

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**Regulación de la actividad de hexocinasas por
sacarosa y glucosa en la germinación de tejido
embrionario de maíz.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico en Alimentos

P R E S E N T A

Aída Castañeda Rico



MÉXICO DF. 2008



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	Homero Hernández Montes
Vocal	Sobeida Sánchez Nieto
Secretario	Elpidio García Ramírez
1er suplente	Ma Carmen Parra González
2do suplente	Selene Fragoso Iñiguez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114, del departamento de bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Asesor

M. en C. María del Carmen Parra González

Supervisor técnico

Aída Castañeda Rico

Alumna

Agradezco:

A Dios por mi familia, por la vida, por escucharme y por todo lo que me ha dado.

A mis padres: Mi mamá Alejandra por su amor, su apoyo y ternura, por que todo lo que soy se lo debo a ella y mi Papá Jaime por su apoyo y comprensión, los amo mucho.

A mis hermanos: Moy por apoyarme siempre que lo necesito, Rosy por apoyarme en mis locuras y darme consejos, Ale por su chispa y apoyo y Dione por su apoyo los quiero mucho.

A mi Asesora Sobeida por sus consejos y apoyo para realizar esta tesis y en lo personal gracias, la estimo mucho.

A mi novio Víctor por apoyarme siempre, darme consejos y amarme, te amo, siempre juntos.

A mi asesora técnica y amiga Carmen Parra gracias nunca olvidare sus consejos y apoyo, la quiero mucho.

A mis amigos por su apoyo y su amistad inigualable: Norma M., Ale S., Ricardo P., Ale P., Julia S., Janeth R., Toño Beaz, Rafa N., Armando C., Saúl C., Ulises, Adriana G., Saúl, Eva, Jaz, Edson, Marce, Arturo, Fabián, Pily, Alberto Z, etc..... y a todos los que me apoyaron y me brindaron su amistad a lo largo de la carrera gracias por su amistad.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 114 Sonia, Tania, Ira, Jorge, Pilo, Manuel, Ale, Silvia, George, Octavio, Nazul, Carlos, Alfredo, Mine, Aurora y si se me olvida alguno no lo olvide solo se me fue su nombre, gracias por el tiempo compartido, los estimo mucho.

A todos los que contribuyeron en mi formación profesional y personal gracias.

A la UNAM y La Facultad de Química.

A mi Dany por su amor y a su mamá y hermano Ale, por su amistad y cariño gracias.

A Lety por su amistad y apoyo, a su mamá las dos son unas grandes personas.

A mis Tíos David, Delia, Bartolo, Socorro, y Seferino por siempre darme ánimos gracias los quiero mucho.

A mis primos: Erika, Oscar, David y Jimmy por ser mis primos, los quiero mucho.

A mi Perro Ruffo por desvelarse siempre conmigo y cuidarme.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con apoyos:

- **PAPIIT IN218505**, DGAPA, UNAM.
- **PAIP 6290-12** de la Facultad de Química.
- Beca para realización de tesis de licenciatura, otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 de la Asociación Autónoma del Personal Académico de la UNAM (AAPAUNAM), **Cátedra Fernando Orozco Díaz**.

ÍNDICE

	Página
Índice general	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Antecedentes	9
El maíz.....	9
Estructura de la semilla de maíz.....	10
Germinación.....	12
Movilización de reservas.....	15
Hexocinasas.....	18
Características bioquímicas y estructurales de las hexocinasas.....	19
Características bioquímicas de las fructocinasas.....	25
Distribución subcelular de las hexocinasas y fructocinasas.....	26
La hexocinasa en la vía de traducción de señales de carbohidratos.....	29
Justificación	30
Objetivos	31
Materiales y métodos	31
Material biológico.....	32
Obtención del extracto enzimático.....	32
Determinación de proteínas.....	32
Protocolo de medición de la actividad de hexocinasa.....	32
Determinación de la actividad de hexocinasas en geles nativos	32
Resultados	32
Perfil de la hexocinasa en tejido embrionario de maíz a lo largo de la germinación.....	34
Efecto de la imbibición en diferentes concentraciones y tipo de hidratos de carbono en la actividad de la hexocinasa.....	36
Determinación del perfil de isoenzimas de tejido embrionario germinado en diferentes carbohidratos	36
Discusión	38
Conclusiones	42
Perspectivas	47
Referencias	57
	57
	58

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estructura de la semilla de maíz mostrando sus tejidos principales.....	11
Figura 2. Curva de toma de agua por la semilla.....	13
Figura 3. Modelo de la estructura de la hexocinasa de rata.....	20
Figura 4. Localización subcelular de la hexocinasa.....	27
Figura 5. Reacción de reducción del NBT por protones.....	35
Figura 6. Actividad de las hexocinasas durante la germinación de ejes y embriones de maíz.....	37
Figura 7. Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en diferentes carbohidratos sobre la actividad de las hexocinasas.....	39
Figura 8. Efecto de la imbibición de embriones de maíz en diferentes concentraciones de carbohidratos sobre la actividad de las hexocinasas.....	41
Figura 9. Patrón de enzimas que fosforilan hexosas en los ejes embrionarios.....	43
Figura 10. La imbibición en glucosa aumenta la actividad de una isoforma de HXK citosólica en embriones de maíz.....	46

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Composición química de las partes principales del grano de maíz.....	16
Tabla 2. Efecto de diferentes moléculas sobre la actividad de la hexocinasa de plantas.....	24
Tabla 3. Soluciones que contiene el medio de reacción para determinar la actividad de hexocinasa.....	33
Tabla 4. Soluciones y cantidades utilizadas para hacer un gel de poliacrilamida no desnaturalizante.....	34

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ABA	Ácido abscísico
GA	Ácido giberelico
ATP	Trifosfato de Adenosina
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
NADPH	Nicotinamida adenosinfosfato dinucleótido
HXK	Hexocinasa
GK	Glucocinasa
FRK	Fructocinasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
Km	Constante de Michaelis-Menten
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inhibición
ADP	Difosfato de Adenosina
GTP	Guanidin trifosfato
CTP	Citosin trifosfato
UTP	Uracil trifosfato
UDP	Uracil difosfato

RESUMEN

En la semilla seca, la actividad glucolítica, la síntesis de ATP, ciclo de las pentosas etc., funcionan a una velocidad mínima y cuando inicia la germinación, las actividades se incrementan de forma notable. La hexocinasa es una enzima importante en el metabolismo y se ha sugerido su participación en la vía de señalización por carbohidratos y que lleva a modificar la expresión de genes. En la germinación de la semilla del maíz se producen diferencias en la concentración de carbohidratos en diferentes tiempos y tejidos, gradientes que pueden influenciar la expresión de ciertos genes del metabolismo del carbono y de sus transportadores. Tenemos evidencias de que el transportador de sacarosa se reprime cuando el tejido se embebe en glucosa y manosa, ambos sustratos de la hexocinasa, por lo que en este trabajo se examinó si la expresión hexocinasa también es modulada por la concentración de carbohidratos en la que se embebe el tejido embrionario del maíz. Se obtuvieron los perfiles de la actividad de la hexocinasa citosólica usando glucosa y fructosa como sustratos durante la germinación y se observó que la actividad aumentó conforme avanza la germinación, alcanzando su máxima actividad en la fase III o fase post-germinativa. El efecto de la exposición de ejes y embriones del maíz a la imbibición con carbohidratos produce un incremento en la actividad de las hexocinasas citosólicas del tejido, en los ejes la actividad de ésta se incrementa hasta 5 veces más cuando el tejido se embebió en glucosa, a la concentración de 25mM. Mientras que en los embriones se encontró que sólo las hexosas aumentan la actividad desde 5 hasta 50mM, en todas las concentraciones. Con la finalidad de identificar cual o cuales de las isoformas de hexocinasa eran las responsables de los aumentos en la actividad se separaron las formas de hexocinasas en geles de poliacrilamida no desnaturizantes y se detectó la actividad en el gel. Se encontró que el perfil de isoenzimas es diferente en ejes como en embriones y también si el tejido se embebía a 5 ó 50mM de los carbohidratos. En los ejes embrionarios embebidos con 5mM de glucosa, sacarosa o sorbitol se encontraron 5 bandas, siendo la banda de la HXK3 la más intensa cuando el tejido se embebió en glucosa. Al embeber los embriones en 5mM de los carbohidratos se encontraron 5-6 bandas, en donde la banda de la

HXK5 desapareció y otras aparecieron en la parte superior del gel, pero la banda que presentó la mayor actividad fue la que denominamos HXK4.

