



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TÍTULO DEL TEMA ESCRITO**

***Análisis de la interacción de las proteínas Fosfofructosa Bifosfatasa,  
Citrato Sintasa con Ciclinas y CDK'S de Maíz.***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANDREE GEOVANNI SÁNCHEZ GARCÍA.**



**CDMX**

**2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: LILIAN GONZALEZ SEGURA

**VOCAL:** Profesor: AURORA LARA NUÑEZ

**SECRETARIO:** Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: HUGO ANTONIO HERNANDEZ PEREZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**AURORA LARA NUÑEZ**

**SUSTENTANTE (S):**

**ANDREE GEOVANNI SÁNCHEZ GARCÍA.**

## **Agradecimientos**

Se agradece a las fuentes de financiamiento para el desarrollo de este proyecto:

CONAHCyT: **A1-S-9076**

PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica): **IN211423, IN201322**

Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado: **5000-9130**

# Índice de contenido

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
2.1. MAÍZ.....	7
2.2 GERMINACIÓN.....	9
2.3 CICLO CELULAR.....	10
2.3.1 CDKs .....	12
2.3.2 CICLINAS.....	14
2.4. METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO EN PLANTAS.....	15
2.4.1 CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO.....	19
2.4.2 CICLO DEL GLICOXILATO.....	21
2.4.3 GLUCONEOGENÉISIS EN PLANTAS.....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>25</b>
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 PROCEDIMIENTO <i>in silico</i> .....	26
6.1.1 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS.....	26
6.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURAS 3D DE LAS PROTEÍNAS CS y FBPasa.....	27
6.2 PROCEDIMIENTO <i>in vitro</i> .....	27
6.2.1 PROTEÍNAS FUSIONADAS A COLA DE HISTIDINA, MBP O GST.....	27
6.2.2 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	28
6.2.3 ELECTROFORESIS DE SDS.....	29
6.2.4 WESTERN BLOT.....	30
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
7.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO <i>in silico</i> .....	30
7.1.1 PROPIEDADES GENÉTICAS, SECUENCIA Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN ESTUDIO.....	31
7.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURAS 3D DE CS y FBPasa....	32
7.1.3 RELACIÓN EVOLUTIVA DE LAS ENZIMAS FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATASA Y CITRATO CINTASA DE MAÍZ CON OTRAS ESPECIES.....	38
7.2 RESULTADO DEL ESTUDIO <i>in vitro</i> .....	39
7.2.1 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	39
7.2.1.1 INTERACCIÓN DE CS CON CICLINAS CycD2;2 CycB2;1, PERO NO CON CDKs y CycB1;2.....	41

7.2.1.2 INTERACCIÓN DE FBPassa CON CDK'S, Cyc B 2;1 y CycD2;2, pero no con Cyc B1;2. ....	44
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b> .....	46
8.1 EL CICLO CELULAR Y EL METABOLISMO CENTRAL EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ.....	46
8.2 INTERACCIÓN DE CS CON CICLINAS Y CDKS. ....	48
8.3 INTERACCIÓN DE FBPASSA CON CICLINAS Y CDKS. ....	50
<b>9. CONCLUSIONES.</b> .....	51
<b>10. PERSPECTIVAS.</b> .....	52
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	53

# 1. RESUMEN.

La germinación del maíz se divide en tres fases: hidratación, reactivación del metabolismo y crecimiento. El ciclo celular se reactiva a partir de la replicación del ADN tras la imbibición de los embriones de maíz, ya que la mayoría de las células se encuentran en la fase G1, en paralelo el metabolismo central del carbono también se reestablece. Ambos procesos deben coordinarse para proporcionar la energía suficiente y los esqueletos carbonados para la proliferación celular. La relación entre el ciclo celular y el metabolismo central del carbono es compleja, y en esta destacan la regulación y la interacción de enzimas, lo que pueden influir en la provisión de energía y sustratos necesarios para el desarrollo temprano de la planta.

En el siguiente trabajo se realizó un estudio que combina diversas herramientas *in silico* y bases de datos bioinformáticas, así como una aproximación experimental, para comprender características propiedades estructurales de proteínas relacionadas con el metabolismo central de carbono en el maíz y su relación con proteínas reguladoras del ciclo celular. En la fase experimental se utilizó la estrategia de producir, purificar y analizar la interacción de proteínas recombinantes utilizando una precipitación de proteínas llamada Pull-down, consisten en un análisis donde se etiqueta una proteína y se captura en un ligando inmovilizado (microesferas de soporte) mediante unión covalente o a través de una etiqueta de afinidad como en la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Las etiquetas de fusión de proteínas cebo habituales son la glutatión S-transferasa (GST) y las proteínas etiquetadas con histidina.

Las enzimas del metabolismo central de carbono analizadas fueron citrato sintasa (CS) y fructosa 1,6 bifosfatasa (FBPasa), del ciclo de Krebs y la gluconeogénesis, respectivamente. El análisis *in silico* y los experimentos *in vitro* sugieren que tanto CS como FBPasa son identificados como blancos potenciales de fosforilación por

complejos Cyclin/CDKs, reconocidos como los reguladores más importantes del ciclo celular. FBPasa presenta en su secuencia seis sitios putativos de fosforilación, mientras que CS posee cuatro sitios canónicos putativos de interacción con Cilcinas. A través de ensayos de Pull down se encontró que CS interaccionó *in vitro* con CycD2;2, CycB2;1 y CDKB, mientras que FBPasa interaccionó a su vez también con CycD2;2 CycB2;1, CDKA y CDKB. Esto sugiere que estas enzimas podrían estar sujetas a ser reguladas, vía fosforilación por la maquinaria del ciclo celular. Estas interacciones podrían jugar un papel de regulación del ciclo celular y modular el metabolismo central de carbono, para contribuir a la regulación de la germinación y el crecimiento celular en el maíz.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1. MAÍZ.**

El maíz es descendiente de las gramíneas silvestres y formó la base de la alimentación de las culturas precolombinas hace 4,000 años. Hoy en día sigue siendo el alimento principal de los mexicanos y es uno de los cultivos más importantes del planeta, ya que se utiliza en diversos productos tales como plásticos biodegradables, adhesivos, biocombustibles, edulcorantes, entre muchos otros (Scott y Emery, 2016). Además, tiene un valor agregado como modelo botánico por excelencia para el estudio de temas tan diversos como la domesticación de plantas, evolución del genoma, fisiología del desarrollo, epigenética, resistencia a plagas, y genómica comparativa (Trable y Scanlon, 2009).

Es uno de los cereales de mayor tamaño y que más se produce en el mundo. El fruto de la planta se denomina mazorca, se llena de granos aplanados y grandes, colocados en ejes paralelos alrededor de su eje vertical. Los granos de maíz son cariósides desnudas y es el óvulo fecundado que ya es maduro y desarrollado, cuyas partes fundamentales son el pericarpio, el endospermo, el embrión



(germen) y el pedúnculo ver figura 1. El principal parámetro de clasificación es el color externo del grano.

El Pericarpio ver figura 1, forma la cubierta externa de la semilla, siendo 5-6% del total del grano y está constituida por varias capas: pericarpio exterior, intermedio e interior. (Lara Núñez, 1999).

Endospermo ver figura 1, representa entre el 80-85% en el interior de la semilla. Es la principal fuente de reserva de almidón y proteína. El almidón es usado en la elaboración de diferentes platillos (como combustible fundamental), para preparar edulcorantes, bioplásticos y otros productos. Y está conformada por tres principales tejidos (Martínez & Jiménez, 2017; Lara Núñez, 1999)

Embrión ver figura 1, representa entre el 8 y el 12% del peso del grano, y se encuentra embebida en el endospermo. Está formada por tejido de reserva lipídico (escutelo) y en su interior el eje embrionario con el programa morfogénico que dará pie a la formación de la plántula durante la germinación (Lara Núñez, 1999).

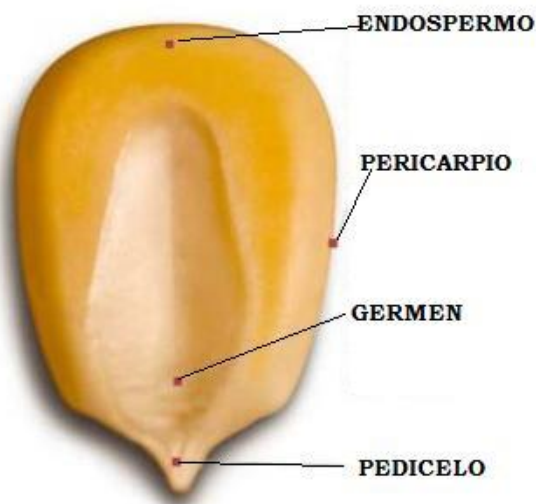


Figura 1. Semilla de maíz

## 2.2 GERMINACIÓN.

La germinación de una semilla tiene como fin dar origen a una nueva planta, similar a la que originó a esa semilla. Durante la germinación, la plántula se nutre a través de las reservas del embrión puesto que el papel esencial de una semilla es reproducirse y asegurar la supervivencia de la especie.

Por definición, la germinación inicia con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula, mientras que en el campo no se considera que la germinación ha finalizado hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (criterio agronómico) (Pita & Pérez, 1998). Desde un punto de vista molecular, la germinación involucra el despertar metabólico de la semilla y la reanudación de sus procesos de desarrollo, culmina cuando las células en este estado metabólicamente activo terminan exitosamente la primera ronda de división celular (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Las fases de la germinación se dividen en tres etapas: la primera inicia con la entrada de agua a la semilla reparando componentes celulares y ADN dañado. Una vez que la semilla se ha hidratado entra en una fase de germinación “sensu stricto” (en sentido estricto). La segunda etapa activa toda una serie de procesos metabólicos que son esenciales y hay una disminución de la absorción de agua. En la última fase, se produce el crecimiento y la elongación de la radícula a través de las cubiertas seminales. En el caso particular del maíz, se ha observado que las células entran en la segunda fase o etapa aproximadamente a las 14 h del inicio de la imbibición y que las primeras figuras mitóticas se pueden observar a partir de las primeras 28 h de imbibición (Baíza et al., 1989).

Cuando la semilla es imbibida y los componentes celulares y el ADN dañado en la deshidratación son reparados, se da el comienzo de la progresión del ciclo celular en el eje embrionario. Dicho proceso se controla por señales hormonales,

nutricionales y ambientales. Las familias de proteínas que regulan el ciclo celular son muy conservadas desde levaduras hasta mamíferos y plantas. Destaca la familia de las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) que son enzimas de tipo transferasas. El grupo fosfato es transferido desde un ATP a residuos de serina/treonina en las proteínas blanco. Las CDKs forman complejo con proteínas denominadas ciclinas, son las responsables de reconocer al sustrato.

## 2.3 CICLO CELULAR.

Los estudios del ciclo celular en plantas se han incrementado en los últimos años y se ha demostrado que la maquinaria de regulación es altamente conservada. Existen claras diferencias entre el desarrollo de plantas y animales, destacando que el desarrollo de las plantas es en gran parte post-embriionario. Nuevos órganos, como raíces, tallos, hojas y flores se originan por un proceso de división celular post-germinativo.

El ciclo celular es una progresión ordenada e irreversible a través de una serie de eventos que conducen a la duplicación de cromosomas y separación de cada juego de cromosomas en dos células hijas. En la primera fase (G1) la célula crece alcanzando un cierto tamaño, posteriormente las células entran en la siguiente fase (S), en que se presenta la síntesis y replicación de ADN, durante la fase (G2) la célula asegura que el ADN se haya replicado en su totalidad, si hay errores se reparan. Finalmente, la célula se prepara para la división celular segregando los cromosomas en dos células hijas, esto sucede en la última fase llamada mitosis. Seguidamente de la división, las células entran de vuelta en la fase G1 completando el ciclo celular o se diferencian (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

En el Figura 1.2 se muestra las diferentes fases del ciclo celular y los principales actores que regulan a cada una de estas fases. En la transición G1/S son los complejos CycD/CDKA los que predominan; en S prevalecen los complejos CycA/CDKA y en la transición G2/M y la fase M se establecen diversos complejos

de CYCA/B con CDKA/B, Los complejos ciclinas/CDKs son degradadas y sintetizadas al iniciar un nuevo ciclo.

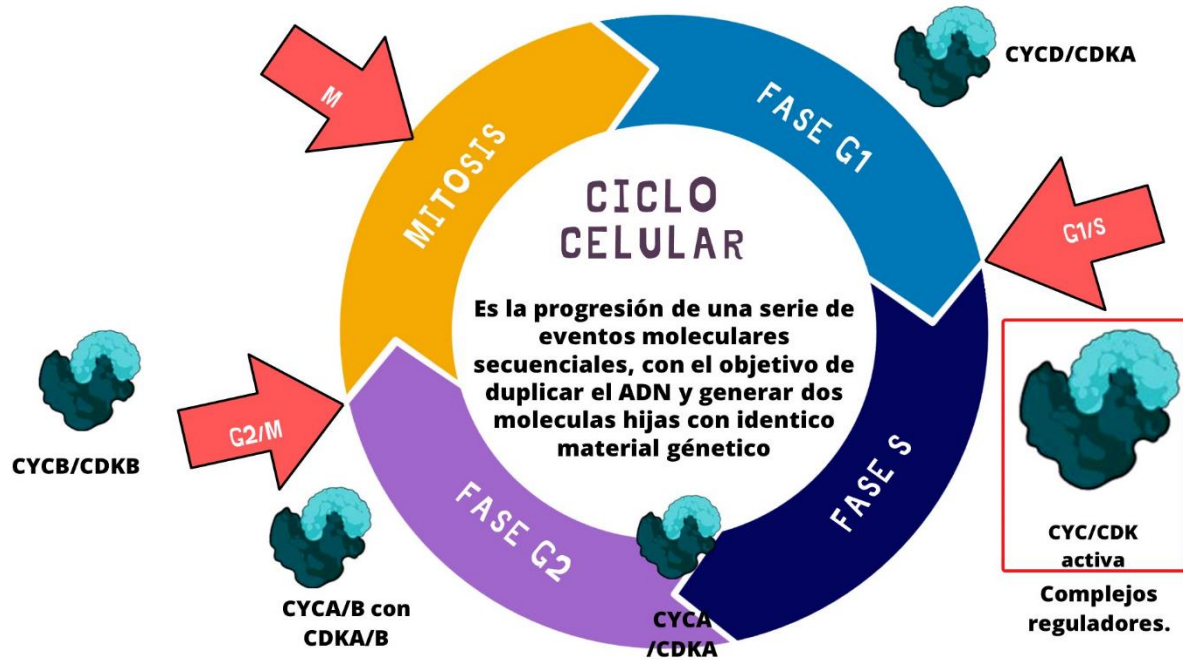


Figura 1.2: Fases del ciclo celular y los complejos CYC/CDKs que participan en cada fase (esquema Simplificado del trabajo de Garza Aguilar et al., 2013).

