: 3PGE) (B). En C, la superposición de PCNA modificada por ubiquitina y PCNA modificada por SUMO muestra que ambas proteínas, ubiquitina y SUMO, se ubican en la cara trasera del anillo de PCNA dejando libre su cara delantera. Imagen inspirada en una de Dieckman 2012⁹⁹.

PCNA ubiquitinada debería poder interactuar con otros factores proteicos como la DNA polimerasa clásica en su cara frontal, al mismo tiempo que se unen las polimerasas no clásicas en su cara posterior. Ahí, la polimerasa no clásica puede mantenerse en reserva hasta que se necesite sin interferir con la actividad en curso en la cara frontal del anillo de PCNA. En bacterias, por ejemplo, la DNA polimerasa III clásica y la DNA polimerasa IV no clásica se unen simultáneamente a la pinza deslizante β ³⁴³.

Otras modificaciones de PCNA

También se requieren modificaciones postraduccionales de PCNA distintas a la ubiquitinación para una replicación o reparación correctas del DNA y garantizar así la estabilidad del genoma. Por ejemplo, PCNA es acetilada en la lisina 14 en respuesta a irradiación UV, lo que provoca su degradación³⁴⁴.

PCNA también sufre metilación. La histona metiltransferasa SETD8 metila PCNA en la lisina 248, y esta MPT modula la interacción con FEN1 y, por tanto, juega un papel en la replicación del DNA³⁴⁵.

Además, PCNA se fosforila en la tirosina 211 por EGFR (receptor de EGF). La fosforilación de PCNA protege a PCNA de la poliubiquitinación y degradación^{346,347} y altera su interacción con las proteínas de reparación de desapareamiento de bases, inhibiendo así este mecanismo de reparación³⁴⁸.

PCNA también es modificada por SUMO, miniproteína que se une principalmente en la lisina 164 y secundariamente en la lisina 254^{348,349}. Esta proteína de fusión SUMO-PCNA inhibe la recombinación homóloga^{130,132,133,350} y mejora la supervivencia celular después del tratamiento con MMS (metil-metanosulfonato) y cisplatino³⁴⁹, lo que sugiere que PCNA SUMOilada también actúa como un regulador negativo de la recombinación homóloga en células de mamíferos.

La estructura cristalina de rayos X de PCNA modificada con SUMO mostró que SUMO también estaba en la cara posterior del anillo de PCNA e interactúa predominantemente con el bucle P de PCNA (ver Figura 32)¹⁵⁹.

Como ocurre con la ubiquitina, la unión de SUMO no cambia la estructura de PCNA, lo que sugiere que los modelos alostéricos para el reclutamiento de la helicasa Srs2 anti-recombinogénica son poco probables. En cambio, el resto SUMO probablemente proporciona una superficie de unión adicional a la que Srs2 puede unirse. Además, el hallazgo del resto SUMO en la cara posterior del anillo PCNA también argumenta a favor de un modelo en el que Srs2 podría ser reclutada en la cara posterior de PCNA, donde puede mantenerse en reserva hasta que sea necesario⁹⁹.

Además del tipo de modificaciones, el número de modificaciones en un anillo homotrimérico de PCNA también contribuye a la regulación de las rutas de tolerancia al daño del DNA³¹⁰.

2.1.3. Modificaciones de la pared del anillo interno de PCNA

La cara interna del anillo de PCNA también puede ser modificada de diferentes maneras para modular la actividad de la pinza.

Ya hemos visto en el capítulo anterior cómo residuos básicos conservados en el canal central de PCNA crean una superficie específica que reconoce el esqueleto de DNA y habilita a la abrazadera para deslizarse por seguimiento rotacional la hélice de DNA.

Esta superficie deslizante puede ser modulada (i) por acetilación de lisina, lo que desencadena la degradación de PCNA durante el proceso de reparación por escisión de nucleótido (NER, acrónimo de su nombre en inglés *nucleotide excision repair*)³⁵¹ o estimula la reparación por recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*)³⁵², o (ii) a través de la unión del factor proteico p15^{PAF}, lo que desactiva el baipás de lesiones en el DNA²⁹¹.

Se puede hipotetizar, basándonos en lo visto en el capítulo anterior, que modificar algunos residuos de lisina de la pared del anillo interno de PCNA puede romper la simetría electrostática y, por lo tanto, modificar su difusión lineal a lo largo del DNA. Y, de esta manera, la superficie interna de PCNA está regulada para controlar la resistencia al daño del DNA; luego desde el punto de vista estructural, estos hechos ofrecen una nueva perspectiva en la función de PCNA en la replicación.

La superficie deslizante de PCNA

PCNA se encuentra en el corazón de una replicación precisa de los genomas eucarióticos, y su modulación es fundamental para un correcto funcionamiento del proceso.

Ya sabemos que PCNA reconoce la estructura del DNA a través de un conjunto de residuos básicos del canal del anillo colocados estratégicamente para que coincidan con el paso de giro de la doble hélice, estableciendo interacciones polares de corta duración con fosfatos consecutivos de una de las cadenas del DNA y permitiendo el rastreo del esqueleto de DNA.

El trabajo expuesto en el anterior capítulo explica cómo PCNA reconoce y se une a la hélice de DNA. La estructura cristalográfica de la PCNA humana en complejo con un dúplex de DNA de 10 pb (PDB ID: 6GIS) muestra el DNA en el canal de la pinza formando un ángulo de 15° con el eje ternario de rotación de la abrazadera. Los altos valores de los factores de temperatura del

DNA en la estructura son compatibles con una interacción PCNA-DNA bastante dinámica. La interfaz cristalográfica PCNA-DNA está compuesta por seis residuos básicos conservados distribuidos en cinco α -hélices de dos subunidades de la pinza (K20, K77, R149, H153, K217, K80), estableciendo contactos polares con cinco fosfatos consecutivos de una única cadena de DNA.

Así, PCNA reconoce la hélice de DNA a través de un área de residuos básicos dispuestos espacialmente para coincidir con la frecuencia helicoidal del DNA, y la interacción de baja afinidad resultante parece ideal para satisfacer la necesidad del deslizamiento eficiente de la pinza en la doble hélice.

Como también vimos, esta interfaz dinámica fue validada por estudios de RMN en solución, los cuales permitieron una estimación de la constante de disociación ($K_d \approx 0.7$ mM) de la interacción. Además, los datos de RMN mostraron que la porción de una sola hebra de un sustrato de DNA cebado no interacciona con el bolsillo de unión a PIP-box de PCNA, lo que sugiere que las abrazaderas bacteriana y eucariótica reconocen el cebador de DNA de manera diferente.

Asimismo, los resultados de DM mostraron que el gran número de interacciones débiles que se establecen entre residuos de PCNA y fosfatos de DNA en la interfaz del complejo, además de ser fundamentales para el deslizamiento de la pinza y proporcionar al sistema una gran estabilidad y flexibilidad, mantienen la orientación de la pinza invariante en relación con la doble hélice, algo necesario para el ensamblaje de una holoenzima PCNA-pol δ de replicación competente.

Importancia de la superficie deslizante de PCNA durante la replicación

PCNA ejecuta su función principal de factor de procesividad en la replicación del DNA atando las polimerasas replicativas al molde genómico^{5,353}. En particular, la actividad de la polimerasa de la hebra rezagada Pol δ es completamente dependiente de PCNA^{205,354}.

Pol δ , como ya sabemos, es una polimerasa de cuatro subunidades de la familia B que se asocia con PCNA en la unión P/T de los fragmentos de Okazaki nacientes²⁸⁰. Tres de las cuatro subunidades de Pol δ pueden interactuar directamente con PCNA vía PIP-box en la cara frontal del anillo de PCNA^{148,282-286}.

Un antiguo trabajo mostró que la mutación de cualquier residuo catiónico presente en la interfaz PCNA-DNA cristalográfica reducía notablemente la incorporación de nucleótido a la cadena naciente por la Pol δ humana en la síntesis de DNA²⁸². Estos residuos de la interfaz no están implicados en una interacción directa con Pol δ pero ahora sabemos que son críticos para el reconocimiento PCNA-DNA y para la orientación de la pinza en el DNA, y esta orientación definida parece necesaria para el ensamblado de una holoenzima pol δ funcional, capaz de iniciar la replicación de un fragmento de Okazaki cebado.

En un trabajo más reciente, Billon y colaboradoras/es mostraron que la mutación de dos residuos de lisina conservados (K20Q y K77Q) en la superficie deslizante de scPCNA, la PCNA de *S. cerevisiae*, dañaron la procesividad de Pol δ en moldes de DNA circular replicantes, con la formación de intermediarios fallidos³⁵². Luego las interacciones PCNA-DNA controlan la actividad de sujeción de PCNA para formar un holoenzima funcional con Pol δ , además de la actividad de deslizado durante la replicación procesiva cuando PCNA está unida a la polimerasa.

Según nuestro modelo propuesto, PCNA viaja por el DNA con modo de deslizamiento de «rueda dentada» durante la replicación, y la orientación restringida de PCNA respecto al paso

de giro o frecuencia helicoidal de la doble hélice que provoca podría satisfacer la necesidad de la polimerasa de mantener una posición relativa fija respecto al esqueleto fosfodiéster en la unión P/T. Como también vimos, la rápida velocidad de difusión de PCNA en el DNA ($D \approx 2 \cdot 10^7$ pb²/s¹⁶⁶) asegura que no obstaculiza la velocidad de polimerización de la polimerasa ($k_{cat} \approx 10^2$ pb/s²⁸⁷). Por tanto, con la inserción de nucleótidos sucesivos en el extremo 3' del cebador o iniciador, la polimerasa puede moderar la velocidad de la pinza haciendo que rastree los fosfatos del DNA en la dirección correcta.

A diferencia de la homóloga de levadura, la Pol δ humana mantiene una asociación laxa con PCNA durante la replicación, así que la holoenzima pol δ se puede disociar antes de completar un fragmento de Okazaki²⁸⁷. El modelo propuesto de deslizamiento de rueda dentada proporciona la manera de que Pol δ encuentre el camino para reanudar la síntesis de un fragmento paralizado (Figura 33(a, b)), pues la polimerasa entrante se encontrará a PCNA en la orientación activa para restaurar la síntesis de manera eficiente³⁵⁵.

La estructura oligomérica de PCNA, con tres sitios de unión a PIP-box, le permite interactuar con diferentes dianas, de forma simultánea o secuencial⁹⁷. Así, el cambio del DNA entre los tres sitios de interacción equivalentes dentro del canal de PCNA podría ser necesario para llevar a la unión P/T del DNA diferentes dianas unidas al mismo anillo de PCNA. Por ejemplo, el cambio de sitio podría ocurrir durante el intercambio entre una polimerasa de replicación de alta fidelidad que encuentra una lesión en el DNA y DNA polimerasas TLS de baja fidelidad, especializadas en traspasar las lesiones (Figura 33(c, d)).

Y si es la superficie deslizante de PCNA la que determina su orientación respecto al DNA, lo cual es fundamental para la correcta actuación de la Pol δ , entonces las modificaciones que esta cara interna de la pinza sufra serán trascendentales para su función como factor de procesividad así como andamio de una holoenzima pol δ funcional.

Como pasa con la superficie externa de PCNA, la modulación de la superficie de deslizamiento puede ocurrir de varias maneras. La proteína CBP (proteína de unión a CREB, siglas en inglés de CREB-binding protein), y también, aunque menos eficientemente, el factor p300, acetilan PCNA en los residuos de lisina Lys13, 14, 77 y 80 de la pared deslizante para promover la eliminación de la PCNA unida a la cromatina y su degradación durante NER³⁵¹.

Pero estas no son las únicas acetilaciones de lisina en la cara interna de PCNA inducidas por lesiones en el DNA. La cohesín-acetiltransferasa Eco1 se dirige a la lisina 20, también en la superficie deslizante del anillo, *in vitro* e *in vivo* en respuesta al daño en el DNA lo que estimula la recombinación homóloga y suprime la sensibilidad al daño³⁵².

Una manera alternativa y menos estudiada de modulación de la superficie deslizante de PCNA es a través de la unión de la proteína p15^{PAF292}, la cual inhibe el baipás de la lesión del DNA por la polimerasa TLS η ²⁹¹.

Vamos a estudiar más profundamente estas dos últimas MPT de la superficie del canal interno de PCNA, la acetilación de la lisina 20 y la interacción con p15^{PAF}.

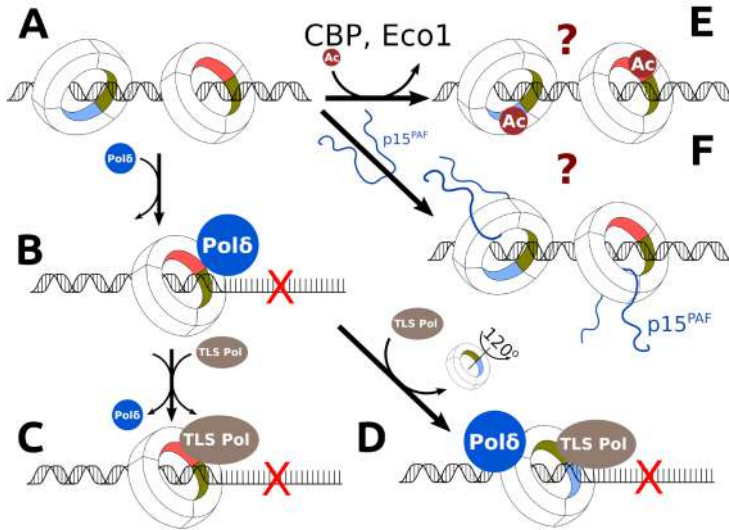


Figura 33: Modelos funcionales del deslizamiento y modulación de la superficie deslizante de PCNA en la replicación del DNA y el baipás del daño en el DNA. A) Deslizamiento de PCNA en el DNA principalmente por difusión en modo rueda dentada, que mantiene la pinza en una orientación relativa al DNA invariante y competente para B) unirse a la polimerasa replicativa Pol δ . Al encontrar una lesión en el DNA (indicada con una cruz roja), dos rutas son posibles: o C) Pol δ se disocia de PCNA y es reemplazada por una polimerasa TLS especializada que replica más allá de la lesión, o D) PCNA gira alrededor de su eje de simetría C3, manteniendo la orientación relativa al DNA sin cambios y presentando un sitio de unión libre en el extremo 3' del cebador de DNA y que será ocupado por la polimerasa TLS sin necesidad de que Pol δ se disocie (el llamado modelo del «cinturón de herramientas»). Para simplificar, no se indica la ubiquitinación de PCNA en la lesión. La superficie de deslizamiento de PCNA puede modularse mediante E) acetilación por la proteína de unión a CREB (CBP) o Eco1 o F) unión de la proteína intrínsecamente desordenada p15PAF. El impacto de esta modulación en los mecanismos de deslizamiento del PCNA durante la replicación y reparación del DNA aún no se ha determinado. Imagen inspirada de De March & De Biasio 2017¹³⁶.

2.2. Estudio computacional de la acetilación de la lisina 20 de la superficie deslizante de PCNA

PCNA tiene una estructura que ha evolucionado para maximizar sus contactos con la doble hélice del DNA durante su movimiento deslizante. Las MPT como SUMOilación y ubiquitinación ocurren en la superficie externa del anillo de PCNA para regular su interacción con diferentes factores sin alterar su estructura³⁵⁶ y no afectan a la superficie interna del anillo, sin embargo, esta, enriquecida en residuos lisina y arginina y cargada positivamente, se ve muy modificada tras la acetilación de los residuos de lisina conservados^{351,352}, lo que puede afectar, como decimos, a su movimiento deslizante en la molécula de DNA³⁵⁷ y puede ser un mecanismo precisamente para modificar transitoriamente la interacción entre la pinza y el DNA durante el deslizamiento.

2.2.1. Acetilación de la pared interna de PCNA

Comparada con la cara externa de PCNA, la pared interna está, evidentemente, mucho menos expuesta a potenciales interacciones con otras proteínas. Por eso fueron toda una sorpresa los trabajos que mostraron que la superficie deslizante de PCNA está regulada por acetilación de residuos de lisina específicos para controlar la respuesta a daño en el DNA^{351,352}.

La acetilación consiste en una reacción que introduce un grupo acetilo en un compuesto químico y también en una proteína. Una lisina N-acetiltransferasa (o también lisina acetiltransferasa o K-acetiltransferasa) es una enzima que acetila residuos lisina de determinadas proteínas diana. Estas enzimas constituyen un tipo de transferasas, y transfieren un grupo acetilo desde una molécula de acetil-CoA a la lisina diana, creando una ϵ -N-acetil lisina, tal y como se muestra en la reacción (Figura 34):

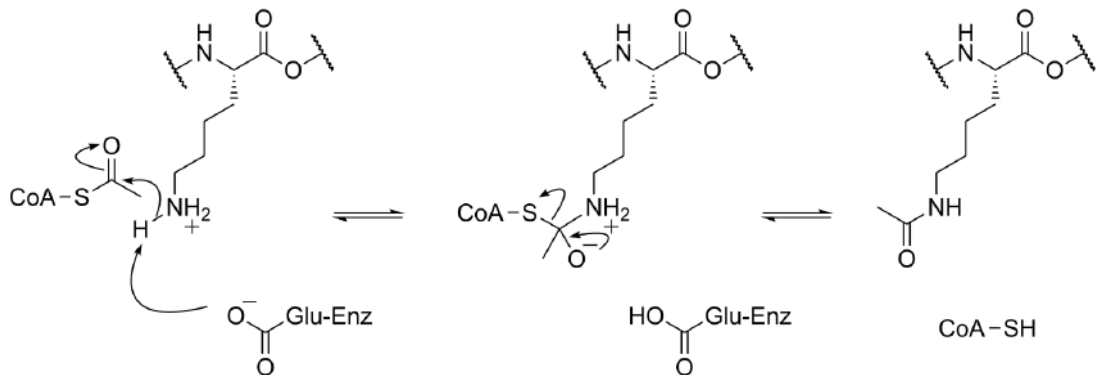


Figura 34: Reacción de acetilación de un residuo de lisina.

La acetilación de PCNA en K13, K14, K77 y K80 por el factor de transcripción CBP o por p300 promueve la eliminación de PCNA unida a cromatina y su degradación durante la reparación por excisión nucleotídica (NER)³⁵¹. Este mecanismo de control es funcionalmente relevante, ya que una excesiva retención de PCNA en la cromatina después de NER puede poner en peligro la estabilidad genómica^{344,358}.

Los residuos positivos lisina y arginina que recubren la superficie interna de la pinza deslizante están altamente conservados a lo largo de la evolución, al igual que la relación lisina/arginina, que también se conserva, ya que hay seis residuos de lisina y tres residuos de

argina en eucariotas superiores e inferiores³⁵². La acetilación de K13, K20, K77 y K217, los únicos residuos de lisina estrictamente conservados entre las PCNA eucarióticas, fue detectada en células de la levadura *S. cerevisiae* expuestas a metil-metanosulfonato (MMS) y se demostró importante para la resistencia celular a este agente que daña el DNA³⁵². Esto respalda la idea de que se requiere acetilación de los residuos de lisina en la superficie interna del anillo durante la replicación de las plantillas de DNA dañadas³⁵². En particular, Billon y el resto de autores/as de este trabajo hicieron hincapié en una de ellas y mostraron que la cohesinacetiltransferasa Eco1 actúa sobre K20 *in vitro* e *in vivo* en respuesta al daño en el DNA. Una mutación acetilmimética de este residuo estimula la recombinación homóloga (HR) y suprime la sensibilidad celular a los agentes perjudiciales del DNA en las células portadoras³⁵². Estas observaciones sugieren que la naturaleza y la posición de estos residuos de lisina son importantes para la función de PCNA, pues la acetilación en el centro del anillo de PCNA, que neutraliza las cargas positivas de los residuos de lisina, afecta drásticamente su potencial electrostático para regular el deslizamiento dinámico de PCNA en las plantillas dañadas³⁵².

Pero ¿cómo puede una acetiltransferasa tener acceso a los residuos en la pared interna de PCNA cuando esta está anclada en el DNA? Como el DNA interactúa con PCNA asimétricamente, principalmente asociado con dos de las tres subunidades, es concebible que los residuos de lisina de la subunidad menos ocupada pueden llegar a estar más accesibles para su acetilación. Además, el cambio ocasional de DNA a lo largo de las tres posiciones homólogas en el anillo de la abrazadera permitiría potencialmente la acetilación de residuos en todas las subunidades.

Desde una perspectiva estructural, cómo la acetilación de residuos de lisina en la superficie deslizante de PCNA puede controlar la respuesta al daño en el DNA aún permanece poco clara. Una estructura cristalográfica de PCNA acetilada en K20 solo muestra diferencias marginales al compararla con la PCNA sin modificar³⁵², apoyando la idea que, más que afectar a la estructura de la pinza, la acetilación puede afectar a la interacción con el DNA.

La superficie interna de PCNA está altamente conservada ya que su deslizamiento es esencial para la procesividad de la DNA polimerasa durante la replicación y reparación¹⁰⁰. A la luz de nuestros descubrimientos que revelan el mecanismo de deslizamiento de PCNA, se puede prever que un residuo de lisina acetilado en la interfaz PCNA-DNA, eliminando un contacto polar con los fosfatos de DNA, comprometerá el deslizamiento espiral normal causando la desalineación de otros residuos que contactan con el DNA, resultando en un cambio en la inclinación del DNA y en la evolución de las interacciones pinza-DNA. Y esta idea es consistente con la observada pérdida de procesividad de Pol δ cuando PCNA es acetilada en K20³⁵². Además, la acetilación en K20 no afecta la procesividad de las polimerasas TLS η y ζ ³⁵², lo que sugiere que, cuando llevan a cabo su función, las polimerasas replicativas y las polimerasas de TLS y HR pueden usar diferentes inclinaciones activas del DNA.

Las lisinas conservadas que recubren la superficie interna del anillo tienen una importancia funcional diferente en la respuesta al daño en el DNA³⁵². Por ejemplo, solo dos residuos de lisina (K20 y K77) sensibilizan las células frente a agentes que dañan el DNA cuando se mutan a glutamina (K20Q y K77Q), un acetilmimético. La diferencia en la sensibilidad entre las dos mutaciones sugiere que estas dos lisinas acetiladas actúan en mecanismos distintos de bypass/ reparación de daños en el DNA y tienen efectos diferenciales en el deslizamiento de PCNA. La acetilación de PCNA en K20 se ha asociado con una supresión de la sensibilidad al daño en el DNA en células deficitarias en mecanismos para evitar lesiones en el DNA durante la replicación³⁵². Una observación interesante del trabajo de Billon y colaboradoras/es es que las muta-

ciones de residuos de lisina individuales en residuos de arginina cargados positivamente no acetilables no crean ningún fenotipo nuevo, lo que probablemente se explica por un nivel de redundancia funcional entre los diferentes sitios de acetilación en la superficie deslizante de PCNA³⁵². Por otro lado, la mutación de los seis residuos de lisina conservados en argininas conduce a una sensibilidad débil pero significativa al daño en el DNA, pero sin afectar la replicación normal³⁵².

Curiosamente, la mayoría de estos residuos de lisina, con la excepción específica de K20, también se han encontrado acetilados en ausencia de daños en el DNA en diferentes especies³⁵². Puede que exista un papel independiente del daño del DNA de la acetilación de la superficie deslizante durante la carga y descarga de PCNA en el DNA³⁵⁹. De hecho, ya se ha hablado de que los residuos cargados positivamente juegan un papel importante durante la carga de PCNA por RFC²⁴⁹.

Ensayos específicos realizados por Billon y colaboradoras/es mostraron que Eco1, que tiene interacción física directa para promover la cohesión de la cromátida hermana³⁶⁰⁻³⁶², es la que puede transferir grupos acetilo en K20 a PCNA³⁵², y esta acetilación de PCNA subordinada a Eco1 depende de la interacción mediada por el motivo PIP de Eco1. En el mismo trabajo, también analizaron si la acetilación de PCNA en K20 inducida por MMS estaba regulada por Eco1 *in vivo*, y observaron que, efectivamente, la acetilación de PCNA en K20 dependiente de Eco1 se produce en respuesta al daño en el DNA³⁵². Y esto coincide con otras observaciones en las que mutaciones en la actividad de transferencia de acetilo de Eco1 conducen a la sensibilidad a los agentes que inducen la parada de la horquilla de replicación y los defectos en la reparación del DNA^{363,364}, y afectan a la síntesis de DNA y a la procesividad de la horquilla³⁶⁵.

Eco1 sigue a la horquilla de replicación para establecer la cohesión de la cromátida hermana durante la fase S a través de su unión directa a PCNA^{360,366-368}; y esta interacción entre Eco1 y PCNA es neutralizada por la SUMOilación de PCNA³⁶⁰, modificación requerida para controlar las rutas de *baipás* del daño en el DNA^{356,369}. Las cromátidas hermanas y Eco1 son críticas para la reparación porque la cohesión establecida durante la fase S estimula la HR³⁷⁰.

Como ya se sabía que PCNA recluta Eco1 en las horquillas de replicación para promover la cohesión de la cromátida hermana durante la fase S³⁶⁰ y que la HR utiliza preferentemente cromátidas hermanas para reparar las lesiones del DNA, Billon y colaboradoras/es estudiaron cómo la acetilación en K20 de PCNA afecta las vías de tolerancia al daño en el DNA en las horquillas de replicación, es decir, en el *baipás* del daño por TLS o en el cambio de plantilla.

Como ya hemos adelantado, dado que se requiere el deslizamiento de PCNA para estimular las DNA polimerasas aumentando su procesividad^{162,166,204,249,267}, la neutralización de las cargas positivas de PCNA por acetilación podría ser un mecanismo regulador para controlar la actividad de las polimerasas en las lesiones del DNA durante la replicación. Para ver si existía o no vinculación entre el deslizamiento de PCNA y la procesividad de las polimerasas, Li y colaboradoras/es compararon las capacidades de mutantes de PCNA para estimular polimerasas³⁷¹. Todos los mutantes podían cargarse eficientemente en el DNA por RFC e iniciar la extensión del cebador por la adición de polimerasas, pero la síntesis de DNA dependiente de Pol δ fue menos eficiente con el mutante PCNAK20Q. Billon y colaboradoras/es reprodujeron el efecto negativo sobre Pol δ con PCNA acetilada en K20, lo que indica que la mutación K20Q imita eficientemente a K20ac. Que la procesividad de las polimerasas TLS Pol η y Pol ζ no se viera afectada apoya un papel específico de PCNA K20ac para modular transitoriamente la actividad de Pol δ ³⁵². Además de afectar el deslizamiento de la pinza, la acetilación de la superficie interna de PCNA

podría, entonces, representar un mecanismo regulador por el cual la síntesis de DNA dependiente de Pol δ se puede modular en las lesiones.

Pero ¿cuál es el impacto de la acetilación de K20 en la estructura del anillo de PCNA? La estructura cristalina de PCNAK20ac (PDB ID: 5T9D)³⁵² revela que adopta la estructura canónica en forma de anillo en la cual las hélices α se alinean en el interior de la abrazadera y las láminas β componen el exterior del PCNA. La alineación de las estructuras de PCNA acetilada y PCNA no modificada sugiere que la acetilación de K20 no provoca grandes cambios conformacionales, ni siquiera en las hélices que contienen el sitio de acetilación, que se superponen bien, lo que demuestra que la acetilación no cambia la orientación de la primera α -hélice de PCNA donde se encuentra K20³⁵².

Pero una inspección más detallada de ambas estructuras, PCNA y PCNAK20ac, nos sugiere que la acetilación de K20 desencadena cambios estructurales de largo alcance que afectan a la distancia entre subunidades o protómeros de la abrazadera³⁵². Curiosamente, la interfaz afectada entre los protómeros corresponde al sitio de unión de la subunidad Ubc9 del complejo E2/E3 (Siz1) encargado de la SUMOilación en la K164 de PCNA³⁷², y es precisamente esta SUMOilación la que neutraliza la interacción entre Eco1 y PCNA. Además, afecta al bucle J (residuos 105-110), implicado en la trimerización y estabilización de PCNA y en la interacción con DNA polimerasas TLS³⁷³.

Los hallazgos de Billon de que la acetilación de K20 se correlaciona con algunos cambios conformacionales de largo alcance son sorprendentes ya que otras MPT estudiadas de PCNA no alteran su estructura^{158,159}, sino que estas modificaciones proporcionan distintos modos de asociación con PCNA para aumentar las posibles superficies de reclutamiento de efectores²³⁴. Un residuo de lisina acetilada dentro del anillo podría afectar el deslizamiento de PCNA al encontrar una lesión en el DNA, y esto, combinado con los cambios conformacionales de larga distancia que sufre la estructura de la pinza, puede favorecer transitoriamente la eliminación de Pol δ del replisoma. El impacto estructural en la interfaz de los protómeros por la acetilación también podría desfavorecer TLS. De hecho, publicaciones recientes refuerzan la importancia de la interfaz entre las subunidades PCNA para TLS y HR^{372,374}.

Además de los cambios estructurales y de manera más directa, la neutralización de las cargas positivas inducidas por la acetilación de PCNA ciertamente afecta sus interacciones con el esqueleto de fosfato de DNA durante el deslizamiento. De hecho, aunque K20 normalmente interactúa con la cadena lateral de D17 en la estructura de PCNA⁷⁰, K20Ac es móvil, tiene más libertad conformacional³⁵², lo que podría afectar directamente la interacción con el esqueleto de fosfato. Luego el modelo de deslizamiento de PCNA en el DNA no justifica solo el movimiento de las polimerasas que viajan junto a la pinza, sino que, además, es un medio directo de regulación de la polimerasa que se asocia a PCNA en cada momento.

2.2.2. Caracterización computacional de la acetilación de K20

El anillo de PCNA ha evolucionado como un trímero para controlar mejor su flexibilidad conformacional mientras desliza a lo largo del DNA y para que sea posible el acceso a la superficie deslizante para su regulación. Como hemos dicho, Billon y Côté observaron que la estructura cristalina de PCNA-K20ac muestra diferencias respecto a PCNA en la interfaz entre protómeros en el anillo³⁵⁷, luego la acetilación, además de la pérdida de la interacción de la K20 con el fosfato de DNA, induce cambios conformacionales transitorios en el anillo durante el deslizamiento que tendrían como consecuencia la acomodación de diferentes polimerasas, pues estos

cambios también pueden afectar la afinidad de las interacciones en la superficie externa del anillo.

Un primer paso para revelar el impacto de la acetilación de las lisinas de PCNA en su deslizamiento en el DNA sería realizar simulaciones de dinámica molecular de PCNA-K20ac cargada en dsDNA.

Y ya que: a) conocemos el mecanismo molecular que subyace al desplazamiento de PCNA sin alterar en el DNA; b) como hemos apuntado, una acetilación en K20 puede afectar al deslizamiento de la pinza por modificación de la polaridad de la superficie deslizante; y c) esto podría promover el intercambio entre diferentes polimerasas, lo que a su vez conlleva un cambio en la reacción o proceso que está teniendo lugar sobre el DNA, entonces, el estudio de la dinámica de la acetilación en K20 de PCNA resulta suficientemente interesante por la posibilidad de llevarnos a dilucidar conclusiones sobre el mecanismo por el cual la célula pasa de replicación a reparación del DNA.

Simulaciones de dinámica molecular de PCNA acetilada en K20 y cargada sobre el DNA

Se llevaron a cabo dos simulaciones de DM del sistema PCNAK20ac-dsDNA empleando para ambas como estructura de partida la estructura cristalográfica de PCNA-DNA (PDB ID 6GIS), cambiando las K20 (una por subunidad) por lisina acetilada con HADDOCK³⁷⁵ y alargando la cadena de DNA 10 pb por cada uno de los dos lados con COOT²⁷⁴, y siguiendo el mismo protocolo que se siguió para correr las dinámicas del Capítulo 1. El protocolo es: 1) Primero se protonó el sistema usando Ambertools 15²⁷⁵, se solató en una caja dodecaédrica truncada de agua TIP3P de al menos 1.5 nm más allá de los átomos de la proteína o el DNA, y se añadieron tantos iones cloruro y sodio como para alcanzar una concentración de 100 mM (igual que la utilizada en las DM de los sistemas del Capítulo 1). 2) Después, el sistema se minimizó y equilibró, con una distancia de corte para las interacciones electrostáticas de largo alcance (usando el método PME - Particle-mesh Ewald-) de 1 nm, durante 100 ps en el colectivo canónico NVT y durante 100 ps en el colectivo isotermodisipativo NPT; la energía de equilibración fue revisada en estos pasos y se ejecutaron con restricciones de posición en los átomos pesados (todos los que no son hidrógeno) del DNA y de la proteína. 3) Se corrieron simulaciones de 1000 ns (1 μ s) con GRO-MACS 5^{276,277} empleando el campo de fuerza parmBSC1 del grupo de Modesto Orozco²⁷⁸ y con pasos de integración de 2 fs. 4) Por último, la estabilidad de las simulaciones fue verificada por inspección visual de las trayectorias y por representación de los valores de RMSD respecto a la estructura inicial (Figura complementaria 2).

Para poder seguir el movimiento de PCNA en el DNA, definimos varios parámetros de giro y distancia. Para el giro definimos los movimientos giro, inclinación y viraje, y para su comprensión, acudir a la Figura complementaria 3 en Material complementario. Para calcular la distancia desde el DNA a PCNA, hemos medido la distancia a lo largo de la trayectoria tomando como posición del DNA y de las subunidades de PCNA cada uno de sus centros de masas (c.m.). El c.m. del DNA lo hemos calculado tomando los residuos que encajan con el ancho del anillo de PCNA en el primer marco de la dinámica (residuos 11-19 de la cadena D, y 12-20 de la cadena E del DNA) (para aclaración, ver Figura complementaria 4). Todos los marcos de la trayectoria se alinearon al trozo de DNA elegido para calcular el c.m. por ser el que sufre menos deformación a lo largo de toda la dinámica molecular. Ver resultados en las Figuras 35 y 36).

Diferencias entre PCNA acetilada en K20 y sin acetilar

La adición de un grupo acetilo en el grupo amino de la cadena lateral de la lisina 20 hace perder la carga positiva que tiene en PCNA sin modificar, y esto influye en la carga electrostática de su entorno próximo (Figura 37).

Billon y colaboradoras/es dicen que la acetilación de K20 por Eco1 perjudica la procesividad de Pol δ , estimula la reparación por HR y suprime la sensibilidad al daño³⁵², y que la acetilación de K20 puede ser una mecanismo para modificar transitoriamente la interacción entre la pinza y el DNA durante el deslizamiento³⁵⁷. La variación que vemos en la superficie electrostática alrededor de la K20ac, que parece ir más allá de la pérdida de carga de un residuo, hace pensar que, efectivamente, la interfaz PCNA-DNA se verá afectada y, por tanto, la superficie de deslizamiento que controla el modo de movimiento a lo largo del DNA.

Además, Billon y colaboradoras/es mostraron que la acetilación de K20 no provoca grandes cambios conformacionales, ni siquiera en el entorno próximo del residuo modificado³⁵². Parece lógico pensar que si la lisina 20 pierde su carga positiva, ya no formará los enlaces electrostáticos con los grupos fosfato de la hebra de DNA que mantienen la pinza sin modificar orientada y, entonces, su movilidad será mayor. Además, al perder con la acetilación la interacción con la cadena lateral de D17⁷⁰, tendrá más libertad conformacional, lo que también afectará a la interacción con el esqueleto de fosfato (Figura 38).

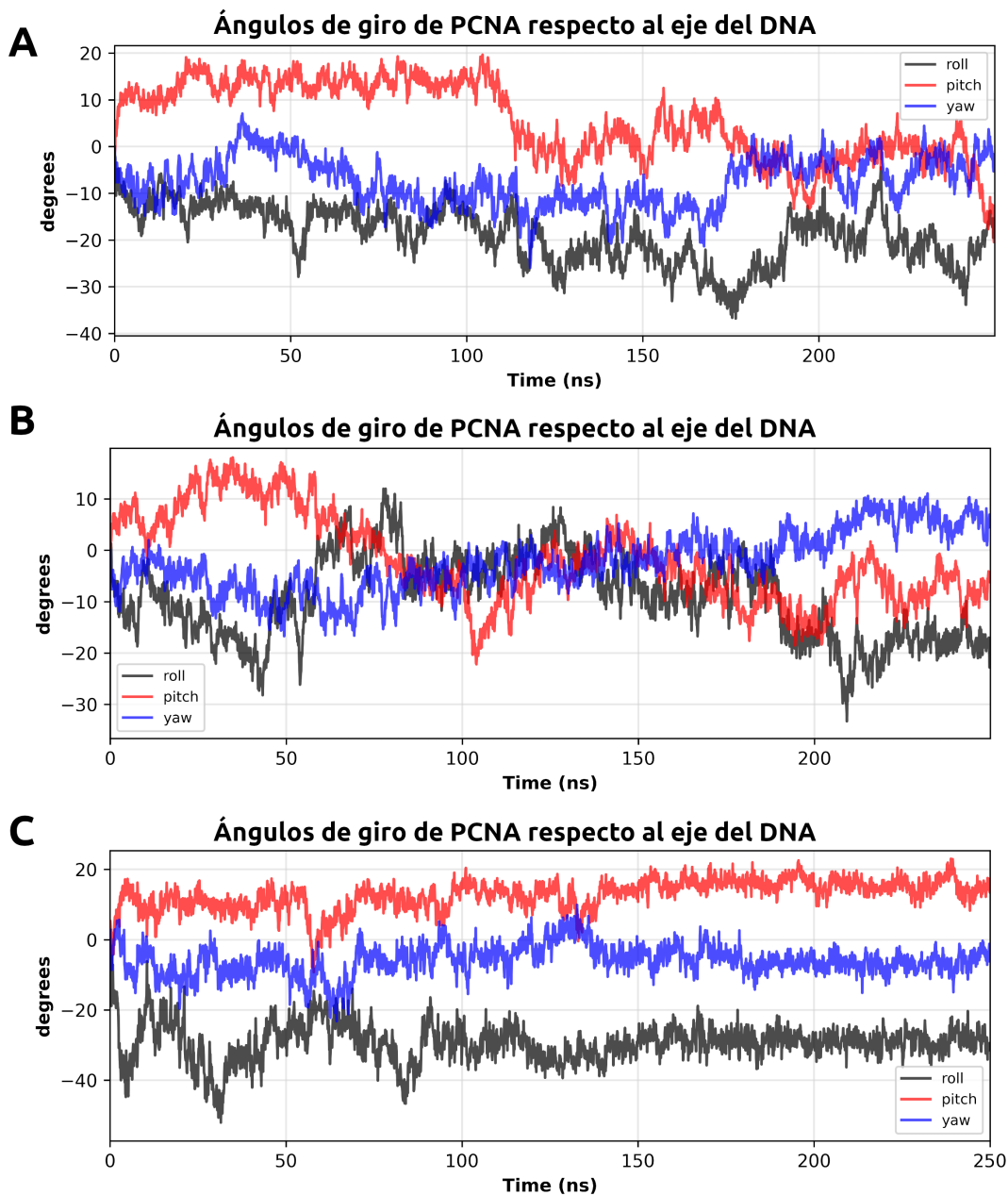


Figura 35: Análisis de las simulaciones de DM de dos réplicas (A y B) del sistema PCNAK20ac-dsDNA y del sistema PCNA-dsDNA (C) (Capítulo 1), parte 1. Representación de los valores de los ángulos giro, inclinación y viraje («roll», «pitch» y «yaw» en las leyendas y representados en colores diferentes) para los primeros 250 ns de las trayectorias del sistema PCNAK20ac-dsDNA y la trayectoria completa del sistema PCNA-dsDNA para comparación. Gráficas de trayectorias completas del sistema PCNAK20ac-dsDNA en Figura complementaria 4.

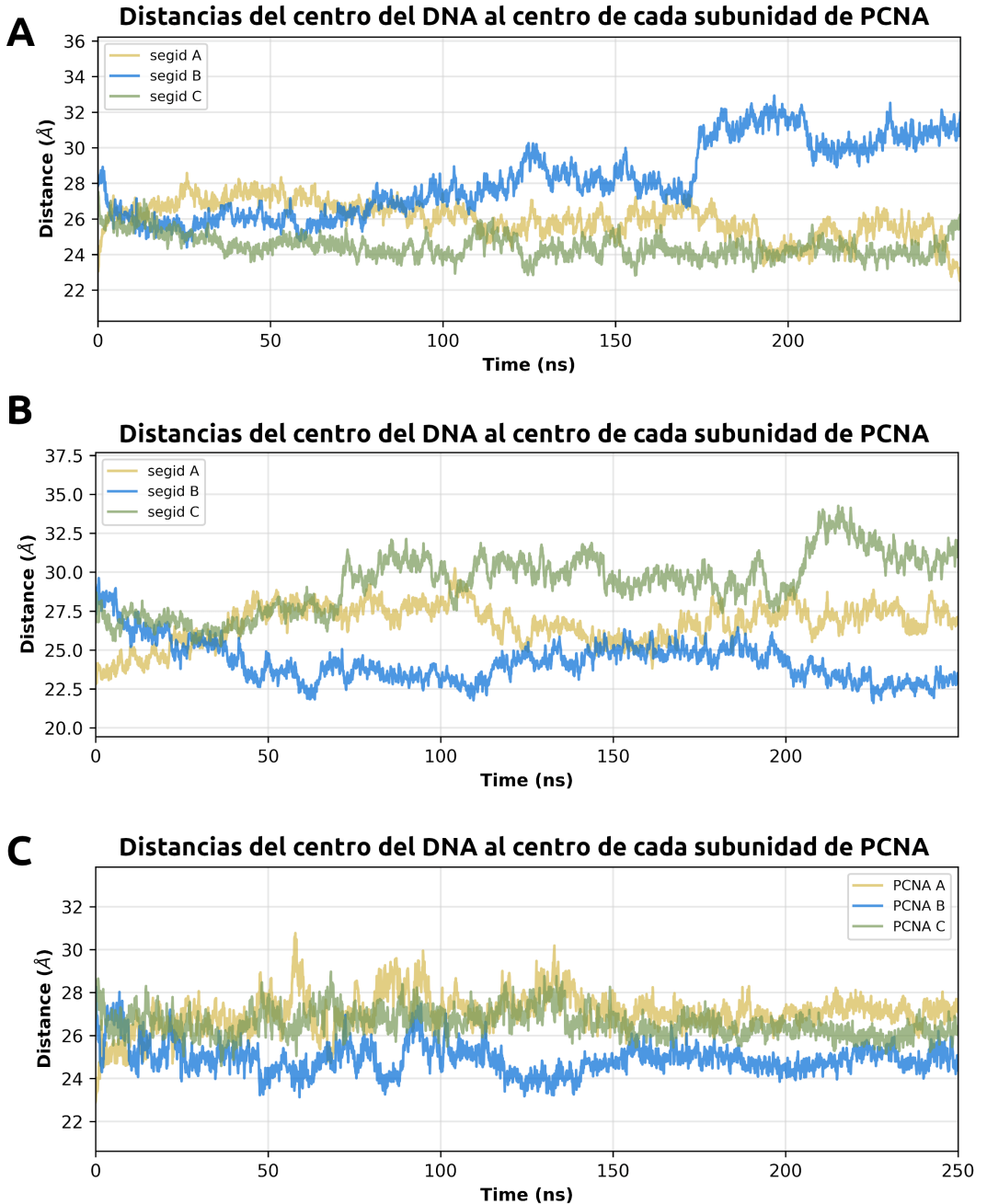


Figura 36: Análisis de las simulaciones de DM de dos réplicas (A y B) del sistema PCNAK20ac-dsDNA y del sistema PCNA-dsDNA (C) (Capítulo 1), parte 2. Representación de los valores de las distancias entre el DNA y las tres subunidades de PCNA (representadas en colores diferentes) para los primeros 250 ns de las trayectorias del sistema PCNAK20ac-dsDNA y la trayectoria completa del sistema PCNA-dsDNA para comparación. Gráficas de trayectorias completas del sistema PCNAK20ac-dsDNA en Figura complementaria 4.

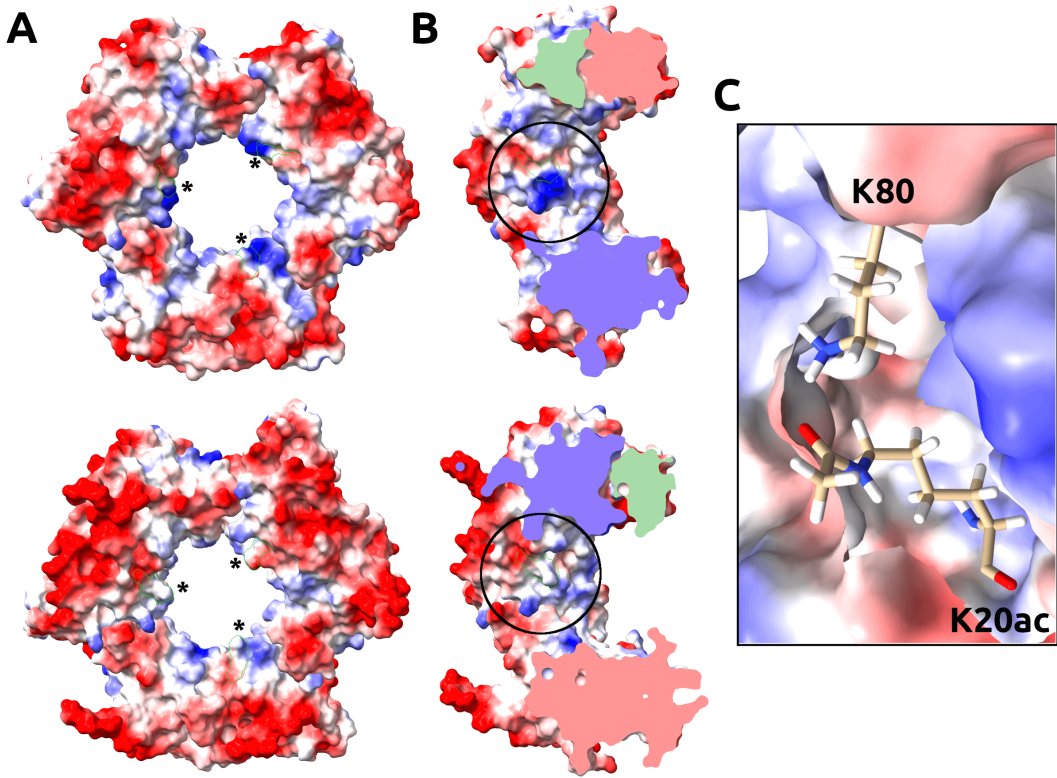


Figura 37: A) Vista frontal de la superficie de cargas de PCNA (arriba, PDB ID: 1VYM) y PCNA con K20 acetilada (PCNAK20ac, abajo, topología utilizada para la dinámica) mostrando gradación de color desde la máxima carga negativa (en rojo) a máxima carga positiva (en azul). Con asterismo se indican las K20 de cada una de las subunidades de PCNA y PCNAK20ac. B) Corte del anillo de PCNA (arriba) y PCNAK20ac (abajo, lisina 20 acetilada) para visualizar la superficie electrostática en el entorno de K20 (arriba) y K20ac (abajo), que se muestran rodeadas. C) Ampliación de la K20ac y una compañera próxima, la K80, que también ve afectada su carga.

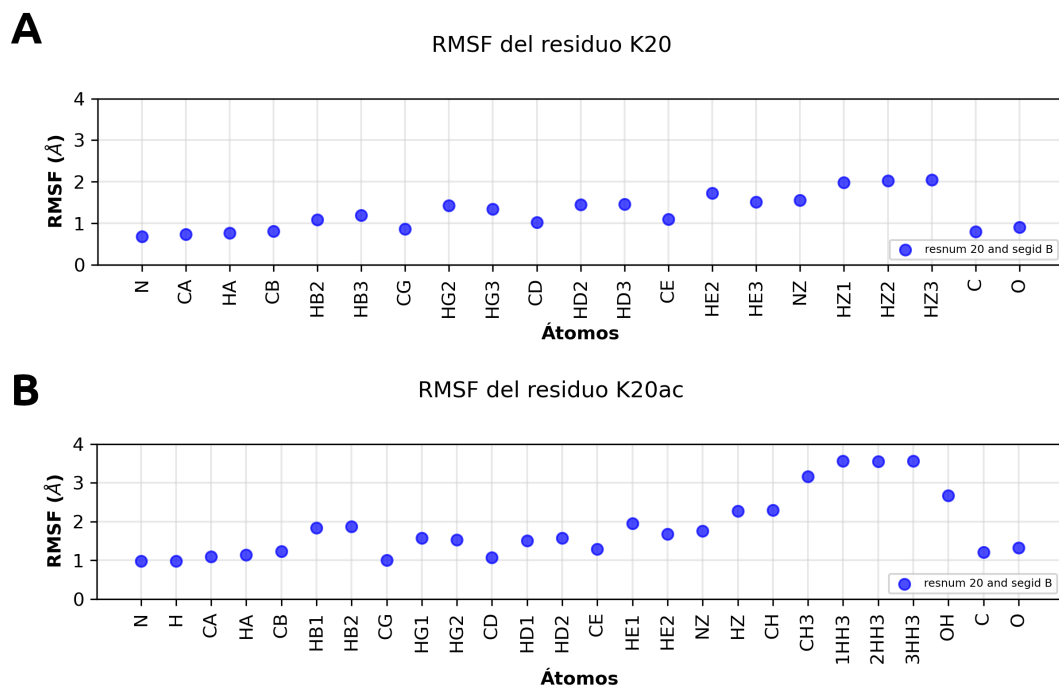


Figura 38: valores de RMSF del residuo K20 en la dinámica PCNA-DNA y del residuo K20ac en la dinámica PCNAK20ac-DNA.

2.2.3. Análisis de la acetilación de K20

Al estudiar la interacción de la interfaz PCNA-DNA, vimos que el residuo K20 era uno de los residuos importantes en el mantenimiento de la estabilidad de esta conexión y, por tanto, importante para la orientación precisa de PCNA en el DNA y, por ende, para la colocación de Pol δ así como para la difusión en modo rueda dentada de PCNA. Por tanto no es de extrañar que si se interrumpe la estabilidad del acoplamiento entre PCNA y el DNA, puedan darse condiciones que no sean favorables para el acoplamiento de Pol δ o para la difusión helicoidal de PCNA.

El mayor movimiento de PCNA en el DNA cuando está acetilada en K20 en comparación a cuando lo hace sin acetilar, reflejado en los valores de las RMSD a lo largo de las trayectorias (Figura complementaria 2), hace pensar en una situación inestable para la holoenzima pol δ . Cuando PCNA se desliza por el DNA de manera ambulante se desestabiliza su unión con Pol δ y esta se desengancha de la pinza. Luego la acetilación de K20 en PCNA afecta de manera negativa a la procesividad de Pol δ porque la polimerasa no consigue mantener la interacción con tal vibración.

La inestabilidad de la difusión de PCNA acetilada en K20 respecto a PCNA queda bien reflejada en los valores de los ángulos que la pinza toma en cada caso respecto al eje de DNA (Figura 35). Los valores, tras la acetilación, dejan de ser constantes y definidos para ser erráticos. Además, la localización del DNA en el anillo interno de PCNA, aunque sigue estando más próx-

imo a una de las subunidades de PCNA y no se mantiene en el centro igual que ocurre cuando PCNA no está acetilada en K20, también es mucho más inestable (Figura 36).

Con la pérdida de la estabilidad que la acetilación de K20 provoca, PCNA adquiere una disposición diferente respecto al DNA que ya no es la idónea para una adecuada actuación de Pol δ . No solo, después de la acetilación, el ángulo que forma el DNA respecto al eje de simetría que pasa por el centro del anillo de PCNA es diferente al óptimo para la actuación de Pol δ , es que, además, también lo es la distancia del DNA a las diferentes subunidades de PCNA y, por tanto, a cada uno de los bolsillos de unión al motivo PIP-box. Es decir, PCNA adquiere una disposición diferente respecto al DNA que ya no es la idónea para una adecuada actuación de Pol δ .

Como podemos ver en la Figura 37a, la acetilación de una lisina de la interfaz PCNA-DNA hace desaparecer una de las cargas positivas de la cara del anillo interno de PCNA que establece contactos electrostáticos múltiples y efímeros con las cargas negativas de los fosfatos de una de las hebras del DNA (Capítulo 1). Luego con la acetilación de la K20 de PCNA, desaparece una de las interacciones clave para el mantenimiento del movimiento de la pinza en el DNA en modo rueda dentada (que es el que aseguraba la disposición adecuada entre PCNA y el DNA para que Pol δ pueda colocarse en PCNA a través de su motivo PIP-box en la subunidad adecuada y que el DNA escajase en su centro activo).

Sin duda, el hecho de que la lisina acetilada tenga un mayor tamaño que la lisina hace que el impedimento estérico entre este residuo y el fosfato de la hebra de DNA que tiene enfrente cree un defecto en la interfaz de interacción PCNA-DNA que la haga menos estable (Figura 37b). Además, los valores de los RMSF del residuo acetilado (K20ac) son superiores a los del residuo sin acetilar (K20), lo que indica una ganancia de movilidad tras la acetilación (ver Figura 38), y una mayor movilidad necesita un mayor espacio. Según Krishna y colaboradoras/es⁷⁰ la acetilación hace a K20 perder una interacción clave con D17, además de las que establecía con el DNA, luego son de esperar unos valores de RMSF superiores a los del caso de K20, indicativos de una mayor movilidad. Pero entonces ¿es más importante la mayor movilidad de K20ac que el hecho de perderse una carga positiva, y con ello una interacción electrostática, para que se desestabilice la interfaz PCNA-DNA de tal manera?

K20 de PCNA gana movilidad conformacional al modificarse con la acetilación, pero no es el mayor oscilamiento del residuo lo que provoca una fluctuación en la zona para contribuir a una mayor inestabilidad en la interfaz PCNA-DNA. Pero tampoco es haber perdido una carga positiva en K20 que hace perder las interacciones electrostáticas con el grupo fosfato de la hebra de DNA que tiene enfrente (y también con el fosfato el anterior y posterior a este tal, y como vimos en el Capítulo 1). Hay que ir un poco más allá, pues la pérdida de una interacción en la superficie de deslizamiento (a modo de recuerdo, la superficie de deslizamiento la forman los residuos K77, K20, K217, R149 y H153 de una subunidad y K80 de la siguiente) de PCNA supone solo el \approx 17% de la dinámica interfaz PCNA-DNA necesaria.

Sin embargo, la modificación del aminoácido hace que se puedan establecer enlaces de hidrógeno que no se establecen en el residuo sin modificar, lo que provoca una disminución de la densidad electrónica positiva en su alrededor por retirada de carga de los otros residuos. Por tanto, la pérdida de carga en el residuo K20ac hace que también disminuya la carga parcial positiva de los residuos K77 y K217 con los que forma esos nuevos puentes de hidrógeno (también con K80 que tiene al lado, y que afecta a la superficie de deslizamiento de PCNA en el DNA de la otra subunidad). Por consiguiente, si de esta subunidad de PCNA se ven afectados los residuos

K77 y K217, y además la K80 de la otra subunidad y que pertenece a esta superficie de deslizamiento y que establece también estas mismas interacciones con la K20ac correspondiente a su subunidad, entonces lo que realmente se está perdiendo ya es el $\approx 67\%$ de la superficie de deslizamiento, y esta pérdida ya sí es importante.

Si nos fijamos en los valores de los RMSD de PCNA a lo largo de la trayectoria, cuando PCNA tiene sus K20 sin acetilar y cuando las tiene acetiladas (Figura 39), vemos que las oscilaciones en el caso de PCNA son mucho mayores, del orden de 1 Å, que en el caso de PCNAK20ac, que son del orden de 0,5 Å.

La visualización de los valores de RMSD de las trayectorias nos hace pensar en una K20 que se mueve bastante y de manera aleatoria alrededor de su posición de equilibrio, y una K20ac que se mueve menos y además en posiciones concretas de su entorno, luego los diferentes estados que nos muestran los valores de los RMSD nos dan una indicación de los enlaces de hidrógeno que K20ac forma y no forma K20.

Si el entorno de cada K20ac es el que tenemos en la Figura 40, donde vemos a la lisina acetilada rodeada de dos residuos que pertenecen a la interfaz de interacción PCNA-DNA y que son fundamentales para la superficie de deslizamiento, que son K77 y K217, y un tercero, K80 que, aunque no pertenece a esta superficie de deslizamiento, pues el de la suya es el residuo K80 de la subunidad contigua, la interacción con él será igual que la que establezca la K20ac de la subunidad contigua, en la que sí tiene un residuo K80 de su superficie de deslizamiento.

Estudiemos, pues, las distancias que hay entre K20 o K20ac y los residuos K77, k217 y K80 que tiene alrededor a lo largo de las trayectorias (Figura 41) y veremos que aparece una diferencia clara entre PCNA y PCNA acetilada en K20. En el caso de PCNA sin acetilar, solo en una de las cadenas, la C, hay un residuo que se acerca a K20 más que el resto y de manera repetida, y es K217; sin embargo nunca lo hace más allá de los $\approx 3,8$ Å. En cambio, en el caso de PCNAK20ac, hay un acercamiento más generalizado a K20ac, aunque fundamentalmente lo hace el residuo K80, pero lo que es más importante y que marca la diferencia con PCNA es que el acercamiento llega a los 2,5 Å, que es distancia de enlace de hidrógeno. Y así ya queda justificada la pérdida de carga generalizada y no solo en K20 que observamos en la Figura 37.

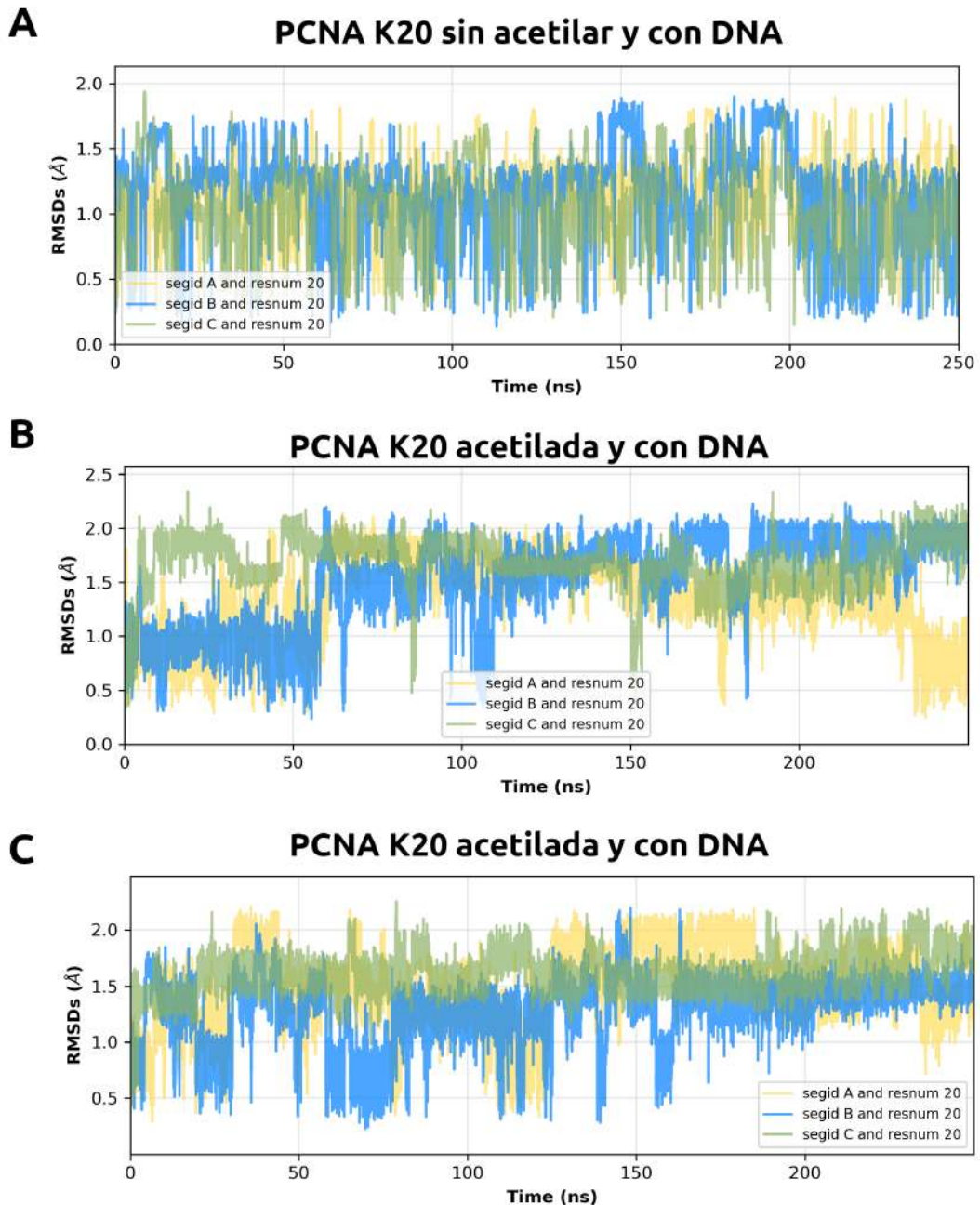


Figura 39: Gráfica de los valores de RMSD a lo largo de la trayectoria de PCNA con las K20 sin acetila y de PCNA con las K20 acetiladas (PCNAK20ac), en medio y abajo (pues tenemos dos réplicas). Los diferentes valores de RMSD que se alcanzan en cada caso denotan estados diferentes, y la oscilación de ese valor denota movimiento del dentro del estado.

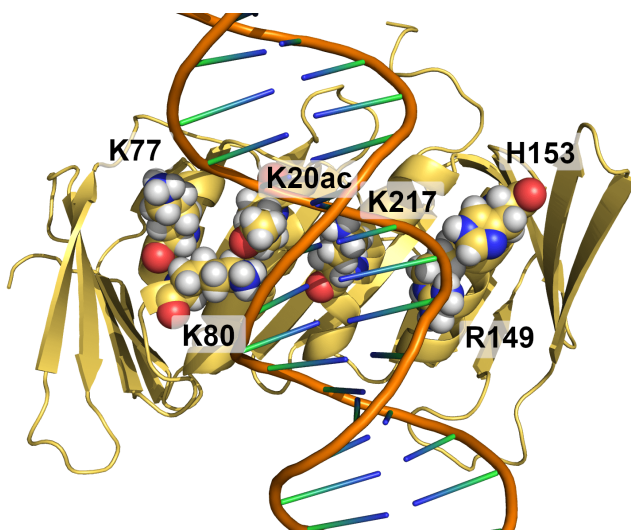


Figura 40: Sección del anillo de PCNA para mostrar la superficie de interacción con el DNA (en color naranja). Los residuos se muestran en representación de bolas y etiquetados. Los residuos K77, K20ac, K217, R149 y H153 pertenecen a la misma superficie de deslizamiento (y no se muestra el residuo K80 de su misma superficie y que corresponde a la subunidad contigua). Se muestra el residuo K80 de su misma subunidad, aunque pertenece a la superficie de deslizamiento contigua, porque es con el que se estudia la interacción de K20ac.

Por tanto, la pérdida de carga por la acetilación de K20 va más allá que la pérdida en un residuo (uno por subunidad, se entiende), pues la formación de enlaces de hidrógeno que con los residuos del entorno hace neutralizar parcialmente sus cargas positivas y disminuir la densidad de carga parcial positiva de toda la zona, afectando a una mayor superficie de la interfaz PCNA-DNA (PCNAK20ac-DNA en este caso).

Los residuos de la interfaz (K20, K77, R149, H153 y K217 de una subunidad y K80 de la contigua) no están implicados en la interacción directa con Pol δ pero son críticos para el reconocimiento PCNA-DNA y para la orientación de la pinza en el DNA, y esta orientación es necesaria para un ensamblado de una holoenzima pol δ funcional. No solo acabamos de ver que la difusión de PCNA es distinta tras la acetilación de K20 y quizás se pierda el modo rueda dentada, es que se sabe que la mutación de esa lisina daña la procesividad de PCNA y, por ende, la de Pol δ .

Por otro lado, puede que la pérdida de la forma de difusión en modo rueda dentada sea clave para el cambio de polimerasa y para el paso de PCNA a través del daño en el DNA. La acetilación hace perder una interacción importante entre PCNA y el DNA, pero quizás sea importante para la HR que exista una menor interacción y que el DNA esté más libre para poder actuar sobre él. Una posibilidad es que, tras la acetilación, la difusión ya no sea en modo rueda dentada y sea difusión lineal sin seguimiento helicoidal, quizás más adecuado para pasar el anillo y toda la maquinaria a través de una lesión en el DNA. Lo que sí puede necesitar perder la estabilidad de la interacción en la interfaz PCNA-DNA es la necesidad de encontrar la disposición adecuada de la pinza para la nueva polimerasa. El leve cambio en la difusión permitirá a PCNA buscar otras conformaciones adecuadas tanteando nuevos ángulos y colocaciones.

2.Regulación de PCNA

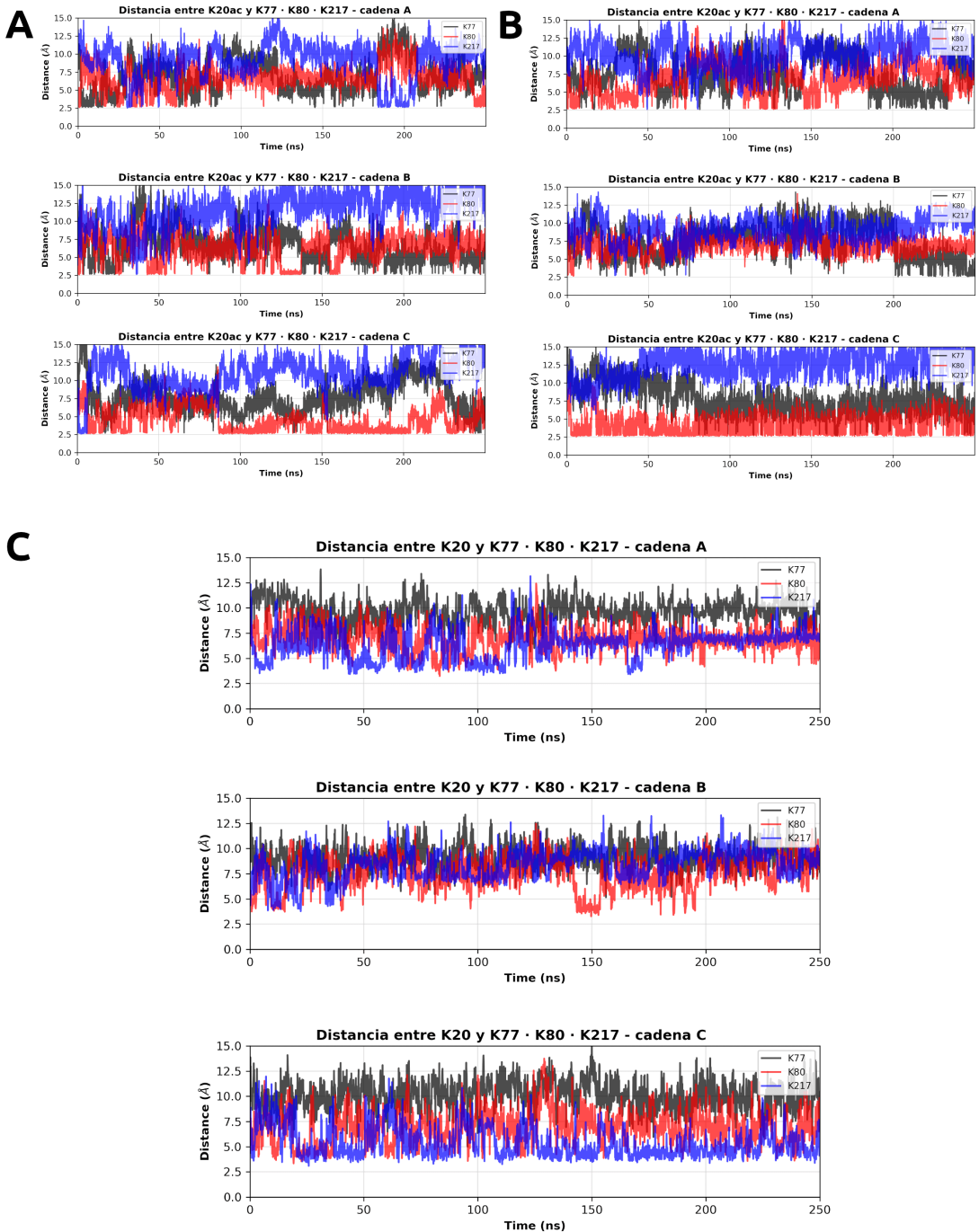


Figura 41: Distancias entre el O del acetilo de K20ac o al N de las otras lisinas (K77, K80 y N217) para cada una de las cadenas de PCNA y para cada dinámica (arriba y en paralelo las dos réplicas de las DM de PCNAK20ac-DNA y abajo la DM de PCNA-DNA). Se representan solo los primeros 250 ns de las dinámicas para comparación.

Así que, con la acetilación de K20 de PCNA por la enzima Eco1, Pol δ se suelta de la pinza por no tener buenas condiciones y se puede producir la entrada de la polimerasa siguiente y la recombinación homóloga. Además vimos que la acetilación en K20 afectaba a la procesividad de Pol δ , pero no a la procesividad de polimerasas TLS como Pol η o Pol ζ ³⁵². Este movimiento más errático de PCNA que le otorga una disposición menos estable a Pol δ puede no ser un problema para la polimerasa TLS Pol η , por ejemplo, pues se ancla a PCNA, como veremos más adelante, a través de la interacción entre su cola C-ter flexible y la ubiquitina anclada a PCNA³⁷⁶ (Figura 42). Puede que la cola larga y desestructurada^{377,378} de Pol η otorgue al binomio ubiquitina-Pol η una plasticidad intrínseca que puede compensar el ajeteo que supone viajar en PCNA acetilada en K20, cosa complicada para Pol δ anclada directamente a PCNA a través de su PIP-box.

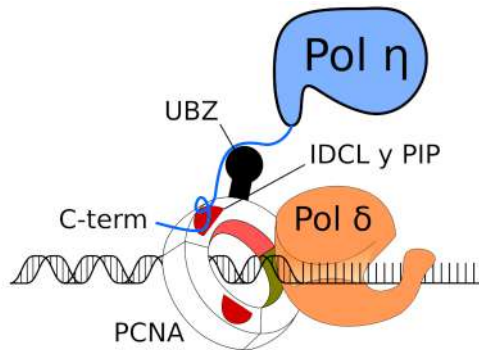


Figura 42: Representación de un hipotético complejo entre PCNA (anillo blanco, con los bolsillos hidrofóbicos para Pip-box en rojo), Pol δ (en naranja) y Pol η (en azul). Pol δ se muestra anclada a PCNA a través de su Pip-box y pol η , además de interacciona a través de su Pip-box con el bolsillo hidrofóbico y bucle IDCL con PCNA, también lo hace con la ubiquitina anclada a PCNA (en color negro) a través del dominio UBZ de su cola flexible C-terminal. Figura inspirada en una de la referencia Ulrich 2013³⁰⁹.