La separación de las bandas de actividad cuando el tejido embrionario de maíz se embebía en 50 mM de los carbohidratos era pobre, sin embargo al menos para los embriones logramos detectar que algunas de las bandas de actividad eran similares a las encontradas en los tejidos que se embebieron en 5 mM de los carbohidratos, las bandas HXK2, HXK3 y HXK4, pero la banda más intensa era una que se encontraba por arriba de la HXK2, una banda ancha y que en otros geles aparecía como un doblete. Nuevamente está banda era más intensa en los embriones que fueron embebidos en glucosa.

Encontramos que la imbibición en glucosa aumenta la actividad de la hexocinasa tanto en los ejes como en embriones, sin embargo las isoformas de la hexocinasa que se encienden o activan por la glucosa son diferentes dependiendo del tejido y de la concentración. En los ejes embebidos en glucosa 5mM se encendió la isoforma HXK3, en los embriones embebidos también en glucosa 5 mM se incrementó la isoforma HXK4 y cuando se embebieron los embriones en glucosa 50 mM aumentó la actividad de la HXK2. El papel de las diferentes hexocinasas durante la germinación posiblemente sea diferente, sin embargo aún desconocemos si alguna de ellas participa en la transducción de señales que modifica la expresión temporal y espacial del transportador de sacarosa, pero es indicativo de que alguna de ellas puede participar en su regulación.

ANTECEDENTES

El maíz.

Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Orden cereal	Monocotiledoneae
Familia	Poaceae (Gramineae)
Género	Zea
Especie	Zea mays

La planta de maíz alcanza de 0.5m a 6m de alto. El maíz forma un tallo erguido y macizo, una peculiaridad que diferencia a esta planta de casi todas las demás gramíneas, es que lo tienen hueco. Las hojas forman una larga vaina íntimamente arrollada al tallo y un limbo más ancho, alargado y flexuoso. Del tallo nacen 2-3 inflorescencias muy densas o mazorcas envueltas en espatas. En cada mazorca se ven filas de granos, cuyo número puede variar de 8 a 30, y su color variará desde claro amarillento hasta verde pardo. El tallo de la planta está rematado en el extremo por una gran panoja de pequeñas flores masculinas, y al dispersarse el polen, se vuelven secas y parduscas (Paliwal *et al.*, 2001).

El maíz constituye, junto con el arroz y el trigo, uno de los principales alimentos cultivados en el mundo, y uno de los que tiene la mayor variedad de usos. Su uso no solo se centra en la alimentación humana, sino que forma parte de la alimentación animal por sí mismo o constituyendo un ingrediente muy importante en la composición de piensos para aves, cerdos y vacas. Los tallos de maíz, una vez separada la mazorca, se pueden utilizar como forraje.

A partir de esta planta se obtienen bebidas no alcohólicas mezclas como la harina de maíz, azúcar y agua; la harina de maíz y cacao; harina de maíz, agua, leche y azúcar. Aunque también se obtienen bebidas alcohólicas.

Del maíz, además de sus granos, se extrae harina para la confección de pan de maíz, harinas para bizcochos, pasteles y otros productos de repostería y los subproductos de la harina se utilizan en la manufactura de otros productos como pienso para animales etc. También se obtiene aceite de uso alimentario o para la industria de fabricación de pinturas o jabón.

Desde un punto de vista industrial, esta planta es interesante, además, para la obtención de endulzantes alimentarios de almidón y alcohol. A partir de las partes no aprovechables, se obtiene furfural un componente que se utiliza en la industria del caucho, resinas, plásticos, insecticidas o líquidos para embalsamar (Paliwal *et al.*, 2001)

Estructura de la semilla de maíz

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas y tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen. En las semillas se encuentra una planta en miniatura encerrada y protegida dentro de una cubierta seminal y provista de sustancias de reserva, ya sea en los cotiledones del embrión o fuera del mismo, el endospermo (Figura 1). La semilla se dispersa en un estado de bajo contenido de agua (5 al 15%) y con una actividad metabólica detenida (Bove *et al.*, 2001).

En la semilla del maíz se distinguen tres partes principales, el revestimiento exterior de la semilla, denominado pericarpio, el endospermo amiláceo y el embrión, que dará origen a la nueva planta (Figura 1). El pericarpio antes y después de la siembra, tiene como misión proteger el interior de eventuales ataques de patógenos (hongos y bacterias). El endospermo constituye la principal y primaria reserva energética del embrión, de la cual la plántula obtiene carbohidratos y sustancias proteicas, para hacer frente a sus necesidades durante el periodo posterior a la salida de la radícula y previo a la aparición de las hojas. El embrión se encuentra embebido sobre la cara ancha de la semilla, en el embrión se encuentra el eje embrionario, que precisamente es un eje central el cual termina en la cara basal en la raíz y por el lado opuesto la punta del tallo. El

escutelo es considerado por mucho un cotiledón modificado y se encuentra unido en el primer nodo o denominado nodo escutelar. El escutelo forma parte del embrión al igual que el eje embrionario y nunca funciona como hoja verdadera, pero sirve para digerir y absorber el endospermo durante el crecimiento del embrión y la plántula. El eje embrionario se puede definir como una planta de maíz en miniatura, teniendo ya predeterminadas las principales partes de la planta adulta, que en esta fase toman los nombres de plúmula (parte foliar) y la radícula (raíz primaria). En la plúmula se encuentran de cinco a seis hojas en miniatura protegidas por un tejido denominado coleóptilo, mientras que la radícula se encuentra protegida por un tejido denominado coleorriza (Leszek y Vincent, 2002).

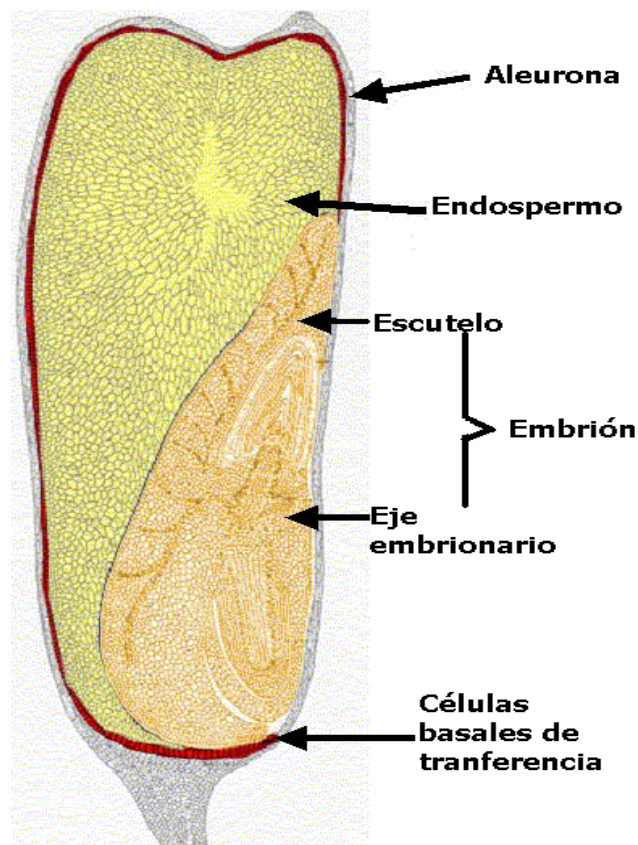


Figura 1. Estructura de la semilla de maíz mostrando sus tejidos principales (Leszek y Vincent 2002).