Para que el ciclo celular se lleve correctamente es fundamental que las diferentes fases estén coordinadas y controladas con precisión, para ello se requiere de altos niveles de actividad de cinasa de complejos Cyc/CDKs para promover las transiciones vía la fosforilación de los blancos moleculares particulares. Se reconocen tres puntos de control en el ciclo celular, que se presentan en las transiciones G1/S, G2/M y en la metafase/anafase de la mitosis (Magyar et al. 2013).

La familia de cinasas CDKs son enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular. Estructuralmente, son heterodímeros constituidos por una subunidad ciclinas (Cyc). Los complejos Cyc/CDK son los encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco en motivos canónicos. Los diferentes tipos de Cycs regulan los puntos de control mencionados arriba (Magyar et al. 2013).

Para encender y apagar la actividad de CDK y bloquear los tres puntos de transición principales existe una familia de inhibidores específicos de la actividad cinasa de CDKs, denominada Cip/KIP (ICK/KRP) en plantas. En mamíferos el análogo funcional (pero no análogo en secuencia) es p21.

Por otro lado, el estado de fosforilación de CDKs es fundamental para la actividad del complejo Cyc/CDK. Su activación se da gracias a la fosforilación de un residuo de treonina conservado en la zona central de la proteína (Thr 160), impuesta por la cinasa CAK (CDK activating kinase), mientras que la inhibición de la actividad se da por la fosforilación de un residuo de serina/treonina en la región amino terminal (Thr 14 y Ser15), fosforilación generada por Wee1.

### 2.3.1 CDKs

Las CDKs constituyen una familia grande de proteínas que se encuentran en células eucariotas, cuya actividad depende de una subunidad regulatoria (ciclina) para fosforilar a sus blancos moleculares en aminoácidos serina o treonina (Ser/Thr). En Eucariotas simples, como las levaduras hay un solo análogo funcional de CDK (*cdc28* en *Saccharomyces cerevisiae* y *cdc2* en *Schizosaccharomyces pombe*). En animales más complejos y plantas superiores se han encontrado un amplio número de genes que codifican para CDKs en sus genomas. Por ejemplo, el genoma humano contiene 21 genes codificantes para CDKs (Malumbres *et al.*, 2009). Las CDKs están altamente conservadas. Por ejemplo Harashima y colaboradores (Harashima *et al.*, 2016) reportaron que CDKA;1 de arabisopsis comparte un alto grado de similitud en secuencia con CDK1, CDK2 Y CDK3 de humano, así como con las cinasa *CDC2* Y *CDC28* de levaduras. Las CDKs reconocen un motivo canónico de fosforilación en sus proteínas blanco, el cual es el siguiente: [SER/THR]-PRO-X-[LYS/ARG] (X representa un aminoácido cualquiera, motivo completo, figura 1.3) El aminoácido fosforilado es Serina o Treonina) seguido de Prolina (motivo mínimo de

fosforilación). Harashima y colaboradores (2016) sugieren que CDK necesita reconocer, además, un aminoácido cargado positivamente en la posición +3 y/o +4 que interactúa con el grupo fosfato cargado negativamente en el interior del bucle del sitio activo (Lisina o Arginina).



Figura 1.3 Las CDKs reconocen un motivo canónico de fosforilación en sus proteínas blanco, el cual es el siguiente: [SER/THR]-PRO-X-[LYS/ARG]. (figura obtenida de Nikolaj Blom *et al* 2004 de la base de datos de bibliotecas de péptidos).

Las CDKs en plantas se clasifican en ocho grupos, de CDKA a CDKG, de acuerdo con su clasificación en *Arabidopsis* (Dudits *et al.*, 2007) y con el motivo de unión a ciclina, que es altamente conservado. Las CDKs de tipo A y B son de las más estudiadas en vegetales y son las que participan directamente en la regulación de la progresión del ciclo celular. El grupo de CDKA se caracterizan por presentar un motivo canónico PSTAIRE de unión a ciclina, altamente conservado y estructuralmente homólogo a las proteínas cinasas de mamíferos y levaduras. El otro grupo más grande de CDKs son las de tipo B, específicas de plantas, y están involucradas en funciones celulares divergentes. Se han estudiado en alfalfa, chícharo, *Arabidopsis* y arroz (Magyar *et al.*, 1997) y carecen de homólogos en levaduras y mamíferos. Poseen un motivo de unión a ciclina divergente: PPTAIRE para CDKB1 o PPTTLRE para CDKB2 (Garza-Aguilar, *et al.* 2014). Esta última CDKB2 no se ha encontrado en gramíneas, entre ellas, el maíz.

Las CDKs se encuentran actualmente en el centro de la investigación del ciclo celular de las plantas. Asimismo, en estudios recientes se ha documentado que

algunos sustratos de CDKs actúan fuera de la maquinaria central del ciclo celular, en procesos que conectan la proliferación celular con la diferenciación celular, el metabolismo energético u otros procesos fisiológicos.

### 2.3.2 CICLINAS.

Las ciclinas son proteínas que se acumulan y degradan cíclicamente a lo largo del ciclo celular. Presentan un alto número de recambio y vida media corta, son típicamente inestables, y son el principal factor que determina el tiempo de actividad de las CDKs.

Las ciclinas se identificaron por primera vez en invertebrados marinos, como proteínas de gran abundancia en momentos definidos en el ciclo celular, con alta probabilidad de inducir la meiosis. Posteriormente fueron asociadas a las CDKs formando un complejo para la activación y regulación del ciclo celular.

Estas proteínas se agrupan en subfamilias denominadas ciclinas de tipo A, B y D. En *Arabidopsis thaliana* se han clasificado las ciclinas en nueve grupos: A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3, D4 y D5. Cada ciclina tiene un patrón de expresión único durante el ciclo celular (Nieuwland *et al.*, 2007). Las ciclinas de tipo A pueden interaccionar con CDKA o CDKB, actuando en las fases S y G2, y en la transición G2/M, que desencadenan el inicio de la replicación del ADN, mientras que las ciclinas tipo B controlan la progresión del ciclo celular durante la mitosis, y se asocian con CDKBs (Van Leene *et al.*, 2010).

Las ciclinas tipo D en plantas y sus homólogas en mamíferos y levaduras son fundamentales en el inicio o reinicio del ciclo celular. Su expresión está asociada a la proliferación celular y responden fuertemente a señales mitogénicas como hormonas, factores de estrés, concentración de azúcares y a señales internas como velocidad de crecimiento o tamaño de la célula (Menges y Murray, 2002). En maíz se ha evidenciado la expresión diferencial de las ciclinas D2, D4, D3 y D5

(Garza-Aguilar, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008) durante la germinación; además, se ha comprobado la asociación de este tipo de ciclinas con CDKA y CDKB, además de proteínas auxiliares como KRPs, CKS y PCNA en este proceso fisiológico (Menges *et al.*, 2005).

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

#### 2.4. METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO EN PLANTAS.

El metabolismo de los carbohidratos ha sido ampliamente estudiado en el pasado en tejidos vegetales. Tales estudios se centran en las hojas o en órganos de almacenamiento como las semillas o tubérculos en la fase de llenado. Entre estos procesos destaca la respiración vegetal, que se define como el conjunto de reacciones celulares mediante las cuales los carbohidratos sintetizados, a través de la fotosíntesis, son oxidados a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (ver figura 1.4). La degradación de sacarosa y la energía liberada es transformada mayoritariamente en ATP y precursores carbonados para la biosíntesis *de novo* de biomoléculas (Ribas *et al.*, 2008). Las vías metabólicas de los carbohidratos pueden dividirse en cuatro etapas, que se describen a continuación:

La primera y segunda etapa se llevan a cabo en el citosol. La primera etapa comprende la activación de azúcares mediante la fosforilación, mientras que en la etapa 2 se transforman esos intermediarios fosforilados en precursores más pequeños para dar pie a la biosíntesis *de novo* de biomoléculas necesarias para la vida (por ejemplo, la generación de pentosa 5 fosfato, precursor de ácidos nucleicos), o los azúcares se desdoblan para la liberación posterior de energía en las siguientes etapas. Además de la función metabólica, estos intermediarios contribuyen a la regulación del pH intracelular. La mayoría de las reacciones químicas del metabolismo central del carbono ocurren en el citosol. Las principales



proteínas que catalizan la reacción de moléculas en estas dos etapas actúan como enzimas fundamentales en procesos metabólicos como la gluconeogénesis, glucólisis, biosíntesis de aminoácidos y síntesis *de novo* de proteínas, biosíntesis de ácidos grasos, entre otras reacciones en las que intervienen el ATP o NADPH como fuente de energía o poder reductor.

La célula en una primera etapa emprende la degradación del almidón y la sacarosa obtenidos durante la fotosíntesis, generando glucosa que es fosforilada en fructosa-6-fosfato. En una segunda etapa, la fructosa-6-fosfato es fosforilada a fructosa-1,6-bisfosfato, la cual es oxidada para formar ácidos orgánicos. En una reacción anterior, una molécula de sacarosa se divide en dos hexosas, hasta llegar a piruvato a través de la vía glucolítica, durante estas reacciones se utilizan 2 ATP mientras se producen 4 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH (figura 1.4).

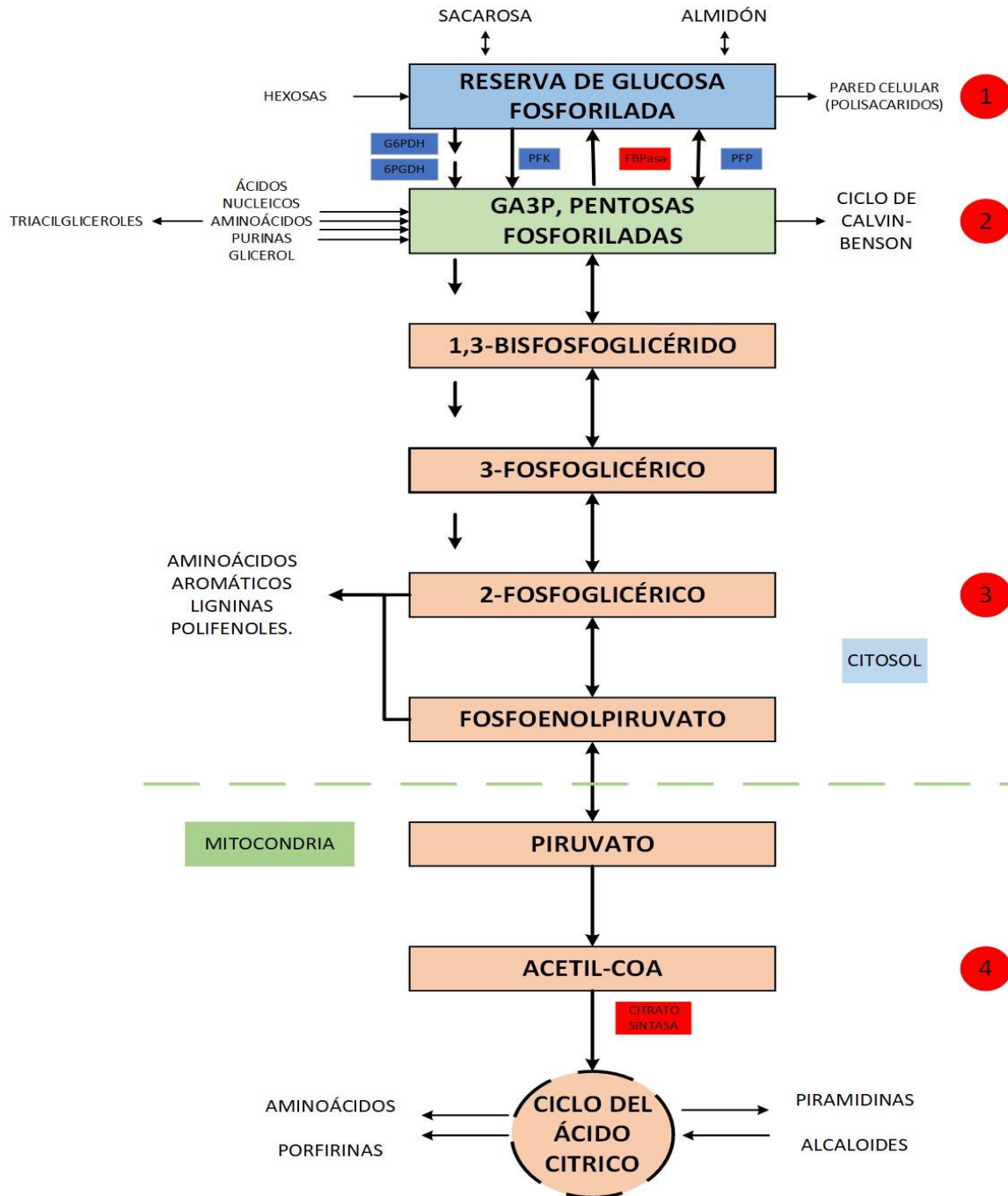


Figura 1.4: Metabolismo central del carbono. Resalta en color rojo las enzimas de estudio: citrato sintasa (CS) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa).

La conversión de la fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato en el citosol involucra la participación de tres enzimas: fosfofructocinasa (PFK), Pirofosfato fructosa 6 fosfato 1 fosfotransferasa (PFP) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa).

Cada una de estas enzimas con un mecanismo de regulación diferente. La regulala glucólisis, mientras que la FBPasa regula la gluconeogénesis.

La tercera y cuarta parte de las rutas metabólicas se realizan en las mitocondrias que están presente en casi todas las células eucarióticas, se incluyen dentro de los orgánulos energéticos de las células. El número de mitocondrias en las células vegetales varía y está relacionado con la actividad metabólica de cada tejido. La mitocondria es un orgánulo que transforma totalmente el piruvato originado a partir de los azúcares provenientes de la fotosíntesis como son la sacarosa (Figura 1.4.1) y el almidón, en presencia de oxígeno hasta convertirla en dióxido de carbono y agua, obteniendo mucha energía en forma de ATP. De lo contrario las células sólo podrían obtener su ATP de la glucólisis anaeróbica a través de fosforilación a nivel de sustrato.

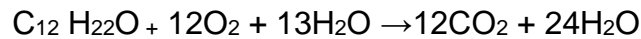


Figura 1.4.1 Ecuación de la respiración aeróbica de sacarosa.

En una tercera etapa, el piruvato entra a la mitocondria, donde es oxidado hasta CO<sub>2</sub> por medio del ciclo de Krebs, produciéndose la mayor parte del NADH mitocondrial. En la cuarta etapa, el NADH es finalmente utilizado por la cadena de transporte electrónico mitocondrial para producir ATP. Asimismo, la vía de las pentosas fosfato complementa la vía glucolítica utilizando la glucosa-6-fosfato como sustrato para dar lugar a fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, ambos intermediarios de la vía glucolítica (Ribas et al, 2008), así como intermediarios de 4, 5, 6 y 7 carbonos que pueden ser precursores de la biosíntesis de ácidos nucleicos, por ejemplo.

En la tercera etapa esta presenta la citrato sintasa que cataliza la reacción de condensación tipo aldólica del acetato, proveniente del acetil-CoA, y del oxaloacetato para formar citrato. El oxaloacetato es regenerado después de completar el ciclo del ácido cítrico.