2.3. Interacción entre PCNA y p15^{PAF}

2.3.1. Quién es p15^{PAF}

En 2001, el grupo de Ying Luo de la Universidad del Norte de California identificó en levadura una proteína de 15kDa como un nuevo factor asociado a PCNA mediante la técnica del doble híbrido. Llamaron a esta nueva proteína p15^{PAF} (haciendo referencia a su masa molecular y a su función como *PCNA-Associated Factor*, factor asociado a PCNA en inglés)³⁷⁹.

p15^{PAF}, y de ahora en adelante p15, que también ha sido identificada en la bibliografía como PAF15²⁹⁰, KIAA0101³⁸⁰, NS5ATP9³⁸¹, INK4b³⁸² o OEATC-1²³¹, se une a PCNA a través del motivo conservado de interacción con PCNA PIP-box, de secuencia consenso, como ya hemos visto, Qxx[L/I/M]xx[F/Y][F/Y], y localizado en sus residuos 62-69 (62-QKGIGEFF-69)^{379,383}. Además, p15 tiene otros motivos conservados con significación biológica, según la base de datos UniProt³⁸⁴ (Uniprot ID: Q15004), como por ejemplo el motivo KEN-box (residuos 78-80), requerido para la asociación de p15 con el complejo promotor de la anafase o ciclosoma APC/C (por sus siglas en inglés)²⁹⁰ y con actividad ubiquitín-ligasa, encargado de marcar proteínas del ciclo celular para su degradación vía proteosoma³⁸⁵ (Figura 43).

p15 se localiza en el núcleo celular y en mitocondrias³⁸⁶ y se sobreexpresa en múltiples tipos de cánceres humanos, como el carcinoma hepatocelular^{231,380,381,387}, melanoma³⁸⁸, cáncer de pulmón^{389,390}, cáncer de mama³⁹¹⁻³⁹³, carcinoma gástrico³⁹⁴, adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal³⁹⁵, glioblastoma³⁹⁶, cáncer de páncreas³⁹⁷, cáncer de ovario³⁹⁸, y otros^{386,399,400}, y su sobreexpresión está asociada con un mal pronóstico de la enfermedad^{380,389,391,393}. De hecho, es probable que la supresión de la función de p15 sea una estrategia prometedora para desarrollar nuevos fármacos terapéuticos contra el cáncer³⁸⁷.

Como acabamos de comentar, p15 es sustrato para el complejo APC/C: los niveles de p15 son máximos en la fase G2/M del ciclo celular y disminuyen rápidamente al acabar la mitosis de manera dependiente de APC/C²⁹⁰. p15 se asocia con PCNA, y su minoración hace disminuir el número de células en fase S, lo que sugiere un papel de p15 en la regulación del ciclo celular²⁹⁰. Después de irradiación UV, la reducción de p15 en los sitios dañados donde aparece PCNA conduce a un aumento de la reparación del DNA mediada por recombinación homóloga; su sobreexpresión, sin embargo, conduce a sensibilidad frente al daño en el DNA inducido por luz UV^{290,386}.

La sobreexpresión de p15 promueve el crecimiento de células cancerígenas, mientras que la atenuación de su expresión por siRNA (RNA de interferencia pequeño) reduce la proliferación celular³⁹⁷, resultados que indican claramente que p15 tiene un papel como promotor de crecimiento celular. Aunque los mecanismos moleculares que subyacen tras este efecto aún no han sido identificados.

Algo relevante es que p15 es una proteína de 111 residuos que carece de estructura secundaria y terciaria permanente en condiciones fisiológicas y por eso pertenece al grupo de las conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP a partir de ahora, del inglés *intrinsically disordered proteins*) (Figura 44).

Por tanto, p15 es una IDP que interacciona con PCNA y está regulada por APC/C, involucrada tanto en la progresión del ciclo celular como en la respuesta al daño en el DNA.

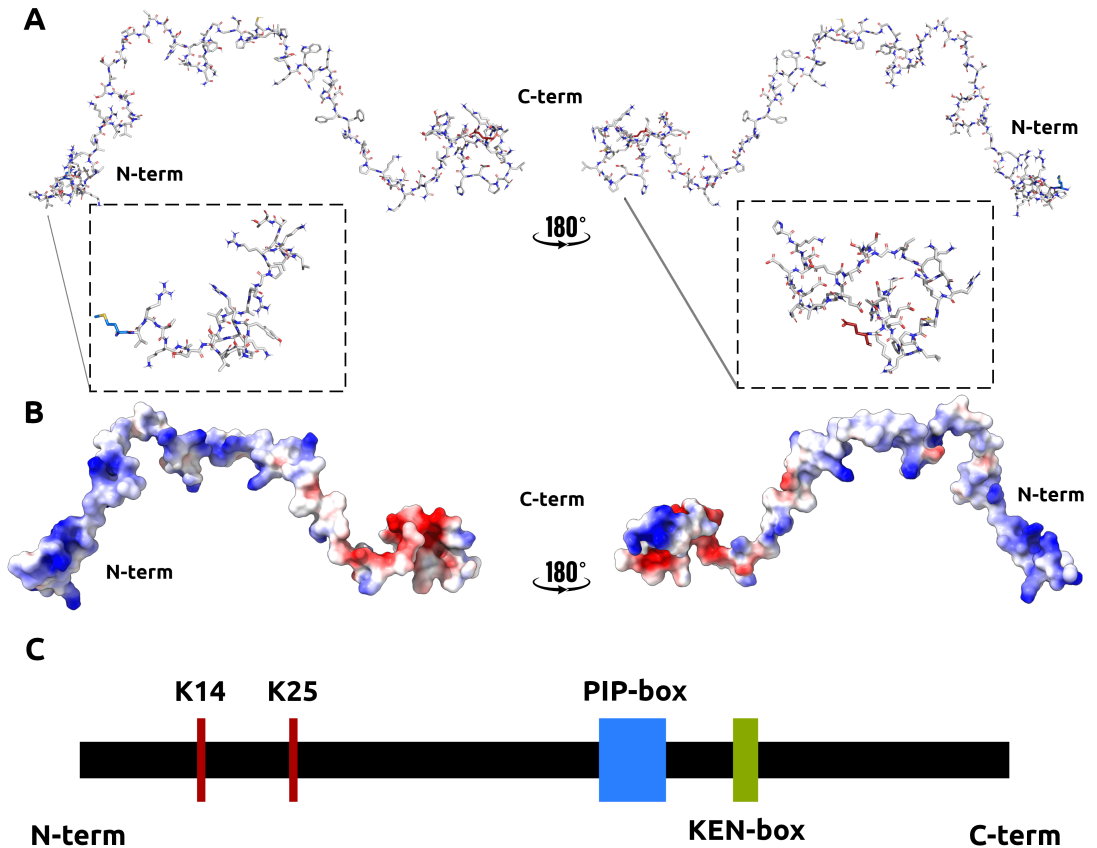


Figura 43: A) Una de las múltiples conformaciones de p15, indicando sus colas C-terminal (C-term) y N-terminal (N-term) y mostrando detalle de las mismas. B) El mismo conformero que en A, pero mostrando la superficie electrostática, indicando gradación de cargas desde el positivo azul, al negativo rojo. Se puede apreciar la acumulación de carga positiva en su cola N-terminal. C) Esquema de los motivos más importantes de la secuencia de p15: K14 y K25 son centros de ubiquitinación que pueden ser también poliubiquitinados, PIP-box es la zona de unión al bolsillo hidrofóbico de interacción con PCNA, y KEN-box es la zona de poliubiquitinación para conducir a p15 a degradación proteosomal.

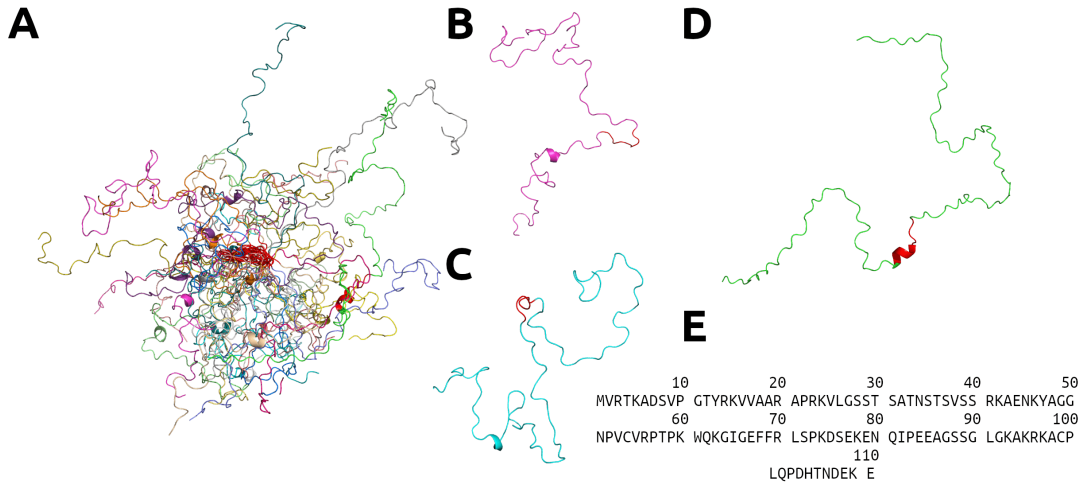


Figura 44: A) Agrupación de algunos conformeros (ensamble) de p15 solapados a través de su secuencia PIP-box (62-69), resaltada en rojo en todos ellos, generados a partir de la secuencia de p15 Uniprot ID: Q15004 con el algoritmo Flexible-Meccano⁷⁰³. En E) se muestra la secuencia de p15.

Qué son y qué hacen las proteínas intrínsecamente desordenadas

El concepto de proteína intrínsecamente desordenada surgió en varios campos independientemente al mismo tiempo, y por eso la terminología en cada campo empezó ligeramente diferente, con «intrínsecamente desestructurada»⁴⁰¹, «nativamente desplegada»⁴⁰², o «nativamente o intrínsecamente desordenada»⁴⁰³. En la conferencia «Barcelona BioMed Conference Intrinsically Disordered Proteins in Biomedicine» en octubre de 2010⁴⁰⁴ se alcanzó un consenso entre los participantes que la terminología «intrínsecamente desordenada» era el término más descriptivo y el menos abierto a interpretación errónea⁴⁰⁵, y este término es, por ello, el utilizado en el campo en general y en esta tesis en particular.

Hoy en día está ampliamente reconocido que las IDP desempeñan diversos papeles biológicos en todos los reinos de la vida⁴⁰⁶. Hace ya dos décadas que los análisis bioinformáticos predijeron que muchas proteínas clave implicadas en señalización y regulación celular son desordenadas o contienen grandes regiones desordenadas en condiciones fisiológicas^{379,407}. Estas proteínas o regiones (estas regiones son conocidas como IDR, del inglés *intrinsically disordered regions*, o también IDD de *intrinsically disordered domains*, de manera equivalente a las IDP) son más abundantes en eucariotas que en procariotas, sugiriendo así una correlación entre el desorden y la complejidad de los procesos biológicos^{406,408,409}.

En octubre de 1972, la Real Academia de Ciencias de Suecia decidió otorgar el Premio Nobel de Química a Christian B. Anfinsen, del NIH (*National Institutes of Health*, de Estados Unidos), «por su trabajo sobre la ribonucleasa, especialmente en lo que respecta a la conexión entre la secuencia de aminoácidos y la conformación biológicamente activa». Compartió la mitad del premio con Stanford Moore y William H. Stein, de la Universidad Rockefeller, por su contribución a la comprensión de la conexión entre la estructura química y la actividad catalítica del centro activo del molécula de ribonucleasa.

Anfinsen demostró que la información necesaria para que una cadena polipeptídica de una enzima dada asuma una conformación específica es inherente a la secuencia lineal de residuos de aminoácidos en dicha cadena, por lo que no se necesita más información que la que se encuentra en el DNA. La fuerza impulsora para tal plegamiento es la tendencia de cada sistema a asumir un estado de energía mínima. De manera más precisa, esto puede expresarse diciendo que la conformación de la enzima representa el estado termodinámicamente más estable en el entorno intracelular.

La estructura tridimensional de la enzima puede reunir en el sitio activo grupos que están muy separados en la secuencia lineal. Moore y Stein observaron que los grupos en el sitio activo suelen tener una reactividad anormalmente alta, y utilizaron esta reactividad incrementada para modificarlos químicamente y de esta manera determinar su posición en la secuencia sin ambigüedades. A través de estas investigaciones, Moore y Stein pudieron dar una imagen detallada del sitio activo de la ribonucleasa mucho antes de que se hubiera determinado la estructura tridimensional de la enzima.

Lo que hizo Anfinsen para comprobar que la secuencia de aminoácidos influía directamente en la estructura de la Ribonucleasa A (RNasaA) fue añadir a una solución de la enzima mercaptoetanol para eliminar sus puentes disulfuro (la RNasaA tiene cuatro), y posteriormente la puso en una solución de urea en concentraciones desnaturalizantes. En estas condiciones, agregó RNA (sustrato para la RNasaA) al medio y observó que las proteínas habían perdido prácticamente por completo su actividad, quedando solo un remanente de un 2%. Después, por medio de diálisis, eliminó poco a poco la urea, restableciendo las condiciones óptimas para su actividad y consiguiendo recuperar hasta un 80% de la actividad normal de la RNasaA, así que asumió que la proteína había recuperado su estructura. Como no había nada más que el polipéptido, sales y agua, Anfinsen concluyó que, en las condiciones ambientales en las que ocurre el plegamiento normal de las proteínas, al menos para proteínas globulares pequeñas, la estructura biológicamente activa es única, estable y está determinada por su secuencia de aminoácidos. Y a esto es a lo que se le conoce como el Paradigma de Anfinsen y es lo que le valió el Nobel en 1972⁴¹⁰.

Las proteínas que se pliegan en estructuras tridimensionales definidas han proporcionado la base para nuestra comprensión de los medios por los cuales el metabolismo celular se lleva a cabo en todas las células, desde bacterias hasta eucariotas complejos. El paradigma de la transcripción de la información genética codificada en las secuencias de desoxirribonucleótidos en el DNA a la secuencia de ribonucleótidos del RNA mensajero, que luego es traducido por los ribosomas a una secuencia de aminoácidos en una proteína, ha sido axiomático en los últimos 50 años. Sin embargo, el último paso en el proceso, el plegamiento de la secuencia de aminoácidos lineal para formar una proteína bien estructurada aún no se comprende completamente. A finales del decenio de los años 2000 ya apareció en varios campos que la formación de una estructura tridimensional estable puede no ser absolutamente requerida en todos los casos para que una proteína sea funcional. De hecho, precisamente la ausencia de estructura 3D estable parecía, en algunos casos, ser requerida para una función correcta de la proteína⁴⁰⁵.

Veinticinco años atrás, dos conjuntos paralelos de observaciones dejaron claro que la estructura terciaria probablemente no era un prerrequisito para la función de algunas proteínas. Por un lado, la disponibilidad de un gran número de secuencias génicas, culminando con la publicación del genoma humano completo en 1999, permitían una aproximación computacional y bioinformática al análisis de las propensiones de multitud de secuencias, y con ello varios grupos notaron que los genomas publicados contenían secuencias que codificarían para proteínas

desestructuradas⁴¹¹. La asombrosa estadística fue que el 6-33% de las proteínas bacterianas, 9-37% de las proteínas de arqueas y el 35-50% de las proteínas eucarióticas debían contener trozos de 40 aminoácidos consecutivos desordenados⁴¹². Y por otro lado, al mismo tiempo y de manera independiente, varios laboratorios experimentales se dieron cuenta de que algunas proteínas, particularmente de control transcripcional y traduccional, de control del ciclo celular y de señalización^{413,414} permanecían sin estructura terciaria estable incluso cuando se sometían a todo el ingenio del repertorio del personal experimentalista, incluyendo la optimización del pH, temperatura, condiciones del tampón, concentración de sal y la presencia de aditivos como agentes caotrópicos y osmolitos⁴⁰⁵.

La mayoría de los factores de transcripción⁴¹⁵ y proteínas implicadas en la transducción de señal⁴¹⁶ en eucariotas se predicen desordenadas o contener amplios segmentos desordenados. Parece que el 79% de las proteínas relacionadas con cáncer en humanos son IDP⁴¹⁶. Esto subraya, dicho sea de paso y para resaltar una idea anterior, la importancia del desorden intrínseco en la función de proteínas que regulan procesos que a menudo se ven alterados en el cáncer, como la proliferación celular, la reparación del DNA y la apoptosis⁴¹⁷.

Y es que el descubrimiento de funciones biológicas para proteínas no globulares e intrínsecamente desordenadas requiere una reformulación del paradigma tradicional clásico estructura-función⁴⁰³, que consideraba no solo que una estructura tridimensional definida era imprescindible para que la proteína desempeñase su función, sino que es esa estructura la que define la función. Pero es que no es este el caso de las IDP, que tienen funcionalidad a pesar de una estructura tridimensional indefinida.

Un patrón comenzaba a emerger. Estas proteínas permanecían desestructuradas en solución en ausencia de sus dianas fisiológicas, pero se plegarían en presencia de su compañera estructurada formando complejos estables que podrían ser purificados y caracterizados^{413,414,418}. El primer compendio de estos datos experimentales preliminares fue publicado por Wright y Dyson en 1999⁴⁰¹.

La función biológica de muchas IDP se manifiesta cuando reconocen su pareja biológica plegada, reconocimiento que a menudo implica motivos lineales de la cadena desordenada que, tras la unión, adoptan conformaciones relativamente fijas adaptadas estructural y químicamente a su compañera, mientras que el resto de la IDP permanece flexible en el contexto del complejo^{419,420}. La reducción de las fluctuaciones conformacionales de los elementos de reconocimiento tras la interacción con la diana implica un coste entrópico que a menudo conduce a complejos de afinidad baja a intermedia, y esta capacidad de modulación entrópica de la interacción es un contribuyente clave para lograr respuestas ajustables a los cambios en las condiciones ambientales o señales externas, explicando así el papel predominante de las proteínas desordenadas en los procesos de señalización⁴⁰¹.

Una vez fue aceptado que las proteínas podían estar desestructuradas y seguir siendo funcionales, un análisis de las secuencias de proteínas cruciales en la célula reveló que grandes tramos de estas contenían composiciones de aminoácidos que claramente no eran propicias para la formación de un pliegue de proteína globular convencional⁴²¹⁻⁴²³. Las secuencias frecuentemente contenían una alta proporción de Ser, Gly, Pro, Asn y Gln, con una baja frecuencia de aminoácidos hidrofóbicos que normalmente formarían parte del núcleo hidrofóbico de una proteína globular plegada. Muchas de las secuencias contenían repeticiones sucesivas múltiples de estos aminoácidos, mientras que otras estaban enriquecidas en aminoácidos cargados Lys, Arg, Glu y Asp. Estas composiciones de secuencia aparentemente anómalas promovieron el de-

sarrollo de varios algoritmos para la predicción de secuencias desordenadas en las proteínas^{406,411,424-435}.

Cuando el número de IDP empezó a crecer, se comenzaron a formar teorías sobre qué ventajas podría conferir un desorden intrínseco a una proteína. Particularmente, si la proteína forma parte de una red de interacción, puede, por ejemplo, ser ventajoso para ella interactuar con varias compañeras, y, estando desordenada, la proteína podría ser capaz de usar diferentes estructuras para lograr estas interacciones. Sitios o motivos de interacción múltiples en un dominio desordenado único podrían conducir a la formación de complejos altamente ordenados, donde diversas dianas podrían acercarse por unión independiente al mismo dominio⁴⁰⁵.

Aunque la evidencia bioinformática y de experimentos *in vitro* era inequívoca, había dudas expresas sobre si las proteínas desordenadas podían funcionar *in vivo*. La bien conocida sensibilidad a proteasa de proteínas desplegadas era un aparente problema, así como la naturaleza abarrotada del entorno celular, el cual debe inducir estados plegados.

Una de las mejores explicaciones del fenómeno del desorden en estos términos fue dada en una revisión de 2002 por Dunker y colaboradoras/es⁴⁰³. Primero, las proteasas están compartimentadas y secuestradas en la célula⁴³⁶, y sus reacciones están extremadamente reguladas^{437,438}. Segundo, las regiones desordenadas pueden ser inaccesibles o haber perdido los sitios sensibles a proteasa, y algunas de ellas, particularmente aquellas asociadas con la regulación transcripcional, por ejemplo, pueden o estar presentes en el estado libre desordenado solo transitoriamente a medida que pasan de una compañera a otra o estar asociadas con chaperonas^{403,439}, aunque cierto es que las proteínas desordenadas no muestran, en general, preferencias particulares para la unión a chaperona⁴⁴⁰.

Las propias chaperonas frecuentemente contienen una alta proporción de regiones desordenadas; por ejemplo, el 54% de los residuos en chaperonas de RNA caen en estas regiones⁴⁴¹ y se piensa que funcionan como elementos de reconocimiento, así como agentes de relajación para regiones mal plegadas vía un mecanismo que podríamos llamar de «transferencia de entropía»⁴⁴². Regiones desordenadas específicas de proteínas pueden tener papeles esenciales en el plegado y ensamblado de complejos moleculares, y un ejemplo de ello es el ensamblado de los anticuerpos IgG⁴⁴³.

Se ha encontrado que la aglomeración molecular favorece los estados plegados⁴⁴⁴, pero esto se aplica solo a proteínas que son capaces de plegarse independientemente. Si el paisaje de energía de un polipéptido no es compatible con un estado plegado de manera independiente o intrínseca, ni siquiera un entorno atestado puede inducir la formación de tal estado⁴⁰³ (Figura 45).

Hay que considerar que las IDP forman parte de todo el panorama de la estructura y función de proteínas. Las proteínas desordenadas pueden verse como un extremo del continuo que va, a través de la flexibilidad y la heterogenidad conformacional, desde las proteínas completamente plegadas y enteramente rígidas hasta las proteínas completamente desplegadas y flexibles. Su existencia claramente indica que el proteoma es muchísimo más versátil de lo que habíamos imaginado y que el desorden intrínseco es también un tipo de estructura dentro de todas las posibles en proteínas, y además el tipo de estructura más prolífico.

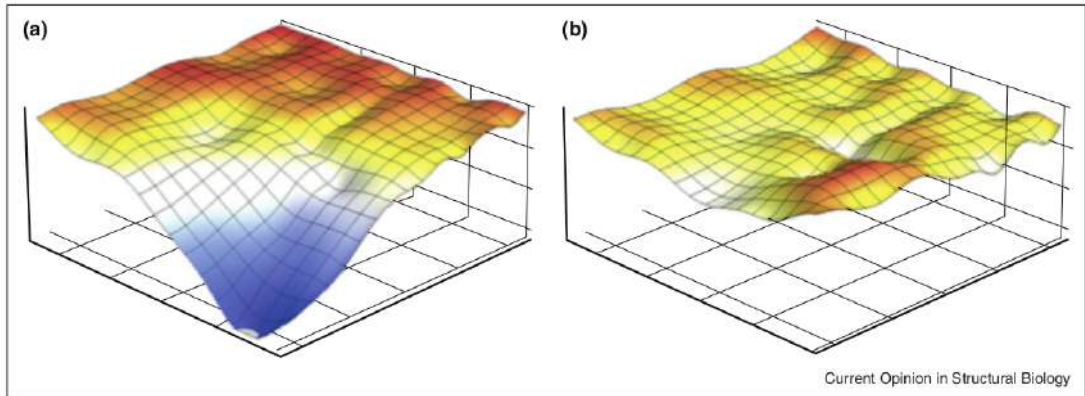


Figura 45: Paisaje de energía potencial de proteína plegada (a) e IDP (b). El paisaje energético de una proteína plegada muestra un estado de energía mínima bien definido correspondiente a la conformación plegada; Sin embargo, el de una IDP carece de este mínimo profundo. Figura tomada con consentimiento de Fisher et. al. 2011⁷⁰².

Papeles fisiológicos de las IDP

El papel central de las IDP y las proteínas que contienen dominios intrínsecamente desordenados en procesos celulares cruciales argumenta su importancia como un tipo estructural general y la repercusión fundamental del desorden intrínseco en el metabolismo de las células vivas.

Una de las observaciones más tempranas sobre las IDP fue que estaban presentes con más alta frecuencia en ciertos nichos fisiológicos. Así, se encontró que eran más abundantes entre las proteínas relacionadas con el cáncer y la señalización celular^{401,416}. Las IDP con frecuencia interactúan con proteínas de redes de interacción, o funcionan como centros en tales redes^{420,445}. Los dominios desordenados parecen estar presentes con alta frecuencia en proteínas reguladoras asociadas con vías de señalización y procesos celulares fundamentales como la transcripción y la traducción^{415,416}, el ciclo celular⁴⁴⁶, la transducción de señal y la fosforilación proteica, en definitiva, en todos los procesos que están, de alguna manera, implicados en control fisiológico⁴⁰⁵. La abundancia de IDP en la célula está estrechamente regulada para garantizar una señalización precisa en el tiempo y en el espacio, y las mutaciones en las IDP o los cambios en su abundancia celular están frecuentemente asociados con enfermedades⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹.

Desde el punto de vista de las enfermedades genéticas, que las IDP y las IDD estén frecuentemente asociadas a enfermedades es relativamente fácil de entender. Aumentos en el número de secuencias repetidas, como suele ocurrir en las regiones desordenadas, con frecuencia presagian susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas hereditarias como las enfermedades de Huntington y de Parkinson⁴⁵⁰⁻⁴⁵². ¿Por qué las mutaciones que causan enfermedades no son vistas de manera preferencial en las regiones estructuradas, donde presumiblemente tendrían más efecto? La respuesta a esta pregunta yace en la mayor probabilidad de que las mutaciones en dominios estructurados de proteínas vitales tengan efectos deletéreos y ser letales en el estado embrionario. Las enfermedades genéticas causadas por mutaciones en regiones desordenadas pueden, sin embargo, ser consideradas por la célula como un mal menor⁴⁰⁵.

El importante papel de las IDP en muchas enfermedades ha llevado al desarrollo de fármacos dirigidos directamente a proteínas desordenadas o a sus interacciones con proteínas plegadas⁴⁵³⁻⁴⁵⁵.

Las IDP tienen muy diversos papeles funcionales, en parte debido a su habilidad para muestrear varios estados estructurales y oligoméricos en el continuo de estados proteicos accesibles. Una función, quizás sorprendente, supone la modulación de la solubilidad proteica. La alta proporción de residuos cargados y polares en su secuencia a menudo incrementa la solubilidad de las IDP y las proteínas que contienen IDR⁴⁵⁶ y, de hecho, algunas IDP pueden actuar como detergentes proteínicos gracias a su distribución de secuencia única⁴⁵⁷. En contraposición, la exposición de sus residuos hidrofóbicos por la falta de estructura terciaria y la posible propensión a estructuras extendidas y giros puede suponer un riesgo de agregación y de formación de estructuras tipo β amiloide, por eso hay muchas IDP implicadas, como ya hemos señalado, en enfermedades basadas en la agregación^{454,458,459}.

Más del 90% de los genes humanos se someten a empalme alternativo⁴⁶⁰. El empalme alternativo específico de tejido, que da como resultado la expresión de distintas isoformas de proteínas que hacen interacciones distintas en diferentes tejidos, tiene funciones fundamentales en el desarrollo y la diferenciación celular^{461,462}. Los segmentos de proteínas codificados por exones específicos de tejido están enriquecidos en desorden, mientras que los exones constitutivos codifican con mayor frecuencia dominios plegados^{461,462}. Estas IDR son ricas en motivos de interacción y sitios para la modificación postraducciona, y tienden a ocupar posiciones centrales en las redes de interacción celular. El empalme específico de tejido modula las propiedades de unión de proteínas reguladoras críticas y ajusta de forma diferencial las redes de señalización en diferentes tipos de células o tejidos⁴⁰¹.

La señalización intracelular se logra mediante redes dinámicas de proteínas que interactúan entre sí, y el desorden intrínseco tiene un papel destacado en la mediación de estas interacciones. Las regiones desordenadas de proteínas de señalización y proteínas reguladoras frecuentemente contienen múltiples motivos de secuencia conservada que interactúan con ácidos nucleicos u otras proteínas^{408,463}, y estos motivos lineales cortos que median la unión pueden identificarse fácilmente mediante análisis bioinformáticos^{464,465}. Las estimaciones sugieren que el proteoma humano puede contener más de 100.000 motivos de unión lineal cortos ubicados dentro de IDR⁴⁶⁶.

Las características físicas de las IDP permiten un nivel exquisito de control de los procesos de señalización celular. Sus características favorables en este sentido incluyen: la presencia de pequeños elementos de reconocimiento que se pliegan tras la unión con su pareja; un grado de flexibilidad que les permite interactuar promiscuamente con diferentes objetivos en diferentes ocasiones; sitios accesibles para modificaciones postraduccionales; utilización más eficiente de motivos de secuencia conservados para mediar interacciones de unión; la capacidad de unirse a parejas con alta especificidad pero modesta afinidad, lo que lleva a una disociación y terminación rápida y espontánea de la señal; y ventajas cinéticas en la señalización, ya que sus velocidades de asociación rápidas permiten que las señales se activen rápidamente^{408,438,467,468}.

Al realizar sus funciones de señalización, las IDP se unen de manera transitoria a múltiples socias de interacción en redes reguladoras dinámicas⁴⁶⁹ que responden de manera precisa y cuantitativa a las señales celulares y tienen el potencial de procesar información compleja⁴⁰¹. Estas interacciones moleculares transitorias y dinámicas en las que las IDP intercambian parejas de unión y compiten por la unión a proteínas centrales de la red, a menudo presentes en canti-

dades limitantes, además se afinan mediante modificaciones postraduccionales⁴⁰⁵, lo que les permite funcionar como interruptores⁴⁷⁰ y reostatos⁴⁷¹⁻⁴⁷⁶. El empleo del desorden proporciona, pues, a la célula importantes ventajas, ya que la misma secuencia se puede usar en diferentes contextos y en respuesta a diferentes señales para activar o desactivar diferentes vías de señalización y provocar diferentes respuestas celulares⁴⁵⁸.

La mayor flexibilidad y plasticidad conformacional de las regiones desordenadas de las proteínas las hace fácilmente accesibles para la modificación postraducciona⁴⁷⁷. Se ha estimado que, cuando se tienen en cuenta las MPT, puede haber hasta un millón de motivos de interacción peptídica dentro de las IDR del proteoma humano⁴⁶⁶. Este enorme número subraya de nuevo el papel central que tienen las IDP en la señalización y regulación celular, y arroja luz sobre su notable diversidad funcional⁴⁰¹.

Las modificaciones de una IDP por diferentes quinasas, acetilasas, metilasas u otras enzimas modificadoras pueden dar diferentes resultados de señalización, lo que agrega una gran complejidad a las vías de señalización. Los sitios de fosforilación se encuentran predominantemente en IDR⁴⁷⁸, y la fosforilación juega un papel importante en la modulación del conjunto conformacional (en la jerga del campo, el conjunto de conformaciones que describe la estructura de una IDP se denomina por el término anglosajón *ensemble*. Vimos uno de ellos en la Figura 44) y las interacciones de las proteínas de señalización desordenadas. La señalización puede regularse mediante la adición (o eliminación) de un único grupo fosforilo, como por ejemplo ocurre en la activación de CREB a través de la fosforilación en Ser133 en el dominio desordenado de activación inducible por quinasa^{418,479}. Las proteínas de señalización intrínsecamente desordenadas contienen con frecuencia múltiples sitios de fosforilación que pueden modificarse de manera secuencial o combinados para ejercer un control exquisito de la señalización^{480,481}.

Las IDP pueden funcionar para separar o salvar distancias, como las que hay, por ejemplo, entre sitios activos de enzimas y sitios de unión a sustrato en grandes complejos catalíticos⁴⁸². La presencia de IDR como enlazadores flexibles (el término más extensamente empleado, incluso entre la comunidad hispanohablante, es el anglosajón *linker*) entre dominios ordenados permite el control de la orientación y las distancias entre dichos dominios^{476,483-485}. Aunque el papel de los *linkers* es probable que sea principalmente topológico permitiendo que partes distantes de la cadena polipeptídica interactúen con diversas secuencias diana que podrían estar muy lejos o muy cerca, hay secuencias enlazadoras que juegan roles muy específicos en un gran número de sistemas. Un estudio computacional de la influencia de la presencia de un *linker* flexible en la afinidad de factores de transcripción multidominio para el DNA^{486,487} mostró un incremento significativo en la afinidad esperada, lo cual fue atribuido a una habilidad mejorada para deslizarse a lo largo de la secuencia del DNA y encontrar sitios de unión específicos⁴⁸⁸. Pero también tienen funciones más complejas como funcionar como resortes entrópicos^{489,490} o temporizadores^{491,492}. El tamaño del *linker* y su flexibilidad puede, por ejemplo, determinar cuánto tiempo tardan dos dominios en encontrarse estocásticamente y, por lo tanto, puede cronometrar un evento de señalización posterior⁴⁵⁸.

Gracias a sus propiedades de unión favorables debido a la falta de una estructura estricta a cambio de la posibilidad de múltiples estructuras de energías similares, una función importante de las IDP es mediar el reconocimiento proteico. El complicado paisaje de energía de las IDP y sus complejos potencialmente dinámicos facilita el alosterismo y la regulación alostérica^{493,494}. Además, esta flexibilidad dentro de los estados de unión dinámicos es la que permite una fácil regulación por MPT debido a la accesibilidad a las enzimas modificadoras. Las MPT pueden

tener consecuencias drásticas en la unión debido a efectos estructurales, estéricos y/o electrostáticos, por eso las interacciones en el complejo pueden activarse o desactivarse dinámicamente mediante estas MPT⁴⁷¹.

Los complejos que involucran IDP (o IDD) entierran un área superficial muy grande en comparación con el número de aminoácidos involucrados⁴⁹⁵. La consecuencia de esto para la célula es que puede alcanzarse un alto grado de especificidad (y afinidad) para un desembolso metabólico relativamente pequeño, pues para alcanzar la misma superficie de área enterrada empleando solo proteínas plegadas se requeriría que las proteínas implicadas en la formación del complejo fueran mucho más grandes, es decir, de secuencias mucho más largas, imponiendo una carga metabólica demasiado alta a la célula⁴⁹⁵. Por tanto, el empleo de IDPs en la formación de complejos aumenta el rendimiento metabólico de la célula.

Muchas IDP interactúan a través de conformaciones extendidas con una compañera plegada en una gran interfaz, lo que proporciona a las IDP una alta especificidad y el potencial para una afinidad significativa que puede ser modulada por la pérdida de entropía conformacional tras la unión, permitiendo el ajuste de la afinidad⁴⁹⁶. El radio hidrodinámico más grande de algunas IDPs, en comparación con estados colapsados, lleva a radios de captura mayores⁴⁹⁷, pero también puede ralentizar la difusión⁴⁹⁸, modulando la cinética de la unión y liberación, efectos que pueden ser más significativos en proteínas que contienen dominios plegados e IDR. Incluso si el estado unido de la IDP está ordenado, la cinética y la termodinámica de la unión pueden ser significativamente diferentes de las de proteínas plegadas. Ya hemos comentado que la misma región de una IDP puede a veces interactuar con diferentes proteínas diana en distintas conformaciones (la mencionada promiscuidad de las IDP), permitiendo multiespecificidad debida a la plasticidad conformacional de la cadena^{499,500}.

Las interacciones entre una IDP que contiene múltiples motivos de unión y su diana rara vez serán energéticamente uniformes, por eso, para comprender las interacciones con IDP, es de gran importancia conocer cómo se distribuye la energía libre de unión en la interfaz IDP-diana⁴⁰¹. La unión con frecuencia estará dominada por residuos en puntos calientes locales que contribuyen a la mayor parte de la energía libre de unión, mientras que otras regiones pueden interactuar solo débilmente y contribuir en menor medida, pero aún significativamente, a la afinidad de unión general⁴⁰¹. Se puede ver un ejemplo de esto en la interacción entre el dominio de activación transcripcional de RELA y el dominio TAZ1 de CBP⁵⁰¹. La unión está dominada por tres motivos anfipáticos en RELA que se acoplan dentro de sendas ranuras hidrófobas en la superficie del dominio TAZ1. La hélice anfipática transitoria establece contactos adicionales en la región N-ter del dominio RELA, pero estos contribuyen poco a la energía de unión general. Los experimentos de RMN muestran que las interacciones son dinámicas y que esta región de RELA fluctúa entre estados libres y unidos, y entre conformaciones helicoidales y extendidas⁵⁰¹, sin embargo, los sitios de unión transitorios contribuyen con una energía libre de unión no nula, y la eliminación de estas regiones conducen a una disminución apreciable de la afinidad⁵⁰¹.

La presencia de una interfaz dinámica débil tiene ventajas en una red de señalización: cuando las IDP que contienen múltiples motivos de interacción se unen a sus dianas a través de interfaces dinámicas débiles además de a través de interfaces estáticas bien estructuradas, las fluctuaciones conformacionales exponen transitoriamente el motivo de interacción dinámico, lo que facilita que se produzcan modificaciones postraduccionales y/o interacciones con otras proteínas diana⁴⁰¹. Por ejemplo, la proteína p120 regula la estabilidad de la adhesión célula-célula al unir la cola citoplasmática intrínsecamente desordenada de la cadherina a través de interfaces

estáticas y dinámicas. La región central de la cola de cadherina imparte especificidad a la interacción y se une fuertemente a p120 a través de una interfaz estática bien estructurada. Por el contrario, una región flanqueante N-terminal interactúa solo débilmente y dinámicamente con p120, fluctuando entre estados libres y unidos. Este sitio de unión dinámico contribuye poco a la afinidad de unión, pero tiene una función importante para determinar el destino celular de la cadherina: al enmascarar un motivo Leu-Leu crítico, esta región dificulta la internalización por endocitosis mediada por clatrina⁵⁰².

Incluso en ausencia de un motivo de interacción de alta afinidad localizado, las IDR pueden unirse fuertemente a sus dianas mediante la acción sinérgica y dinámica de múltiples sitios de unión débiles. Un ejemplo de ello es la interacción entre el complejo APC/C que controla la división celular y el inhibidor mitótico EMI1, que contiene una IDR con múltiples motivos de interacción que median interacciones con múltiples sitios en APC/C⁵⁰³. Los sitios de unión individuales en EMI1 interactúan solo débilmente con APC/C, pero funcionan sinérgicamente para formar un complejo de alta afinidad a través de una unión múltiple⁵⁰³. Además, debido a que la unión de los sitios individuales es débil, las fluctuaciones entre los estados libres y unidos hacen que EMI1 sea accesible para las quinasas que pueden regular la interacción con APC/C a través de la fosforilación⁴⁰¹. Y así, a través del desorden intrínseco de una región de 143 residuos, EMI1 puede unirse dinámicamente a través de múltiples motivos de reconocimiento para regular una máquina molecular de 100 veces su tamaño.

El alosterismo desempeña un papel crucial en la regulación de las redes de señalización celular⁵⁰⁴. Debido a su plasticidad conformacional, a su capacidad para unir múltiples dianas con alta especificidad y baja afinidad, y a su propensión a la modificación postraduccional, las IDP muestran un comportamiento alostérico complejo que puede ajustar sus interacciones reguladoras⁵⁰⁵. De hecho, los modelos sugieren que el acoplamiento alostérico es óptimo cuando uno o los dos sitios de unión que se acoplan están intrínsecamente desordenados⁴⁹³. Ejemplos de esta regulación alostérica por IDP se han observado experimentalmente para la pareja toxina-antitoxina Phd-Doc del bacteriófago P1⁵⁰⁶, o entre la oncoproteína de adenovirus E1A y las proteínas celulares CBP y RB, que puede mostrar alosterio positivo o negativo dependiendo de los sitios de unión de E1A disponibles⁴⁹⁴. Quizás la modulación de las interacciones alostéricas surge como un mecanismo común por el cual se regulan las funciones de señalización de las proteínas intrínsecamente desordenadas nodo y por el cual se determina el resultado final de la señalización⁴⁰¹.

Además, los efectos alostéricos asociados con la unión de las IDR podrían potencialmente explotarse como una nueva estrategia para el desarrollo de fármacos. Una pequeña molécula llamada MSI-1436 se une a la región desordenada C-ter de la proteína PTP1B y, mediante un efecto alostérico, bloquea la enzima en un estado inactivo, limitando así el crecimiento tumoral, y convirtiéndose en una candidata terapéutica viable para el tratamiento del cáncer de mama¹⁹.

Una característica que instantáneamente viene a la cabeza es la posibilidad de que un dominio desordenado podría unirse en diferentes conformaciones a diferentes dianas gracias a su polimorfismo conformacional^{408,414}. Este concepto de la actividad basal promiscua ya fue explorado hace muchos años en el contexto de las afinidades de anticuerpos, donde se vio que los sitios de combinación de los anticuerpos eran con mucha frecuencia altamente flexibles⁵⁰⁷. La secuencia desordenada de una IDP puede adoptar conformaciones completamente diferentes cuando forma complejos con compañeras diferentes. Algunos ejemplos incluyen proteínas remodeladoras de la cromatina, las cuales interactúan con una amplia variedad de proteínas y

ácidos nucleicos⁵⁰⁸, diferentes isoformas de receptores nucleares de hormonas^{509,510}, o el caso extremo del dominio de unión del coactivador nuclear NCBD de la proteína de unión a CREB (CBP), que se pliega en dos estructuras muy diferentes cuando se une al dominio de activación de los coactivadores del receptor nuclear p160^{511,512} o cuando se une al factor regulador del interferón 3 (IRF3)⁴⁴⁵.

La IDR de la oncoproteína de adenovirus E1A es un buen ejemplo de cómo las interacciones promiscuas a través de múltiples motivos de unión pueden modular los resultados de la señalización. E1A utiliza su región N-terminal y las llamadas regiones conservadas 1 y 2 (CR1 y CR2) para reclutar proteínas reguladoras clave y subvertir las vías de señalización celular, forzar la entrada en fase S del ciclo celular y activar la transcripción de genes virales⁵¹³. Al incorporar múltiples motivos de unión dentro de una IDR, E1A funciona como un centro que puede unirse promiscuamente a numerosas proteínas celulares y organizarlas en complejos de orden superior para alterar eficientemente las redes reguladoras y reprogramar la expresión génica⁴⁰¹. De hecho, la región N-terminal y CR1 funcionan sinérgicamente para activar la transcripción de genes del adenovirus vía interacción con CBP y p300 mediada por CBP⁵¹⁴ y reprimir la transcripción de genes celulares involucrados en proliferación y diferenciación⁵¹⁵.

Pero no todas las IDP sufren transiciones hacia un plegamiento al realizar sus funciones biológicas, algunas IDP permanecen desordenadas incluso después de unirse a sus objetivos^{482,516}, formando complejos «difusos», término acuñado por Monika Fuxreiter⁵¹⁷. El término “complejos difusos” (en inglés *fuzzy complexes*) fue creado para enfatizar la naturaleza fluida, variable, de las interacciones proteína-proteína, y señalar que este atributo de muchos, si no todos, los complejos proteicos donde intervienen IDP proporciona un recordatorio de que los métodos de alta resolución para definir sus estructuras pueden estar condenados al fracaso⁵¹⁷.

Estos complejos difusos son producto de las interacciones entre proteínas desordenadas que mantienen un desorden significativo en una o las dos compañeras tras la formación del complejo. Tales interacciones, pueden consistir en múltiples interacciones débiles: la IDP usa múltiples sitios de unión para contactar con varios sitios de la diana y dar lugar a un complejo que mantiene un grado de desorden^{473,482,516,518}. Las IDP también pueden formar complejos dinámicos heterogéneos con sus dianas interactuando a través de interfaces estáticas ordenadas y completamente estructuradas a la vez que interaccionan a través de zonas dinámicas desordenadas (o difusas) adicionales en sitios distintos^{502,519}. Funcionalmente, tales interacciones de unión dinámica pueden mejorar la afinidad de unión a la diana, mediar la comunicación en las vías a través de la formación de complejos ternarios con otras parejas de unión, y modular las interacciones alostéricas⁴⁹⁴.

En esta línea, Monika Fuxreiter dice que hay procesos importantes en la célula que frecuentemente requieren el ensamblado y el funcionamiento de máquinas moleculares. Estas máquinas, cuyo funcionamiento no es constante pero que deben ser activadas en respuesta a señales y otros requerimientos metabólicos en una célula y momento dados, suelen contener componentes que no están completamente estructurados, y a veces incluso están completamente desordenados, dentro de una matriz de otros componentes más o menos rígidos. Tal máquina moldeable, como la denomina Fuxreiter, probablemente sería más capaz que una entidad completamente rígida de responder a diferentes condiciones, reconociendo múltiples dianas que pueden tener diferentes estructuras, y permitir o facilitar reordenamientos conformacionales⁵²⁰. Ejemplos de ello son la máquina macromolecular del ribosoma, la organización de la

cromatina, el ensamblaje y desensamblaje de microfilamentos y microtúbulos, el transporte a través del poro nuclear o el funcionamiento de los protectores de proteínas y RNA^{401,521,522}.

Una forma extrema de unión y plegamiento acoplados ocurre cuando ambos miembros de la pareja están desordenados en su estado libre y se estructuran al interactuar, como entre el dominio ACTR de p160 y el dominio NCBD de CBP/p300⁵¹¹. En el otro extremo están la histona 1 humana y su chaperona nuclear, ambas IDP, que se asocian conservando completamente su desorden estructural y flexibilidad⁵²³.

Las interacciones proteína-proteína multivalentes de baja afinidad, a menudo mediadas por secuencias intrínsecamente desordenadas de baja complejidad y similares a priones, pueden promover, en ciertas condiciones, la separación de dos fases líquidas para formar gránulos citoplásmicos y nucleares sin membrana⁵²⁴⁻⁵²⁷. Estos gránulos se comportan como gotas líquidas dinámicas, intercambiando rápidamente proteínas componentes y RNA con el citoplasma o con el nucleoplasma. Al secuestrar proteínas reguladoras en condiciones de alta concentración macromolecular, la separación de fases mediada por IDP contribuye a su compartimentación de manera regulada^{526,527}, lo que puede tener una profunda influencia en la señalización celular o formación de materiales elásticos, geles y fibras con diferentes papeles biológicos⁵²⁷⁻⁵³¹. Por ejemplo, en respuesta al estrés celular, el complejo mTORC1, una quinasa que controla el crecimiento celular y el metabolismo, es secuestrada en forma inactiva en gránulos. La reactivación de mTORC1 requiere la disolución de estos gránulos de estrés, proceso mediado por la fosforilación de Tyr específicas regulado por la quinasa DYRK3⁵³². La activación de DYRK3 promueve la disolución de los gránulos de estrés por fosforilación de mTORC1, que conduce a su liberación reactivando la señalización⁵³². Dada la abundancia de secuencias multivalentes de baja complejidad y secuencias similares a priones ricas en Gln y Asn en proteínas de unión a RNA y factores de transcripción^{527,533}, parece probable que la separación de fases desempeñe un papel bastante general, aunque aún poco entendido, en la señalización celular⁵³⁴.

Funciones de p15

p15 se aisló inicialmente como pareja de unión a PCNA y se demostró que se une a esta compitiendo con el regulador del ciclo celular p21³⁸⁶. Con diferentes experimentos en líneas celulares tumorales y no tumorales, Simpson y colaboradoras/es demostraron que p15 se localiza en núcleo y mitocondrias asociada a PCNA, y que esta asociación se ve potenciada tras irradiación con luz UV^{231,386}. También demostraron que la sobreexpresión de p15 en células de mamífero protege a las células de la muerte inducida por luz UV^{386,407}. Basándose en las similitudes entre el comportamiento de p15 y el factor supresor de tumores conocido como p33ING1b, Fiona Simpson y colaboradoras/es mostraron que estas dos proteínas interactúan en el mismo complejo en los cultivos celulares, lo que sugiere que p15 forma parte de un gran complejo proteico potencialmente implicado en la regulación de la reparación del DNA, apoptosis y la progresión del ciclo celular³⁸⁶.

La proteína KIAA0101 también se identificó como p15^{PAF} y para investigar el significado biológico de su sobreexpresión en células cancerígenas, en el grupo de Hidewaki Nakagawa de Japón³⁹⁷ hicieron experimentos en células pancreáticas tumorales con los que encontraron que una expresión reducida de p15 causa una drástica atenuación de su proliferación así como una disminución significativa de la velocidad de replicación del DNA. Coincidiendo con esto, la sobreexpresión exógena de p15 aumenta el crecimiento de las células cancerosas, revelando así su propiedad oncogénica y promotora de crecimiento.

Hosokawa y colaboradoras/es también mostraron que la expresión de p15 estaba estrechamente regulada por la vía p53-p21 (factores proteicos también implicados en la reparación del DNA y en la progresión del ciclo celular)³⁹⁷. Además, hicieron experimentos con péptidos diseñados para inhibir la interacción p15-PCNA resultando en una interrupción significativa del crecimiento de células cancerígenas, sugiriendo que la supresión de la actividad oncogénica de p15 y PCNA o la inhibición de la interacción p15-PCNA probablemente sea una prometedora estrategia para el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas contra el cáncer³⁹⁷.

Tatsuya Kato y colaboradoras/es encontraron altos niveles de expresión de p15 en células humanas de cáncer de pulmón y que cuando p15 se sobreexpresa, compite con el factor p21 por la unión a PCNA³⁸⁹ hasta superar la función inhibitoria mediada por p21 en la progresión del ciclo celular¹¹⁵. p15 está sobreexpresada en otros tumores, como en el de exófago³⁷⁹, páncreas³⁹⁷, colon⁵³⁵, hígado³⁸⁰, y en varias líneas celulares de carcinoma anaplásico de tiroides³⁹⁹.

Los experimentos de Lou K. Povlsen y colaboradoras/es demuestran una participación generalizada de la señalización por ubiquitinación, importante mecanismo de regulación por modificación covalente en células eucariotas⁵³⁶, en las respuestas al estrés genotóxico e identifican una función para la ubiquitinación de p15 para salvaguardar la integridad del genoma en respuesta a la radiación UV²⁹¹.

La ubiquitinización de p15 está bien caracterizada por ser importante en el baipás del bloqueo de la replicación mediante la regulación del reclutamiento de las polimerasas TLS²⁹¹. Durante la fase S del ciclo celular, p15 es modificada por una doble ubiquitinación de sus lisinas 15 y 24 mientras está unida a PCNA, lo que desencadena su rápida eliminación dependiente de proteosoma y facilitando así el baipás de lesiones que bloquean la horquilla de replicación al permitir el reclutamiento de la polimerasa de síntesis translesión Pol η por la PCNA monoubiquitinada en los replisomas bloqueados²⁹¹. Los resultados de Povlsen identifican la ubiquitinización dinámica de p15 como un importante mecanismo de regulación que protege a las células frente a la inestabilidad genómica provocada por la radiación UV (Figura 46).

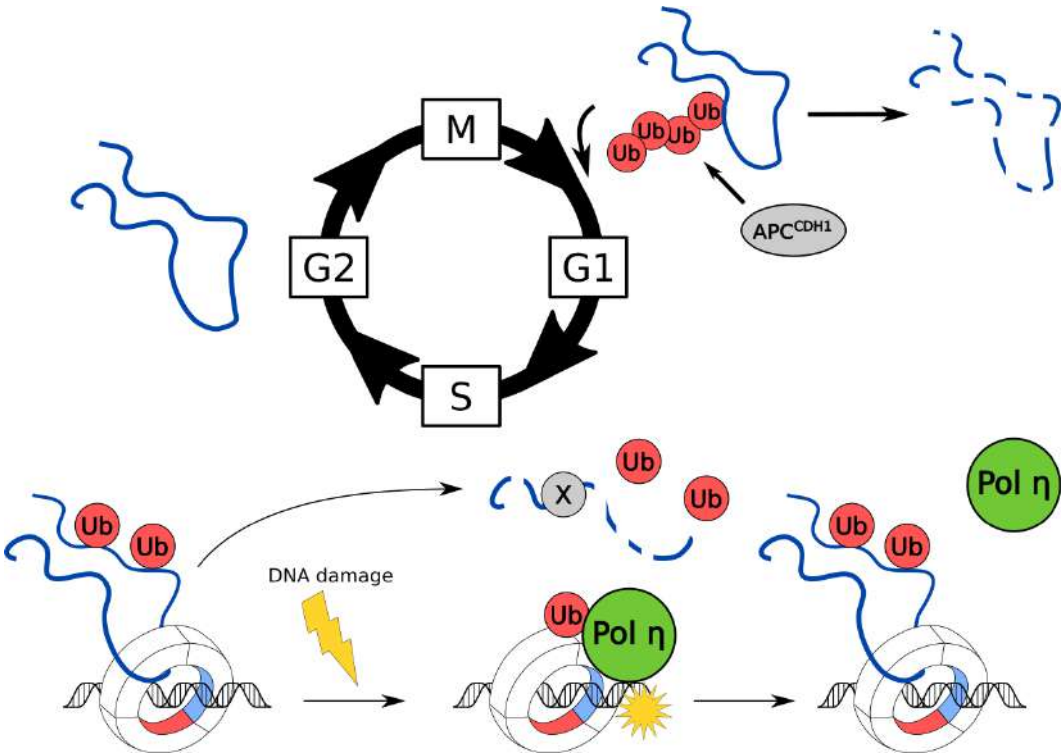


Figura 46: Modelo del papel de la regulación dependiente de ubiquitina de p15 en el mantenimiento de la estabilidad genómica durante el ciclo celular propuesto por Povlsen y colaboradoras/es²⁹¹. Durante la replicación normal del DNA, la p15 unida a PCNA en la horquilla de replicación se modifica por doble monoubiquitinación de sus Lys 15 y 24. Cuando el replisoma encuentra una lesión que bloquea la horquilla, p15 ubiquitinada en Lys-15/24 se separa de PCNA, probablemente por extensión de la cadena de los residuos Lys 15 y 24 monoubiquitinados por una ubiquitina ligasa (X) aún desconocida, que marca a p15 para su degradación proteasomal. Como tanto p15 como las polimerasas TLS interactúan con PCNA a través de motivos PIP-box, la disociación de p15 de PCNA facilita la interacción entre Pol η y posiblemente otras polimerasas TLS con PCNA monoubiquitinado en la horquilla estancada para permitir así el baipás de la lesión. Después del desvío del daño mediado por TLS, la reasociación de p15 a PCNA puede ayudar a promover la liberación de las polimerasas TLS asociadas a PCNA y la reanudación de la replicación normal. Por tanto, p15 puede funcionar organizando el reclutamiento de la polimerasa TLS a PCNA cuya regulación dependiente de ubiquitina y facilitar el intercambio de polimerasas durante la TLS. p15 también se dirige a degradación dependiente de poliubiquitinación por el complejo APC/Cdh1 durante las fases tardías M y G1 del ciclo celular de manera completamente independiente de su ubiquitinación en Lys 15 y 24 asociada a la fase S. Figura inspirada en una de Povlsen et. al. 2012²⁹¹.

Como las dos, p15 y las DNA polimerasas TLS, interaccionan con PCNA a través de motivos PIP-box, la disociación de p15 de PCNA facilita la interacción entre Pol η y, posiblemente, también de otras polimerasas TLS con PCNA monoubiquitinada en la horquilla atascada para permitir el baipás de las lesiones en el DNA. Después del baipás mediado por las enzimas TLS, la reasociación de p15 a PCNA debe ayudar a promover la liberación de las polimerasas TLS asociadas a PCNA y a reanudar la replicación normal²⁹¹.

El complejo APC/C y su coactivador Cdh1 marcan a p15 para su degradación proteasomal a través de su motivo KEN-box conservado; este mecanismo implica el reconocimiento de poliubiquitina (p15 poliubiquitinada) por el proteasoma²⁹⁰. Alfredo de Biasio encontró que p15 también podría ser degradada por el proteasoma independientemente de la ubiquitina y el ATP, muy probablemente debido a su estado intrínsecamente desordenado²⁹². Esta degradación se inhibe fuerte y específicamente en presencia de PCNA, a pesar de que la mayor parte de la cadena p15 permanece flexible y desordenada en la forma unida²⁹². Sin embargo, la tasa de degradación medida es menor que la calculada asumiendo que p15 solo puede degradarse cuando se disocia de PCNA, lo que indica que p15 es menos accesible para el proteasoma incluso cuando se disocia de PCNA, posiblemente porque parte de ella permanece atrapada dentro del anillo de PCNA²⁹².

La función de p15 está regulada por la monoquitinación de estas dos lisinas, K15 y K24, en su región N-terminal. p15 se pliega parcialmente al unirse a PCNA y contacta independientemente el DNA a través de su cola N-terminal. Gonzalez-Magaña y colaboradoras/es presentaron una caracterización conformacional mediante RMN de p15 monoubiquitinada en K15 y K24²⁷⁹, y mostraron que p15 doblemente monoubiquitinada es monomérica, intrínsecamente desordenada y se une a PCNA de la misma manera que p15 sin ubiquitinar, pero interactúa con el DNA con afinidad reducida²⁷⁹. El conjunto conformacional de p15 doblemente monoubiquitinada derivado de SAXS muestra que los restos de ubiquitina, separados por ocho residuos desordenados, forman dímeros transitorios debido a la alta concentración local efectiva de ubiquitina. Esta observación y la similitud de secuencia con la cola N-ter de la histona H3 sugieren que p15 doblemente monoubiquitinada es diana para la unión de la DNA metil-transferasa Dnmt1, tal y como confirmaron los experimentos de calorimetría. Por lo tanto, p15 doblemente monoubiquitinada interactúa directamente con PCNA y recluta Dnmt1 para el mantenimiento de la metilación del DNA durante la replicación²⁷⁹.

Entonces ya sabemos que p15 participa en diferentes procesos celulares y está implicada en distintas patologías, pero ¿cómo actúa? ¿cuál es su función en el replisoma? Intentaremos dar respuesta a estas preguntas.

2.3.2. Regulación de PCNA por p15

Al igual que las polimerasas replicativas y TLS, muchas otras proteínas de interacción con PCNA se unen a través del motivo PIP-box, incluyendo el cargador de la abrazadera RFC⁷⁴, la exonucleasa FEN1¹⁷⁷ y el regulador del ciclo celular p21⁶⁹.

En todas las estructuras cristalinas conocidas de PCNA con sus proteínas diana, los residuos PIP-box se unen al lado frontal de PCNA formando i) una corta lámina β en su N-terminal e interactuando con el C-terminal de PCNA, una pequeña hélice 3_{10} anclada en un bolsillo hidrofóbico, y ii) una β -lámina C-terminal de longitud variable que se empareja con el bucle conector de interdominios de PCNA (el ya mencionado IDCL)⁵³⁷. Generalmente, las regiones que flanquean estos residuos PIP-box que interaccionan con la superficie de unión de PCNA son invisibles en los

mapas de densidad electrónica de estos cristales, sugiriendo que están desordenados y se alejan de la superficie de la pinza⁵³⁷.

Sin embargo, una excepción relevante al modo de unión a PCNA es precisamente la interacción de PCNA con el factor p15. La estructura del complejo p15-PCNA fue determinada a través de la combinación de cristalografía, RMN, SAXS y datos computacionales^{292,538}. Estos estudios mostraron que p15 se une al anillo trimérico de PCNA humana en un sitio que va desde el bolsillo de unión a PIP-box hasta la pared interna de la pinza, y que el N-ter desordenado de p15 sale por la cara trasera de la abrazadera e interactúa con el DNA. Veremos enseguida esta singularidad con más detalle.

Considerando que p15 está expresada en la fase S del ciclo celular²⁹¹ y su sitio de unión en PCNA se superpone parcialmente con el de dsDNA¹³⁶, es probable que p15 juegue un papel en la modulación del deslizamiento de PCNA, quizás inhibiendo el intercambio de DNA entre los tres sitios de unión equivalentes en el anillo, y favoreciendo de esta manera la difusión en modo «rueda dentada» sobre la difusión traslacional (Figura 33 en la página 125). En otras palabras, p15 puede actuar sujetando el DNA dentro del canal del anillo por reducción de la superficie deslizante accesible, luego p15 estaría incrementando la estabilidad de la interacción PCNA-DNA, y este aumento de la estabilidad puede estabilizar a su vez la polimerasa unida a la pinza y aumentar así la procesividad de la enzima. Esto podría explicar los efectos negativos de los experimentos *knockdown* de p15 en la síntesis del DNA (aclaración: cuando se produce una atenuación o disminución de la expresión de p15, se produce una disminución de la síntesis de DNA por la disminución en la actividad de las enzimas replicativas. En un experimento *knockout* hay una anulación de la expresión)^{290,291,383,397}.

Alternativamente, el N-ter desordenado de p15 puede actuar como un freno o resistencia al avance de la abrazadera al interactuar con el DNA directamente²⁹², resultando en una difusión más lenta de PCNA en el DNA. Esta función puede ser requerida en la respuesta a daño del DNA para prevenir una rápida deriva de PCNA en las horquillas atascadas entre eventos de intercambio de polimerasa.

Durante la replicación del DNA no perturbada, cuando se produce un daño en el DNA, la p15 unida a PCNA monoubiquitinada en dos lisinas del N-ter (K14 y K25) es poliubiquitinada en la región conocida como KEN-box²⁹¹, y el proceso se bloquea¹³⁶. Este bloqueo de la replicación induce el reclutamiento de la polimerasa TLS Pol η al sitio del daño y la degradación de p15 poliubiquitinada²⁹¹. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la función de p15 en el baipás de la lesión en el DNA permanecen sin aclarar. Una posibilidad es que p15 inhibe la unión de Pol η a PCNA por competición por los sitios de unión PIP-box²⁹¹. Otra, que p15 puede coexistir con Pol η en PCNA, pero puede arrestar el complejo PCNA-polimerasa (la holoenzima pol η) en la lesión. En efecto, p15 unida a la pinza restringe el diámetro efectivo del canal interno y un dúplex de DNA que contenga una lesión voluminosa (como un dímero de timina o un aducto de Pt) puede no atravesar de manera sencilla el anillo. En consecuencia, p15 puede tener que ser eliminada para un restablecimiento de la síntesis normal.

2.3.3. Unión de p15 a PCNA

La interacción entre PCNA y p15 es un ejemplo de complejo flexible y transitorio. Muchas proteínas que interaccionan con PCNA comparten la secuencia de aminoácidos consenso llamada PIP-box, que ya hemos visto, y cuyo patrón es $QXXhXXaa$, donde h es un residuo hidrofóbico, a aromático (F, W o Y), y X cualquiera de los 20 residuos proteínogénicos⁵³⁹, que reconoce un bolsillo hidrofóbico localizado en la cara frontal del anillo de la pinza. Y muchos de estos motivos PIP están dentro de regiones intrínsecamente desordenadas, a menudo cerca de sus extremos N-ter o C-ter⁵⁴⁰. Esto permite a estas proteínas unirse a PCNA a través de zonas flexibles sin que sus dominios plegados permanezcan en la vecindad inmediata de PCNA o verse geoméricamente restringidas.

Las estructuras cristalográficas disponibles corresponden a PCNA unida a péptidos PIP-box derivados de siete IDP o IDR: p21⁶⁹, Pol δ p66¹⁵⁵, FEN1¹⁷⁷, RnaseH2B¹⁷³, Pol η ¹⁵⁶, Pol κ ¹⁵⁶ y p15²⁹². Las PIP-box muestran características estructurales similares en el estado unido, caracterizadas por una hélice 3_{10} , pero divergen en el contenido estructural y la orientación de las regiones flanqueantes^{155,292} (Figura 47).

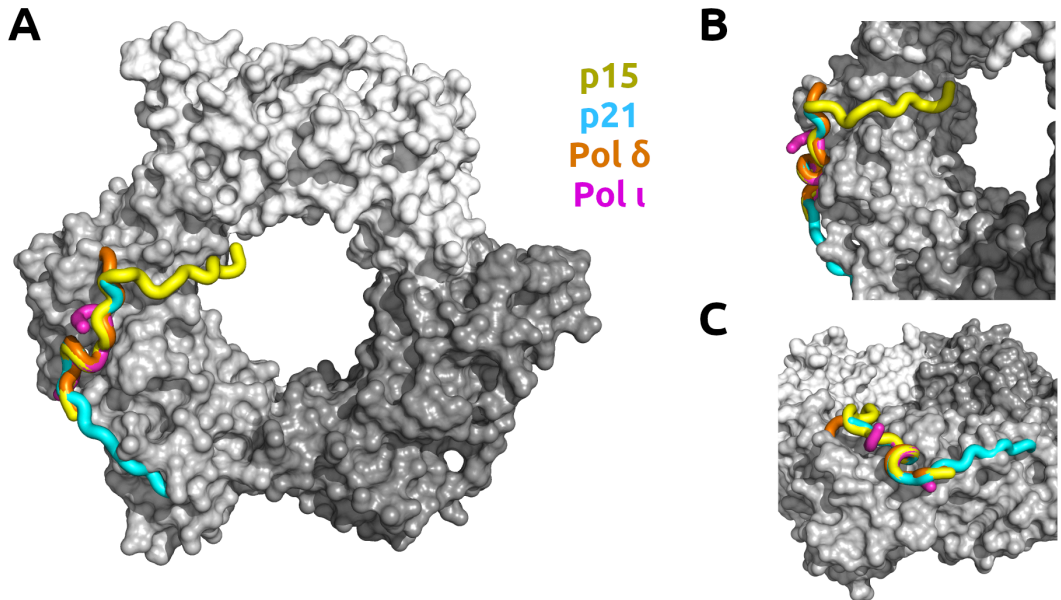


Figura 47: Varios péptidos PIP-box unidos a uno de los tres bolsillos hidrofóbicos de PCNA. En verde p1551-71 (PDB ID: 4D2G), en azul p21143-160 (PDB ID: 1AXC), en naranja p66453-465 de Pol δ (PDB ID: 1U76) y en magenta Pol κ 421-429 (PDB ID: 2ZVM).

La proteína mejor caracterizada que interacciona con PCNA y que no es parte de la holoenzima de la DNA polimerasa es p21⁵⁴¹. El llamado guardián del genoma, p53, induce la expresión de p21 como respuesta al daño en el DNA bloqueando la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S⁵⁴². p21 se une a CDK a través de su región N-ter y bloquea el ciclo celular por inhibición de la actividad quinasa del complejo CDK/ciclina, luego uno de sus papeles es determinar si las células se dividirán o no.

La IDP p15 regula la replicación y reparación del DNA cuando interacciona vía PIP-box con PCNA^{290-292,379,417} y es, como adelantamos antes, una excepción relevante a este modo de unión a PCNA.

Los intentos de cristalización conjunta de diferentes péptidos de distintas longitudes de p15 y PCNA no fueron exitosos y muy probablemente estuvieron obstaculizados por su largo y flexible N-ter. Sí se consiguió la cristalización del fragmento truncado p15⁵⁰⁻⁷⁷ con PCNA (PDB ID: 4D2G)²⁹² y la estructura obtenida muestra que los residuos de PIP-box de p15⁵⁰⁻⁷⁷ se unen al mismo bolsillo en la cara frontal del anillo de PCNA que el péptido PIP-box de p21.

La mayor diferencia estructural con p21 y otros ligandos que se unen a PCNA en el motivo PIP involucra los residuos N-ter de PIP-box de p15 y concierne tanto a la conformación del péptido como a la superficie de interacción en PCNA. Los residuos P59-Q62 forman un giro β de tipo I que revierte la dirección de la cadena del péptido y coloca los residuos N51-T58 del N-ter en contacto con la superficie interna del anillo de PCNA donde están anclados en un surco entre las hélices α A2 y α B2 del anillo de la abrazadera a través de una red de contactos intermoleculares, incluidos cinco enlaces de hidrógeno directos y tres mediados por agua²⁹². Contrariamente, en estructuras cristalográficas de otros péptidos PIP-box solo unos pocos residuos del N-ter de PIP-box son visibles y adoptan una conformación diferente que dirige la cadena lejos de la superficie de PCNA.

No es habitual ver hélices 3_{10} en las interfaces proteína-proteína; en complejos proteína-proteína de *S. cerevisiae*, solo en menos del 5% de los casos se observó una hélice 3_{10} ⁵⁴³. La presencia de la hélice 3_{10} en las interfaces PCNA-proteína delata la importancia de este elemento estructural y sugiere que ayuda a orientar los residuos de anclaje de PIP-box para impulsar la desolvatación de la interfaz. Un estudio sobre la unión de los péptidos p21 y PL a PCNA propone que un residuo de ácido aspártico adyacente a los residuos aromáticos dentro del motivo PIP ayuda a estabilizar la hélice¹⁷⁴. Además, los resultados computacionales indican que la pérdida de esta hélice 3_{10} , como ocurre en el péptido Abl al unirse a PCNA, puede contribuir a su afinidad relativamente baja¹⁷⁸.

La orientación de la cadena del péptido p15⁵⁰⁻⁷⁷ unido a PCNA en la estructura cristalina de De Biasio sugiere que, en solución, la región N-ter completa de p15 pasa a través del canal de la abrazadera para emerger por la cara trasera del anillo, y esta conclusión es consistente con las perturbaciones de las señales de RMN observadas para los residuos en la cara posterior del anillo de PCNA con la adición de p15²⁹² (veremos esto con detalle en el siguiente Capítulo 3).

Como muchas interacciones entre proteínas desordenadas y su pareja globular implicadas en señalización y regulación, el complejo entre p15 y PCNA trimérica es de baja afinidad, formando un complejo transitorio que es difícil de caracterizar a nivel estructural debido a su inherente heterogeneidad. Cordeiro y colaboradoras/es han determinado la estructura, las fluctuaciones conformacionales, y las poblaciones relativas de las cinco especies que coexisten en solución del complejo PCNA-p15 y han caracterizado la interacción de PCNA con p15 con un estudio que emplea técnicas biofísicas complementarias para determinar los detalles estructurales del reconocimiento PCNA-p15 y la flexibilidad de las regiones de p15 que no interactúan⁵³⁸.

Las proteínas que interactúan con PCNA muestran un amplio rango de afinidades de interacción que va desde nM para p21 ($K_d \approx 90$ nM)^{155,175,544} a mM para ING1⁵⁴⁴. Esta variabilidad

se explica por las diferencias en la secuencia de aminoácidos de PIP-box y las diferentes contribuciones de las regiones flanqueantes a la interacción con PCNA.

Experimentos de ITC (siglas para calorimetría de titulación isotérmica, del inglés *isothermal titration calorimetry*) establecieron la afinidad del complejo p15-PCNA en $K_d = 1.1 \mu\text{M}$ a 25°C y la ausencia de cooperatividad entre cada uno de los tres sitios de unión de PCNA; además, la densidad electrónica del complejo muestra que la región flanqueante del N-ter de PIP-box apunta hacia el interior del anillo de PCNA; también algunas señales de RMN, como ya hemos comentado, correspondientes a residuos de la cara trasera de PCNA se vieron perturbadas por la adición de p15⁵³⁸. En base a estas observaciones, Cordeiro y colaboradoras/es propusieron que, tras la unión en la cara frontal de PCNA, la región N-ter desordenada de p15 cruza el anillo y emerge por la cara trasera; además, mostraron que el N-ter de p15 tiene actividad directa de unión a DNA⁵³⁸. Estas observaciones confirman el papel de p15 como un obstáculo que regula el deslizamiento de PCNA propuesto por De Biasio²⁹², por lo que sugirieron el papel de p15 como regulador de la procesividad de PCNA durante la reparación del DNA⁵³⁸.