Germinación.

Algunos fisiólogos mencionan que independiente de su estructura, información genética y contenido macromolecular, las semillas secas están capacitadas para reasumir su actividad metabólica. Para que la germinación ocurra, las semillas quiescentes necesitan solamente ser hidratadas bajo condiciones que favorezcan el metabolismo, como una temperatura adecuada y la presencia de oxígeno (Bove *et al.*, 2001). La semilla una vez colocada en humedad y a temperatura mínima de 13 a 14°C, absorbe agua a través del tegumento externo, se hincha y dos o tres días después, si las condiciones climáticas son favorables, sale la radícula. Unos 10 días después de la fecha de siembra despunta en el terreno el coleóptilo, en forma de una punta de consistencia rígida, según la definición agronómica este es el final de la germinación. La definición de germinación que tomaremos en este trabajo es la definición botánica, siendo el proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla y culmina con la salida de la radícula (Bewley y Black 1994).

La germinación se conoce que procede en tres fases, que delimitan diferentes eventos celulares y que generalmente coinciden con la curva de toma de agua o hidratación de la semilla (Figura 2).

La toma rápida de agua, es conocida como fase I de la germinación, se inicia con la hidratación de los constituyentes de la semilla, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y organelos. La hidratación, es un fenómeno físico, que ocurre debido a que el potencial mátrico de las semillas es bajo, es un proceso que no está sujeto a un control fisiológico.

Al inicio de la fase I las membranas y varios organelos no se encuentran intactos y son bioquímicamente ineficientes. La reparación de las estructuras celulares toma unas pocas horas, mientras tanto, las semillas experimentan una salida transitoria de sustancias de bajo peso molecular, iones, carbohidratos y aminoácidos. Generalmente con el aumento en el contenido de humedad hay un

incremento en la toma de O₂. Las enzimas del ciclo de Krebs y las oxidasas terminales que se encontraban en la semilla en desarrollo, se reactivan, aunque también comienza la síntesis de nuevas enzimas mitocondriales y por tanto la biogénesis mitocondrial.

La activación primaria de la respiración, la síntesis de RNAm y de proteínas, son eventos característicos de la fase I (Figura 2; Bewlley y Black 1994; Bove *et al.*, 2001), y los sustratos metabólicos se encuentran disponibles en el embrión, tales como sacarosa, rafinosa, péptidos, aminoácidos entre otros.

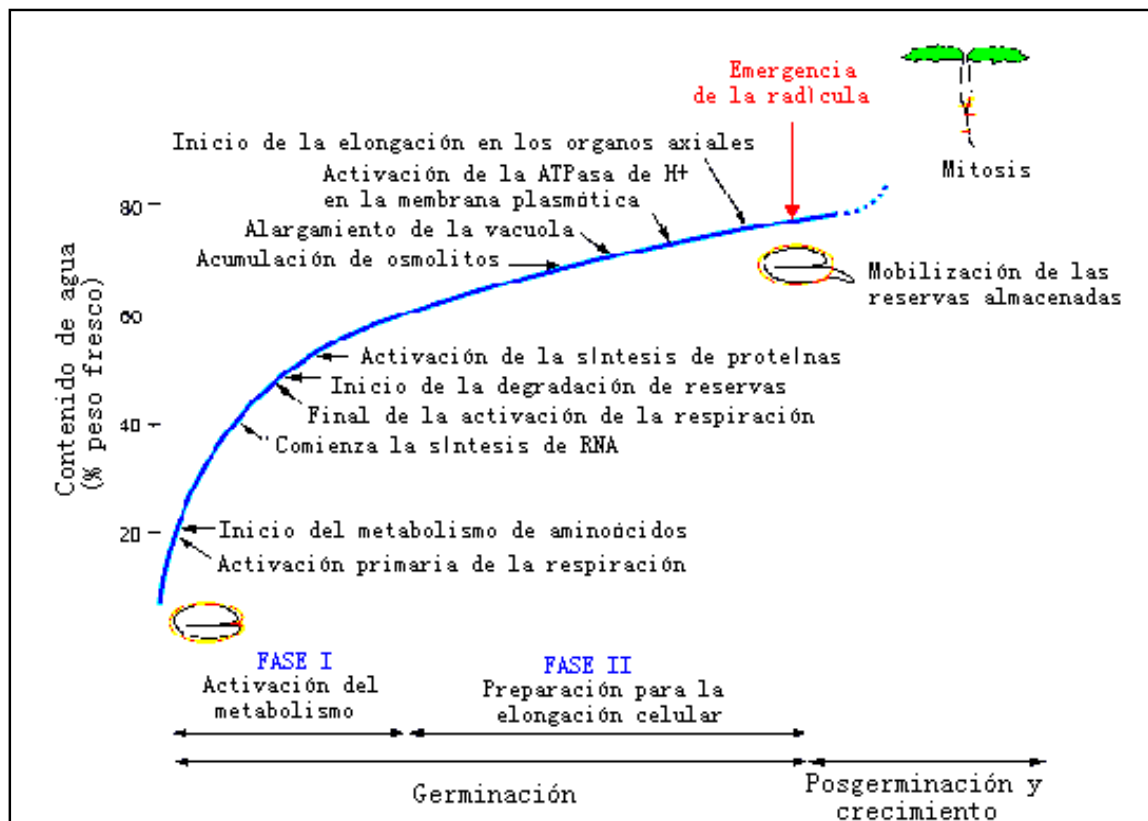


Figura 2. Curva de toma de agua por la semilla. Se muestran las fases características del proceso de la germinación (traducido de Bove *et al.*, 2001).

Cuando el nivel de hidratación es superior al 60%, la velocidad de hidratación disminuye y nuevos mecanismos fisiológicos ocurren para la preparación de la

célula para la expansión de la radícula, este periodo aparentemente estacionario, es el más activo y se le denomina fase II de la germinación. Se reparan las estructuras moleculares (membranas, DNA, entre otros), se reanuda el ciclo celular y se debilitan las estructuras que rodean a la radícula, evento que ayudará a su salida (Bewley y Black, 1994, Soeda *et al.*, 2005). Al final de esta fase, el único cambio morfológico observable es el alargamiento de las células, principalmente las de la radícula, dado esencialmente por el aumento de volumen de las células.

Como se mencionó, el metabolismo está en completa actividad, por ejemplo, después de 15 h de germinación en agua la expresión de transcritos en *Brassica napus* se incrementan, principalmente aquellos relacionados con la síntesis de proteínas, el metabolismo, la organización de la célula, la biogénesis de organelos y la transducción de señales (Soeda *et al.*, 2005).

La denominada fase III o de crecimiento postgerminativo, está marcado por el incremento en la toma de agua y en ella ocurren los mayores cambios morfológicos de la semilla. La radícula se convierte en raíz primaria, mientras que en el extremo apical del eje embrionario empieza el crecimiento del tallo o epicotilo y la aparición de las primeras hojas. El paso de la semilla de la fase II a la fase de crecimiento está fuertemente regulada por señales, tanto ambientales como hormonales¹, la salida de la radícula compromete a la semilla a continuar el crecimiento, debido a que pierde la tolerancia a la desecación.