#### 2.4.1 CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO.

Conocido por varios nombres, incluido el ciclo del ácido tricarbóxico ciclo y el ciclo de Krebs (después de su descubridor, Hans Krebs), el ciclo del ácido cítrico tiene varias funciones entre ellas: 1) la oxidación de ácidos orgánicos para producir  $\text{CO}_2$ ; 2) la generación de poder reductor (NADH) que será utilizado posteriormente por la cadena de transporte de electrones, y 3) la síntesis de precursores para la formación de aminoácidos, de colesterol y ácidos grasos y metabolitos secundarios.

El ciclo del ácido cítrico en eucariotas tiene lugar en la matriz mitocondrial donde el piruvato, antes de entrar al ciclo del ácido cítrico, es oxidado y descarboxilado por piruvato deshidrogenasa para formar acetil-CoA y NADH. Así mismo, la acetil-CoA, entra al ciclo de Krebs y es transformada por la primera reacción de éste catalizada por la Citrato sintasa en que el acetil-CoA y el Oxalacetato reaccionan para producir una molécula de seis carbonos, el citrato. A continuación, una serie de reacciones orquestadas por otras siete enzimas que igualmente se encuentran en la matriz mitocondrial (salvo la Succinato deshidrogenasa) oxida al citrato y propicia la formación de tres moléculas de NADH una molécula de  $\text{FADH}_2$  y un ATP. Al finalizar el ciclo el resultado es una nueva molécula de oxalacetato que reacciona con una nueva molécula de acetil-CoA para iniciar un nuevo ciclo. La descarboxilación oxidativa del piruvato produce una molécula de  $\text{CO}_2$  y una de NADH. Así, el ciclo de Krebs provoca que la oxidación de un equivalente de NADH mitocondrial proveniente del piruvato promueva la síntesis de 2,5 ATP y que la oxidación de  $\text{FADH}_2$  propicie la síntesis de 1,5 ATP teniendo como productos finales 3 moléculas de  $\text{CO}_2$  más NADH y 1  $\text{FADH}_2$  por cada molécula de piruvato que entra al ciclo. En total, son ocho etapas que se explicaran más adelante (Buchanans, 2015).

Paso 1. En el primer paso del ciclo del ácido cítrico, el acetil-CoA se une con una molécula de cuatro carbonos, oxalacetato, y libera el grupo CoA a la vez que forma una molécula de seis carbonos (citrato) asistida por la enzima Citrato sintasa que realiza una reacción de condensación aldólica. La Citrato sintasa representa el principal paso regulador de la reacción del ácido cítrico, se inhibe con NADH, citrato (producto) y succinil-CoA, y es activado por el oxalacetato (sustrato).

Paso 2. El citrato se convierte en su isómero isocitrato. Este es un proceso de dos pasos: primero se retira una molécula de agua que luego se vuelve a añadir para isomerizar a la molécula. Este paso es mediado por la enzima Aconitasa.

Paso 3. En este paso, el isocitrato se oxida y se libera una molécula de dióxido de carbono, con lo que queda una molécula de cinco carbonos (el  $\alpha$ -cetoglutarato). Durante este paso un  $\text{NAD}^+$  se reduce a NADH, la enzima que cataliza este paso, la isocitrato deshidrogenasa, representa un importante regulador de la velocidad del ciclo del ácido cítrico.

Paso 4. El cuarto paso es similar al tercero. En este el  $\alpha$ -cetoglutarato se oxida, lo que reduce un  $\text{NAD}^+$  en NADH. En el proceso se libera una molécula de dióxido de carbono. La molécula de cuatro carbonos resultante se une a la coenzima A y forma un compuesto inestable, la succinil-CoA. La enzima que cataliza este paso,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, también es importante en la regulación del ciclo del ácido cítrico.

Paso 5. En el quinto paso, la CoA de la succinil-CoA se sustituye con un grupo fosfato que luego es transferido a ADP para obtener ATP. En algunas células se utiliza GDP (guanosina difosfato) en lugar de ADP, con lo que se obtiene GTP (guanosin trifosfato) como producto. La molécula de cuatro carbonos producida en este paso se llama succinato, y la enzima que media dicha reacción es la Succinato CoA-sintetasa.

Paso 6. En este paso se oxida el succinato y se forma otra molécula de cuatro carbonos llamada fumarato. En esta reacción se transfieren dos átomos de hidrógeno (junto con sus electrones) a FAD para formar FADH<sub>2</sub>. La enzima que realiza este paso se encuentra incrustada en la membrana interna de la mitocondria, por lo que el FADH<sub>2</sub> puede transferir sus electrones directamente a la cadena de transporte de electrones. Esta reacción es mediada por la enzima Succinato deshidrogenasa.

Paso 7. En el séptimo paso se le añade agua a la molécula de cuatro carbonos fumarato, con lo que se convierte en otra molécula de cuatro carbonos llamada malato.

Paso 8. En el último paso del ciclo del ácido cítrico, se regenera el oxalacetato (el compuesto inicial de cuatro carbonos) mediante la oxidación del malato. En el proceso, otra molécula de NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH y la reacción es catalizada por la Malato deshidrogenasa.

En el metabolismo se encuentran otras variantes anabólicas como es el caso del ciclo del glicoxilato es una variante anabólica del ciclo de Krebs, que se lleva a cabo en plantas, ciertas bacterias, protozoos y hongos. Su principal objetivo es convertir las reservas de lípidos a hidratos de carbono evitando los dos pasos de descarboxilación del ciclo de Krebs.

#### 2.4.2 CICLO DEL GLICOXILATO.

En plantas se activa durante la germinación de semillas que contienen lípidos como compuestos de almacén, en forma de triacilgliceroles incluidas las semillas de plantas de cereales, en las que el proceso de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos se generará acetil-CoA. Este proceso ocurre en un organelo llamado glioxisoma (peroxisoma modificado) (Holtman, 1994).

En el glioxisoma se llevará a cabo el primer paso del ciclo del ácido cítrico, la condensación de acetil-CoA con el oxalacetato, y liberando al grupo CoA a la vez que se forma una molécula de seis carbonos (citrato) asistida por la enzima CS. Posteriormente el citrato se convierte en su isómero isocitrato con la ayuda de la enzima aconitasa. Posteriormente el isocitrato se divide en dos moléculas, una de dos carbonos llamada glioxilato y la otra de cuatro carbonos, el succinato, reacción mediada por la enzima isocitrato liasa. Por último, el glioxilato se une con un acetil-CoA, para formar malato que posteriormente formará nuevamente oxalacetato, las enzimas responsables de estas reacciones son la malato sintasa y malato deshidrogenada, respectivamente.

Las semillas de cebada con almidón son diferentes de las semillas oleaginosas como arabis (S. Baud, 2008). Por lo tanto, aunque el ciclo del glioxilato juega un papel crucial en el aprovechamiento de la acetil-CoA procedente del desdoblamiento de los lípidos en las semillas oleaginosas (Eastmond, 2001), podría tener diferentes funciones en las semillas de cereales. A partir del oxaloacetato se puede generar fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la PEP carboxiquinasa (PEPCK) en el citosol o la PEP carboxilasa (PEPC). El PEP es sustrato de la gluconeogénesis (gluconeogénesis, cuyo mecanismo de regulación primordial lo constituye la enzima FBPasa), en la que se generan carbohidratos (Zhenguo, 2016).

#### 2.4.3 GLUCONEOGÉNESIS EN PLANTAS.

La gluconeogénesis es el proceso que permite satisfacer demandas de glucosa del organismo cuando no se dispone de suficiente cantidad de carbohidratos en el medio. La gluconeogénesis no es común en las plantas, pero se lleva a cabo en algunas semillas, que almacenan una gran cantidad de carbono en forma de lípidos (triacilglicerol) como reserva en la etapa de desarrollo, como son las semillas de oleaginosas, e incluso el maíz en el embrión.

Los lípidos, aminoácidos y los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs (málico y otros ácidos intermedios del ciclo de Krebs) se pueden convertir en glucosa mediante la gluconeogénesis. Por lo tanto, esta vía metabólica es clave entre la interfaz del metabolismo de ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos y el metabolismo de azúcares.

La semilla durante la germinación libera los lípidos simples a partir de los triacilglicéridos, son desdoblados hasta Aceti-CoA por la beta-oxidación y después reconvertidos en ácidos carboxílicos por el ciclo del glioxilato hasta obtener malato, u oxaloacetato, mismos que por la vía de la gluconeogénesis pueden ser inter-convertidos en sacarosa, para ser transportada a los tejidos demanda para promover el crecimiento de la planta. La mayor parte de las reacciones de la gluconeogénesis son reacciones reversas de la glucólisis, aquellas reacciones que trabajan al equilibrio. Esta etapa consume alta cantidad de energía, y provee glucosa y glucosa-6-fosfato a las células que crecen en ausencia de glucosa, y a las células que requieren derivados de glucosa como sustrato energético y en la formación de glucolípidos, glucoproteínas, y polisacáridos estructurales, los cuales son constituyentes normales de las membranas (Buchanans, 2015).

Como la reacción glucolítica catalizada por la fosfofructocinasa (PFK) dependiente de ATP es irreversible, es necesario un enzima adicional que convierta la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato y Pi durante la gluconeogénesis. Esta enzima es la Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa). La PFK y la FBPasa representan el principal control del flujo de carbono a través de las rutas glucolítica y gluconeogénica tanto en animales como en plantas superiores, así como en la síntesis de sacarosa en plantas. La FBPasa es una enzima alostérica, cuya actividad es controlada por la concentración de su sustrato (Fructosa 1,6 bifosfato) y de sus dos inhibidores, AMP cíclico y Fructosa-2,6-bifosfato. Su actividad es dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP (Buchanans, 2015).



### 3. JUSTIFICACIÓN.

Para la generación de una célula hija genéticamente idéntica a la madre se lleva a cabo el proceso del ciclo celular. Este proceso está orquestado por una serie de proteínas que se encargan del control del tiempo de entrada, la progresión y regulación del ciclo celular. Es impulsado principalmente por familias de proteínas: las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas (CYCs). Estas proteínas son altamente conservadas entre eucariotes, aunque varían en el número de isoformas (Malumbres. 2014). La actividad de cinasa del complejo CYC/CDK es la encargada de fosforilar una gran cantidad de sustratos en los puntos de control G1/S, G2/M y en la metafase-anafase (Garza-Aguilar, *et al.* 2014). La división celular es un proceso complejo con altas demandas de energía. A la fecha no se comprende bien cómo las células regulan la energía para la síntesis de ADN y la segregación cromosómica (Salazar, *et al.* 2017).

Por otro lado, recientemente se han destacado, en líneas de investigación de células de cáncer en humano, funciones no canónicas de las CDKs, por ejemplo: la regulación de la fosforilación oxidativa y la glucólisis (H. Wang *et al.*, 2017) (Salazar, *et al.* 2017), esto, mediante la fosforilación de enzimas que regulan estos metabolismos centrales del carbono.

En este sentido, es factible proponer que las enzimas reguladoras de las diferentes rutas metabólicas que canalizan al carbono desde el glicólisis hasta la oxidación completa de los azúcares, así como rutas que parten de moléculas pequeñas para generar azúcares simples como la gluconeogénesis podrían ser blancos de fosforilación por complejos CYC/CDKs. Así, se destacan las enzimas citrato sintasa (regulador importante del Ciclo de Krebs) y la FBPasa (principal regulador de la gluconeogénesis). Estas enzimas podrían ser probablemente blancos de fosforilación por el heterodímero si presentan en su secuencia de aminoácidos motivos canónicos completos o mínimos de fosforilación por CDKs.

## 4. HIPÓTESIS.

Si se considera que las CycD/CDKs de mamíferos regulan el metabolismo central del carbono y presentan, tanto CDKs como ciclinas, secuencias conservadas con sus proteínas homólogas en plantas, es probable que los complejos heterodiméricos CyC/CDKs de especies vegetales regulen la energética y el metabolismo central de carbono.

## 5. OBJETIVO GENERAL.

Demostrar la asociación de Cyc oCDKS, proteínas del ciclo celular del maíz, con Citrato sintasa y FBPasa, proteínas del metabolismo central del carbono, también de maíz, vía ensayos de tipo Pull-down.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar *in silico* la presencia del motivo canónico de fosforilación por Cyc/CDKS en las proteínas blanco CS y FBPasa.
- Analizar si el motivo es conservado en especies vegetales cercanas al maíz
- Evaluar el patrón genético de expresión de estas proteínas en base de datos disponibles en la red, así como su localización subcelular (WoLF PSORT, UNIPROT).
- Llevar a cabo pruebas de simulación de predicción de interacción de proteínas (*in silico*).
- Realizar experimentos en ambiente controlados con proteínas recombinantes para comprobar la interacción (*in vitro*) por ensayos de Pull-down.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 PROCEDIMIENTO *in silico*.

Las interacciones proteína-proteína (PPI) son un elemento crítico en los sistemas biológicos para poder comprender las complejas redes en las que pueden colaborar la función de las proteínas. Se diseñaron dos estrategias en este trabajo: 1) predicciones bioinformáticas y 2) aproximación experimental. Las predicciones informáticas pueden sugerir interacciones que han eludido la detección por otros métodos o de proteínas que no han sido investigadas. En un intento de predecir las PPI se desarrolló una estrategia en sistemas computacionales con herramientas como ExPASy, BAR, Expression Angler, WoLF PSORT, SPORT II UniProt, Gene Ontology, AlfaFold, PDB, y BRENDA.

#### 6.1.1 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Se evaluaron las características genéticas, identificación de motivos en la secuencia de aminoácidos y la localización de las proteínas a estudiar. Se inició el estudio con el número de acceso de dos genes: FBPA<sub>sa</sub>: GRMZM2G322953, y CS: GRMZM2G064023, que codifican para proteínas de maíz del metabolismo central de carbono mencionado en la introducción. Se encontró la secuencia de nucleótidos en la página de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con ayuda del servidor Web ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) que es un sistema de análisis de proteínas del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB); se tradujo, a partir de una secuencia nucleotídica, una secuencia peptídica. Posteriormente, con la ayuda de la base de datos Botany Array Resource (BAR, <http://bar.utoronto.ca/>) y su herramienta, llamada Expression Angler, se identificó a los genes y sus perfiles de expresión en diferentes tejidos y estadios de desarrollo de la planta (Toufighi et al, 2005) con la finalidad de realizar un mapa de calor y observar los cambios fisiológicos en el proceso de germinación del maíz, dado que es el modelo de estudio del grupo en que se realizó el estudio. Para la predicción de la localización

subcelular de proteínas, se utilizó la herramienta WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) de la base de datos SPORT II (Horton et al, 2007) la cual nos ayuda a sustentar la investigación; ya que cuenta con actualizaciones periódicas de numerosos experimentos para determinar la localización de proteínas cuyos resultados se acumulan en bases de datos públicos como UniProt y Gene Ontology.