El análisis colectivo de múltiples curvas de SAXS medidas para varias mezclas de PCNA y p15 demuestra que p15, efectivamente, cruza el anillo de PCNA dirigiendo el sistema a un aumento del desorden y a una oclusión gradual del anillo⁵³⁸, corroborando así observaciones biofísicas y bioquímicas anteriores²⁹². Cordeiro y colaboradoras/es proporcionan en este trabajo sobre el complejo p15-PCNA una descripción estructural que informa de la existencia de varias especies con diferentes estequiometrías coexistiendo en disolución debido a la moderada afinidad de la interacción, a la naturaleza trimérica de PCNA y a la flexibilidad intrínseca del complejo⁵³⁸. Pero para caracterizar cuantitativamente dicho ensamblaje macromolecular flexible, transitorio y multivalente, se requieren herramientas computacionales confiables y precisas que permitan describir el espacio conformacional de p15 y PCNA y calcular las propiedades de dispersión de las conformaciones individuales.

p15 puede unirse a cada uno de los tres monómeros de PCNA con afinidad moderada²⁹², lo que conlleva la presencia de hasta cinco especies en el equilibrio: p15 libre, PCNA libre y PCNA unida a una (3:1), dos (3:2) y tres (3:3) moléculas de p15. El análisis de los datos de SAXS proporcionó conocimientos de las características estructurales de las especies coexistentes en solución⁵³⁸. La población relativa de las diferentes especies varía a lo largo del curso de la titulación, y SAXS puede usarse para preguntar en cada punto de la misma sobre la distribución de especies y sus características estructurales⁵⁴⁵. Las intensidades SAXS medidas representan medias de todas las especies coexistentes, por eso Cordeiro y colaboradoras/es generaron conjuntos explícitos de 800 conformaciones (*ensembles*) para cada una de las cinco especies a partir de simulaciones de DM y modelado molecular integrando información previa de RMN y cristalografía, calcularon la curva SAXS teórica para cada conformación usando WAXSiS⁵⁴⁶ y luego las promediaron para tener una curva SAXS teórica de cada especie. Dada una K_d y las concentraciones totales de las dos proteínas PCNA y p15, puede ser estimada la población de cada una de las especies presentes en el equilibrio, y en base a estas poblaciones, las curvas teóricas (o modeladas) de las especies puras pueden combinarse linealmente para producir la curva esperada (la experimental) para cada punto de la titulación. Empleando el parámetro χ^2 , cribaron los valores de K_d desde 10^{-3} a $10^3 \mu\text{M}$ para identificar el valor que produce la mejor concordancia para cada punto de la titulación entre una combinación lineal dada de curvas teóricas y la curva experimental. Así, Cordeiro y colaboradoras/es vieron que todos los puntos de la titulación a una K_d de $30 \mu\text{M}$ contenían poblaciones no despreciables de varias especies, destacando así la complejidad del sistema a estudio²⁹². Siguiendo el mismo protocolo pero

introduciendo en el análisis complejos PCNA:p15 3:1, 3:2 y 3:3 en los que el N-ter de p15 está por la cara frontal de PCNA y no por la trasera, obtuvieron valores de χ^2 significativamente más altos y un valor de K_d desplazado hacia afinidades más bajas ($K_d \approx 50 \mu\text{M}$), luego las observaciones con ambos modelos, el que tiene las colas N-ter de p15 en la cara trasera y el que las tiene en la cara frontal junto a las colas C-ter, apoyan la idea de que p15 cruza el anillo y muestrea el espacio conformacional en la cara trasera de PCNA⁵³⁸.

Cordeiro y colaboradoras/es no solo muestran que efectivamente p15 cruza el anillo de PCNA, también demuestran que SAXS, que es sensible a características globales de las partículas como el peso molecular, el tamaño y la forma, es una técnica muy adecuada para probar estructuralmente la heterogeneidad de este complejo en solución. El empleo de SAXS para estudios estructurales de sistemas heterogéneos o, como la gente del campo llama, polidispersos, requiere un diseño adecuado de las medidas experimentales para poder tener información de todas las especies presentes, la generación de modelos atomistas de las especies coexistentes, y la predicción de perfiles SAXS teóricos precisos de estos modelos atómicos.

Como veremos en el siguiente capítulo, las perturbaciones de los desplazamientos químicos de experimentos de RMN y la estructura cristalográfica de PCNA con una versión elongada de la región PIP-box de p15 ya sugieren que p15 cruza el anillo. Este análisis de los datos de SAXS valida las observaciones previas. Este modo de interacción es coherente con la protección frente a la degradación proteosómica de p15 en presencia de PCNA²⁹² y además proporciona una base sólida para hipotetizar que p15 actúa como un freno que relentiza la procesividad de PCNA a lo largo del DNA facilitando las acciones de la maquinaria de reparación. Hablaremos más de esto en el capítulo 4.

2.3.4. Estudio estructural de la acetilación en K20 de PCNA en presencia de p15

Cuando se está dando la replicación procesiva del DNA por Pol δ , p15 acompaña a PCNA y a la polimerasa en su camino para contribuir a la procesividad por contribuir al mantenimiento de la superficie deslizante de PCNA en el DNA. Por tanto, si se activa la acetilación de PCNA en K20ac y Eco1 actúa para estimular la recombinación homóloga, deberá hacerlo en presencia de p15.

La hipotética estructura de PCNA_{K20ac} con p15 unida que vemos en la Figura 48 muestra que p15 no solapa el residuo K20 y, en presencia de p15, queda libre para poder ser acetilado por Eco1.

Con este simple estudio estructural podemos concluir que los residuos K20 de PCNA están accesibles para ser acetilados por Eco1 en presencia de p15 ya que ninguna de las moléculas de la IDP se coloca encima de K20. Y esto teniendo en cuenta el complejo de mayor estequiometría, es decir, que tres moléculas de p15 estén unidas a PCNA. En complejos de estequiometrías inferiores, el hueco disponible para la actuación de Eco1 sería mayor y la acetilación de K20 más fácil. Entonces, según esto, p15 no necesita abandonar el anillo de PCNA para que sea acetilado en K20. Sin embargo, para saber si esto es así o no, son necesarios otros ensayos.

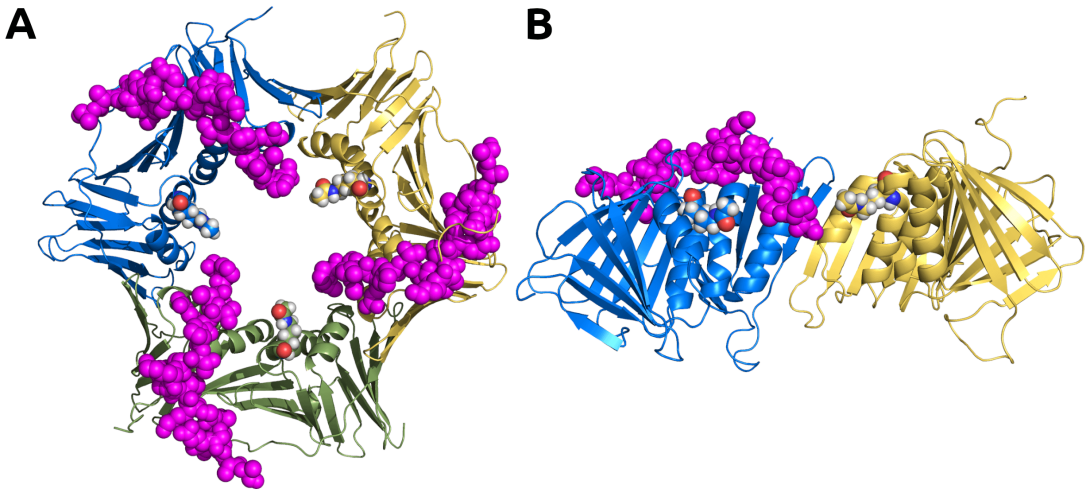


Figura 48: Estructura del hipotético complejo PCNAK20ac-p15 obtenido superponiendo el primer marco de una de las réplicas de DM del sistema PCNAK20ac con la estructura PCNA-p15 (PDB ID: 4D2G) (alineando las dos moléculas de PCNA de ambas estructuras y eliminando después la que pertenece al complejo PCNA-p15).

2.4. Orientando la terapia contra el cáncer hacia la superficie deslizante de PCNA

Debido a la función esencial de PCNA en la proliferación celular, hay un interés significativo en su papel en el cáncer y su inhibición se considera una valiosa estrategia en terapia⁵⁴⁷. Esto condujo al desarrollo de diversas tácticas, como el empleo de pequeñas moléculas específicas que bloquean la función de PCNA por inhibición de las interacciones PIP-box, inhibición del ensamblaje del trímero de PCNA, o la fosforilación de PCNA⁵⁴⁸⁻⁵⁵⁰, mostrando todas ellas efectos inhibitorios en la proliferación celular *in vitro*. Pero todas estas estrategias se dirigen a la superficie externa de PCNA.

Como bien apunta Alfredo de Biasio en su revisión sobre PCNA¹³⁶, la revelación de mecanismos de regulación nuevos de PCNA que ocurren en la superficie deslizante ofrecen una nueva e inesperada oportunidad para desarrollar moléculas dirigidas a esta región. Es importante destacar que alrededor del 30% de las mutaciones de PCNA listadas en el repositorio cBioPortal^{551,552} de datos genómicos a gran escala de cáncer están localizadas en la superficie deslizante³⁵⁷, incluyendo residuos de lisina conservados que interactúan con el DNA (vistos en el Capítulo 1), los que interactúan con p15²⁹² o los que son susceptibles de acetilación^{351,357}.

Ambas, la unión de p15 a PCNA y la acetilación de PCNA, afectan negativamente la vía de desvío o baipás de la lesión del DNA. Mientras juega un papel central en la supervivencia celular al daño en el genoma, el baipás de la lesión del DNA también permite a los cánceres sobrevivir a la quimioterapia genotóxica y aumentar la tasa de mutación en tumores, lo que lleva a una rápida aparición de células resistentes a los tratamientos^{377,553}. Así, subraya Alfredo de Biasio, los inhibidores del baipás de la lesión del DNA están emergiendo como una prometedora nueva clase de agentes adyuvantes en la quimioterapia contra el cáncer^{554,555}. Un ejemplo de ello sería el desarrollo de moléculas que se unan a la ranura de unión de p15 en la pared interna del anillo de PCNA para actuar como inhibidores de TLS. Precisamente, señala De Biasio, se ha visto que un péptido que codifica el sitio de unión a PCNA de p15 inhibe la proliferación celular en cáncer en modelos celulares³⁹⁷. Igualmente, estrategias capaces de estimular la acetilación de la superficie deslizante de PCNA pueden ser ideadas para modular el baipás de lesión del DNA.

Sin duda las interacciones PIP-box/PCNA son una prometedora diana terapéutica contra el cáncer^{549,556}, sin embargo, la orientación de estas dianas a un sitio de interacción común para tantas proteínas diferentes PIP-box podría causar citotoxicidad no específica por la desregulación incontrollada de diferentes procesos o vías. Ya que p15 exhibe un modo de unión único hasta ahora en las proteínas PIP-box en el que los residuos del N-ter de la PIP-box contribuyen de manera importante a la interacción por unión en la parte interna del anillo de PCNA, apuntar a esta nueva interacción como diana terapéutica podría proporcionar una vía para inhibidores altamente selectivos.

Quizás sea necesario aclarar una cosa. La presencia de p15 anclada a PCNA inhibe el baipás de una lesión existente en la cadena nucleotídica, es decir, si está p15 no se produce el paso de la lesión y entonces la replicación se bloquea, luego p15 debe eliminarse para que no se inhiba el baipás, el baipás pueda darse y entonces pueda continuar la replicación. Pero, como ya hemos visto, p15 se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer, es decir, en células en proliferación o crecimiento en tasa muy superior a la normal, cosa que parece lógica si, como

hemos visto, la función de p15 es estimular la actividad de las polimerasas replicativas. Pero si p15 estimula la replicación, ¿entonces cómo va a ser buena idea emplear un mimético de p15 en terapia contra el cáncer? Esto parece contradictorio a primera vista.

Bien, las células cancerígenas son células normales, igual que las sanas, que tienen aumentadas las rutas de proliferación, pero no son células con el DNA dañado, luego p15 está sobreexpresada para llevar a cabo su función junto a PCNA y Pol δ y permitir una replicación más procesiva. Así, ni p15 ni una molécula que sustituya a p15 en su unión a PCNA pararán el crecimiento del tumor. Sin embargo, si mediante quimioterapia o radioterapia se produce un daño en el DNA, la presencia de p15 en PCNA paralizará la replicación de esa célula al llegar el replisoma al sitio dañado en su material genético, pues la presencia de p15 inhibe el *baipás* de la lesión. La célula lo soluciona eliminando p15 y empleando una polimeras TLS en lugar de la replicativa, pero si se emplea como adyuvante en el tratamiento una molécula que mimetice la unión de p15 a PCNA y que además tenga más afinidad de unión que p15 y que esa unión sea irreversible, entonces, cuando se produzca el daño en el DNA y el replisoma con la molécula mimética de p15 unida a PCNA lleguen a la lesión, este inhibidor del *baipás* no podrá ser eliminado por la célula y ésta verá su replicación paralizada y, por tanto, su crecimiento.

Emplear un péptido mimético solo de la zona de p15 que se une a PIP-box y a la cara interna de PCNA pero con mayor afinidad además evitaría la posibilidad de la ubiquitinación para su degradación, quedando, en tal caso, PCNA libre para interacciones con las polimerasas TLS y darse el *baipás* de la lesión.

2.5. Compendio de resultados y conclusiones

Tal y como indican los valores de RMSD de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNAK20ac-DNA en comparación con los del sistema PCNA-DNA, la pérdida de uno de este residuo clave (K20) en la interfaz PCNA-DNA para una correcta orientación y difusión de la pinza inestabiliza la interacción entre PCNA y el DNA.

El estudio de las distancias entre los residuos K20ac (K20 en el caso del sistema PCNA-DNA para comparación) y los residuos K77, K80 y K217 refleja la aparición de enlaces de hidrógeno entre ellos a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular.

La acetilación de K20 hace que se puedan establecer enlaces de hidrógeno que no se establecen en el residuo sin modificar, lo que provoca una disminución de la densidad de carga positiva en su entorno, afectando a los residuos K77 y K217 de su subunidad y al residuo K80 de la subunidad contigua, lo que supone una pérdida de carga positiva en el $\approx 67\%$ de la superficie de deslizamiento de PCNA.

La pérdida de gran parte de la superficie de deslizamiento que supone la acetilación de la K20 de PCNA debe estar implicada en la ya conocida pérdida de procesividad de Pol β tras esta modificación postraducciona.

Teniendo en cuenta cuestiones espaciales, parece que la acetilación de K20 de PCNA en presencia de tres moléculas de p15 unidas a sus bolsillos de unión en PCNA es posible.

3. Modulación de la superficie de deslizamiento de PCNA por p15

p15 es una proteína intrínsecamente desordenada que regula la replicación del DNA y el baipás de una lesión interactuando con la abrazadera deslizante PCNA. Cuando PCNA no está anclada al DNA, p15 atraviesa el anillo y se une a PIP-box estableciendo contactos también con la superficie deslizante de la abrazadera. Nuestros datos de cristalografía y simulaciones de dinámica molecular de complejos ternarios PCNA-DNA-p15 muestran que, cuando p15 ocupa dos subunidades del homotrímero de PCNA, el DNA dentro del canal del anillo se une a la subunidad que queda desocupada.

La estructura de PCNA con p15 unida en ausencia y presencia de DNA es invariante, y p15 cruza el canal de la abrazadera asomando su cola N-terminal por la cara trasera. Los experimentos de RMN en solución confirman que el DNA no desplaza a p15 de la pared del anillo interno de PCNA.

Cuando p15 está unida a PCNA, se reduce la superficie deslizante disponible de la abrazadera, así que p15 puede estar funcionando como un cinturón que abrocha el DNA a PCNA durante la síntesis por la polimerasa replicativa Pol δ . Esta restricción de la superficie deslizante, sin embargo, puede necesitar ser elimicada para un baipás eficaz de la lesión del DNA por parte de la polimerasa de síntesis translesión Pol η . De hecho, los datos bioquímicos muestran que p15 desfavorece la síntesis de cebadores por parte de la holoenzima pol η -PCNA tanto en moldes de DNA dañados como sin dañar.

3.1. Conocimiento previo de la interacción PCNA-p15

Parece que la interacción PCNA-DNA tiene una importancia crucial en la replicación y que la superficie de la cara interna del anillo de PCNA es clave, de ahí la relevancia de su modulación, tal y como hemos visto en el capítulo anterior.

La interacción entre p15 y PCNA es suficientemente peculiar y de trascendentes consecuencias como para merecer un estudio más profundo y un capítulo aparte. Vemos primero de qué información partimos.

3.1.1. El complejo PCNA-p15

Como ya bien sabemos, p15 es una proteína intrínsecamente desordenada oncogénica de 11kDa que regula la replicación y el baipás de lesión del DNA a través de una interacción PIP-box con PCNA^{290-292,379,417}.

p15 y PCNA se localizan en el núcleo de células en proliferación, principalmente en la fase S del ciclo celular^{291,383,397}, y la disminución de p15 decrece significativamente la síntesis de DNA^{290,291,383,397}, sugiriendo que modula la función de PCNA como factor de procesividad. La coinmunoprecipitación de p15 y PCNA a partir de líneas celulares de cáncer de páncreas insinúa que p15 es parte del complejo de replicación del DNA con PCNA, Pol δ y la endonucleasa FEN1 en el origen de replicación²⁹¹.

En ausencia de DNA, hasta tres moléculas de p15 se unen al anillo trimérico de la PCNA humana en el sitio que se extiende desde el bolsillo de unión a PIP-box hasta el canal interno de la abrazadera atravesándolo²⁹², y el N-terminal desordenado de p15 sale de la abrazadera por la cara trasera e interactúa directamente con la doble hélice de DNA^{292,538}. Las imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa del complejo ternario PCNA-DNA-p15 muestran partículas con DNA en el canal de la abrazadera mientras p15 está unida a PCNA²⁹², aunque los detalles moleculares de todo este ensamblaje permanecían hasta ahora sin definir.

Aportando luz al funcionamiento de este complejo, la combinación de enfoques experimental y computacional nos ha permitido, tal y como veremos un poco más adelante, caracterizar por fin la estructura del complejo ternario formado por PCNA, DNA y la región de p15 que interacciona con PCNA. Basado en nuestros descubrimientos, estudiaremos detenidamente esta interacción entre PCNA y p15 y después discutiremos las posibles funciones de p15 en la replicación y en la baipás de la lesión del DNA.

De Biasio y colaboradoras/es presentaron una extensa caracterización de la interacción entre p15 y PCNA desde una aproximación estructural hasta entonces inédita. Tres moléculas de p15 se unen al anillo trimérico de PCNA con una baja afinidad del orden de micromolar. La región central de p15, incluida su PIP-box, está estrechamente unida a la cara frontal y a la superficie de la cara interna de PCNA, mientras que el N-ter y el C-ter permanecen predominantemente desordenados en sus caras trasera y delantera respectivamente con interacciones transitorias en la superficie externa de PCNA²⁹². Esta disposición es consistente con el hecho de su protección frente a la degradación por parte de la partícula 20S del proteosoma, que rápidamente degrada la p15 libre²⁹².

Pero lo más importante del trabajo es que De Biasio muestra que p15 se une al DNA principalmente a través de su cola N-ter, que establece interacciones electrostáticas con los

fosfatos de la hélice²⁹². p15 se une a PCNA y al DNA simultáneamente a través de sitios independientes y el modelado molecular y la microscopía electrónica muestran que se puede formar un complejo ternario con p15 y el DNA dentro del anillo de PCNA²⁹², en base al cual De Biasio y colaboradoras/es propusieron que p15 actúa como un freno o impedimento flexible que regula el deslizamiento de PCNA a lo largo del DNA, facilitando el cambio de la unión de la polimerasa replicativa a la polimerasa de translesión²⁹².

Los cambios en el espectro de RMN de p15 en presencia de PCNA, y de PCNA en presencia de p15 confirman una interacción directa entre ambas proteínas²⁹². Las medidas de ITC (siglas en inglés de calorimetría de titulación isotérmica) pueden ajustarse muy bien a un modelo que asume una unión de p15 independiente a sitios equivalentes en el trímero de PCNA, con una constante de disociación de 1.1 μM a 25°C, luego tres moléculas independientes de p15 pueden unirse a los tres protómeros de PCNA sin indicios de existencia de cooperatividad²⁹². Los datos también muestran que la contribución entálpica a la energía libre es grande, pero también lo es el coste entrópico, acorde con una pérdida en la libertad conformacional de p15 al unirse a PCNA²⁹².

Como proteína desordenada que es, p15 tiene un espectro de RMN con señales intensas y poco dispersas en la frecuencia del protón⁵⁵⁷ (Figura 49). Al adicionar un exceso de PCNA, las intensidades de las señales disminuyen en general, lo que es más notable para los residuos centrales V53-D75, que incluso desaparecen²⁹² (para ver el espectro de p15 y p15-PCNA, acudir a la Figura 1 de De Biasio et. al. 2015²⁹²; el artículo es abierto, pero es necesario pagar por el uso de las imágenes). Esta observación resalta que la región central de p15 es el principal sitio de unión a PCNA, la cual incluye el motivo PIP-box (⁶²QKGIGEFF⁶⁹, con los residuos conservados subrayados).

Las señales de RMN de p15 aún visibles en el complejo con PCNA conservan su baja dispersión, indicando que las colas N-ter y C-ter de p15 permanecen ampliamente desordenadas y flexibles; sin embargo, dos segmentos de estas regiones alrededor de los residuos básicos conservados R14, K15 y P100 muestran intensidades de señal significativamente reducidas y valores de tasas de relajación R_2 del ¹⁵N aumentados (¹⁵N- R_2)²⁹². Mientras que los valores de R_2 aumentan debido al gran tamaño molecular, el incremento anormal en estas dos regiones indica la existencia de algunas restricciones conformacionales en el complejo. Las dos regiones contienen agrupamientos de aminoácidos cargados positivamente que podrían interaccionar de manera transitoria e inespecífica con la superficie cargada negativamente de PCNA²⁹². En consonancia con esto, las perturbaciones de los desplazamientos químicos (CSP) aquí son las más grandes observadas fuera del núcleo del sitio de unión a PCNA, pero aún así, solo se espera una interacción transitoria débil²⁹².

Para estudiar el papel de diferentes regiones de p15 en la interacción con PCNA, De Biasio y colaboradoras/es diseñaron tres fragmentos de p15: 1) el mutante p15^{ΔN}, que carece de muchos de los residuos que experimentan una disminución de la intensidad de la señal de RMN y tasas de ¹⁵N- R_2 mayores al unirse a PCNA; 2) el fragmento p15⁵⁰⁻⁷⁷, que comprende los residuos centrales de p15 que experimentan la mayor disminución de la intensidad de la señal de RMN con la unión a PCNA; y 3) p15⁵⁹⁻⁷⁰, que corresponde con la PIP-box más pequeña publicada que contiene el fragmento de p21 que se une a PCNA³⁹⁷. Los tres fragmentos unen PCNA pero con afinidad decreciente en el orden que han sido presentados²⁹². El mutante p15^{ΔN} se une a PCNA con una afinidad solo ligeramente inferior a p15, lo que implica que cualquier interacción transitoria de los residuos V2-S31 del N-ter solo

estabiliza el complejo de manera marginal²⁹². La afinidad de p15⁵⁰⁻⁷⁷, sin embargo, se reduce en un factor de 5, y el fragmento más pequeño p15⁵⁹⁻⁷⁰ incluso en un factor de 33²⁹².

La proyección de los CSP en la estructura de PCNA revela que la unión de todos los péptidos de p15, excepto el fragmento núcleo p15⁵⁹⁻⁷⁰, afecta a residuos no solo del sitio de unión a PIP-box en la cara frontal, sino también en la cara interna del anillo²⁹².

Los intentos de cristalización de los diferentes péptidos de p15 unidos a PCNA no fueron exitosos, probablemente debido, como ya hemos comentado, al largo y flexible N-ter de p15; sin embargo, el fragmento truncado p15⁵⁰⁻⁷⁷ sí cristalizó con PCNA y difractó a una resolución de 2.65 Å (PDB ID: 4D2G)²⁹². Los residuos de PIP-box de p15⁵⁰⁻⁷⁷, como también hemos visto ya, se unen al mismo bolsillo en la cara frontal del anillo de PCNA que el péptido PIP-box de p21 y otras proteínas de unión a la abrazadera (Figura 50). La mayor diferencia estructural entre p15 y otros ligandos que se unen a PCNA involucra los residuos N-ter de PIP-box de p15 P59-Q62 que forman un giro que cambia la dirección de la cadena del péptido para colocar los residuos N51-T58 en contacto con la superficie interna del anillo de PCNA²⁹² (Figura 51). Esta orientación del péptido p15⁵⁰⁻⁷⁷ unido a PCNA sugiere que, en solución, la región N-ter completa de p15 pasa a través del canal de la abrazadera para emerger por la cara trasera del anillo, lo que es consistente con las perturbaciones de las señales de RMN observadas para los residuos en la cara interna del anillo de PCNA con la adición de p15²⁹².

De Biasio y colaboradores además observaron varios residuos en la cara trasera de PCNA con frecuencias y/o intensidades de RMN perturbadas. Algunos de ellos experimentan pequeños cambios de frecuencia a lo largo de la titulación con p15 (como el residuo A194), mientras otros no se desplazan pero su intensidad decae, desapareciendo a relaciones de PCNA:p15 alrededor de 1:0.5 (como los residuos A82, E143 y K110) debido a contactos transitorios de p15 en la cara trasera de PCNA²⁹².

De Biasio anota que el rápido decaimiento de la señal de RMN a razones estequiométricas PCNA:p15 sin reaparición de la señal con la saturación de ligando se ha visto también en otros complejos proteicos donde se dan interacciones débiles transitorias entre superficies cargadas⁵⁵⁸ o múltiples estados de unión⁵⁵⁹. En ese mismo estudio se cuantificaron las intensidades de las señales de PCNA a ratios estequiométricos PCNA:p15, donde las posiciones de las señales aún son, en gran parte, como en la forma libre, con una reducción selectiva de la intensidad de las señales afectadas por la unión de p15. Ya que la asignación de las señales de RMN de esta muestra fueron, tal y como De Biasio y colaboradoras/es dicen, inambiguas, pudieron proyectar con seguridad las atenuaciones de señal en la estructura de PCNA para obtener la superficie de unión de p15 de longitud completa²⁹². De acuerdo con la estructura cristalográfica de PCNA unida al fragmento p15⁵⁰⁻⁷⁷, el sitio de unión incluye residuos en el bolsillo de unión canónico a PIP-box en la cara frontal del anillo y se extiende a las hélices α A2 y α B2 en su superficie interna²⁹². Además, varios residuos de la cara trasera de PCNA también muestran una atenuación significativa de la señal y forman una región de interacción casi contigua a la región de interacción de la pared interna del anillo de PCNA²⁹². Estas atenuaciones de señal adicionales no fueron observadas en presencia de cantidades estequiométricas de la truncada p15⁵⁰⁻⁷⁷, lo que indica un modo de unión en el que el N-ter de la p15 completa pasa a través del anillo de PCNA²⁹².

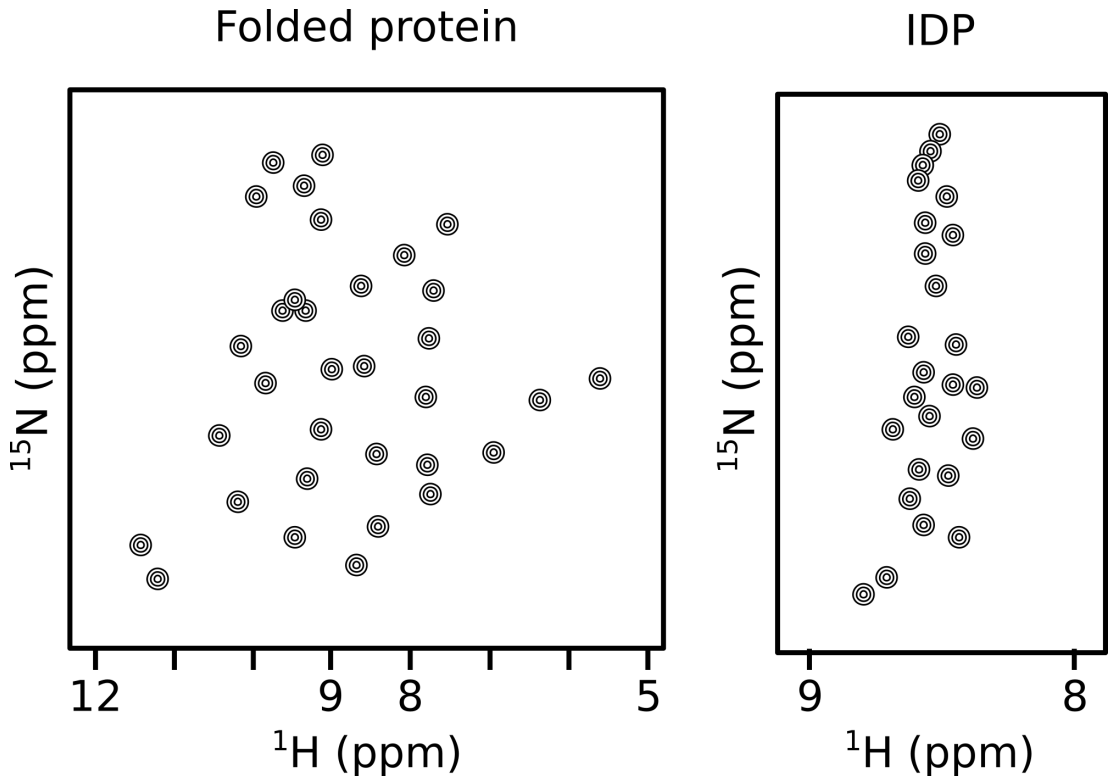


Figura 49: Arquetipos de espectros HSQC de proteína globular (a la izquierda de la imagen) y de proteína intrínsecamente desordenada (a la derecha). En estos espectros de RMN se muestra la correlación entre los desplazamientos químicos del protón (^1H) y el nitrógeno (^{15}N , sus valores no se indican en el gráfico) del grupo amida de cada residuo de las proteínas, dando lo que se llama en la jerga del campo «la huella dactilar de la proteína». Una proteína globular plegada tiene las señales de sus picos intensas y dispersas, es decir, repartidas entre los valores (5-12) de la dimensión del protón. Los picos o señales de una IDP son también intensas, pues están bien definidas, pero están poco dispersas, y solo se reparten entre los valores (8-9) de la dimensión del protón. Cuando una proteína globular se desnaturaliza y pierde su estructura terciaria, su espectro tiene un patrón similar al de una IDP, con señales poco dispersas. Luego el espectro HSQC de una IDP es señal inequívoca de su falta de plegamiento.

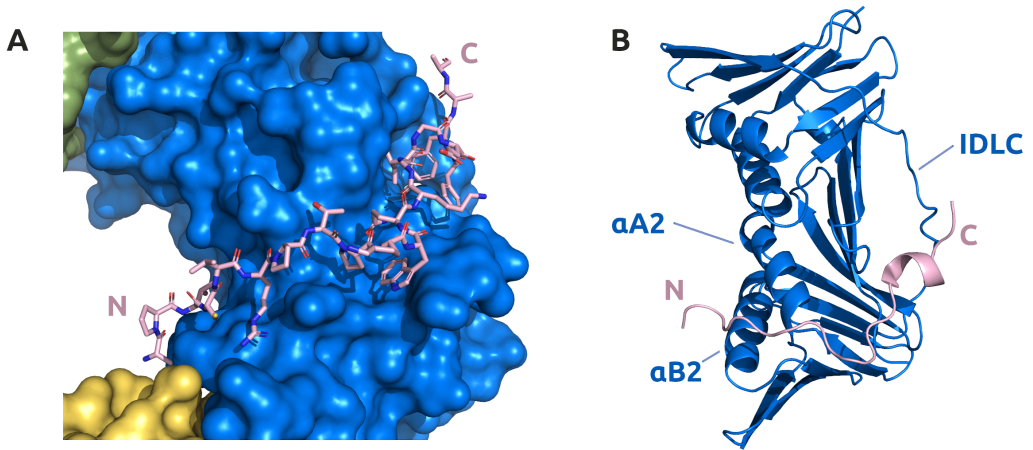


Figura 50: A) Representación de la superficie de uno de los tres sitios de unión de p1550-77 en el anillo de PCNA, con p1550-77 ligado mostrado en barras coloreadas por tipo de átomo. Se indican los extremos N (de N-ter) y C (de C-ter) de p1550-77. B) Diagrama de cinta de un protómero de PCNA (en azul) con p1550-77 unido (en rosa). El bucle IDCL y las hélices $\alpha A2$ y $\alpha B2$ (en la superficie interna del anillo de PCNA) están etiquetadas. Adaptación de figura de De Biasio et. al. 2015²⁹².

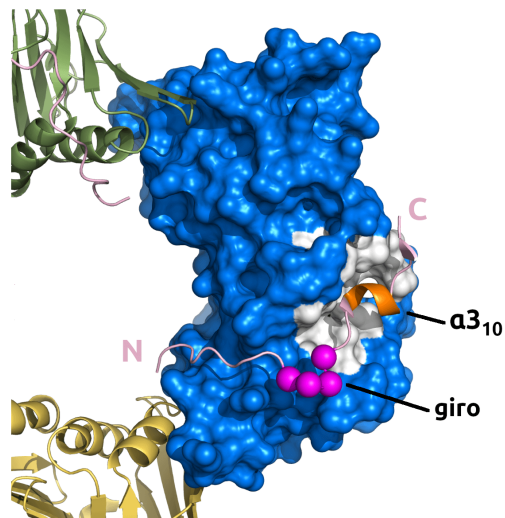


Figura 51: PIP-box de p15 y su giro para atravesar el anillo

En el mismo trabajo, De Biasio y colaboradoras/es también generaron un gran conjunto de estructuras del complejo PCNA-p15 basado en la estructura cristalográfica de PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ con los extremos N-ter y C-ter de la cadena de p15 anexados al azar. En más del 90% de estos modelos del complejo una o dos cadenas de p15 pasan a través del anillo; solo el 13% de los complejos muestran las tres cadenas de p15 cruzando a través, presumiblemente debido al impedimento estérico que resulta de construir cadenas desordenadas al azar dentro del agujero²⁹². En general, estos resultados indican que la conformación con la región central de p15 firmemente unida impone una fuerte tendencia en el N-ter de p15 a pasar a través del anillo interno de PCNA. Seleccionaron de este conjunto estructuras donde los residuos del N-ter de p15 están cerca de los residuos de la cara trasera de PCNA con una intensidad de la señal de RMN que se vió significativamente reducida, y el 92% de las estructuras del complejo de este subconjunto mostraron las tres cadenas de p15 pasando a través del anillo de PCNA y emergiendo por la cara trasera, mientras que las restantes estructuras complejas modeladas tenían al menos una cadena de p15 con su N-ter plegado hacia la cara frontal de PCNA en lugar de canalizar a través del anillo²⁹².

El complejo de la ubiquitín ligasa promotor de la anafase y su coactivador Cdh1 etiquetan p15 para su degradación proteosomal a través de su motivo KEN-box conservado, pero de Biasio y colaboradoras/es encontraron que p15 podía también ser degradada por el proteosoma 20S independiente de ubiquitina y ATP, sobre todo debido a su estado intrínsecamente desordenado²⁹². Sin embargo, esta degradación es inhibida fuerte y específicamente en presencia de PCNA, a pesar de que la mayoría de la cola N-ter de p15 permanece flexible y desordenada en la forma unida²⁹², lo que además es una muestra de que p15 se encuentra interaccionando con PCNA en la célula.

El modelo del complejo PCNA-p15 de De Biasio sugiere, además, y como ya hemos resaltado, que p15, al unirse a un anillo de PCNA ya cargado en el DNA, puede interaccionar con la doble hélice mediante sus colas flexibles²⁹².

El trabajo de De Biasio y colaboradoras/es es muy extenso, y en él también analizaron la interacción p15-DNA-PCNA probando secuencias de DNA específicas a las que se une la PCNA de *S. Solfatarius*⁵⁶⁰ y vieron que, en contraste con el homólogo de arqueas, la PCNA humana no interactúa con estas secuencias concretas de DNA, mientras que p15 sí lo hace. Resultó que la interacción p15-DNA no es específica ya que p15 se unía a cualquiera de las moléculas de DNA que analizaron con afinidades similares²⁹². Cuando aumentaron la concentración salina desde 40 a 150 mM, dichas afinidades disminuían en un orden de magnitud, indicando que la interacción es predominantemente electrostática²⁹². Además, la afinidad del péptido p15^{ΔN} se redujo dos órdenes de magnitud con respecto a p15, indicando que la región básica N-ter de p15 contribuye más a la afinidad por el DNA²⁹². El fragmento central p15⁵⁰⁻⁷⁷ une DNA con incluso más baja afinidad, y no se observa unión a DNA con el fragmento núcleo PIP-box p15⁵⁹⁻⁷⁰²⁹².

Los experimentos de RMN mostraron una pobre dispersión de la señal del NH y solo cambios menores en los desplazamientos químicos de los C α , lo que indica que p15 no adquiere una estructura definida al unirse al DNA; más bien su esqueleto permanece flexible y desordenado²⁹². En presencia de PCNA, la p15 unida al DNA muestra un patrón de la atenuación de la señal de RMN similar al que tiene al unirse a PCNA en ausencia de DNA, en consonancia con un complejo ternario donde la cola N-ter se une al DNA y la región central de p15 a PCNA²⁹².

Para evaluar si un dúplex de DNA podría entrar dentro del anillo de PCNA con p15 unida, De Biasio y colaboradoras/es también construyeron modelos basados en la estructura cristalográfica del complejo PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ con los extremos N-ter y C-ter de p15 saliendo de caras opuestas del anillo de PCNA. La formación de este complejo es posible teniendo en cuenta consideraciones estéricas, pero para una verificación experimental de esta posibilidad, llevaron a cabo diferentes experimentos de microscopía electrónica de transmisión con PCNA en presencia de p15, en presencia DNA o en presencia de ambos y observaron que el complejo ternario muestra un aumento de la intensidad dentro del anillo de PCNA, lo que indica que el DNA está localizado en el interior cuando p15 está también unida a PCNA²⁹², sin embargo, no pueden confirmar que p15 pase a través del centro de PCNA. Pero, como ya vimos, la alta similitud en el patrón de las señales de RMN que desaparecen de p15 cuando se une a PCNA en presencia y ausencia de DNA indica que la estructura de la región fuertemente unida a PCNA es la misma, con su N-ter orientado hacia la cara trasera, sugiriendo que en el complejo ternario PCNA-DNA-p15 pasa a través del anillo como en el complejo binario PCNA-p15²⁹².

La moderada afinidad de interacción entre p15 y PCNA da como resultado la presencia en solución de cinco especies distintas, las cuales corresponden a las formas libres de PCNA y p15, y los tres complejos con diferentes estequiometría (3:1, 3:2 y 3:3). El grupo y colaboradoras/es de Pau Bernadó en el trabajo de Cordeiro⁵³⁸ recurrió a una estrategia integrante para estudiar el complejo PCNA-p15 en la que emplearon esta información previa de RMN y cristalografía para construir modelos precisos para estas especies altamente flexibles. Para ello emplearon SAXS (siglas en inglés de la técnica de dispersión de rayos X de ángulo reducido), que es una técnica sensible a características globales de las partículas como el peso molecular, el tamaño y la forma, y es, por tanto, muy adecuada para caracterizar estructuralmente la heterogeneidad de este tipo de complejos en solución⁵⁶¹. Su enfoque validó un modo de interacción donde la parte N-ter de p15 cruza el anillo de PCNA y emerge por la cara trasera de la proteína a la vez que modelos estructurales donde p15 no cruza el anillo sino que sitúan el N-ter y el C-ter en la cara frontal de PCNA presentaron un bajo acuerdo con el conjunto de datos de SAXS⁵³⁸. Luego este análisis de datos de SAXS valida las observaciones de las perturbaciones de los desplazamientos químicos de los experimentos de RMN y la estructura cristalográfica de PCNA con una versión elongada de la región PIP de p15 que sugerían que p15 cruza el anillo. Este modelo proporciona unas bases sólidas para hipotetizar que p15 actúa como un freno que ralentiza la procesividad de PCNA a lo largo del DNA facilitando las acciones de la maquinaria de reparación.

3.1.2. Consecuencias biológicas de la interacción p15-PCNA

En el núcleo de la célula, varios ligandos de PCNA compiten por unirse a los tres monómeros del anillo y probablemente hay una jerarquía basada en afinidades relativas moduladas por modificaciones postraduccionales que, junto al impedimento estérico y concentraciones relativas de proteína, determinan la ocupación de los protómeros de PCNA^{292,356}. De hecho, la ocupación simultánea de los tres sitios por ligandos idénticos puede no ser la situación prevalente dentro de la célula²⁹².

Solo la pequeña y desordenada proteína p21 parece tener una afinidad suficiente para desplazar cualquier otro ligando de PCNA, explicando su inhibición dominante de la replicación del DNA y de la progresión del ciclo celular⁵⁶². El fragmento C-ter de p21 une PCNA con una afinidad dos órdenes de magnitud superior a p15⁵⁶³, sin embargo, la afinidad de PCNA por p15

es más alta que por el fragmento PIP-box de la subunidad p66 de la polimerasa replicativa δ^{155} , y similar a la de la polimerasa de síntesis de la translesión η^{156} .

Pol δ es un complejo de cuatro subunidades de 239kDa, mucho más grande que PCNA, que posiblemente bloquea (por unión y por impedimento estérico) más de un bolsillo de unión PIP-box, como se observa en los complejos de proteínas grandes con anillos PCNA^{74,173}. Pol η es una proteína multidominio de 78kDa con un dominio de unión a ubiquitina que aumenta su afinidad por PCNA cuando esta última se ubiquitina en K164 después de exposición a radiación ultravioleta¹⁵⁹.

La rápida degradación de p15 por la partícula 20S del proteosoma sugiere que esto puede ser un mecanismo para la regulación de los niveles de p15 libre en la célula, además del mecanismo dependiente de ubiquitina²⁹⁰. PCNA unida, sin embargo, inhibe fuertemente la degradación de p15 por el proteosoma 20S²⁹². Al parecer, p15 es menos accesible al proteosoma incluso después de la disociación de PCNA, lo que es consistente con la estructura del complejo modelado por De Biasio donde p15 puede quedar parcialmente atrapada dentro del anillo de PCNA. La degradación por el proteosoma 20S y su inhibición en la unión a PCNA también se ha descrito para p21⁵⁶⁴.

Ambas, p15 y PCNA, se expresan fundamentalmente durante la fase S del ciclo celular, cuando ocurre la replicación cromosomal, y ambas están principalmente asociadas con la cromatina^{290,291}. Entonces, aunque p15 puede estar unida a PCNA sola, su forma funcionalmente relevante en la replicación y reparación del DNA es la que está unida a PCNA cargada en el DNA. Como hemos visto, De Biasio y colaboradoras/es encontraron que p15 por sí misma se une al DNA, predominantemente vía interacciones electrostáticas con su cola N-ter básica²⁹². Mientras que la PCNA humana sola no interacciona notablemente con el DNA, p15 puede unir PCNA y DNA simultáneamente vía sitios independientes y con afinidades similares, y la abrazadera puede acomodar hasta tres moléculas de p15 más el dúplex de DNA dentro de la cavidad central²⁹². Por todo esto, De Biasio y colaboradoras/es propusieron que la cola N-ter flexible de p15 puede actuar como un brazo extendido que captura y une la doble hélice de DNA a la cara trasera de PCNA²⁹² pudiendo así modular y ralentizar la difusión lineal de PCNA a lo largo del DNA.

La subunidad pinza β de *E. Coli* se une al DNA con afinidad nanomolar y tiene un coeficiente de difusión en el DNA que es dos órdenes de magnitud más bajo que el de la PCNA humana²⁶⁷. La subunidad de procesividad de la DNA polimerasa UL42 del virus de herpes simple también tiene afinidad nanomolar por el DNA, valor alto para una proteína de unión a DNA independiente de secuencia⁵⁶⁵, mientras que la interacción de la PCNA de *S. cerevisiae* con el DNA es muy débil¹⁶¹. Esta comparación sugiere una pérdida en la afinidad por el DNA durante la evolución de las abrazaderas deslizantes del DNA, con una concomitante ganancia en la procesividad que implica una difusión más rápida a lo largo del DNA. En organismos superiores, p15 puede que ayude a regular la velocidad de deslizamiento de PCNA, y esta función de p15 debe ser requerida para la respuesta al daño del DNA para prevenir una rápida deriva de PCNA en las horquillas de replicación paradas entre eventos de intercambio de la DNA polimerasa.

3.2. Estudio biofísico y bioquímico del sistema PCNA-DNA-p15

Entonces ya sabemos que p15 está implicada en la replicación y cómo es la unión de p15 a PCNA (capítulo 2), y también conocemos en detalle la interfaz de interacción PCNA-DNA (capítulo 1). Ya hemos mencionado cómo p15 puede actuar como modulador de la velocidad de difusión de PCNA gracias a la interacción de su cola N-ter asomando por la cara trasera de la pinza con el DNA, y que parece factible la acción de p15 sobre PCNA y sobre el DNA a la vez. Dando por hecho la posibilidad del complejo ternario PCNA-DNA-p15, el siguiente paso es claro, conseguir su estructura cristalográfica y comenzar a estudiar el sistema. Y una vez conseguido lo primero, igual que hicimos para el esclarecimiento del mecanismo de difusión de PCNA en la doble hélice de DNA, donde recurrimos a la combinación de técnicas experimentales y computacionales, intentaremos dilucidar el mecanismo molecular que subyace tras la actuación de p15 en el replisoma celular.

3.2.1. Caracterización de la interacción PCNA-DNA-p15

Gracias al empleo combinado de técnicas biofísicas experimentales (cristalografía y RMN), herramientas computacionales (simulaciones de dinámica molecular) y técnicas bioquímicas (SDS-PAGE), esclarecemos el mecanismo molecular de la interacción PCNA-DNA-p15 para poder entender y justificar la función de p15 en el replisoma.

Estudio de la estructura cristalina y de las interacciones en solución del complejo PCNA-DNA-p15

Se obtuvieron sendos cristales que difractaron a una resolución adecuada (Tabla complementaria 5, Figura complementaria 5 y Figura complementaria 6), uno con PCNA, dúplex de pDNA de 10 pb y el fragmento p15⁵⁰⁻⁷⁷ (residuos 50-77 de p15) (PDB ID: 6EHT), y otro con PCNA y el fragmento p15⁴¹⁻⁷² (residuos 41-72 de p15) (PDB ID: 6GWS). Con 10 pb de DNA porque esta es la longitud en estudios anteriores con la pinza bacteriana¹⁶³ y PCNA de *S. cerevisiae*¹⁶¹, y también en nuestra estructura hPCNA-DNA (PDB ID: 6GIS), analizada en profundidad en el capítulo 1 de esta tesis. Con el fragmento p15⁵⁰⁻⁷⁷ porque ya se había obtenido previamente la estructura cristalográfica de este mismo trozo con PCNA humana (PDB ID 4D2G)²⁹² y porque consiste en la fracción PIP-box de p15 y algunos residuos más tanto en el N-terminal como en el C-terminal; y con el fragmento p15⁴¹⁻⁷² porque incluye residuos adicionales en el N-terminal y así se podrá ver su interacción con la pared de la cara interna del anillo y con la cara trasera de PCNA (Figura 52).

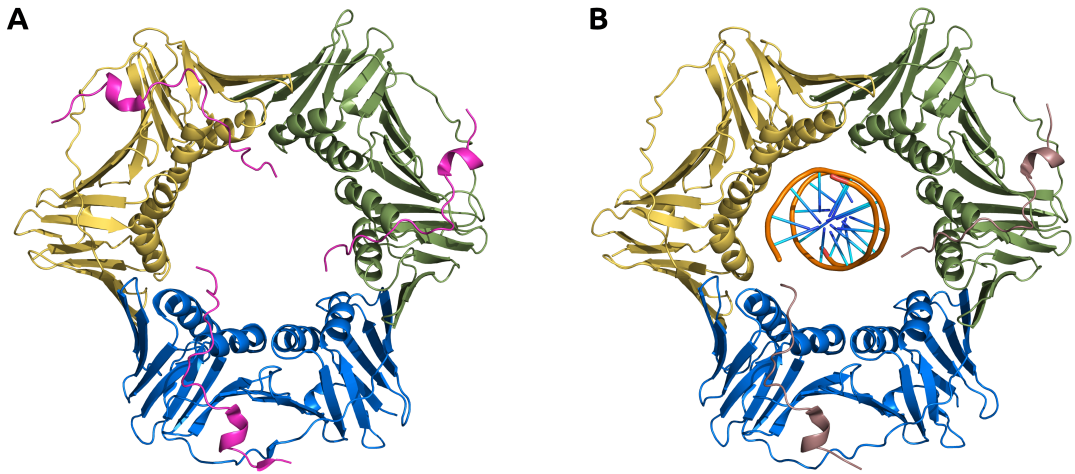


Figura 52: Estructuras cristalográficas obtenidas: A) hPCNA y el fragmento p15⁴¹⁻⁷² (residos 41-72 de p15) (PDB ID: 6GWS); B) hPCNA, dúplex de pDNA de 10 pb y el fragmento p15⁵⁰⁻⁷⁷ (residos 50-77 de p15) (PDB ID: 6EHT).

Los cristales que incluían el péptido p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT) mostraron dos de los tres sitios de unión a PIP-box de PCNA ocupados por dicho péptido y características de densidad electrónica en el canal del anillo que se pueden atribuir al dsDNA y que sugieren desorden parcial (presencia de múltiples conformaciones) y/o una baja ocupación por parte de este dúplex de DNA. El mejor modelo estadístico, la mejor calidad del mapa de densidad electrónica y los valores de los factores de temperatura más bajos de este cristal (Figura 53 y Tabla complementaria 5) muestran al DNA inclinado hacia la subunidad de PCNA no ocupada por p15⁵⁰⁻⁷⁷, lo que también está de acuerdo con los resultados de las simulaciones de DM que veremos después, y en una posición similar a la vista en el modelo binario PCNA-dsDNA (Figura 54). Como ya ocurrió en la estructura binaria PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G)²⁹², la estequiometría de p15⁵⁰⁻⁷⁷ unida a PCNA en el sistema ternario está definida por el empaquetamiento cristalográfico, donde una molécula de PCNA relacionada ocluye el sitio de unión del péptido en una subunidad.

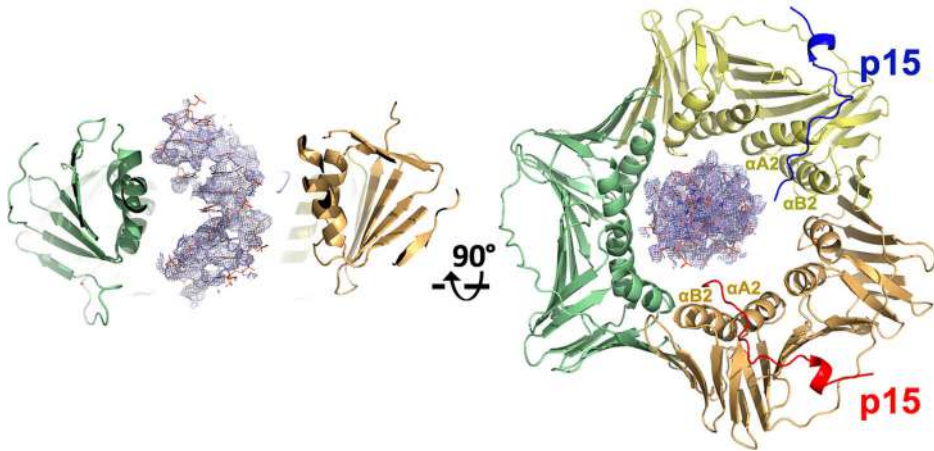


Figura 53: Vistas lateral y superior de la estructura cristalina refinada del complejo PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT). PCNA y p15⁵⁰⁻⁷⁷ se muestran en representación de cintas con las cadenas de la proteína y los péptidos coloreados de manera diferente. El DNA se muestra en color naranja con el mapa 2Fo-Fc a 0,7 σ .

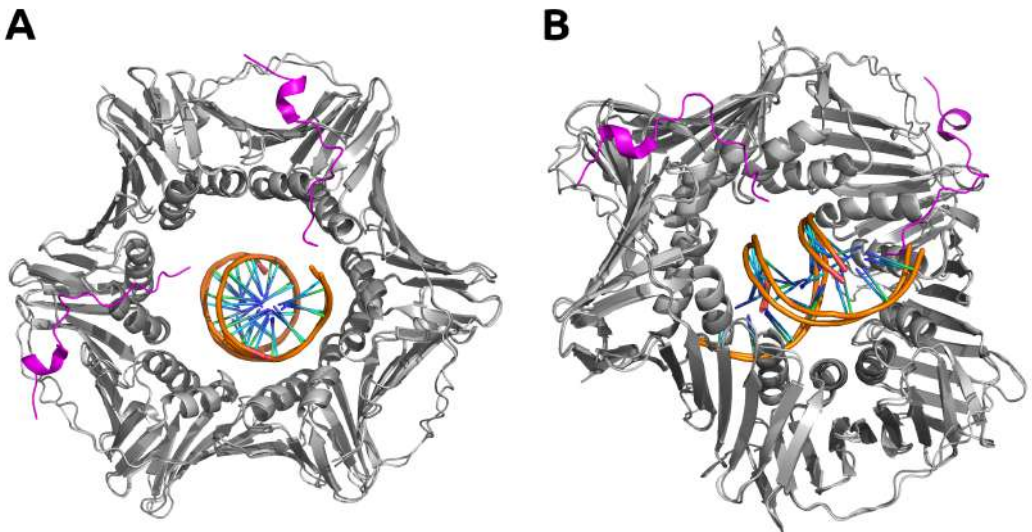


Figura 54: Superposición de las estructuras PCNA-DNA (PDB ID: 6GIS) y PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT). Vemos que, en presencia y ausencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ el dsDNA ocupa la misma posición en el interior del canal del anillo de PCNA más próximo a una de sus subunidades, precisamente la que no está ocupada por p15⁵⁰⁻⁷⁷, y establece contacto con los mismos residuos (K20, K77, R149, H153 y K217 de una subunidad, y K80 de la contigua).

Para obtener la estructura PCNA-p15⁴¹⁻⁷² (PDB ID: 6GWS) también se añadió a la disolución de cristalización pDNA, igual que para la estructura PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT), sin embargo no aparece. El mapa de densidad electrónica de los cristales de PCNA con p15⁴¹⁻⁷² y pDNA (PDB ID: 6GWS) (Figura complementaria 7) sugiere que, aunque incorporado en el cristal, el DNA no está suficientemente ordenado como para generar una señal estructurada, y por eso no se ve; además, el cristal muestra tres fragmentos de p15⁴¹⁻⁷², abarcando los residuos 50-72 los sitios para PIP-box correspondientes, con una conformación análoga a la observada en la estructura con el péptido p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID 6EHT). Es decir, los cristales obtenidos tras la mezcla de PCNA y p15⁴¹⁻⁷² (y DNA, aunque no se incorpora) muestran una estructura en la que tres moléculas de p15 están unidas a sendos bolsillos hidrofóbicos de unión a PIP-box y con igual conformación que en la estructura PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷. Hay que señalar que, debido al impedimento estérico, la localización de los péptidos p15⁴¹⁻⁷² interferiría con la unión del DNA a PCNA en la orientación observada en la estructura ternaria PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (Figura 55), sugiriendo que p15 puede superar al DNA en la competición por la unión al borde interior de PCNA.

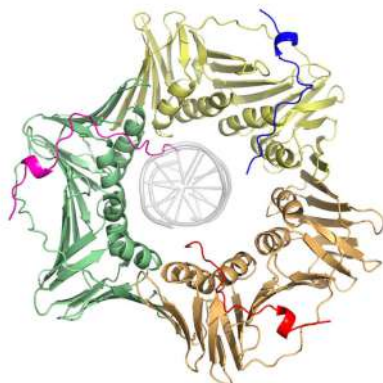


Figura 55: Vista superior de la estructura del complejo PCNA-p15⁴¹⁻⁷², con los mismos colores que en la Figura 8, e insertado el DNA (mostrado como una cinta gris transparente) en la misma posición que ocupa en el complejo PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷. Vemos que el dsDNA chocaría con la cola N-ter del péptido p15 en la tercera subunidad de PCNA.

También se ha caracterizado la interacción de PCNA con p15⁵⁰⁻⁷⁷ y dsDNA de 10 pb (Tabla complementaria 3) en solución por RMN. Primero se hizo la titulación de PCNA, etiquetada en ²H-¹⁵N, con p15⁵⁰⁻⁷⁷ sin marcar y se analizaron las perturbaciones de los desplazamientos químicos de las señales del esqueleto amida de PCNA (Figura 56). Así se identificaron dos grupos diferenciados de residuos que interactúan: i) residuos cuyas señales se desplazaban gradualmente a lo largo de la titulación, lo que indica un régimen de intercambio rápido en la escala de tiempo de RMN, y ii) residuos que a concentraciones subestequiométricas de péptido p15 muestran señales que se ensanchan y desaparecen (debido a una atenuación de la señal por debajo del nivel de ruido o a un desplazamiento no rastreado) (Figura 57), lo que indica un régimen de intercambio intermedio (para aclarar, mirar RMN en Definiciones). Para los residuos del primer grupo (i), se extrajo una constante de disociación de $\approx 35 \mu\text{M}$ a 35 °C (Figura complementaria 8), del mismo orden de magnitud que la constante de $\approx 12.5 \mu\text{M}$ previamente medida a la misma temperatura por calorimetría isotérmica²⁹². Para algunos residuos del

segundo grupo (ii), las nuevas señales que aparecen una vez saturado el complejo, podrían asignarse a la forma enlazada, con tres péptidos de p15 unidos a cada una de las tres subunidades de PCNA.

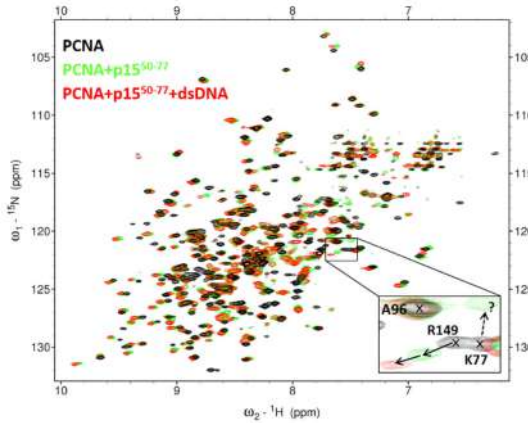


Figura 56: Análisis de RMN de la unión de PCNA a p15⁵⁰⁻⁷⁷ y a dsDNA de 10 pb. Vemos la superposición de los espectros de ¹H-¹⁵N TROSY de PCNA concentración 95 μM en ausencia (color negro) y presencia (color verde) de p15⁵⁰⁻⁷⁷ 606 μM, y (en color rojo) con dsDNA 92 μM y p15⁵⁰⁻⁷⁷ 606 μM. Los espectros se adquirieron a 35 ° C en muestras en fosfato sódico 20 mM, NaCl 50 mM, y pH 7,0. La expansión muestra señales de tres residuos representativos: la señal de A96 no se ve perturbada por la adición de p15⁵⁰⁻⁷⁷ o dsDNA; la señal de R149 persiste tras la adición de p15⁵⁰⁻⁷⁷ y cambia significativamente por la adición secuencial de dsDNA; y, por el contrario, la señal de K77 desaparece a concentraciones subestequiométricas de p15⁵⁰⁻⁷⁷ y no se recupera mediante la adición de DNA. La flecha punteada apunta a una tentativa de asignación de K77 en la forma unida a p15⁵⁰⁻⁷⁷.

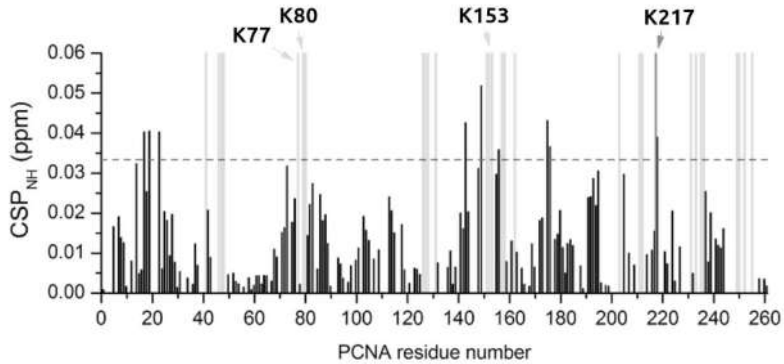


Figura 57: Análisis de RMN de la unión de PCNA unida a p15⁵⁰⁻⁷⁷ y dsDNA de 10 pb. Perturbaciones de los desplazamientos químicos (CSP) de los grupos amida (¹H-¹⁵N) del esqueleto de PCNA unida a p15⁵⁰⁻⁷⁷ inducidos por DNA. La línea punteada indica el valor promedio más dos desviaciones estándar. Las barras de color gris indican la posición de los residuos cuyas señales desaparecen al agregar p15⁵⁰⁻⁷⁷ en cantidades subestequiométricas. Están etiquetados los residuos perturbados por p15⁵⁰⁻⁷⁷ y que también aparecen en la interfaz de la estructura cristalina p15⁵⁰⁻⁷⁷-PCNA-DNA.

Los residuos de PCNA cuyas señales desaparecen a concentraciones subestequiométricas de péptido p15 se superponen con aquellos de la interfaz de interacción en la estructura cristalográfica de PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (Figura 58), mientras que los residuos cuyas señales se ven perturbadas significativamente se encuentran cerca del sitio de unión principal (el de unión a PIP-box) (Figura 59). Las señales de los residuos de PCNA K77, K80 y H153 desaparecen, mientras que la señal de K217 persiste pero está significativamente perturbada (Figura 60). Estos cuatro residuos de PCNA con señales perturbadas en la titulación de PCNA con p15 son también cuatro de los cinco residuos en la interfaz PCNA-DNA en la estructura cristalográfica PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷. Este resultado es consistente con la existencia de solapamiento parcial entre los sitios de unión de p15 y DNA a PCNA vistos en el estudio cristalográfico, y sugiere que, en solución, p15 puede competir con la unión del DNA.

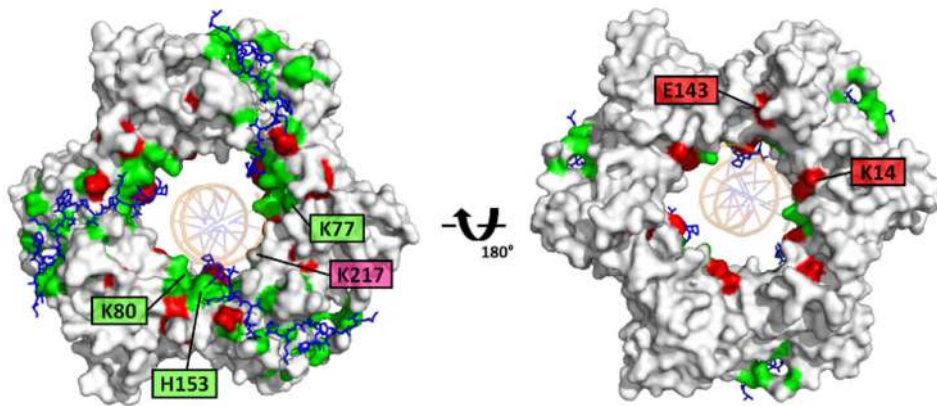


Figura 58: Vistas frontal y trasera de la superficie de PCNA. Los residuos de PCNA cuyas señales del protón amida desaparecen en presencia de cantidades subestequiométricas de p15⁵⁰⁻⁷⁷, o son significativamente perturbados por el DNA, están coloreados en verde o en rojo, respectivamente. Las tres p15⁵⁰⁻⁷⁷ en los tres sitios de unión a PIP-box se muestran en barras, y el DNA (en la posición cristalográfica) se muestra como una cinta naranja. Los residuos de la interfaz cristalográfica PCNA-DNA en la estructura PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ están etiquetados en verde y magenta.

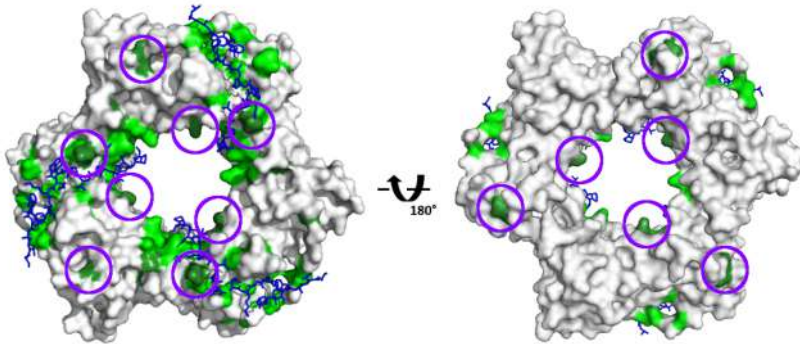


Figura 59: Vistas frontal y trasera de la superficie de PCNA. Los residuos de PCNA cuyas señales del protón amida desaparecen en presencia de cantidades subestequiométricas de p15⁵⁰⁻⁷⁷, o cuyas señales persisten pero se desplazan significativamente a lo largo de la titulación, se muestran en color verde claro o verde oscuro, respectivamente. Los péptidos p15⁵⁰⁻⁷⁷ unidos a los tres sitios de unión a PIP-box de PCNA se muestra en representación de barras.

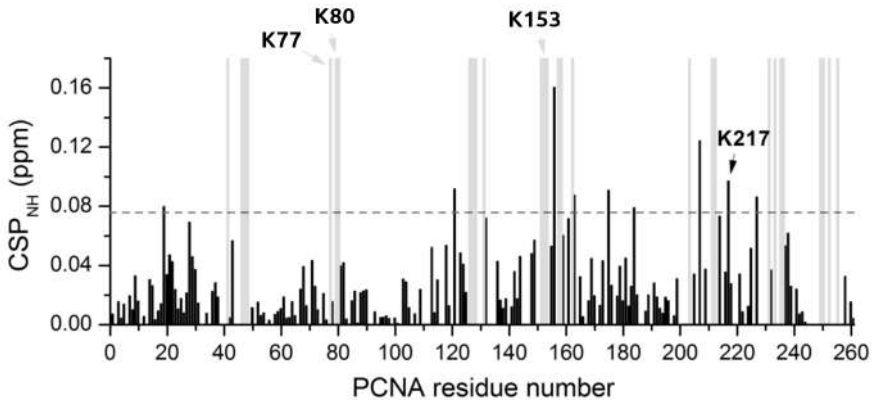


Figura 60: Análisis de RMN de la unión de PCNA y p15⁵⁰⁻⁷⁷. Perturbaciones de los desplazamientos químicos (CSP) de los grupos amida (¹H-¹⁵N) del esqueleto de PCNA inducidas por p15⁵⁰⁻⁷⁷. La línea punteada indica el valor promedio más dos desviaciones estándar. Las barras de color gris indican la posición de los residuos cuyas señales desaparecen al agregar p15⁵⁰⁻⁷⁷ en cantidades subestequiométricas. Están etiquetados los residuos perturbados por p15⁵⁰⁻⁷⁷ y que también aparecen en la interfaz de la estructura cristalina p15⁵⁰⁻⁷⁷-PCNA-DNA.

A fin de mapear el sitio de interacción del DNA con PCNA unida a p15, se realizó una segunda titulación con dsDNA de una muestra de PCNA marcada en ^2H - ^{15}N y saturada con p15⁵⁰⁻⁷⁷ (Figura 56). La saturación del desplazamiento de la señal con dsDNA se alcanzó a una relación molar 1:3 (trímero de PCNA saturado con p15 : dúplex de DNA). El hecho de que en una titulación análoga de PCNA con dsDNA en ausencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ solo el $\approx 10\%$ del complejo PCNA-DNA estaba formado a esta relación molar 1:3 (visto en el capítulo 1, Figura 10 del capítulo 1) indica que la presencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ aumenta la afinidad aparente del DNA por PCNA. Este resultado es además consistente con el hecho de que no pueda medirse bioquímicamente la afinidad de unión de DNA por PCNA sola, mientras que una afinidad débil pero detectable ha sido medida previamente en presencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ 292.

Al igual que en las titulaciones de PCNA sola con dsDNA o con pDNA (capítulo 1, Figura 10 de capítulo 1), los picos del espectro que ven modificada su señal sufren perturbaciones de sus desplazamientos químicos pequeñas (CSP < 0.06ppm), lo que sugiere que la interacción es débil (Figura 60 y Figura 57). Las perturbaciones inducidas por el DNA se asignan a residuos del interior del canal del anillo de PCNA así como a residuos en la cara frontal que están también en el sitio de unión de p15⁵⁰⁻⁷⁷ (Figura 58). Sin embargo, en la titulación con DNA de PCNA-p15, el péptido permanece anclado a su sitio de unión cuando se adiciona DNA, ya que las señales de los residuos de PCNA que desaparecen en presencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ subestequiométrico no se recuperan por la adición de DNA.

De manera general, estos datos sugieren que el DNA puede enhebrarse a través del canal de PCNA cuando p15⁵⁰⁻⁷⁷ satura los tres sitios PIP-box, pero que p15⁵⁰⁻⁷⁷ permanece anclada a la pared interna del anillo y no es desplazada.

Estudio de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15

Para la aproximación computacional se realizaron dos réplicas de simulaciones de dinámica molecular de 300 ns para el complejo ternario compuesto por PCNA, dos péptidos de p15 que abarcan los residuos 47-70 (p15⁴⁷⁻⁷⁰) y dsDNA de 40 pb. La estructura de partida para las simulaciones se construyó a partir de dos estructuras cristalográficas, la del complejo PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G)²⁹² y la del complejo PCNA-dsDNA (PDB ID: 6GIS), obtenida en el transcurso de esta tesis (capítulo 1), y se movió el DNA lejos de su sitio de unión en la pared interna del canal de la abrazadera, posición que ocupa en la estructura PCNA-dsDNA, a una posición central con contactos mínimos con PCNA. Los siete residuos del C-ter de p15⁵⁰⁻⁷⁷ son flexibles (residuos 71-77) y no interaccionan con PCNA, por eso fueron excluidos, mientras que se añadieron 3 residuos en el N-ter, también flexible, porque se localizan en el canal de la abrazadera y pueden interaccionar transitoriamente con el DNA (resultando el péptido final p15⁴⁷⁻⁷⁰). El segmento de DNA, con 10 pb en la estructura cristalográfica, también se extendió 15 pb en cada sentido del eje helicoidal. Las extensiones de los fragmentos se llevaron a cabo con el programa COOT²⁷⁴.

Para las dinámicas se siguió este protocolo: 1) Primero se protonó el sistema usando AmberTools 15²⁷⁵, se solató en una caja dodecaédrica truncada de agua TIP3P de al menos 1.5 nm más allá de los átomos de la proteína o el DNA, y se añadieron tantos iones cloruro e iones sodio como para alcanzar una concentración de 100 mM, que es también la concentración experimental, y neutralizar el sistema. 2) Después, el sistema se minimizó y equilibró, con una distancia de corte para las interacciones electrostáticas de largo alcance (usando el método PME -Particle-mesh Ewald-) de 1 nm, durante 0.1 ns en el colectivo canónico NVT y durante 0.1 ns en el colectivo isotermodisipativo NPT; la energía de equilibración fue revisada en estos

pasos y se ejecutaron con restricciones de posición en los átomos pesados (todos los que no son hidrógeno) del DNA y de la proteína. 3) Los cálculos se corrieron con GROMACS 5.1^{276,277} empleando el campo de fuerza parmBSC1 del grupo de Modesto Orozco²⁷⁸ y con pasos de integración de 2 fs; al calcular los promedios, los primeros 50 ns fueron tratados como equilibración y no considerados para las simulaciones de 300 ns. 4) Por último, la estabilidad de las simulaciones fue verificada por inspección visual de las trayectorias y por representación de los valores de RMSD respecto a la estructura inicial (Figura 61).