De hecho, las señales que llevarán a que una semilla germine comienzan antes de la aparición de la radícula, por ejemplo, en algunas semillas los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA, del inglés "Abscisic acid") disminuyen y los de la

¹ Usaremos el término hormona en la tesis, pero sabemos que el término hormona es generalmente aplicado a sistemas animales, y se refiere a una molécula orgánica que se encuentra de manera natural en pequeñas concentraciones, es producida en un sitio y transportada hacia el sitio blanco, llevando a una respuesta bioquímica o morfogénica específica. Se ha sugerido el uso del término reguladores del crecimiento de plantas o PGRs del inglés "plant growth regulators", ya que en este término se engloba tanto a compuestos naturales como sintéticos. Muchas veces estos últimos más potentes que los primeros (Srivastava, 2001).

hormona ácido giberélico (GA, del inglés "Giberellic acid") aumentan. ABA es un fuerte inhibidor de la germinación, con efecto similar al que produce la baja disponibilidad de agua o la germinación en presencia de concentraciones altas de solutos.

El GA realiza un efecto antagónico al del ABA, el efecto se ha establecido al usar marcadores moleculares, como por ejemplo enzimas que son requeridas para la movilización de las reservas en cereales, en donde el efecto es a través de una variada regulación, incluyendo control transcripcional y síntesis de inhibidores específicos para algunas actividades enzimáticas (Finkelstein y Lynch, 2000).

La sugerencia de que la germinación es regulada por el balance de GA y ABA en las semillas, proviene de experimentos en los que semillas de mutantes incapaces de sintetizar GA, requieren la adición exógena de GA para completar la germinación. Mientras que las semillas mutantes en la síntesis de ABA, germinan rápidamente en agua o requieren menores concentraciones de GA para mostrar un fenotipo similar al de las semillas silvestres (Srivastava, 2001). Ambas hormonas tienen un papel en la germinación de la semilla, sin embargo, no sólo es importante el índice relativo de ambas hormonas, sino también la sensibilidad del tejido para éstas.

Movilización de las reservas

En los cereales como el maíz, el endospermo ocupa la mayor parte de la semilla y consiste de dos partes, células parenquimatosas, en las cuales se han almacenado almidón y proteínas (ver Tabla 1) y las células de la aleurona. Las primeras células murieron en el proceso de maduración y las segundas se encuentran alrededor del endospermo, formando 1 o varias capas y funcionan durante la germinación en la síntesis y secreción de enzimas hidrolíticas sobre el endospermo (Srivastava, 2001).

El almidón se encuentra formando gránulos o corpúsculos intracelulares. Dichos granos muestran una apariencia característica en cada especie, pudiendo tener formas esféricas, elípticas, poligonales, etc. En la hidrólisis del almidón sus componentes, la amilosa y la amilopectina, son hidrolizados por la α -amilasa y la β -amilasa para dar glucosa. La degradación del almidón se incrementa progresivamente hacia el final de la germinación, primero lentamente, y luego de una forma más rápida para la práctica desaparición del polisacárido. En cotiledóneas se secretan endo- β -mananasas, α -galactosidasa y β -manosidasa, lo que lleva a que todos los componentes del endospermo sean utilizados, (Srivastava, 2001).

Tabla 1. Composición química de las partes principales del grano de maíz. Tomado de http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/T0395S/T0395S00.htm, los valores se muestran en porcentaje.

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Embrión
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Carbohidratos solubles	0.34	0.62	10.8

Durante la germinación el embrión y principalmente el escutelo, se sintetizan y secretan diferentes giberelinas, las que difunden hacia la capa de aleurona. El GA induce la síntesis de varias enzimas hidrolíticas, mismas que son secretadas al endospermo y/o al escutelo, se degradan las reservas y los productos -glucosa y aminoácidos- son transportados hacia el embrión para su crecimiento. En arroz se ha encontrado que después de 1 a 2 días después de comenzar la imbibición aparecen enzimas hidrolíticas en el escutelo, y posteriormente, días 3 y 4, aparecen en la capa de aleurona (Srivastava, 2001).

Otra de las reservas importantes de carbono en el maíz son los lípidos y constituyen en la semilla el 37% de su peso seco y en el embrión el 70% (Ingle *et al.*, 1964; Martínez-Marcelo, 2007).

En la movilización y metabolismo de las reservas lipídicas están implicados tres tipos de orgánulos: las vesículas que contienen aceites almacenados (cuerpos lipídicos), los glioxisomas o peroxisomas y las mitocondrias. La degradación y metabolismo de los lípidos se produce en varias fases (Eastmond y Graham, 2001):

1. Lipólisis de los triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol. Se produce en los cuerpos lipídicos por acción de las lipasas que rompen los enlaces éster.
2. Oxidación de los ácidos grasos a acetil-CoA (β -oxidación) y posterior formación de succinato en los glioxisomas o en los peroxisomas.
3. Conversión de succinato a oxalacetato en las mitocondrias.
4. Formación de sacarosa a partir de oxalacetato en el citoplasma.

La acetil-CoA se utilizará tanto en la síntesis de sacarosa en el citoplasma, como en la producción de ATP y poder reductor en la mitocondria. De hecho, se ha documentado que el proceso de hidratación reanuda la degradación de lípidos aún cuando las enzimas malato sintasa e isocitrato liasa no se encuentren presentes, por lo que la acetil-CoA debe estarse usando como sustrato respiratorio (Eastmond y Graham, 2001).

Por otra parte, la movilización de las proteínas de reserva está catalizada por diferentes tipos de enzimas proteolíticas, agrupadas bajo el nombre de proteasas. A medida que progresa la germinación, las fracciones proteínicas de reserva se transforman principalmente en pequeños péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos liberados pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas en la plántula en desarrollo o proporcionarán energía mediante la oxidación de su

esqueleto carbonado. En los cereales, las proteínas se almacenan en los gránulos, y se acumulan en la capa de aleurona. En maíz se ha observado, que las proteínas de reservas se movilizan rápidamente a partir de las 24h de la germinación y esto lleva a un incremento de 1 a 4 veces en el contenido de aminoácidos totales en el eje embrionario (Ingle *et al.*, 1964). En cebada se conoce que durante las primeras horas de la germinación, el escutelo sintetiza una variedad de transportadores específicos de aminoácidos y péptidos que se encargaran de nutrir al embrión hasta su establecimiento como plántula (Salmenkallio y Sopanen, 1989).

La expresión de genes rápidamente cambia durante la transición de semilla seca hacia el modo germinativo. Y aunque la transición en general ha sido documentada, la mayoría de la información proviene de los genes que se encienden para la movilización de las reservas en el evento posterior a la germinación. Asimismo, se conoce que el balance hormonal entre ABA y AGA3 participa regulando el avance de la germinación, sin embargo se desconoce que otras moléculas pueden actuar. Actualmente se considera que los propios carbohidratos no sólo cumplen la función de dar carbono y energía, sino que son moléculas que regulan la actividad metabólica a través de inducir o reprimir genes específicamente (Rolland y Sheen, 2005). En la germinación se conoce que la poza de glucosa y sacarosa se encuentra cambiando continuamente. Estudios con una variedad de carbohidratos y sus análogos e intermediarios metabólicos, apuntan a que la hexocinasa, la primera enzima de la glucólisis, puede ser un sensor de los carbohidratos y que al percibirlos establece contacto con otras proteínas para cambiar la expresión de genes. En este trabajo se investigó si la actividad de la enzima cambia cuando el tejido embrionario del maíz es embebido en diferentes carbohidratos.