### 6.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURAS 3D DE LAS PROTEÍNAS CS y FBPasa.

Se utilizaron dos bases de datos: 1) BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) (<http://www.brenda-enzymes.org>) y 2) PDB (Protein Data Bank) (<https://www.rcsb.org/>). Dentro de la bioinformática, se encuentra la parte de modelado estructural, es una metodología computacional que nos permite obtener un modelo de la estructura tridimensional a partir de su secuencia, comparándola con una secuencia homóloga de estructura conocida. Se basa en tres observaciones: la relación evolutiva entre secuencia y estructuras, esto se establece con la premisa de que secuencias similares producen estructuras similares con la finalidad de mantener una misma función. Por otra parte, una estructura es más conservada que la secuencia de aminoácidos, así, cambios pequeños o medianos en la secuencia no alterarán drásticamente a una proteína. Por último, los sitios funcionales mantienen idénticos sus plegamientos, esto permite agrupar diversas proteínas con secuencias diferentes en familias, lo que indica función y estructura similar. Finalmente, se modeló la estructura 3D de las proteínas de maíz mediante la herramienta AlfaFold (AlphaFold Protein Structure Database).

## 6.2 PROCEDIMIENTO *in vitro*.

### 6.2.1 PROTEÍNAS FUSIONADAS A COLA DE HISTIDINA, MBP O GST.

Para la producción de proteínas recombinantes se realizó un pre-cultivo con 5 mL de medio LB de bacterias BL21(DE3)RIPL transformadas con los vectores correspondientes (pET28a con el inserto del gen optimizado para la correcta producción de la proteína en *E. coli*, obtenidos de Life Tein® New Jersey, USA) para sobre-expresar a las diferentes proteínas recombinantes. Para la producción de las proteínas FBPasa-His o CS-His, se añadió 5 µL de antibiótico kanamicina (50µg/mL), mientras que para las proteínas: MBP-Cyc D2;2, MBP-Cyc B2;1, MBP-Cyc B1;2, GST-CDKA, GST-CDKB, se añadió 5 µL de antibiótico ampicilina (200µg/mL). Los vectores empleados para la transformación de las bacterias fueron los siguientes: 1) CycD2;2: pMal c5X; 2) CDKA y CDKB: pGEX-4t-2, ya disponibles con anterioridad en el laboratorio. Se incubó por 16-18 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente se realizaron cultivos independientes en un volumen de 200 mL de medio LB agregando de inóculo 5 mL del pre-cultivo (2.5 %), y 100 µL de antibiótico correspondiente para las respectivas proteínas recombinantes. Se incubó a 37°C en agitación constante hasta alcanzar un rango de 0.4-0.6 de D.O medida a 600nm, y se indujo con IPTG a una concentración de 1.0 mM incubando por 18 h a 37°C con agitación constante.

### 6.2.2 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Las proteínas recombinantes se purificaron mediante el empleo de la resina Ni-NTA (Complete, Roche®), mediante el procedimiento que se describe a continuación: tras el periodo de incubación para la inducción de la proteína recombinante el medio de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis. Posteriormente se realizó un lisado por sonicación en un equipo Vibra Cell VC505 empleando cuatro ciclos de 20 segundos con una amplitud de 20% con periodos de descanso de 20 segundos.

Para la interacción, se mezclaron en proporciones 1:1 0.4-0.6 de D.O medida a 600nm las proteínas recombinantes de colas de HIS con las proteínas con

etiqueta de MBP o GST, en un único tubo de centrifuga, se dejan interaccionar por un periodo de tiempo mínimo de 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Para la interacción de FBPasa y CS con CDKB se agregó a la mezcla 1% (w/v) de una solución de detergente Sarkosil 0.1% (w/v) en agitación a 4°C, por 30 min, posteriormente se agregó Tritón para un porcentaje final de 0.1% (w/v) y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 30 min más. Se centrifugó la mezcla de interacción a 10,000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante se pasó a través de una columna de Níquel para retener a las proteínas con etiqueta de Histidina y analizar la posible interacción con las proteínas del ciclo celular

Previo al paso de la mezcla de proteínas las columnas se equilibraron con 10 mL de Buffer A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, y 300 mM NaCl) tras lo cual se cargó la mezcla de proteínas recombinantes cuya interacción se analiza. Se recupera la fracción que pasó por la columna para pasarla por una segunda ocasión a través de la columna. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 mL de buffer A cada uno. Al segundo lavado con 10 mL de buffer A se añadió imidazol a una concentración de 25 mM. A continuación, se realizó la elución de las proteínas en tres fracciones de 500 µL, agregado 500 µL de Buffer A con 300 mM de imidazol, se recolectó un volumen total de 1.5 mL, el cual se precipitó con 3.5 mL de acetona a -20°C y posteriormente se resuspendió el pellet resultante en 375 µL de una Solución de PBS 1X.

### 6.2.3 ELECTROFORESIS DE SDS.

Para corroborar la presencia de proteínas de interés en las eluciones se realizó el análisis por Western Blot, resolviendo los geles por la técnica de SDS-PAGE. El gel de acrilamida al 10% se preparó como se muestra en el anexo. Las muestras se prepararon añadiendo buffer de carga 1X (SDS 2%, 2 mM β-mercaptoetanol, glicerol 4%, 40 mM de Tris HCl, pH 6.8, azul de bromofenol 0.01%). Cada gel se cargó de la siguiente manera: Carril 1) marcadores de peso molecular 5 µL (Bio rad dual Color), Carril 2) Lisado de Proteína del Metabolismo (antes de la mezcla)

10  $\mu$ L, Carril 3) Lisado de proteína del Ciclo Celular (antes de la mezcla) 10  $\mu$ L, Carril 4) Mix o mezcla de proteínas, 18  $\mu$ L y elución de Proteínas resuspendidas, precipitadas y pellet resuspendido en PBS 1X, 20 $\mu$ L. El gel se corrió a 80 volts por 30 min o hasta que el frente de corrida pasara el gel concentrador, para después aumentar el voltaje a 145 volts por 1 h.

#### 6.2.4 WESTERN BLOT.

Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-PSQ Transfer Membrane (Milipore), previamente activadas con metanol en un equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell a 45 volts durante 1 hora en baño de hielo por transferencia húmeda. Se utilizó el siguiente amortiguador de transferencia: Tris 25 mM y Glicina 200 mM de Glicina. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente con 5% de leche-PBS 1X para bloquearlas durante 1 h en agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 min cada uno, y se dejaron incubando durante 16-18 h con un anticuerpo primario para el reconocimiento de los TAGs HIS, GST o MBP, tras el tiempo de incubación se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X (al lavado intermedio se le añadió NaCl 300 mM y Tween 20, 0.5 %) por 10 min. Se adicionó un anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-ratón, de acuerdo con el anticuerpo primario) y se dejó incubar por 1 h en agitación constante, finalmente se llevaron a cabo 3 lavados como se indicó previamente para continuar con el proceso de revelado. A las membranas se le adicionó 2 mL de solución de detección por quimioluminiscencia (ECL). Las imágenes se obtuvieron con el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad) en el programa Image Lab.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO *in silico*.

### 7.1.1 PROPIEDADES GENÉTICAS, SECUENCIA Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN ESTUDIO.

En el estudio se analiza la PPI de CDKs y Ciclina D con dos enzimas reguladoras del metabolismo central de carbono del maíz, las cuales son:  $\beta$ -D-fructosa-1,6-bifosfato (FBPasa), y citrato sintasa (CS). Con la herramienta WoLF PSORT se encontró que FBPasa se encuentran en el citosol, mientras que CS está presente en la mitocondria, como se esperaba. Con la base de datos BAR, se predijo que el gen que codifica para FBPasa se expresa en la radícula desde las 6 h con aumento hacia las 24 horas de germinación, mientras que el gen de CS se expresa también en la radícula desde las 6 horas, se observa a las 17 h pero a las 24 h de germinación ya no hay expresión figura 2 La imbibición de semillas induce la activación metabólica, lo que aumenta la actividad de la mitocondria debido a la reparación tanto enzimática como de la membrana de estos organelos y, por ende, hay un incremento de la actividad respiratoria, esencial para la obtención de energía necesaria para las diferentes fases del ciclo celular. Las células meristemáticas empiezan la replicación del ADN y la división celular (Ching, 1972; Jann and Amen, 1977, Bove et al.,2001).

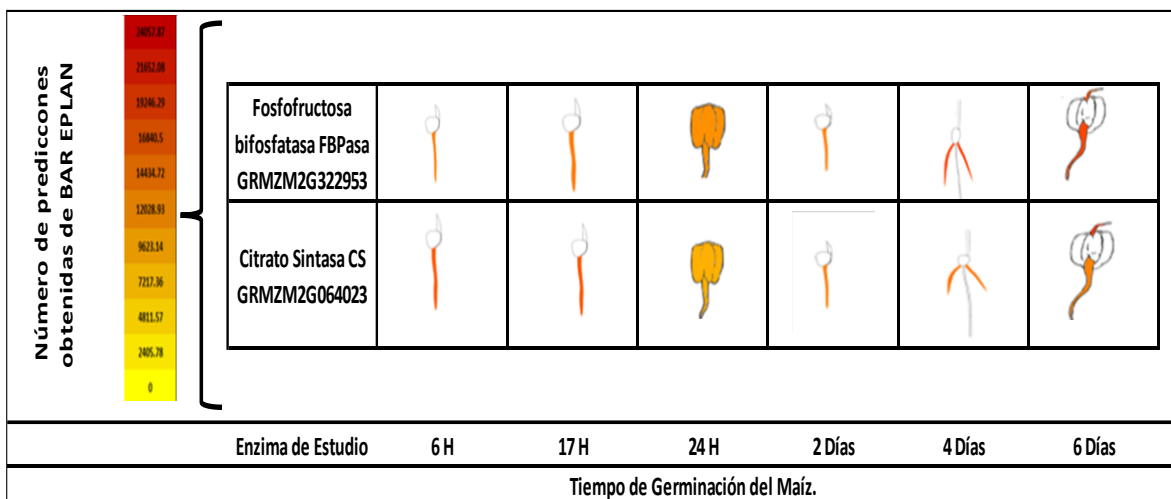


Figura 2.: Mapa de calor de cantidad de transcrito del gen de *fbpasa* y *cs* en las distintas etapas de la germinación del maíz con respecto al tiempo y la expresión génica de las enzimas en estudio.

BAR ePlant ([http://bar.utoronto.ca/eplant\\_maize/](http://bar.utoronto.ca/eplant_maize/)).



Durante la fotosíntesis, proceso en que se da la formación de carbohidratos, el  $\text{CO}_2$  se exporta al citosol uniéndose al transportador triosa fosfato-fosfato (TPT) para convertirse posteriormente en sacarosa o se retiene en el cloroplasto y se convierte en almidón (Stitt, 1990). La síntesis de ambos compuestos está regulada por la FBPasa citosólica y cloroplástica (cyFBPasa y cFBPasa). Los diferentes combustibles de carbono se metabolizan en acetil CoA y ácidos orgánicos. El ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en que participa CS, es un componente crucial del metabolismo respiratorio en los órganos vegetales fotosintéticos y heterotróficos, puesto que oxida este tipo de compuestos. Esta ruta se realiza en la mitocondria de la célula vegetal, como en todas las células eucariotas, es la productora de equivalentes de ATP y poder reductor que entrará a la cadena respiratoria (Nunes-Nesi et al., 2013).

Tanto la CS como la FBPasa se regulan durante la fotosíntesis, sin embargo, durante la germinación no está activo este proceso. Los lípidos almacenados en las semillas, especialmente en dicotiledóneas como el girasol o el ricino, cuyas reservas de carbohidratos en semilla son bajas o nulas, son interconvertidos en glucosa por el ciclo del glioxilato, que puede ser de principal importancia en la germinación. En cambio, en las semillas de monocotiledóneas como el maíz, con altas reservas de carbohidratos en forma de almidón, el ciclo del glioxilato pudiera tener otros propósitos metabólicos como proporcionar sustratos para la síntesis de aminoácidos y para la acidificación del endospermo (Igamberdiev, 2002). Lo anterior se comprobó en el estudio de Igamberdiev, en los que se añadió a escutelo de maíz en germinación acetato marcado con  $^{14}\text{C}$ , que se convirtió en  $^{14}\text{C}$ -acetil-CoA, y se utilizó una pequeña cantidad de acetato exógeno para la síntesis de carbohidratos, mientras que la mayor parte se detectó en aminoácidos y ácidos orgánicos (Igamberdiev, 1991).

### 7.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURAS 3D DE CS y FBPasa.

La estructura 3D de una proteína ayuda a visualizar cómo se encuentra una proteína en el espacio, la secuencia de aminoácidos, su estabilidad, y sus sitios catalíticos. Con ayuda de simuladores computacionales se representan esquemáticamente las dos enzimas: FBPasa y CS.

Estas proteínas presentan dos o más unidades estructurales. En el caso de FBPasa muestra una estructura terciaria globular y una cuaternaria con 4 subunidades idénticas (homotetrámero), mientras que CS también es una proteína globular conformada por dos subunidades idénticas (homodímero) (se puede observar solo una subunidad en las figuras 2.1 para FBPasa y figuras 2.2 para CS). Esta característica de las proteínas nos permite trabajar experimentalmente con la proteína completa y poder predecir si tienen algún sitio canónico de fosforilación.

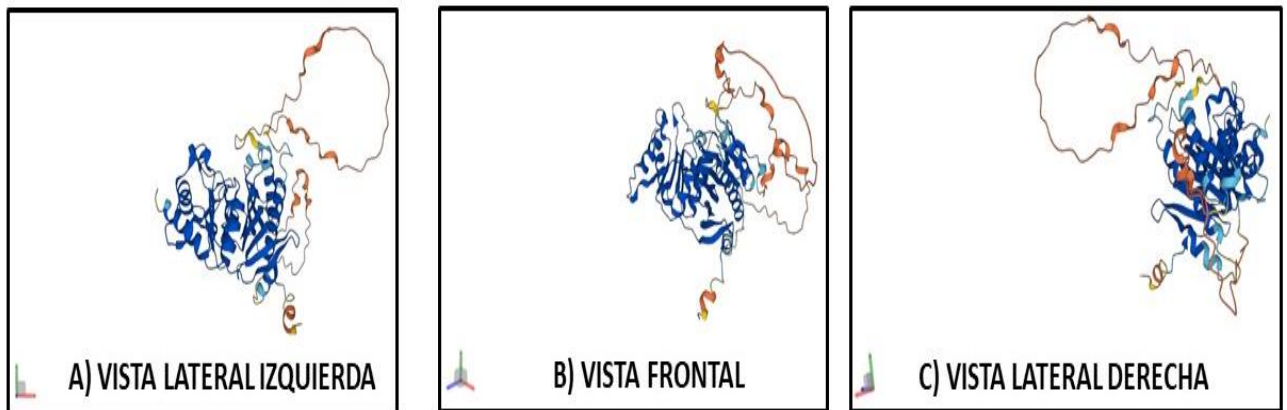


Figura 2.1. Modelo de la estructura tridimensional de FBPasa tomada de AlfaFold (No. de acceso de proteína en Uniprot: A0A3L6DKW4 Zea mays).