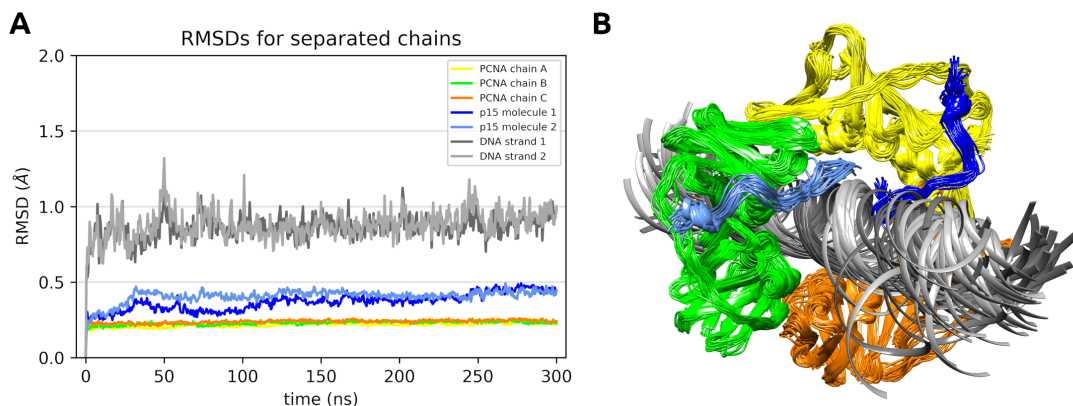


Figura 61: (A) Desviación cuadrática media (RMSD) calculada para los átomos pesados del esqueleto de las tres subunidades de la proteína PCNA (cadena A, cadena B y cadena C), las dos hebras del dúplex de DNA (cadena 1 y cadena 2) y los dos péptidos p15⁴⁷⁻⁷⁰ a lo largo de las trayectorias de DM. (B) Superposición de las estructuras del complejo ternario PCNA-dsDNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ de la réplica 1 de las simulaciones de DM, con el mismo código de colores que en A. Se puede ver que la mayor parte de la flexibilidad del DNA surge de sus regiones terminales. Los resultados de la réplica 2 son visualmente similares.

Para rastrear la evolución de la posición del DNA dentro del anillo de PCNA, se siguió este procedimiento: a) Primero, las cadenas de PCNA se superpusieron para todos los marcos de la trayectoria para así eliminar la rotación y la traslación globales. b) En segundo lugar, se calculó el centro de cada PCNA para todos los marcos de trayectoria. c) Tercero, se seleccionaron los pares de bases del DNA 17-21 de una de las cadenas (llamada cadena F en la estructura de partida, cadena 1 en la Figura 16) y 20-24 para la otra cadena (la G, cadena 2 en la Figura 16) como los que se encuentran dentro del anillo de PCNA; calculamos también su centro para cada marco. d) Y en cuarto lugar, para proyectar en un espacio 2D, se realizó un análisis de las componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para los centros de las subunidades de PCNA, y los centros de DNA se proyectaron en las dos primeras componentes de este subespacio (Figura 62).

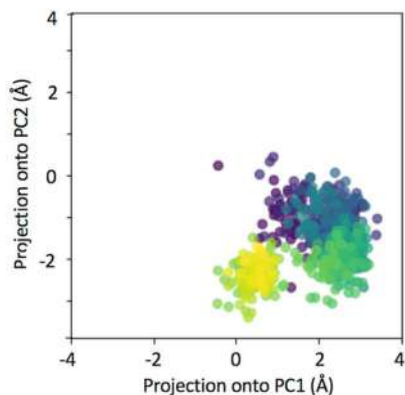


Figura 62: Análisis de componentes principales de la evolución de la posición del DNA dentro del anillo de PCNA en una simulación de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰. El centro del DNA en cada marco de la trayectoria se proyectó sobre los dos primeros componentes del subespacio (PC1 y PC2) compuesto por los centros de las tres subunidades de PCNA. Cada marco se colorea utilizando el mapa de colores viridis, que va desde el violeta oscuro para los primeros marcos hasta el amarillo para los últimos. En el marco inicial, el DNA está cerca de (0,0), en el centro de las tres subunidades de PCNA, y se mueve rápidamente a una posición no centrada. La posición final se mantiene debido a las interacciones estabilizadoras que se muestran en la Figura 67.

A lo largo de la trayectoria, los péptidos p15 permanecen anclados a sus sitios de unión en dos subunidades de PCNA, mientras que el DNA gira y se inclina hacia la pared de la subunidad de PCNA que no está ocupada por p15. Al final de la simulación, el segmento de DNA en el canal del anillo tiene una posición similar a la observada en nuestra simulación previa de 250 ns de PCNA unida a un dúplex de DNA de 30 pb en ausencia de p15, vista en el capítulo 1 de esta tesis, donde el DNA simultáneamente interactúa en la cara frontal de PCNA con dos conjuntos adyacentes de residuos de dos subunidades diferentes de PCNA, y con residuos en la cara posterior de la abrazadera (Figura 63 y Figura 64).

Las interacciones polares entre el DNA y la subunidad de PCNA no ocupada por p15 en el complejo PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ coinciden con las observadas en la estructura cristalográfica del complejo PCNA-dsDNA (Figura 65). Además, los resultados de estas simulaciones de DM, con un segmento de DNA muy móvil, son consistentes con los resultados cristalográficos del complejo PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷, que daban unos valores de factores de temperatura elevados, acordes con un DNA muy móvil y/o ocupando parcialmente el canal interno. Todos estos datos cristalográficos y computacionales sugieren, pues, que, en presencia de dos moléculas de p15 unidas a PCNA, un dúplex de DNA de más de 10 pb puede aún unirse a una de las tres superficies de deslizamiento de PCNA.

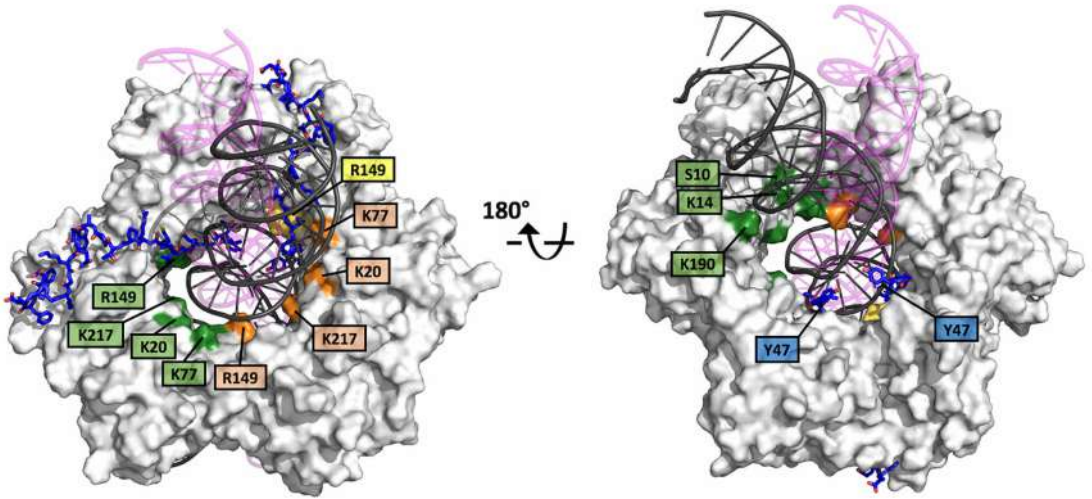


Figura 63: Superposición de los estados inicial y de equilibrio de la trayectoria de dinámica molecular de PCNA unida a dos péptidos p15⁴⁷⁻⁷⁰ y una molécula de DNA de 40 pb. PCNA se muestra como superficie gris y el DNA como cinta. El DNA en color magenta y con transparencia corresponde al estado inicial de la simulación, y en color negro el estado de equilibrio. Se indican los residuos de PCNA cuyas cadenas laterales están involucradas en contactos polares con fosfatos del DNA, coloreados en colores diferentes para cada subunidad de PCNA (verde, amarillo y trigo). En recuadro azul están indicados los residuos Y47 de los péptidos p15⁴⁷⁻⁷⁰ (uno por cada molécula) que asoman por la cara trasera de PCNA.

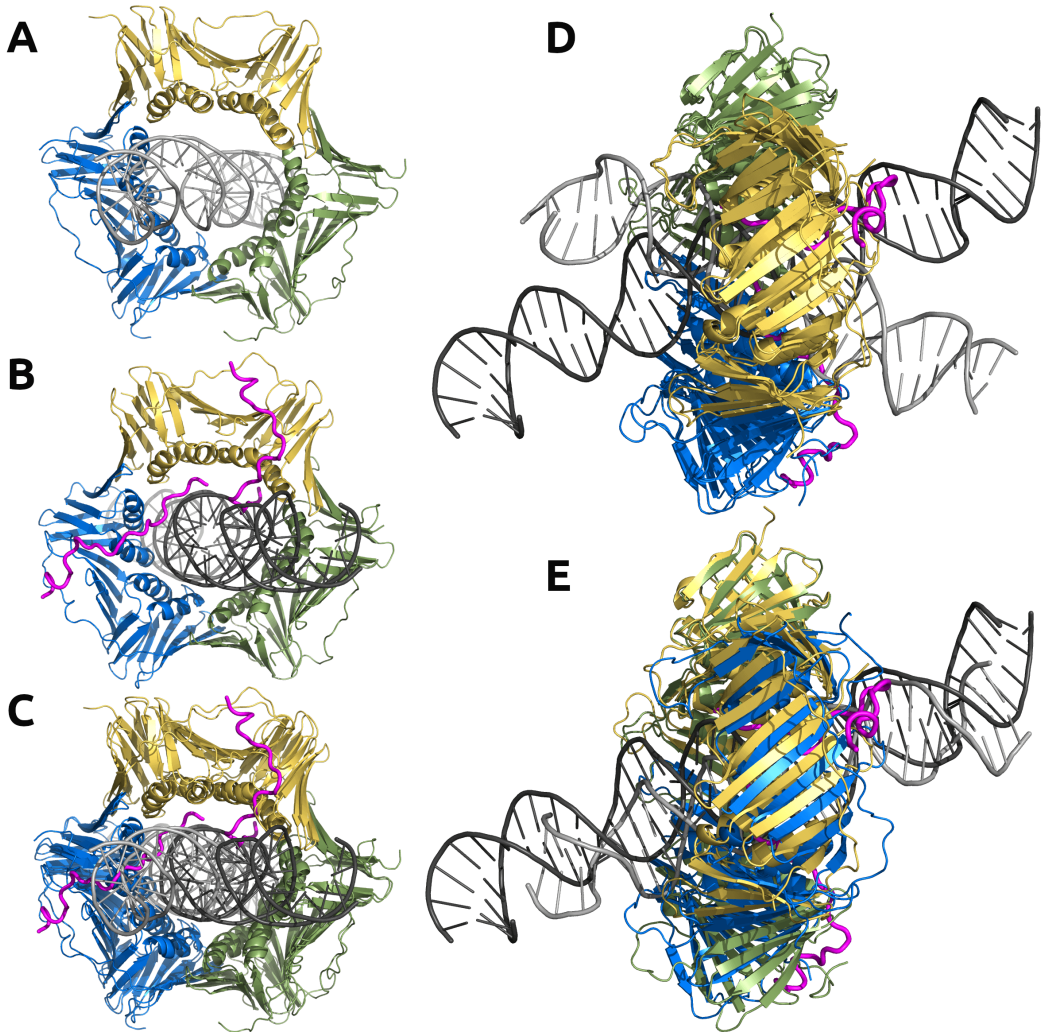


Figura 64: En B se muestra el último marco de la simulación de DM del sistema binario PCNA-DNA (Capítulo 1) y en C el último marco de la simulación de DM del sistema ternario PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰. El DNA se inclina y acerca a una de las subunidades de PCNA incluso en ausencia de p15, y cuando p15 está, lo hace hacia la que la IDP deja libre. Si superponemos ambos marcos (A y D. D se obtiene girando PCNA 90° hacia la izquierda alrededor de su eje ternario de simetría y después girando 90° la vista de la estructura), la orientación del DNA respecto a la pinza no coinciden, pero se debe a una asignación arbitraria de los nombres de las cadenas de PCNA. Si superponemos las subunidades de PCNA hacia las que se acerca el DNA, obtenemos E.

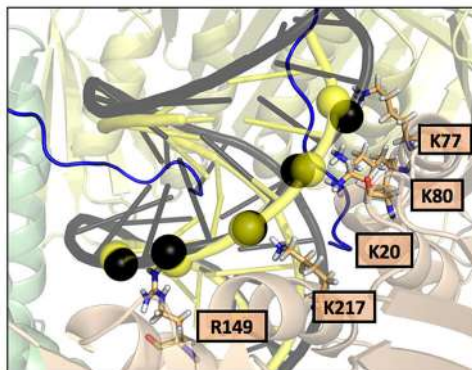


Figura 65: Primer plano del estado de equilibrio de la trayectoria de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ que muestra la interfaz PCNA-DNA. Las cadenas laterales de PCNA y los fosfatos del DNA que interactúan (átomos de nitrógeno de las cadena laterales de aminoácidos de PCNA etiquetados en la imagen, y átomos de fósforo del DNA a distancias interatómicas inferiores a 4 Å) se muestran como barras y esferas negras, respectivamente. El DNA en color amarillo corresponde a la posición en la estructura cristalográfica del sistema binario PCNA-dsDNA (PDB ID: 6GIS, capítulo 1), con los fosfatos interfaciales mostrados como esferas.

El análisis de distancias de los contactos intermoleculares a lo largo de la trayectoria de DM del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ muestra que los residuos 52-61 del N-terminal de la PIP-box de p15 están anclados de manera estable a la pared interna del anillo de PCNA, mientras que los residuos 47-51 del N-ter permanecen flexibles (Figura 66, Figura complementaria 9) y se enhebran en el canal. En general, los péptidos p15 establecen contactos limitados con el DNA; en particular, se detectan contactos polares entre los residuos Y47 y G49 del péptido y fosfatos del DNA. Sin embargo, PCNA sí muestra interacciones extensas con el DNA (Figura 63), y las cadenas laterales de muchos residuos en la interfaz PCNA-DNA pueden aleatoriamente cambiarse entre fosfatos adyacentes del DNA en una escala de tiempo por debajo de los nanosegundos (Figura 67), tal y como ya observamos en la simulación de DM del complejo binario (capítulo 1).

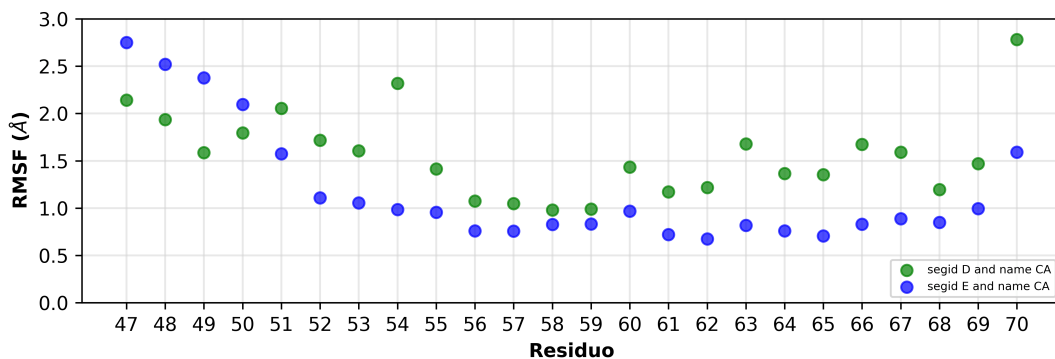
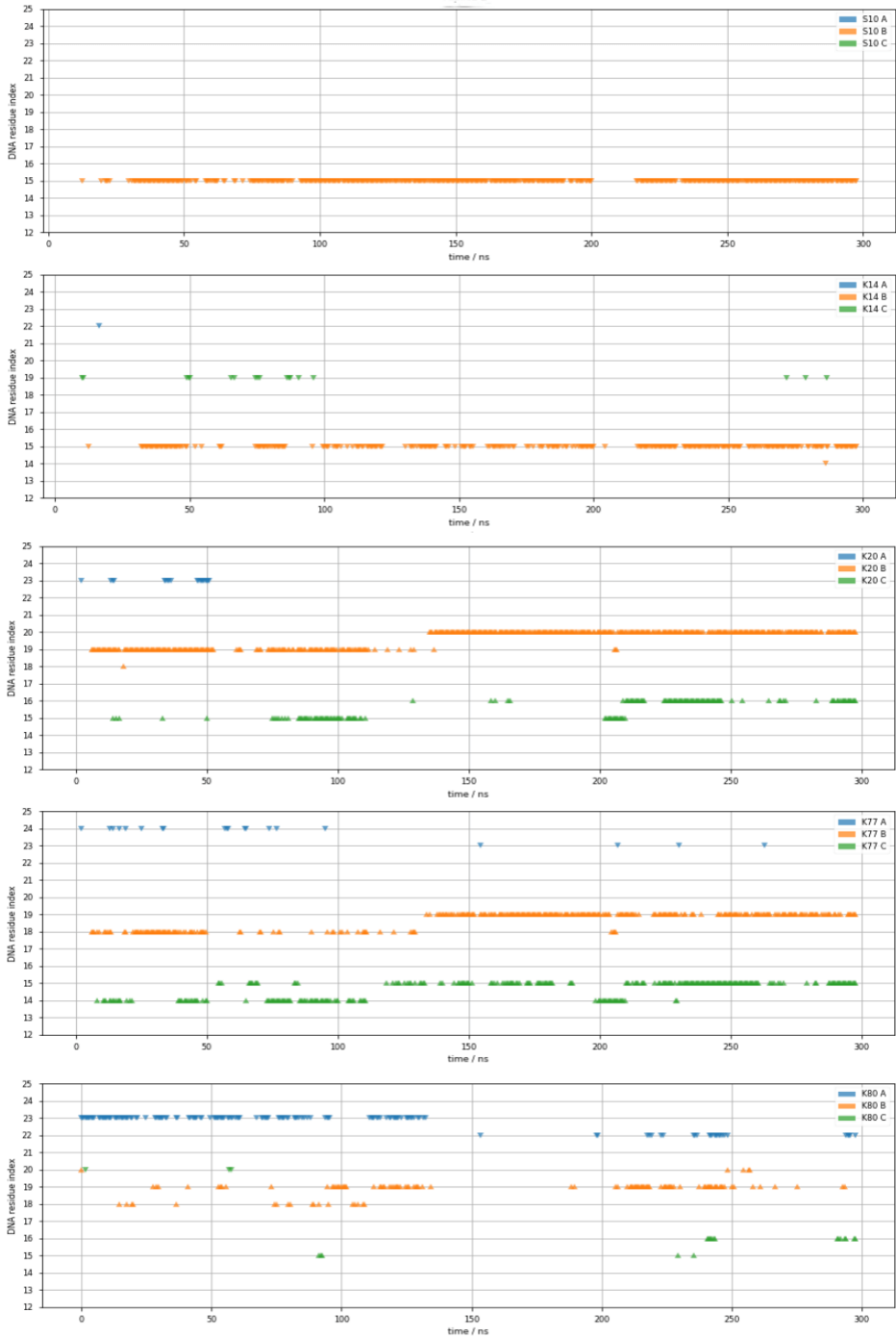


Figura 66: Para mostrar la flexibilidad de los péptidos p15 anclados a PCNA en el sistema ternario PCNA-DNA-p15 a lo largo de las trayectorias, se recurre a los valores de los RMSF. Esta fluctuación cuadrática media de la posición de los átomos a lo largo de la simulación proporciona información de la dinámica del sistema, y, cuanto mayor es su valor, más fluctuaciones en su movimiento se dan. Por tanto, con los valores mostrados en la gráfica podemos deducir que los residuos (47-51) del N-ter de p15 tienen más flexibilidad que los residuos intermedios.



3. Modulación de la superficie de deslizamiento de PCNA por p15

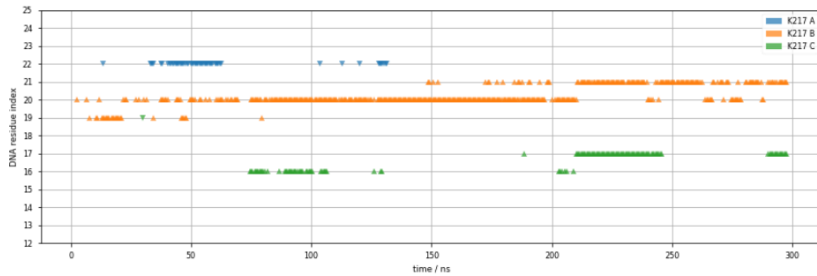
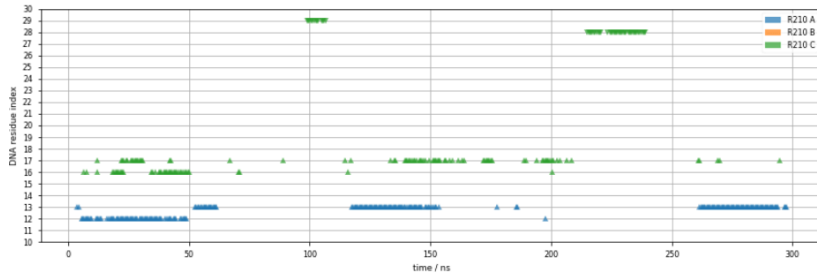
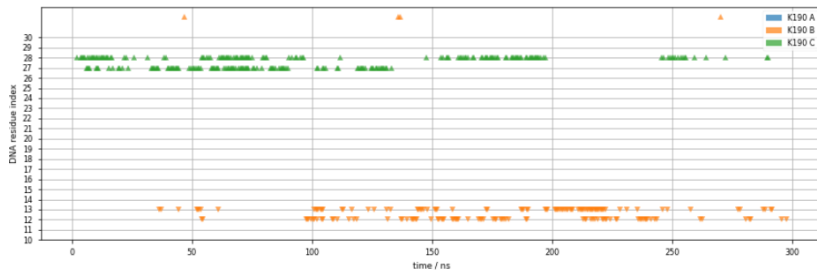
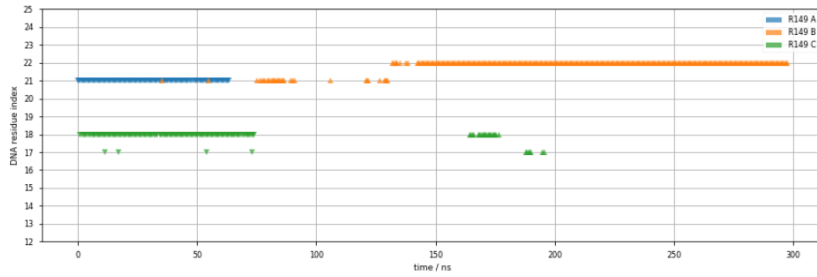
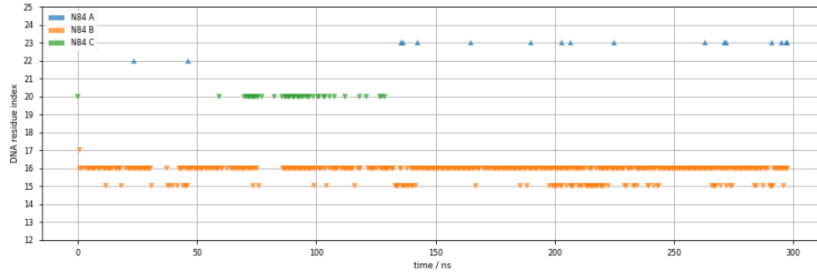


Figura 67: Análisis de la simulación de DM de PCNA unida a dos péptidos p15⁴⁷⁻⁷⁰ y un dúplex de DNA de 40 pb. Evolución temporal de los contactos (entre el nitrógeno u oxígeno de la cadena lateral del residuo y el fósforo del DNA que tenga a una distancia interatómica inferior a 4 Å) en la interfaz PCNA-DNA. Los contactos con residuos pertenecientes a las subunidades A, B y C de PCNA se muestran como triángulos coloreados en azul, naranja y verde, respectivamente. Los nucleótidos que interactúan de las dos hebras del dsDNA de 40 pb están numerados consecutivamente; los triángulos con vértices apuntando hacia arriba y hacia abajo corresponden a contactos con la hebra 1 del DNA, y con vértices hacia abajo a la hebra 2.

Estudio bioquímico de la inhibición de la actividad de la holoenzima pol η -PCNA por p15

Dada la importancia de p15 en la regulación de la actividad de Pol η durante la TLS, demostrada ya en experimentos celulares²⁹¹, y a la luz de todos estos nuevos datos estructurales a partir de los resultados experimentales de RMN y cristalografía, y computacionales de la dinámica molecular, se realizaron estudios bioquímicos con proteínas purificadas para obtener una mayor visión del mecanismo de actuación del sistema PCNA-DNA-p15.

Primero se probaron los efectos de p15 en la actividad de la holoenzima pol η -PCNA en la extensión del cebador de DNA cuando hay una lesión específica de sitio con cisplatino. Para ello se realizó un estudio de la variación con el tiempo del baipás de Pol η en presencia o ausencia de PCNA y p15 en una plantilla de DNA que lleva un aducto cisPt(GG) en las posiciones +1 y +2 (Figura 68).

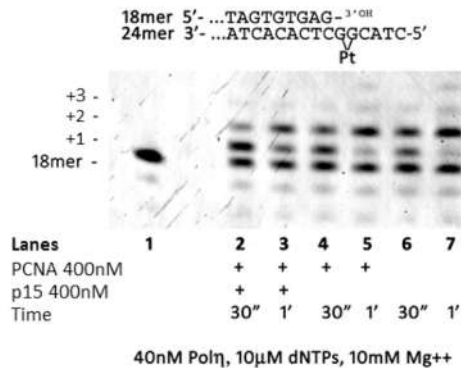


Figura 68: Inhibición de la holoenzima pol η por p15. Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra la evolución temporal de la reacción de Pol η en una plantilla con cisPt(GG) (10 nM) en presencia de PCNA y p15 a concentraciones equimolares (carriles 2 y 3), en presencia de PCNA (carriles 4 y 5), o Pol η sola (carriles 6 y 7). En el pDNA (unión P/T) utilizado, la cadena cebada se llama 18mer y la cadena molde o plantilla 24mer.

Los datos muestran que Pol η sola fue capaz de completar el baipás, es decir, pudo llevar a cabo la incorporación de hasta dos dCMP opuestos a ambas G (guanina) en el aducto, tal y como indica la existencia de bandas de los productos +1 y +2 fruto de la incorporación de un nucleótido y dos respectivamente en la cadena 18mer (carriles 6-7 del gel). A tiempos mayores, la cantidad de producto +1 (con un dCMP incorporado) se redujo por su conversión en el producto +2 (con dos dCMP incorporados), por eso su banda disminuye de intensidad. El alargamiento adicional más allá de la lesión fue mínimo, como era de esperar por la naturaleza altamente distributiva (mirar «naturaleza distributiva» en Definiciones) de Pol η , especialmente al replicar plantillas dañadas⁵⁶⁶.

La adición de un exceso de PCNA de 10 veces (carriles 4-5 del gel) no afectó significativamente la actividad de Pol η , pues, como puede apreciarse, las bandas de los carriles 4 y 5 son similares a las de los carriles 6 y 7; pero tal efecto no es sorprendente ya que mientras PCNA ha mostrado estimular la actividad de Pol η en los sustratos de DNA con los finales bloqueados^{566,567} o en plantillas circulares¹⁰⁵, tal estimulación puede no ser efectiva en un sustrato de DNA con finales libres como el de nuestro ensayo debido al rápido deslizado de PCNA a través del sustrato. Además, si la estimulación de Pol η por PCNA es el resultado de una afinidad aumentada por el nucleótido incorporado¹⁰⁵, las concentraciones de nucleótido saturantes utilizadas en nuestro experimento podrían estar enmascarando la estimulación.

Por otro lado, la adición de cantidades equimolares de PCNA y p15 (carriles 2-3) redujeron la incorporación de nucleótido en las posiciones +2 y +3 (resultado reproducido también en otros experimentos independientes (Figura 69), tal y como indica una banda más clara del aducto +2 en el carril 2 en comparación con los carriles 4 y 6, y una banda más intensa del aducto +1 en el carril 3 en comparación con los carriles 5 y 7. Para descartar la posibilidad de que el efecto inhibitor de p15 en la actividad de Pol η sea debido a un cargado defectuoso de PCNA sobre la unión o empalme cebador-plantilla (P/T) del sustrato de DNA, el experimento TLS fue repetido en presencia de RFC de *S. cerevisiae* (ScRFC), el cual es capaz de cargar la PCNA humana en el DNA⁵⁶⁸. Nuestros resultados (Figura 70) muestran que p15 retrasa la TLS por la holoenzima pol η -PCNA a través de una lesión cis-Pt incluso en presencia de RFC.

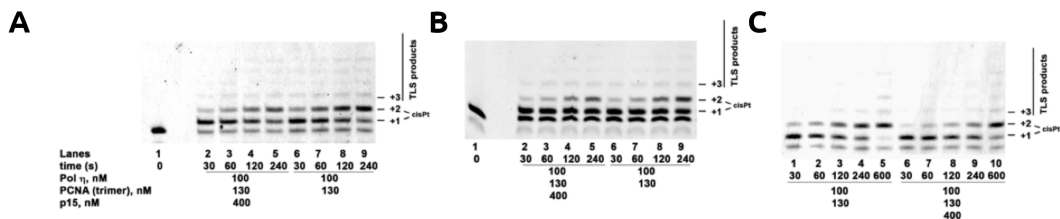


Figura 69: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la inhibición de la holoenzima Pol η por p15. Tres repeticiones independientes (A, B y C) de la evolución temporal de la reacción de Pol η en la plantilla cisPt (GG) (10 nM) en presencia de PCNA y p15.

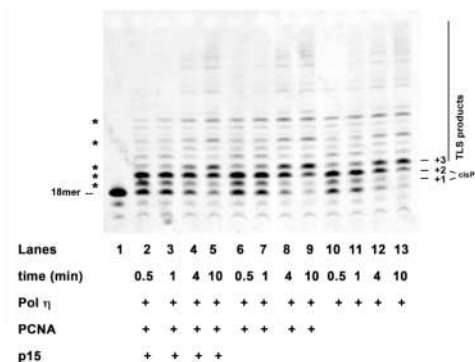


Figura 70: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la inhibición de la actividad de Pol η por PCNA y p15 en presencia de RFC. Se probó la actividad de Pol η en presencia de RFC en el sustrato cebador-plantilla 18mer/24mer que lleva un aducto cis-Pt en las dos guaninas de las posiciones +1 y +2 de la hebra plantilla, en ausencia (carriles 10-13) o en presencia (carriles 6-9) de PCNA, o en presencia de PCNA y p15 (carriles 2-5). La evolución de la incorporación de nucleótidos mostró que la presencia de PCNA no cambió significativamente los productos de síntesis translesión respecto a Pol η sol. Sin embargo, la adición de p15 en combinación con PCNA provocó una acumulación de los productos +1 y +2, correspondientes a la incorporación opuesta a las dos G del aducto cis-Pt, y un retraso en la aparición de productos más largos, particularmente a tiempos de incubación cortos (comparación de los carriles 2, 3 con los carriles 6, 7 y 10, 11), como puede verse comparando los productos marcados con asteriscos en los diferentes carriles. Estos resultados indicaron que el complejo PCNA/p15 fue capaz de retrasar la TLS a través de una lesión cis-Pt incluso en presencia de RFC.

Después se repitió el experimento de replicación anterior con el mismo sustrato de DNA pero sin la lesión (Figura 71) y de nuevo, mientras Pol η sola (carriles 10-13) y Pol η en presencia de PCNA (carriles 6-9) mostraron igual procesividad, pues se produce la terminación de la cadena en crecimiento al añadirse hasta 6 nucleótidos, la adición de PCNA y p15 redujo la incorporación de nucleótido en la posición +2 al tiempo inicial (carril 2), y ralentizó la síntesis del producto de longitud completa (carriles 3-5). Para confirmar que el efecto inhibitorio de p15 es mediado por la interacción con PCNA y no por una interacción directa con Pol η , se probó la actividad de Pol η replicando el sustrato en ausencia o presencia de p15 sola, sin adicionar PCNA, mostrando que p15 sola no afecta la actividad de la polimerasa (Figura 72).

Para determinar si un fragmento de p15 que abarca la región que interactúa con PCNA es suficiente para inducir el efecto inhibitorio en Pol η observado con p15 completa, se probó la actividad de Pol η en un sustrato de DNA sin daños (Figura 73) en presencia de PCNA y i) en ausencia (carriles 2 y 3) o ii) en presencia de péptido p15⁴¹⁻⁷² (carriles 4, 5) o iii) de p15 completa (carriles 6, 7). La adición de p15⁴¹⁻⁷² o p15 en combinación con PCNA causó una reducción de la síntesis de DNA con respecto a Pol η y PCNA solas, que se paró en las posiciones +1 y +2, posiciones que corresponden a la incorporación en los sitios opuestos a las dos primeras G de la plantilla. Estos resultados indican que tanto p15 como p15⁴¹⁻⁷² actuando de manera conjunta con PCNA son capaces de reducir la síntesis de Pol η en niveles comparables, luego parece que la interacción con un péptido de p15 de tamaño (41-72) es suficiente para la inhibición.

3. Modulación de la superficie de deslizamiento de PCNA por p15

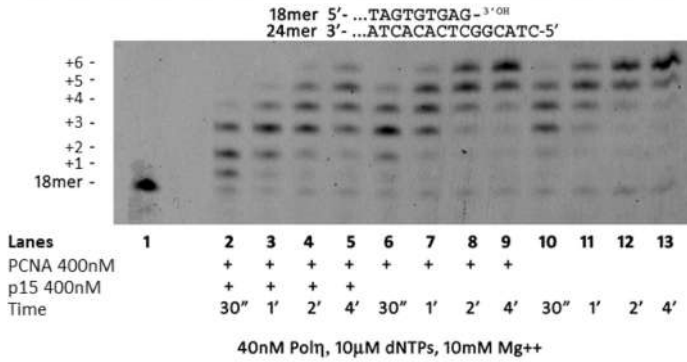


Figura 71: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la inhibición de la holoenzima Pol η por p15. Evolución temporal de la reacción de Pol η en una plantilla sin la lesión cis-Pt (10 nM), en presencia de PCNA/p15 en concentraciones equimolares (carriles 2-5), en presencia de PCNA (carriles 6-9) o solo con Pol η (carriles 10-13).

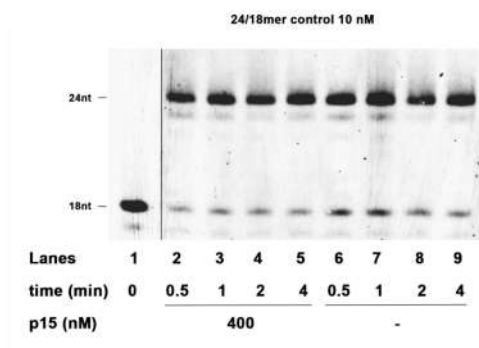


Figura 72: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la inhibición de la holoenzima Pol η por p15. Evolución en el tiempo de la reacción de Pol η en la plantilla control (sin lesión), con Pol η sola (carriles 6-9) o en presencia de p15 (carriles 2-5) (la línea vertical indica que dos porciones del mismo gel se han acercado para mayor claridad).

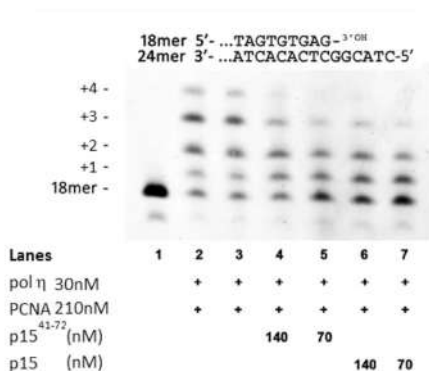


Figura 73: Electroforesis en gel de poliacrilamida de la inhibición de la holoenzima Pol η por p15. Reacción de Pol η replicando la plantilla intacta (sin lesión) en presencia de PCNA sola (carriles 2-3), o presencia de PCNA y del péptido p15⁴¹⁻⁷² (carriles 4-5), o en presencia de PCNA y de p15 de longitud completa (carriles 6-7). PCNA no estaba ubiquitinada en ningún caso. Estos experimentos muestran que p15 regula a la baja la actividad de la holoenzima pol η -PCNA para evitar una lesión de cisplatino, así como en la replicación de un sustrato de DNA normal.

Considerando las concentraciones de Pol η , PCNA y p15 utilizadas en los ensayos (Figura 68 y Figura 71), y las constantes de disociación del equilibrio de unión para Pol η -PCNA ($K_d = 0.4 \mu\text{M}$ a 25°C)¹⁵⁶ y p15-PCNA ($K_d = 1.1 \mu\text{M}$ a 25°C)²⁹² reportadas en la bibliografía, se estimaron las poblaciones relativas de los complejos binarios asumiendo que la unión de Pol η y p15 a PCNA es mutuamente excluyente, resultando que el 42% de Pol η y el 23% de p15 están saturadas con PCNA. Así que, cada paso de inserción de dNTP es llevado a cabo por una combinación de Pol η sola y de Pol η holoenzima (Pol η -PCNA). Sin embargo, si esto es así, si p15 inhibe la unión de Pol η a PCNA, no debería observarse una caída de la actividad de Pol η en presencia de p15, ya que esta última favorecería la formación de Pol η libre, y Pol η libre muestra una actividad completa. Además, la relativamente alta (30 nM)⁵⁶⁶ y baja (5 μM)²⁹² afinidad de Pol η y p15 por el DNA respectivamente, descarta que p15 pueda prevenir el acceso de Pol η a la unión P/T del DNA por interacción con el DNA. Todo esto sugiere que la inhibición de la procesividad de Pol η en presencia de PCNA y p15 es debida a la formación de una holoenzima ternaria p15-PCNA-pol η defectuosa, deficiente en la síntesis del cebador tanto en plantillas dañadas como normales.

3.2.2. Análisis del sistema ternario PCNA-DNA-p15

Todos estos datos revelan que el DNA puede pasar a través del anillo de PCNA junto a dos cadenas de p15, y que la estructura del segmento de p15 que interacciona con PCNA es invariante en ausencia y presencia de DNA. En nuestras simulaciones de dinámica molecular, el N-ter desordenado de los fragmentos de p15 estudiados (p15⁴⁷⁻⁷⁰) se asoma por la cara trasera de PCNA, una topología análoga a la propuesta para p15 completa unida a PCNA en ausencia de DNA^{292,538} (Figura 74).

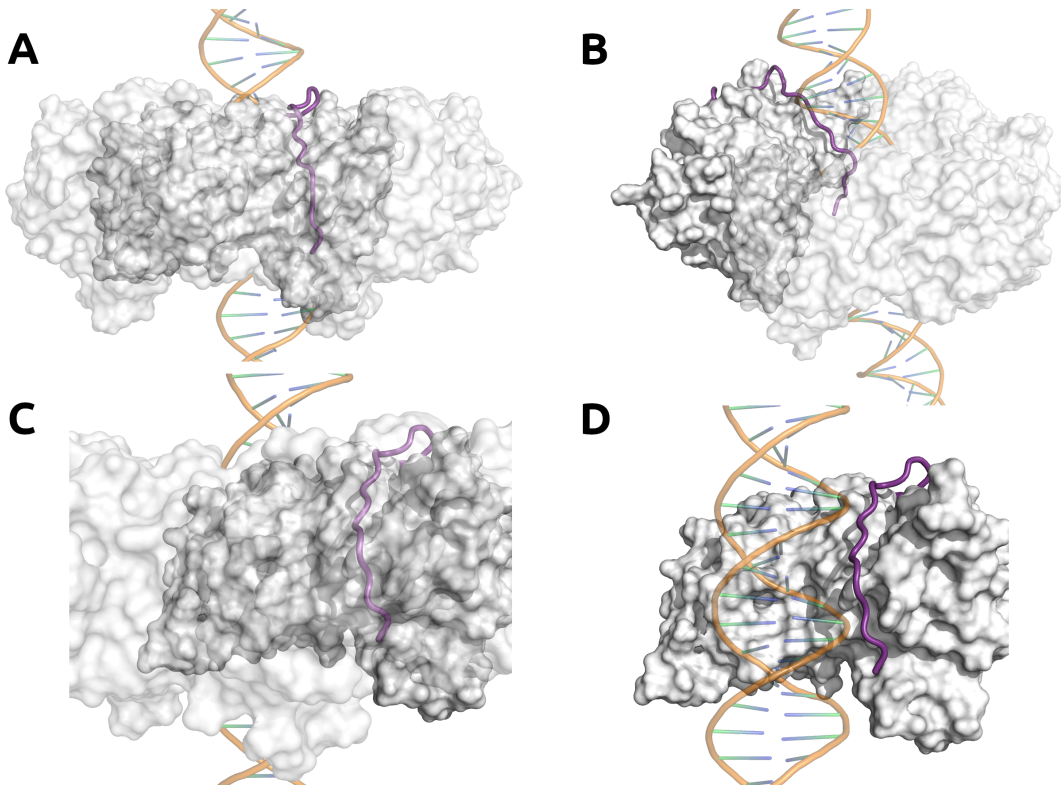


Figura 74: Detalle de la estructura del sistema ternario PCNA-DNA-p15 que muestra que el extremo N-ter del péptido de p15⁴⁷⁻⁷⁰ atraviesa el canal central del anillo de PCNA hasta asomar (y salir, si tuviera más longitud) por la cara trasera de la pinza.

El número limitado de contactos entre p15 y el DNA observados en nuestro análisis computacional sugiere que la IDP funciona principalmente como un obstáculo estérico pasivo restringiendo al DNA en el canal de la abrazadera. p15 protege residuos clave en la superficie deslizante de PCNA, confinando el DNA a posiciones concretas, posiciones que dependerán de la estequiometría de unión de p15 (Figura 75, Figura 76). Este modo de unión con el DNA compitiendo parcialmente con p15 por un único sitio de unión en el anillo interno de la abrazadera está también apoyado por (i) nuestro estudio de RMN, que muestra que el DNA no desengancha a p15 de la pared interna de PCNA saturada con p15, y por (ii) nuestra estructura cristalina de la cocrystalización de PCNA con tres péptidos de p15 y DNA (PDB ID (PCNA-p15⁴¹⁻⁷²): 6GWS), en la que el DNA no ocupa el canal central.

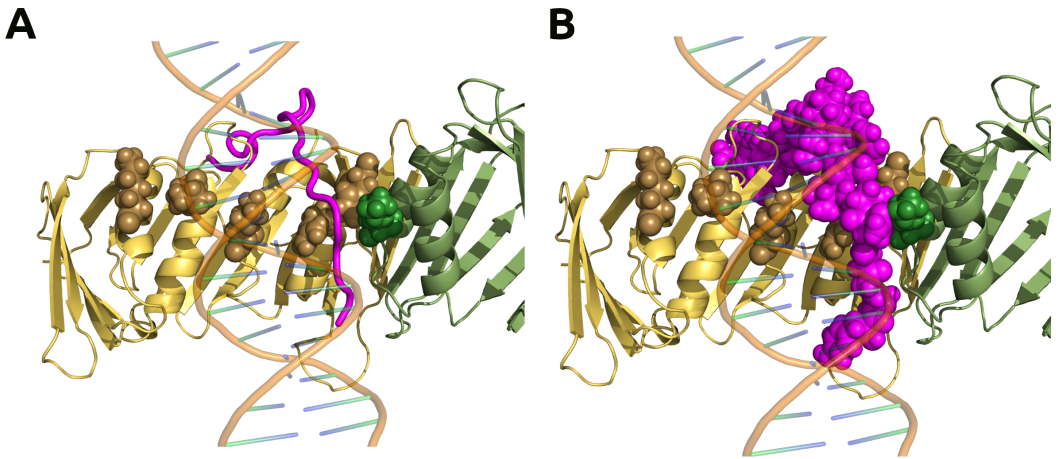


Figura 75: Imagen del centro del anillo de PCNA en el sistema ternario PCNA-DNA-p15. Están representados (aunque no etiquetados) los residuos K20, K77, R149, H153, K217 de una subunidad de PCNA (en color dorado, subunidad y residuos, y por este orden) y el residuo K80 de la siguiente (en color verde). El péptido p15 solapa dos de los residuos que establecen las interacciones más importantes en la interfaz PCNA-DNA.

Ya vimos en el Capítulo 1 que el DNA se aproxima inclinado hacia una de las subunidades de PCNA. En presencia de dos moléculas de p15, el DNA vuelve a acercarse inclinado hacia una subunidad de PCNA, solo que ahora es hacia la subunidad que las p15 dejan libre. En cualquier caso, los resultados vuelven a mostrar un DNA que no permanece en el centro del anillo de PCNA (Figura 77) ni tampoco se queda perpendicular a su plano (Figura 78), pudiendo así interactuar con residuos, además de en el canal central de la pinza, de la cara frontal y trasera, proporcionando más estabilidad a la interacción.

A diferencia de lo que ocurre en el sistema PCNA-DNA, en el sistema PCNA-DNA-p15 se da el giro paulatino de PCNA. En el sistema PCNA-DNA el ángulo que alcanza PCNA poco después de comenzar la dinámica molecular se mantiene más o menos constante a lo largo de la trayectoria; sin embargo, PCNA en presencia de p15 (sistema PCNA-DNA-p15) ya muestra una variación gradual de su ángulo de giro, alcanzando poco a poco a lo largo de la trayectoria los 30° que tiene al final (Figura 79). Parece que p15 favorece el giro de PCNA en el DNA, luego p15 beneficia la difusión en modo "rueda dentada".

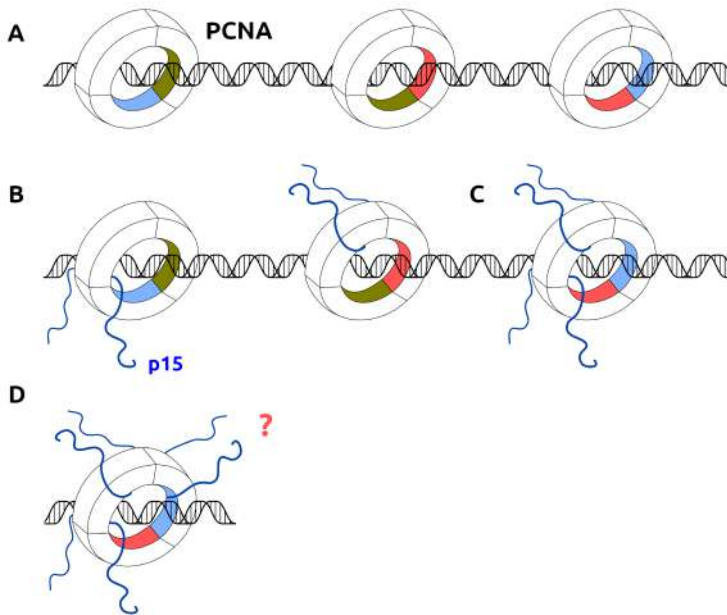


Figura 76: Posibles efectos de p15 en función de la estequiometría sobre el deslizamiento de PCNA (cada subunidad de PCNA se representa con un color diferente en su parte interna del anillo). A) PCNA puede difundir en el DNA entrando en contacto con cualquiera de las tres superficies deslizantes equivalentes, cada una compuesta por dos conjuntos homólogos de residuos básicos que se extienden a través de la superficie de dos subunidades, produciéndose, quizás, intercambios entre ellas durante el deslizamiento. B– C) La estequiometría de la unión de p15 al homotrímero de PCNA define las superficies disponibles para el deslizamiento de la abrazadera, así que el DNA solo podrá acercarse a la subunidad o subunidades que p15 deje libres. D) Queda por determinar si se puede lograr una configuración en la que el PCNA se una simultáneamente a tres cadenas p15 y al DNA, y cómo podría ser el deslizamiento de PCNA en este caso.

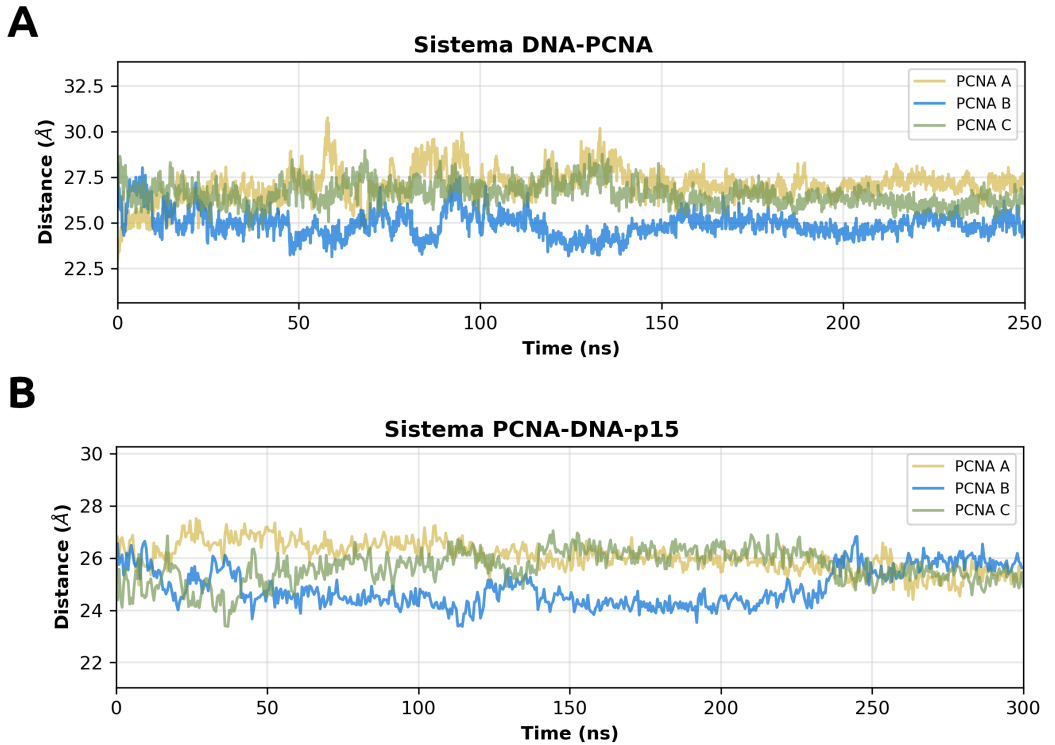
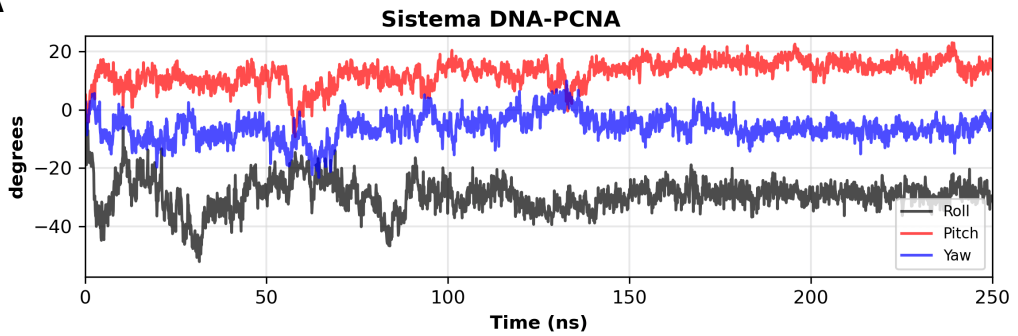


Figura 77: Análisis de las simulaciones de DM de los sistemas PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15. Representación de los valores de las distancias entre el DNA y las tres subunidades de PCNA (representadas en colores diferentes) a lo largo de las trayectorias.

A



B

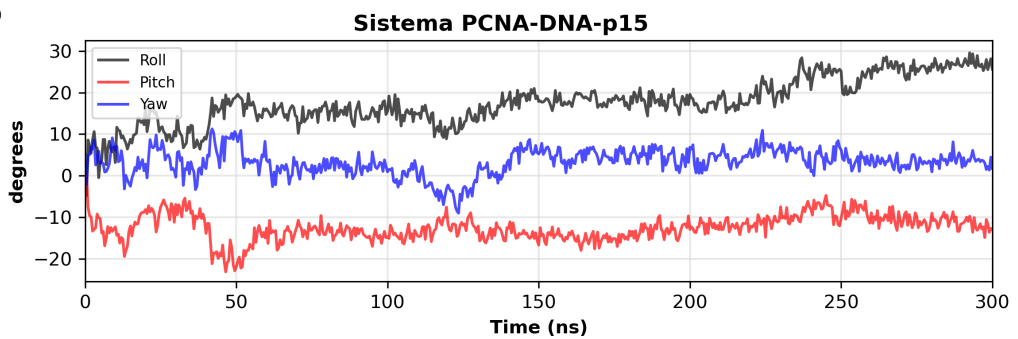


Figura 78: Análisis de las simulaciones de DM de los sistemas PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15. Representación de los valores de los ángulos giro, inclinación y viraje («roll», «pitch» y «yaw» en las leyendas y representados en colores diferentes) a lo largo de las trayectorias. Mirar figura complementaria 3.

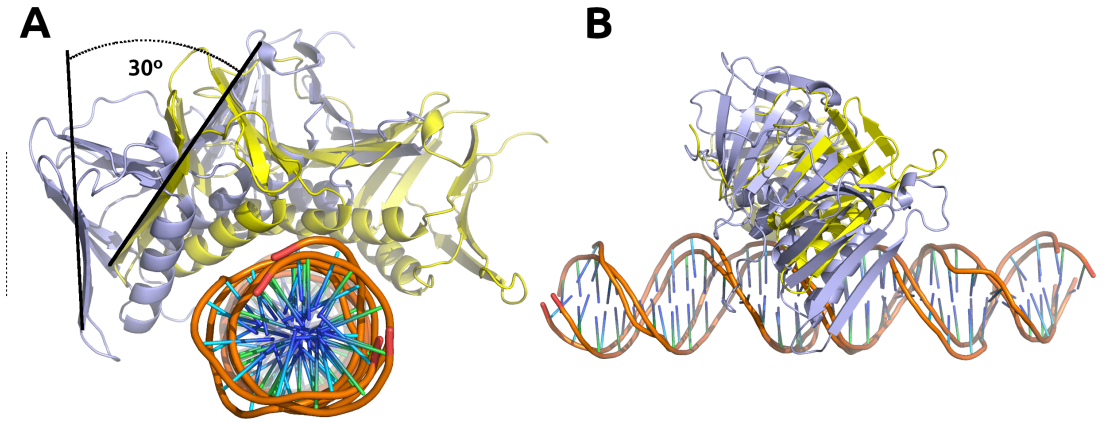


Figura 79: Representación del ángulo de giro de PCNA en el sistema PCNA-DNA-p15. A) Vista frontal de la superposición del primer marco y el último de la trayectoria de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15 (se muestra solo una subunidad de PCNA para mayor claridad. En color grisáceo la subunidad en el primer marco de la trayectoria y en color amarillo en el último marco). B) Vista lateral de A.

Debido a que p15 está asociada de manera estable con PCNA en la cromatina durante la fase S del ciclo celular²⁹¹, es probable que, durante la replicación, las polimerasas y otras enzimas de edición del DNA se unan solo a uno o dos sitios de PCNA solamente, y que dos sitios o un sitio libres en PCNA estarían disponibles para la unión de p15. La subunidad catalítica de Pol δ (p125) y la proteína FEN1 fueron precipitadas junto con p15 y PCNA a partir de lisados de células pancreáticas³⁹⁷, y mientras FEN1 es una enzima monomérica que se une a PCNA a través de una única PIP-box¹⁷⁷, la Pol δ humana consiste en cuatro subunidades (p125, p66, p50 y p12), todas ellas se requieren para la actividad óptima de la holoenzima⁵⁶⁹ y las cuatro contienen sitios PIP-box potenciales. Sin embargo, el estudio de holoenzimas reconstituidas en las que los motivos PIP de unión a PCNA se han mutado o inactivado solo se ha llevado a cabo para p12 y p66^{286,570,571}, y pueden existir múltiples subensamblados de Pol δ *in vivo*^{572,573}. Así que, considerando su pequeño tamaño y alta flexibilidad, p15 puede coexistir con Pol δ en el mismo homotrímero de PCNA en una célula en replicación. De la misma manera, una comparación de las estructuras cristalográficas FEN1-PCNA (PDB ID: 1UL1)¹⁷⁷ y PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G)²⁹² sugiere que FEN1 y p15 pueden ambas acomodarse en un único anillo de PCNA. (Figura 80).

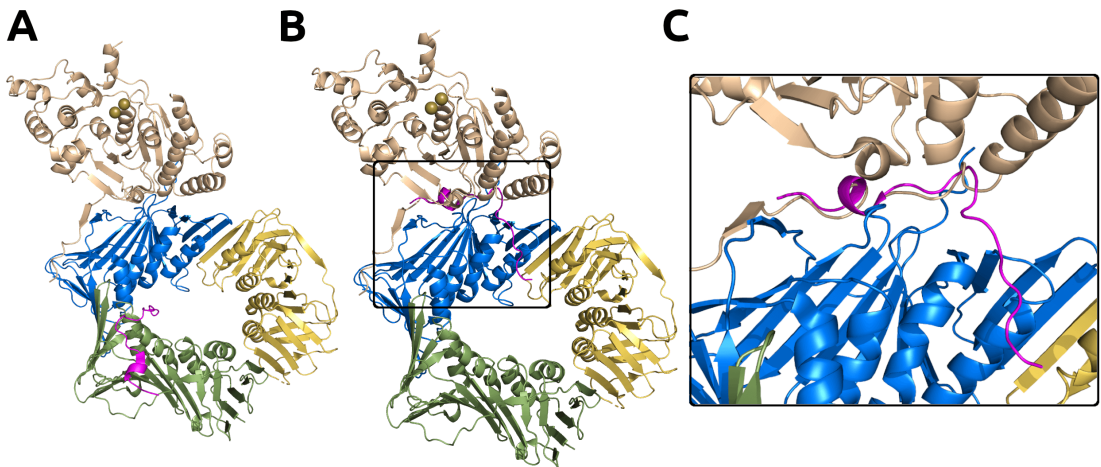


Figura 80: Superposición de las estructuras cristalográficas de los complejos FEN1-PCNA (PDB ID: 1UL1) y PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G). Vemos que p15 y FEN1 pueden acomodarse sin problemas en una misma molécula de PCNA, y que además eso debe ocurrir en subunidades diferentes, pues parte de sus motivos PIP-box coinciden.

La Pol η , de 78 kDa, es menos voluminosa que Pol δ y se une a PCNA a través de una única PIP-box localizada en su C-ter flexible¹⁵⁶. Considerando las afinidades de las PIP-box por PCNA comparables^{156,292}, Pol η y p15 pueden coexistir en un homotrímero de PCNA; y, además, la estructura de microscopía electrónica de PCNA ubiquitinada y unida a Pol η y DNA³⁷⁶, donde dos sitios PIP-box estarían libres para la unión de p15, y la superposición de las estructuras PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ y pol η -PCNA-DNA (Figura 81) apoyan esta hipótesis.

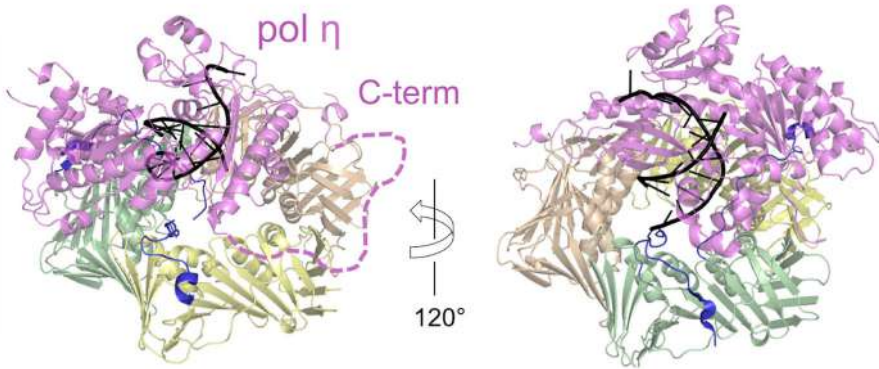


Figura 81: Modelos estructurales de la holoenzimas pol η -PCNA con p15 y DNA. Superposición del trímero de PCNA de la estructura cristalina de PCNA- p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G) y PCNA de la estructura de baja resolución de pol η -PCNA-DNA humana generada a partir de datos de microscopía electrónica (PDB ID: 3JA9 y 3JAA⁵⁷⁵). El DNA se muestra en color negro. Mostramos el sitio vacante para PIP-box en PCNA (subunidad color trigo) ocupado por el motivo PIP-box del C-terminal de Pol η , utilizando el dominio PIP-box de la estructura cristalina de la PCNA humano unida a Pol η (cadena W de PDB ID: 2ZVK¹⁵⁶). La línea punteada indica el C-ter flexible de Pol η (residuos 433-699).

Pero nuestros resultados de los ensayos bioquímicos indican que p15 inhibe Pol η y además solo lo hace en presencia de PCNA, luego la inhibición no debe producirse por unión directa a Pol η y sin embargo deberse a la formación de una holoenzima defectuosa. La holoenzima Pol η -PCNA se formaría en presencia de p15, pero no podría hacer el baipás de la lesión en el DNA y continuar con la síntesis al otro lado del daño. El daño en el DNA producido por agentes químicos (como el aducto de cis-Pt) o luz UV (como los dímeros de pirimidina) provoca un abultamiento en la doble hélice del material genético que hace aumentar su diámetro en la sección de la lesión, y quizás tener un tamaño tal que no permita el paso de la holoenzima pol η -DNA si p15 está presente (Figura 82).

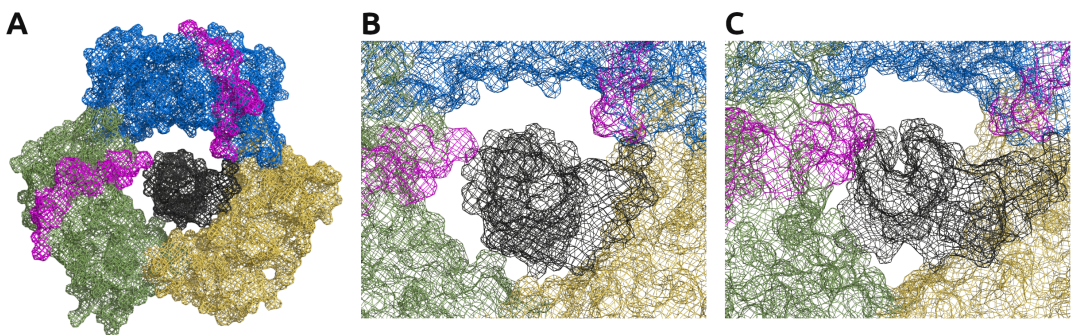


Figura 82: Estructura del complejo PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT) en representación de malla; en A vemos la estructura entera, en B una ampliación del centro del anillo de PCNA y en C la misma ampliación que en B pero con una rotación de 45°. Vemos parte del hueco que deja el DNA en el anillo interno de PCNA al acercarse a una de sus subunidades es ocupado por las dos moléculas de p15⁵⁰⁻⁷⁷, y ese espacio podría ser insuficiente para poder pasar a través de una lesión abultada en el DNA.

Así que, si esto es así y p15 puede coexistir estructuralmente con Pol η , pero estar ocupando el espacio en el anillo interno de PCNA necesario ahora para traspasar un tramo de la doble hélice con una lesión voluminosa, entonces necesariamente p15 debe eliminarse de PCNA para que la holoenzima pueda pasar el daño y se pueda dar la TLS.

3.2.3. Intercambio entre Pol δ y Pol η para hacer el baipás de una lesión en el DNA

p15 se asocia con PCNA, y su disminución hace mermar el número de células en fase S²⁹⁰, fase del ciclo celular en la que tiene lugar la replicación por parte de la polimerasa replicativa Pol δ . p15 se localiza en el núcleo y mitocondrias siempre asociada a PCNA^{231,386} y estudiando el significado biológico de su sobreexpresión en células cancerígenas, se vio que una expresión reducida de p15 causa una drástica atenuación de su proliferación así como una disminución significativa de la velocidad de replicación del DNA³⁹⁷. Además, la expresión de p15 está estrechamente regulada por la vía p53-p21 (factores proteicos también implicados en la reparación del DNA y en la progresión del ciclo celular)³⁹⁷. Los experimentos con péptidos diseñados para inhibir la interacción p15-PCNA resultaron también en una interrupción significativa del crecimiento de células cancerígenas³⁹⁷. Si Pol δ necesita a PCNA para aumentar su procesividad y p15 es compañera inseparable de PCNA, parece que p15 y Pol δ deben entenderse. Pero ¿por qué necesita la holoenzima pol δ -DNA a p15?

Al encontrarse con una lesión en el DNA, la Pol δ se disocia de PCNA y esta última es ubiquitinada para el reclutamiento de Pol η y así replicar el DNA más allá de la lesión^{377,574} e impedir que la horquilla de replicación se detenga. Aunque las unidades de ubiquitina de la PCNA ubiquitinada pueden interactuar con el C-ter del motivo de unión a ubiquitina (UBZ) de Pol η , una gran cantidad de datos argumentan que la ubiquitinación de PCNA no es estrictamente necesaria para el reclutamiento de Pol η y la actividad TLS^{5,105,129}. De hecho, Hedglin y colaboradoras/es demuestran que la unión de Pol η a PCNA y la síntesis de DNA por la holoenzima pol η son independientes de la monoubiquitinación de PCNA²⁸⁷.

Nuestros experimentos muestran una inhibición de la actividad de Pol η en presencia de p15, así que, que la unión de Pol η a PCNA no precise de la monoubiquitinación del anillo, y que la ocupación de los bolsillos hidrofóbicos de unión a PIP-box de PCNA por parte de p15 impida su actividad, nos lleva a pensar que Pol η necesita unir su motivo PIP-box al bolsillo de PCNA para llevar a cabo su actividad y entonces la monoubiquitinación de PCNA podría estar actuando o como señal para su reclutamiento, o como anclaje para tenerla próxima a modo de reservorio para asegurarse la maquinaria de replicación su intervención en el mismo instante en que sea requerida.

Durante una replicación no perturbada, p15 está monoubiquitinada en K15 y K24 y es degradada por el proteosoma después de irradiación UV o tratamiento con cisplatino²⁹¹. Esta degradación de p15 tras daño en el DNA es requerida para el reclutamiento de Pol η al sitio de replicación y un eficiente baipás de la lesión²⁹¹, y por eso Povlsen y colaboradoras/es ya sugirieron que p15 puede prevenir la unión de Pol η a PCNA.

Hemos visto que p15 tiene una actividad inhibidora en la holoenzima pol η -PCNA en sintetizar más allá del 5'dG de un aducto de DNA de cisplatino 1,2-d(GpG) y extender el molde no dañado. Y lo que es más importante, un fragmento de p15 que abarca solo la región de interacción con PCNA (PIP-box) es suficiente para inhibir esa actividad de Pol η . En lugar de evitar que Pol η se una a PCNA, los datos sugieren que p15 inhibe la actividad de Pol η por asociación a la

holoenzima, posibilidad apoyada por razones estructurales (Figura 81). Por tanto, Pol η debe poder unirse a PCNA en presencia de p15, pero como encuentra los bolsillos PIP-box ocupados, no puede anclarse correctamente para tener la disposición adecuada para actuar sobre el DNA.

Aunque el DNA en el mapa de microscopía electrónica de Pol η unida a PCNA ubiquitinada y DNA no está completamente definido³⁷⁶, el dúplex de DNA dentro de PCNA se encuentra cerca de una de las subunidades de la abrazadera en una posición diferente de la observada en la estructura del complejo PCNA-DNA-p15 (Figura 83). La restricción impuesta al DNA por p15 en el canal central de PCNA podría obstaculizar el avance del DNA en el sitio activo de Pol η requerido para la incorporación del nucleótido opuesto al 5'dG del molde de DNA. Así, después de la inserción del primer dCMP, la polimerasa podría volverse inactiva y disociarse de PCNA. Sin duda, nuevos estudios de alta resolución de la holoenzima Pol η aclararán esta posibilidad.

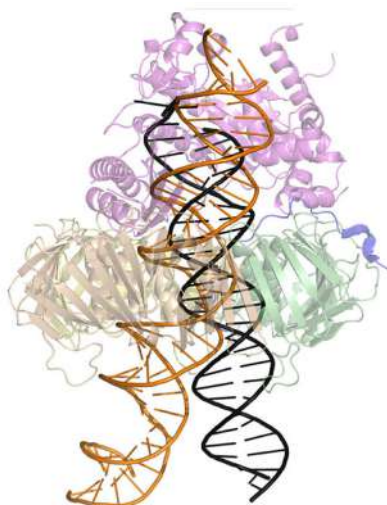


Figura 83: Superposición del trímero de PCNA en la estructura cristalográfica del complejo PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB: 6EHT) con el trímero de PCNA del complejo de microscopía electrónica pol η -PCNA-DNA (PDB: 3JA9 y 3JAA). El DNA del primer complejo (alargado hasta las 40 pb) se muestra como una cinta color naranja, el DNA del segundo último (alargado hasta las 25 pb) como una cinta color negro. Según este modelo (y el visto en la Figura 33), es posible que p15 coexista con Pol η en el mismo anillo de PCNA; sin embargo, la restricción sobre el DNA dentro del canal interno de PCNA impuesta por p15 puede dificultar el posicionamiento de la holoenzima pol η en el DNA.

Y ya que nuestros resultados de los ensayos bioquímicos indican que p15 inhibe Pol η y además solo lo hace en presencia de PCNA, y que, por tanto, la inhibición debe producirse por la formación de una holoenzima pol η -PCNA defectuosa tal macrocomplejo se forma en presencia de p15, sea por impedimento estérico al paso del bulbo debido a la lesión en el DNA por disminución del diámetro efectivo del hueco en el anillo de PCNA, sea porque p15 coloca al DNA en una disposición no adecuada para su encaje en el centro catalítico de Pol η , lo que está claro es que necesariamente p15 debe eliminarse para que se pueda dar la TLS y Pol η pueda hacer el *by-pass* de la lesión en el DNA y continuar con la síntesis al otro lado del daño.

Ya hemos hablado sobre que la interacción entre PCNA y el DNA es fundamental para el posicionamiento y la orientación de PCNA en el replisoma y que esto debe tener claras implicaciones en el desarrollo de su función. Una colocación concreta de PCNA sobre el DNA y su orientación respecto a él debe ser fundamental no solo para interactuar de manera

3. Modulación de la superficie de deslizamiento de PCNA por p15

adecuada con la proteína asociada en cada momento de la replicación y aumentar su procesividad, sino también para que esa proteína asociada adquiriera la disposición óptima para realizar su actividad y, algo que parece ahora mucho más claro, también para determinar precisamente qué proteína debe asociarse en cada momento. Pero parece que la flexibilidad del sistema PCNA-DNA para poder acoplar gran diversidad de proteínas que actúan sobre el DNA debe acotarse para seleccionar cada una de ellas, y parece p15 una buena candidata a llevar a cabo esta función, pues con su cola N-ter controla la velocidad de deslizado de la pinza por el DNA y fija el DNA en la posición adecuada para que la replicación procesiva y la síntesis translesión tengan lugar, dictando el cambio entre Pol δ y Pol η .