Hexocinasas

La hexocinasa (HK) es una enzima ubicua encontrada en levaduras, plantas y tejidos de mamíferos. Esta enzima cataliza el primer paso de la glucólisis, la

fosforilación de la glucosa. Las enzimas que son capaces de fosforilar diferentes hexosas se clasifican de acuerdo a su afinidad por el carbohidrato. Las hexocinasas (EC 2.7.1.1. ATP: D-hexosa 6 fosfotransferasa) en general pueden fosforilar glucosa y fructosa, pero su afinidad por glucosa es usualmente dos órdenes de magnitud más altos que por fructosa (Menu *et al.* 2001; Dai *et al.* 2002; Kandel-KWr *et al.* 2006). Las fructocinasas (EC 2.7.1.4. ATP:D-fructosa 6-fosfotransferasa; FRK) tienen mayor afinidad por fructosa, y por tanto solo fosforilan fructosa (Renz y Stitt 1993; Kanayama *et al.* 1998; German *et al.* 2004).

La reacción de las hexocinasas o fructocinasas juega un papel importante en remover las hexosas libres del citosol, canalizando los carbonos hacia la glicólisis o la biosíntesis de NADPH, almidón o sacarosa y de componentes de la pared celular. Además, las hexocinasas han sido reconocidas como parte de la vía de transducción de señales para carbohidratos, participa entonces en la modulación de la expresión de proteínas que son reguladas por carbohidratos (Rolland *et al.* 2001; Seixas *et al.* 2001).

Características bioquímicas y estructurales de las hexocinasas

La HK de mamíferos es un homodímero compuesto de monómeros de 920 aminoácidos cada uno. La estructura cristalográfica en diferentes especies de mamíferos se ha obtenido y en ella claramente se observa que cada uno de los monómeros tiene dos dominios (Figura 3A), unidos a través de una larga α hélice que en rata es de 43 aa (aminoácidos 450 a 493 en la HK1 de rata; Mulichak *et al.*, 1998). Cada dominio a su vez está formado de varias alfa hélices y hojas beta. Las alfa hélices se encuentran dispuestas en una estructura hélice-vuelta-hélice, mientras que las 5 hojas beta forman una estructura abierta y que combinan las hélice-vuelta-hélice, dejando una hendidura en el centro. En la Figura 3A, se indica con óvalos los dos lóbulos que se forman por el plegamiento antes descrito de la proteína, un lóbulo mayor y otro menor.

La HK cataliza la transferencia irreversible del grupo γ fosforilo del ATP a la D-glucosa y también puede usar como sustratos también a la D-manosa y a la D-fructosa. El sustrato real de la enzima es el complejo ATP-Mg, de hecho el ATP sólo es un fuerte inhibidor de la enzima. La HK es capaz de unir los dos ligandos, la glucosa y la glucosa 6-fosfato (G6P). La glucosa se une al sitio activo para formar G6P, por su parte la G6P es capaz de unirse a otro sitio, el dominio que se encuentra cerca de la región N-terminal de la proteína y que se le ha denominado regulatorio, aunque no todas las enzimas lo presentan (Figura 3A).

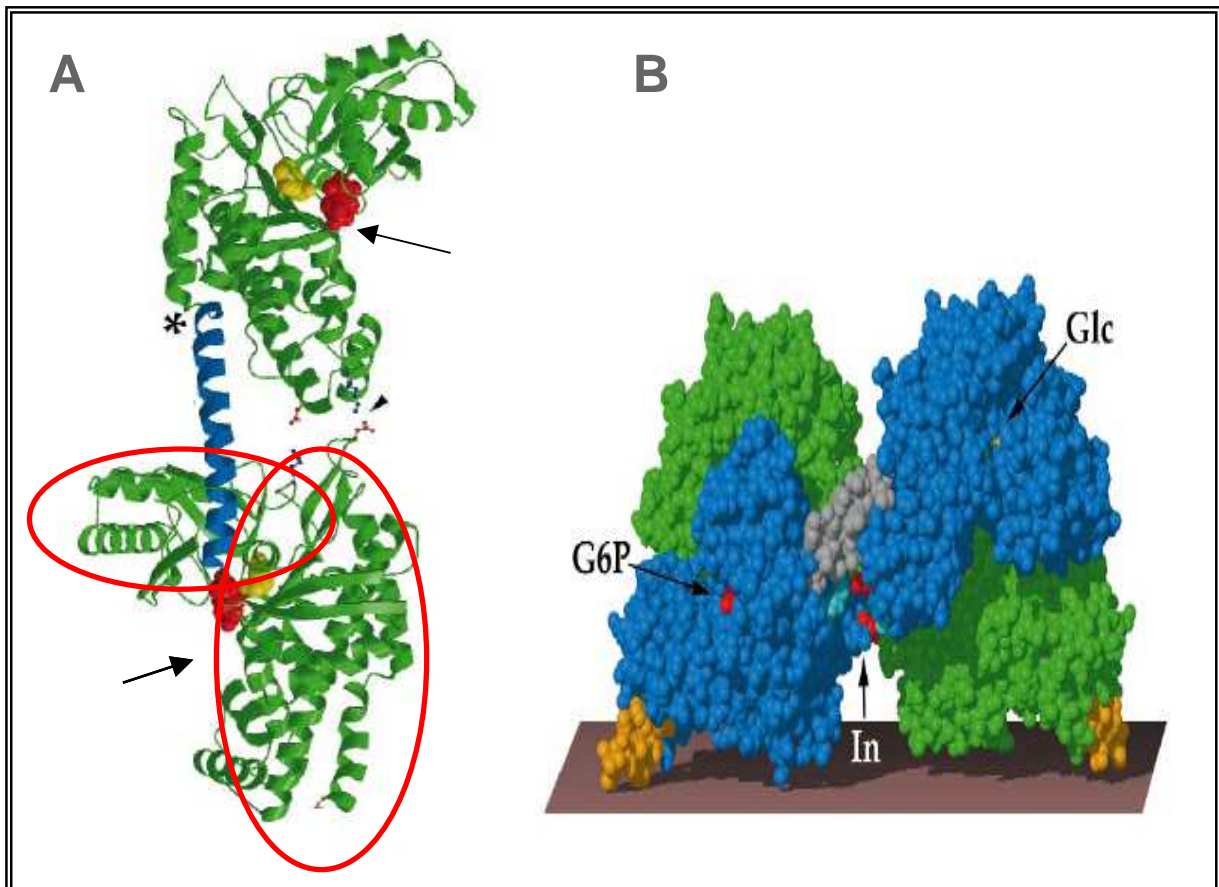


Figura 3. Modelo de la estructura de la hexocinasa de rata. A. Modelo de listones de un monómero de la HK1 de rata, en donde se observa en azul la hélice que conecta ambos dominios de la enzima, en rojo la molécula de glucosa-6P y en amarillo a la glucosa. Se puede notar que el carbohidrato se encuentra en la hendidura que forman los dos lóbulos de la enzima (encerrados en rojo), la hendidura se indica con la flecha. En B, se muestra un modelo de un dímero de HK en donde en azul se encuentra uno de los monómeros, y en verde el segundo. La flecha indica la Interfase de las dos hélices hidrofílicas que se mostraron en azul en el modelo en A. Tomado de Mulichak *et al.*, 1998.