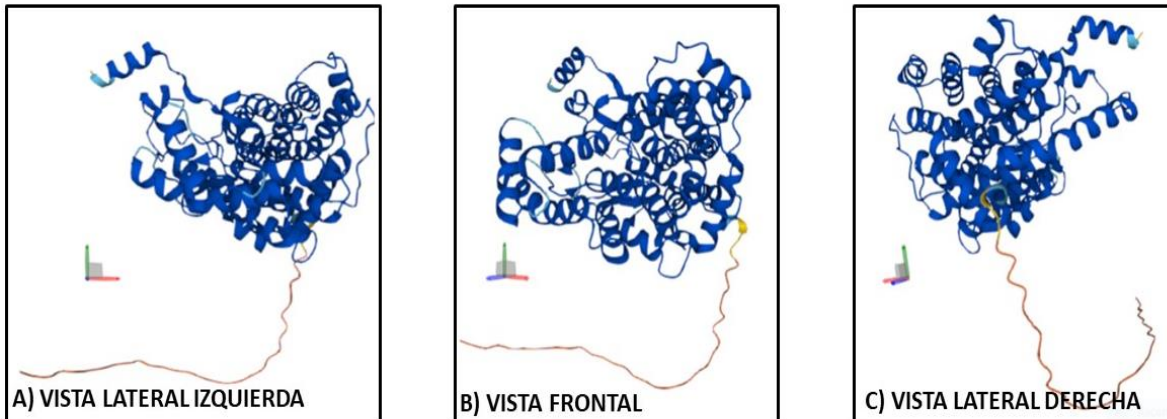


Figura 2.2. Modelo de la estructura tridimensional de CS tomada de AlfaFold (No. de acceso de proteína en Uniprot: B4FIC0 Zea mays).

Las figuras 2.1 y 2.2 indican una zona altamente estructurada (azul rey) y varias zonas desestructuradas o con bajo nivel de confianza en cuanto a la predicción de la estructura 3D (amarillo-naranja). En ambas figuras se observan principalmente estructuras terciarias de hélices-alfa y una zona terminal sin estructura (amarillo-naranja).

Las CDKs son enzimas de tipo transferasas, promueven la transferencia de un grupo fosfato donado por una molécula de alta energía como es el ATP, a un aminoácido de un sustrato específico, en este caso la serina o la treonina de la secuencia peptídica de las proteínas en estudio. El motivo canónico de fosforilación de CDKs está constituido por [S/T]PX[R/L], siendo X un aminoácido cualquiera. El motivo mínimo de fosforilación es [S/T]P.

Con ayuda de aplicaciones en la red para analizar fosforilaciones putativas en secuencias proteicas, NetPhos 3.1, GPS-5, HPDR, se muestra que la cdk5, enzima de mamíferos homóloga a la CDKA que se encuentra en las células vegetales, podría fosforilar, con alta probabilidad a la proteína FBPasa en seis sitios putativos (Figura 2.3), cinco motivos mínimos y uno completo.

MDHAAEAQRT DLMTITRHVL NEQSRHPESR GDFTEILLSHI VLGCKFVAAA VNKAGLAKLI GLAGETNVQA  
 STAPPNTHTH **TP**PLTRPARR **SPSTP**RLSCF NTRTHDPNDI QQKKMQGEEQ KKLDVLSNEV FVKALVSSGR  
 TCVLVSEENE EAIFVDFPALR GKFNPLLLH PDLVKVPQRR TVAFPDRLV LSLSLFRYCV CFDPLDGSSN  
 IDCGVSIGTI FGIYMKDKD NVTLEDVLP GTNMLAAGYC MYGSSCTLVL STGNGVNGFT LDPSLGEFIL  
 THPNIKIPRK GKIYSVNEGN AKNWDGPTAK FVEKCKYPED **GSP**PRSLRYI GSMVADVHRT LLYGGIFLYP  
 ADQK**SE**NGKL RVLVEVFPMS FLMEQAGGQA FTGKQRALEL APAKLHDR**SE** VFLGSYDDVE EIKALYASMS NSG

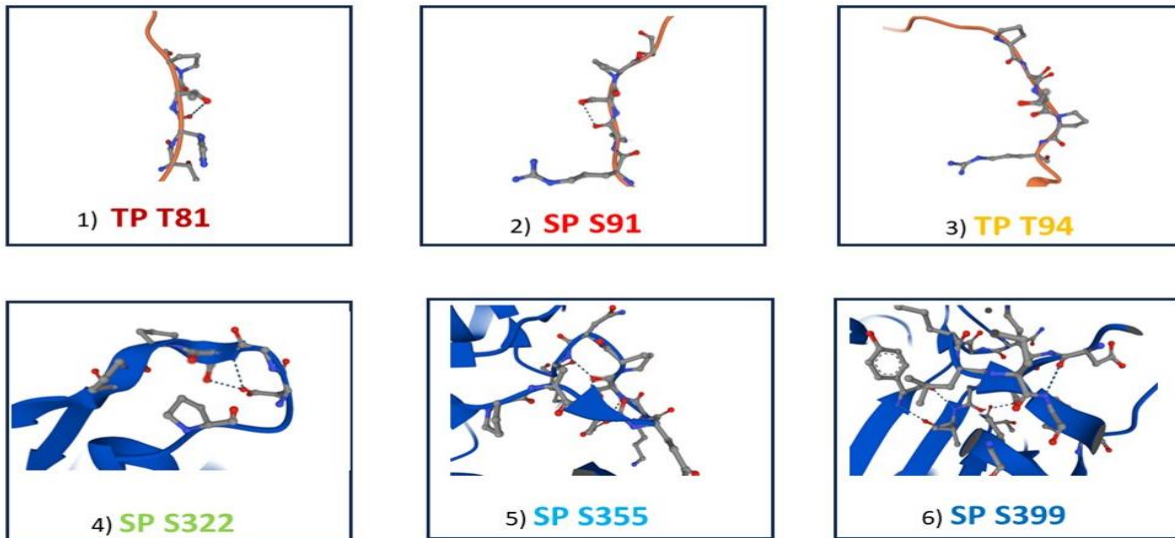


Figura 2.3 Sitios putativos de fosforilación de FBPasa (No. de acceso de proteína en Uniprot: A0A3L6DKW4 Zea mays) predichos por NetPhos 3.1. Se muestran los seis sitios putativos de fosforilación, resaltados en color y subrayados (panel superior). Imágenes tomadas de AlfaFold (panel inferior). Los sitios son: 1) **Treonina 81**, 2) **Serina 91**, 3) **Treonina 94**, 4) **Serina 322**, 5) **Serina 355** y 6) **Serina 399**. Todos los sitios de fosforilación putativos son mínimos, salvo el cuarto (verde) que es un sitio canónico.

El que FBPasa posea un alto número de motivos fosforilables por Cyc/CDKs sugiere que sería un buen sustrato del complejo cinasa con posibilidad de ser fosforilada en más de un sitio por la CDK los cuales sugieren que esta enzima también podría ser fosforilada con CDK 1,2,3,4,5,6, y que las probabilidades de ser fosforilada son altas.

Por otro lado, CS no presenta en su secuencia motivos de fosforilación completos o mínimos canónicos. Sin embargo, sí se encontraron cuatro motivos de interacción con ciclinas (motivo RXL, siendo X cualquier residuo de aminoácido, (Harashima & Schnittger, 2012)), como se muestra en la figura 2.4. se observa una probabilidad de interacción del 32% en la serina 15 (Netphos. 2020, ver tabla 1.1 del anexo C).

MAFF**RGL**TAV SRLRSRMAQE ATTLGGV**RWL** QMQSASDLDL KSQLQELIPE QQDRLKKLKS EHGKVQLGNI TVDMVLGGMR  
 GMIGMLWETS LLDPEEGIRF **RGL**SIPECQK VLPTAVKGGE PLPEGLLWLL LTGKVPTKEQ VDALSHELLA RSTVPAHVYK  
 AIDALPVTAH PMTQFTTGVM ALQVESEFQK AYDNGLPKSK FWEPTYEDCL NMIARLPPVA SYVYRRIFKG GKSIEDNSL  
 DYAAFHSHML GFDDPKMLEL MRLYVTIHTD HEGGNVSAHT GHLVGSALSD PYLSFAAALN GLAGPLHGLA NQEVLLWIKS  
 VIQETGSDVT TDQLKEYVVK TLKSGKVVPK FGHGVLKRTD PRYSCQREFA LKHLPEPDLF QLVSKLYEVV PPILTELGVK  
 KNPWPNVDAH SGVLLNHFGL SEARYYTVLF GVSRSMGIGS QLIWDR**ALGL** PLERPKSVTM EWLENYCANNK AA

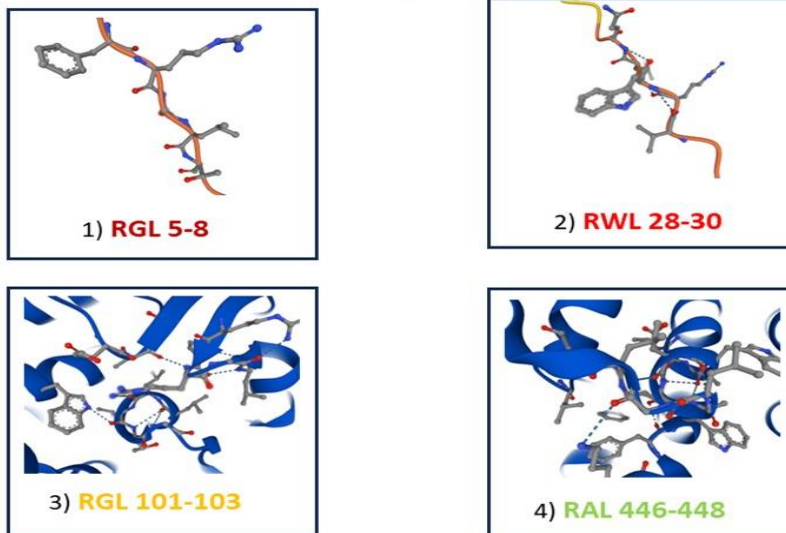


Figura 2.4 motivos de interacción con ciclinas de CS (No. de acceso de proteína en Uniprot: B4FIC0 Zea mays). 1) **RGL 5-8**, 2) **RWL 28-30**, 3) **RGL 101-103**, 4) **RAL 446-448**

Los sitios predichos de interacción con ciclinas (RXL). Dos de los sitios encontrados se encuentran en zonas desestructuradas, mientras que los otros dos motivos se encuentran embebidos en la estructura 3D. En el panel superior se muestra la secuencia resaltando en color los motivos putativos de interacción con ciclinas.

En la figura 2.4 se observan estructuras de  $\alpha$ -hélice en las que las serinas serían fosforiladas por la CDK en el caso de CS ocasionarían un impedimento estérico y las interacciones que presentan estas estructuras traería como consecuencia una menor probabilidad de que presenten interacción con otras moléculas. Por otra parte, este sistema de predicción de motivos de fosforilación de proteínas se basa en el motivo canónico, el cual consiste en una Serina/Treonina seguido por una Prolina, -un aminoácido cualquiera- y una Arginina o una Lysina, como se puede ver en la figura 1.3. Por último, La cdk 5 podría fosforilar otras serinas de la estructura proteica, pero su probabilidad sería <50%, también las dos enzimas

pueden interaccionar fuertemente con cdc2, proteína reguladora de levadura, homóloga de cdk en humano y plantas.

Por su naturaleza química, las enzimas se ven afectadas por factores que influyen en sus propiedades físicas y químicas de las proteínas (Badui. 2013). Como perspectiva experimental posterior se plantea analizar si complejos Cyc/CDKs pueden fosforilar a las enzimas metabólicas en estudio, y si esta modificación post-traducciona tuviese algún efecto funcional, por lo que se plantea también el monitoreo de la actividad enzimática de los candidatos. Se sabe que la velocidad de reacción enzimática depende de muchos factores tales como: pH, temperatura, presencia de inhibidores o activadores, cofactores y temperatura, además de modificaciones post-traduccionales que pudiesen modificar la estructura 3D de las proteínas. En la tabla 1 se resumen algunos valores fisicoquímicos y cinéticos de las enzimas en estudio. Es de suma importancia estos valores fisicoquímicos para la medición de la velocidad de reacción en condiciones estándar y evitar falsos positivos. De acuerdo con los parámetros de la tabla 1, los valores de actividad específica son altos. Si estas enzimas sufriesen alguna fosforilación por CDKs, habría una alta probabilidad de que se presentase una activación o inhibición en la actividad específica, si bien se sabe que en enzimas mitocondriales cuando sufren fosforilación por CycB/CDKs se activan. Hasta el momento no hay evidencia experimental para declinarse hacia una activación o inhibición en caso de que CS o FBPasa sean fosforiladas por complejos Cyc/CDKs.

	Tipo de enzima	
Parámetros fisicoquímicos.	Fructosa-1,6-bisfosfatasa	Citrato Sintasa
Km (mM).	0.121	0.018
Actividad específica (U/mg).	62.5	108
pH óptimo.	7.7-8.2	7.0-9.0
T óptima (°C).	25-50	30-35
Peso molecular (kDa).	46	50
Metales/Iones.	Mg(2+), Mn(2+)	
Activadores.	ATP, Citrato	ADP, NAD+
Inhibidores.	AMP, Fructosa 2,6-bifosfato	ATP, NADH

Tabla 1: Parámetros fisicoquímicos de la FBPasa y CS. Los valores se obtuvieron de la base de datos de BRENDA (Enzyme Database - BRENDA (brenda-enzymes.org)).

### 7.1.3 RELACIÓN EVOLUTIVA DE LAS ENZIMAS FRUCTOSA-1,6-BIFOSFATASA Y CITRATO CINTASA DE MAÍZ CON OTRAS ESPECIES.

El árbol filogenético es un esquema que relaciona filogenias de diferentes especies que reflejan los intercambios de nucleótidos (o aminoácidos) que se producen en dos o más secuencias comparadas. Las figuras 2.1 y 2,2 del anexo B muestra un árbol filogenético que se realizó con la secuencia de expresión de algunas gramíneas y que ilustra las relaciones filogenéticas entre miembros de la familia de FBPasa y de CS.

Como se muestra en las Figuras 2.5 y 2.6, la especie más cercana al maíz es el sorgo, mientras que la especie de la familia de las gramíneas más alejada es el trigo. Esto se ve reflejado en los experimentos de Doebley et al., 1990, en donde Sorghum y Zea son taxones hermanos en un árbol basados en datos de la gran subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RUBISCO) con la secuencia del ARN ribosomal (rRNA), mientras que los estudios de Hamby y Zimmer, 1992, indican que Sorghum, Saccharum, Zea y Tripsacum son hermanos taxonómicos, y que los cuatro géneros juntos forman un clado. En el esquema se muestra otras especies estudiadas como son: *Coffea arabica* y *Lactuca sativa*. También se incluyó la secuencia del gen que codifica para la proteína de *Homo sapiens*, por ser una de las especies más estudiadas y con las que se desarrollaron los esquemas 3D homólogos a las proteínas de estudio.