3.3. Compendio de resultados y conclusiones

Se obtuvieron dos estructuras cristalográficas: 1) hPCNA, dúplex de pDNA de 10 pb y el fragmento p15(50-77) (PCNA-DNAp15⁵⁰⁻⁷⁷, PDB ID: 6EHT), y 2) hPCNA y el fragmento p15(41-72) (PCNA-p15⁴¹⁻⁷², PDB ID: 6GWS). La estructura PCNA-DNAp15⁵⁰⁻⁷⁷ muestra dos de los tres sitios de PCNA de unión a PIP-box ocupados por p15 con el DNA inclinado hacia la tercera subunidad libre de PCNA, en una posición similar a la que tiene en el modelo binario PCNA-dsDNA. Aunque se intentó la cristalización entre PCNA, p15(41-72) y pDNA, en la estructura PCNA-p15⁴¹⁻⁷² no aparece el DNA y tres moléculas de p15 ocupan sendos bolsillos para PIP-box en PCNA en conformación análoga a la de la estructura PCNA-DNAp15⁵⁰⁻⁷⁷, sugiriendo que p15 puede superar al DNA en la competición por la unión al borde interior del anillo de PCNA.

PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 6EHT) involucra a los mismos residuos en la cara interna de PCNA (de una subunidad y K80 de la contigua) que el complejo binario PCNA-DNA (PDB ID: 6GIS).

La interfaz de interacción del DNA en la cara interna de PCNA coincide con la de la cola N-ter de p15, pues si el DNA pretendiera colocarse en el complejo binario PCNA-p15⁴¹⁻⁷² (PDB ID: 6GWS), con tres fragmentos de p15 unidos a los bolsillos hidrofóbicos de unión a PIP-box de PCNA, chocarían.

Se caracterizó la interacción entre PCNA, p1550-77 y dsDNA por RMN, y se obtuvo una constante de disociación para la interacción entre PCNA y p1550-77 de ≈ 35 μM a 35 °C, del mismo orden que la obtenida previamente por calorimetría isotérmica.

Los residuos de PCNA con señales perturbadas en la titulación de PCNA con p15 son cuatro de los cinco residuos de la interfaz PCNA-DNA en la estructura cristalográfica p15⁵⁰⁻⁷⁷-PCNA-DNA. Los residuos de PCNA cuyas señales desaparecen (K77, K80 y H153) a concentraciones subestequiométricas de p15⁵⁰⁻⁷⁷ se superponen con los de la interfaz de interacción en la estructura cristalográfica de PCNA-DNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷. Los residuos cuyas señales se ven perturbadas significativamente (K217) se encuentran cerca del sitio de unión a PIP-box de PCNA. Este resultado es consistente con la existencia de solapamiento parcial entre los sitios de unión de p15 y DNA a PCNA vistos en el estudio cristalográfico, y sugiere que, en solución, p15 puede competir con la unión del DNA.

La comparación entre una titulación de PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ con dsDNA y una titulación de PCNA don dsDNA (y en ausencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷) indica que la presencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ aumenta la afinidad aparente del DNA por PCNA.

Los resultados de RMN muestran que la interacción entre PCNA y el DNA es débil y ocurre con residuos tanto del interior del canal del anillo, como de la cara frontal de PCNA que están en el sitio de unión a p15, pero que cuando p15 está unida a PCNA, tanto al bolsillo de unión a PIP-box como a la pared interna del anillo, el DNA no consigue desplazarla.

Todos estos datos revelan que el DNA puede pasar a través del anillo de PCNA junto a dos cadenas de p15, y que la estructura del segmento de p15 que interacciona con PCNA es invariante en ausencia y presencia de DNA.

Los estudios bioquímicos muestran que la polimerasa TLS Pol η sola puede completar el *baipás* de la lesión en la plantilla, pero la adición de un exceso de PCNA no afectó a su actividad.

Sin embargo, la adición de cantidades equimolares de PCNA y p15 redujeron su actividad, mostrando así el efecto inhibitor de p15 en Pol η , lo que ocurre incluso en presencia de RFC. Además, este efecto inhibitor de p15 no se debe a la interacción entre p15 y PCNA y no a la interacción entre p15 y Pol η .

Los estudios bioquímicos indican que un fragmento de p15 que abarca la región que interactúa con PCNA es suficiente para inhibir la actividad de Pol η en baipasear la lesión en el DNA, y la inhibición de la procesividad de Pol η en presencia de PCNA y p15 es debida a la formación de una holoenzima ternaria p15-PCNA-pol η defectuosa, deficiente en la síntesis del cebador tanto en plantillas dañadas como normales.

El análisis de componentes principales de la evolución de la posición del DNA dentro del anillo de PCNA en una simulación de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ muestra al DNA comenzando la simulación en una posición centrada en el canal del anillo y que se mueve rápidamente a una posición no centrada, acercándose inclinado a la subunidad de PCNA que han dejado libre los dos péptidos de p15, e interactuando simultáneamente, además de con la cara interna de PCNA, con residuos en la cara frontal y en la trasera.

Al igual que ocurría con los resultados de RMN, las interacciones entre el DNA y la subunidad no ocupada por p15 en PCNA en el complejo PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ coinciden con las observadas en la estructura cristalográfica del complejo PCNA-DNA (PDB ID: 6GIS, Capítulo 1). Estas interacciones se dan entre fosfatos consecutivos de una de las hebras del DNA y los residuos K77, K20, K217, R159 y K80 de la cara interna de PCNA. Luego en presencia de dos moléculas de p15, el DNA puede unirse a la superficie de deslizamiento que queda libre en PCNA y mantener su orientación gracias a las interacciones establecidas.

En análisis de los valores de RMSF de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ muestra que los residuos 52-61 del N-ternal de la PIP-box de p15 están anclados de manera estable a la pared interna del anillo de PCNA, mientras que los residuos 47-51 del N-ter permanecen más flexibles.

En nuestras simulaciones de dinámica molecular, el N-ter desordenado de los fragmentos de p15 estudiados (p15⁴⁷⁻⁷⁰) se asoma por la cara trasera de PCNA, una topología análoga a la propuesta para p15 completa unida a PCNA en ausencia de DNA^{292,538}.

Las cadenas laterales de residuos de la interfaz PCNA-DNA en las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ pueden aleatoriamente cambiarse entre fosfatos adyacentes del DNA en una escala de tiempo por debajo de los nanosegundos, por tanto las interacciones necesarias para que PCNA difunda en modo rueda dentada se mantienen en el sistema ternario.

El número limitado de contactos entre p15 y el DNA observados en nuestro análisis computacional sugiere que la IDP funciona principalmente como un obstáculo estérico pasivo restringiendo al DNA en el canal de la abrazadera. Dos moléculas de p15 se unen a PCNA y protegen residuos clave en su superficie deslizante, confinando el DNA a posiciones concretas.

Considerando las afinidades de las PIP-box por PCNA comparables, Pol η y p15 pueden coexistir en un homotrímero de PCNA; y la superposición de las estructuras PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ (PDB ID: 4D2G) y pol η -PCNA-DNA (PDB ID: 3JA9 y 3JAA⁵⁷⁵) apoyan esta hipótesis. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultado bioquímicos, que indican que la inhibición debe producirse por

la formación de una holoenzima defectuosa, debemos pensar que la disposición que adquiere Pol η en la holoenzima en presencia de p15 no es la adecuada para llevar a cabo su actividad.

4. Estabilización de la forma cerrada del anillo de PCNA por p15

Todas las pinzas deslizantes son estables en forma de anillo cerrado y, por lo tanto, deben cargarse activamente en las uniones cebador/plantilla del DNA, colocándolas exactamente en el lugar y posición correctas para una replicación procesiva. Este proceso se lleva a cabo mediante el cargador de la pinza RFC. Una vez en el DNA, la pinza se vuelve a sellar alrededor del DNA y el cargador de la pinza es expulsado. Cuando PCNA ya no es necesaria anclada en el DNA, el complejo RFC es el encargado de retirarla abriéndola y soltándola fuera de la doble hebra.

Pero la flexibilidad intrínseca de PCNA hace que tenga cierta predisposición a estar en estado abierto separando dos de sus subunidades a través de su interfaz. Esto, que favorece la apertura del anillo por parte de RFC para lograr el ensamblado alrededor del DNA, puede ser un problema para mantenerla cerrada en la unión cebador/plantilla.

La estabilidad de las interfaces entre subunidades de PCNA disminuye cuando esta se une al DNA después de ser cargada por RFC, y dicha estabilidad solo la ve recuperada cuando p15 se ancla por su dominio PIP-box a sus bolsillos hidrofóbicos, grapando así las subunidades de la pinza e impidiendo su salida prematura del complejo con el DNA.

Además de estabilizar la forma cerrada del anillo de PCNA, cuando p15 está anclada a su cara frontal impide que RFC se aproxime, se una a ella y la desenganche de la unión cebador/plantilla.

4.1. Apertura del anillo de PCNA por RFC

La estructura trimérica de PCNA se mantiene por la conexión cabeza-cola de los monómeros constituyentes a través de interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos localizados en la interfaz. Una configuración antiparalela de dos β -láminas de monómeros adyacentes, una desde Glu 109 hasta Lys 117 y la otra desde Leu 175 hasta Ser 183, produce una conexión interfacial estable a través de ocho enlaces de hidrógeno^{69,249} (Figura 84). Varias sustituciones de un único aminoácido en esta región afectan enormemente la estabilidad de la estructura trimérica y, algunas de ellas, también a la función de PCNA en su unión al DNA y en la estimulación de Pol δ ^{90,154,576,577}. Aún siendo la interacción entre caras de monómeros de PCNA muy estable y responsable del mantenimiento de la estructura del anillo, la conexión debe romperse temporalmente para trabajar como una abrazadera del DNA deslizante, pues debe abrirse temporalmente para pasar a través de la hélice de DNA y cargarse. Y ya que este problema topológico existe para todas las abrazaderas, todas comparten la característica de tener chaperonas asociadas específicas llamadas cargadores de abrazadera para colocarlas alrededor del DNA¹⁹⁵. El factor de replicación C (RFC) es la de PCNA y es funcionalmente análoga al complejo γ en *E. coli*¹⁹⁵.

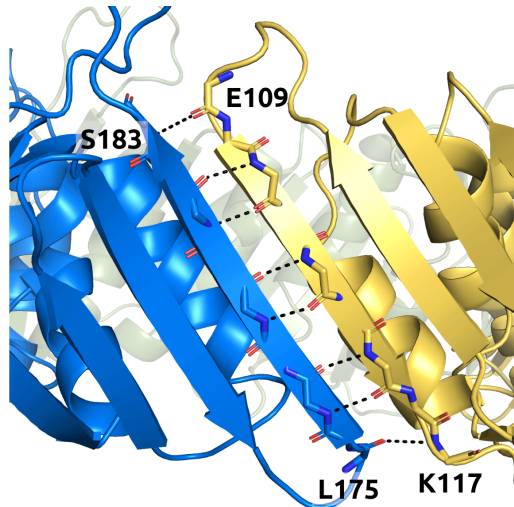


Figura 84: Detalle la interfaz entre subunidades de PCNA (PDB ID: 1VYM). Están etiquetados los residuos inicial y final de cada lámina β de la interfaz entre dos cualesquiera subunidades de PCNA, una representada en color azul y la otra en color amarillo. No se muestran las cadenas laterales de los residuos. Con líneas punteadas se indican los enlaces de hidrógeno que mantienen la estructura.

RFC reconoce el cebador del DNA y facilita la apertura del anillo de PCNA para cargarlo alrededor de la unión P/T^{94,95,578-581}, pero también es capaz de retirar la abrazadera del DNA tras el término de un fragmento de Okazaki y así reciclarla para reusarla en un nuevo cebador¹⁵³. Estas funciones de RFC como cargador y descargador de la pinza implican que establezca un contacto físico con PCNA.

RFC es un complejo proteico dependiente de ATP de cinco subunidades de la superfamilia AAA+ ATPasas. Las cinco subunidades se conocen como RFC-A, RFC-B, RFC-C, RFC-D y RFC-E y tienen tamaños similares de 36-41 kDa con la excepción de RFC-A, que tiene un peso molecular de 128 kDa⁵⁸². Cada una de ellas tiene un potencial sitio de unión a PCNA de secuencia primaria muy conservada, el ya conocido PIP-box⁵⁸³. Todas las subunidades de RFC constan de tres do-

minios homólogos. Los dominios I y II de cada subunidad comprenden el módulo AAA+ ATPasa siendo todas las subunidades capaces de unirse a ATP. El dominio III es el dominio de oligomerización y solo se ha observado en cargadores de pinzas⁷⁴. Además de estos tres dominios, RFC-A contiene más inserciones en las regiones N-ter y C-ter que explican su tamaño más grande en comparación con las otras subunidades. Estos insertos incluyen una extensión homóloga de la DNA ligasa en la región N-ter que no tiene actividad ligasa ni es importante para la carga de la pinza *in vitro*^{584,585}, y el dominio A0 que interactúa con el módulo AAA+ de RFC-E en la región C-ter⁵⁸⁶. El ensamblaje pentamérico general difiere de los complejos hexaméricos observados en otras ATPasas AAA+, pues hay una brecha entre RFC-A y RFC-E y se propone que se debe precisamente a la falta de la sexta subunidad⁵⁸⁴; sin embargo, la interacción del dominio A0 con RFC-E imita la presencia de la sexta subunidad⁵⁸⁶ (**Figura 2**).

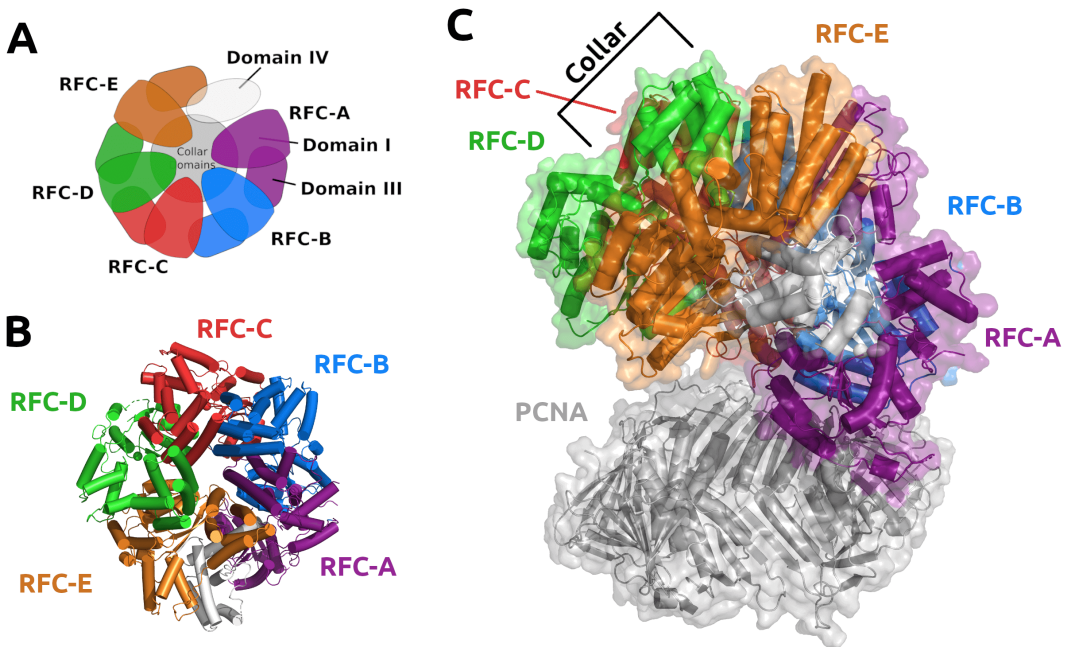


Figura 85: Descripción del cargador de la abrazadera eucariota RFC. A) Representación esquemática de RFC mostrando sus subunidades (RFC-A, RFC-B, RFC-C, RFC-D y RFC-E). B) Representación estereoscópica de RFC indicando en diferentes colores sus subunidades. C) Complejo PCNA-RFC (modelo de Bowman y colaboradoras/es⁷⁴) donde se muestran las diferentes subunidades de RFC en los mismos colores que en el esquema, y PCNA en color gris.

El grupo de O'Donnell confirmó la apertura del anillo de la subunidad β de *E. coli* durante su carga conducida por un cambio en la estructura de la proteína cargadora de la pinza, llamada, como ya sabemos, subunidad gamma, inducido por la unión de ATP⁸⁸⁻⁹⁰. De manera similar, RFC forma un complejo con PCNA y el modo de interacción cambia por la unión de ATP⁵⁸⁷ lo que le permite abrir el anillo⁵⁸⁸, indicando un mecanismo dependiente de este factor, el ATP, para transferir el DNA dentro de los agujeros centrales de las abrazaderas. Si la hidrólisis de ATP ocurre, se produce el enganche en el DNA y las interacciones entre RFC y PCNA se debilitan e interrumpen. A través de estos ciclos, múltiples moléculas de PCNA pueden ser cargadas en el DNA por una única molécula de RFC.

Los principales sitios de interacción de RFC con la pinza son el bucle localizado en el centro del monómero de PCNA (de Asp 41 a His 44) y la cola C-ter (de Lys 254 a Glu 256), ambos en la cara frontal de PCNA^{55,95,589}, así que RFC y PCNA se unen cara a cara estableciendo múltiples contactos y así, cuando PCNA es cargada, se orienta hacia el extremo 3' de la cadena de DNA sintetizada¹¹⁷.

La presencia en PCNA de sitios comunes para RFC y Pol δ sugiere un modelo en el que sitios funcionalmente importantes serán transferidos desde RFC a Pol δ durante la carga de esta polimerasa¹⁴⁶. Pol δ debe invadir los bucles centrales para formar un complejo funcional con PCNA, así que RFC debe ser ligeramente desplazada. Es sabido que la hidrólisis de ATP por RFC es esencial para empezar la síntesis de DNA por Pol δ ^{139,195}, lo que sugiere un segundo cambio estructural, el cual es inducido por la hidrólisis de ATP para dejar el bucle(s) central libre para Pol δ ¹⁴⁶. Además, la habilidad de RFC para unir específicamente el final 3' del cebador de DNA permite a PCNA, como hemos señalado, ser cargada en el DNA directamente en la orientación de su alargamiento^{120,590}. Después Pol δ se carga en el DNA interaccionando con PCNA en la misma cara que RFC y por desplazamiento del sitio común. Como un mecanismo para bloquear una descarga no programada de PCNA durante la síntesis de DNA, la interacción de Pol δ con el bucle central de PCNA inhibirá el acceso de RFC a la pinza y, por tanto, el solapamiento de los sitios de interacción comunes es un segundo rol del complejo Pol δ durante la síntesis de DNA¹⁴⁶.

Después de completar su tarea como factor de procesividad de Pol δ , PCNA será soltada del DNA por acción de RFC a través de la hidrólisis de ATP como reacción inversa a la de carga^{152,153}.

Las imágenes de microscopía electrónica de Tomoko Miyata y colaboradoras/es muestran dos características: en primer lugar, se observa claramente la hélice de DNA entrando en el cargador de la abrazadera y atravesando el centro de PCNA y, en segundo lugar, la abrazadera está abierta y se asemeja a una arandela^{591,592} (Figura 86A). Y las simulaciones de dinámica molecular de Steven L. Kazmirski de PCNA sugieren que la mayor parte de la flexibilidad ocurre en las interfaces intermoleculares y muestran que, una vez abierta, la pinza tiende a moverse hacia la conformación de arandela elástica similar a la observada por microscopía electrónica⁵⁹³ (Figura 86B).

En las simulaciones de Kazmirski y colaboradoras/es, la flexibilidad de PCNA apareció principalmente en las interfaces de subunidades más que en las interfaces de dominio, que son mucho más pequeñas⁵⁹³. Quizás más sorprendente fue que en siete de las nueve simulaciones, los movimientos fuera del plano tendían hacia una hélice a derechas. Este es un resultado notable que sugiere que la abrazadera ha evolucionado para cooperar en el proceso de carga en el DNA⁵⁹³. El cargador de la abrazadera en presencia de ATP se une a la abrazadera e interrumpe una de las interfaces entre las subunidades de la abrazadera, lo que hace que esta se abra en una hélice a derechas, que luego se estabiliza aún más mediante la unión al cargador de la pinza. En ese punto, la abrazadera abierta se puede cargar en el DNA, después de un mayor ensanchamiento (al menos más allá de los 5 Å que se observaron en la estructura de microscopía electrónica⁵⁹²) para permitir la entrada de DNA bicatenario (la unión P/T), o posiblemente permitiendo que entre solo la porción de DNA monocatenario⁵⁹³.

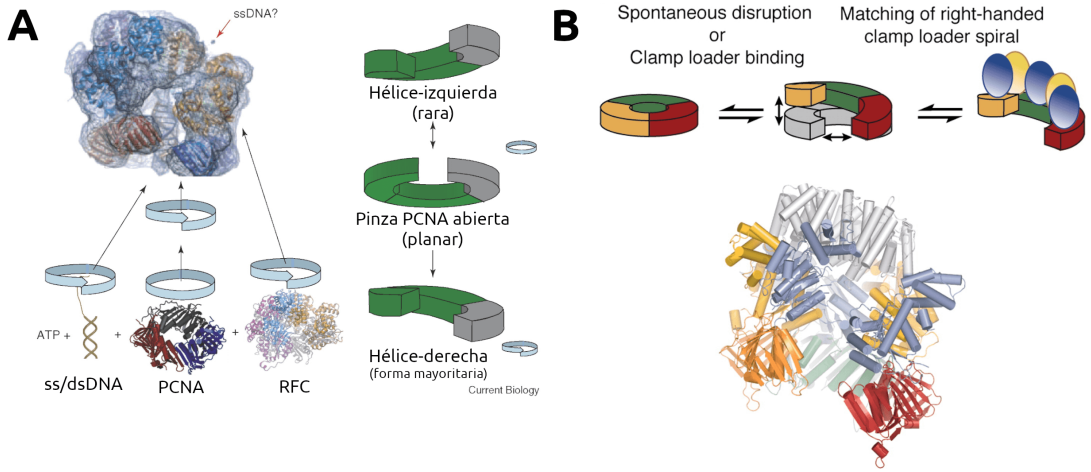


Figura 86: (A) Estructura de microscopía electrónica del complejo RFC-DNA-DNA con la pinza PCNA abierta y pDNA de Miyata y colaboradoras/es⁵⁹¹. Debajo se muestran los componentes del complejo por separado y en el estado no unido del complejo; las flechas indican que todos son helicoidales a derechas excepto PCNA, que sí la tiene en el complejo. Sin embargo, las simulaciones de dinámica molecular sugieren que la pinza PCNA también adopta una conformación helicoidal derecha cuando se abre. A la izquierda se muestra una ilustración esquemática de las simulaciones de dinámica molecular de Kazmirski y colaboradoras/es de PCNA dimérica con la tercera subunidad «sombra» (pues fue eliminada para correr las dinámicas⁵⁹³) mostrada en gris. La mayoría de las simulaciones de dinámica molecular mostraron una transición de hélice plana a derecha⁵⁹³. Figura reproducida de Barsky & Venclovas 2005⁵⁹². (B) En solución PCNA se encuentra normalmente como anillo cerrado. Ya sea de forma espontánea o mediante su interacción inicial con RFC, la pinza se abre. Cuando la estructura de la simulación se superpone a la estructura cristalina del complejo RFC-PCNA, la espiral a derechas de PCNA sigue la espiral de RFC permitiendo el contacto entre las tres subunidades de PCNA y las cinco de RFC. Figura reproducida de Kazmirski 2005⁵⁹³, Copyright (2007) National Academy of Sciences.

Los resultados de Kazmirski sugieren que la estructura de PCNA oscila espontáneamente entre conformaciones planas y no planas, con una marcada tendencia a las distorsiones espirales derechas, y que, una vez que se rompe una interfaz intermolecular en PCNA, ya sea de forma espontánea o por intervención del cargador de la pinza, la molécula de PCNA puede adoptar una conformación espiral derecha que se uniría con RFC⁵⁹³. Según otros resultados de simulaciones de DM, los de Tainer y colaboradoras/es, la unión del anillo de PCNA en conformación abierta a las cinco subunidades de RFC transforma el panorama de energía libre de la transición de estado cerrado a estado abierto, atrapando a PCNA en una conformación abierta⁵⁹⁴. La comparación de los perfiles de energía libre para la apertura de la abrazadera en presencia y ausencia de RFC permitió corroborar el papel de RFC en la etapa inicial del ciclo de carga de la PCNA. RFC no desestabiliza de manera apreciable el estado cerrado de PCNA, sino que estabiliza selectivamente la conformación abierta de la pinza⁵⁹⁴.

El ciclo de carga de la pinza implica la asociación inicial de PCNA con RFC^{74,595}, perteneciente, como hemos dicho, a la familia de ATPasas AAA+.⁵⁹⁶ y la unión de ATP por las subunidades de RFC promueve la interrupción de una de las interfaces entre subunidades de la pinza. El enhebrado del ácido nucleico a través de la brecha resultante en PCNA y su posterior interacción con RFC desencadena la hidrólisis de ATP junto con cambios conformacionales en las subunidades del cargador. Estos cambios, a su vez, disminuyen la afinidad de unión de las sub-

unidades de RFC por la superficie externa de PCNA y conducen al cierre eventual de la abrazadera alrededor del DNA y la expulsión del cargador de la abrazadera⁵⁹⁴.

Para cumplir con sus variadas funciones en la horquilla de replicación, las abrazaderas deslizantes deben alcanzar un delicado equilibrio entre la estabilidad y la capacidad de abrirse para cargarse en la unión P/T del DNA. El cargador de la pinza puede usar dos estrategias para facilitar la apertura de PCNA: la desestabilización energética del estado cerrado de la pinza o la estabilización del estado abierto.

Como comenzamos diciendo, la interfaz entre subunidades de PCNA se compone de dos cadenas β antiparalelas que forman parte de la cubierta externa de la abrazadera (ver Figura 84 en la página 217). La presencia de enlaces de hidrógeno y una considerable superficie hidrofóbica enterrada entre estas dos cadenas beta implica que la interrupción de la interfaz de la subunidad es un proceso activado⁵⁹⁴. Varios factores promueven la apertura fuera del plano de PCNA en presencia de RFC. Primero, las láminas β que forman la superficie exterior de la abrazadera poseen una tendencia intrínseca a flexionarse hacia una conformación helicoidal derecha, que coincide con la disposición en espiral de los módulos AAA+ en la forma unida al ATP del cargador de abrazaderas⁵⁹⁴. En segundo lugar, la arquitectura altamente simétrica y modular del cargador de pinzas es compatible con la pseudosimetría de orden seis de la pinza. Y por último, la complementariedad electrostática significativa entre la abrazadera deslizante y el cargador de la abrazadera. Luego todos los módulos AAA+ de RFC se acoplan a PCNA en estado abierto y, además de los factores estructurales, el movimiento fuera del plano del anillo de la abrazadera parece estar guiado por una electrostática favorable⁵⁹⁴.

Tainer y colaboradoras/es llegaron a la conclusión de que el papel del cargador de la abrazadera en la apertura de PCNA es estabilizar selectivamente la conformación de anillo abierto. La asociación de los módulos AAA+ de RFC con la superficie externa de la abrazadera deslizante abierta modifica el paisaje de energía libre subyacente a la transición de estado cerrado a abierto y crea un mínimo estable de energía libre para la conformación de PCNA en anillo abierto⁵⁹⁴. Así, los contactos residuales perdidos en la interrupción de la interfaz de la subunidad PCNA son compensados por contactos recién formados con RFC. Además de la estabilización termodinámica del estado abierto, la unión de RFC aumenta la barrera para la transición inversa en ≈ 9 kcal/mol (Figura 87), y disminuir la velocidad de cierre asegura que la pinza permanezca abierta el tiempo suficiente para permitir que el DNA pase a través de la abertura entre las subunidades PCNA⁵⁹⁴.

En la Figura 87 se muestra una representación esquemática del modelo propuesto por Tainer para el papel de RFC en la transición de apertura de la abrazadera, y es el siguiente⁵⁹⁴: (i) la unión de ATP a RFC bloquea el cargador de abrazadera en una conformación que es estructural y electrostáticamente compatible con la forma de anillo abierto de la abrazadera; (ii) después de una interrupción transitoria de la interfaz entre dos subunidades de PCNA, las interacciones con los módulos AAA+ de RFC se optimizan comenzando con la subunidad C y avanzando a través de las subunidades D y E; (iii) la unión a las subunidades D y E es necesaria para abrir PCNA; (iv) la asociación de PCNA con RFC da como resultado una conformación fuera del plano del anillo de PCNA; (v) una interfaz complementaria a PCNA abierta transforma el paisaje de energía libre subyacente a la transición de estado cerrado a abierto, atrapando efectivamente a PCNA en una conformación abierta; (vi) la estabilidad del estado anillo abierto en presencia de RFC es comparable o mayor que la del estado cerrado; (vii) el estado abierto está cinéticamente estabilizado por una barrera para volverse a cerrar de ≈ 9 kcal/mol.

Los estudios computacionales de Adelman y colaboradoras/es, donde combinan el uso de trayectorias de dinámica molecular largas y múltiples réplicas permitiendo un muestreo más exhaustivo de la flexibilidad conformacional, van en esta misma dirección, pues indican que PCNA se comporta como un material elástico simple y, una vez abierta, RFC debe dirigir las transiciones conformacionales necesarias para cargarla en el DNA⁵⁹⁷.

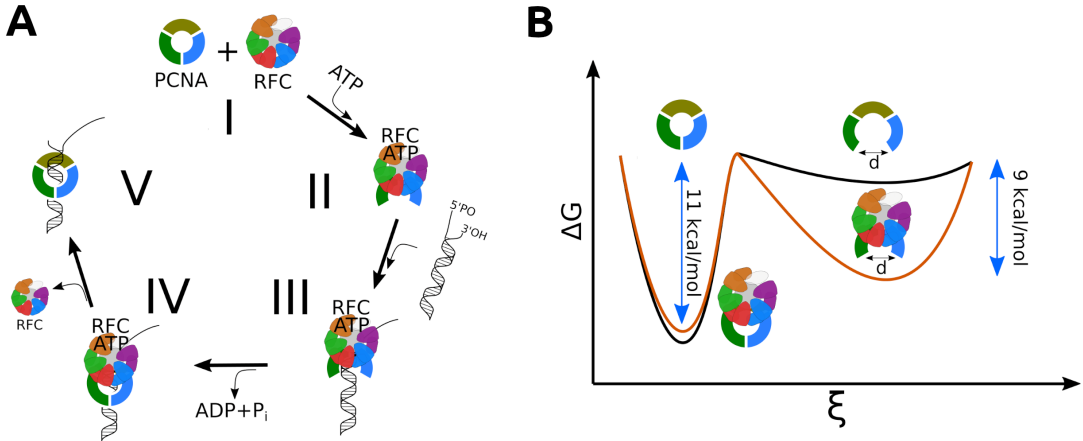


Figura 87: A) Representación esquemática del ciclo de carga de PCNA en el DNA por acción de RFC propuesto por Tainer y colaboradoras/es⁵⁹⁴. B) Representación esquemática del paisaje de energía libre para la apertura de PCNA por RFC propuesto por Tainer y colaboradoras/es⁵⁹⁴ cuyo análisis revela que RFC no desestabiliza de manera apreciable el estado cerrado de PCNA y que la función de RFC depende más bien de la estabilización selectiva de la conformación abierta de la pinza.

Sus simulaciones sugieren que la flexibilidad de PCNA parece suficiente para que se modele en la espiral derecha que acopla bien con RFC una vez que se ha producido un evento de apertura del anillo, aunque PCNA no tiene una fuerte preferencia para adoptar transitoriamente conformaciones de una mano (a derecha o izquierda) en particular⁵⁹⁷. PCNA parece comportarse de manera consistente con un material elástico que sufre deformaciones estocásticas impulsadas por las fuerzas brownianas del disolvente, lo que sugiere un papel mínimo para las interacciones de largo alcance u otros elementos estructurales dentro de PCNA que lo atraparían en conformaciones metaestables para tiempos largos⁵⁹⁷.

Para la actuación de RFC sobre PCNA se requiere la unión de ATP pero no su hidrólisis⁵⁹⁸⁻⁶⁰². La unión de ATP a las subunidades RFC-C, RFC-D y RFC-B, y por este orden⁵⁹⁹, da como resultado unos cambios conformacionales de modo que los módulos AAA+ comienzan a adoptar forma de espiral hacia la derecha, seguida de unión a PCNA. Este contacto con PCNA está mediado por los motivos de la caja PIP de las subunidades A, B y C de RFC, formando RFC-A la asociación más estrecha⁷⁴. El resultado neto de todos los cambios conformacionales es la apertura de PCNA en una interfaz⁵⁸⁵. Pero, en lugar de RFC mediar activamente la apertura de PCNA, RFC unido a ATP es competente para unirse a PCNA y tiene las superficies apropiadas para estabilizar favorablemente a PCNA en el estado abierto en lugar del anillo cerrado.

Una vez abierta, PCNA adopta una conformación en espiral a la derecha⁵⁹³ que coincide con la conformación en espiral del N-terminal del RFC unido a ATP, pero la apertura de la pinza y el cargador de pinza entre RFC-A y RFC-E no es lo suficientemente ancha para acomodar el dsDNA como es evidente en el modelo de microscopía electrónica de la estructura RFC/PCNA de *P. fu-*

*rius*⁵⁹¹ y en la estructura cristalina del cargador de abrazadera T4 unido a una abrazadera abierta^{76,586}. En consecuencia, se ha sugerido que la interacción de RFC/PCNA con el cebador-plantilla puede involucrar inicialmente solo la hebra de plantilla libre, lo que está respaldado por la observación de que RFC se une al ssDNA con alta afinidad⁶⁰³. Los cambios conformacionales que se producen después de esta interacción macromolecular ternaria (RFC-PCNA-ss-DNA) acelerarían la apertura de la brecha de manera que permitiera la entrada de la porción dúplex del cebador-plantilla. De manera alternativa, RFC/PCNA podría unirse inicialmente al ss-DNA y parte del dsDNA en la unión cebador-plantilla, lo que alinea la posición del DNA para entrar en la cámara que forman RFC/PCNA desde el lado de PCNA⁵⁸⁵. El movimiento ascendente del DNA sería similar al de un tornillo⁵⁸⁵.

Tras la unión del cebador-plantilla al complejo RFC/PCNA/ATP, tres moléculas de ATP se hidrolizan rápidamente⁵⁹⁸⁻⁶⁰⁰, con RFC-D iniciando el proceso y actuando como un desencadenante de la hidrólisis de ATP en los otros sitios activos en las otras subunidades de RFC⁵⁹⁹. Como consecuencia, RFC pierde su conformación en espiral y asume de nuevo el estado enlazado a ATP lo que debilita las interacciones macromoleculares y, en consecuencia, provoca la eventual liberación del complejo PCNA/cebador-plantilla⁵⁸⁵. Dado que RFC-A hace el contacto más extenso con PCNA, la hidrólisis de ATP en este sitio podría acelerar el cierre de PCNA y la liberación del complejo PCNA/cebador-plantilla⁵⁹⁹.

Dada la estabilidad de PCNA como un anillo cerrado^{153,604} es muy posible que RFC simplemente libere PCNA y que PCNA, una vez liberada de las limitaciones impuestas por el cargador de la abrazadera, se cierre rápidamente alrededor del pDNA⁵⁸⁵. En este tipo de mecanismo, las interacciones entre los residuos de aminoácidos cargados positivamente que recubren el centro de la pinza y los fosfatos de DNA cargados negativamente podrían estabilizar el PCNA en el DNA para evitar la disociación de PCNA antes del cierre^{70,161,270}. Sin embargo, este mecanismo deja abierta la posibilidad de que PCNA pueda disociarse del DNA antes de cerrarse. Para determinar si PCNA se cierra rápidamente después de la disociación de RFC, o si PCNA se cierra alrededor del DNA antes de disociarse de RFC, Marzahn y colaboradoras/es midieron las tasas de cierre y liberación de PCNA y los experimentos mostraron que PCNA se cierra alrededor del DNA más rápido que PCNA se disocia del RFC. Por lo tanto, el cargador de pinzas no deja abierta la posibilidad de que una pinza abierta se disocie del DNA antes de que se cierre⁶⁰⁵.

4.2. Estudio de la estabilización de las interfaces entre subunidades del anillo de PCNA

Tal y como acabamos de comentar al finalizar el apartado anterior, los experimentos de Marzahn y colaboradoras/es concluyeron que PCNA se cierra alrededor del DNA más rápido que se disocia de RFC, luego RFC no deja abierta la posibilidad de que una pinza abierta se disocie del DNA antes de cerrarse⁶⁰⁵.

Según los resultados de los estudios de dinámica molecular de anillos de PCNA, parece que la pinza tiene cierta tendencia a abrirse en disolución, y esto, sin duda, deber ser importante para poder ser cargada en el DNA. Pero para mantenerse cerrada durante la replicación, esta tendencia a abrirse que tiene en estado libre debe desaparecer.

¿Es PCNA más estable anclada en el DNA que en disolución debido a las interacciones que establecen, o acaso hay algún componente del replisoma interviniendo para que esto sea así?

Cuando PCNA está cargada en el DNA siendo el centro de la maquinaria del replisoma, Pol δ permanece anclada a ella para poder llevar adelante una replicación procesiva y, para que esto sea así, p15 la acompaña. Es interesante pensar en una manera de estabilización de la forma cerrada del anillo para asegurarse el replisoma que PCNA no se abre, escapa y paraliza la maquinaria en la que p15 tenga algo que ver.

4.2.1. Parámetro de estabilidad

Si la pregunta es si p15 tiene algo que ver con la estabilización de la forma cerrada de PCNA cuando está llevando a cabo su función anclada en el DNA, necesitaremos explorar la estabilidad del sistema PCNA-DNA en presencia y en ausencia de p15. Precisamos, pues, un parámetro que podamos obtener de las simulaciones de dinámica molecular y que nos sugiera estabilidad.

Las proteínas globulares tienen una amplia variedad de movimientos internos. Estos movimientos van desde deformaciones elásticas irregulares de toda la proteína impulsadas por colisiones con moléculas de solvente hasta vibraciones caóticas de grupos impulsadas por colisiones aleatorias con átomos vecinos en la proteína⁶⁰⁶. Los movimientos internos han sido investigados por una variedad de métodos experimentales como análisis de difracción de rayos X⁶⁰⁷, mediciones de Mössbauer⁶⁰⁸, RMN y simulaciones de DM⁶⁰⁹⁻⁶¹¹.

El conocimiento de los movimientos internos de las proteínas es fundamental para la comprensión de las funciones biológicas a nivel molecular. Yuan y colaboradoras/es, en su trabajo sobre cristalografía y la flexibilidad de centros catalíticos de proteínas⁶¹², dividen los movimientos intramoleculares en los cristales en tres grandes categorías en términos de su amplitud, energía y escala de tiempo. La primera categoría contiene fluctuaciones atómicas, como vibraciones. Estos movimientos son aleatorios, muy rápidos y rara vez cubren más de 0,5 Å; la escala de tiempo de estos movimientos es del orden de picosegundos o menos⁶¹². La segunda categoría contiene movimientos colectivos, como los movimientos de grupos de átomos que están unidos covalentemente de tal manera que el grupo se mueve como una unidad. Los grupos de átomos que interactúan de forma no covalente también pueden moverse colectivamente; la escala de tiempo de estos movimientos varía de picosegundos a milisegundos⁶¹². La tercera categoría contiene movimientos que pueden describirse como cambios conformacionales desencadenados. Estos son los movimientos de grupos de átomos o secciones completas de una proteína que ocurren como respuesta a un estímulo específico; la distancia recorrida puede ser de

hasta 10 Å o más⁶¹². Las categorías uno y dos definen los movimientos atómicos que, ya sean individuales o correlacionados, implican excursiones aleatorias sobre la conformación de equilibrio⁶¹². Tanto las fluctuaciones atómicas como los movimientos colectivos rápidos pueden resultar en una dispersión de la densidad de electrones en un rango del espacio y, por lo tanto, contribuirán al factor de temperatura^{607,613}.

Así que, si estamos buscando un parámetro que apunte a la estabilidad de un sistema y asumimos que una mayor dispersión de la densidad electrónica de los átomos es sinónimo de menor estabilidad, quizás este factor de temperatura sea lo que estamos buscando.

Factores de temperatura

La cristalografía de rayos X es el método experimental más utilizado para la determinación de estructuras biomoleculares, con más del 85% de las estructuras actualmente depositadas en el banco de datos de proteínas RCSB PDB⁶¹⁴⁻⁶¹⁶ que se han resuelto de esta manera. Sin embargo, mientras que la precisión de las coordenadas de estas estructuras de rayos X alcanza de forma rutinaria niveles por debajo de los 2-3 ángstrom, los experimentos cristalográficos no pueden sondear directamente la dinámica de las biomoléculas y capturan su heterogeneidad estructural sólo indirectamente^{617,618}. Como los observables cristalográficos son promedios tanto en el tiempo como en el espacio, las estructuras de rayos X generalmente dan solo una vista promedio estática de los conjuntos dinámicos y estructuralmente heterogéneos contenidos en los cristales^{617,618}.

Por otro lado, la necesidad de estudiar la dinámica y la heterogeneidad estructural e incorporarlas a nuestra comprensión de la función biomolecular es fundamental y ha sido reconocida desde hace mucho tiempo⁶¹⁹⁻⁶²¹. Además, la dinámica influye directamente en el proceso mismo de determinación de la estructura, ya que los promedios estructurales derivados de diversos conjuntos pueden exhibir ciertas características que no son necesariamente representativas de la verdadera realidad microscópica y son un artefacto directo de promediar^{618,622-624}. Si bien estos efectos han sido bien estudiados en el área de la RMN y otros métodos espectroscópicos, todavía están en gran parte poco explorados cuando se trata de experimentos de dispersión de Rayos X (con algunas excepciones^{618,622,623,625-627}).

La forma principal de obtener y analizar la dinámica microscópica y la heterogeneidad de las biomoléculas en cristalografía de rayos X es a través de factores B (o factores de temperatura o factores de Debye-Waller) isotrópicos y anisotrópicos^{628,629}. Idealmente, los factores B¹ capturan la atenuación de la dispersión de rayos X debido al movimiento térmico y pueden relacionarse cuantitativamente con las variaciones de las distribuciones posicionales atómicas.

Se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones que van desde la evaluación de la dinámica de las proteínas^{630,631,631,632} y la predicción de su flexibilidad^{633,634} y estabilidad térmica⁶³⁵⁻⁶³⁷, el cálculo de la entropía⁶³⁸ y la comparación con otras estimaciones y medidas de dinámica de proteínas (por ejemplo, fluctuaciones de modelos de redes elásticas^{639,640}, RMN⁶⁴¹ y simulaciones de dinámica molecular^{625,632,642}), el análisis de sitios activos y bolsillos de unión^{612,643,644}, la correlación entre la movilidad de las cadenas laterales y la conformación^{645,646}, hasta la predicción y análisis de regiones desordenadas de proteínas⁶⁴⁷.

1 Aunque hasta ahora en esta tesis hemos utilizado el término «factores de temperatura», en este apartado emplearemos, simplemente por comodidad, «factores B».

Es importante destacar que los factores B no informan únicamente sobre las fluctuaciones de los átomos, sino también sobre otros factores como defectos de la red cristalina⁶⁴⁸, contactos de empaquetamiento en los cristales⁶⁴⁹, movimientos de cuerpos rígidos, niveles de ocupación o artefactos de refinamiento⁶⁵⁰⁻⁶⁵². Por todo esto, es común emplear los factores B para distinguir las partes móviles de las rígidas en las estructuras de rayos X y, en el caso ideal, se toman como una medida cuantitativamente precisa de las fluctuaciones posicionales de los átomos⁶⁵³.

El factor B es una medida para capturar el movimiento vibratorio atómico. Mide y cuantifica la incertidumbre/movilidad de un átomo en estructuras dinámicas de proteínas 3D, es decir, el desplazamiento de las posiciones atómicas de su posición media. El factor B es un indicador del movimiento vibratorio relativo o del desorden de un átomo en un cristal de proteína. Se calcula usando:

$$B^i = 8 \pi^2 U_i^2$$

donde U_i^2 es el desplazamiento cuadrático medio del átomo i ⁶⁵⁴. El factor B aumenta a medida que aumenta U_i^2 . Un factor B bajo implica que el átomo está en las partes bien ordenadas de la estructura, mientras que un factor B grande generalmente sugiere una flexibilidad muy alta de este átomo. La flexibilidad de las proteínas está estrechamente relacionada con funciones de las proteínas como la catálisis y la alosteria⁶⁵⁵. Los átomos profundamente enterrados en el núcleo de la proteína suelen ser rígidos con un factor B bajo⁶⁵⁶, y los residuos interfaciales en el complejo de unión a proteínas también tienen factores B más bajos en comparación con el resto de la superficie estructural terciaria⁶¹².

Las estructuras de biomoléculas de rayos X generalmente proporcionan una vista estática, promediada en el tiempo y en el conjunto de las moléculas de los cristales, y son estos factores B los que revelan las fluctuaciones de los átomos sobre su posición promedio reflejando con precisión la heterogeneidad estructural de tales conjuntos moleculares. En definitiva, los factores B representan la dispersión de las densidades de electrones atómicos alrededor de sus posiciones de equilibrio debido al movimiento térmico y al desorden posicional, y la distribución de sus valores a lo largo de la secuencia de una proteína se considera un indicador importante de su estructura reflejando su flexibilidad y dinámica⁶⁵⁵. Podemos, pues, utilizar estos factores de estructura promedio derivados de una simulación de dinámica molecular y analizarlos para hacernos una idea de la heterogeneidad del sistema y, por tanto, de su estabilidad⁶³⁵ y movilidad⁶⁵³.

Desviación cuadrática media posicional (RMSD)

La desviación cuadrada media de las posiciones atómicas (conocida como RMSD por sus siglas de su nombre en inglés, *root-mean-square deviation*) es una herramienta estándar para comparar la similitud de dos estructuras moleculares. Dado dos conjuntos de puntos cartesianos, como pueden ser nuestra molécula de interés en dos estados diferentes, la RMSD nos proporciona la desviación media de los puntos de un conjunto respecto a los del otro conjunto, es decir, la desviación de un estado de la molécula respecto al otro estado. La ecuación para la RMSD

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

donde δ_i es la distancia entre el átomo i en los dos estados (normalmente la RMSD se expresa en ángstrom, Å), muestra la comparación entre los dos conjuntos de puntos de los que hablamos. En un caso práctico, estos dos conjuntos podrían ser los átomos C α de una proteína en dos estados diferentes, y entonces la RMSD nos daría una medida de cuan diferentes son los esqueletos moleculares de las dos estructuras. Pero también podríamos mirar el valor de RMSD de un residuo en dos estados diferentes para determinar la variación de su cadena lateral, para estudiar el sitio activo de una enzima, o para excluir elementos altamente variables como bucles o átomos de hidrógeno. Sin embargo, la RMSD no nos indica qué regiones del conjunto difieren más entre sí, sino que únicamente nos da un valor global para todo el conjunto. Elegir los conjuntos que queremos comparar depende de la cuestión biológica que queramos resolver. De manera consistente, antes de cada cálculo de RMSD, las coordenadas de los dos conjuntos de puntos se superponen intentando que la media de la distancia entre puntos homólogos sea mínima para así eliminar artefactos derivados de la traslación espacial de la molécula. La RMSD es, por tanto, el valor del mínimo cuadrado del alineamiento^{657,658}.

Desde una perspectiva histórica, la desviación cuadrada media posicional del átomo fue desarrollada como una métrica para la comparación estructural por cristalógrafas y cristalógrafos⁶⁵⁹ y quizás sea la medida más utilizada para la comparación de estructuras en Biología estructural⁶⁴⁷. Con el crecimiento de la simulación biomolecular, la RMSD se ha convertido en una herramienta estándar para caracterizar conjuntos conformacionales⁶⁶⁰, delimitar grupos de conformaciones relacionadas⁶⁶¹, definir paisajes de energía libre⁶⁶², seguir cambios estructurales del plegamiento y la dinámica de proteínas^{317,663-668}, evaluar la calidad de los algoritmos de predicción de estructuras⁶⁶⁹⁻⁶⁷² o comparar la diversidad de estructuras modelo derivadas de experimentos^{673,674}.

Es habitual analizar la diversidad estructural de un conjunto de estructuras biomoleculares obtenidas a través de simulaciones de DM mediante el cálculo de una distribución de todos contra todos de los valores de RMSD (RMSD por pares)^{660,675}. Este cálculo también se lleva a cabo comúnmente en RMN para evaluar la similitud entre las estructuras de energía más baja en un conjunto producido por el proceso de refinamiento⁶⁷⁶⁻⁶⁷⁸. La distribución de valores de RMSD por pares resultante captura el grado de heterogeneidad estructural de un conjunto dado que puede deberse a la flexibilidad intrínseca de una estructura dada o las incertidumbres del procedimiento de refinamiento. Las propiedades de esta distribución, que se calculan típicamente para los átomos del esqueleto de la proteína, a menudo se resumen dando su media aritmética. Aunque los cálculos de los valores de RMSD por pares pueden ser computacionalmente exigentes para conjuntos grandes, también se utilizan con frecuencia como una medida apropiada para la agrupación de estructuras en conjuntos de similitud (habitualmente conocidos por su denominación en inglés *clustering*)^{667,679-681}.

En Biología estructural computacional, la RMSD se puede calcular sobre todos los átomos de una conformación o un subconjunto, ya sea para enfocar la comparación en una región de interés como por ejemplo un sitio activo de una enzima o sea para excluir elementos altamente variables como bucles o átomos de hidrógeno. Los valores de RMSD a menudo se calculan utilizando solo un átomo por residuo de aminoácido, generalmente el carbono α , para capturar los cambios conformacionales globales en las proteínas. El ajuste de mínimos cuadrados empleado para eliminar los efectos de la traslación y rotación globales, minimiza las diferencias entre las dos estructuras^{657,658}.

Finalmente, en los estudios de simulaciones de dinámica molecular se analizan los valores de RMSD a lo largo de las trayectorias como medida de estabilidad del sistema por comparación de cada marco con el marco inicial. Esto es, se estudia el perfil de RMSD para visualizar cómo a partir de una estructura inicial, independientemente de su estabilidad, el sistema a estudio llega a convergencia, es decir, cómo los valores de RMSD se alejan rápidamente de un valor inicial cero para, en algún momento en la dinámica, fluctuar y mantenerse estable alrededor de un valor (normalmente diferente del inicial). Solemos interpretar que, en ese momento, la dinámica ha logrado el equilibrio y ya no se observarán cambios estructurales relevantes, sino solamente fluctuaciones locales de los átomos. Claro está, esto depende siempre del sistema que estemos observando y la cuestión a estudio. Ocurre a veces que los valores de RMSD aumentan continuamente; en estos casos, la comunidad científica del campo suele decir coloquialmente que la «dinámica ha explotado», y lo que indica es que nuestra estructura se ha desecho durante la dinámica y perdido todo su valor biológico; algún error ha ocurrido y toca empezar de nuevo.

Por lo tanto, la distribución de los valores RMSD por pares proporciona información sobre la similitud entre los miembros de un conjunto en dos estados diferentes. Sin embargo, para obtener información sobre la flexibilidad estructural, la estabilidad térmica y la heterogeneidad de las macromoléculas en un intervalo de tiempo, a menudo lo que se estudian son las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF por las sigla en inglés de *root-mean-square fluctuation*)⁶⁸²⁻⁶⁸⁴.

Fluctuación de la desviación cuadrática media posicional (RMSF)

A diferencia de RMSD, la fluctuación cuadrática media (RMSF) es un parámetro extraído de la variabilidad estructural a lo largo del tiempo y denota la fluctuación de una posición atómica sobre su valor promedio⁶⁸⁵. Mientras que la RMSD es un valor que refleja la diferencia posicional entre dos conjuntos de partículas, la RMSF proporciona un valor para cada una de las partículas del conjunto y revela la desviación estándar de los movimientos de cada partícula relativamente a su media posicional observada para un intervalo de tiempo. En otras palabras, RMSF indica su fluctuación o amplitud de movimiento (en un intervalo). Como podemos ver, las ecuaciones de RMSF y de la desviación estándar son equivalentes:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |\mathbf{r}_i(t_j) - \mathbf{r}_i^{ref}|^2}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{N}}$$

Un ejemplo práctico sería calcular las RMSF para los carbonos α de una proteína a lo largo de toda una trayectoria para identificar qué regiones son más flexibles, móviles o inestables. De este modo, cuánto más elevado es el valor de RMSF para un átomo, más se mueve este en el intervalo de tiempo observado; análogamente, cuánto más bajo es el valor de RMSF, más estable es la partícula que observamos.

Por otra parte, Kuzmanic y Zagrovic demostraron que las RMSF se pueden obtener a partir de los factores B usando la ecuación⁶⁴⁷:

$$RMSF_i^2 = \frac{3 B_i}{8 \pi^2}$$

donde los factores B generalmente se definen, como hemos visto, como una medida de las fluctuaciones espaciales de los átomos alrededor de su posición promedio y donde su movimiento se describe como una distribución gaussiana isotrópica de los desplazamientos alrededor de esa posición promedio⁶⁸⁶.

Y ya que los valores de las RMSD, RMSF o los factores B se utilizan muy habitualmente para proporcionar información sobre diferentes aspectos de los conjuntos biomoleculares, es interesante conocer su relación. Acabamos de ver la ecuación que relaciona RMSF y los factores B y que muestra que son directamente proporcionales⁶⁴⁷.

Tal y como justifican y defienden Kuzmanic y Zagrovic a la vista de sus resultados, ya que las estructuras biomoleculares (y sus factores B asociados) se refinan en coordenadas cartesianas, la medida más natural para evaluar su diversidad estructural global directamente desde el experimento también debería involucrar la representación cartesiana posicional del átomo, y esto ocurre en el caso de RMSD⁶⁴⁷. Y, de hecho, la simplicidad matemática que demuestran los resultados de la conexión entre los factores B, RMSF y RMSD (de los que se puede concluir, de manera simplificada, que los tres parámetros son proporcionales $\text{factor B} \propto \text{RMSF} \propto \text{RMSD}$) descrita en el estudio de Kuzmanic y Zagrovic⁶⁴⁷ en realidad sirve como evidencia indirecta que respalda esta afirmación.

Pero si lo que buscamos no es solo evaluar la diversidad conformacional de una especie, sino compararla en diferentes estados (distintos complejos en nuestro caso), debemos normalizar este valor RMSD. Si en vez de calcular el valor de RMSD respecto a la conformación del marco cero de la trayectoria de dinámica molecular como habitualmente se hace con las simulaciones, lo hacemos respecto al valor medio de la dinámica, entonces el valor de RMSD coincide con el valor de RMSF, pues, tal y como demuestra Jed W. Pitera en su desarrollo matemático, si la estructura de referencia para el cálculo de RMSD es la estructura media del conjunto, se espera que los promedios (RMSD) y RMSF sean idénticos⁶⁸⁵.

RMSF: parámetro para definir la estabilidad interfacial en el estudio

Resumiendo y concluyendo, el factor B es un parámetro experimental indicador del movimiento vibratorio relativo, del desorden de un átomo en la estructura, de su movilidad y de su estabilidad, y un factor B bajo implica que el átomo está en las partes bien ordenadas de la estructura, mientras que un factor B grande generalmente sugiere una flexibilidad muy alta de este átomo. El factor B resulta ser directamente proporcional al parámetro RMSF, que es un valor teórico extraído de las simulaciones de dinámica molecular que corresponde a una propiedad de un conjunto de estructuras o distribución, y que denota la fluctuación de una posición atómica sobre su valor promedio.

Resulta que ambos parámetros, factores B y RMSF, son directamente proporcionales, así que asumimos que podemos interpretar la información que dan de la misma manera, y podemos utilizar estos factores de estructura promedio derivados de una simulación de dinámica molecular para hacernos una idea de la heterogeneidad del sistema y, por tanto, de su movilidad⁶⁵³ y estabilidad⁶³⁵.

Elegimos, pues, el valor de RMSF como parámetro de estabilidad de los sistemas y, del mismo modo que ocurre con el valor del factor B, un valor más alto de RMSF indicará una mayor movilidad de los átomos y, por tanto, una menor estabilidad conformacional. Luego el sistema o subconjunto de átomos del sistema con mayores valores de RMSF será el que consideremos

más inestable, de la misma manera que el sistema con menores valores de RMSF será el más estable. En principio es de esperar entonces, tal y como ocurre con el factor B, que los átomos profundamente enterrados en el núcleo de la proteína, que suelen ser rígidos, tengan un factor B bajo⁶⁵⁶, más bajo que los residuos expuestos, y que los residuos interfaciales en complejos de unión a proteínas también tengan factores B más bajos en comparación con el resto de la superficie estructural terciaria⁶¹².

4.2.2. Caracterización de las interfaces entre subunidades de PCNA

La naturaleza podría haber diseñado una abrazadera que se abriera espontáneamente y, en forma de letra C, se uniera al DNA y después, estimulada por la presencia del DNA, simplemente se cerrara en un anillo en torno al DNA; pero esto no sucede. PCNA necesita ser, si no abierta, sí cargada y cerrada alrededor del DNA de manera activa por el cargador de la abrazadera RFC. Y si RFC necesita asegurarse de dejar cerrada PCNA en el DNA antes de marcharse, quizás la interacción con el DNA no sea tan deseable y PCNA agradezca una ayuda.

Para estudiar si PCNA se estabiliza o desestabiliza al cargarse en el DNA y si p15 está ahí para algo más que para mantener el modo de difusión de rueda dentada de PCNA, vamos a tomar como parámetro de estabilidad el factor RMSF y a analizar sus valores para PCNA en tres sistemas: PCNA sola (PCNA), PCNA cargada en el dsDNA (PCNA-DNA) y PCNA cargada en el dsDNA con dos fragmentos de p15 (p15⁴⁷⁻⁷⁰) unidos a sendos bolsillos de unión a PIP-box (PCNA-DNA-p15).

A partir de simulaciones de DM de los sistemas PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15, corridas todas en las mismas condiciones (con Gromacs, parmBSC1 como campo de fuerzas, 250 ns de trayectoria, y tal y como ha sido ya descrito en el Capítulo 1 y en el Capítulo 3), vamos a calcular los valores de RMSF de cada una de las subunidades de PCNA y, ya que valores más altos de RMSF indican mayor movilidad conformacional de los residuos estudiados a lo largo de la trayectoria, consideraremos que un mayor valor de RMSF está asociado a una mayor inestabilidad del sistema. Comparando, pues, los valores de RMSF para PCNA en los diferentes sistemas, estableceremos la estabilidad de PCNA en cada uno de ellos.

Todos los valores de RMSF mostrados han sido calculados para los C α de todos los residuos de PCNA con Theseus⁶⁸⁷.

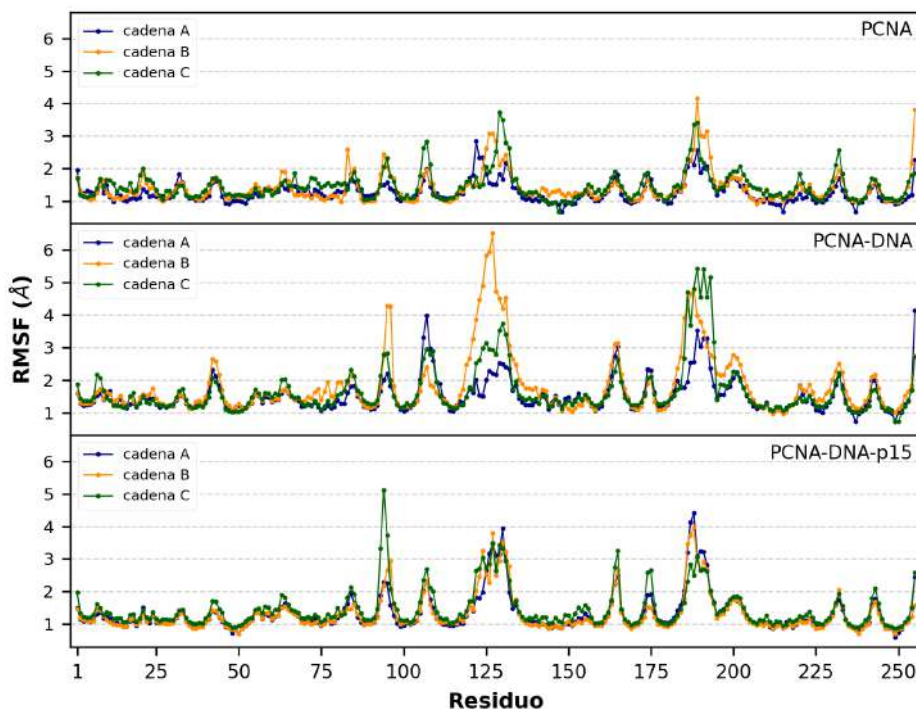


Figura 88: Valores de RMSF para cada una de las cadenas de PCNA en cada uno de los tres sistemas a estudio calculados a partir de simulaciones de dinámica molecular. Se muestra cada cadena en un color diferente (la cadena de la subunidad A en azul, la B en amarillo y la C en verde) y los valores para cada sistema: PCNA arriba, PCNA-DNA en medio, y PCNA-DNA-p15 abajo, para comparación de los valores de RMSF de las subunidades de PCNA en cada sistema. En el sistema PCNA-DNA-p15 las cadenas A y B están ocupadas por p15.

En general, las tres cadenas tienen valores de RMSF más bajos para el sistema PCNA-DNA-p15 (verde) y más altos para el sistema PCNA-DNA (amarillo). El sistema PCNA no siempre tiene valores de RMSF comprendidos entre los valores de los otros dos sistemas, pero se puede generalizar diciendo que en el sistema PCNA-DNA-p15, PCNA tiene los valores de RMSF más bajos, en el sistema PCNA-DNA los más altos, y cuando está libre tiene valores de RMSF intermedios a los de los otros dos sistemas (Figura 88). A la vista de estos resultados y considerando que valores más altos de RMSF indican menor estabilidad de la estructura, podemos decir que en el sistema PCNA-DNA-p15 es donde PCNA es más estable, seguida de PCNA sola y, por último, en el sistema PCNA-DNA es donde es menos estable. Luego parece que PCNA, al anclarse al DNA se desestabiliza, pero vuelve a ganar estabilidad al unirse p15, siendo muchas veces incluso más estable cuando está anclada al DNA y con p15 unida que cuando está sola en disolución. Los picos que vemos en las gráficas de la Figura 89 corresponden a zonas de las cadenas de PCNA con valores más altos y, por lo tanto, más móviles. Los residuos de las interfaces entre subunidades o cadenas de PCNA son 109-117 y 175-183, y se puede apreciar que esas zonas caen en valles de valores de RMSF, luego las interfaces son zonas con movilidad reducida dentro de la proteína, tal y como cabría esperar para una interfaz no expuesta.

4.2.3. Análisis de la estabilidad de los diferentes sistemas

En vista de los resultados obtenidos para los valores de los RMSF de PCNA en cada uno de los tres sistemas (PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15) que, considerando mayor estabilidad a mayores valores de RMSF, parecen indicar que PCNA requiere de p15 para recuperar la estabilidad que perdió al unirse al DNA, vamos a comprobar si hay o no ganancia de estabilidad para PCNA perteneciendo a un sistema u otro.

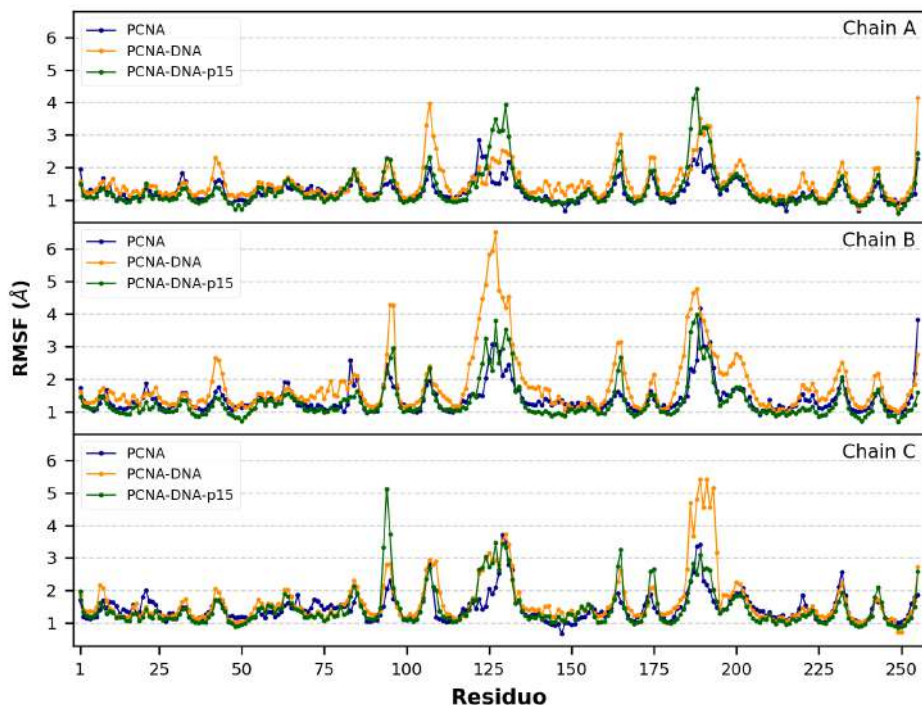


Figura 89: Valores de RMSF para cada una de las cadenas de PCNA en cada uno de los tres sistemas a estudio calculados a partir de simulaciones de dinámica molecular. Se muestran en una misma gráfica los valores de cada cadena de PCNA, la A, la B o la C, en cada uno de los tres sistemas (PCNA en azul, PCNA-DNA en amarillo, y PCNA-DNA-p15 en verde) para comparación de los valores de RMSF de cada subunidad de PCNA en todos los sistemas.

Para ello calcularemos la relación o ratio entre los valores de RMSF por parejas de sistemas, teniendo todos en común a PCNA como componente, para así comparar la estabilidad entre ellos y deducir en cuál PCNA es más estable (recordando siempre que relacionamos menores valores de RMSF con una mayor estabilidad).

Tenemos los sistemas PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15 y para estudiar en qué sistema PCNA es más estable relación a otro, vamos a analizar la relación de valores de RMSF en las parejas PCNA-DNA/PCNA, PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA. Luego en cada pareja de análisis, siempre tendremos en el numerador de la división entre los valores de RMSF el sistema con más componentes de la pareja y en el denominador en sistema con menos com-

ponentes de la pareja. Y si tomamos estas relaciones entre sistemas y consideramos, como ya hemos dicho, que valores más altos de RMSF indican una menor estabilidad, entonces, para una pareja de sistemas i/j cualquiera, si el ratio $\frac{RMSF_i}{RMSF_j}$, donde i es el sistema con más componentes de la pareja y j el sistema con menos componentes de la pareja

- es mayor que 1

$$\frac{RMSF_i}{RMSF_j} > 1$$

entonces el sistema con más componentes (i) tiene los valores de RMSF más altos que el sistema con menos componentes (j), por lo tanto el sistema con más componentes (i) tiene una mayor movilidad, luego es más estable el sistema con menor número de componentes (j).

- es igual que 1

$$\frac{RMSF_i}{RMSF_j} = 1$$

entonces el sistema con más componentes (i) tiene los mismos valores de RMSF que el sistema con menos componentes (j), por lo tanto los dos sistemas tienen la misma movilidad, luego los dos sistemas tienen igual estabilidad.

- es menor que 1

$$\frac{RMSF_i}{RMSF_j} < 1$$

entonces el sistema con más componentes (i) tiene los valores de RMSF más bajos que el sistema con menos componentes (j), por lo tanto el sistema con más componentes i tiene una menor movilidad, luego es más estable el sistema con mayor número de componentes (j).

Calculando los valores de las relaciones $RMSF_i / RMSF_j$ para las parejas de sistemas PCNA-DNA/PCNA, PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA obtenemos las representaciones que podemos ver en las figuras Figura 90 y Figura 91.

Fijándonos en la Figura 90, vemos que, en general, y exceptuando los picos más abruptos que en todos los casos tienen valores superiores a 1, la pareja PCNA-DNA/PCNA tiene los valores $RMSF_i / RMSF_j$ por encima de 1 para las tres cadenas de PCNA. El caso de las parejas PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA es justo al contrario, pues muestran la mayor parte de sus valores $RMSF_i / RMSF_j$ por debajo de 1. Según esto, en el sistema PCNA-DNA es menos estable que el sistema PCNA, y el sistema PCNA-DNA-p15 es más estable que los sistemas PCNA-DNA y PCNA. Por lo tanto, según el criterio de estabilidad elegido para este estudio, PCNA se desestabiliza al tener DNA unido y la presencia de p15 estabiliza cualquiera de los dos sistemas donde no estaba.

En la Figura 91 podemos ver en qué pareja de sistemas es más estable cada una de las cadenas de PCNA. En general, y exceptuando los picos de las zonas más móviles, las tres cadenas de PCNA tienen valores de $RMSF_i / RMSF_j$ por debajo de 1 en las parejas PCNA-DNA-p15/PCNA (en color amarillo) y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA (en color verde), y los valores de la pareja PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA son más bajos que los de la pareja PCNA-DNA-p15/PCNA. A la vista de estos resultados podemos concluir que en el sistema PCNA-DNA las tres cadenas de PCNA

4. Estabilización de la forma cerrada del anillo de PCNA por p15

son menos estables que el sistema PCNA, y que el sistema PCNA-DNA-p15 tiene las tres cadenas de PCNA más estables que cuando p15 no está presente, sea en el sistema PCNA-DNA o sea en el sistema PCNA. Por tanto, las tres cadenas de PCNA se desestabilizan cuando PCNA se ancla al DNA, y después recupera estabilidad cuando p15 se une a ella.

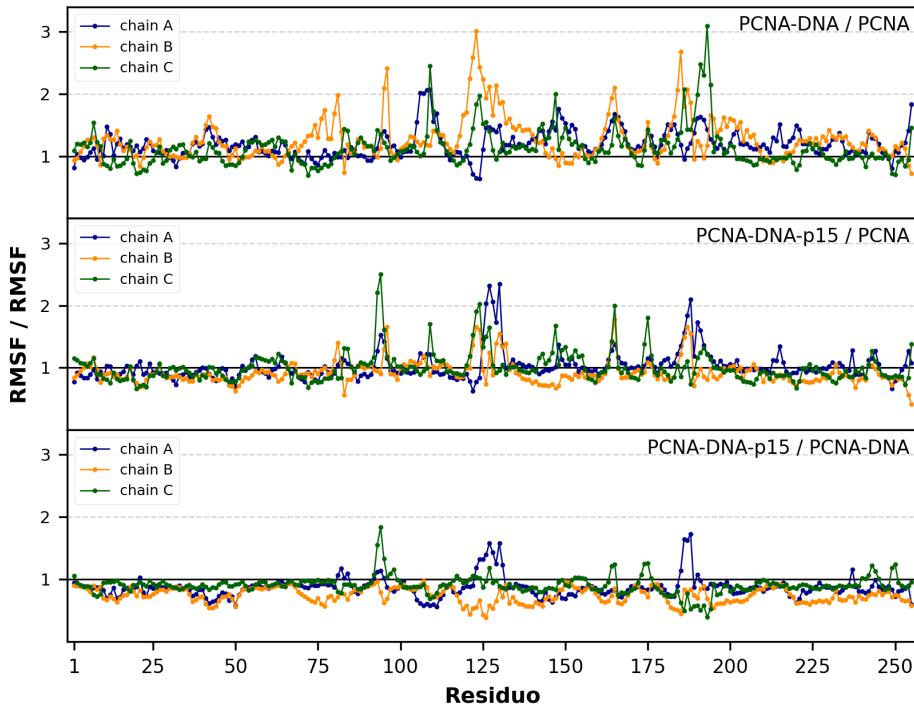


Figura 90: Representación de los valores $RMSF_i/RMSF_j$ de las tres cadenas de PCNA para cada pareja de sistemas. Mostramos con línea continua negra el valor $RMSF_i/RMSF_j=1$.