La comparación de las estructuras cristalográficas de la hexocinasa en presencia y ausencia de glucosa indica que la glucosa induce un gran cambio conformacional en la enzima. Los dos lóbulos que forman la hendidura del sitio activo se balancean por más de 8Å y entonces la glucosa se introduce en la parte media de la estructura, es decir se encuentra encerrada en la enzima (ajuste conformacional). Este movimiento aproxima al ATP -que previamente se había unido a uno de los lóbulos- con el OH de la posición del carbono 6 de la glucosa, y propicia la exclusión de agua del sitio activo (se denomina catálisis por efecto de proximidad). Lo anterior se confirmó cuando en lugar de glucosa se usó xilosa, este último carbohidrato carece del OH en la posición 6 y al colocarlo en un medio de reacción que contiene hexocinasa y ATP, la enzima transfiere el fosfato del ATP al agua, ya que el agua ocupa el lugar que la xilosa no puede llenar (Voet y Voet, 1995).

Las hexocinasas se presentan en diferentes isoformas, con capacidad catalítica y propiedades regulatorias distintas, así como de localización subcelular y expresión tejido específico tanto en mamíferos como en plantas. La expresión diferencial de las isoformas de hexocinasas es la que se sugiere puede estar llevando a la regulación de la homeostasis de glucosa en estos organismos (Wilson, 2003). En tejidos de mamíferos hay cuatro isoenzimas nombradas como I, II, III y IV. Las isoenzimas I a III tienen una alta afinidad por glucosa con K_m en el intervalo de 0.003 a 0.3mM, las tres son monómeros de 100 KDa, la proteína presenta un sitio catalítico y uno regulador, en el que G6P se une, la K_i determinada es de 0.02 mM para las isoenzimas I y II, mientras que de 0.1mM para la tipo III. La isoenzima tipo IV llamada también glucocinasa es un monómero de 52 KDa que presenta una baja afinidad por la glucosa ($K_m = 12 \text{ mM}$) y no es regulada por la glucosa 6-fosfato, pero concentraciones altas de ADP inhiben a la enzima de manera no competitiva (Wilson, 2003).

En contraste a las enzimas de mamíferos, la HK de levadura es un dímero de dos cadenas de polipéptidos que tienen la misma masa molecular de 50 KDa y no es

inhibida por glucosa 6-fosfato o ADP (Wilson, 2003). Por otra parte, en germen de trigo se han identificado 4 isoenzimas de HK, dos con una masa molecular de 52 KDa y dos con 100 KDa (Galina *et al.*, 1995). Sin embargo, el peso molecular de la enzima en plantas varía grandemente dependiendo de las especies de plantas y aún, dentro de la misma; p.ej. en maíz el peso molecular varía de 39 a 59 KDa, mientras que en papa se han reportado valores de 66, 102, 105 y 118 KDa, la variabilidad en los reportes puede corresponder a protéolisis parcial de la proteína (cuando el peso molecular es menor a 54 kDa), a corrimiento anómalo en el gel o bien a la formación de dímeros de proteína, ya que el peso molecular de muchas de éstas formas de acuerdo a los datos de la secuencia del gen, apuntan a un peso molecular de alrededor de 54 kDa (Tiessen *et al.*, 2003). Del análisis de la composición de aminoácidos y masa molecular, se ha propuesto que la forma con alta afinidad para la glucosa en tejidos de mamíferos, pudo haber surgido de una forma ancestral semejante a la hexocinasa de levadura y de germen de trigo, es decir surgió de un proceso de duplicación de genes y su fusión (Wilson, 2003).

En plantas como se mencionó anteriormente también se han encontrado numerosas formas de la enzima, pero en contraste con las de mamíferos no se han obtenido los genes para todas ellas, pero se pueden distinguir en base a su localización subcelular, sus propiedades cromatográficas o cinéticas y su pl.

Las HK prefieren usar glucosa como sustrato, la K_m se encuentra en el intervalo de 0.02 a 0.13 mM, mientras que la K_m para fructosa es al menos 2 ordenes de magnitud mayor, K_m 1.5 a 30 mM (Claeyssen y Rivoal, 2007). Considerando que los valores de glucosa en las células de las hojas se encuentran en el intervalo entre 100 a 400 μ M, mientras que las concentraciones de fructosa generalmente se encuentran 3 órdenes de magnitud por abajo o en niveles exigüos, la hexocinasa estaría funcionando casi exclusivamente con la glucosa en las hojas. La enzima presenta una K_m de 0.5 a 0.59 mM para ATP, sin embargo también podría usar GTP, CTP y UTP. Algunas isoformas presentan inhibición al ADP (K_i de 0.3 a 1mM; Claeyssen y Rivoal, 2007), por ejemplo en maíz la isoforma unida a

la mitocondria se inhibe por ADP, mientras que la citosólica no es sensible a la adición del ADP (Tabla 2; Galina *et al.*, 1995). Glucosamina inhibe a ambas enzimas citosólicas o no citosólicas, pero a diferente concentración, la K_i es de 0.8mM para inhibir a la mitocondrial y 10 veces mayor para la citosólica. Es probable que la hexocinasa mitocondrial sea más sensible a los cambios en las concentraciones de glucosa y nucleótidos debido a su localización.

Adicionalmente, en contraste con las isoformas de mamíferos la HK de plantas presenta una pobre sensibilidad al G6P (Tabla 2). En células de plantas en desarrollo la G6P es necesaria para la síntesis de los polisacáridos de la pared celular (Higgins y Esterby, 1976). En este caso la respiración mitocondrial y la HxK unida a la membrana se sugiere favorecen la acumulación de la G6P para sintetizar polímeros de carbohidratos.

Varios análogos de carbohidratos han sido utilizados como sustratos de la enzima, como la 2-deoxi D-glucosa, la D-glucosamina y la manosa, sin embargo cuando se incuban por unos minutos, ya sean células tumorales o pedazos de escutelo de maíz, en ellos se producen decrementos en algunos metabolitos, como el ATP, fosfato, G6P y fosfoenolpiruvato (Hernández y De la Fuente, 1989; Garrard y Humpreys, 1969). La 2-deoxiglucosa-6P en general disminuye el crecimiento de las plantas, y se presume que ocurre a que el carbohidrato es convertido a UDP2-deoxiglucosa y esto modifica la síntesis de polisacáridos. Además, los análogos fosforilados son capaces de inhibir a la fosfoglucosa isomerasa, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la mio-inositol sintasa y la fosfoglucosa mutasa (Hernández y De la Fuente, 1989; Graham *et al.*, 1994).

La glucosamina inhibe a la enzima de plantas de manera moderada y la trehalosa no produce cambios en la actividad de la enzima, opuesto a lo que ocurre en levadura que si es altamente sensible a la presencia de la trehalosa (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes moléculas sobre la actividad de la hexocinasa de plantas. Tomado de Claeysen y Rivoal, 2007.