Figura 2.5: Árbol filogenético de la enzima  $\beta$ -D-fructosa1,6-bifosfato, software MEGA. Se muestra con una flecha la variante de la isoforma a utilizar.



Figura 2.6: Árbol filogenético de la enzima Citrato Sintasa, software MEGA, Se muestra con una flecha la variante de la isoforma a utilizar.

## 7.2 RESULTADO DEL ESTUDIO *in vitro*

### 7.2.1 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Todos los plásmidos empleados en este trabajo se encuentran en la colección de construcciones del laboratorio 114 del departamento de bioquímica. Se verificó



que las proteínas recombinantes del metabolismo del carbono CS-His del ciclo de Krebs y FBPasa-His de la gluconeogénesis, se expresarán de una manera suficiente y en el tamaño predicho, para posteriormente realizar el análisis de la interacción con las proteínas del ciclo celular. Se realizó la purificación de las proteínas del metabolismo central de carbono a través de su etiqueta en columnas de afinidad (NTA-Nickel) y se monitoreó por Western Blot la presencia de las proteínas recombinantes en las diferentes fracciones con anticuerpos que reconocen a la etiqueta de histidinas (Figura 2.8). Estos resultados muestran que las proteínas recombinantes se producen de manera eficiente, se encuentran en el citosol y son adecuadas como proteínas de anclaje.

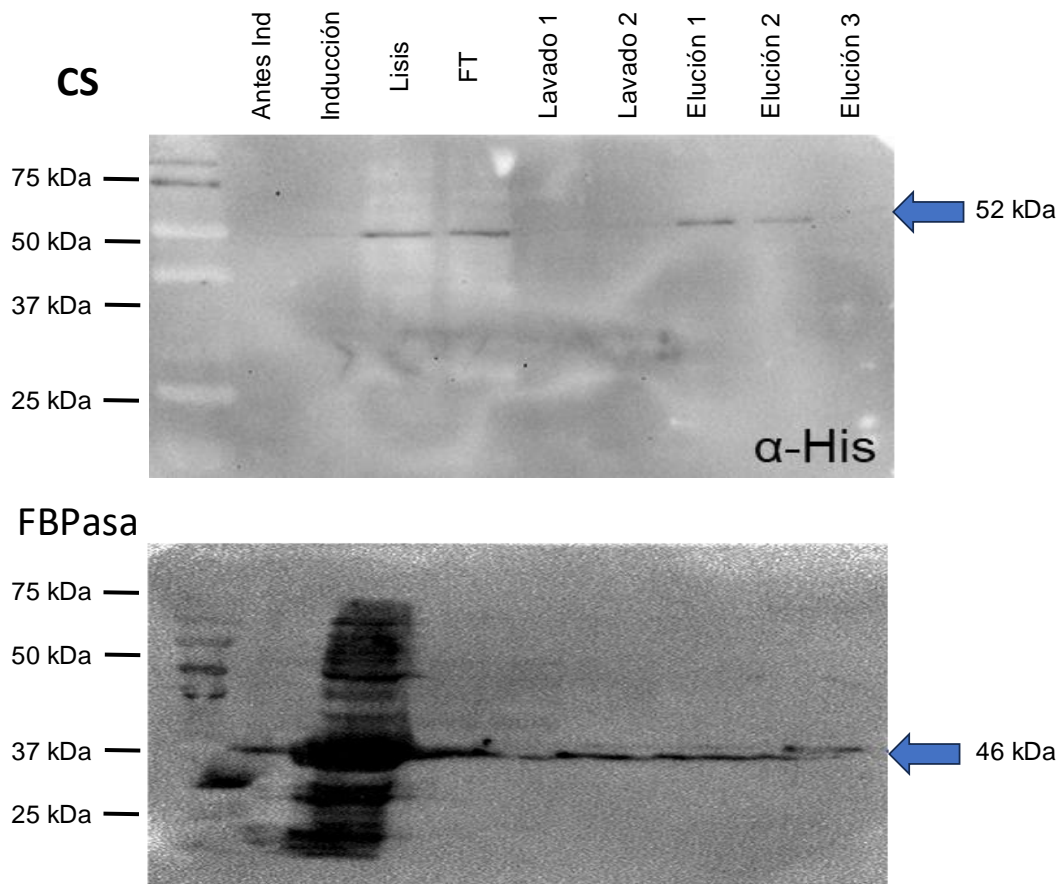


Figura 2.8. Purificación de Citrato Sintasa y FBPasa en columna de afinidad (NTA-Ni). El panel superior muestra el Western blot revelado con anti-His (1:1000) en el que se observa una única banda correspondiente al tamaño esperado para ambas proteínas. FT o FTL: fracción de lisado

tras fluir a través de la columna. LV1 y LV2, fracciones de lavado. ELU1 y ELU2: fracciones de elución.

Por otra parte, las proteínas del ciclo celular CDKA;1-GST, CDKB1;1-GST, CycB1;2-MBP y CycB2;1-MBP, Cyc D2;2-MBP, son proteínas recombinantes que se expresan de manera eficiente, y que no presentan interacción inespecífica con la columna de purificación con níquel, puesto que carecen de etiqueta de histidina, ya reportado en estudios anteriores (Vargas-Cortez *et al.*, 2023).

Los análisis de las interacciones proteína-proteína se realizaron conforme al procedimiento mencionado en la sección de Materiales y métodos. Brevemente: los lisados bacterianos de los cultivos, tras la expresión de proteínas recombinantes independientes se mezclaron en proporción 1:1, es decir, un volumen de enzima de glucólisis, y volumen equivalente de un regulador del ciclo celular. CS y FBPasa representaron la proteína de anclaje para su unión a la resina precargada con Ni (II), al estar marcadas con el His-tag. Tras la purificación de las proteínas y su correspondiente elución, las fracciones se cargaron en dos geles independientes y se transfirieron para ser analizados en dos Western blots paralelos e independientes. Uno de los WB se reveló con anticuerpo primario  $\alpha$ -His y secundario anti-ratón. Mientras que la proteína recombinante del ciclo celular se reveló con anticuerpo  $\alpha$ -MBP o  $\alpha$ -GST, de acuerdo con el TAG de la proteína empleada y el anticuerpo secundario fue anti-conejo.

#### 7.2.1.1 INTERACCIÓN DE CS CON CICLINAS CycD2;2 CycB2;1, PERO NO CON CDKs y CycB1;2

En la figura 2.9 se observa que no hubo interacción de CS *in vitro* con CDKA;1, ni con CDKB1;1 (CDKA presenta una masa de 57 kDa: 32 kDa +25 kDa de TAG GST; CDKB1;1 tiene una masa de 59 kDa: 3 kDa + 25 kDa de TAG-GST). En las imágenes de los Western blot revelados con anti-GST se puede observar (exposiciones de 13 s y 25 s en el equipo ChemiDoc Imaging Systems, Biorad), el carril que indica la fracción de elución (eluato) la ausencia de señal al no

observarse bandas claras, indicando que no hubo interacción de CS con las proteínas recombinantes del ciclo celular. En las demás fracciones: FM= fracción metabólica, FC=fracción del ciclo celular, M=mix (mezcla de ambas proteínas), en cambio, si se observó una banda clara demostrando la presencia inicial y en la mezcla de las CDKs. La banda de la fracción de elución (E) es clara para CS (52 kDa) con TAG de HIS, en el Western blot revelado con anticuerpo  $\alpha$ -HIS. Por lo anterior, se concluye que no hay interacción de CS con CDKA o CDKB.

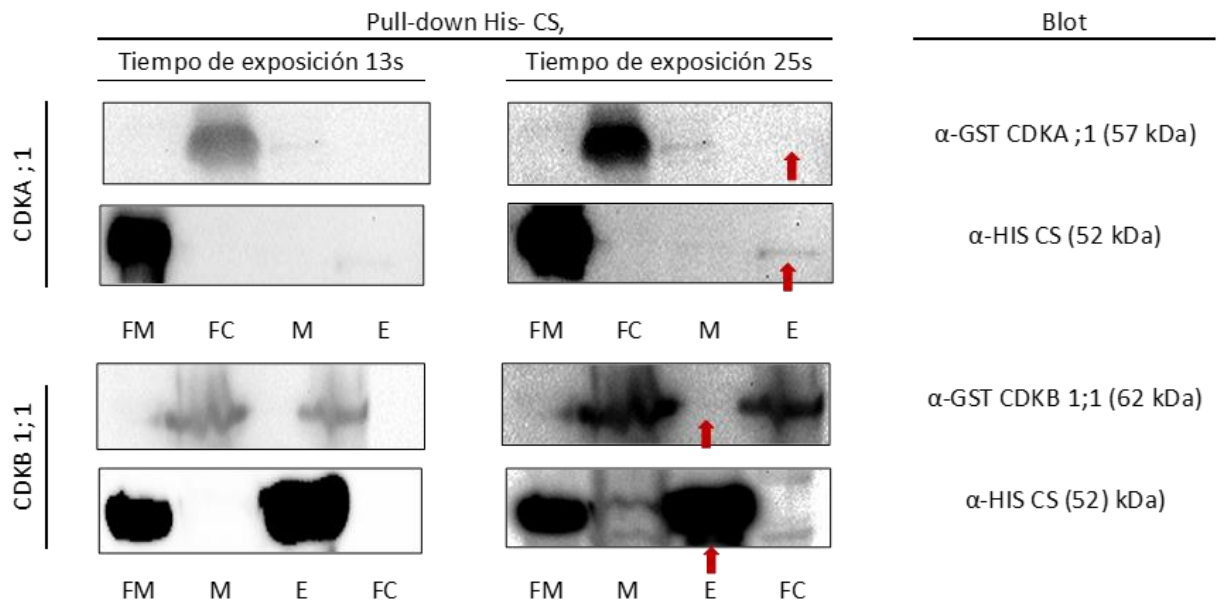


Figura 2.9 Se muestra el estudio de pull-down, de la proteína recombinante CS-His con las proteínas recombinantes del ciclo celular CDKA;1-GST, CDKB1;1-GST. Dos tiempos de exposición, 13 s y 25s ChemiDoc Imaging Systems (Biorad)., FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M= Mezcla de proteínas, y E=Elución.

En la figura 2.9.1 se observa que las proteínas recombinantes CycB1;2-MBP (95 kDa: CycB1;2, 50 kDa y MBP, 45 kDa), no presenta interacción con CS, mientras que la CycB2;1-MBP (95kDa: CycB2;1, 50 kDa y MBP, 45 kDa) sí presentará interacción con CS *in vitro*. La exposición se realizó por 13 y 25 s. El carril que indica la elución (eluato, E) en el incubado con anti-MBP la CycB1;2-MBP no muestra la presencia de bandas claras correspondientes, a Cyc2;1-MBP, lo que sugiere la interacción de CS con la proteína reguladora del ciclo celular.

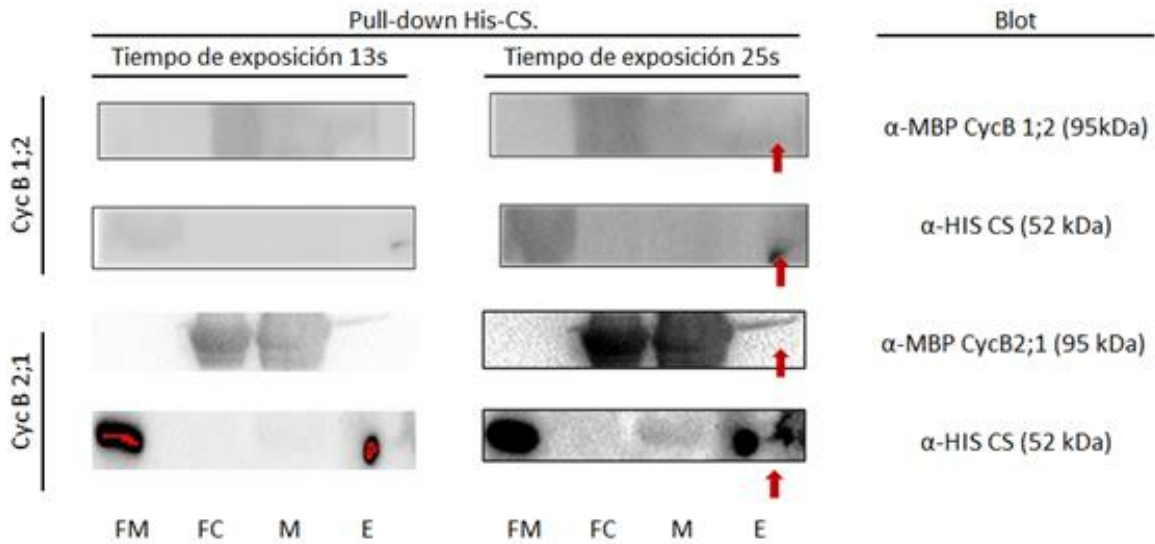


Figura 2.9.1 Se muestra el Pull-down, de la interacción de CS con las proteínas recombinantes del ciclo celular Cyc B1;2 y Cyc B2;1. Dos tiempos de exposición: 13 s y 25 s en ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M= Mezcla de proteínas, y E=Elución.

Por último, en la figura 2.9.2 se muestra que CS presentó interacción con CycD2;2-MBP, de 87 kDa (CycD2;2 42 kDa, MBP 45 kDa). En la figura se muestran las bandas definidas en la fracción de la elución (E), tanto para el TAG  $\alpha$ -MBP, como para el TAG  $\alpha$ -HIS. Por otra parte, las bandas de las fracciones son claras para: FM= fracción metabólica, FC=fracción del ciclo celular, M=mix (mezcla de ambas proteínas).

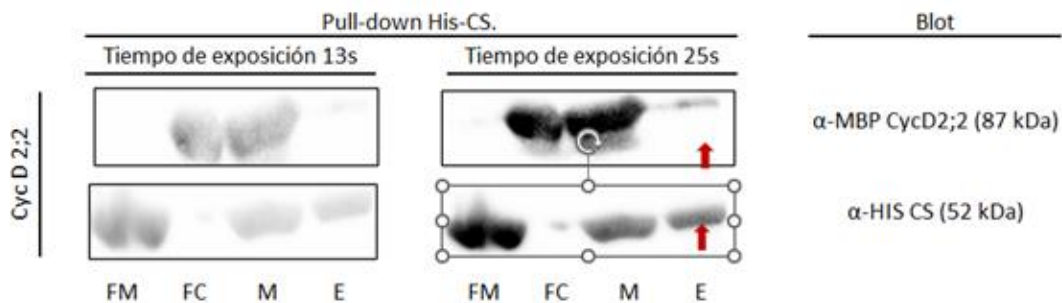


Figura 2.9.2 Se muestra el estudio de pull-down, de CS con la proteína recombinantes del ciclo celular CycD2;2. Se muestra en dos tiempos de exposición de 13 s y 25 s ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M= Mezcla de proteínas, y E=Elución.