Si calculamos las medias y la desviación estándar de los valores de RMSF de las tres cadenas de PCNA para cada uno de los sistemas, y representamos sus valores para todos los residuos (Figura 92), podemos ver que, en general, el sistema PCNA-DNA-p15 tiene el rango de valores más bajos (color verde), el sistema PCNA-DNA el rango de valores más altos (color amarillo), y el sistema PCNA (color azul) muestra valores intermedios.

Ya que la manera de ver los valores de RMSF de PCNA en cada sistema como en la Figura 92 es bastante ilustrativa, haremos lo mismo con los valores de las relaciones $RMSF_i/RMSF_j$. Calculando la media y desviación estándar de los valores $RMSF_i/RMSF_j$ de las tres cadenas de PCNA en cada una de las parejas de sistemas estudiadas (PCNA-DNA/PCNA, PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA) y representado los valores para cada residuo de PCNA (Figura 93), podemos ver que, en general, la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA (en

color verde) tiene sus valores de $RMSF_i/RMSF_j$ por debajo de 1, por lo tanto el sistema PCNA-DNA-p15 es más estable que el sistema PCNA-DNA; que la pareja de sistemas PCNA-DNA/PCNA (color azul) tiene sus valores $RMSF_i/RMSF_j$ por encima de 1, por lo tanto el sistema PCNA es más estable que el sistema PCNA-DNA; y que la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA (color amarillo) tiene valores de $RMSF_i/RMSF_j$ intermedios a los de los otros dos sistemas, por debajo también de 1, pero más cercanos a este valor, por lo tanto, el sistema PCNA-DNA-p15 es más estable que el sistema PCNA.

Y a la vista de todos estos resultados, podemos concluir que PCNA se desestabiliza al anclarse en el DNA y que cuando p15 se une a ella a través de su dominio PIP-box, PCNA se estabiliza. El hecho de que los valores $RMSF_i/RMSF_j$ de la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA sean inferiores a los valores $RMSF_i/RMSF_j$ de la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA nos hace pensar que el DNA es el componente que más contribuye a la inestabilidad del sistema y que es p15 la componente que devuelve a PCNA la estabilidad que tenía en disolución.

Aunque parece que la zona de los residuos de las interfaces de las subunidades de PCNA (son los residuos 109-117 y 175-183 y podemos verlos en la Figura 84 en la página 217) no ocurre gran cosa, pues tienen valores de RMSF bajos, indicando que su movilidad no es elevada, tal y como cabría esperar para residuos no expuestos, sería interesante detenernos un poco en ellos.

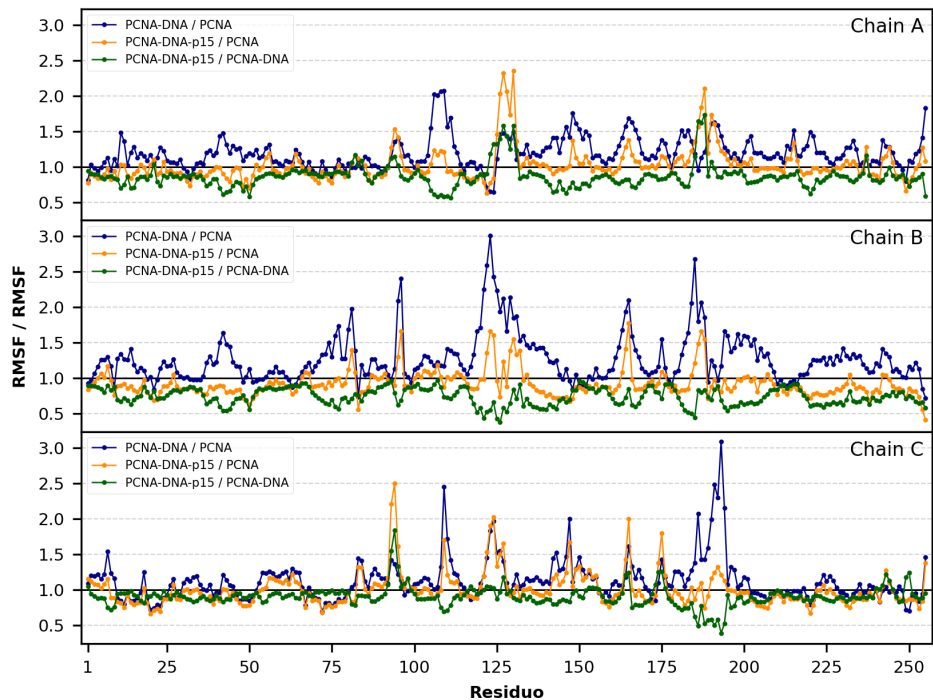


Figura 91: Representación de los valores $RMSF_i/RMSF_j$ de las tres parejas de sistemas para cada una de las cadenas de PCNA. Mostramos con línea continua negra el valor $RMSF_i/RMSF_j=1$.

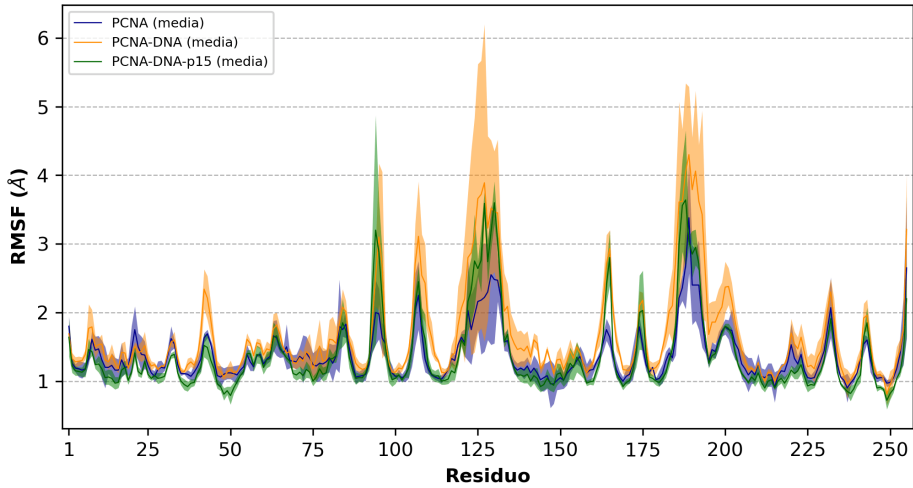


Figura 92: Representación de los valores medios de RMSF (línea más oscura) y desviación estándar (sombreado del mismo color que la línea) para cada sistema. El sistema PCNA se representa en color azul, el sistema PCNA-DNA en color amarillo y el sistema PCNA-DNA-p15 en color verde.

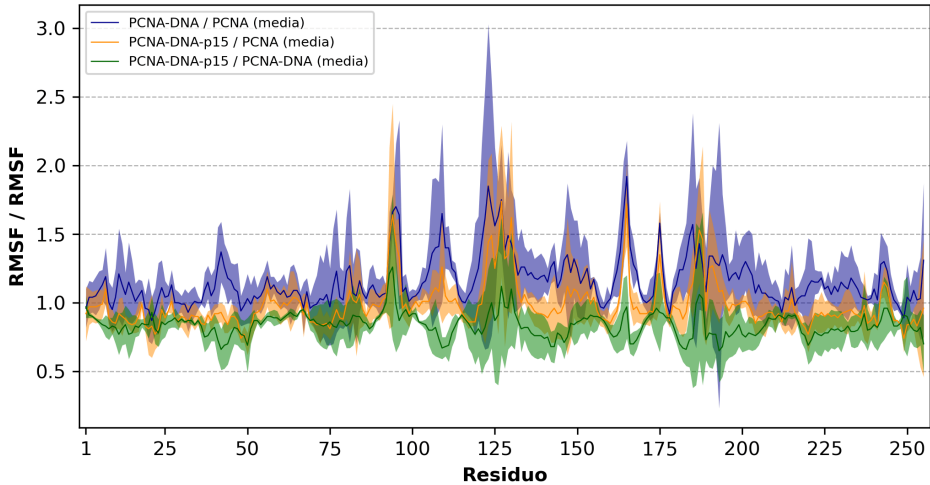


Figura 93: Representación de los valores medios de $RMSF_i/RMSF_j$ (línea más oscura) y desviación estándar (sombreado del mismo color que la línea) para cada pareja de sistemas. La pareja PCNA-DNA/PCNA se representa en color azul, la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA en color amarillo y la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA en color verde.

Ya que parece que la molécula de PCNA, en general, se inestabiliza al anclarse en el DNA a pesar de formar interacciones muy estables con él y que siempre llevaron a pensar que favorecerían la permanencia de la pinza en la doble hélice. Ya que, además, la entrada en escena de p15 hace mejorar la estabilidad de PCNA, pareciéndose esta más a la que PCNA tenía antes de anclarse al DNA, y que, al final, el resultado de tal mejora en la estabilidad es una replicación procesiva por parte de Pol δ debido a que PCNA no se abre para abandonar el replisoma, sería interesante fijarnos en qué ocurre con la estabilidad de las interfaces entre subunidades de PCNA en los distintos sistemas (Figura 94).

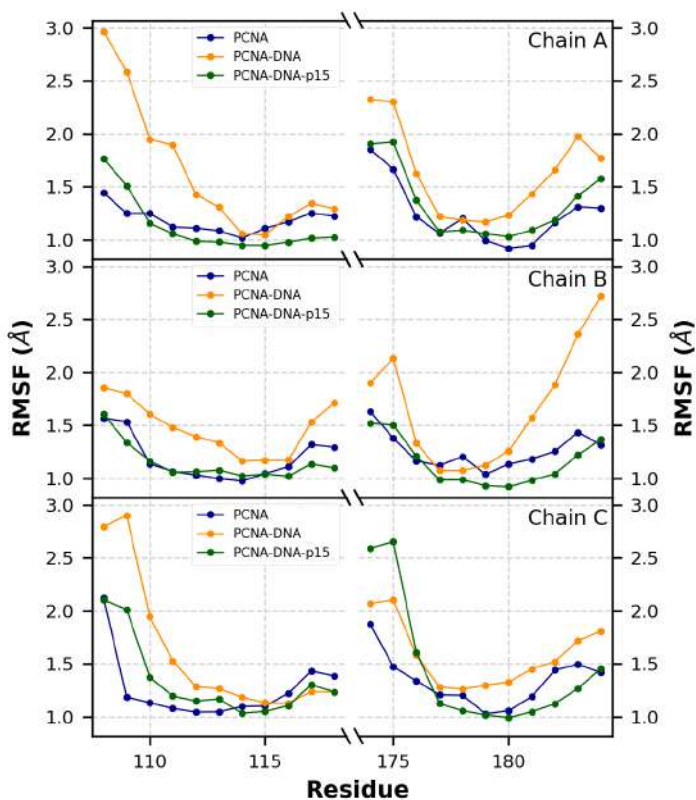


Figura 94: Representación de los valores RMSF de los tres sistemas estudiados para los residuos de la interfaz de cada una de las cadenas (A, B y C) de PCNA. El sistema PCNA se representa en color azul, el sistema PCNA-DNA en color amarillo y el sistema PCNA-DNA-p15 en color verde. Se indican los valores RMSF de los residuos de la interfaz (109-117, 175-183) y además uno más a cada lado de cada lámina β .

El patrón de valores de RMSF de los residuos de las interfaces para las tres cadenas de PCNA en los tres sistemas a estudio es el mismo que hemos encontrado hasta ahora: los residuos interfaciales del sistema PCNA-DNA tienen, en general, los valores más altos. En el caso de los sistemas PCNA y PCNA-DNA-p15, sus valores son más parecidos entre sí y unas veces son inferiores los del sistema PCNA y otras los del sistema PCNA-DNA-p15, mostrando también ahora que sus estabilidades son más parecidas y haciéndonos pensar de nuevo que p15 devuelve a PCNA la estabilidad que pierde al unirse al DNA. Podemos decir que el hecho de unirse PCNA al DNA hace desestabilizar los residuos de sus interfaces y p15 hace recuperar la estabilidad de esta zona, al igual que ocurre con el resto de la molécula de PCNA.

Podemos ver de manera más condensada la información de la Figura 94 en la Figura 95. De esta manera queda más claro que los residuos interfaciales del sistema PCNA-DNA tienen los valores más altos de los tres sistemas, por tanto, PCNA tiene las interfaces más inestables en el sistema PCNA-DNA.

Si nos fijamos en los valores de los ratios $RMSF_i/RMSF_j$ de los residuos de las interfaces de las distintas parejas de sistemas estudiadas (Figura 96), resulta que, también y de manera muy evidente, la pareja PCNA-DNA/PCNA es la única con prácticamente todos los valores por encima de 1, indicando que el sistema PCNA-DNA es más inestable que el sistema PCNA; la pareja PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA es la única con prácticamente todos los valores por debajo de 1, mostrando que el sistema PCNA-DNA-p15 es más estable que el sistema PCNA-DNA; y la pareja PCNA-DNA-p15/PCNA tiene casi siempre valores intermedios a los de las otras dos parejas y además en torno a 1, sugiriendo que la estabilidad de las interfaces de PCNA en los sistemas PCNA-DNA-p15 y PCNA son parecidas.

Así que, aunque RFC se asegura de dejar a PCNA cerrada en el DNA antes de marcharse, algo hace que PCNA se mantenga cerrada durante la actuación de Pol δ , y p15, debido a que su llegada a PCNA anclada en el DNA estabiliza el sistema, parece una buena candidata.

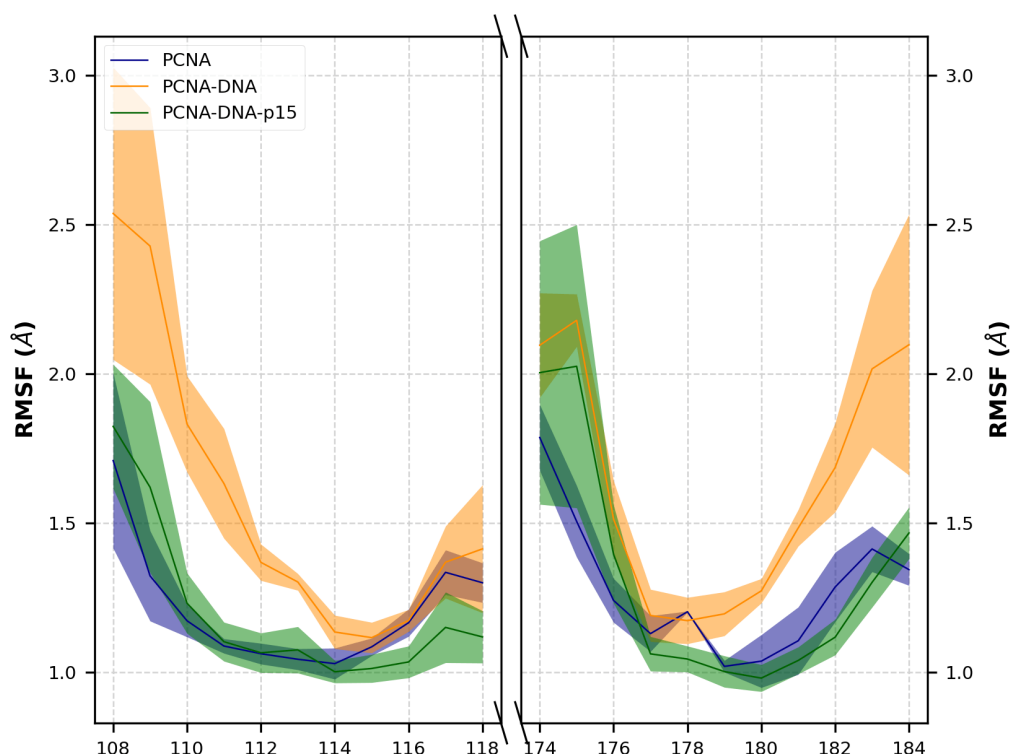


Figura 95: Representación de la media y desviación estándar de los valores RMSF para las tres cadenas de PCNA de los residuos interfaciales y uno más flanqueando cada lado de las dos láminas β en cada uno de los sistemas. La media se representa como una línea y la desviación estándar como una sombra del mismo color, y en color azul se representa el sistema PCNA, en amarillo el sistema PCNA-DNA y en verde el sistema PCNA-DNA-p15.

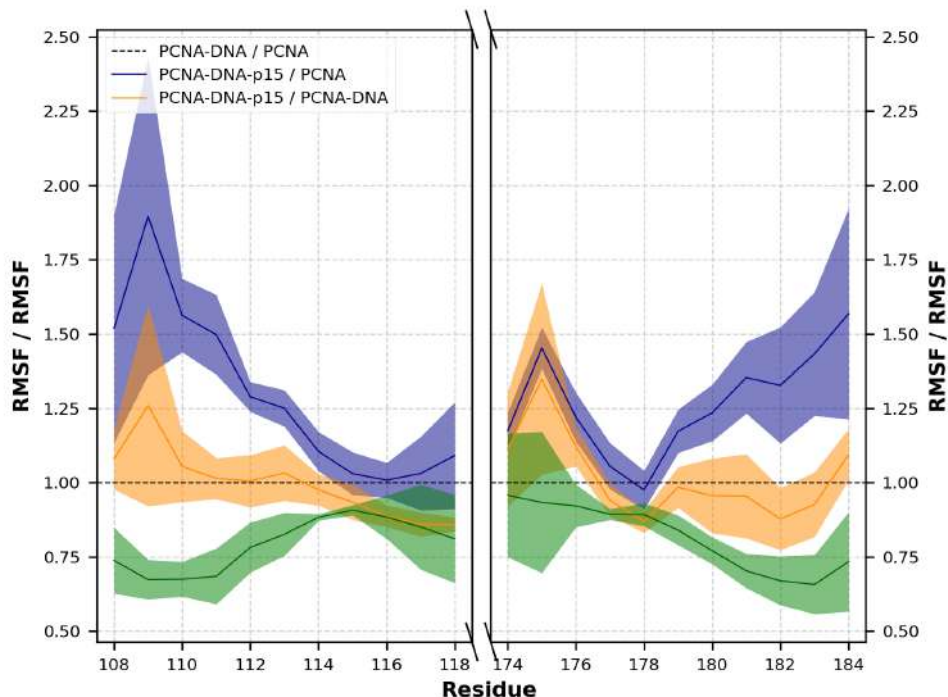


Figura 96: Representación de los valores medios de $RMSF_i/RMSF_j$ (línea más oscura) y desviación estándar (sombreado del mismo color que la línea) para cada pareja de sistemas para los residuos de la interfaz entre subunidades de PCNA. La pareja PCNA-DNA/PCNA se representa en color azul, la pareja de sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA en color amarillo y la pareja del sistemas PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA en color verde.

4.2.4. Caracterización y análisis de la interacción entre RFC y el sistema PCNA-p15

Al principio del capítulo dijimos que la presencia en PCNA de sitios comunes para RFC y Pol δ sugiere un modelo en el que sitios funcionalmente importantes serán transferidos desde RFC a Pol δ durante la carga de esta polimerasa y que Pol δ debe invadir los bucles centrales para formar un complejo funcional con PCNA, así que RFC debe ser ligeramente desplazada¹⁴⁶. Es sabido que la hidrólisis de ATP por RFC es esencial para empezar la síntesis de DNA por Pol δ ^{688,689}, lo que sugiere un segundo cambio estructural, el cual es inducido por la hidrólisis de ATP para dejar el bucle(s) central libre para Pol δ ¹⁴⁶. Además, la habilidad de RFC para unir específicamente el final 3' del cebador de DNA permite a PCNA, como hemos señalado, ser cargada en el DNA directamente en la orientación de su alargamiento^{120,590}. Y, como explicamos entonces, la idea aceptada es que, después Pol δ se carga en el DNA interaccionando con PCNA en la misma cara que RFC y por desplazamiento del sitio común y que esta interacción con Pol δ bloquea una descarga no programada de PCNA durante la síntesis de DNA inhibiendo el acceso de RFC a la

pinza y, por tanto, el solapamiento de los sitios de interacción comunes es un segundo rol del complejo Pol δ durante la síntesis de DNA¹⁴⁶.

La inhibición de los sitios de unión de RFC a PCNA es un buen mecanismo para impedir la apertura de la pinza, pero ahora no solo sabemos que p15 también está presente en el replisoma unida a PCNA en los mismos bolsillos hidrofóbicos que necesita RFC y que, entonces, esa inhibición no es exclusivamente debida a Pol δ , sino debida a Pol δ y p15; además sabemos que, entre otras, la función de p15 es estabilizar PCNA cuando está anclada en el DNA. Luego p15, estabilizando las interfaces de PCNA contribuye a la no apertura del anillo en impide la liberación prematura de la pinza.

Tal y como describieron Tainer y colaboradoras/es, la confluencia de varios factores estructurales y energéticos permite la unión de RFC a PCNA: (i) la disposición en espiral de las subunidades de RFC; (ii) la flexibilidad intrínseca de PCNA y su tendencia a torcerse fuera del plano; (iii) la presencia de elementos estructurales de RFC preparados para interactuar con PCNA (sus dominios PIP-box); y (iii) la electrostática favorable⁵⁹⁴. Como acabamos de ver, p15 parece estabilizar PCNA cuando está anclada en el DNA, luego la tendencia de PCNA a abrirse una vez RFC la ha unido al DNA disminuye si p15 está unida a la pinza. Así que, si RFC necesita para actuar la tendencia de PCNA a abrirse y resulta que p15 hace que esta tendencia sea inferior, no parece que RFC y p15 puedan actuar a la vez en el mismo anillo de PCNA.

Además, RFC y p15 interaccionen ambas con PCNA a través de sus motivos PIP-box, lo que también va en la misma dirección de no poder coincidir en el PCNA a la vez. Podemos ver si es posible la coexistencia de p15 y RFC en un mismo bolsillo de unión a PIP-box de PCNA (Figura 97) aún sabiendo de antemano la respuesta. Aunque la superposición de las estructuras de los péptido p15 y p21, y p15 y p66 de Pol δ es superior que en el caso de los péptidos p15 y RFC, claramente los cuatro péptido ocupan el mismo espacio en PCNA y su presencia conjunta en un mismo bolsillo hidrofóbico de unión a PIP-box es imposible, luego, si algunas de las cuatro proteínas estudiadas (p15, p21, Pol δ , RFC) se anclaran a la vez en PCNA, tendrían que hacerlo en bolsillos de unión diferentes (no estamos teniendo en cuenta ningún otro aspecto como otros factores estéricos o que estén presentes a la vez o no en el mismo momento del ciclo celular).

Ya que RFC se ancla a la abrazadera a través de sus motivos PIP-box de manera secuencial a los tres bolsillos disponibles de PCNA, desde un punto de vista estructural, si p15 está unida a PCNA a cualquiera de ellos, sea a uno, dos o los tres, RFC no podrá unirse y llevar a cabo su función. Pero quizás el impedimento estérico por la ocupación del sitio de unión y la estabilización de la forma cerrada de PCNA por parte de p15 no son los únicos impedimentos que hacen que RFC no se una a PCNA si con ella ya está p15. El otro factor para una unión favorable entre RFC y PCNA es una electrostática favorable. Vamos, pues, a fijarnos en las superficies de PCNA y RFC que interaccionan y en sus cargas electrostáticas (Figura 98).

En vista de lo que nos muestra la Figura 98, parece que existe complementariedad de cargas entre las superficies de PCNA y RFC que interaccionan, pues, a simple vista, se aprecia que las cargas positivas de RFC (zonas azules) se enfrentan a cargas negativas de PCNA (zonas rojas). Al unirse p15 a PCNA, p15 tapa cargas negativas en la superficie de PCNA que debían interactuar con RFC y, además, hace que aparezcan cargas positivas (zonas azules) en la nueva superficie del complejo PCNA-p15 en zonas que interaccionarán con cargas positivas de RFC si se acerca. Luego la presencia de p15 en la superficie de PCNA hace perder la complementariedad de cargas que PCNA tiene en ausencia de p15 con RFC.

4. Estabilización de la forma cerrada del anillo de PCNA por p15

Así que RFC tiene motivos energéticos, motivos estéricos y motivos eléctricos para no acercarse a PCNA si con ella está p15.

En la Figura 99 podemos apreciar mejor el impedimento estérico que supone para RFC tener anclada p15 sobre la superficie de RFC; sin duda, la aproximación y anclaje de RFC al bolsillo hidrofóbico de PCNA es así imposible. Pero además, en cada uno de los péptidos de p15 unidos a PCNA hay dos amenazantes lisinas apuntando con sus cargas positivas hacia zonas de densidad de carga positiva en la superficie de RFC. Parece claro que esta situación, en la que el cargador de la abrazadera se encuentra a PCNA acompañada de p15, no debe gustar a RFC.

Y, teniendo en cuenta esta incompatibilidad entre RFC y p15 anclada a PCNA, debemos pensar que para que RFC se una a PCNA y medie su anclaje en el DNA, debe encontrarla libre de p15, luego solo cabe pensar que p15 se une a PCNA una vez ha sido anclada sobre el DNA por RFC. De la misma manera, cuando PCNA debe abandonar el DNA y para ello RFC debe volver a unirse a ella para abrirla y soltarla, p15 ya no puede estar presente.

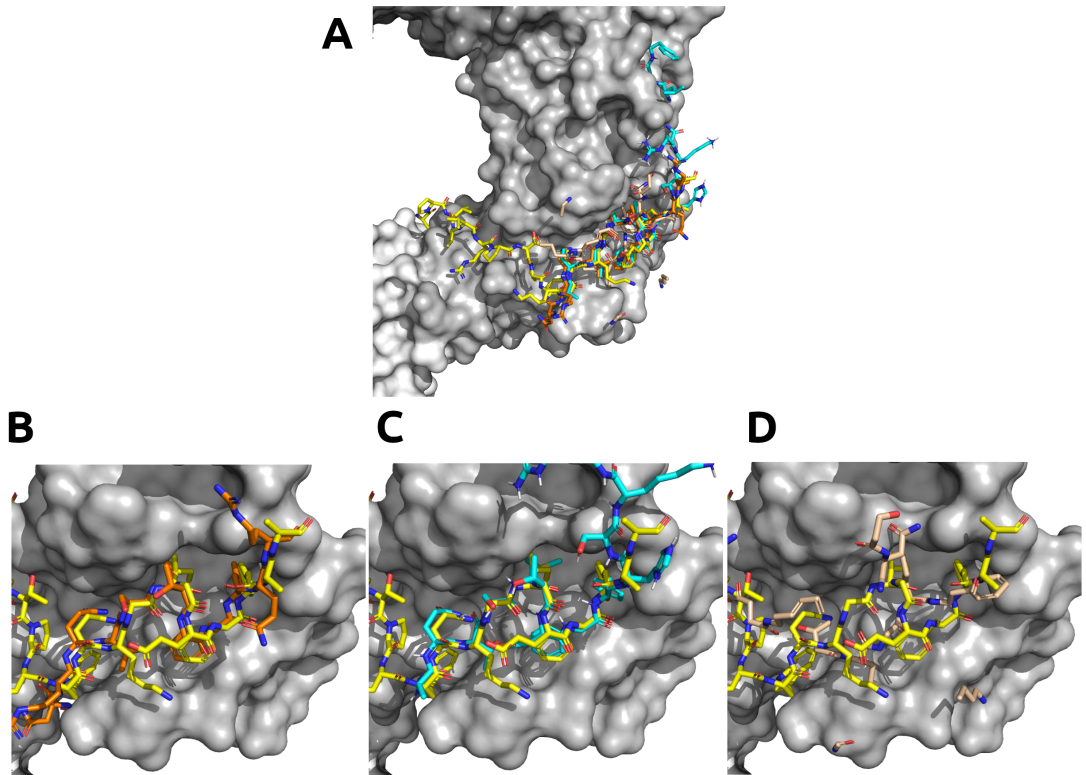


Figura 97: A) Representación de la estructura de distintos péptidos unidos al bolsillo de unión de PCNA (en color gris y representación de superficie). Los péptidos PIP-box son p15 (PDB ID: 4D2G) en amarillo, p66 de Pol δ (PDB ID: 1U76) en naranja, p21 (PDB ID: 1AXC) en cian, y RFC (PDB ID: 1SXJ) en rosado. Vemos los distintos péptidos por parejas para comparación entre p15 y cada uno de los otros tres: B) p15 y p66 de Pol δ , C) p15 y p21, D) p15 y RFC.

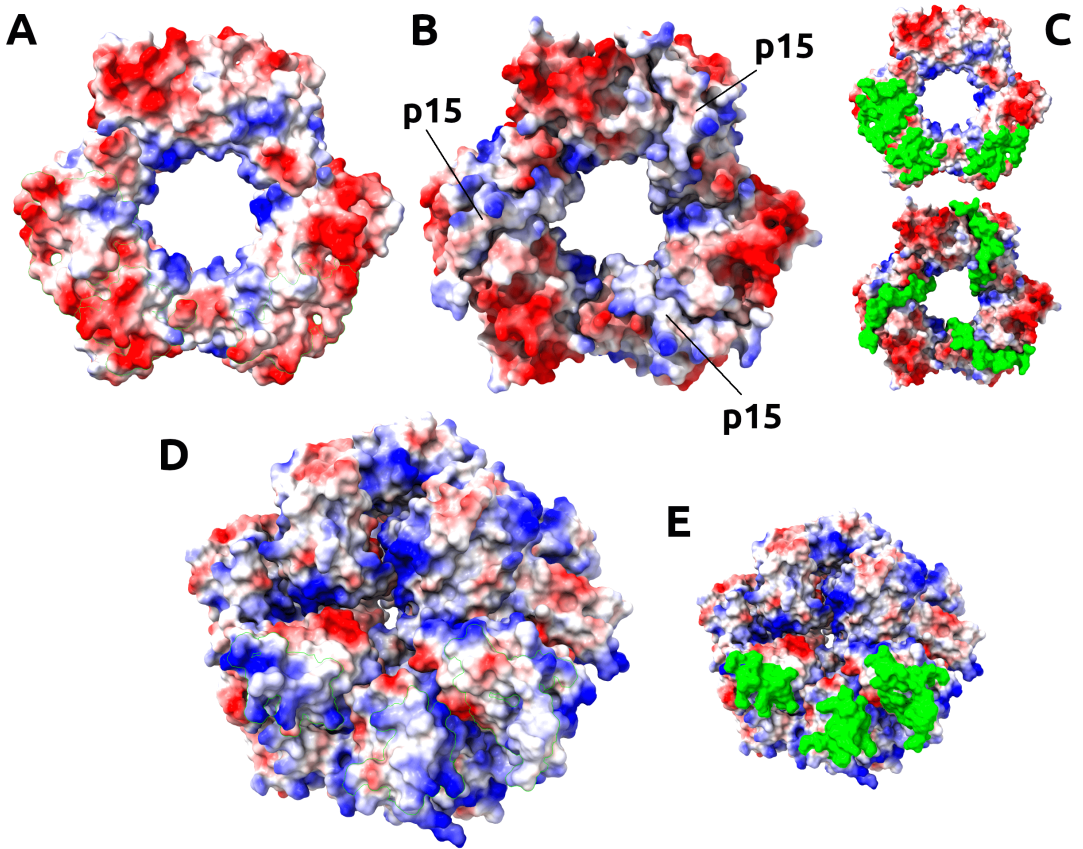


Figura 98: Superficies electrostáticas de A) la cara frontal de PCNA (PDB ID: 6VVO), B) la cara frontal del sistema PCNA-p15 (PDB ID: 6GWS,) y D) la cara de RFC que se une a PCNA. Las cargas negativas se muestran en rojo (más altas cuanto mayor es la intensidad), las positivas en azul (más altas cuanto más intenso) y el blanco indica neutralidad de cargas. En C) tenemos: arriba la misma estructura que en A resaltando en verde los residuos que interacciones con RFC, y abajo tenemos la misma estructura que en B resaltando en color verde los tres péptidos p15 unidos. En E tenemos la misma estructura que en D, resaltando en verde los residuos que interaccionan con PCNA. Para saber los residuos que interaccionan entre PCNA y RFC se han considerado aquellos que están a menos de 7 Å en la estructura del complejo RFC-PCNA (PDB ID: 6VVO).

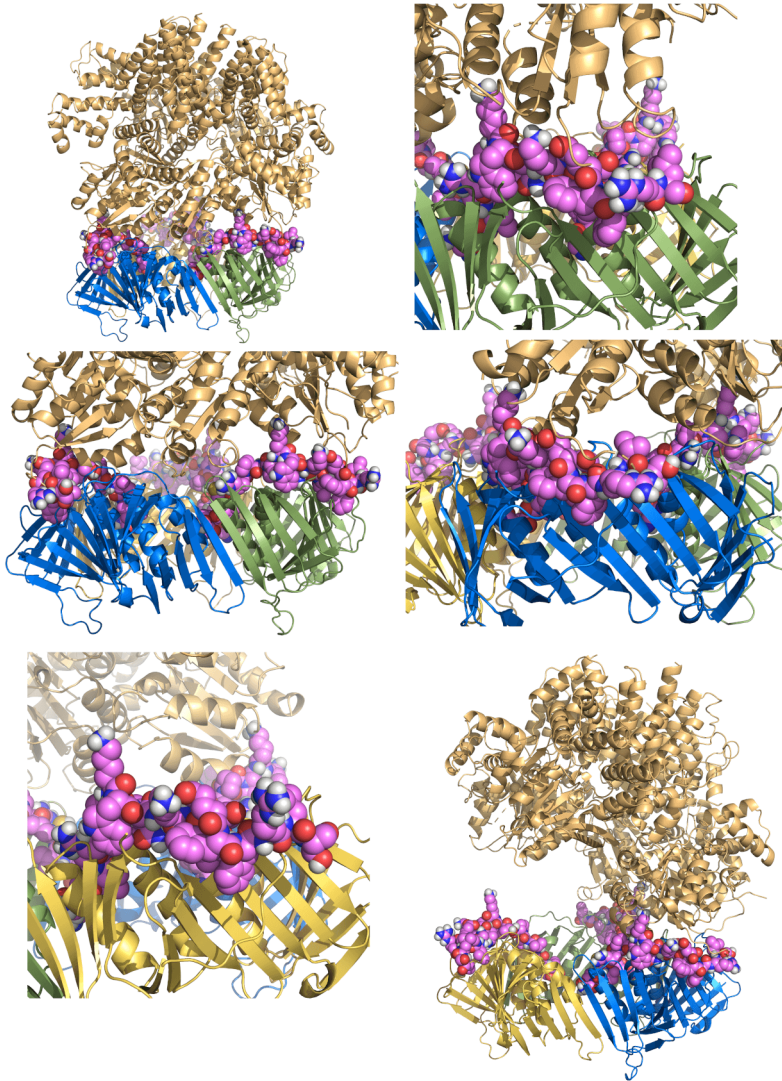


Figura 99: Representación de la estructura del hipotético complejo RFC-PCNA-p15 obtenido por superposición de las estructuras del complejo RFC-PCNA (PDB ID: 6VVO) y PCNA-p15 (6GWS). Se muestran diferentes orientaciones y ampliaciones del complejo RFC-PCNA-p15, con RFC en color dorado y PCNA en azul, verde y amarillo para diferenciar sus tres subunidades; p15 se muestra en representación de bolas para apreciar mejor el volumen que ocupa y diferenciar más fácilmente los diferentes residuos.

4.2.5. El «efecto grapa» de p15 en PCNA

El hecho de que PCNA tenga una predisposición intrínseca debida a su flexibilidad a estar en estado abierto separando dos de sus subunidades a través de su interfaz, favorece la apertura del anillo por parte de RFC para lograr su ensamblado alrededor del DNA.

Todo parecía indicar que, y de hecho así lo establecen multitud de grupos, una vez cerrada la pinza alrededor del DNA, el establecimiento de tantas conexiones dinámicas y flexibles en la interfaz PCNA-DNA estabilizaría la forma sellada de la abrazadera. Pero ahora nuestro análisis indica que las interfaces entre subunidades pierden estabilidad cuando PCNA es anclada alrededor de la unión P/T en el DNA, lo que puede ser un problema para mantener la replicación procesiva.

La estabilidad de las interfaces de PCNA disminuye cuando esta se une al DNA, pero dicha estabilidad se ve recuperada cuando dos moléculas de p15 se anclan por sendos dominios PIP-box a sus bolsillos hidrofóbicos de dos subunidades de PCNA. p15 actúa, pues, como una grapa que estabiliza las uniones de estas subunidades de la pinza e impidiendo su salida prematura del complejo con el DNA. Luego p15 ejerce un «efecto grapa» en PCNA para que la replicación por Pol δ sea procesiva.

Pero además de estabilizar la forma cerrada del anillo grapando PCNA consiguiendo que su tiempo sobre el DNA sea superior, cuando p15 está anclada a su cara frontal también impide que RFC se aproxime, se una a ella y la desenganche de la unión cebador/plantilla. Luego el «efecto grapa» debido a la estabilización del anillo de PCNA sobre el DNA también se ve aumentado por impedimento estérico que ocasiona p15 al rellenar el bolsillo que RFC precisa ocupar para enganchar PCNA, y por la pérdida de la complementariedad electrostática entre PCNA y RFC que causa al apuntar directamente al cargador de la abrazadera con al menos un par de lisinas cargadas contrariamente a su superficie cuando intenta la aproximación.

4.3. Compendio de resultados y conclusiones

Por la significación del factor de temperatura experimental en la estabilidad de las proteínas y la relación de proporcionalidad que guarda con la variable teórica RMSF obtenida de simulaciones de dinámica molecular, hemos considerado el factor RMSF como indicador adecuado de la estabilidad de los sistemas y útil para hacer comparaciones entre ellos. Asumimos, pues, que valores más altos de RMSF en un sistema son indicativos de inestabilidad, y valores más bajos de estabilidad.

Los análisis de los valores de RMSF de las trayectorias de los sistemas PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15 indica que el orden de estabilidad de PCNA en los diferentes sistemas es: PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA-DNA. Luego parece que PCNA se desestabiliza al anclarse al DNA, pero vuelve a ganar estabilidad con el anclaje de p15. Y esto ocurre para las tres subunidades de PCNA.

Para comparar la estabilidad de un sistema respecto a otro, calculamos los ratios $RMSF_i/RMSF_j$ para todas las parejas i/j de sistemas posibles PCNA-DNA/PCNA, PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA, siendo siempre el sistema i el de mayor número de componentes de la pareja y el sistema j el de menor número de componentes, y establecimos que, de esta manera, 1) cuando la relación de valores de RMSF es superior a 1, el sistema i , el de mayor número de componentes, es menos estable que el sistema j , el de menor número de componentes. 2) Cuando la relación de valores de RMSF es inferior a 1, el sistema i , el de mayor número de componentes, es más estable que el sistema j , el de menor número de componentes. 3) Cuando la relación de valores de RMSF es igual a 1, ambos sistemas i y j son igualmente estables.

La pareja de sistemas PCNA-DNA/PCNA tiene valores de $RMSF_i/RMSF_j$ mayores que 1 para las tres cadenas de PCNA. Sin embargo, las parejas PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA tienen valores de $RMSF_i/RMSF_j$ menores que 1. Por tanto, el sistema PCNA-DNA es menos estable que el sistema PCNA y el sistema PCNA-DNA-p15 es más estable que cualquiera de los otros dos sistemas (PCNA-DNA y PCNA). Y esto ocurre para las tres subunidades de PCNA.

Aunque los residuos de las interfaces (L175-S183 y E109-K117) tienen valores de RMSF bajos en comparación con el resto de la molécula de PCNA, las comparaciones de los valores de RMSF de los tres sistemas (PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15.) y de los valores de $RMSF_i/RMSF_j$ en las tres parejas de sistemas posibles (PCNA-DNA/PCNA, PCNA-DNA-p15/PCNA y PCNA-DNA-p15/PCNA-DNA) muestran el mismo patrón que el obtenido con el análisis de PCNA completa: el orden de estabilidad de los sistemas en función de la estabilidad de las interfaces entre subunidades de PCNA es PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA-DNA. Y esto ocurre para las tres subunidades de PCNA.

Así pues, todos estos resultados parecen indicar que PCNA se desestabiliza al unirse al DNA, pero la presencia de p15 en sus bolsillos hidrofóbicos estabiliza el sistema, recobrando PCNA la estabilidad que tenía en solución. Por lo tanto, como p15 estabiliza el anillo de PCNA grapando las interfaces entre subunidades entre sí evitando de este modo su apertura prematura, proponemos como función de p15 el «efecto grapa» que ejerce sobre PCNA.

Como p15 y RFC comparten los sitios de unión a PCNA y el impedimento estérico impide que ambas proteínas los ocupen a la vez; además p15 interrumpe la complementariedad de cargas entre las superficies de PCNA y RFC; y también p15 presenta, cuando está unida al bolsillo hidrofóbico de PCNA, dos importantes cargas positivas saliendo directamente de la cara forntal de PCNA y dirigiéndose hacia zonas de carga positiva de la superficie de RFC; la presencia de p15 en el anillo de PCNA impide que RFC se ancle a ella para abrirla y liberla del DNA.

El «efecto grapa» de p15 que influye en el aumento de la procesividad de PCNA se ve reforzado por el obstáculo que supone su presencia para RFC para desanclar la pinza del DNA.

5. Recapitulación

Castellano

Los resultados de cristalografía muestran que la interfaz PCNA-DNA implica las cadenas laterales de cinco residuos básicos de PCNA, cuatro (K20, K77, R149, H153 y K217) distribuidos en cuatro α -hélices de una subunidad de PCNA, y un quinto residuo (K80) en la α -hélice más próxima de la subunidad adyacente, que configuran una espiral a derechas que coincide estrechamente con el paso de giro del DNA tipo B y están implicadas en contactos polares con cinco fosfatos consecutivos de una única cadena de dsDNA.

Los resultados de RMN muestran que PCNA tiene tres de estas superficies de deslizamiento en el DNA equivalentes, una por cada una de sus tres subunidades, y que la interacción con el DNA se extiende a las caras delantera y trasera de PCNA.

Nuestras simulaciones de dinámica molecular de 100 ns de PCNA formando complejo con un dsDNA de 10 pb predicen una interacción altamente dinámica, de acuerdo con todas nuestras observaciones experimentales. Las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA, con dsDNA tanto de 10 pb (de 100 ns) como de 30 pb (de 250 ns), confirman la disposición vista en la estructura cristalográfica en la que el DNA se aproxima a la cara interna del anillo de PCNA y no permanece en el centro, e indican que los 25 ns de simulaciones precedentes son insuficientes para que el sistema alcance una conformación estable.

A lo largo de la simulación de dinámica molecular de 100 ns del sistema PCNA- DNA, el DNA pasa de una posición inicial a una final que equivale al desplazamiento del DNA en la estructura cristalográfica de dos pares de bases a lo largo de su eje helicoidal. El análisis de distancias de los contactos polares intermoleculares a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular de 100 ns indica que residuos de la cara trasera del anillo (S10, K14, K84) contribuyen también a conducir el DNA al estado final en el que se ha producido este avance en dos pares de bases.

La simulación de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA de 250 ns apoya el resultado de una doble hélice de DNA interaccionando simultáneamente y de forma dinámica con dos conjuntos de residuos en dos subunidades adyacentes de PCNA, tanto en la cara interna del anillo, como en la frontal y en la trasera. Según los resultados de las simulaciones, los residuos de PCNA que establecen contactos con el DNA son: a) en el interior del anillo, K20, K80 y N84 de una subunidad, y R149, K217, K80 y N84 de la subunidad adyacente, b) en la cara frontal, R210 en una subunidad y K77 y K20 en la contigua, y c) en la cara trasera, S10 y S223 en un monómero y K14 en el de al lado.

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que los residuos del interior del canal de PCNA implicados en las principales interacciones con el DNA forman una hélice a derechas en la superficie interna del anillo de PCNA que coincide con el paso helicoidal del DNA tipo B y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular.

El DNA al final de las trayectorias de 250 ns, de longitud 30 pb, muestra una inclinación respecto al plano del anillo de PCNA de $\approx 30^\circ$.

Las interacciones que se dan entre residuos de PCNA y fosfatos de DNA en la interfaz de deslizamiento de la pinza, mantienen la orientación de PCNA invariante en relación con la doble hélice, y una pinza correctamente orientada en el DNA es necesaria para el ensamblaje de una holoenzima PCNA-pol δ de replicación competente.

La inclinación de PCNA anclada en el DNA provoca la asimetría del sistema y, por tanto, la ruptura de la equivalencia de los tres sitios de unión a PIP-box. Esta asimetría de la pinza y, en consecuencia, de sus sitios de unión a las diversas proteínas y factores con las que interacciona, podría ser determinante para establecer quién, cómo, cuándo y dónde se une a la pinza.

En todas las trayectorias obtenidas, el DNA no permanece en el centro del anillo de PCNA y se aproxima a una de sus subunidades. El posicionamiento del DNA más próximo a una subunidad de PCNA, así como la inclinación de esta, debe proporcionar un DNA en la disposición adecuada para encajar en el centro catalítico de Pol δ , por eso en la replicación eucariota no es necesario un «marcador de posición» como ocurre en la bacteriana.

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que muchos de los residuos de PCNA en la interfaz de la interacción PCNA-DNA pueden intercambiar aleatoriamente fosfatos de DNA adyacentes en una escala de tiempo inferior a los nanosegundos. Este proceso estocástico de cambio de la pareja de interacción generará eventualmente un estado donde se establecen simultáneamente un número suficiente de contactos de los residuos de PCNA de dicha interfaz con fosfatos adyacentes en la dirección del eje helicoidal dando como resultado una rotación neta de la proteína y el avance de un par de bases del DNA.

Proponemos un mecanismo molecular de difusión de PCNA a lo largo del DNA al que denominamos de «rueda dentada» y en el que la pinza se desliza siguiendo el esqueleto de fosfatos mediante el establecimiento de interacciones polares efímeras en la interfaz del complejo entre los residuos K77, K20, K217, R149 (de una subunidad) y K80 (de la contigua) de PCNA con cinco fosfatos i consecutivos del esqueleto de DNA más intensas, e interacciones menos intensas entre esos mismos residuos y los fosfatos $(i+1)$ e $(i-1)$.

El mecanismo de tipo «rueda dentada» es consecuencia, pues, del mantenimiento de las interacciones entre los residuos de PCNA K20, K77, K80, R149 y K217 y el DNA, que forman una hélice a derechas en la superficie interna del anillo que coincide con el paso helicoidal del DNA y cuya interacción máxima se da cuando PCNA se coloca inclinada respecto al DNA y no perpendicular. Este mecanismo de deslizamiento permitiría a PCNA el seguimiento del esqueleto de fosfatos del DNA en los dos sentidos posibles, manteniendo los contactos PCNA-DNA que conservan la pinza en una posición definida relativa a la doble hélice, manteniéndola a la distancia y con la orientación adecuadas y constantes respecto al DNA exigidas para la interacción provechosa con las proteínas que se unen al bolsillo de unión a PIP-box en general, y con Pol δ en particular.

Tal y como indican los valores de RMSD de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNAK20ac-DNA en comparación con los del sistema PCNA-DNA, la pérdida de uno de los residuo clave (K20) en la interfaz PCNA-DNA para una correcta orientación y difusión de la pinza inestabiliza la interacción entre PCNA y el DNA.

El estudio de las distancias entre los residuos K20ac y los residuos K77, K80 y K217 refleja la aparición de enlaces de hidrógeno entre ellos a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular. El establecimiento de estos enlaces de hidrógeno provoca una disminución de la densidad de carga positiva en el entorno de K20ac que afecta a los residuos K77 y K217 de su subunidad y al residuo K80 de la subunidad contigua, lo que supone una pérdida de carga positiva en el $\approx 67\%$ de la superficie de deslizamiento de PCNA en el DNA. Esta pérdida debe estar relacionada con la pérdida de procesividad de Pol δ tras esta modificación postraduccional.

Los resultados de cristalografía y RMN son consistentes con la existencia de solapamiento parcial entre los sitios de unión de p15 y DNA a PCNA lo que sugiere que, en solución, p15 puede competir con la unión del DNA.

El análisis de componentes principales de la evolución de la posición del DNA dentro del anillo de PCNA en una simulación de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ muestra al DNA comenzando la simulación en una posición centrada en el canal del anillo y que se mueve rápidamente a una posición no centrada, acercándose inclinado a la subunidad de PCNA que han dejado libre los dos péptidos de p15, e interactuando simultáneamente, además de con la cara interna de PCNA, con residuos en la cara frontal y en la trasera.

El análisis de los contactos entre el DNA y la subunidad no ocupada por p15 en PCNA en el complejo PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ a lo largo de las trayectorias de dinámica molecular muestra interacciones entre fosfatos consecutivos de una de las hebras del DNA y los residuos K77, K20, K217, R159 y K80 de la cara interna de PCNA. Luego en presencia de dos moléculas de p15, el DNA puede unirse a la superficie de deslizamiento que queda libre en PCNA y mantener su orientación gracias a las interacciones establecidas., coincidiendo con los resultados de cristalografía y RMN.

Las cadenas laterales de residuos de la interfaz PCNA-DNA en las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ pueden aleatoriamente cambiarse entre fosfatos adyacentes del DNA en una escala de tiempo por debajo de los nanosegundos, por tanto las interacciones necesarias para que PCNA difunda en modo rueda dentada se mantienen en el sistema ternario.

El análisis de los valores de RMSF de las simulaciones de dinámica molecular del sistema PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ muestra que los residuos 52-61 del N-ternal de la PIP-box de p15 están anclados de manera estable a la pared interna del anillo de PCNA, mientras que los residuos 47-51 del N-ter permanecen más flexibles.

En las simulaciones de dinámica molecular, el N-ter desordenado de los fragmentos de p15 estudiados (p15⁴⁷⁻⁷⁰) se asoma por la cara trasera de PCNA.

El número limitado de contactos entre p15 y el DNA observados en nuestro análisis computacional sugiere que la IDP funciona principalmente como un obstáculo estérico pasivo restringiendo al DNA en el canal de la abrazadera. Dos moléculas de p15 se unen a PCNA y protegen residuos clave en su superficie deslizante, confinando el DNA a posiciones concretas.

Considerando las afinidades de las PIP-box por PCNA comparables, Pol η y p15 pueden coexistir en un homotrímero de PCNA, y la superposición de las estructuras PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ y pol η -PCNA-DNA apoya esta hipótesis. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados bioquímicos que indican que la inhibición debe producirse por la formación de una holoenzima defectuosa, debemos pensar que la disposición que adquiere Pol η en la holoenzima en presencia de p15 no es la adecuada para llevar a cabo su actividad.

El análisis de los valores de RMSF de las trayectorias de dinámica molecular de los sistemas PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15 muestra que el orden de estabilidad de PCNA en los diferentes sistemas es: PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA-DNA.

Aunque los residuos de las interfaces de las subunidades de PCNA (L175-S183 y E109-K117) tienen valores de RMSF bajos en comparación con el resto de la molécula, las comparación de los valores de RMSF de los tres sistemas (PCNA, PCNA-DNA y PCNA-DNA-p15.) muestra el

mismo patrón que el obtenido con el análisis de PCNA completa, es decir, PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA-DNA.

El estudio de estabilidad a partir del análisis de los valores de RMSF obtenidos de trayectorias de dinámica molecular parece indicar que PCNA se desestabiliza al unirse al DNA, pero la presencia de p15 en sus bolsillos hidrofóbicos estabiliza el sistema, recobrando PCNA la estabilidad que tenía en solución. Por lo tanto, p15 estabiliza el anillo de PCNA cerrado alrededor del DNA evitando así su apertura prematura. y reforzando su procesividad.

La comparación entre una titulación de RMN de PCNA-p15⁵⁰⁻⁷⁷ con dsDNA y una titulación de PCNA con dsDNA (en ausencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷) indica que la presencia de p15⁵⁰⁻⁷⁷ aumenta la afinidad aparente del DNA por PCNA.

Como p15 y RFC comparten los sitios de unión a PCNA y 1) el impedimento estérico impide que ambas proteínas los ocupen a la vez; 2) p15 interrumpe la complementariedad de cargas entre las superficies de PCNA y RFC; y 3) p15 presenta, cuando está unida al bolsillo hidrofóbico de PCNA, dos residuos con carga positiva apuntando directamente hacia zonas de carga positiva de la superficie de RFC; entonces, la presencia de p15 en el anillo de PCNA impide que RFC se ancle a ella para abrirla y liberla del DNA.

Tras todos estos estudios, podríamos resumir las funciones de p15 en el replisoma así: p15 abrocha el DNA a la superficie de deslizamiento de PCNA y, por lo tanto, modula la superficie de interacción PCNA-DNA; p15 mantiene la difusión de PCNA en modo rueda dentada; p15 estabiliza el anillo de PCNA anclado al DNA; p15 protege la procesividad de la holoenzima pol δ y controla el baipás de una lesión en el DNA; y p15 modera la velocidad del replisoma.

Catalá

Els resultats de cristal·lografia mostren que la interfície PCNA-DNA implica les cadenes laterals de cinc residus bàsics de PCNA, quatre (K20, K77, R149, H153 i K217) distribuïts en quatre α -hèlixs d'una subunitat de PCNA, i un cinquè residu (K80) a l' α -hèlix més propera de la subunitat adjacent, que configuren una espiral a dretes que coincideix estretament amb el pas de gir del DNA tipus B i estan implicades en contactes polars amb cinc fosfats consecutius d'una única cadena de dsDNA.

Els resultats de RMN mostren que PCNA té tres d'aquestes superfícies de lliscament al DNA equivalents, una per cadascuna de les tres subunitats, i que la interacció amb el DNA s'estén a les cares davantera i posterior de PCNA.

Les nostres simulacions de dinàmica molecular de 100 ns de PCNA formant complex amb un dsDNA de 10 pb prediuen una interacció altament dinàmica, d'acord amb totes les nostres observacions experimentals. Les simulacions de dinàmica molecular del sistema PCNA-DNA, amb dsDNA tant de 10 pb (de 100 ns) com de 30 pb (de 250 ns), confirmen la disposició vista a l'estructura cristal·logràfica en què el DNA s'aproxima a la cara interna de l'anell de PCNA i no roman al centre, i indiquen que els 25 ns de simulacions precedents són insuficients perquè el sistema assoleixi una conformació estable.

Al llarg de la simulació de dinàmica molecular de 100 ns del sistema PCNA-DNA, el DNA passa d'una posició inicial a una final que equival al desplaçament del DNA a l'estructura cristal·logràfica de dos parells de bases al llarg del seu eix helicoidal. L'anàlisi de distàncies dels contactes polars intermoleculars al llarg de les trajectòries de dinàmica molecular de 100 ns indica que residus de la cara posterior de l'anell (S10, K14, K84) contribueixen també a conduir el DNA a l'estat final en què es ha produït aquest avenç en dos parells de bases.

La simulació de dinàmica molecular del sistema PCNA-DNA de 250 ns dóna suport al resultat d'una doble hèlix de DNA interaccionant simultàniament i de forma dinàmica amb dos conjunts de residus en dues subunitats adjacents de PCNA, tant a la cara interna de l'anell, com a la frontal i al darrere. Segons els resultats de les simulacions, els residus de PCNA que estableixen contactes amb el DNA són: a) a l'interior de l'anell, K20, K80 i N84 d'una subunitat, i R149, K217, K80 i N84 de la subunitat adjacent, b) a la cara frontal, R210 en una subunitat i K77 i K20 a la contigua, ic) a la cara posterior, S10 i S223 en un monòmer i K14 al del costat.

Les simulacions de dinàmica molecular mostren que els residus de l'interior del canal de PCNA implicats en les principals interaccions amb el DNA formen una hèlix a dretes a la superfície interna de l'anell de PCNA que coincideix amb el pas helicoidal del DNA tipus B i la interacció màxima del qual es dóna quan PCNA es col·loca inclinada respecte del DNA i no perpendicular.

El DNA al final de les trajectòries de 250 ns, de longitud 30 pb, mostra una inclinació respecte al pla de l'anell de PCNA de $\approx 30^\circ$.

Les interaccions que es donen entre residus de PCNA i fosfats de DNA a la interfície de lliscament de la pinça, mantenen l'orientació de PCNA invariant en relació amb la doble hèlix, i una pinça correctament orientada al DNA és necessària per a l'assemblatge d'una holoenzim PCNA-pol δ de replicació competent.

La inclinació de PCNA ancorada al DNA provoca l'asimetria del sistema i, per tant, la ruptura de l'equivalència dels tres llocs d'unió a PIP-box. Aquesta asimetria de la pinça i, en conseqüència, dels seus llocs d'unió a les diverses proteïnes i factors amb què interacciona, podria ser determinant per establir qui, com, quan i on s'uneix a la pinça.

En totes les trajectòries obtingudes, el DNA no roman al centre de l'anell de PCNA i s'aproxima a una de les subunitats. El posicionament del DNA més proper a una subunitat de PCNA, així com la inclinació d'aquesta, ha de proporcionar un DNA en la disposició adequada per encaixar al centre catalític de Pol δ , per això en la replicació eucariota no cal un «marcador de posició» com passa a la bacteriana.

Les simulacions de dinàmica molecular mostren que molts dels residus de PCNA a la interfície de la interacció PCNA-DNA poden intercanviar aleatòriament fosfats de DNA adjacents en una escala de temps inferior als nanosegons. Aquest procés estocàstic de canvi de la parella d'interacció generarà eventualment un estat on s'estableixen simultàniament un nombre suficient de contactes dels residus de PCNA d'aquesta interfície amb fosfats adjacents en la direcció de l'eix helicoidal donant com a resultat una rotació neta de la proteïna i l'avenç d'un parell de bases del DNA.

Proposem un mecanisme molecular de difusió de PCNA al llarg del DNA que anomenem de «roda dentada» i en què la pinça llisca seguint l'esquelet de fosfats mitjançant l'establiment d'interaccions polars efímeres a la interfície del complex entre els residus K77, K20, K217, R149 (d'una subunitat) i K80 (de la contigua) de PCNA amb cinc fosfats i consecutius de l'esquelet de DNA més intenses, i interaccions menys intenses entre aquests mateixos residus i els fosfats $(i+1)$ i $(i-1)$.

El mecanisme de tipus «roda dentada» és conseqüència, doncs, del manteniment de les interaccions entre els residus de PCNA K20, K77, K80, R149 i K217 i el DNA, que formen una hèlix a dretes a la superfície interna de l'anell que coincideix amb el pas helicoidal del DNA i la interacció màxima del qual es dona quan PCNA es col·loca inclinada respecte al DNA i no perpendicular. Aquest mecanisme de lliscament permetria a PCNA el seguiment de l'esquelet de fosfats del DNA en els dos sentits possibles, mantenint els contactes PCNA-DNA que conserven la pinça en una posició definida relativa a la doble hèlix, mantenint-la a la distància i amb l'orientació adequades i constants respecte al DNA exigides per a la interacció profitosa amb les proteïnes que s'uneixen a la butxaca d'unió a PIP-box en general, i amb Pol δ en particular.

Tal com indiquen els valors de RMSD de les simulacions de dinàmica molecular del sistema PCNAK20ac-DNA en comparació amb els del sistema PCNA-DNA, la pèrdua d'un dels residus clau (K20) a la interfície PCNA-DNA per a una correcta orientació i difusió de la pinça inestabilitza la interacció entre PCNA i el DNA.

L'estudi de les distàncies entre els residus K20ac i els residus K77, K80 i K217 reflecteix l'aparició d'enllaços d'hidrogen entre ells al llarg de les trajectòries de dinàmica molecular. L'establiment d'aquests enllaços d'hidrogen provoca una disminució de la densitat de càrrega positiva a l'entorn de K20ac que afecta els residus K77 i K217 de la seva subunitat i el residu K80 de la subunitat contigua, fet que suposa una pèrdua de càrrega positiva a el $\approx 67\%$ de la superfície de lliscament de PCNA al DNA. Aquesta pèrdua ha d'estar relacionada amb la pèrdua de processivitat de Pol δ després d'aquesta modificació postraduccional.

Els resultats de cristal·lografia i RMN són consistents amb l'existència de solapament parcial entre els llocs d'unió de p15 i DNA a PCNA el que suggereix que, en solució, p15 pot competir amb la unió del DNA.

L'anàlisi de components principals de l'evolució de la posició del DNA dins de l'anell de PCNA en una simulació de dinàmica molecular del sistema PCNA-DNA-p1547-70 mostra al DNA començant la simulació en una posició centrada al canal de l'anell i que es mou ràpidament a una posició no centrada, acostant-se inclinat a la subunitat de PCNA que han deixat lliure els dos pèptids de p15, i interactuant simultàniament, a més de amb la cara interna de PCNA, amb residus a la cara frontal i a la posterior.

L'anàlisi dels contactes entre el DNA i la subunitat no ocupada per p15 a PCNA al complex PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ al llarg de les trajectòries de dinàmica molecular mostra interaccions entre fosfats consecutius d'un dels fils del DNA i els residus K77, K20, K217, R159 i K80 de la cara interna de PCNA. Després en presència de dues molècules de p15, el DNA es pot unir a la superfície de lliscament que queda lliure a PCNA i mantenir la seva orientació gràcies a les interaccions establertes., coincidint amb els resultats de cristal·lografia i RMN.

Les cadenes laterals de residus de la interfície PCNA-DNA a les simulacions de dinàmica molecular del sistema PCNA-DNA-p1547-70 poden aleatòriament canviar-se entre fosfats adjacents del DNA en una escala de temps per sota dels nanosegons, per tant les interaccions necessàries perquè PCNA difongui en mode roda dentada es mantenen al sistema ternari.

L'anàlisi dels valors de RMSF de les simulacions de dinàmica molecular del sistema PCNA-DNA-p1547-70 mostra que els residus 52-61 del N-ternal de la PIP-box de p15 estan ancorats de manera estable a la paret interna del anell de PCNA, mentre que els residus 47-51 del N-ter romanen més flexibles.

En les simulacions de dinàmica molecular, el N-ter desordenat dels fragments de p15 estudiats (p15⁴⁷⁻⁷⁰) treu el cap per la cara posterior de PCNA.

El nombre limitat de contactes entre p15 i el DNA observats a la nostra anàlisi computacional suggereix que la IDP funciona principalment com un obstacle estèric passiu restringint el DNA al canal de l'abraçadora. Dues molècules de p15 s'uneixen a PCNA i protegeixen residus clau a la seva superfície lliscant, confinant el DNA a posicions concretes.

Considerant les afinitats de les PIP-box per PCNA comparables, Pol η i p15 poden coexistir en un homotrimer de PCNA, i la superposició de les estructures PCNA-p1550-77 i pol η -PCNA-DNA dóna suport a aquesta hipòtesi. No obstant això, tenint en compte els resultats bioquímics que indiquen que la inhibició s'ha de produir per la formació d'una holoenzima defectuosa, hem de pensar que la disposició que adquireix Pol η a l'holoenzima en presència de p15 no és l'adequada per dur a terme la seva activitat .

L'anàlisi dels valors de RMSF de les trajectòries de dinàmica molecular dels sistemes PCNA, PCNA-DNA i PCNA-DNA-p15 mostra que l'ordre d'estabilitat de PCNA en els diferents sistemes és: PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA -DNA.

Tot i que els residus de les interfícies de les subunitats de PCNA (L175-S183 i E109-K117) tenen valors de RMSF baixos en comparació amb la resta de la molècula, les comparació dels valors de RMSF dels tres sistemes (PCNA, PCNA- DNA i PCNA-DNA-p15.) mostra el mateix patró que l'obtingut amb l'anàlisi de PCNA completa, és a dir, PCNA-DNA-p15 > PCNA > PCNA-DNA.

L'estudi d'estabilitat a partir de l'anàlisi dels valors de RMSF obtinguts de trajectòries de dinàmica molecular sembla indicar que PCNA es desestabilitza en unir-se al DNA, però la presència de p15 a les butxaques hidrofòbiques estabilitza el sistema, recobrant PCNA l'estabilitat que tenia a solució. Per tant, p15 estabilitza l'anell de PCNA tancat al voltant del DNA i evita així la seva obertura prematura, i reforçant-ne la processivitat.

La comparació entre una titulació de RMN de PCNA-p1550-77 amb dsDNA i una titulació de PCNA amb dsDNA (en absència de p1550-77) indica que la presència de p1550-77 augmenta l'afinitat aparent del DNA per PCNA.

Com que p15 i RFC comparteixen els llocs d'unió a PCNA i 1) l'impediment estèric impedeix que les dues proteïnes els ocupin alhora; 2) p15 interromp la complementaritat de càrregues entre les superfícies de PCNA i RFC; i 3) p15 presenta, quan està unida a la butxaca hidrofòbica de PCNA, dos residus amb càrrega positiva apuntant directament cap a zones de càrrega positiva de la superfície de RFC; aleshores, la presència de p15 a l'anell de PCNA impedeix que RFC s'hi ancori per obrir-la i alliberar-la del DNA.

Després de tots aquests estudis, podríem resumir les funcions de p15 al replisoma així: p15 corda el DNA a la superfície de lliscament de PCNA i, per tant, modula la superfície d'interacció PCNA-DNA; p15 manté la difusió de PCNA en mode roda dentada; p15 estabilitza l'anell de PCNA ancorat al DNA; p15 protegeix la processivitat de l'holoenzim pol δ i controla el baix pas d'una lesió al DNA; i p15 modera la velocitat del replisoma.

English

The results of crystallography show that the PCNA-DNA interface involves the side chains of five basic PCNA residues, four (K20, K77, R149, H153 and K217) distributed in four α -helices of a PCNA subunit, and a fifth residue (K80) in the closest α -helix of the adjacent subunit, which form a right-hand spiral that closely coincides with the turning path of type B-DNA and are involved in polar contacts with five consecutive phosphates of a single dsDNA chain.

The NMR results show that PCNA has three of these equivalent DNA sliding surfaces, one for each of its three subunits, and the interaction with DNA extends to the front and back faces of PCNA.

Throughout the 100 ns molecular dynamics simulation of the PCNA-DNA system, the DNA passes from an initial to a final position that is equivalent to the displacement of DNA in the crystallographic structure of two base pairs along its helical axis. The distance analysis of the intermolecular polar contacts along the 100 ns molecular dynamics trajectories indicates that residues on the back face of the ring (S10, K14, K84) also contribute to driving the DNA to this final state.

The 250 ns molecular dynamics simulation of the PCNA-DNA system supports the result of a DNA double helix interacting simultaneously and dynamically with two sets of residues in two adjacent subunits of PCNA: on the inner face, on the front and on the back of the ring. According to the results of the simulations, the PCNA residues that establish contacts with the DNA are: a) inside the ring, K20, K80 and N84 of one subunit, and R149, K217, K80 and N84 of the adjacent subunit, b) on the front face, R210 in one subunit and K77 and K20 in the adjoining one, and c) in the back face, S10 and S223 in one monomer and K14 in the one next.

Molecular dynamics simulations show that the residues inside the PCNA channel involved in the main interactions with DNA form a right-hand helix on the inner surface of the PCNA ring that coincides with the helical pitch of B-DNA and whose maximum interaction occurs when PCNA is placed inclined with respect to the DNA and not perpendicular.

The DNA at the end of the 250 ns trajectories, of length 30 bp, shows an inclination respective to the plane of the PCNA ring of $\approx 30^\circ$.

The interactions between PCNA residues and DNA phosphates at the gliding interface of the clamp maintain the orientation of PCNA invariant about the double helix, and a correctly oriented clamp in the DNA is necessary for the assembly of a replication-competent PCNA-pol δ holoenzyme.

The inclination of PCNA respective to the DNA renders the system asymmetric, differentiating the three PIP-boxes.

This asymmetry of the sliding clamp could be decisive in establishing which partner joins the clamp.

In all the trajectories obtained, the DNA does not remain in the centre of the PCNA ring but approaches one of its subunits. The positioning of the DNA closest to a PCNA subunit, as well as the inclination of this subunit, must provide a DNA in the suitable disposition to fit in the catalytic centre of Pol δ , therefore in eukaryotic replication, a "marker of position" is not necessary.

Molecular dynamics simulations show that many of the PCNA residues at the interface of the PCNA-DNA interaction can randomly exchange adjacent DNA phosphates on a time scale of less than nanoseconds. This stochastic process of change of the interaction partner will eventually generate a state where a sufficient number of contacts of the PCNA residues of this interface are established simultaneously with adjacent phosphates in the direction of the helical axis, resulting in a net rotation of the protein and the advancement of a DNA base pair.

We propose a molecular mechanism for the diffusion of PCNA along with the DNA, which we call a "cogwheel" and in which the clamp slides following the phosphate backbone by establishing ephemeral polar interactions at the interface of the complex between the residues K77, K20, K217, R149 (of a subunit) and K80 (of the contiguous one) of PCNA with five consecutive phosphates i of the DNA backbone more intense, and less intense interactions between those same residues and the phosphates $(i + 1)$ e $(i - 1)$.

The "cogwheel" mechanism is a consequence of the maintenance of interactions between the PCNA residues K20, K77, K80, R149 and K217 and DNA, that form a right-hand helix on the inner surface of the ring that coincides with the helical pitch of the DNA and whose maximum interaction occurs when PCNA is placed inclined with respect to the DNA and not perpendicular. This sliding mechanism would allow PCNA to follow the phosphate backbone of the DNA in both possible directions, keeping the PCNA-DNA contacts that hold the clamp in a defined position relative to the double helix, keeping it at the proper distance and orientation required for beneficial interaction with proteins that bind to the PIP-box binding pocket in general, and with Pol δ in particular.

As indicated by the RMSD values of the molecular dynamics simulations of the PCNAK20ac-DNA system compared to those of the PCNA-DNA system, the loss of one of the critical residues (K20) at the PCNA-DNA interface for correct orientation and clamp diffusion destabilizes the interaction between PCNA and DNA.

The study of the distances between the K20ac residues and the K77, K80 and K217 residues reflects the appearance of hydrogen bonds between them along the molecular dynamics trajectories. The establishment of these hydrogen bonds causes a decrease in the density of positive charge in the environment of K20ac that affects the K77 and K217 residues of its subunit and the K80 residue of the adjacent subunit, which implies a loss of positive charge in $\approx 67\%$ of the PCNA sliding surface in DNA. This loss must be related to the loss of processivity of Pol δ after this post-translational modification.

The results of crystallography and NMR are consistent with the existence of a partial overlap between the binding sites of p15 and DNA to PCNA, suggesting that, in solution, p15 can compete with the binding of DNA.

Principal component analysis of the DNA position evolution within the PCNA ring in a molecular dynamics simulation of the PCNA-DNA-p1547-70 system shows the DNA starting the simulation at a centered position in the ring channel and moving rapidly to a non-centered position, approaching inclined to the subunit of PCNA that the two peptides of p15 have freed, and interacting simultaneously, in addition to the internal face of PCNA, with residues on the front and the back.