Molécula efectora	Especies, tejidos, isoformas de HK	K _i o % inhibición con D-Glucosa como sustrato
ADP^a		
	<i>T. aestivum</i> , HK de germen de trigo	K _i = 1 mM
	<i>P. sativum</i> , semilla, HK I y II	50% a ~1 mM
	<i>Z. mays</i> , semilla, HK1 y HK2	45% a 1 mM
	<i>Z. mays</i> , raíz, HK no-citosólica	K _i = 0.03 mM
	HK citosólica	Sin efecto
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk1 a LeHxk4 recombinante	~50% a 5 mM
	<i>S. tuberosum</i> , tubérculo, HK1	K _i = 0.04 mM
	HK2	K _i = 0.11 mM
	<i>S. chacoense</i> , SchK 2 recombinante	60% a 0.1 mM
G6P		
	<i>P. sativum</i> , semilla, HK I	Sin efecto
	<i>Z. mays</i> , semilla, HK1 y HK2	Inhibición débil
	<i>Z. mays</i> , raíz, HK no-citosólica	Sin efecto
	HK citosólica	Sin efecto
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk2 recombinante	20% a 5 mM (pH 7)
	<i>S. tuberosum</i> , tubérculo, HK1	K _i = 4 mM a pH 7
	HK2	Sin efecto
	<i>S. chacoense</i> , SchK2 recombinante	Sin efecto (pH 7, pH 8)
Glucosalina o N-acetilglucosamina		
	<i>Z. mays</i> , raíz, HK no-citosólica	K _i = 0.8 mM
	HK citosólico	K _i = 80 mM
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk2 recombinante	20% a 50 mM
	LeHxk3 y LeHxk4	20% a 15 mM
	<i>S. chacoense</i> , SchK2 recombinante	50% a 5 mM
	<i>S. oleracea</i> , hoja, SoHxK1	K _i = 50 mM
Manoheptulosa^a		
	<i>Z. mays</i> , raíz, HK no-citosólica	K _i = 0.5 mM
	HK citosólica	K _i = 20 mM
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk2 recombinante	20% a 50 mM
D-Trehalosa-6-fosfato		
	<i>S. lycopersicum</i> , LeHxk1 a LeHxk4 recombinante	Sin efecto
	<i>S. chacoense</i> , SchK2 recombinante	Sin efecto
	<i>S. oleracea</i> , hoja, SoHxK1	Sin efecto

^a Glucosamina, N-acetilglucosamina y manoheptulosa se han usado para demostrar la implicación de la HK de *Arabidopsis* HK en la vía de percepción de carbohidratos. Nota: no-citosólica HK es la que se encuentra asociada con la mitocondrial, el aparato de Golgi o a la fracción microsomal.

Características bioquímicas de las fructocinasas

Las FRK en plantas catalizan la fosforilación de la fructosa en la posición 6, mientras que en mamíferos lo hace en la posición 1. El pH óptimo para la enzima es de 8.0, y la Km para fructosa se encuentra en el intervalo de 41 a 220 μ M. En semillas de maíz se han encontrado 2 fructocinasas FRK1 y FRK2 y presentan una Km para fructosa de 148 y 121 μ M respectivamente (Doehler, 1990). Las fructocinasas prefieren usar ATP más que otros nucleótidos y Mg²⁺ es necesario para la actividad y se ha encontrado que la presencia de K⁺ estimula la actividad de la enzima (Pego-Smeekens, 2000).

Se ha encontrado que en papa, tomate, chícharo y maíz, la enzima puede inhibirse por fructosa a pH 8.0, con un Ki de 1-6 mM. Aunque hay reportes contradictorios, en el sentido de que para un mismo tejido se reportan dos diferentes Ki aún al mismo pH. En el fruto de jitomate la Ki para fructosa es de 2mM, considerando que la concentración de fructosa en ese tejido es de aproximadamente 40mM, la enzima estaría esencialmente inhibida (Pego y Smeekens, 2000).

Del análisis de las secuencias entre las hexocinasas, glucocinasas y fructocinasas de varios organismos como mamíferos, bacterias y plantas, se encontró que las hexocinasas y glucocinasas pertenecen a la misma familia de enzimas, pero las fructocinasas se encuentran aparte, lo que sugiere que hubo una evolución convergente en función entre las hexocinasas y las fructocinasas, ya que no presentan un plegamiento similar (Dai *et al.*, 2002).

El peso molecular de las fructocinasas de plantas ha sido determinado en varios estudios, en tomate en desarrollo, tubérculos de papa y la cubierta de la raíz de betabel se encuentra en el intervalo de 35 a 37 kDa, valor que concuerda con el que se predice de la secuencia de aminoácidos para estas especies. Mientras que, por la técnica de filtración en gel se determino que en tomate, papa, cebada, soya, aguacate y betabel el peso molecular de la enzima es de 70-105 kDa, lo que

sugiere que la enzima *in vivo* es un dímero. También, se han encontrado valores intermedios entre 44 a 59 kDa y que podrían ser causa de una mezcla de los monómeros y dímeros en la preparación (Pego y Smeekens, 2000).

Distribución subcelular de las hexocinasa y fructocinasas.

La hexocinasa se encuentra ampliamente distribuida en las células, así se encuentran en citoplasma y en diferentes organelos (Figura 4). Aún cuando las implicaciones de su diferente localización subcelular no han sido estudiadas, se ha sugerido que esto podría ser una mecanismo por el cuál la célula comunica su estado energético celular y entonces podría mediar el flujo metabólico en ese compartimento particular, pero también podría controlar la respuesta de inducción o represión de ciertos genes que están involucrados en el metabolismo de carbono (Figura 4).

Claeyssen y Rivoal (2007), proponen una clasificación de las hexocinasas, con base en el análisis y alineamiento de las secuencias de aminoácidos que se predicen de los genes que fueron clonados en *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestris*, *Physcomitrella patens*, *Solanum chacoense*, *Spinacia olearacea* y *Solanum tuberosum*. Dos tipos de HxK se proponen, las tipo A son aquellas que presentan dentro de su secuencia una señal de tránsito al cloroplasto; mientras que las tipo B son las que presentan un dominio que se predice es de anclaje a membranas.

Es interesante que aquellas del tipo B se han encontrado tanto en la membrana plasmática (ScHK2; Claeyssen *et al.*, 2006), en las mitocondrias (LeHK2, LeHK3; Damari-Weissler *et al.*, 2006; AtHXK1 y AtHXK2; Rolland y Sheen *et al.*, 2006), en dos diferentes compartimentos como cloroplasto y mitocondria e incluso en el Golgi (SoHxK1; Wiese *et al.*, 1999). Para esta última se ha propuesto que podría contener una doble secuencia de localización en organelos una que se predice del análisis de la secuencia y otra que por encontrarse en la parte madura de la secuencia no se ha detectado. Algunas de las HxK incluso se han encontrado en

el núcleo y se cree que lo que ha ocurrido es que la HxK se puede unir fuertemente a la actina y así es capaz de movilizar a la enzima a los diferentes compartimentos, incluso al núcleo (Rolland *et al*, 2006).

Algo notorio de la clasificación de Claeysen y Rivoal 2007, es que todas las hexocinasas en estas especies de plantas, contienen una señal de localización en la membranas, aún cuando en diferentes estudios la actividad de la enzima se puede localizar en el citoplasma. La presencia en el citoplasma se ha explicado por una contaminación con organelos, de su liberación por proteólisis de su región amino terminal durante la extracción, de su movilización entre membranas por el citoesqueleto entre otros (Claeysen y Rivoal, 2007).

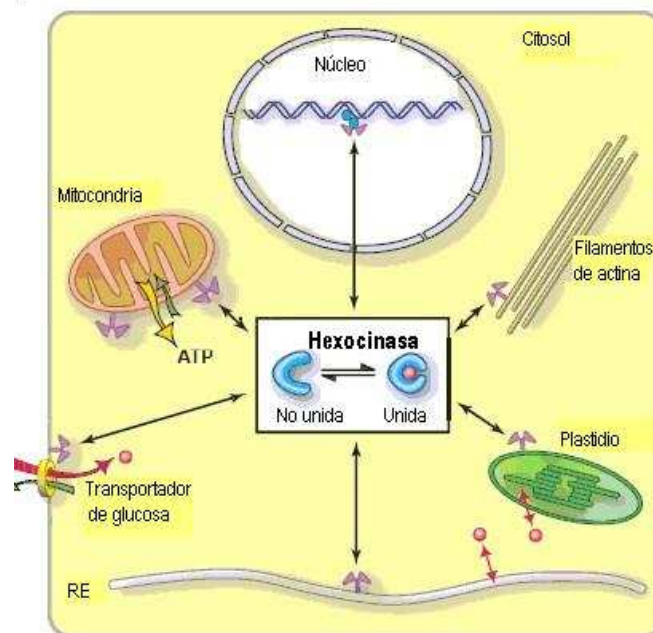


Figura 4. Localización subcelular de la hexocinasa. Tomado de Frommer *et al.*, 2003.