7.2.1.2 INTERACCIÓN DE FBPasa CON CDK'S, Cyc B 2;1 y CycD2;2, pero no con Cyc B1;2.

En la Figura 2.10 se muestra la interacción observada *in vitro* de la enzima FBPasa con las proteínas cinasas del ciclo celular CDKA;1 y CDKB1. En las exposiciones de 13 y 25 s el carril que corresponde a la elución (eluato) en los Western Blots revelados con  $\alpha$ -GST se ve la presencia de bandas claras que sugieren que efectivamente se llevó a cabo la interacción de FBPasa (que se observan en los blots correspondientes revelados con  $\alpha$ -His) y las proteínas del ciclo celular. Las bandas de la E=elución (eluato) son evidentes y denotan a las proteínas recombinantes con TAG  $\alpha$ -HIS o TAG  $\alpha$ -GST, por lo que se concluye que hay interacción con estas proteínas.

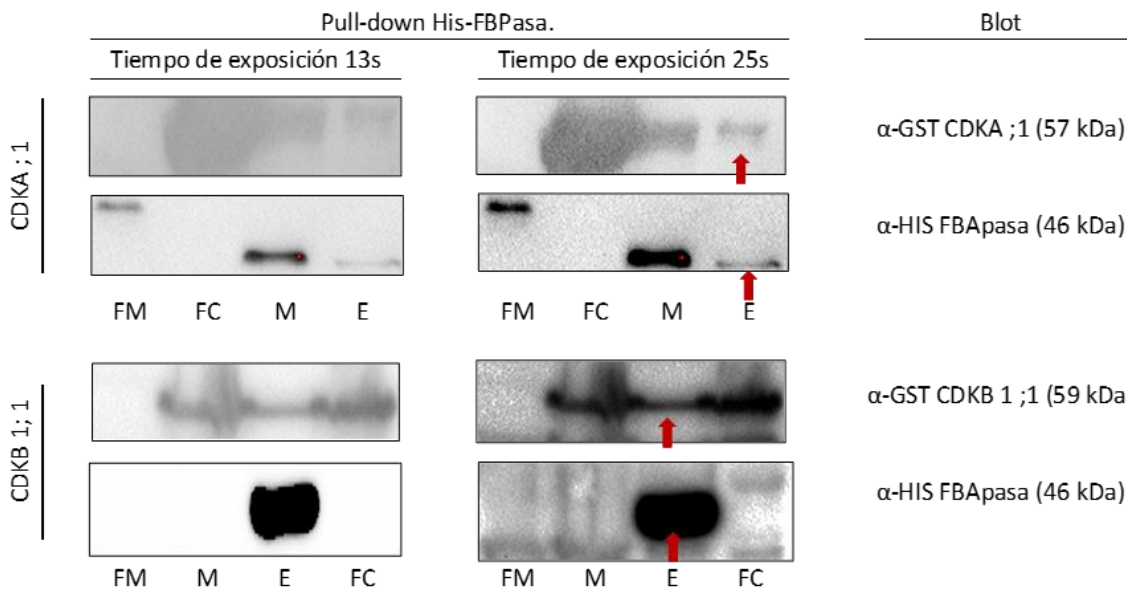


Figura 2.10 Se muestra el estudio de Pull-down, de FBPasa con las proteínas recombinantes del ciclo celular CDKA;1 y CDKB1;1. Dos tiempos de exposición, 13 y 25 s. Imágenes obtenidas en ChemiDoc Imaging Systems (Bio rad). FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M=Mezcla de proteínas, y E=Elución.

En la Figura 2.10.1 se observa que FBPasa no presenta interacción CycB1;2-MBP mientras que la interacción *in vitro* con CycB2;1-MBP se observa que si presenta interacción, las que presentan un tamaño de alrededor de 95 kDa, Se muestran las exposiciones de 13 y 25 s. En los carriles correspondientes a la elución (eluato) y revelados en el Blot con  $\alpha$ -MBP. La CycB1;2-MBP no muestra la

presencia de bandas claras correspondientes. Por lo cual se concluye que no hay interacción entre estas proteínas. Por otro parte, la Cyc2;1-MBP, presenta las bandas que sugieren la interacción de las proteínas recombinantes del metabolismo. . Por lo cual se concluye que hay interacción entre estas proteínas.

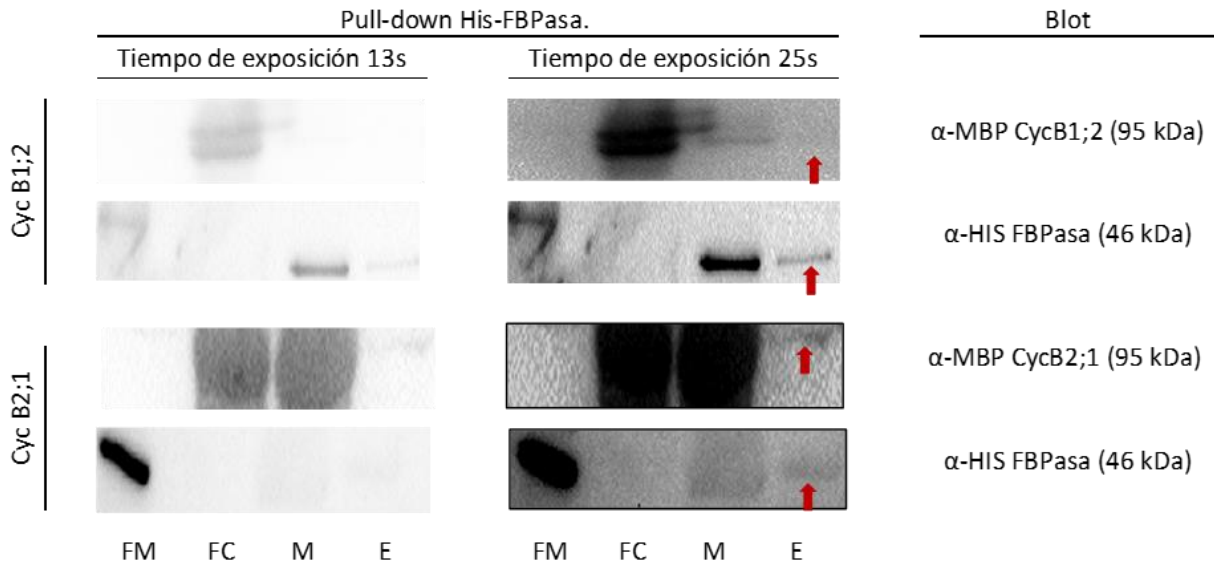


Figura 2.10.1 Se muestra el estudio de Pull-down de la interacción de FBPasa con las proteínas recombinantes del ciclo celular Cyc B1;2 y Cyc B 2;1. Dos tiempos de exposición: 13 s y 25 s ChemiDoc Imaging Systems, donde la FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M= Mezcla de proteínas, y E=Elución.

Por último, en la figura 2.10.2 se muestra que FBPasa también interaccionó con CycD2;2-MBP, misma que se detectó por α-MBP a los 83 kDa (CycD2;2 38 kDa y MBP, 45 kDa). En la Figura 12 se observan bandas definidas en el carril de elución, tanto para el TAG α-MBP, como para el TAG α-HIS. Por otra parte, las bandas de las fracciones son claras para: FM= fracción metabólica, FC=fracción del ciclo celular, M=mix (mezcla de ambas proteínas, tanto en la exposición a 13 y 25 s.

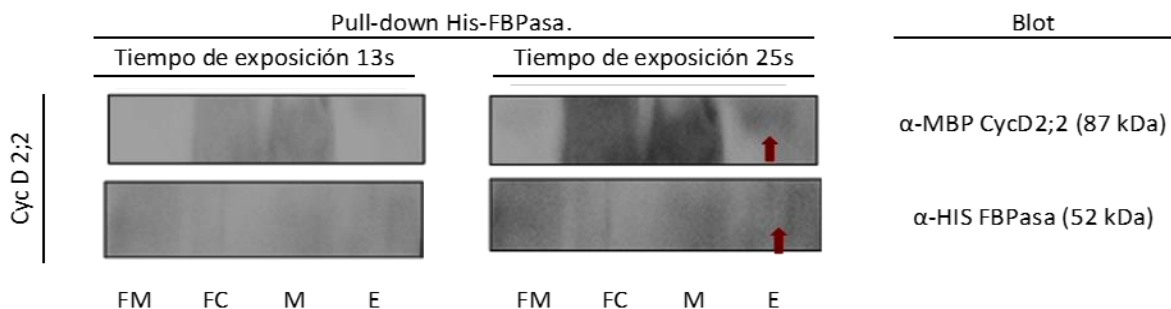


Figura 2.10.2 Ensayo de Pull-down, de FBPasa con la proteína recombinante del ciclo celular CycD2;2. Dos tiempos de exposición: 13 y 25 s, analizados por ChemiDoc Imaging Systems (Biorad). FM=Fracción Metabólica, FC=Fracción del ciclo celular, M= Mezcla de proteínas, y E=Elución.

En resumen, la citrato sintasa mostró interacción directa con las ciclinas CycD2;2, CycB1;2 y CycB2;1 como se muestra en la Tabla 1.2 mientras que, en las condiciones de ensayo no fue posible detectar interacción con CDKA;1 o CDKB1;1. Por otro lado, FBPasa sí mostró interacción con todas las proteínas del ciclo celular analizadas, tanto cinasas, como ciclinas.

Enzima metabólica	Interacción		Sin interacción.	
	Cinasa	Ciclina	Cinasa	Ciclinas
CS		Cyc B 2;1 Cyc D 2;2	CDKB 1;1 CDKA;1	Cyc B1;2
FBPasa	CDKA;1 CDKB 1;1	Cyc B 2;1 Cyc B 1;2		Cyc B1;2

Tabla 1.2. Resumen de las Interacciones entre CS o FBPasa con proteínas del ciclo celular analizadas en este trabajo.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 8.1 EL CICLO CELULAR Y EL METABOLISMO CENTRAL EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ.

La germinación es un proceso que consta de tres fases, comúnmente llamadas hidratación (fase I), germinación (fase II) y crecimiento (fase III). En la fase I, hay un aumento de la actividad mitocondrial que es necesaria para la obtención de energía para la siguiente fase. (Sánchez-Camargo y Juárez 2019), empiezan a restablecerse secuencialmente las funciones de la respiración celular, se activa la síntesis de proteínas a partir de moléculas de mRNA almacenados durante el secado de la semilla y posteriormente, ocurre la transcripción *de novo* tanto de mRNA como de RNA de transferencia y ribosomales. La evidencia bioquímica de los predictores en línea demuestra que las proteínas del metabolismo central del carbono se expresan y probablemente se encuentren con actividad basal en las primeras 6 horas de la germinación (ver Figura 2).

El control del metabolismo de la glucosa y el ciclo celular debe coordinarse para garantizar suficiente ATP y sustratos en las distintas fases del ciclo celular. Sin duda, los estudios sobre el papel del metabolismo de azúcares en la progresión del ciclo celular germinativo en maíz han demostrado que la glucosa parece estimular la síntesis de DNA (Lara-Núñez et al., 2017) además de inducir que un mayor número de células se comprometa a germinar en regiones meristemáticas en ejes de maíz en germinación (Díaz-Granados *et al.*, 2020).

Las observaciones anteriores sugieren que debe haber un control estrecho entre los procesos del ciclo celular y el metabolismo central de carbono, dado que se requiere que ambos procesos estén coordinados para proveer la energía y los intermediarios metabólicos que la célula requiere para poder generar nuevas estructuras celulares y con ello proliferar, esto cobra particular relevancia durante la germinación, ya que la semilla cuenta con moléculas de almacenamiento que debe inter-convertir para dar paso a nuevas estructuras y órganos a través de la proliferación y posterior diferenciación.

Los estudios *in silico* predicen que los complejos Cycs/CDKs podrían fosforilar a las enzimas FBPasa y CS dado que la primera presenta en su secuencia seis



sitios putativos de fosforilación por CDKs y la segunda 4 motivos de interacción con ciclinas. Por otro parte, los ensayos *in vitro* de Pull down demuestran que proteínas del ciclo celular, tanto ciclinas D y B como CDKA y CDKB tienen la capacidad de interactuar con las proteínas metabólicas, lo que a su vez sugiere la interacción con complejos Cyc/CDKs, quienes son los que tienen la capacidad de fosforilar a los sustratos.

Fisiológicamente la germinación empieza con una actividad metabólica basal que se torna intensa conforme avanza, que parte de tres rutas proveedoras de sustratos directos o indirectos para la respiración mitocondrial, las cuales son: glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs. Entre los objetivos de estas rutas se encuentra la formación de ATP y la producción de intermediarios que sustentarán el crecimiento posterior de la semilla en germinación.

## 8.2 INTERACCIÓN DE CS CON CICLINAS Y CDKS.

La interacción de CS con ciclinas tanto de S (CycD2) como con Cycs de G2/M (CycB1;2 y CycB2;1) sugiere una regulación potencial de complejos CDKs con estas ciclinas u otras presentes en diferentes momentos del ciclo celular. El hecho de que CS no presente motivos de fosforilación, pero sí motivos de interacción con ciclinas, refuerza la posibilidad de regulación *in vivo* por complejos Cyc/CDKs.

Los resultados de interacción *in vitro* reportados en este trabajo indican que efectivamente CS interacciona con CycD2;2, CycB2;1y es sabido que son las ciclinas quienes seleccionan al sustrato y lo presentan a las CDKs para ser fosforilado.

Dado que CS es una enzima importante para el ciclo de Krebs en cuanto a su actividad y a su potencial regulación, es de gran importancia analizar el efecto (si es que existe alguno) de la fosforilación de estos complejos sobre alguno o varios de los sitios putativos de fosforilación de CS.

Pudiera considerarse que CS es la enzima de entrada del ciclo de ácidos carboxílicos, al sintetizar una molécula de 6 carbonos a partir de dos moléculas, una de dos carbonos (acetil-CoA) y otra de cuatro (oxaloacetato), por lo que su actividad enzimática representa un punto crítico de control para esta ruta. Se ha reportado que complejos CycD2/CDKA de *Arabidopsis* fosforilan a MDH, enzima participante del ciclo de Krebs, aunque no se ha investigado el efecto de dicha fosforilación sobre la actividad enzimática (Harashima et al., 2016).

Si se encontrase que la fosforilación por Cyc/CDKs provocase un efecto de activación de CS significaría que el ciclo celular requiere de la energía generada por este ciclo, junto con la cadena respiratoria, para poder sustentar la proliferación celular. Sería interesante realizar un análisis de la actividad de CS y el potencial de fosforilación por Cyc/CdKs sobre esta enzima a lo largo de la germinación de maíz para evaluar la dependencia entre ciclo de Krebs y momento del ciclo celular en que se encuentren las células.

En mamíferos se ha encontrado que complejos CycB1/CDK1 se localizan en la matriz mitocondrial y tienen la capacidad de fosforilar a subunidades del complejo I de la cadena respiratoria, y otros sustratos mitocondriales, lo que estimula de manera global la actividad de la mitocondria proporcionando mayor energía que utiliza la célula particularmente en G2/M para llevar a cabo la división celular (Z. Wang et al., 2014).