Contact analysis between the DNA and the subunit not occupied by p15 in PCNA in the complex PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ along the molecular dynamics trajectories shows interactions between consecutive phosphates of one of the DNA strands and the residues K77, K20, K217, R159 and

K80 of the internal face of PCNA. Then, in the presence of two p15 molecules, the DNA can bind to the sliding surface that remains free in PCNA and maintain its orientation thanks to the established interactions, consistent with the results of crystallography and NMR.

The side chains of residues of the PCNA-DNA interface in the molecular dynamics simulations of the PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ system can be randomly switched between adjacent DNA phosphates on a time scale of less than nanoseconds. Thus the necessary interactions for PCNA to diffuse in cogwheel mode remain in the ternary system.

Analysis of the RMSF values from the molecular dynamics simulations of the PCNA-DNA-p15⁴⁷⁻⁷⁰ system shows that residues 52-61 of the N-terminal of the PIP-box of p15 are stably anchored to the inner wall of the PCNA ring, while residues 47-51 of the N-term remain more flexible.

In the molecular dynamics simulations, the disordered N-term of the studied p15 fragments (p15⁴⁷⁻⁷⁰) protrudes from the back face of PCNA.

The limited number of contacts between p15 and DNA observed in our computational analysis suggests that IDP functions primarily as a passive steric obstacle restricting DNA in the clamp channel. Two p15 molecules bind to PCNA and protect key residues on its sliding surface, confining DNA to specific positions.

IV. Miscelánea

Acrónimos y abreviaturas

Å: ångstrom

ATP: adenosín trifosfato

C-ter: extremo carbonilo terminal

CSP: perturbación del desplazamiento químico

CTP: citidina trifosfato

Ca: carbono alfa

DNA-B: DNA de tipo B

DNA: ácido desoxirribonucleico

G: guanina

GTP: guanosín trifosfato

HN: protón amida

HR: recombinación homóloga

IDD: dominio intrínsecamente desordenado

IDP: proteína intrínsecamente desordenada

IDR: región intrínsecamente desordenada

ITC: calorimetría de titulación isotérmica

MMS: metil-metano sulfonato

MPT: modificación postraduccional

Mr: masa molecular

N-ter: extremo amino terminal

NER: reparación por escisión de nucleótido

NTP: nucleósido trifosfato

P/T: unión cebador/plantilla

PCA: análisis de componentes principales

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación

PCNAK20ac: PCNA con la lisina 20 acetilada

PIP-box: dominio de interacción con PCNA

PIP: dominio de interacción con PCNA

RFC: factor de replicación C

RMN: resonancia magnética nuclear

RMSD: desviación cuadrática media

RMSF: fluctuación de la desviación cuadrática media

RNA: ácido ribonucleico

RPA: proteína de replicación

SAXS: dispersión de rayos X de ángulo reducido

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SSB: proteína de unión a DNA monocatenario

SV40: virus simio 40

TLS: síntesis translesión

UTP: uridina trifosfato

UV: ultravioleta

cis-Pt: cis platino

dCMP: desoxicitidina monofosfato

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

dsDNA: DNA de hebra doble o doble cadena

fs: femtosegundo

kDa: kilodalton

micros: microsegundo

ms: milisegundo

nm: nanometro

ns: nanosegundo

nt: nucleótido

pDNA: DNA cebado

pI: punto isoeléctrico

pb/s: par de bases por segundo

pb: par de bases

ssDNA: DNA de cadena simple o hebra única.

2D: bidimensional

3D: tridimensional

Material Complementario

PCNA–dsDNA (PDB: 5L7C)	
Data collection	
Space group	H3
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	180.19, 180.19, 76.83
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Resolution (Å)	90.1 - 2.82 (2.97 - 2.82)
R_{merge}	0.093 (0.44)
$I / \sigma I$	2.7 (1.7)
Completeness (%)	99.6 (99.8)
Redundancy	3.1 (3.0)
Refinement	
Resolution (Å)	90.09 - 2.82
No. reflections	21184
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.250 / 0.285
No. atoms	
Protein	5349
Ligand/ion	410
Water	31
<i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	44.25
Ligand/ion	193.67
Water	59.25
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.0206
Bond angles (°)	2.2194

Tabla Complementaria 1: Datos y refinamiento estadístico de cristalografía.

DNA oligo	Sequence (5'-3')
1	ATACGATGGG
2	CCCATCGTAT
3	TTTTATACGATGGG
4	ATACGATGGGATACGATGGGATACGATGGG
5	CCCATCGTATCCCATCGTATCCCATCGTAT

Tabla Complementaria 2

DNA oligo	Sequence (5'-3')
1	ATACGATGGG
2	CCCATCGTAT
3	TTTTATACGATGGG
4	ATACGATGGGATACGATGGGATACGATGGG
5	CCCATCGTATCCCATCGTATCCCATCGTAT

Tabla Complementaria 3

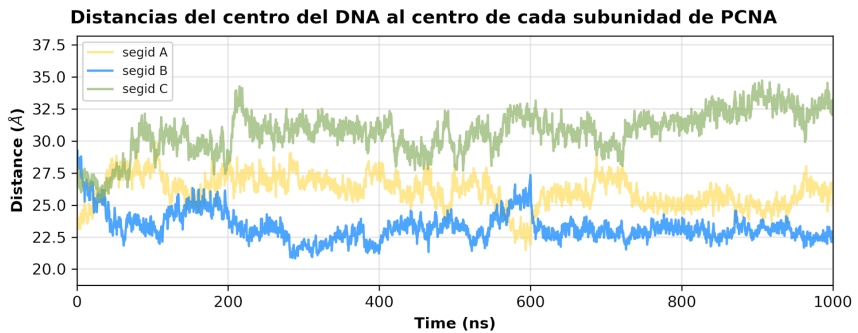
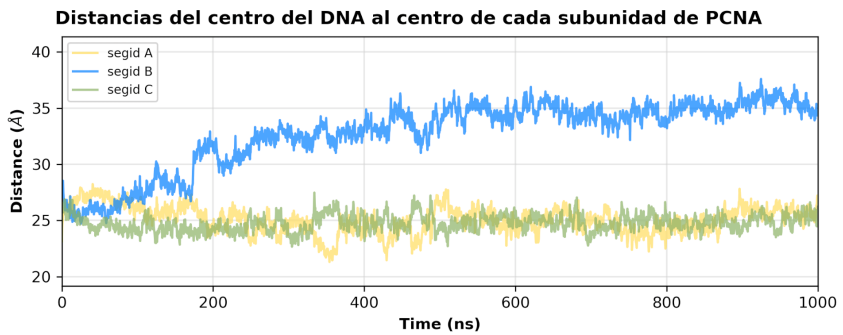
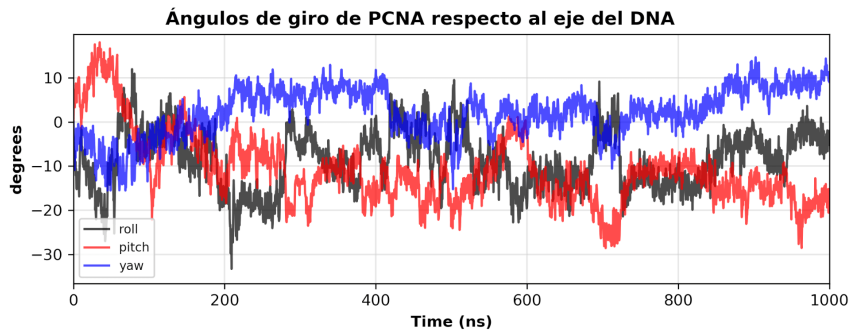
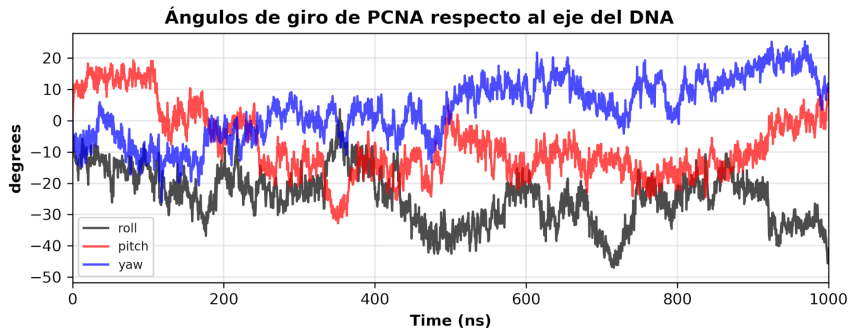


Tabla Complementaria 4

	PDB: 6EHT p15 ⁵⁰⁻⁷⁷ -PCNA-pDNA	PDB: 6GWS p15 ⁴¹⁻⁷² -PCNA
Data collection		
Space group	P2 ₁	P2 ₁
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	75.99, 42.30, 141.83	79.24, 89.75, 85.13
α , β , γ (°)	90, 102.70, 90	90, 117.25, 90
Resolution (Å)	46.12 - 3.20 (3.37 - 3.20)	75.69 - 2.90 (3.08 - 2.90)
<i>R</i> _{merge}	0.105 (0.320)	0.11 (1.113)
<i>R</i> _{PIM}	0.087 (0.257)	0.087 (0.730)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	4.5 (2.0)	4.77 (1.6)
CC(1/2)	0.987 (0.916)	0.986 (0.763)
Completeness (%)	95.3 (98.8)	92.2 (91.3)
Redundancy	2.2 (2.3)	1.8 (1.8)
Refinement		
Resolution (Å)	40.484 - 3.2	44.9 - 2.9
No. reflections	13440	23688
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.26 / 0.33	0.20 / 0.26
No. atoms		
Protein	5229	5882
Peptide	277	538
DNA	410	-
Water	9	10
<i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein	60.6	99.04
Peptide	70.6	98.99
DNA	230.1	-
Water	60.5	70.65
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.0102	0.0030
Bond angles (°)	1.3961	1.2740

Tabla Complementaria 5

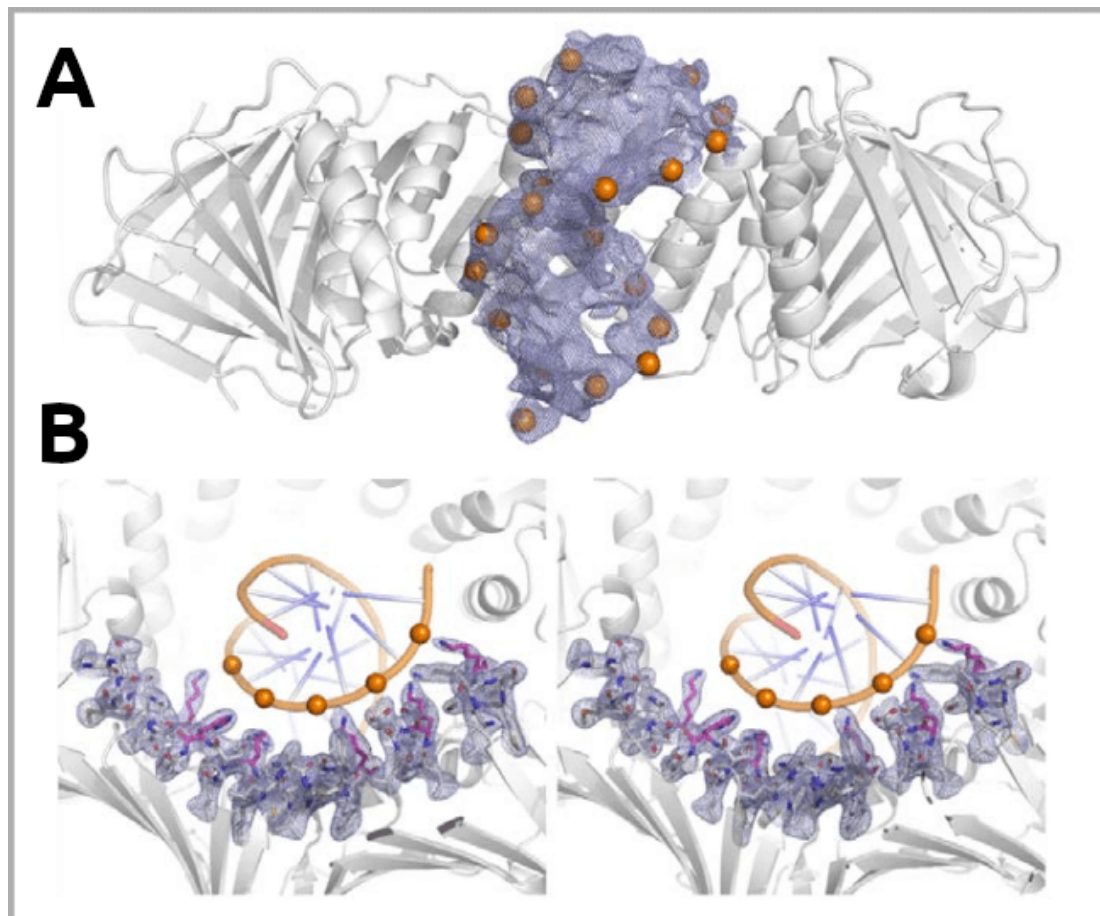


Figura Complementaria 1: Posiciones de los fosfatos del DNA en el anillo de PCNA.

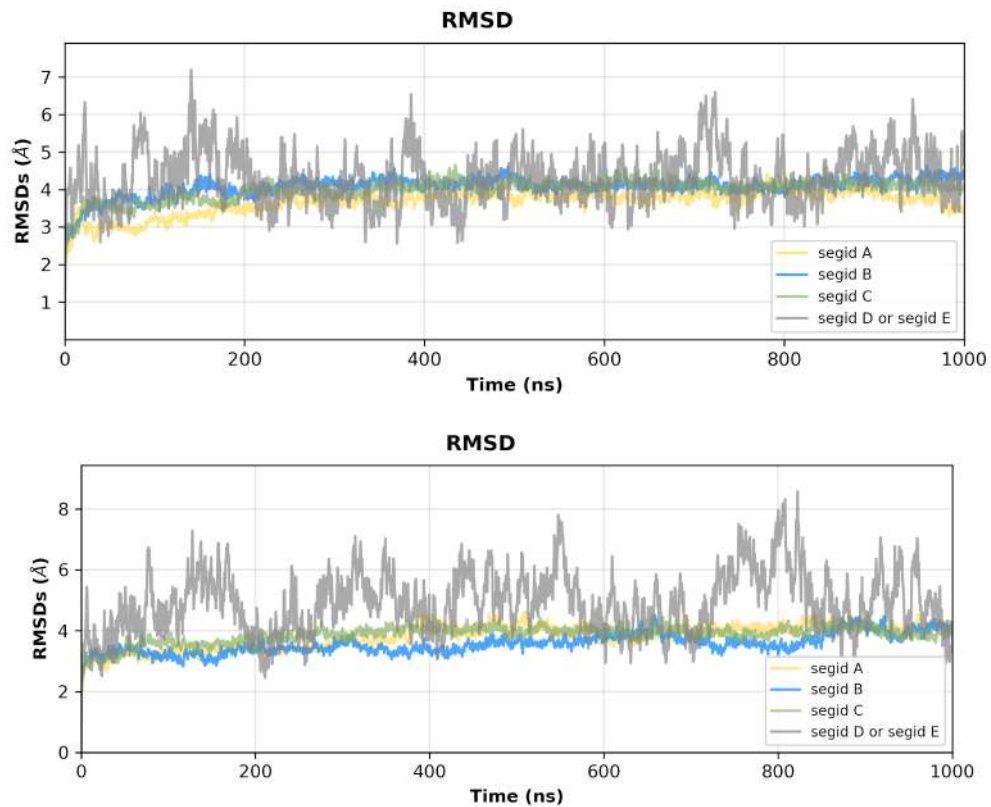


Figura Complementaria 2: valores de RMSD a lo largo de la trayectoria de las dos trayectorias para poner en material complementario.

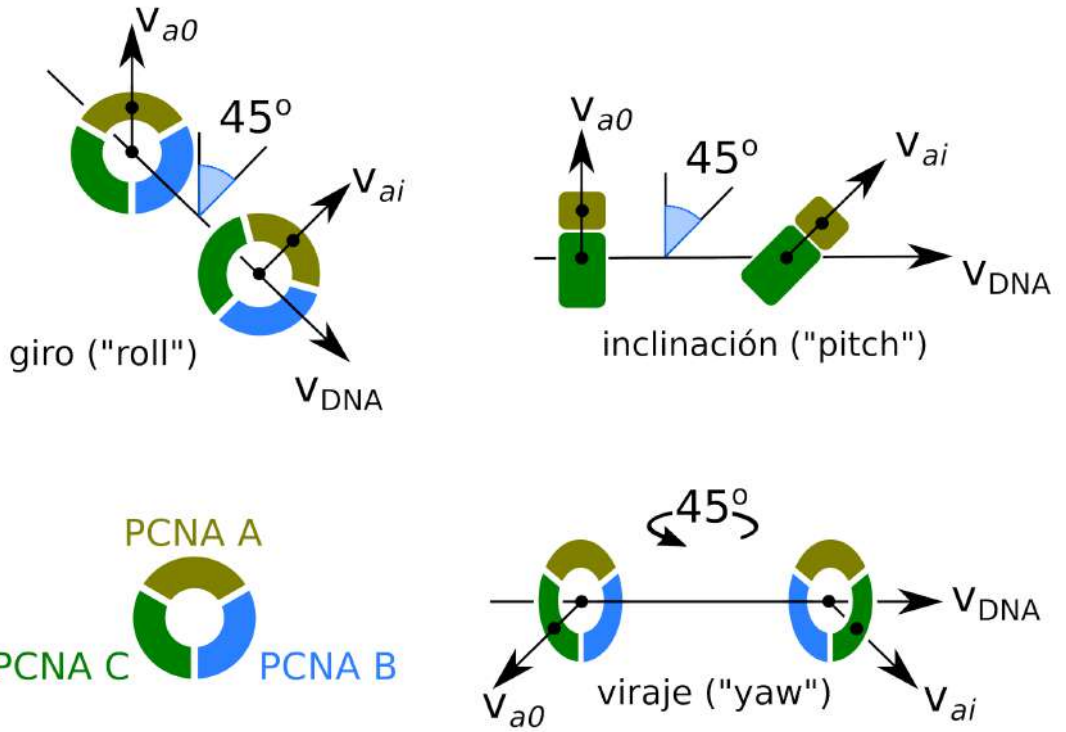


Figura Complementaria 3

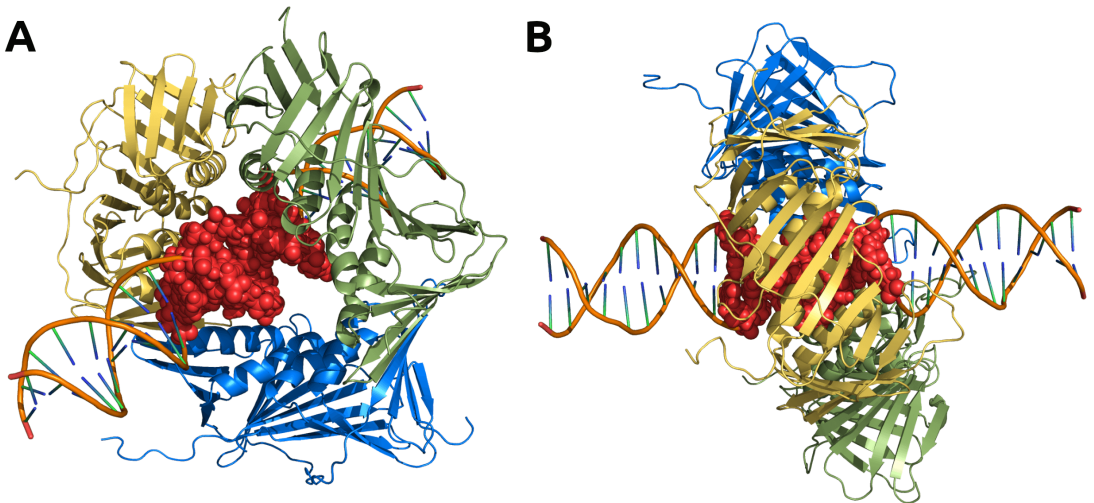


Figura Complementaria 4

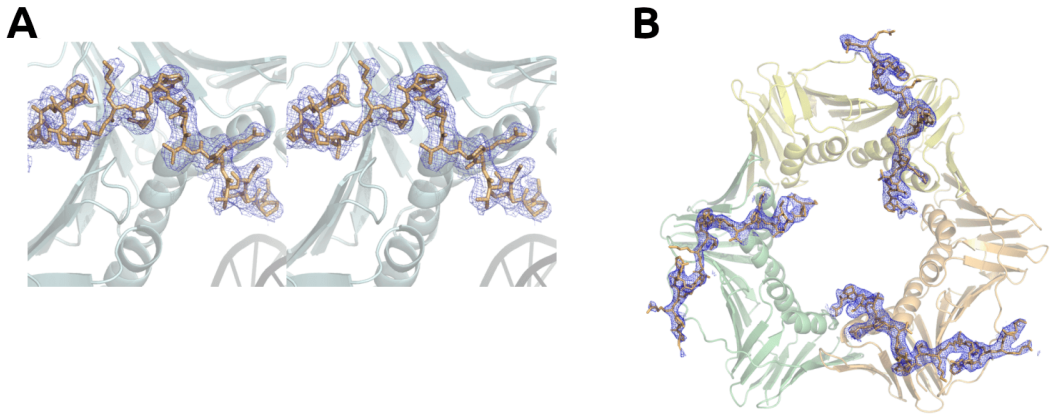


Figura Complementaria 5

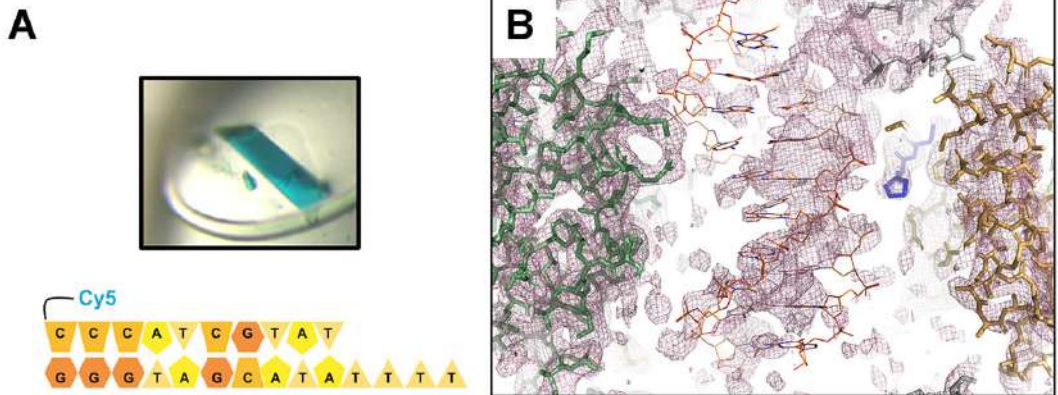


Figura Complementaria 6

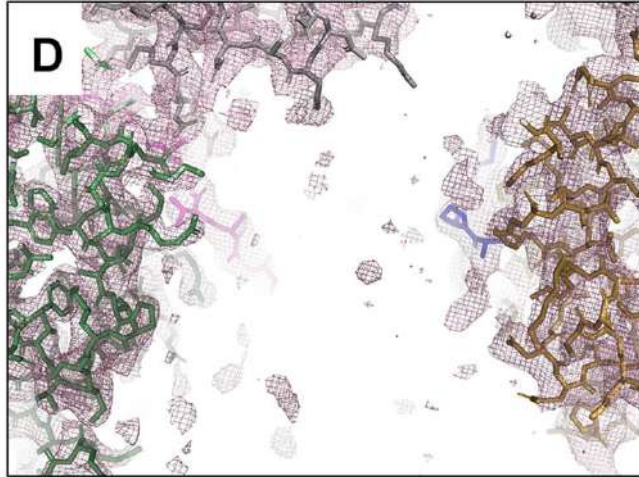


Figura Complementaria 7

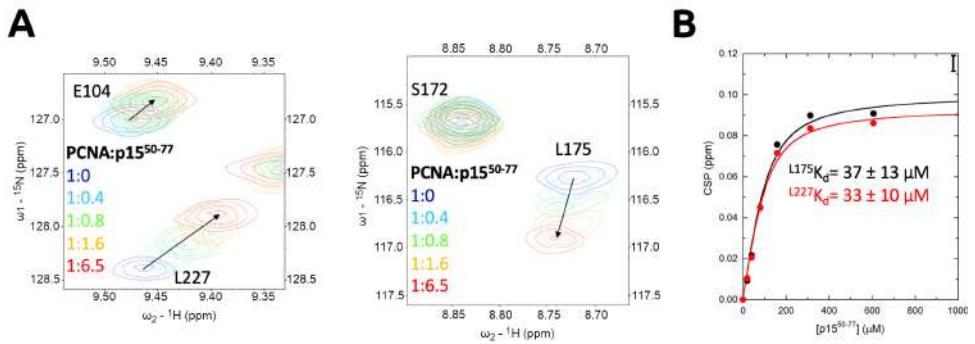


Figura Complementaria 8

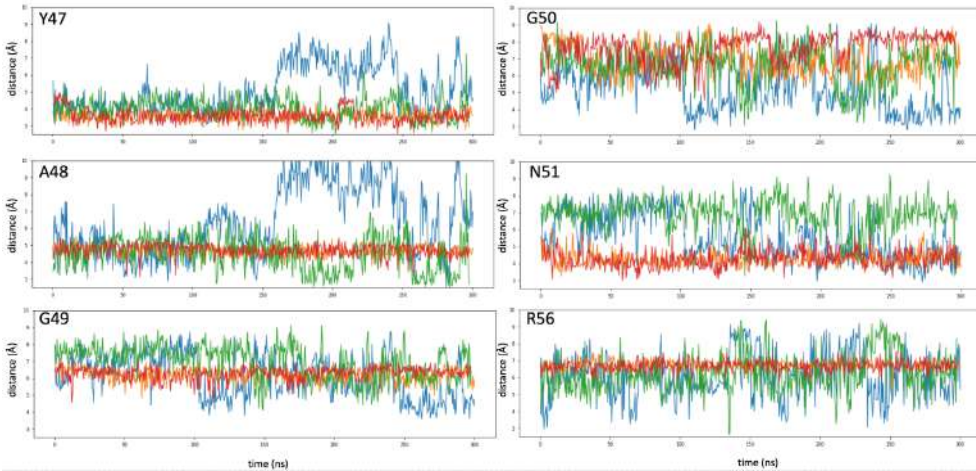


Figura Complementaria 9: Análisis de la interacción entre p15 y el DNA en la simulación de DM de PCNA unida a dos péptidos p15⁴⁷⁻⁷⁰ y un dúplex de DNA de 40 pb. Evolución de las distancias entre los residuos del péptido p15⁴⁷⁻⁷⁰ (átomos de la cadena principal o de la cadena lateral) al fósforo del DNA en la trayectoria de DM para los residuos indicados (los trazos rojos y naranjas corresponden al péptido 1 en la réplica 1 y 2 de DM, respectivamente; los trazos azul y verde corresponden al péptido 2 en la réplica 1 y 2, respectivamente).

Artículos científicos publicados

Sobre esta tesis

«Structural basis of human PCNA sliding on DNA»

Autoras/es: Matteo De March, Nekane Merino, Susana Barrera-Vilarmau, Ramon Crehuet, Silvia Onesti, Francisco J Blanco, Alfredo De Biasio

Nature Communications, 2017 Jan 10; 8:13935.

PMID: 28071730; doi: 10.1038/ncomms13935

Abstract: Sliding clamps encircle DNA and tether polymerases and other factors to the genomic template. However, the molecular mechanism of clamp sliding on DNA is unknown. Using crystallography, NMR and molecular dynamics simulations, here we show that the human clamp PCNA recognizes DNA through a double patch of basic residues within the ring channel, arranged in a right-hand spiral that matches the pitch of B-DNA. We propose that PCNA slides by tracking the DNA backbone via a 'cogwheel' mechanism based on short-lived polar interactions, which keep the orientation of the clamp invariant relative to DNA. Mutation of residues at the PCNA–DNA interface has been shown to impair the initiation of DNA synthesis by polymerase δ (pol δ). Therefore, our findings suggest that a clamp correctly oriented on DNA is necessary for the assembly of a replication-competent PCNA-pol δ holoenzyme.

«p15PAF binding to PCNA modulates the DNA sliding surface»

Autoras/es: Matteo De March*, Susana Barrera-Vilarmau*, Emmanuele Crespan, Elisa Mentegari*, Nekane Merino, Amaia Gonzalez-Magaña, Miguel Romano-Moreno, Giovanni Maga, Ramon Crehuet, Silvia Onesti, Francisco J Blanco, Alfredo De Biasio

* igual contribución

Nucleic Acids Research, 2018 Oct 12;46(18):9816-9828.

PMID: 30102405; doi: 10.1093/nar/gky723

Abstract: p15^{PAF} is an oncogenic intrinsically disordered protein that regulates DNA replication and lesion bypass by interacting with the human sliding clamp PCNA. In the absence of DNA, p15^{PAF} traverses the PCNA ring via an extended PIP-box that contacts the sliding surface. Here, we probed the atomic-scale structure of p15PAF-PCNA-DNA ternary complexes. Crystallography and MD simulations show that, when p15^{PAF} occupies two subunits of the PCNA homotrimer, DNA within the ring channel binds the unoccupied subunit. The structure of PCNA-bound p15^{PAF} in the absence and presence of DNA is invariant, and solution NMR confirms that DNA does not displace p15^{PAF} from the ring wall. Thus, p15^{PAF} reduces the available sliding surfaces of PCNA, and may function as a belt that fastens the DNA to the clamp during synthesis by the replicative polymerase (pol δ). This constraint, however, may need to be released for efficient DNA lesion bypass by the translesion synthesis polymerase (pol η). Accordingly, our biochemical data show that p15^{PAF} impairs primer synthesis by pol η -PCNA holoenzyme against both damaged and normal DNA templates. In light of our findings, we discuss the possible mechanistic roles of p15PAF in DNA replication and suppression of DNA lesion bypass.

Durante el transcurso de esta tesis

«ASC pyrin domain self-associates and binds NLRP3 protein using equivalent binding interfaces»

Autoras/es: Javier Oroz, Susana Barrera-Vilarmau, Carlos Alfonso, Germán Rivas, Eva de Alba

Journal of Biological Chemistry, 2016 Sep 9;291(37):19487-501.

PMID: 27432880; doi: 10.1074/jbc.M116.741082

Abstract: Death domain superfamily members typically act as adaptors mediating in the assembly of supramolecular complexes with critical apoptosis and inflammation functions. These modular proteins consist of death domains, death effector domains, caspase recruitment domains, and pyrin domains (PYD). Despite the high structural similarity among them, only homotypic interactions participate in complex formation, suggesting that subtle factors differentiate each interaction type. It is thus critical to identify these factors as an essential step toward the understanding of the molecular basis of apoptosis and inflammation. The proteins apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and NLRP3 play key roles in the regulation of apoptosis and inflammation through self-association and protein-protein interactions mediated by their PYDs. To better understand the molecular basis of their function, we have characterized ASC and NLRP3 PYD self-association and their intermolecular interaction by solution NMR spectroscopy and analytical ultracentrifugation. We found that ASC self-associates and binds NLRP3 PYD through equivalent protein regions, with higher binding affinity for the latter. These regions are located at opposite sides of the protein allowing multimeric complex formation previously shown in ASC PYD fibril assemblies. We show that NLRP3 PYD coexists in solution as a monomer and highly populated large-order oligomerized species. Despite this, we determined its monomeric three-dimensional solution structure by NMR and characterized its binding to ASC PYD. Using our novel structural data, we propose molecular models of ASC-ASC and ASC-NLRP3 PYD early supramolecular complexes, providing new insights into the molecular mechanisms of inflammasome and apoptosis signaling.

«Structural models of human ACE2 variants with SARS-CoV-2 Spike protein for structure-based drug design»

Autoras/es: Marija Sorokina, João MC Teixeira, Susana Barrera-Vilarmau, Reinhard Paschke, Ioannis Papatotiriou, João PGLM Rodrigues, Panagiotis L Kastiritis

* todas/os las/os autoras/es con igual contribución

Scientific data, 2020 Sep 16;7(1):309.

PMID: 32938937; doi: 10.1038/s41597-020-00652-6

Abstract: Emergence of coronaviruses poses a threat to global health and economy. The current outbreak of SARS-CoV-2 has infected more than 28,000,000 people and killed more than 915,000. To date, there is no treatment for coronavirus infections, making the development of therapies to prevent future epidemics of paramount importance. To this end, we collected information regarding naturally-occurring variants of the Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), an epithelial receptor that both SARS-CoV and SARS-CoV-2 use to enter the host cells. We built 242 structural models of variants of human ACE2 bound to the receptor binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 surface spike glycoprotein (S protein) and refined their interfaces

with HADDOCK. Our dataset includes 140 variants of human ACE2 representing missense mutations found in genome-wide studies, 39 mutants with reported effects on the recognition of the RBD, and 63 predictions after computational alanine scanning mutagenesis of ACE2-RBD interface residues. This dataset will help accelerate the design of therapeutics against SARS-CoV-2, as well as contribute to prevention of possible future coronaviruses outbreaks.

«Insights on cross-species transmission of SARS-CoV-2 from structural modeling»

Autoras/es: João PGLM Rodrigues, [Susana Barrera-Vilarmau*](#), João Mc Teixeira*, Marija Sorokina, Elizabeth Seckel, Panagiotis L Kastritis, Michael Levitt

* igual contribución

PLoS computational biology, 2020 Dec 3;16(12):e1008449.

PMID: 33270653; doi: 10.1371/journal.pcbi.1008449

bioRxiv (preprint), 2020 Jul 23;2020.06.05.136861.

PMID: 32577636 doi: 10.1101/2020.06.05.136861

Abstract: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the ongoing global pandemic that has infected more than 31 million people in more than 180 countries worldwide. Like other coronaviruses, SARS-CoV-2 is thought to have been transmitted to humans from wild animals. Given the scale and widespread geographical distribution of the current pandemic and confirmed cases of cross-species transmission, the question of the extent to which this transmission is possible emerges, as well as what molecular features distinguish susceptible from non-susceptible animal species. Here, we investigated the structural properties of several ACE2 orthologs bound to the SARS-CoV-2 spike protein. We found that species known not to be susceptible to SARS-CoV-2 infection have non-conservative mutations in several ACE2 amino acid residues that disrupt key polar and charged contacts with the viral spike protein. Our models also allow us to predict affinity-enhancing mutations that could be used to design ACE2 variants for therapeutic purposes. Finally, our study provides a blueprint for modeling viral-host protein interactions and highlights several important considerations when designing these computational studies and analyzing their results.

«Conformational buffering underlies functional selection in intrinsically disordered protein regions»

Autoras/es: Nicolas S Gonzalez-Foutel, Wade M Borchers*, Juliana Glavina*, [Susana Barrera-Vilarmau](#), Amin Sagar, Alejandro Estaña, Amelie Barozet, Gregorio Fernandez-Ballester, Clara Blanes-Mira, Ignacio E Sánchez, Gonzalo de Prat-Gay, Juan Cortés, Pau Bernadó, Rohit V Pappu, Alex S Holehouse, Gary W Daughdrill, Lucía B Chemes

* igual contribución

bioRxiv (preprint), doi: 10.1101/2021.05.14.444182

Abstract: Many disordered proteins conserve essential functions in the face of extensive sequence variation. This makes it challenging to identify the forces responsible for functional selection. Viruses are robust model systems to investigate functional selection and they take advantage of protein disorder to acquire novel traits. Here, we combine structural and computational biophysics with evolutionary analysis to determine the molecular basis for functional selection in the intrinsically disordered adenovirus early gene 1A (E1A) protein. E1A competes

with host factors to bind the retinoblastoma (Rb) protein, triggering early S-phase entry and disrupting normal cellular proliferation. We show that the ability to outcompete host factors depends on the picomolar binding affinity of E1A for Rb, which is driven by two binding motifs tethered by a hypervariable disordered linker. Binding affinity is determined by the spatial dimensions of the linker, which constrain the relative position of the two binding motifs. Despite substantial sequence variation across evolution, the linker dimensions are finely optimized through compensatory changes in amino acid sequence and sequence length, leading to conserved linker dimensions and maximal affinity. We refer to the mechanism that conserves spatial dimensions despite large-scale variations in sequence as conformational buffering. Conformational buffering explains how variable disordered proteins encode functions and could be a general mechanism for functional selection within disordered protein regions.

Herramientas computacionales e informáticas

Las simulaciones de dinámica molecular han sido ejecutadas con Gromacs²⁷⁷



Las simulaciones de dinámica molecular han sido analizadas y creadas con taurenmd⁶⁹⁰, MDTraj⁶⁹¹, Mdanalysis⁶⁹², Openmm⁶⁹³, Gromacs, y Theseus⁶⁸⁷



Las estructuras para las dinámicas moleculares han sido inicialmente preparadas con AMBER-Tools²⁷⁵, Coot²⁷⁴, pdb-tools⁶⁹⁴, HADDOCK³⁷⁵.



Las imágenes de las estructuras han sido preparadas con PyMol-OS⁶⁹⁵, a excepción de las que enseñan la distribución de cargas que han sido preparadas con ChimeraX⁶⁹⁶. Las gráficas han sido preparadas con matplotlib⁶⁹⁷.



La tesis ha sido escrita y maquetada con LibreOffice⁶⁹⁸, Zotero⁶⁹⁹, Sublime⁷⁰⁰.



LibreOffice
The Document Foundation

zotero

V. Bibliografía

1. Costa, A., Hood, I. V. & Berger, J. M. Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Annual Review of Biochemistry* **82**, 25–54 (2013).
2. Tanaka, S. & Araki, H. Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, (2013).
3. Tognetti, S., Riera, A. & Speck, C. Switch on the engine: how the eukaryotic replicative helicase MCM2–7 becomes activated. *Chromosoma* **124**, 13–26 (2015).
4. Duderstadt, K. E., Reyes-lamothe, R., Oijen, A. M. V. & Sherratt, D. J. Replication-Fork Dynamics. 1–18 (2014).
5. O'Donnell, M., Langston, L. & Stillman, B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, 1–14 (2013).
6. Forterre, P. The Common Ancestor of Archaea and Eukarya Was Not an Archaeon. *Archaea* **2013**, 1–18 (2013).
7. Leipe, D. D., Aravind, L. & Koonin, E. V. Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic Acids Research* **27**, 3389–3401 (1999).
8. Hedglin, M., Kumar, R. & Benkovic, S. J. Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, 1–19 (2013).
9. Kelch, B. A., Makino, D. L., Donnell, M. O. & Kuriyan, J. High-speed replication of chromosomal DNA requires the DNA polymerase α . 1–14 (2012).
10. Zhang, D. & O'Donnell, M. *The Eukaryotic Replication Machine*. *Enzymes* vol. 39 (Elsevier Inc., 2016).
11. Kong, X.-P., Onrust, R., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Three-dimensional structure of the β subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: A sliding DNA clamp. *Cell* **69**, 425–437 (1992).
12. McInerney, P., Johnson, A., Katz, F. & O'Donnell, M. Characterization of a Triple DNA Polymerase Replisome. *Molecular Cell* **27**, 527–538 (2007).
13. Gao, D. & McHenry, C. S. τ Binds and Organizes *Escherichia coli* Replication Proteins through Distinct Domains. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 4441–4446 (2001).
14. Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D. J. & Leake, M. C. Stoichiometry and Architecture of Active DNA Replication Machinery in *Escherichia coli*. *Science* **328**, 498–501 (2010).
15. Georgescu, R. E., Kurth, I. & O'Donnell, M. E. Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome. *Nature Structural and Molecular Biology* **19**, 113–116 (2012).
16. Onrust, R., Finkelstein, J., Turner, J., Naktinis, V. & O'Donnell, M. Assembly of a Chromosomal Replication Machine: Two DNA Polymerases, a Clamp Loader, and Sliding Clamps in One Holoenzyme Particle. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13366–13377 (1995).
17. Tougu, K. & Marians, K. J. The Interaction between Helicase and Primase Sets the Replication Fork Clock. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21398–21405 (1996).
18. Forterre, P., Filée, J. & Myllykallio, H. Origin and Evolution of DNA and DNA Replication Machineries. in *The Genetic Code and the Origin of Life* 145–168 (Springer US). doi:10.1007/0-387-26887-1_10.
19. Krishnan, N. *et al.* Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nat Chem Biol* **10**, 558–566 (2014).
20. Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J. & Botchan, M. R. Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Molecular Cell* **37**, 247–258 (2010).
21. Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 10236–10241 (2006).
22. Makarova, K. S., Koonin, E. V. & Kelman, Z. The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. *Biology Direct* **7**, 7 (2012).
23. Sanchez-Pulido, L. & Ponting, C. P. Cdc45: the missing RecJ ortholog in eukaryotes? *Bioinformatics* **27**, 1885–1888 (2011).
24. Bochman, M. L. & Schwacha, A. The Mcm2-7 Complex Has In Vitro Helicase Activity. *Molecular Cell* **31**, 287–293 (2008).
25. Davey, M. J., Indiani, C. & O'Donnell, M. Reconstitution of the Mcm2-7p Heterohexameric, Subunit Arrangement, and ATP Site Architecture. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 4491–4499 (2003).
26. Takayama, Y. GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes & Development* **17**, 1153–1165 (2003).
27. Hacker, K. J. & Johnson, K. A. A Hexameric Helicase Encircles One DNA Strand and Excludes the Other during DNA Unwinding. *Biochemistry* **36**, 14080–14087 (1997).
28. Jeong, Y.-J., Rajagopal, V. & Patel, S. S. Switching from single-stranded to double-stranded DNA limits the unwinding processivity of ring-shaped T7 DNA helicase. *Nucleic Acids Research* **41**, 4219–4229 (2013).
29. Shin, J.-H., Jiang, Y., Grabowski, B., Hurwitz, J. & Kelman, Z. Substrate Requirements for Duplex DNA Translocation by the Eukaryal and Archaeal Minichromosome Maintenance Helicases. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 49053–49062 (2003).
30. Fu, Y. V. *et al.* Selective Bypass of a Lagging Strand Roadblock by the Eukaryotic Replicative DNA Helicase. *Cell* **146**, 931–941 (2011).

31. Kaplan, D. L. The 3'-tail of a forked-duplex sterically determines whether one or two DNA strands pass through the central channel of a replication-fork helicase 1 Edited by M. Gottesman. *Journal of Molecular Biology* **301**, 285–299 (2000).
32. Yardimci, H. *et al.* Bypass of a protein barrier by a replicative DNA helicase. *Nature* **492**, 205–209 (2012).
33. Hauschka, P. V. Chapter 19 Analysis of Nucleotide Pools in Animal Cells. in 361–462 (1974). doi:10.1016/S0091-679X(08)61787-2.
34. Sheaff, R. J. & Kuchta, R. D. Misincorporation of nucleotides by calf thymus DNA primase and elongation of primers containing multiple noncognate nucleotides by DNA polymerase alpha. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19225–19231 (1994).
35. Zhang, S. & Grosse, F. Accuracy of DNA primase. *Journal of Molecular Biology* **216**, 475–479 (1990).
36. Cotterill, S., Chui, G. & Lehman, I. R. DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. The DNA polymerase subunit. *J Biol Chem* **262**, 16100–16104 (1987).
37. Banks, G. R., Boezi, J. A. & Lehman, I. R. A high molecular weight DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos. Purification, structure, and partial characterization. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 9886–9892 (1979).
38. Kaguni, L. S., Rossignol, J. M., Conaway, R. C. & Lehman, I. R. Isolation of an intact DNA polymerase-primase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 2221–2225 (1983).
39. Sauer, B. & Lehman, I. R. Immunological comparison of purified DNA polymerase alpha from embryos of *Drosophila melanogaster* with forms of the enzyme present in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 12394–12398 (1982).
40. Conaway, R. C. & Lehman, I. R. A DNA primase activity associated with DNA polymerase alpha from *Drosophila melanogaster* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 2523–2527 (1982).
41. Perera, R. L. *et al.* Mechanism for priming DNA synthesis by yeast DNA Polymerase α . *eLife* **2**, (2013).
42. Singh, H. *et al.* Yeast DNA primase and DNA polymerase activities. An analysis of RNA priming and its coupling to DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 8564–8569 (1986).
43. Stillman, B. DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Molecular Cell* **30**, 259–260 (2008).
44. Ayyagari, R., Gomes, X. V., Gordenin, D. A. & Burgers, P. M. J. Okazaki Fragment Maturation in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1618–1625 (2003).
45. Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M. R. & Burgers, P. M. J. Lagging Strand DNA Synthesis at the Eukaryotic Replication Fork Involves Binding and Stimulation of FEN-1 by Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22109–22112 (1995).
46. LAOSIRIEIX, S., PELLEGRINI, L. & BELL, S. The promiscuous primase. *Trends in Genetics* **21**, 568–572 (2005).
47. Miles, J. & Formosa, T. Protein affinity chromatography with purified yeast DNA polymerase alpha detects proteins that bind to DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 1276–1280 (1992).
48. Gambus, A. *et al.* GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature Cell Biology* **8**, 358–366 (2006).
49. Gambus, A. *et al.* A key role for Ctf4 in coupling the MCM2-7 helicase to DNA polymerase α within the eukaryotic replisome. *The EMBO Journal* **28**, 2992–3004 (2009).
50. Sun, J. *et al.* The architecture of a eukaryotic replisome. *Nature Structural and Molecular Biology* **22**, 976–982 (2015).
51. Nick McElhinny, S. A., Gordenin, D. A., Stith, C. M., Burgers, P. M. J. & Kunkel, T. A. Division of Labor at the Eukaryotic Replication Fork. *Molecular Cell* **30**, 137–144 (2008).
52. Pursell, Z. F., Isoz, I., Lundström, E.-B., Johansson, E. & Kunkel, T. A. Yeast DNA Polymerase ϵ Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science* **317**, 127–130 (2007).
53. Kunkel, T. A. & Burgers, P. M. Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends in Cell Biology* **18**, 521–527 (2008).
54. Waga, S. & Stillman, B. THE DNA REPLICATION FORK IN EUKARYOTIC CELLS. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 721–751 (1998).
55. Morrison, A., Araki, H., Clark, A. B., Hamatake, R. K. & Sugino, A. A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* **62**, 1143–1151 (1990).
56. Clausen, A. R. *et al.* Tracking replication enzymology in vivo by genome-wide mapping of ribonucleotide incorporation. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 185–191 (2015).
57. Yu, C. *et al.* Strand-Specific Analysis Shows Protein Binding at Replication Forks and PCNA Unloading from Lagging Strands when Forks Stall. *Molecular Cell* **56**, 551–563 (2014).
58. Miyabe, I., Kunkel, T. A. & Carr, A. M. The Major Roles of DNA Polymerases Epsilon and Delta at the Eukaryotic Replication Fork Are Evolutionarily Conserved. *PLoS Genetics* **7**, e1002407 (2011).
59. Garg, P. Idling by DNA polymerase maintains a ligatable nick during lagging-strand DNA replication. *Genes & Development* **18**, 2764–2773 (2004).
60. Jin, Y. H., Ayyagari, R., Resnick, M. A., Gordenin, D. A. & Burgers, P. M. J. Okazaki Fragment Maturation in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1626–1633 (2003).

V. Bibliografía

61. Klinge, S., Núñez-Ramírez, R., Llorca, O. & Pellegrini, L. 3D architecture of DNA Pol α reveals the functional core of multi-subunit replicative polymerases. *The EMBO Journal* **28**, 1978–1987 (2009).
62. Hogg, M. *et al.* Structural basis for processive DNA synthesis by yeast DNA polymerase ϵ . *Nature Structural & Molecular Biology* **21**, 49–55 (2014).
63. Swan, M. K., Johnson, R. E., Prakash, L., Prakash, S. & Aggarwal, A. K. Structural basis of high-fidelity DNA synthesis by yeast DNA polymerase δ . *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 979–986 (2009).
64. Steitz, T. A. DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17395–17398 (1999).
65. Yang, W. An Overview of Y-Family DNA Polymerases and a Case Study of Human DNA Polymerase η . *Biochemistry* **53**, 2793–2803 (2014).
66. Yuan, Z., Georgescu, R., Schauer, G. D., O'Donnell, M. E. & Li, H. Structure of the polymerase ϵ holoenzyme and atomic model of the leading strand replisome. *Nature Communications* **11**, 1–11 (2020).
67. Stukenberg, P. T., Studwell-Vaughan, P. S. & O'Donnell, M. Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 11328–11334 (1991).
68. Stukenberg, P. T., Turner, J. & O'Donnell, M. An explanation for lagging strand replication: Polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* **78**, 877–887 (1994).
69. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Structure of the C-Terminal Region of p21WAF1/CIP1 Complexed with Human PCNA. *Cell* **87**, 297–306 (1996).
70. Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M. & Kuriyan, J. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**, 1233–43 (1994).
71. Georgescu, R., Langston, L. & O'Donnell, M. A proposal: Evolution of PCNA's role as a marker of newly replicated DNA. *DNA Repair* **29**, 4–15 (2015).
72. Cullmann, G., Fien, K., Kobayashi, R. & Stillman, B. Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4661–4671 (1995).
73. Guenther, B., Onrust, R., Sali, A., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Crystal Structure of the δ' Subunit of the Clamp-Loader Complex of *E. coli* DNA Polymerase III. *Cell* **91**, 335–345 (1997).
74. Bowman, G. D., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* **429**, 724–30 (2004).
75. Jeruzalmi, D., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* **106**, 429–41 (2001).
76. Kelch, B. A., Makino, D. L., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. How a DNA polymerase clamp loader opens a sliding clamp. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 1675–80 (2011).
77. Goedken, E. R., Kazmirski, S. L., Bowman, G. D., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Mapping the interaction of DNA with the *Escherichia coli* DNA polymerase clamp loader complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 183–190 (2005).
78. Simonetta, K. R. *et al.* The Mechanism of ATP-Dependent Primer-Template Recognition by a Clamp Loader Complex. *Cell* **137**, 659–671 (2009).
79. Miyachi, K., Fritzler, M. J. & Tan, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **121**, 2228–34 (1978).
80. Bravo, R. & Celis, J. E. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *The Journal of cell biology* **84**, 795–802 (1980).
81. Bravo, R. *et al.* Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Experimental Cell Research* **136**, 311–319 (1981).
82. Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, B. R. & Garrels, J. I. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* **309**, 374–376 (1984).
83. Madsen, P. & Celis, J. E. S-phase patterns of cyclin (PCNA) antigen staining resemble topographical patterns of DNA synthesis. *FEBS Letters* **193**, 5–11 (1985).
84. Celis, J. E. & Madsen, P. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Letters* **209**, 277–283 (1986).
85. Toschi, L. & Bravo, R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *Journal of Cell Biology* **107**, 1623–1628 (1988).
86. Prelich, G., Kostura, M., Marshak, D. R., Mathews, M. B. & Stillman, B. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* **326**, 471–475 (1987).
87. Wold, M. S. & Kelly, T. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 2523–2527 (1988).

88. Bauer, G. A. & Burgers, M. J. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Research* **18**, 261–265 (1990).
89. McAlear, M. A., Howell, E. A., Espenshade, K. K. & Holm, C. Proliferating cell nuclear antigen (pol30) mutations suppress *cdc44* mutations and identify potential regions of interaction between the two encoded proteins. *Molecular and cellular biology* **14**, 4390–7 (1994).
90. Ayyagari, R., Impellizzeri, K. J., Yoder, B. L., Gary, S. L. & Burgers, P. M. A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4420–4429 (1995).
91. Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G. & Downey, K. M. An auxiliary protein for DNA polymerase- δ from fetal calf thymus. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 12310–12316 (1986).
92. Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. & Macdonald-Bravo, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* **326**, 515–517 (1987).
93. Prelich, G. *et al.* Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* **326**, 517–520 (1987).
94. Burgers, P. M. *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 22698–22706 (1991).
95. Lee, S. H., Pan, Z. Q., Kwong, A. D., Burgers, P. M. & Hurwitz, J. Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 22707–22717 (1991).
96. Podust, V. N. & Hübscher, U. Lagging strand DNA synthesis by calf thymus DNA polymerases α , β , δ and ϵ in the presence of auxiliary proteins. *Nucleic Acids Research* **21**, 841–846 (1993).
97. Boehm, E. M., Goldenberg, M. S. & Washington, M. T. *The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication*. *Enzymes* vol. 39 (Elsevier Inc., 2016).
98. Kuriyan, J. & O'Donnell, M. Sliding Clamps of DNA Polymerases. *Journal of Molecular Biology* **234**, 915–925 (1993).
99. Dieckman, L. M., Freudenthal, B. D. & Washington, M. T. PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Sub-cellular biochemistry* **62**, 281–99 (2012).
100. Moldovan, G.-L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**, 665–679 (2007).
101. Levin, D. S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. & Tomkinson, A. E. An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: Implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 12863–12868 (1997).
102. Warbrick, E., Lane, D. P., Glover, D. M. & Cox, L. S. Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 compete for binding to the same site on PCNA: a potential mechanism to co-ordinate DNA replication and repair. *Oncogene* **14**, 2313–2321 (1997).
103. Umar, A. *et al.* Requirement for PCNA in DNA Mismatch Repair at a Step Preceding DNA Resynthesis. *Cell* **87**, 65–73 (1996).
104. Gary, R., Ludwig, D. L., Cornelius, H. L., MacInnes, M. A. & Park, M. S. 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. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 24522–24529 (1997).
105. Haracska, L. *et al.* Physical and Functional Interactions of Human DNA Polymerase η with PCNA Physical and Functional Interactions of Human DNA Polymerase with PCNA. *Molecular and cellular biology* **21**, 7199–7206 (2001).
106. Haracska, L., Kondratik, C. M., Unk, I., Prakash, S. & Prakash, L. Interaction with PCNA Is Essential for Yeast DNA Polymerase η Function. *Molecular Cell* **8**, 407–415 (2001).
107. Haracska, L. *et al.* Targeting of human DNA polymerase η to the replication machinery via interaction with PCNA. (2001).
108. Haracska, L. *et al.* Stimulation of DNA Synthesis Activity of Human DNA Polymerase η by PCNA. **22**, 784–791 (2002).
109. Xiong, Y., Zhang, H. & Beach, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505–514 (1992).
110. Zhang, H., Xiong, Y. & Beach, D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 897–906 (1993).
111. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574–578 (1994).
112. Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D. & Hieter, P. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes and Development* **13**, 307–319 (1999).
113. Zhang, Z., Shibahara, K. & Stillman, B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* **408**, 221–225 (2000).
114. Arias, E. E. & Walter, J. C. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nature Cell Biology* **8**, 84–90 (2006).
115. Maga, G. & Hübscher, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science* **116**, 3051–60 (2003).

V.Bibliografia

116. Naryzhny, S. N. Proliferating cell nuclear antigen: A proteomics view. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3789–3808 (2008).
117. Tsurimoto, T. PCNA binding proteins. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **4**, D849–D858 (1999).
118. Zhuang, Z. & Ai, Y. Processivity factor of DNA polymerase and its expanding role in normal and translesion DNA synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1804**, 1081–1093 (2010).
119. Kelman, Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629–640 (1997).
120. Jónsson, Z. O. & Hübscher, U. Proliferating cell nuclear antigen: More than a clamp for DNA polymerases. *BioEssays* **19**, 967–975 (1997).
121. Toufektchan, E. & Toledo, F. The guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers* **10**, (2018).
122. Shahbaz, A. J. The Guardian of the Genome: p53. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* **14**, 107–109 (2004).
123. Nguyen, D., Liao, W., Zeng, S. X. & Lu, H. Reviving the guardian of the genome: Small molecule activators of p53. *Pharmacology and Therapeutics* **178**, 92–108 (2017).
124. Service, R. F. Rescuing the guardian of the genome. *Science* **354**, 26–28 (2016).
125. Cox, L. S. & Lane, D. P. Tumour suppressors, kinases and clamps: How p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *BioEssays* **17**, 501–508 (1995).
126. Li, R., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Current Biology* **6**, 189–199 (1996).
127. Shivakumar, C. V., Brown, D. R., Deb, S. & Deb, S. P. Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 6785–6793 (1995).
128. Morris, G. F., Bischoff, J. R. & Mathews, M. B. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 895–9 (1996).
129. Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135–41 (2002).
130. Stelter, P. & Ulrich, H. D. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188–191 (2003).
131. Bienko, M. *et al.* Ubiquitin-Binding Domains in Y-Family Polymerases Regulate Translesion Synthesis. *Science* **310**, 1821–1824 (2005).
132. Papouli, E. *et al.* Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* **19**, 123–133 (2005).
133. Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoegel, C. & Jentsch, S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**, 428–433 (2005).
134. Burgers, P. M. & Yoder, B. L. ATP-independent loading of the proliferating cell nuclear antigen requires DNA ends. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 19923–19926 (1993).
135. Tinker, R. L., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. Detecting the ability of viral, bacterial and eukaryotic replication proteins to track along DNA. *The EMBO Journal* **13**, 5330–5337 (1994).
136. De March, M. & De Biasio, A. The dark side of the ring: role of the DNA sliding surface of PCNA. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **52**, 663–673 (2017).
137. Wing, R. *et al.* Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* **287**, 755–758 (1980).
138. Brown, W. C. & Campbell, J. L. Interaction of proliferating cell nuclear antigen with yeast DNA polymerase delta. *The Journal of biological chemistry* **268**, 21706–10 (1993).
139. Zhou, J. The small subunit is required for functional interaction of DNA polymerase delta with the proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Research* **25**, 1094–1099 (1997).
140. Yoder, B. L. & Burgers, P. M. *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. I. Purification and characterization of its ATPase activity. *The Journal of biological chemistry* **266**, 22689–97 (1991).
141. Lee, S. H., Kwong, A. D., Pan, Z. Q. & Hurwitz, J. Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 594–602 (1991).
142. Boulet, A., Simon, M., Faye, G., Bauer, G. A. & Burgers, P. M. Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *The EMBO journal* **8**, 1849–54 (1989).
143. Jónsson, Z. O., Hindges, R. & Hübscher, U. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J* **17**, 2412–2425 (1998).
144. Eissenberg, J. C., Ayyagari, R., Gomes, X. V. & Burgers, P. M. Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. *Mol Cell Biol* **17**, 6367–6378 (1997).

145. Oku, T. *et al.* Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells* **3**, 357–369 (1998).
146. Tsurimoto, T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1443**, 23–39 (1998).
147. Mossi, R., Jónsson, Z. O., Allen, B. L., Hardin, S. H. & Hübscher, U. Replication Factor C Interacts with the C-terminal Side of Proliferating Cell Nuclear Antigen*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 1769–1776 (1997).
148. Zhang, S.-J. *et al.* A Conserved Region in the Amino Terminus of DNA Polymerase δ Is Involved in Proliferating Cell Nuclear Antigen Binding. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7988–7992 (1995).
149. Shivji, M. K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* **69**, 367–374 (1992).
150. Warbrick, E. The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 997–1006 (2000).
151. Xu, H., Zhang, P., Liu, L. & Lee, M. Y. A novel PCNA-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry* **40**, 4512–20 (2001).
152. Podust, V. N., Podust, L. M., Müller, F. & Hübscher, U. DNA polymerase delta holoenzyme: action on single-stranded DNA and on double-stranded DNA in the presence of replicative DNA helicases. *Biochemistry* **34**, 5003–5010 (1995).
153. Yao, N. *et al.* Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, E. coli and T4 replicases. *Genes Cells* **1**, 101–113 (1996).
154. Jónsson, Z. O., Podust, V. N., Podust, L. M. & Hübscher, U. Tyrosine 114 is essential for the trimeric structure and the functional activities of human proliferating cell nuclear antigen. *The EMBO journal* **14**, 5745–51 (1995).
155. Bruning, J. B. & Shamo, Y. Structural and thermodynamic analysis of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase-delta p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure* **12**, 2209–2219 (2004).
156. Hishiki, A. *et al.* Structural Basis for Novel Interactions between Human Translesion Synthesis Polymerases and Proliferating Cell Nuclear Antigen*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 10552–10560 (2009).
157. Dieckman, L. M., Freudenthal, B. D. & Washington, M. T. The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function. **62**, 281–299 (2012).
158. Freudenthal, B. D., Brogie, J. E., Gakhar, L., Kondratick, C. M. & Washington, M. T. Crystal Structure of SUMO-Modified Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Journal of Molecular Biology* **406**, 9–17 (2011).
159. Freudenthal, B. D., Gakhar, L., Ramaswamy, S. & Washington, M. T. Structure of monoubiquitinated PCNA and implications for translesion synthesis and DNA polymerase exchange. *Nature Structural and Molecular Biology* **17**, 479–484 (2010).
160. Armstrong, A. A., Mohideen, F. & Lima, C. D. Recognition of SUMO-modified PCNA requires tandem receptor motifs in Srs2. *Nature* **483**, 59–63 (2012).
161. McNally, R., Bowman, G. D., Goedken, E. R., Donnell, M. O. & Kuriyan, J. Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. (2010).
162. Ivanov, I., Chapados, B. R., McCammon, J. A. & Tainer, J. A. Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucleic Acids Research* **34**, 6023–6033 (2006).
163. Georgescu, R. E. *et al.* Structure of a Sliding Clamp on DNA. *Cell* **132**, 43–54 (2008).
164. Mayanagi, K. *et al.* Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4647–4652 (2009).
165. Mayanagi, K. *et al.* Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1845–1849 (2011).
166. Kochaniak, A. B. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen uses two distinct modes to move along DNA. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 17700–17710 (2009).
167. Chuang, L. S. *et al.* Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science (New York, N.Y.)* **277**, 1996–2000 (1997).
168. Hall, P. A. *et al.* Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene* **10**, 2427–33 (1995).
169. Gomes, X. V. & Burgers, P. M. J. ATP Utilization by Yeast Replication Factor C. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 34768–34775 (2001).
170. Unk, I. *et al.* Stimulation of 3'→5' Exonuclease and 3'-Phosphodiesterase Activities of Yeast Apn2 by Proliferating Cell Nuclear Antigen. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6480–6486 (2002).
171. Dionne, I., Nookala, R. K., Jackson, S. P., Doherty, A. J. & Bell, S. D. A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular cell* **11**, 275–82 (2003).
172. Boehm, E. M. *et al.* The proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-interacting Protein (PIP) motif of DNA polymerase η Mediates Its interaction with the C-terminal domain of Rev1. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 8735–8744 (2016).

V. Bibliografia

173. Bubeck, D. *et al.* PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates. *Nucleic Acids Research* **39**, 3652–3666 (2011).
174. Kontopidis, G. *et al.* Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1871–6 (2005).
175. Zheleva, D. I. *et al.* A quantitative study of the in vitro binding of the C-terminal domain of p21 to PCNA: Affinity, stoichiometry, and thermodynamics. *Biochemistry* **39**, 7388–7397 (2000).
176. Guo, Z. *et al.* Comprehensive mapping of the C-terminus of flap endonuclease-1 reveals distinct interaction sites for five proteins that represent different DNA replication and repair pathways. *Journal of molecular biology* **377**, 679–90 (2008).
177. Sakurai, S. *et al.* Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO Journal* **24**, 683–693 (2005).
178. Pedley, A. M., Lill, M. A. & Davisson, V. J. Flexibility of PCNA-Protein Interface Accommodates Differential Binding Partners. **9**, (2014).
179. Gilljam, K. M. *et al.* Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *The Journal of cell biology* **186**, 645–54 (2009).
180. Stites, W. E. Protein-protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. *Chemical reviews* **97**, 1233–1250 (1997).
181. Bahadur, R. P., Chakrabarti, P., Rodier, F. & Janin, J. A dissection of specific and non-specific protein-protein interfaces. *Journal of molecular biology* **336**, 943–55 (2004).
182. Fridman, Y., Gur, E., Fleishman, S. J. & Aharoni, A. Computational protein design suggests that human PCNA-partner interactions are not optimized for affinity. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **81**, 341–348 (2013).
183. Inoue, A. *et al.* A small molecule inhibitor of monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits repair of interstrand DNA cross-link, enhances DNA double strand break, and sensitizes cancer cells to cisplatin. *The Journal of biological chemistry* **289**, 7109–7120 (2014).
184. Baple, E. L. *et al.* Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. *Journal of Clinical Investigation* **124**, 3137–3146 (2014).
185. Duffy, C. M., Hilbert, B. J. & Kelch, B. A. A Disease-Causing Variant in PCNA Disrupts a Promiscuous Protein Binding Site. *Journal of Molecular Biology* **428**, 1023–1040 (2016).
186. Leman, A. R. & Noguchi, E. *The replication fork: Understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. Genes* vol. 4 (2013).
187. Bell, S. P. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 333–374 (2002).
188. Johnson, A. & O'Donnell, M. CELLULAR DNA REPLICASES: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 283–315 (2005).
189. Diffley, J. F. X. Regulation of Early Events in Chromosome Replication. *Current Biology* **14**, R778–R786 (2004).
190. Havens, C. G. & Walter, J. C. Mechanism of CRL4Cdt2, a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes & Development* **25**, 1568–1582 (2011).
191. Havens, C. G. & Walter, J. C. Article Docking of a Specialized PIP Box onto Chromatin-Bound PCNA Creates a Degron for the Ubiquitin Ligase CRL4 Cdt2. *Molecular Cell* **35**, 93–104 (2009).
192. Fisher, P. A., Wang, T. S. & Korn, D. Enzymological characterization of DNA polymerase alpha. Basic catalytic properties processivity, and gap utilization of the homogeneous enzyme from human KB cells. *The Journal of biological chemistry* **254**, 6128–37 (1979).
193. Nethanel, T., Zlotkin, T. & Kaufmann, G. Assembly of simian virus 40 Okazaki pieces from DNA primers is reversibly arrested by ATP depletion. *Journal of virology* **66**, 6634–40 (1992).
194. Waga, S., Bauer, G. & Stillman, B. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *The Journal of biological chemistry* **269**, 10923–34 (1994).
195. Tsurimoto, T. & Stillman, B. Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication in vitro. *Molecular and cellular biology* **9**, 609–19 (1989).
196. Cai, J. *et al.* ATP hydrolysis catalyzed by human replication factor C requires participation of multiple subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 11607–12 (1998).
197. Yuzhakov, A., Kelman, Z., Hurwitz, J. & O'Donnell, M. Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *The EMBO journal* **18**, 6189–99 (1999).
198. Maga, G., Stucki, M., Spadari, S. & Hübscher, U. DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *Journal of molecular biology* **295**, 791–801 (2000).
199. Bae, S. H. & Seo, Y. S. Characterization of the enzymatic properties of the yeast dna2 Helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *The Journal of biological chemistry* **275**, 38022–31 (2000).

200. Levin, D. S., McKenna, A. E., Motycka, T. A., Matsumoto, Y. & Tomkinson, A. E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Current biology: CB* **10**, 919–22 (2000).
201. Bae, S. H., Bae, K. H., Kim, J. A. & Seo, Y. S. RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* **412**, 456–61 (2001).
202. Chapados, B. R. *et al.* Structural Basis for FEN-1 Substrate Specificity and PCNA-Mediated Activation in DNA Replication and Repair. *Cell* **116**, 39–50 (2004).
203. Maga, G. *et al.* Okazaki fragment processing: Modulation of the strand displacement activity of DNA polymerase by the concerted action of replication protein A, proliferating cell nuclear antigen, and flap endonuclease-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 14298–14303 (2001).
204. Chilkova, O. *et al.* The eukaryotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 6588–6597 (2007).
205. Georgescu, R. E. *et al.* Mechanism of asymmetric polymerase assembly at the eukaryotic replication fork. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**, 664–670 (2014).
206. Nichols, A. F. & Sancar, A. Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic acids research* **20**, 2441–6 (1992).
207. Aboussekhra, A. *et al.* Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859–68 (1995).
208. Shivji, M. K., Podust, V. N., Hübscher, U. & Wood, R. D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* **34**, 5011–7 (1995).
209. Matsumoto, Y., Kim, K. & Bogenhagen, D. F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Molecular and cellular biology* **14**, 6187–97 (1994).
210. Frosina, G. *et al.* Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **271**, 9573–8 (1996).
211. Fortini, P. *et al.* Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* **37**, 3575–80 (1998).
212. Klungland, A. & Lindahl, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal* **16**, 3341–8 (1997).
213. Johnson, R. E. *et al.* Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* **271**, 27987–90 (1996).
214. Torres-Ramos, C. A., Yoder, B. L., Burgers, P. M., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of proliferating cell nuclear antigen in RAD6-dependent postreplicational DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9676–81 (1996).
215. Miura, M. & Sasaki, T. Effect of XPA gene mutations on UV-induced immunostaining of PCNA in fibroblasts from xeroderma pigmentosum group A patients. *Mutation research* **364**, 51–6 (1996).
216. Clark, A. B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R. K. & Kunkel, T. A. Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36498–501 (2000).
217. Flores-Rozas, H., Clark, D. & Kolodner, R. D. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nature genetics* **26**, 375–8 (2000).
218. Kleczkowska, H. E., Marra, G., Lettieri, T. & Jiricny, J. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes & development* **15**, 724–36 (2001).
219. Gary, R., Kim, K., Cornelius, H. L., Park, M. S. & Matsumoto, Y. Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *The Journal of biological chemistry* **274**, 4354–63 (1999).
220. Pascucci, B., Stucki, M., Jónsson, Z. O., Dogliotti, E. & Hübscher, U. Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33696–702 (1999).
221. Matsumoto, Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **68**, 129–38 (2001).
222. Lehmann, A. R. Replication of damaged DNA. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2**, 300–2 (2003).
223. Prakash, S., Johnson, R. E. & Prakash, L. EUKARYOTIC TRANSLATION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 317–353 (2005).
224. Sale, J. E., Lehmann, A. R. & Woodgate, R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 141–152 (2012).
225. Washington, M. T., Carlson, K. D., Freudenthal, B. D. & Pryor, J. M. Variations on a theme: Eukaryotic Y-family DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1804**, 1113–1123 (2010).
226. Goodman, M. F. Error-Prone Repair DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 17–50 (2002).