Si, por el contrario, se encontrase una disminución en la actividad de CS por efecto de la fosforilación, esto implicaría que el ciclo celular ejerce una regulación negativa de manera global sobre el metabolismo central de carbono, dado que ya se ha demostrado que otras enzimas de la glicólisis son fosforiladas por Cyc/CDKs y como consecuencia su actividad disminuye (H. Wang et al., 2017)(Vargas-Cortes et al., 2023).

Para contestar estas interrogativas se requiere mayor trabajo experimental a desarrollarse en un futuro cercano.

### 8.3 INTERACCIÓN DE FBPASA CON CICLINAS Y CDKS.

La FBPasa es la enzima más importante en la regulación de la gluconeogénesis, dado que la mayoría de las enzimas que participan en esta vía son reversibles y también participan en la glucólisis

En la germinación de semillas con alto contenido lipídico, la contribución de esta enzima proporciona capacidad de generación de azúcares simples a partir de intermediarios provenientes de biomoléculas de almacén como pueden ser aminoácidos no gluconeogénicos o lípidos, ello, gracias a que las plantas cuentan con la ruta del glicoxilato, que es una ruta alternativa del ciclo de Krebs, condensa moléculas de Acetil-CoA y no se generan moléculas de CO<sub>2</sub> (no hay descaboxilación oxidativa) lo que permite la conservación de esqueletos carbonados que salen del ciclo en forma de oxaloacetato (molécula de 4 carbonos), ácido carboxílico gluconeogénico.

En esta tesis se reporta que la secuencia de FBPasa presenta seis sitios canónicos de fosforilación por CDKs, cinco mínimos y uno completo (Figura 2.3), y experimentalmente se demostró la interacción *in vitro* de FBPasa con dos ciclinas y dos CDKs distintas. Lo anterior sugiere un alto potencial de fosforilación por complejos Cyc/CDKs tanto en la interfase como en la mitosis, lo que sólo se podrá averiguar realizando los experimentos correspondientes ya sea *in vitro* con complejos producidos de manera recombinante o *in vivo* con ensayos de inmunoprecipitación.

De encontrarse fosforilación de complejos Cyc/CDKs sobre esta proteína, entonces se requeriría analizar el efecto de las fosforilaciones sobre la actividad enzimática de FBPasa. Se esperaría que la fosforilación provocase un efecto de

activación, dado que esto permitiría que la célula pudiese aprovechar a los lípidos de almacén y otros metabolitos para la generación de carbohidratos que a su vez puedan sustentar la síntesis *de novo* de pared celular y membranas, además de otras moléculas de soporte celular, requeridos para la generación de biomasa resultante de la proliferación celular.

Relacionando este estudio con la germinación de maíz, la regulación de la actividad de FBPasa por el ciclo celular, de darse, se llevaría a cabo desde muy temprano en la germinación. Puesto que el eje embrionario, estructura que contiene el programa morfogénico para generar una plántula, contiene una gran carga lipídica que deberá ser transformada para sustentar la reparación de estructuras dañadas en el secado de la semilla y proporcionar la energía y los esqueletos carbonados necesarios para impulsar la biosíntesis *de novo* de biomoléculas, entre ellas ribosomas, proteínas, o la reparación de organelos, entre otros procesos.

Cabe destacar que la degradación de lípidos del escutelo o de almidón del endospermo son procesos post-germinativos en maíz y que toman relevancia hasta aproximadamente 72 horas después de la imbibición, por lo que en la germinación temprana el eje embrionario deberá consumir sus propios componentes de almacén.

## **9. CONCLUSIONES.**

La evidencia del análisis *in silico* y experimentos *in vitro* reportada en este trabajo sugiere que tanto CS como FBPasa de maíz son blancos potenciales de fosforilación por complejos Cyc/CDKs.

FBPasa presenta en su secuencia seis sitios putativos de fosforilación, mientras que CS posee cuatro sitios canónicos putativos de interacción con ciclinas.

A través de ensayos de Pull down se encontró que CS interaccionó *in vitro* con CycD2;2, y CycB2;1, mientras que FBPasa interaccionó *in vitro* con CycD2;2, CycB2;1, y las CDKA;1 Y CDKB 1;1

El impacto de la regulación de la maquinaria del ciclo celular sobre el metabolismo central de carbono podría ser a través de la regulación por fosforilación de CS y FBPasa, contribuyendo a modular la canalización de metabolitos intermediarios en el ciclo de Krebs y en la gluconeogénesis, respectivamente.

## **10. PERSPECTIVAS.**

- 1) Evaluar la actividad de cinasa de complejos Cyc/CDK *in vitro* e *in vivo*, usando como blancos de fosforilación a las proteínas recombinantes CS y FBPasa.
- 2) Estimar la actividad enzimática de CS y FBPasa una vez que se haya comprobado que los complejos Cyc/CDKs fosforilan a estos sustratos.
- 3) Realizar una búsqueda experimental de sitios de fosforilación por espectrometría de masas tras emplearse a CS y FBPasa como sustratos de fosforilación de complejos Cyc/CDKs.
- 4) Monitorear la actividad enzimática de CS y FBPasa en diferentes momentos de la germinación con el fin de poder relacionar el nivel de actividad con la temporalidad de las diferentes fases del ciclo celular en maíz.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. A.U. Igamberdiev, M.I. Rodionova *Role of the glyoxylate cycle in metabolism of acetate and other organic acids sov. Plant Physiol.*, 38 (1991), pp. 360-365.
2. A.U. Igamberdiev, P.J. Lea *The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms phytochemistry*, 60 (2002), pp. 651-674
3. Badui, S. 2013. *Química de los Alimentos*. 5a edición. Ciudad de México: editorial Pearson.
4. Baíza, A. M., Vázquez-Ramos J. M., Sánchez de Jimenez, E, 1989 *DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. J. Plant Physiol.* Vol. 135. PP416-421.
5. Bove, J., Jullien, M. & Grappin, P., 2001. *Functional genomics in the study of seed germination.* *Genome Biology*, 3, pp. 1-5.
6. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
7. Campbell, C. S., and E. A. Kellogg. 1988. *Grass systematics and evolution* (T. R. Soderstrom, K. W. Hilu, C. S. Campbell, and M. E. Barkworth, eds.). *Scientific American*. 259: pp. 146-147
8. Ching, T. M., 1972. *Metabolism of germination in sedes.* *Seed Biology*, Vol. 3. Academic Press, E.U.A.
9. Doebley, J., M. Durbin, E. M. Golenberg, M. T. Clegg, and D. P. Ma. 1990. *Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (rbcL) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae).* *Evolution* 44, pp. 1097-1108.
10. Díaz-Granados, V. H., López-López, J. M., Flores-Sánchez, J., Olguin-Alor, R., Bedoya-López, A., Dinkova, T. D., Salazar-Díaz, K., Vázquez-Santana, S., Vázquez-Ramos, J. M., & Lara-Núñez, A. (2020). *Glucose modulates proliferation in root apical meristems via tor in maize during germination.* *plant Physiology and Biochemistry*, 155(June), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.041>

11. Dudits, D., Cserháti, M., Miskolczi, P., & Horváth, G. V. (2007). *The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation*. IN : Inzé D (Ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development* (1st ed., pp. 1–30).
12. Ezzatizadeh, V., Pinto, R. M., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Riele, H. te, & Pook, M. A. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. NIH Public Acess, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.033.Cyclin-specific>
13. Garza-Aguilar, S. M. (2018). *Modulación de los complejos ctd3;1/cdks por fitohormonas y sacarosa durante la germinación de maíz* [FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM]. <http://132.248.9.195/ptd2018/enero/0769604/Index.html>
14. Garza-Aguilar, S. M., Sánchez-Camargo, V.A., Godínez-Palma, S.K., y Lara Núñez, A. 2014. *Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas*, Reb 2014, Revsta de Educacion Bioquimica Vol. 33, No, 22, 39-47
15. Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). *Maize cyclin d2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination*. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 166–173. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci007>
16. Hamby, K., and Zimmer, E. A. 1992. *Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics*. in *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York pp. 50-91.
17. Harashima, H., Dissmeyer, N., Hammann, P., Nomura, Y., Kramer, K., Nakagami, H., & Schnittger, A. (2016). *Modulation of plant growth in vivo and identification of kinase substrates using an analog-sensitive variant of cyclin-dependent kinase a;1*. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0900-7>
18. Harashima, H., & Schnittger, A. (2012). *Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria*. *Plant Methods*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-23>.
19. H.L. Kornberg, H. Beevers *a mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor*. *Beans Nature*, 180 (1957), pp. 35-36

20. Horton, P., Keun-Joon, P., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., C.J. Adams-Collier, and Nakai K, *WoLF PSORT: protein localization predictor*. Published online 2007 May 21.
21. JANN, R. C. and R. D. AMEN., 1977 *What is germination?* In: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, pp.7 -28.
22. Kletzien R.F., Harris, P.K.W., Foellmi, L.A. 1994. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a 'housekeeping' enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress* FASEB J., 8, pp. 174-181.
23. Lara-Núñez A *respuesta de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de semillas de maiz en desarrollo al acido obcsisico y al potencial osmótico* tesis que para obtener el título de Quimico de Alimentos, presenta Aurora Lara Nuñez ; asesor Rogelio Rodríguez Stores, 1999.
24. Lara-Núñez A, García-Ayala B.B, Garza-Aguilar S.M, et al. 2017. *glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination*. *Plant Physiol. Biochem.* P. 113.
25. Lara-Núñez, A., De Jesús, N., & Vázquez-Ramos, J. M. (2008). *Maize d4;1 and d5 cyclin proteins in germinating maize. associated kinase activity and regulation by phytohormones*. *Physiologia Plantarum*, 132(1), 79–88. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00995.x>
26. Magyar, Z., Ito, M., Binavora, p., Mohamed, B., and Bogre, L. 2013. *Cell Cycle Modelus in plants for Entry into Proliferation and for mitosis*. *Plant Genome Diversity Vol 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes* pp. 77-97. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1160-4_6).
27. Magyar, Z., Mészáros, T., Miskolczi, P., Deák, M., Fehér, A., Brown, S., Kondorosi, É., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bakó, L., Koncz, C., & Dudits, D. (1997). *Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells*. *Plant Cell*, 9(2), 223–235. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.223>.
28. Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H., & Wolgemuth, D. J. (2009). *Cyclin-dependent*



- kinases: a family portrait*. In *Nature Cell Biology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 1275–1276). <https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275>
29. Malumbres, M. (2014). *Cyclin-dependent kinases*. *Genome Biol.* 15:122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>
  30. Menges Margit, James A.H. Murray *Synchronous arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity*. *The plant journal*, first published 07/may/2002, <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01274.x>
  31. Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W., and Murray, J.A.H. 2005. *Global análisis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expresión and provides a coherent model for plant cell cycle control*. *The Plant Journal*, 41(4), pp. 546-566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02319>.
  32. Ma Zhenguo, M Frédéric, Mark A. Bernards, Mark W. Sumarah, *Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination*, *Plant Science* Volume 248, July 2016, Pages 37-44.
  33. Nieuwland, J., Menges, M. M., & Murray, J. A. H. (2007). *The plant cyclins*. in inzé d (ed.), *Cell Cycle Control and Plant Development* (1st ed., pp. 31–61).
  34. Nikolaj Blom , Thomas Sicheritz-Pontén , Ramneek Gupta , Steen Gammeltoft and Søren Brunak *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence* . *Proteomics* 2004, 4, 1633-1649 DOI 10.1002/PMIC.200300771
  35. Nunes-Nesi, A., Araujo, W.L., Fernie, A.R. 2011. *Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis*. *Plant Physiol*, 155, pp. 101-107
  36. P.J. Eastmond, I.A. *Graham re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds* *Trends Plant Sci.*, 6 (2001), pp. 72-78.
  37. Ribas-Carbó, M., Flórez-Sarasa, I.D., González-Meler, M.A., *La respiración de las plantas* En: Azcón-Bieto. J., Talón, M., Bonilla, I. *Fundamentos de fisiología vegetal*. España 2008, edit., McGraw-Hill Interamericana de España, Capítulo 14.

38. Salazar-Roa, M. and Malumbres, M. January 2017. *Fueling the cell division cycle*. Trends in Cell Biology, Vol. 27, No. 1 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.009>.
39. S. Baud, B. Dubreucq, M. Miquel, C. Rochat, L. LEPINIECSTORAGE *Reserve accumulation in arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling* Arabidopsis Book, 6 (2008), p. e0113.
40. Sánchez-Camargo V. A. y Juárez-Días J. A. (2019). *El ciclo celular durante la germinación*. En: Guevara-Fefer P. (ed), Un viaje alrededor de la semilla. Prensas de Ciencias, pp. 153.
41. Scott, M. P., and Emery, M. 2006. *Maize: Overview*. En Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00022-6>
42. Solaki, M. and Ewald, J., C. 17 August 2018. Fueling the Cycle: CDKs in *Carbon and energy metabolism*. Interfaculty Institute of Cell Biology, Eberhard Karls University of Tuebingen, Tuebingen, Germany, Front. Cell Dev. Biol., vol 6 | <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00093>.
43. Stitt, M. 1990 *Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41, 153-185
44. Trable, J., and Scanlon M. J. 2009. Maize (zea Mays): *A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology*. Cold Spring Harbor Protocols. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>.
45. Toufighi, K., Siobhan-Brady, M., Austin, R., Eugene, Ly., Provart, N. J. *First Expression Angling, and promoter analyses*. published: 10 June 2005. Plant journal. 43: pp. 153-163.
46. Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P. C. G., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J. D., ... De Jaeger, G. (2010). *Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in arabidopsis thaliana*. Molecular Systems Biology, 6(397). <https://doi.org/10.1038/msb.2010.53>
47. Vazques-Ramos, J. M., and Sánchez, M. D.I.P 2003. The cell cycle and seed germination. Seed Science Research, 13(2), 113-130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>.

48. Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inze D (2002) *Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:903- 916W.L.
49. Holtman, J.C. Heistek, K.A. Mattern, R. Bakhuizen, A.C. *Douma $\beta$ -oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley* *Plant Sci.*, 99 (1994), pp. 43-53.
50. Wang, H., Nicolay, B. N., Chick, J. M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., Gao, H., Yang, G., Williams, J. A., Suski, J. M., Keibler, M. A., Sicinska, E., Gerdemann, U., Haining, W. N., Roberts, T. M., Polyak, K., Gygi, S. P., Dyson, N. J., & Sicinski, P. (2017). *the metabolic function of cyclin d3-cdk6 kinase in cancer cell survival*. *nature*, 546(7658), 426–430. <https://doi.org/10.1038/nature22797>.
51. Wang, Z., Fan, M., Candas, D., Zhang, T. Q., Qin, L., Eldridge, A., Wachsmann-Hogiu, S., Ahmed, K. M., Chromy, B. A., Nantajit, D., Duru, N., He, F., Chen, M., Finkel, T., Weinstein, L. S., & Li, J. J. (2014). *Cyclin b1/cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle g2/m progression*. *Developmental Cell*, 29(2), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.0>