V. Bibliografia

227. Hübscher, U., Maga, G. & Spadari, S. Eukaryotic DNA Polymerases. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 133–163 (2002).
228. Kannouche, P. L., Wing, J. & Lehmann, A. R. Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Molecular cell* **14**, 491–500 (2004).
229. Bi, X. *et al.* Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest. *Molecular and cellular biology* **26**, 3527–40 (2006).
230. Watanabe, K. *et al.* Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *The EMBO journal* **23**, 3886–96 (2004).
231. Guo, M., Li, J., Wan, D. & Gu, J. KIAA0101 (OFACT-1), an expressionally down-regulated and growth-inhibitory gene in human hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* **6**, 109 (2006).
232. LEHMANN, A. *et al.* Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* **6**, 891–899 (2007).
233. Tsutakawa, S. E. *et al.* Human Flap Endonuclease Structures , DNA Double-Base Flipping , and a Unified Understanding of the FEN1 Superfamily. *Cell* **145**, 198–211 (2011).
234. Tsutakawa, S. E. *et al.* Structurally Distinct Ubiquitin- and Sumo-Modified PCNA: Implications for Their Distinct Roles in the DNA Damage Response. *Structure* **23**, 724–733 (2015).
235. Garg, P. & Burgers, P. M. Ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen activates translesion DNA polymerases and REV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 18361–18366 (2005).
236. Dieckman, L. M. & Washington, M. T. PCNA trimer instability inhibits translesion synthesis by DNA polymerase η and by DNA polymerase δ. *DNA Repair* **12**, 367–376 (2013).
237. Zhang, H. & Lawrence, C. W. The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 15954–15959 (2005).
238. Unk, I., Hajdú, I., Blastyák, A. & Haracska, L. Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLF and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair* **9**, 257–267 (2010).
239. Yang, K., Gong, P., Gokhale, P. & Zhuang, Z. Chemical Protein Polyubiquitination Reveals the Role of a Noncanonical Polyubiquitin Chain in DNA Damage Tolerance. *ACS Chemical Biology* **9**, 1685–1691 (2014).
240. Sporbert, A., Gahl, A., Ankerhold, R., Leonhardt, H. & Cardoso, M. C. DNA Polymerase Clamp Shows Little Turnover at Established Replication Sites but Sequential De Novo Assembly at Adjacent Origin Clusters. *Molecular Cell* **10**, 1355–1365 (2002).
241. Shibahara, K. & Stillman, B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575–85 (1999).
242. Moggs, J. G. *et al.* A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and cellular biology* **20**, 1206–18 (2000).
243. Hasan, S., Hassa, P. O., Imhof, R. & Hottiger, M. O. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* **410**, 387–391 (2001).
244. Iida, T. *et al.* PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* **7**, 997–1007 (2002).
245. Scott, M. *et al.* UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *Journal of cell science* **114**, 3455–62 (2001).
246. Gomes, X. V. & Burgers, P. M. Two modes of FEN1 binding to PCNA regulated by DNA. *The EMBO journal* **19**, 3811–21 (2000).
247. Henneke, G., Koundrioukoff, S. & Hübscher, U. Phosphorylation of human Fen1 by cyclin-dependent kinase modulates its role in replication fork regulation. *Oncogene* **22**, 4301–13 (2003).
248. Scott, M. T., Morrice, N. & Ball, K. L. Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21(Waf1/Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *The Journal of biological chemistry* **275**, 11529–37 (2000).
249. Fukuda, K. *et al.* Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22527–22534 (1995).
250. Berg, O. G., Winter, R. B. & von Hippel, P. H. Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids. 1. Models and Theory. *Biochemistry* **20**, 6929–6948 (1981).
251. Winter, R. B., Berg, O. G. & von Hippel, P. H. Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids. 3. The Escherichia coli lac Repressor-Operator Interaction: Kinetic Measurements and Conclusions. *Biochemistry* **20**, 6961–6977 (1981).
252. Kabata, H. *et al.* Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science* **262**, 1561–1563 (1993).
253. Harada, Y. *et al.* Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time. *Biophysical Journal* **76**, 709–715 (1999).
254. Kim, J. H. & Larson, R. G. Single-molecule analysis of 1D diffusion and transcription elongation of T7 RNA polymerase along individual stretched DNA molecules. *Nucleic Acids Research* **35**, 3848–3858 (2007).

255. Wang, Y. M., Austin, R. H. & Cox, E. C. Single molecule measurements of repressor protein 1D diffusion on DNA. *Physical Review Letters* **97**, 1–4 (2006).
256. Tafvizi, A. *et al.* Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability. *Biophysical Journal* **95**, 1–3 (2008).
257. Blainey, P. C., van Oijen, A. M., Banerjee, A., Verdine, G. L. & Xie, X. S. A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5752–7 (2006).
258. Gorman, J. *et al.* Dynamic Basis for One-Dimensional DNA Scanning by the Mismatch Repair Complex Msh2-Msh6. *Molecular Cell* **28**, 359–370 (2007).
259. Komazin-Meredith, G., Mirchev, R., Golan, D. E., Van Oijen, A. M. & Coen, D. M. Hopping of a processivity factor on DNA revealed by single-molecule assays of diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10721–10726 (2008).
260. Granéli, A., Yeykal, C. C., Robertson, R. B. & Greene, E. C. Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1221–1226 (2006).
261. Von Hippel, P. H. & Berg, O. G. Facilitated target location in biological systems. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 675–678 (1989).
262. Gorman, J. & Greene, E. C. Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA. *Nature Structural and Molecular Biology* **15**, 768–774 (2008).
263. Schurr, J. M. The one-dimensional diffusion coefficient of proteins absorbed on DNA. *Biophysical Chemistry* **9**, 413–414 (1979).
264. Bagchi, B., Blainey, P. C. & Sunney Xie, X. Diffusion constant of a nonspecifically bound protein undergoing curvilinear motion along DNA. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 6282–6284 (2008).
265. Sakata-Sogawa, K. & Shimamoto, N. RNA polymerase can track a DNA groove during promoter search. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14731–14735 (2004).
266. Jeltsch, A., Pingoud, A., Alves, J., Wolfes, H. & Maass, G. Pausing of the Restriction Endonuclease EcoRI during Linear Diffusion on DNA. *Biochemistry* **33**, 10215–10219 (1994).
267. Laurence, T. A. *et al.* Motion of a DNA sliding clamp observed by single molecule fluorescence spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22895–22906 (2008).
268. Fernandez-Leiro, R., Conrad, J., Scheres, S. H. & Lamers, M. H. cryo-EM structures of the E. coli replicative DNA polymerase reveal its dynamic interactions with the DNA sliding clamp, exonuclease and τ . *eLife* **4**, 1–16 (2015).
269. Fernandez-leiro, R., Conrad, J., Yang, J., Freund, S. M. V. & Sjors, H. W. Europe PMC Funders Group Self-correcting mismatches during high-fidelity DNA replication. **24**, 140–143 (2017).
270. Zhou, Y. & Hingorani, M. M. Impact of individual proliferating cell nuclear antigen-DNA contacts on clamp loading and function on DNA. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 35370–35381 (2012).
271. Ng, L., McConnell, M., Tan, C. K., Downey, K. M. & Fisher, P. A. Interaction of DNA polymerase δ , proliferating cell nuclear antigen, and synthetic oligonucleotide template-primers. Analysis by polyacrylamide gel electrophoresis-band mobility shift assay. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 13571–13576 (1993).
272. D. Watson, J. *Biología molecular del gen.* (Médica Panamericana, 2021).
273. Kubo, R. Brownian motion and nonequilibrium statistical mechanics. *Science (New York, N.Y.)* **233**, 330–4 (1986).
274. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 486–501 (2010).
275. Case, D. A. *et al.* Amber 2016. *University of California, San Francisco* (2016).
276. Abraham, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
277. Pronk, S. *et al.* GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845–854 (2013).
278. Ivani, I. *et al.* Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. *Nat Methods* **13**, 55–58 (2016).
279. Gonzalez-Magaña, A. *et al.* The p12 subunit of human polymerase uses an atypical PIP box for molecular recognition of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Journal of Biological Chemistry* **294**, 3947–3956 (2019).
280. Balakrishnan, L. & Bambara, R. A. Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, 158–160 (2013).
281. Hedglin, M., Perumal, S. K., Hu, Z. & Benkovic, S. Stepwise assembly of the human replicative polymerase holoenzyme. *eLife* **2**, e00278 (2013).
282. Zhou, J. Q., Tan, C. K., So, A. G. & Downey, K. M. Purification and characterization of the catalytic subunit of human DNA polymerase δ expressed in baculovirus-infected insect cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29740–29745 (1996).

V. Bibliografia

283. Ducoux, M. *et al.* Mediation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) dependent DNA Replication through a Conserved p21 Cip1-like PCNA-binding Motif Present in the Third Subunit of Human DNA Polymerase δ . *Journal of Biological Chemistry* **276**, 49258–49266 (2001).
284. Shikata, K. *et al.* The human homologue of fission yeast cdc27, p66, is a component of active human DNA polymerase δ . *Journal of Biochemistry* **129**, 699–708 (2001).
285. Zhang, P. *et al.* Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the p125 catalytic subunit of mammalian DNA polymerase delta. *The Journal of biological chemistry* **274**, 26647–53 (1999).
286. Li, H. *et al.* Functional roles of p12, the fourth subunit of human DNA polymerase delta. *The Journal of biological chemistry* **281**, 14748–55 (2006).
287. Hedglin, M., Pandey, B. & Benkovic, S. J. Stability of the human polymerase δ holoenzyme and its implications in lagging strand DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E1777–E1786 (2016).
288. Lancey, C. *et al.* Structure of the processive human Pol δ holoenzyme. *Nature Communications* **11**, 1–12 (2020).
289. Xu, X., Yan, C., Kossmann, B. R. & Ivanov, I. Secondary Interaction Interfaces with PCNA Control Conformational Switching of DNA Polymerase PolB from Polymerization to Editing. *Journal of Physical Chemistry B* **120**, 8379–8388 (2016).
290. Emanuele, M. J., Ciccio, A., Elia, A. E. H. & Elledge, S. J. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-associated KIAA0101/PAF15 protein is a cell cycle-regulated anaphase-promoting complex/cyclosome substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9845–9850 (2011).
291. Povlsen, L. K. *et al.* Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nature cell biology* **14**, 1089–98 (2012).
292. De Biasio, A. *et al.* Structure of p15(PAF)-PCNA complex and implications for clamp sliding during DNA replication and repair. *Nature communications* **6**, 6439 (2015).
293. The Nobel Prize in Chemistry 2013. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2013/summary/>.
294. Iscen, A. *et al.* Inhibition of Amyloid- β Aggregation by Cobalt(III) Schiff Base Complexes: A Computational and Experimental Approach. *Journal of the American Chemical Society* (2019) doi:10.1021/jacs.9b06388.
295. Pascolutti, R. *et al.* Structure and Dynamics of PD-L1 and an Ultra-High-Affinity PD-1 Receptor Mutant. *Structure* **24**, 1719–1728 (2016).
296. Hart, K. M., Reck, M., Bowman, G. R. & Wencewicz, T. A. Tabtoxinine- β -lactam is a “stealth” β -lactam antibiotic that evades β -lactamase-mediated antibiotic resistance. *MedChemComm* **7**, 118–127 (2016).
297. Montane, J. *et al.* Amyloid-induced β -cell dysfunction and islet inflammation are ameliorated by 4-phenylbutyrate (PBA) treatment. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **31**, 5296–5306 (2017).
298. Seffernick, J. T. & Lindert, S. Hybrid methods for combined experimental and computational determination of protein structure. *Journal of Chemical Physics* **153**, (2020).
299. Ekimoto, T. & Ikeguchi, M. Hybrid Methods for Modeling Protein Structures Using Molecular Dynamics Simulations and Small-Angle X-Ray Scattering Data. *Advances in experimental medicine and biology* **1105**, 237–258 (2018).
300. Alazmi, M. & Motwalli, O. Molecular basis for drug repurposing to study the interface of the S protein in SARS-CoV-2 and human ACE2 through docking, characterization, and molecular dynamics for natural drug candidates. *Journal of molecular modeling* **26**, 338 (2020).
301. Daitchman, D., Greenblatt, H. M. & Levy, Y. Diffusion of ring-shaped proteins along DNA: case study of sliding clamps. *Nucleic acids research* **46**, 5935–5949 (2018).
302. Zandarashvili, L. *et al.* Asymmetrical roles of zinc fingers in dynamic DNA-scanning process by the inducible transcription factor Egr-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, (2012).
303. Leherste, L., Petit, A., Jacquemin, D., Vercauteren, D. P. & Laurent, A. D. Investigating cyclic peptides inhibiting CD2–CD58 interactions through molecular dynamics and molecular docking methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **32**, 1295–1313 (2018).
304. Fogolari, F. *et al.* Molecular dynamics simulation of β 2-microglobulin in denaturing and stabilizing conditions. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **79**, 986–1001 (2011).
305. Ballone, A. *et al.* Experimental and Computational Druggability Exploration of the 14-3-3 ζ /SOS1pS1161 PPI Interface. *Journal of chemical information and modeling* **60**, 6555–6565 (2020).
306. Zhu, Y. *et al.* How graphene affects the misfolding of human prion protein: A combined experimental and molecular dynamics simulation study. *Environmental research* **171**, 1–10 (2019).
307. Philips, R., Kondev, J., Theriot, J. & Garcia, H. *Physical Biology of the Cell*. (Garland Science, 2012).
308. Querol-Audí, J. *et al.* Repair complexes of FEN1 endonuclease, DNA, and Rad9-Hus1-Rad1 are distinguished from their PCNA counterparts by functionally important stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 8528–8533 (2012).

309. Ulrich, H. D. & Takahashi, T. Readers of PCNA modifications. *Chromosoma* **122**, 259–274 (2013).
310. Kanao, R. & Masutani, C. Regulation of DNA damage tolerance in mammalian cells by post-translational modifications of PCNA. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **803–805**, 82–88 (2017).
311. Álvarez, V. *et al.* PCNA Deubiquitylases Control DNA Damage Bypass at Replication Forks. *Cell Reports* **29**, 1323–1335.e5 (2019).
312. Sugasawa, K. Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutation research* **685**, 29–37 (2010).
313. Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S. & Hanaoka, F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *The EMBO journal* **19**, 3100–9 (2000).
314. Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S. & Prakash, L. Fidelity of human DNA polymerase ϵ . *The Journal of biological chemistry* **275**, 7447–50 (2000).
315. Ohmori, H. *et al.* The Y-family of DNA polymerases. *Molecular cell* **8**, 7–8 (2001).
316. Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F. & Kunkel, T. A. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase- ϵ . *Nature* **404**, 1011–3 (2000).
317. Yang, J. S., Chen, W. W., Skolnick, J. & Shakhnovich, E. I. All-atom ab initio folding of a diverse set of proteins. *Structure* **15**, 53–63 (2007).
318. Goodman, M. F. & Woodgate, R. Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a010363 (2013).
319. Shaheen, M., Shanmugam, I. & Hromas, R. The role of PCNA posttranslational modifications in translesion synthesis. *Journal of Nucleic Acids* **2010**, (2010).
320. Ulrich, H. D. & Walden, H. Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 479–489 (2010).
321. Ulrich, H. D. Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair* **8**, 461–469 (2009).
322. Watts, F. Z. Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* **5**, 399–403 (2006).
323. Niimi, A. *et al.* Regulation of proliferating cell nuclear antigen ubiquitination in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 16125–16130 (2008).
324. Yuasa, M. S. *et al.* A human DNA polymerase η complex containing Rad18, Rad6 and Rev1; proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of cells undergoing replication fork arrest. *Genes to Cells* **11**, 731–744 (2006).
325. Durando, M., Tateishi, S. & Vaziri, C. A non-catalytic role of DNA polymerase η in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. *Nucleic Acids Research* **41**, 3079–3093 (2013).
326. Day, T. A. *et al.* Phosphorylated Rad18 directs DNA Polymerase η to sites of stalled replication. *Journal of Cell Biology* **191**, 953–966 (2010).
327. Barkley, L. R. *et al.* c-Jun N-terminal kinase-mediated Rad18 phosphorylation facilitates Pol η recruitment to stalled replication forks. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1943–1954 (2012).
328. Terai, K., Abbas, T., Jazaeri, A. A. & Dutta, A. CRL4Cdt2 E3 Ubiquitin Ligase Monoubiquitinates PCNA to Promote Translesion DNA Synthesis. *Molecular Cell* **37**, 143–149 (2010).
329. Plosky, B. S. *et al.* Controlling the subcellular localization of DNA polymerases ζ and η via interactions with ubiquitin. *The EMBO Journal* **25**, 2847–2855 (2006).
330. Wood, A., Garg, P. & Burgers, P. M. J. A Ubiquitin-binding Motif in the Translesion DNA Polymerase Rev1 Mediates Its Essential Functional Interaction with Ubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen in Response to DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 20256–20263 (2007).
331. Masuda, Y. *et al.* Different types of interaction between PCNA and PIP boxes contribute to distinct cellular functions of Y-family DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **43**, 7898–7910 (2015).
332. Kannouche, P. *et al.* Localization of DNA polymerases η and ζ to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *The EMBO Journal* **21**, 6246–6256 (2002).
333. Vidal, A. E. *et al.* Proliferating Cell Nuclear Antigen-dependent Coordination of the Biological Functions of Human DNA Polymerase ζ . *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48360–48368 (2004).
334. Acharya, N. *et al.* Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase η in translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17724–17729 (2008).
335. Ohmori, H., Hanafusa, T., Ohashi, E. & Vaziri, C. Separate Roles of Structured and Unstructured Regions of Y-Family DNA Polymerases. in 99–146 (2009). doi:10.1016/S1876-1623(08)78004-0.
336. Yoon, J.-H. *et al.* Identification of two functional PCNA-binding domains in human DNA polymerase κ . *Genes to Cells* **19**, 594–601 (2014).

V. Bibliografia

337. Izhar, L., Ziv, O., Cohen, I. S., Geacintov, N. E. & Livneh, Z. Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, E1462–E1469 (2013).
338. Chiu, R. K. *et al.* Lysine 63-Polyubiquitination Guards against Translesion Synthesis-Induced Mutations. *PLoS Genetics* **2**, e116 (2006).
339. Li, Z., Xiao, W., McCormick, J. J. & Maher, V. M. Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV-induced DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4459–4464 (2002).
340. Parker, J. L. & Ulrich, H. D. Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5. *The EMBO Journal* **28**, 3657–3666 (2009).
341. Kanao, R. *et al.* Relevance of Simultaneous Mono-Ubiquitinations of Multiple Units of PCNA Homo-Trimers in DNA Damage Tolerance. *PLOS ONE* **10**, e0118775 (2015).
342. Masuda, Y. *et al.* En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2–E3 pairs. *Nucleic Acids Research* **40**, 10394–10407 (2012).
343. Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M. F. & O'Donnell, M. A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Mol Cell* **19**, 805–815 (2005).
344. Yu, Y. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen is protected from degradation by forming a complex with MutT Homolog2. *J Biol Chem* **284**, 19310–19320 (2009).
345. Takawa, M. *et al.* Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression. *Cancer Res* **72**, 3217–3227 (2012).
346. Wang, Z. *et al.* REV1 promotes PCNA monoubiquitylation through interacting with ubiquitylated RAD18. *J Cell Sci* **129**, 1223–1233 (2016).
347. Lo, Y.-H., Ho, P.-C. & Wang, S.-C. Epidermal growth factor receptor protects proliferating cell nuclear antigen from cullin 4A protein-mediated proteolysis. *J Biol Chem* **287**, 27148–27157 (2012).
348. Ortega, J. *et al.* Phosphorylation of PCNA by EGFR inhibits mismatch repair and promotes misincorporation during DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5667–5672 (2015).
349. Gali, H. *et al.* Role of SUMO modification of human PCNA at stalled replication fork. *Nucleic Acids Res* **40**, 6049–6059 (2012).
350. Hishida, T., Hirade, Y., Haruta, N., Kubota, Y. & Iwasaki, H. Srs2 plays a critical role in reversible G2 arrest upon chronic and low doses of UV irradiation via two distinct homologous recombination-dependent mechanisms in postreplication repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* **30**, 4840–4850 (2010).
351. Cazzalini, O. *et al.* CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucleic Acids Research* **42**, 8433–8448 (2014).
352. Billon, P. *et al.* Acetylation of PCNA Sliding Surface by Eco1 Promotes Genome Stability through Homologous Recombination. *Molecular Cell* **65**, 78–90 (2017).
353. Siddiqui, K., On, K. F. & Diffley, J. F. X. Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012930 (2013).
354. Stodola, J. L. & Burgers, P. M. Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 402–408 (2016).
355. Yao, N. Y. & O'Donnell, M. DNA Replication: How Does a Sliding Clamp Slide? *Current Biology* **27**, R174–R176 (2017).
356. Mailand, N., Gibbs-Seymour, I. & Bekker-Jensen, S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 269–282 (2013).
357. Billon, P. & Côté, J. Novel mechanism of PCNA control through acetylation of its sliding surface. *Molecular and Cellular Oncology* **4**, 1–3 (2017).
358. Kubota, T., Nishimura, K., Kanemaki, M. T. & Donaldson, A. D. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell* **50**, 273–280 (2013).
359. Kupiec, M. Alternative clamp loaders/unloaders. *FEMS Yeast Res* **16**, fow084 (2016).
360. Moldovan, G.-L., Pfander, B. & Jentsch, S. PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* **23**, 723–732 (2006).
361. Collins, S. R. *et al.* Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**, 806–810 (2007).
362. Renaud-Young, M. *et al.* The NuA4 complex promotes translesion synthesis (TLS)-mediated DNA damage tolerance. *Genetics* **199**, 1065–1076 (2015).
363. Lu, S. *et al.* Eco1 is important for DNA damage repair in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle* **9**, 3335–3347 (2010).
364. Gordillo, M. *et al.* The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. *Hum Mol Genet* **17**, 2172–2180 (2008).

365. Terret, M.-E., Sherwood, R., Rahman, S., Qin, J. & Jallepalli, P. V. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* **462**, 231–234 (2009).
366. Unal, E. *et al.* A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**, 566–569 (2008).
367. Rolef Ben-Shahar, T. *et al.* Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**, 563–566 (2008).
368. Lengronne, A. *et al.* Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* **23**, 787–799 (2006).
369. Branzei, D. & Foiani, M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 208–219 (2010).
370. Sjögren, C. & Ström, L. S-phase and DNA damage activated establishment of sister chromatid cohesion—importance for DNA repair. *Exp Cell Res* **316**, 1445–1453 (2010).
371. Li, J., Holzschu, D. L. & Sugiyama, T. PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase δ , η , and ζ activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7672–7677 (2013).
372. Streich, F. C. & Lima, C. D. Capturing a substrate in an activated RING E3/E2-SUMO complex. *Nature* **536**, 304–308 (2016).
373. Kumari, P., Sundaram, R., Manohar, K., Vasudevan, D. & Acharya, N. Interdomain connecting loop and J loop structures determine cross-species compatibility of PCNA. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 100911 (2021).
374. Halmi, M. *et al.* Mutations at the Subunit Interface of Yeast Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveal a Versatile Regulatory Domain. *PLoS One* **11**, e0161307 (2016).
375. van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology* **428**, 720–725 (2016).
376. Lau, W. C. Y., Li, Y., Zhang, Q. & Huen, M. S. Y. Molecular architecture of the Ub-PCNA/Pol h complex bound to DNA. *Scientific Reports* **5**, 1–11 (2015).
377. Walker, G. C. *et al.* Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**, 134–154 (2009).
378. Yang, W. & Woodgate, R. What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15591–8 (2007).
379. Yu, P. *et al.* p15(PAF), a novel PCNA associated factor with increased expression in tumor tissues. *Oncogene* **20**, 484–489 (2001).
380. Yuan, R.-H. *et al.* Overexpression of KIAA0101 predicts high stage, early tumor recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 5368–76 (2007).
381. Wang, Q. *et al.* NSSATP9 Contributes to Inhibition of Cell Proliferation by Hepatitis C Virus (HCV) Nonstructural Protein 5A (NSSA) via MEK / Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) Pathway. 10539–10551 (2013) doi:10.3390/ijms140510539.
382. Markus, J. *et al.* Methylation-independent silencing of the tumor suppressor INK4b (p15) by CBFbeta-SMMHC in acute myelogenous leukemia with inv(16). *Cancer research* **67**, 992–1000 (2007).
383. Chang, C.-N., Feng, M.-J., Chen, Y.-L., Yuan, R.-H. & Jeng, Y.-M. p15PAF Is an Rb/E2F-Regulated S-Phase Protein Essential for DNA Synthesis and Cell Cycle Progression. *PLoS ONE* **8**, e61196 (2013).
384. Bateman, A. *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**, D480–D489 (2021).
385. Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H. & Barford, D. Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature* **513**, 388–393 (2014).
386. Simpson, F. *et al.* The PCNA-associated factor KIAA0101/p15PAF binds the potential tumor suppressor product p33ING1b. *Experimental Cell Research* **312**, 73–85 (2006).
387. Liu, L. *et al.* Variant 1 of KIAA0101, overexpressed in hepatocellular carcinoma, prevents doxorubicin-induced apoptosis by inhibiting p53 activation. *Hepatology* **56**, 1760–1769 (2012).
388. Soto Martínez, J. L., Cabrera Morales, C. M., Serrano Ortega, S. & López-Nevot, M. A. Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **7**, 156–64 (2005).
389. Kato, T. *et al.* Lung Cancer Overexpression of KIAA0101 predicts poor prognosis in primary lung cancer patients. *Lung Cancer* **75**, 110–118 (2012).
390. Li, H. *et al.* Functional prediction of KIAA0101 gene in human non-small cell lung cancer. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* **30**, 157–9 (2010).
391. Kais, Z. *et al.* KIAA0101 interacts with BRCA1 and regulates centrosome number. *Molecular cancer research: MCR* **9**, 1091–9 (2011).
392. Lv, W., Su, B., Li, Y. & Geng, C. Biochemical and Biophysical Research Communications KIAA0101 inhibition suppresses cell proliferation and cell cycle progression by promoting the interaction between p53 and Sp1 in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **503**, 600–606 (2018).

V. Bibliografia

393. Liu, J. *et al.* Increased KIAA0101 gene expression associated with poor prognosis in breast cancer. *Translational Cancer Research* **0**, 0–0 (2021).
394. Zhang, C. *et al.* Effects of KIAA0101 expression on proliferation and invasion of gastric carcinoma MKN-45 cells. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology* **41**, 553–7 (2012).
395. Sakellariou, S. *et al.* Immunohistochemical expression of P15 (INK4B) and SMAD4 in advanced gastric cancer. *Anticancer research* **28**, 1079–83 (2008).
396. Wemmert, S. *et al.* p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients. *International journal of oncology* **34**, 1743–8 (2009).
397. Hosokawa, M. *et al.* Oncogenic Role of KIAA0101 Interacting with Proliferating Cell Nuclear Antigen in Pancreatic Cancer. 2568–2577 (2007) doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4356.
398. Jin, C. *et al.* PCNA-associated factor P15 PAF , targeted by FOXM1, predicts poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer* **143**, 2973–2984 (2018).
399. Mizutani, K. *et al.* Overexpressed in anaplastic thyroid carcinoma-1 (OEATC-1) as a novel gene responsible for anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer* **103**, 1785–1790 (2005).
400. Petroziello, J. *et al.* Suppression subtractive hybridization and expression profiling identifies a unique set of genes overexpressed in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **23**, 7734–7745 (2004).
401. Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 18–29 (2015).
402. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. & Lansbury, P. T. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709–13715 (1996).
403. Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M. & Obradović, Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**, 6573–6582 (2002).
404. Intrinsically Disordered Proteins in Biomedicine. <https://www.irbbarcelona.org/es/events/intrinsically-disordered-proteins-in-biomedicine>.
405. Dyson, H. J. Expanding the proteome: disordered and alternatively folded proteins. *Quarterly reviews of biophysics* **44**, 467–518 (2011).
406. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. & Jones, D. T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology* **337**, 635–645 (2004).
407. Turchi, L. *et al.* ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV stress. *Cell Death and Differentiation* **16**, 728–737 (2009).
408. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 197–208 (2005).
409. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein science: a publication of the Protein Society* **11**, 739–56 (2002).
410. The Nobel Prize in Chemistry 1972. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1972/press-release/>.
411. Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafranca, J. E. & Dunker, A. K. Identifying disordered regions in proteins from amino acid sequence. in *Proceedings of International Conference on Neural Networks (ICNN'97)* vol. 1 90–95 vol.1 (1997).
412. Dunker, A. K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E. C. & Brown, C. J. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **11**, 161–171 (2000).
413. Daughdrill, G. W., Hanely, L. J. & Dahlquist, F. W. The C-terminal half of the anti-sigma factor FlgM contains a dynamic equilibrium solution structure favoring helical conformations. *Biochemistry* **37**, 1076–1082 (1998).
414. Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I. & Wright, P. E. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11504–11509 (1996).
415. Liu, J. *et al.* Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry* **45**, 6873–6888 (2006).
416. Iakoucheva, L. M., Brown, C. J., Lawson, J. D., Obradović, Z. & Dunker, A. K. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *Journal of Molecular Biology* **323**, 573–584 (2002).
417. De Biasio, A. *et al.* P15PAF Is an intrinsically disordered protein with nonrandom structural preferences at sites of interaction with other proteins. *Biophysical Journal* **106**, 865–874 (2014).
418. Radhakrishnan, I. *et al.* Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* **91**, 741–752 (1997).
419. Tompa, P., Schäd, E., Tantos, A. & Kalmar, L. Intrinsically disordered proteins: Emerging interaction specialists. *Current Opinion in Structural Biology* **35**, 49–59 (2015).
420. Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M. & Uversky, V. N. Flexible nets: The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS Journal* **272**, 5129–5148 (2005).

421. Garner, null, Cannon, null, Romero, null, Obradovic, null & Dunker, null. Predicting Disordered Regions from Amino Acid Sequence: Common Themes Despite Differing Structural Characterization. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **9**, 201–213 (1998).
422. Romero, P., Obradovic, Z. & Dunker, A. K. Folding minimal sequences: the lower bound for sequence complexity of globular proteins. *FEBS Lett* **462**, 363–367 (1999).
423. Williams, R. M. *et al.* The protein non-folding problem: amino acid determinants of intrinsic order and disorder. *Pac Symp Biocomput* 89–100 (2001) doi:10.1142/9789814447362_0010.
424. Fukuchi, S., Homma, K., Minezaki, Y., Gojobori, T. & Nishikawa, K. Development of an accurate classification system of proteins into structured and unstructured regions that uncovers novel structural domains: its application to human transcription factors. *BMC Struct Biol* **9**, 26 (2009).
425. Galzitskaya, O. V., Garbuzynskiy, S. O. & Lobanov, M. Y. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. *PLoS Comput Biol* **2**, e177 (2006).
426. Deriusheva, E. I., Galzitskaia, O. V. & Serdiuk, I. N. [Prediction of short loops in the proteins with internal disorder]. *Mol Biol (Mosk)* **42**, 1067–1078 (2008).
427. Schlessinger, A., Punta, M. & Rost, B. Natively unstructured regions in proteins identified from contact predictions. *Bioinformatics* **23**, 2376–2384 (2007).
428. Campen, A. *et al.* TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder. *Protein Pept Lett* **15**, 956–963 (2008).
429. Prilusky, J. *et al.* FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* **21**, 3435–3438 (2005).
430. Xue, B., Oldfield, C. J., Dunker, A. K. & Uversky, V. N. CDF it all: consensus prediction of intrinsically disordered proteins based on various cumulative distribution functions. *FEBS Lett* **583**, 1469–1474 (2009).
431. Sickmeier, M. *et al.* DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, D786–793 (2007).
432. Weathers, E. A., Paulaitis, M. E., Woolf, T. B. & Hoh, J. H. Reduced amino acid alphabet is sufficient to accurately recognize intrinsically disordered protein. *FEBS Lett* **576**, 348–352 (2004).
433. Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* **41**, 415–427 (2000).
434. Linding, R. *et al.* Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure* **11**, 1453–1459 (2003).
435. Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V. & Gibson, T. J. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* **31**, 3701–3708 (2003).
436. Frankel, A. D. & Kim, P. S. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell* **65**, 717–719 (1991).
437. Dunker, A. K. *et al.* Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**, 26–59 (2001).
438. Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology* **293**, 321–31 (1999).
439. Tsvetkov, P., Reuven, N. & Shaul, Y. The nanny model for IDPs. *Nat Chem Biol* **5**, 778–781 (2009).
440. Hegyi, H. & Tompa, P. Intrinsically disordered proteins display no preference for chaperone binding in vivo. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000017 (2008).
441. Tompa, P. & Csermely, P. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J* **18**, 1169–1175 (2004).
442. Sue, S.-C., Cervantes, C., Komives, E. A. & Dyson, H. J. Transfer of flexibility between ankyrin repeats in I κ B* upon formation of the NF- κ B complex. *J Mol Biol* **380**, 917–931 (2008).
443. Feige, M. J. *et al.* An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell* **34**, 569–579 (2009).
444. Iakoucheva, L. M. & Dunker, A. K. Order, disorder, and flexibility: prediction from protein sequence. *Structure* **11**, 1316–1317 (2003).
445. van der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev* **114**, 6589–6631 (2014).
446. Galea, C. A., Wang, Y., Sivakolundu, S. G. & Kriwacki, R. W. Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry* **47**, 7598–7609 (2008).
447. Vavouri, T., Semple, J. I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* **138**, 198–208 (2009).
448. Gsponer, J., Futschik, M. E., Teichmann, S. A. & Babu, M. M. Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* **322**, 1365–1368 (2008).

V. Bibliografia

449. Babu, M. M., van der Lee, R., de Groot, N. S. & Gsponer, J. Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 432–440 (2011).
450. Uversky, V. N. & Eliezer, D. Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of alpha-synuclein. *Curr Protein Pept Sci* **10**, 483–499 (2009).
451. Uversky, V. N. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 5188–5238 (2009).
452. Midic, U., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z. & Uversky, V. N. Unfoldomics of human genetic diseases: illustrative examples of ordered and intrinsically disordered members of the human diseasome. *Protein Pept Lett* **16**, 1533–1547 (2009).
453. Metallo, S. J. Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 481–488 (2010).
454. Uversky, V. N. Targeting intrinsically disordered proteins in neurodegenerative and protein dysfunction diseases: another illustration of the D(2) concept. *Expert Rev Proteomics* **7**, 543–564 (2010).
455. Rezaei-Ghaleh, N., Blackledge, M. & Zweckstetter, M. Intrinsically disordered proteins: from sequence and conformational properties toward drug discovery. *Chembiochem* **13**, 930–950 (2012).
456. Santner, A. A. *et al.* Sweeping away protein aggregation with entropic bristles: intrinsically disordered protein fusions enhance soluble expression. *Biochemistry* **51**, 7250–7262 (2012).
457. Bailey, R. W., Dunker, A. K., Brown, C. J., Garner, E. C. & Griswold, M. D. Clusterin, a binding protein with a molten globule-like region. *Biochemistry* **40**, 11828–11840 (2001).
458. Forman-Kay, J. D. & Mittag, T. From sequence and forces to structure, function, and evolution of intrinsically disordered proteins. *Structure* **21**, 1492–1499 (2013).
459. Huang, A. & Stultz, C. M. Finding order within disorder: elucidating the structure of proteins associated with neurodegenerative disease. *Future Med Chem* **1**, 467–482 (2009).
460. Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470–476 (2008).
461. Ellis, J. D. *et al.* Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Mol Cell* **46**, 884–892 (2012).
462. Buljan, M. *et al.* Tissue-specific splicing of disordered segments that embed binding motifs rewires protein interaction networks. *Mol Cell* **46**, 871–883 (2012).
463. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Current opinion in structural biology* **12**, 54–60 (2002).
464. Mohan, A. *et al.* Analysis of molecular recognition features (MoRFs). *J Mol Biol* **362**, 1043–1059 (2006).
465. Neduva, V. & Russell, R. B. Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS Lett* **579**, 3342–3345 (2005).
466. Tompa, P. Multiteric regulation by structural disorder in modular signaling proteins: An extension of the concept of allostery. *Chemical Reviews* **114**, 6715–6732 (2014).
467. Oldfield, C. J. *et al.* Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. *Biochemistry* **44**, 12454–12470 (2005).
468. Pontius, B. W. Close encounters: why unstructured, polymeric domains can increase rates of specific macromolecular association. *Trends Biochem Sci* **18**, 181–186 (1993).
469. Stein, A., Pache, R. A., Bernadó, P., Pons, M. & Aloy, P. Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J* **276**, 5390–5405 (2009).
470. Tang, X. *et al.* Composite low affinity interactions dictate recognition of the cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3287–3292 (2012).
471. Mittag, T., Kay, L. E. & Forman-Kay, J. D. Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *J Mol Recognit* **23**, 105–116 (2010).
472. Van Roey, K., Dinkel, H., Weatheritt, R. J., Gibson, T. J. & Davey, N. E. The switches.ELM resource: a compendium of conditional regulatory interaction interfaces. *Sci Signal* **6**, rs7 (2013).
473. Borg, M. *et al.* Polyelectrostatic interactions of disordered ligands suggest a physical basis for ultrasensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9650–9655 (2007).
474. Lee, C. W., Ferreon, J. C., Ferreon, A. C. M., Arai, M. & Wright, P. E. Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19290–19295 (2010).
475. Gsponer, J. & Babu, M. M. The rules of disorder or why disorder rules. *Prog Biophys Mol Biol* **99**, 94–103 (2009).
476. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 197–208 (2005).
477. Pejaver, V. *et al.* The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Sci* **23**, 1077–1093 (2014).

478. Iakoucheva, L. M. *et al.* The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* **32**, 1037–1049 (2004).
479. Chrivia, J. C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855–859 (1993).
480. Mittag, T. *et al.* Dynamic equilibrium engagement of a polyvalent ligand with a single-site receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17772–17777 (2008).
481. Nash, P. *et al.* Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514–521 (2001).
482. Mittag, T. *et al.* Structure/function implications in a dynamic complex of the intrinsically disordered Sic1 with the Cdc4 subunit of an SCF ubiquitin ligase. *Structure* **18**, 494–506 (2010).
483. Wang, Y. *et al.* Intrinsic disorder mediates the diverse regulatory functions of the Cdk inhibitor p21. *Nat Chem Biol* **7**, 214–221 (2011).
484. Bertagna, A., Toptygin, D., Brand, L. & Barrick, D. The effects of conformational heterogeneity on the binding of the Notch intracellular domain to effector proteins: a case of biologically tuned disorder. *Biochem Soc Trans* **36**, 157–166 (2008).
485. Chong, P. A., Lin, H., Wrana, J. L. & Forman-Kay, J. D. Coupling of tandem Smad ubiquitination regulatory factor (Smurf) WW domains modulates target specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18404–18409 (2010).
486. Vuzman, D., Azia, A. & Levy, Y. Searching DNA via a ‘Monkey Bar’ mechanism: the significance of disordered tails. *J Mol Biol* **396**, 674–684 (2010).
487. Vuzman, D., Polonsky, M. & Levy, Y. Facilitated DNA search by multidomain transcription factors: cross talk via a flexible linker. *Biophys J* **99**, 1202–1211 (2010).
488. Jowitt, T. A. *et al.* Order within disorder: aggrecan chondroitin sulphate-attachment region provides new structural insights into protein sequences classified as disordered. *Proteins* **78**, 3317–3327 (2010).
489. Lange, S., Agarkova, I., Perriard, J.-C. & Ehler, E. The sarcomeric M-band during development and in disease. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 375–379 (2005).
490. Smaghe, B. J., Huang, P.-S., Ban, Y.-E. A., Baker, D. & Springer, T. A. Modulation of integrin activation by an entropic spring in the {beta}-knee. *J Biol Chem* **285**, 32954–32966 (2010).
491. Wissmann, R. *et al.* NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel beta-subunit Kvbeta1.1. *J Biol Chem* **274**, 35521–35525 (1999).
492. Bentrop, D., Beyermann, M., Wissmann, R. & Fakler, B. NMR structure of the ‘ball-and-chain’ domain of KCNMB2, the beta 2-subunit of large conductance Ca²⁺- and voltage-activated potassium channels. *J Biol Chem* **276**, 42116–42121 (2001).
493. Hilser, V. J. & Thompson, E. B. Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8311–8315 (2007).
494. Ferreon, A. C. M., Ferreon, J. C., Wright, P. E. & Deniz, A. A. Modulation of allostery by protein intrinsic disorder. *Nature* **498**, 390–394 (2013).
495. Gunasekaran, K., Tsai, C.-J., Kumar, S., Zanuy, D. & Nussinov, R. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends Biochem Sci* **28**, 81–85 (2003).
496. Dunker, A. K. *et al.* Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput* 473–484 (1998).
497. Shoemaker, B. A., Portman, J. J. & Wolynes, P. G. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8868–8873 (2000).
498. Huang, Y. & Liu, Z. Kinetic advantage of intrinsically disordered proteins in coupled folding-binding process: a critical assessment of the ‘fly-casting’ mechanism. *J Mol Biol* **393**, 1143–1159 (2009).
499. Hsu, W.-L. *et al.* Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Sci* **22**, 258–273 (2013).
500. Oldfield, C. J. *et al.* Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* **9 Suppl 1**, S1 (2008).
501. Mukherjee, S. P. *et al.* Analysis of the RelA:CBP/p300 interaction reveals its involvement in NF- κ B-driven transcription. *PLoS Biol* **11**, e1001647 (2013).
502. Ishiyama, N. *et al.* Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell* **141**, 117–128 (2010).
503. Frye, J. J. *et al.* Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 827–835 (2013).
504. Nussinov, R. & Tsai, C.-J. Allostery in disease and in drug discovery. *Cell* **153**, 293–305 (2013).
505. Motlagh, H. N., Wrabl, J. O., Li, J. & Hilser, V. J. The ensemble nature of allostery. *Nature* **508**, 331–339 (2014).

V. Bibliografia

506. Li, J., Motlagh, H. N., Chakuroff, C., Thompson, E. B. & Hilser, V. J. Thermodynamic dissection of the intrinsically disordered N-terminal domain of human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **287**, 26777–26787 (2012).
507. Tainer, J. A. *et al.* The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature* **312**, 127–134 (1984).
508. Sandhu, K. S. Intrinsic disorder explains diverse nuclear roles of chromatin remodeling proteins. *J Mol Recognit* **22**, 1–8 (2009).
509. Nocula-Ługowska, M., Rymarczyk, G., Lisowski, M. & Ozyhar, A. Isoform-specific variation in the intrinsic disorder of the ecdysteroid receptor N-terminal domain. *Proteins* **76**, 291–308 (2009).
510. Kumar, R. & Thompson, E. B. Influence of flanking sequences on signaling between the activation function AF1 and DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Arch Biochem Biophys* **496**, 140–145 (2010).
511. Demarest, S. J. *et al.* Mutual synergistic folding in recruitment of cbp/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* **415**, 549–553 (2002).
512. Waters, L. *et al.* Structural diversity in p160/CREB-binding protein coactivator complexes. *J Biol Chem* **281**, 14787–14795 (2006).
513. Berk, A. J. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* **24**, 7673–7685 (2005).
514. Fax, P., Lipinski, K. S., Esche, H. & Brockmann, D. cAMP-independent activation of the adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A(12S), and CBP to the E2-CRE. *J Biol Chem* **275**, 8911–8920 (2000).
515. Green, M., Panesar, N. K. & Loewenstein, P. M. The transcription-repression domain of the adenovirus E1A oncoprotein targets p300 at the promoter. *Oncogene* **27**, 4446–4455 (2008).
516. Baker, J. M. R. *et al.* CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 738–745 (2007).
517. Tompa, P. & Fuxreiter, M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* **33**, 2–8 (2008).
518. Sigalov, A. B., Kim, W. M., Saline, M. & Stern, L. J. The intrinsically disordered cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain binds to the nef protein of simian immunodeficiency virus without a disorder-to-order transition. *Biochemistry* **47**, 12942–12944 (2008).
519. Ferreon, J. C., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Structural basis for subversion of cellular control mechanisms by the adenoviral E1A oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13260–13265 (2009).
520. Tóth-Petróczy, A. *et al.* Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000243 (2008).
521. Frey, S., Richter, R. P. & Görlich, D. FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* **314**, 815–817 (2006).
522. Guharoy, M., Szabo, B., Contreras Martos, S., Kosol, S. & Tompa, P. Intrinsic structural disorder in cytoskeletal proteins. *Cytoskeleton (Hoboken)* **70**, 550–571 (2013).
523. Borgia, A. *et al.* Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. *Nature* **555**, 61–66 (2018).
524. Kedersha, N., Ivanov, P. & Anderson, P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci* **38**, 494–506 (2013).
525. Li, P. *et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **483**, 336–340 (2012).
526. Weber, S. C. & Brangwynne, C. P. Getting RNA and protein in phase. *Cell* **149**, 1188–1191 (2012).
527. Kato, M. *et al.* Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
528. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, eaaf4382 (2017).
529. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 285–298 (2017).
530. Malinowska, L., Kroschwald, S. & Alberti, S. Protein disorder, prion propensities, and self-organizing macromolecular collectives. *Biochim Biophys Acta* **1834**, 918–931 (2013).
531. Boeynaems, S. *et al.* Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol* **28**, 420–435 (2018).
532. Kwon, I. *et al.* Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science* **345**, 1139–1145 (2014).
533. Michelitsch, M. D. & Weissman, J. S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11910–11915 (2000).
534. Chong, P. A. & Forman-Kay, J. D. Liquid–liquid phase separation in cellular signaling systems. *Current Opinion in Structural Biology* **41**, 180–186 (2016).

535. Notterman, D. A., Alon, U., Sierk, A. J. & Levine, A. J. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* **61**, 3124–3130 (2001).
536. Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159–180 (2006).
537. De Biasio, A. & Blanco, F. J. Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer? *Adv Protein Chem Struct Biol* **91**, 1–36 (2013).
538. Cordeiro, T. N. *et al.* Disentangling polydispersity in the PCNA-p15PAF complex, a disordered, transient and multivalent macromolecular assembly. *Nucleic Acids Res* **45**, 1501–1515 (2017).
539. Warbrick, E., Heatherington, W., Lane, D. P. & Glover, D. M. PCNA binding proteins in *Drosophila melanogaster*: the analysis of a conserved PCNA binding domain. *Nucleic Acids Res* **26**, 3925–3932 (1998).
540. Shell, S. S., Putnam, C. D. & Kolodner, R. D. The N Terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Msh6 Is an Unstructured Tether to PCNA. **3**, 565–578 (2007).
541. Xiong, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701–704 (1993).
542. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**, 1149–1163 (1995).
543. Talavera, D., Robertson, D. L. & Lovell, S. C. Characterization of Protein-Protein Interaction Interfaces from a Single Species. *PLOS ONE* **6**, e21053 (2011).
544. De Biasio, A. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interactions in solution studied by NMR. *PLoS One* **7**, e48390 (2012).
545. Sibille, N. & Bernado, P. Structural characterization of intrinsically disordered proteins by the combined use of NMR and SAXS. (2012) doi:10.1042/BST20120149.
546. Knight, C. J. & Hub, J. S. WAXSiS: A web server for the calculation of SAXS/WAXS curves based on explicit-solvent molecular dynamics. *Nucleic Acids Research* **43**, W225–W230 (2015).
547. Wang, F. *et al.* Telocytes in liver regeneration: possible roles. *J Cell Mol Med* **18**, 1720–1726 (2014).
548. Zhao, H. *et al.* Targeting tyrosine phosphorylation of PCNA inhibits prostate cancer growth. *Mol Cancer Ther* **10**, 29–36 (2011).
549. Punchihewa, C. *et al.* Identification of Small Molecule Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Inhibitor That Disrupts Interactions with PIP-box Proteins and Inhibits DNA Replication * □. **287**, 14289–14300 (2012).
550. Tan, Z. *et al.* Small-molecule targeting of proliferating cell nuclear antigen chromatin association inhibits tumor cell growth. *Mol Pharmacol* **81**, 811–819 (2012).
551. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401–4 (2012).
552. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* **6**, pl1 (2013).
553. Ghosal, G. & Chen, J. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl Cancer Res* **2**, 107–129 (2013).
554. Korzhnev, D. M. & Hadden, M. K. Targeting the Translesion Synthesis Pathway for the Development of Anti-Cancer Chemotherapeutics. *J Med Chem* **59**, 9321–9336 (2016).
555. Sail, V. *et al.* Identification of Small Molecule Translesion Synthesis Inhibitors That Target the Rev1-CT/RIR Protein-Protein Interaction. *ACS Chem Biol* **12**, 1903–1912 (2017).
556. Actis, M. *et al.* Small molecule inhibitors of PCNA/PIP-box interaction suppress translesion DNA synthesis. *Bioorg Med Chem* **21**, 1972–1977 (2013).
557. Kosol, S., Contreras-Martos, S., Cedeño, C. & Tompa, P. Structural characterization of intrinsically disordered proteins by NMR spectroscopy. *Molecules* **18**, 10802–10828 (2013).
558. McAlister, M. S. B. *et al.* NMR analysis of interacting soluble forms of the cell-cell recognition molecules CD2 and CD48. *Biochemistry* **35**, 5982–5991 (1996).
559. Park, S. J., Kostic, M. & Dyson, H. J. Dynamic interaction of Hsp90 with its client protein p53. *Journal of Molecular Biology* **411**, 158–173 (2011).
560. Hutton, R. D., Craggs, T. D., White, M. F. & Penedo, J. C. PCNA and XPF cooperate to distort DNA substrates. *Nucleic Acids Research* **38**, 1664–1675 (2009).
561. Bernadó, P. & Svergun, D. I. Analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Methods Mol Biol* **896**, 107–122 (2012).
562. Abbas, T. & Dutta, A. P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer* **9**, 400–414 (2009).
563. Chen, J. *et al.* A 39 amino acid fragment of the cell cycle regulator p21 is sufficient to bind PCNA and partially inhibit DNA replication in vivo. *Nucleic Acids Research* **24**, 1727–1733 (1996).

V. Bibliografía

564. Toutou, R. *et al.* A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. *EMBO Journal* **20**, 2367–2375 (2001).
565. Randell, J. C. & Coen, D. M. Linear Diffusion on DNA Despite High-Affinity Binding by a DNA Polymerase Processivity Factor. *Molecular Cell* **8**, 911–920 (2001).
566. Hedglin, M., Pandey, B. & Benkovic, S. J. Characterization of human translesion DNA synthesis across a UV-induced DNA lesion. *eLife* **5**, (2016).
567. Haracska, L., Unk, I., Prakash, L. & Prakash, S. Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6477–82 (2006).
568. Dzantiev, L. *et al.* A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Molecular cell* **15**, 31–41 (2004).
569. Xie, B. *et al.* Reconstitution and characterization of the human DNA polymerase delta four-subunit holoenzyme. *Biochemistry* **41**, 13133–42 (2002).
570. Rahmeh, A. A. *et al.* Phosphorylation of the p68 subunit of Pol δ acts as a molecular switch to regulate its interaction with PCNA. *Biochemistry* **51**, 416–24 (2012).
571. Zhang, S. *et al.* A novel DNA damage response: Rapid degradation of the p12 subunit of DNA polymerase δ . *Journal of Biological Chemistry* **282**, 15330–15340 (2007).
572. Meng, X. *et al.* DNA damage alters DNA polymerase delta to a form that exhibits increased discrimination against modified template bases and mismatched primers. *Nucleic acids research* **37**, 647–57 (2009).
573. Meng, X., Zhou, Y., Lee, E. Y. C., Lee, M. Y. W. T. & Frick, D. N. The p12 subunit of human polymerase delta modulates the rate and fidelity of DNA synthesis. *Biochemistry* **49**, 3545–54 (2010).
574. Biertümpfel, C. *et al.* Structure and mechanism of human DNA polymerase ϵ . *Nature* **465**, 1044–1048 (2010).
575. Frank, E. G., McDonald, J. P., Karata, K., Huston, D. & Woodgate, R. A strategy for the expression of recombinant proteins traditionally hard to purify. *Analytical biochemistry* **429**, 132–9 (2012).
576. Arroyo, M. P., Downey, K. M., So, A. G. & Wang, T. S. Schizosaccharomyces pombe proliferating cell nuclear antigen mutations affect DNA polymerase delta processivity. *The Journal of biological chemistry* **271**, 15971–80 (1996).
577. Amin, N. S. & Holm, C. In vivo analysis reveals that the interdomain region of the yeast proliferating cell nuclear antigen is important for DNA replication and DNA repair. *Genetics* **144**, 479–93 (1996).
578. Kelman, Z. & O'Donnell, M. DNA replication: enzymology and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 185–195 (1994).
579. Lee, S. H. & Hurwitz, J. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5672–5676 (1990).
580. Tsurimoto, T. & Stillman, B. Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 1023–1027 (1990).
581. Stillman, B. Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* **78**, 725–728 (1994).
582. Oke, M., Zaher, M. S. & Hamdan, S. M. Mechanism of PCNA Loading by RFC. *Bell E. (eds) Molecular Life Sciences* 1–6 (2017) doi:10.1007/978-1-4614-6436-5.
583. O'Donnell, M., Onrust, R., Dean, F. B., Chen, M. & Hurwitz, J. Homology in accessory proteins of replicative polymerases--E. coli to humans. *Nucleic Acids Res* **21**, 1–3 (1993).
584. Yao, N. Y. & O'Donnell, M. The RFC Clamp Loader: Structure and Function. *Subcell Biochem* **62**, 259–279 (2012).
585. Oke, M., Zaher, M. S. & Hamdan, S. M. Mechanism of PCNA Loading by RFC. in *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference* (ed. Bell, E.) 1–6 (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-6436-5_137-1.
586. Kelch, B. A., Makino, D. L., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Clamp loader ATPases and the evolution of DNA replication machinery. *BMC Biol* **10**, 34 (2012).
587. Nishida, C., Reinhard, P. & Linn, S. DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase delta. *The Journal of biological chemistry* **263**, 501–10 (1988).
588. Syvaoja, J. & Linn, S. Characterization of a large form of DNA polymerase delta from HeLa cells that is insensitive to proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry* **264**, 2489–97 (1989).
589. Araki, H. *et al.* DNA polymerase II, the probable homolog of mammalian DNA polymerase epsilon, replicates chromosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **11**, 733–40 (1992).
590. Tsurimoto, T. & Stillman, B. Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 1950–1960 (1991).
591. Miyata, T. *et al.* The clamp-loading complex for processive DNA replication. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**, 632–636 (2004).

592. Barsky, D. & Venclovas, C. DNA sliding clamps: just the right twist to load onto DNA. *Current biology: CB* **15**, R989-92 (2005).
593. Kazmirski, S. L., Zhao, Y., Bowman, G. D., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. Out-of-plane motions in open sliding clamps: Molecular dynamics simulations of eukaryotic and archaeal proliferating cell nuclear antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13801–13806 (2005).
594. Tainer, J. A., McCammon, J. A. & Ivanov, I. Recognition of the ring-opened state of proliferating cell nuclear antigen by replication factor C promotes eukaryotic clamp-loading. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 7372–7378 (2010).
595. Bowman, G. D., Goedken, E. R., Kazmirski, S. L., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS Lett* **579**, 863–867 (2005).
596. Duderstadt, K. E. & Berger, J. M. AAA+ ATPases in the initiation of DNA replication. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**, 163–187 (2008).
597. Adelman, J. L., Chodera, J. D., Kuo, L. F. W., Miller, T. F. & Barsky, D. The mechanical properties of PCNA: Implications for the loading and function of a DNA sliding clamp. *Biophysical Journal* **98**, 3062–3069 (2010).
598. Sakato, M., Zhou, Y. & Hingorani, M. M. ATP Binding and Hydrolysis-Driven Rate-Determining Events in the RFC-Catalyzed PCNA Clamp Loading Reaction. *J Mol Biol* **416**, 176–191 (2012).
599. Sakato, M., O'Donnell, M. & Hingorani, M. M. A Central Swivel Point in the RFC Clamp Loader Controls PCNA Opening and Loading on DNA. *J Mol Biol* **416**, 163–175 (2012).
600. Chen, S., Levin, M. K., Sakato, M., Zhou, Y. & Hingorani, M. M. Mechanism of ATP-driven PCNA clamp loading by *S. cerevisiae* RFC. *J Mol Biol* **388**, 431–442 (2009).
601. Zhuang, Z., Yoder, B. L., Burgers, P. M. J. & Benkovic, S. J. The structure of a ring-opened proliferating cell nuclear antigen-replication factor C complex revealed by fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2546–2551 (2006).
602. Johnson, A., Yao, N. Y., Bowman, G. D., Kuriyan, J. & O'Donnell, M. The replication factor C clamp loader requires arginine finger sensors to drive DNA binding and proliferating cell nuclear antigen loading. *J Biol Chem* **281**, 35531–35543 (2006).
603. Hingorani, M. M. & Coman, M. M. On the Specificity of Interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* Clamp Loader Replication Factor C and Primed DNA Templates during DNA Replication. *J Biol Chem* **277**, 47213–47224 (2002).
604. Binder, J. K. *et al.* Intrinsic stability and oligomerization dynamics of DNA processivity clamps. *Nucleic Acids Res* **42**, 6476–6486 (2014).
605. Marzahn, M. R., Hayner, J. N., Meyer, J. A. & Bloom, L. B. Kinetic analysis of PCNA clamp binding and release in the clamp loading reaction catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. *Biochimica et biophysica acta* **1854**, 31–8 (2015).
606. Karplus, M. [15]Internal dynamics of proteins. in *Methods in Enzymology* vol. 131 283–307 (Academic Press, 1986).
607. Ringe, D. & Petsko, G. A. Study of protein dynamics by X-ray diffraction. *Methods Enzymol* **131**, 389–433 (1986).
608. Parak, F. & Reinisch, L. [24]Mössbauer effect in the study of structure dynamics. in *Methods in Enzymology* vol. 131 568–607 (Academic Press, 1986).
609. Dobson, C. M. & Karplus, M. [18]Internal motion of proteins: Nuclear magnetic resonance measurements and dynamic simulations. in *Methods in Enzymology* vol. 131 362–389 (Academic Press, 1986).
610. Wagner, G. & Wüthrich, K. [16]Observation of internal motility of proteins by nuclear magnetic resonance in solution. in *Methods in Enzymology* vol. 131 307–326 (Academic Press, 1986).
611. Opella, S. J. [17]Protein dynamics by solid state nuclear magnetic resonance. in *Methods in Enzymology* vol. 131 327–361 (Academic Press, 1986).
612. Yuan, Z., Zhao, J. & Wang, Z.-X. Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Eng* **16**, 109–114 (2003).
613. Petsko, G. A. & Ringe, D. Fluctuations in Protein Structure from X-Ray Diffraction. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **13**, 331–371 (1984).
614. Bank, R. P. D. RCSB PDB: Homepage. <https://www.rcsb.org/>.
615. Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235–242 (2000).
616. Burley, S. K. *et al.* RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research* **49**, D437–D451 (2021).
617. Chruszcz, M., Wlodawer, A. & Minor, W. Determination of Protein Structures—A Series of Fortunate Events. *Biophysical Journal* **95**, 1–9 (2008).
618. Kruschel, D. & Zagrovic, B. Conformational averaging in structural biology: issues, challenges and computational solutions. *Mol. Biosyst.* **5**, 1606–1616 (2009).
619. Wilson, M. A. & Brunger, A. T. The 1.0 Å crystal structure of Ca²⁺-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity¹¹ Edited by I. Wilson. *Journal of Molecular Biology* **301**, 1237–1256 (2000).

V. Bibliografia

620. Rader, S. D. & Agard, D. A. Conformational substates in enzyme mechanism: The 120 K structure of α -lytic protease at 1.5 Å resolution. *Protein Science* **6**, 1375–1386 (1997).
621. Rejto, P. A. & Freer, S. T. Protein conformational substates from X-ray crystallography. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **66**, 167–196 (1996).
622. Zagrovic, B. Helical signature motif in the fibre diffraction patterns of random-walk chains. *Molecular Physics* **105**, 1299–1306 (2007).
623. Zagrovic, B. & Pande, V. S. Simulated Unfolded-State Ensemble and the Experimental NMR Structures of Villin Headpiece Yield Similar Wide-Angle Solution X-ray Scattering Profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11742–11743 (2006).
624. Bürgi, R., Pitera, J. & van Gunsteren, W. F. Assessing the effect of conformational averaging on the measured values of observables. *J. Biomol NMR* **19**, 305–320 (2001).
625. Kuriyan, J., Petsko, G. A., Levy, R. M. & Karplus, M. Effect of anisotropy and anharmonicity on protein crystallographic refinement: An evaluation by molecular dynamics. *Journal of Molecular Biology* **190**, 227–254 (1986).
626. García, A. E., Krumhansl, J. A. & Frauenfelder, H. Variations on a theme by Debye and Waller: From simple crystals to proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **29**, 153–160 (1997).
627. Tang, K. E. S. & Dill, K. A. Native Protein Fluctuations: The Conformational-Motion Temperature and the Inverse Correlation of Protein Flexibility with Protein Stability. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **16**, 397–411 (1998).
628. Debye, P. Interferenz von Röntgenstrahlen und Wärmebewegung. *Annalen der Physik* **348**, 49–92 (1913).
629. Waller, I. Zur Frage der Einwirkung der Wärmebewegung auf die Interferenz von Röntgenstrahlen. *Z. Physik* **17**, 398–408 (1923).
630. Navizet, I., Lavery, R. & Jernigan, R. L. Myosin flexibility: structural domains and collective vibrations. *Proteins* **54**, 384–393 (2004).
631. Lu, C.-H. *et al.* On the relationship between the protein structure and protein dynamics. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **72**, 625–634 (2008).
632. Lu, W. c., Wang, C. z., Yu, E. w. & Ho, K. m. Dynamics of the trimeric AcrB transporter protein inferred from a B-factor analysis of the crystal structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **62**, 152–158 (2006).
633. Vihinen, M., Torkkila, E. & Riikonen, P. Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **19**, 141–149 (1994).
634. Karplus, P. A. & Schulz, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* **72**, 212–213 (1985).
635. Parthasarathy, S. & Murthy, M. R. N. Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein Engineering, Design and Selection* **13**, 9–13 (2000).
636. Reetz, M. T., Soni, P. & Fernández, L. Knowledge-guided laboratory evolution of protein thermostability. *Biotechnol Bioeng* **102**, 1712–1717 (2009).
637. Vihinen, M. Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng* **1**, 477–480 (1987).
638. Polyansky, A. A., Kuzmanic, A., Hlevnjak, M. & Zagrovic, B. On the Contribution of Linear Correlations to Quasi-harmonic Conformational Entropy in Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3820–3829 (2012).
639. Isin, B., Tirupula, K. C., Oltvai, Z. N., Klein-Seetharaman, J. & Bahar, I. Identification of motions in membrane proteins by elastic network models and their experimental validation. *Methods Mol Biol* **914**, 285–317 (2012).
640. Kundu, S., Melton, J. S., Sorensen, D. C. & Phillips, G. N. Dynamics of Proteins in Crystals: Comparison of Experiment with Simple Models. *Biophysical Journal* **83**, 723–732 (2002).
641. Lindorff-Larsen, K., Best, R. B., DePristo, M. A., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. Simultaneous determination of protein structure and dynamics. *Nature* **433**, 128–132 (2005).
642. Glykos, N. M. On the application of molecular-dynamics simulations to validate thermal parameters and to optimize TLS-group selection for macromolecular refinement. *Acta Cryst D* **63**, 705–713 (2007).
643. Mohan, S., Sinha, N. & Smith-Gill, S. J. Modeling the binding sites of anti-hen egg white lysozyme antibodies HyHEL-8 and HyHEL-26: an insight into the molecular basis of antibody cross-reactivity and specificity. *Biophys J* **85**, 3221–3236 (2003).
644. Carugo, O. & Argos, P. Accessibility to internal cavities and ligand binding sites monitored by protein crystallographic thermal factors. *Proteins* **31**, 201–213 (1998).
645. Carugo, O. & Argos, P. Correlation between side chain mobility and conformation in protein structures. *Protein Eng* **10**, 777–787 (1997).
646. Eyal, E., Najmanovich, R., Edelman, M. & Sobolev, V. Protein side-chain rearrangement in regions of point mutations. *Proteins* **50**, 272–282 (2003).
647. Kuzmanic, A. & Zagrovic, B. Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. *Biophysical Journal* **98**, 861–871 (2010).

648. Stroud, R. M. & Fauman, E. B. Significance of structural changes in proteins: expected errors in refined protein structures. *Protein Sci* **4**, 2392–2404 (1995).
649. Carugo, O. & Argos, P. Protein-protein crystal-packing contacts. *Protein Sci* **6**, 2261–2263 (1997).
650. Drenth, J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. (Springer, New York, NY, 2007).
651. Kuriyan, J. & Weis, W. I. Rigid protein motion as a model for crystallographic temperature factors. *PNAS* **88**, 2773–2777 (1991).
652. Carugo, O. Correlation between occupancy and B factor of water molecules in protein crystal structures. *Protein Engineering, Design and Selection* **12**, 1021–1024 (1999).
653. Kuzmanic, A., Pannu, N. S. & Zagrovic, B. X-ray refinement significantly underestimates the level of microscopic heterogeneity in biomolecular crystals. *Nature communications* **5**, 3220 (2014).
654. Liu, Q., Li, Z. & Li, J. Use B-factor related features for accurate classification between protein binding interfaces and crystal packing contacts. *BMC Bioinformatics* **15**, S3 (2014).
655. Yuan, Z., Bailey, T. L. & Teasdale, R. D. Prediction of protein B-factor profiles. *Proteins* **58**, 905–912 (2005).
656. Parthasarathy, S. & Murthy, M. R. Analysis of temperature factor distribution in high-resolution protein structures. *Protein Sci* **6**, 2561–2567 (1997).
657. McLachlan, A. D. Rapid comparison of protein structures. *Acta Cryst A* **38**, 871–873 (1982).
658. Coutsias, E. A., Seok, C. & Dill, K. A. Using quaternions to calculate RMSD. *J Comput Chem* **25**, 1849–1857 (2004).
659. Kabsch, W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst A* **32**, 922–923 (1976).
660. Brüschweiler, R. Efficient RMSD measures for the comparison of two molecular ensembles. Root-mean-square deviation. *Proteins* **50**, 26–34 (2003).
661. Troyer, J. M. & Cohen, F. E. Protein conformational landscapes: Energy minimization and clustering of a long molecular dynamics trajectory. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **23**, 97–110 (1995).
662. Dinner, A. R., Lazaridis, T. & Karplus, M. Understanding β -hairpin formation. *PNAS* **96**, 9068–9073 (1999).
663. Verma, A. & Wenzel, W. A free-energy approach for all-atom protein simulation. *Biophys J* **96**, 3483–3494 (2009).
664. Zagrovic, B., Snow, C. D., Shirts, M. R. & Pande, V. S. Simulation of folding of a small alpha-helical protein in atomistic detail using worldwide-distributed computing. *J Mol Biol* **323**, 927–937 (2002).
665. Zagrovic, B., Sorin, E. J. & Pande, V. Beta-hairpin folding simulations in atomistic detail using an implicit solvent model. *J Mol Biol* **313**, 151–169 (2001).
666. Daura, X., van Gunsteren, W. F. & Mark, A. E. Folding-unfolding thermodynamics of a beta-heptapeptide from equilibrium simulations. *Proteins* **34**, 269–280 (1999).
667. Daura, X., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W. F. & Mark, A. E. Reversible peptide folding in solution by molecular dynamics simulation. *J Mol Biol* **280**, 925–932 (1998).
668. Duan, Y. & Kollman, P. A. Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution. *Science* **282**, 740–744 (1998).
669. Rangwala, H. & Karypis, G. FRMSDPred: predicting local RMSD between structural fragments using sequence information. *Proteins* **72**, 1005–1018 (2008).
670. Zhang, Y. Progress and challenges in protein structure prediction. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 342–348 (2008).
671. Bowman, G. R. & Pande, V. S. The roles of entropy and kinetics in structure prediction. *PLoS One* **4**, e5840 (2009).
672. Schueler-Furman, O., Wang, C., Bradley, P., Misura, K. & Baker, D. Progress in modeling of protein structures and interactions. *Science* **310**, 638–642 (2005).
673. Saccenti, E. & Rosato, A. The war of tools: how can NMR spectroscopists detect errors in their structures? *J Biomol NMR* **40**, 251–261 (2008).
674. Andrec, M. *et al.* A large data set comparison of protein structures determined by crystallography and NMR: statistical test for structural differences and the effect of crystal packing. *Proteins* **69**, 449–465 (2007).
675. Zagrovic, B. & van Gunsteren, W. F. Computational Analysis of the Mechanism and Thermodynamics of Inhibition of Phosphodiesterase 5A by Synthetic Ligands. *J. Chem. Theory Comput.* **3**, 301–311 (2007).
676. Zhou, Z., Feng, H., Ghirlando, R. & Bai, Y. The high-resolution NMR structure of the early folding intermediate of the *Thermophilus* ribonuclease H. *J Mol Biol* **384**, 531–539 (2008).
677. Kövér, K. E. *et al.* The solution structure and dynamics of human pancreatic ribonuclease determined by NMR spectroscopy provide insight into its remarkable biological activities and inhibition. *J Mol Biol* **379**, 953–965 (2008).
678. Laurents, D. *et al.* Solution structure and dynamics of ribonuclease Sa. *Proteins* **44**, 200–211 (2001).

V. Bibliografia

679. Betancourt, M. R. & Skolnick, J. Finding the needle in a haystack: educing native folds from ambiguous ab initio protein structure predictions. *Journal of Computational Chemistry* **22**, 339–353 (2001).
680. Zhang, Y. & Skolnick, J. SPICKER: a clustering approach to identify near-native protein folds. *J Comput Chem* **25**, 865–871 (2004).
681. Shortle, D., Simons, K. T. & Baker, D. Clustering of low-energy conformations near the native structures of small proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11158–11162 (1998).
682. Sousa, S. F., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Molecular dynamics simulations on the critical states of the farnesyltransferase enzyme. *Bioorg Med Chem* **17**, 3369–3378 (2009).
683. Yin, J., Bowen, D. & Southerland, W. M. Barnase thermal titration via molecular dynamics simulations: detection of early denaturation sites. *J Mol Graph Model* **24**, 233–243 (2006).
684. Król, M. *et al.* Analysis of correlated domain motions in IgG light chain reveals possible mechanisms of immunological signal transduction. *Proteins* **59**, 545–554 (2005).
685. Pitera, J. W. Expected distributions of root-mean-square positional deviations in proteins. *Journal of Physical Chemistry B* **118**, 6526–6530 (2014).
686. Willis, B. T. M. & Pryor, A. W. *Thermal vibrations in crystallography*. vol. 50 (Cambridge University Press Cambridge, 1975).
687. Theobald, D. L. & Wuttke, D. S. THESEUS: maximum likelihood superpositioning and analysis of macromolecular structures. *Bioinformatics* **22**, 2171–2172 (2006).
688. Podust, V., Mikhailov, V., Georgaki, A. & Hübscher, U. DNA polymerase delta and epsilon holoenzymes from calf thymus. *Chromosoma* **102**, S133–141 (1992).
689. Multiple replication factors augment DNA synthesis by the two eukaryotic DNA polymerases, alpha and delta. *The EMBO Journal* **8**, 3883–3889 (1989).
690. Teixeira, J. M. C. taurenmd: A command-line interface for analysis of Molecular Dynamics simulations. *Journal of Open Source Software* **5**, 2175 (2020).
691. McGibbon, R. T. *et al.* MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories. *Biophysical Journal* **109**, 1528–1532 (2015).
692. Gowers, R. *et al.* MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. in 98–105 (2016). doi:10.25080/Majora-629e541a-00e.
693. Eastman, P. *et al.* OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLOS Computational Biology* **13**, e1005659 (2017).
694. Rodrigues, J. P. G. L. M., Teixeira, J. M. C., Trellet, M. & Bonvin, A. M. J. J. pdb-tools: a swiss army knife for molecular structures. *F1000Res* **7**, 1961 (2018).
695. *Open-Source PyMOL*. (Schrodinger, Inc., 2021).
696. UCSF ChimeraX Home Page. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>.
697. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science & Engineering* **9**, 90–95 (2007).
698. Home | LibreOffice - Free Office Suite - Based on OpenOffice - Compatible with Microsoft. <https://www.libreoffice.org/>.
699. Zotero | Your personal research assistant. <https://www.zotero.org/>.
700. Sublime Text - the sophisticated text editor for code, markup and prose. <https://www.sublimetext.com/>.
701. Sperger, T., Sanhueza, I. A. & Schoenebeck, F. Computation and Experiment: A Powerful Combination to Understand and Predict Reactivities. *Accounts of Chemical Research* **49**, 1311–1319 (2016).
702. Fisher, C. K. & Stultz, C. M. Constructing ensembles for intrinsically disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **21**, 426–431 (2011).
703. Ozenne, V. *et al.* Flexible-meccano: a tool for the generation of explicit ensemble descriptions of intrinsically disordered proteins and their associated experimental observables. *Bioinformatics* **28**, 1463–1470 (2012).