Se ha detectado actividad de la HxK de raíces de maíz, distribuida entre dos fracciones subcelulares: la citosólica y la membranal. Una porción substancial (aproximadamente 30%) de la actividad no citosólica se encontró en el aparato de Golgi y otras fracciones no citosólicas como las mitocondrias (Galina y da-Silva, 2000). En raíces de maíz la hexocinasa no citosólica está acoplada a la formación

de UDP-glucosa (Galina y da-Silva, 2000). De manera similar a lo que en tejidos de mamíferos se ha demostrado, que la glucocinasa de Golgi facilita la biosíntesis de UDP-glucosa (Berthillier y Got, 1974; Iijima y Awazi, 1972). Se ha sugerido que la hexocinasa no citosólica esté involucrada en las reacciones de glicosilación en el aparato de Golgi, en el que el ADP jugaría un papel crítico modulando la actividad en Golgi. La fracción no citosólica también presentó HxK asociada a la mitocondria, y la detección de la hexocinasa en Golgi y mitocondria podría indicar una interacción entre ambos organelos (Morré, 1964). El papel fisiológico de la hexocinasa unida a mitocondria en tejidos de plantas y animales es todavía controversial. En mamíferos se ha encontrado que la HxK interacciona con una proteína mitocondrial, llamada canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC del inglés "voltaje- dependent anion channel"). En rata, la hexocinasa se disocia de la VDAC de manera reversible dependiendo de las concentraciones de G6P. Los primeros 10 aminoácidos de la enzima son los que se asocian a la porina, y su remoción con una digestión suave con quimiotripsina ya no permite a la enzima asociarse a la porina (Kurokawa *et al*, 1983).

En jitomate se han encontrado 4 genes que codifican para las HXK y 4 para las FRK, de las cuatro HXK, LeHxk1, 2 y 3 se predice que se asocian a la mitocondria y LeHxk4 en el plastidio (Claeyssen y Rivoal, 2007); mientras que tres de las fructocinasas, LeFrk1, 2 y 4 son de localización citosólica y la LeFRK3 es de localización plastidial, analizado tanto como por la presencia de una pre-secuencia de localización del plastidio, como por ensayo de localización de las enzimas unidas a la proteína verde fluorescente (GFP; Damari-Weissler *et al.*, 2006).

La importancia de la movilización de las enzimas fosforilantes probablemente radica en la regulación que estas enzimas pueden realizar en el metabolismo de glucosa, por ejemplo la coordinación de la fotosíntesis y la actividad de almacenamiento, fijación de CO₂, tasa de producción de fosfoglicerato, síntesis de sacarosa y almidón, todo ello en el cloroplasto.

La hexocinasa en la vía de traducción de señales de carbohidratos

En plantas, se ha demostrado que las hexosas intracelulares, no sólo pueden entrar al metabolismo glucolítico sino que su fosforilación mediada por hexocinasas esta ligada a un amplio espectro de represión genética, un fenómeno ahora reconocido como percepción de azúcares (Rolland *et al.*, 2006).

Usando un sistema de células sencillo y promotores reprimibles por azúcares de genes involucrados en la fotosíntesis, se han propuesto tres rutas que pueden percibir a los carbohidratos (Jang y Sheen, 1994). Una de éstas rutas involucra a las hexocinasas, así la fosforilación de las hexosas es un paso crítico para la señalización, porque sólo las hexosas y los análogos de glucosa que pueden ser fosforilados por la hexocinasa son efectivos (Jang *et al.*, 1997).

En levadura el mecanismo está bastante bien conocido, en él la HXK actúa como una molécula sensora que puede inicial la señal hacia una cascada de componentes río abajo. En plantas está muy poco entendido y en un admirable intento de encontrar la función sensora de manera separada de la función catalítica de la enzima, Moore y colaboradores (2003) usaron unas mutantes de *Arabidopsis thaliana* denominadas gin2, las cuales carecen de la HxK y presentan un fenotipo característico, disminución en la expansión celular y reducción a la sensibilidad a glucosa o a luz. Al introducirle a la planta mutante una hexocinasa incapaz de llevar a cabo la fosforilación de hexosas, la planta recupera su habilidad para crecer a una tasa comparable a una planta silvestre. Con lo anterior, se plantea que el movimiento conformacional de la enzima podría ayudar a acoplar alguna proteína que le permita continuar con la cascada de señales iniciada por glucosa y así cambiar la expresión de genes y el crecimiento de la planta. Además la presencia de la enzima en diferentes organelos, sugiere que la enzima tiene la capacidad de unirse a diferentes proteínas y así regular las respuestas celulares asociado a los cambios en la disponibilidad de glucosa en las diferentes fases del desarrollo de la planta.

Justificación

Durante la germinación se producen diferencias en la concentración de carbohidratos en diferentes tejidos y a lo largo del tiempo, los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y las enzimas del metabolismo, la hexocinasa podría estar jugando un papel muy importante en modular la expresión de los genes que responden a carbohidratos en este estadio del desarrollo. En el maíz se ha detectado que al menos el 30% de la actividad de HXK se encuentra en la fracción no unida a la membrana y que presenta características de no ser regulada por ADP o G6P, por lo que su papel se ha simplemente circunscrito al catalítico y no al regulador, capacidad que si se le ha dado a la HXK mitocondrial.

En este trabajo exploramos la posibilidad de que la HXK citosólica sea una enzima regulada, analizando el efecto que la imbibición del tejido embrionario de maíz en diferentes tipos y concentraciones de carbohidratos, produce en la expresión de la actividad de la enzima durante la germinación.

Objetivo general

Determinar si la actividad de las hexocinasas de tejido embrionario de maíz se modula por carbohidratos e identificar cual o cuales son las formas de enzima que cambian su actividad.

Objetivos particulares

1. Obtención del perfil de la actividad de la hexocinasa a lo largo de la germinación.
2. Determinación del efecto de la imbibición del tejido embrionario de maíz en diferentes carbohidratos en la actividad de la hexocinasa citosólica.
3. Determinar el tipo de enzima fosforilante que cambia al embeber el tejido embrionario en diferentes carbohidratos.

Materiales y métodos

Material biológico. Se extrajo por disección manual ejes y embriones de semillas de maíz Chalqueño (*Zea mays*). El tejido se germinó en Agar al 1% sólo o en presencia de diferentes tipos y concentraciones de carbohidratos como glucosa, sacarosa, fructosa, sorbitol a concentraciones de 5, 10, 15 y 50 mM. Cuando se embebieron los ejes y embriones de maíz en diferentes carbohidratos la incubación fue a 29°C por 24 horas. Para obtener la actividad de hexocinasa durante la germinación del tejido estos se embebieron los tejidos embrionarios del maíz desde 8 hasta 60 h 29°C. Pasado el tiempo de incubación el tejido se congeló a -80°C hasta su uso.

Obtención del extracto enzimático. El tejido se molió con N₂ líquido con mortero y pistilo hasta que se obtuvo un polvo fino. A partir de aquí todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. A 0.4 g del polvo se le adicionó el amortiguador Hepes/KOH 50mM pH 7.5, Sacarosa 0.3M, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos en el rotor S/N 9450691 (DUPONT). El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min en el rotor CAT 837, por último se centrifugó a 45,000 rpm 1h en el rotor TLA 100.4 (Beckman). En el sobrenadante se determinó la actividad de la HK soluble.

Determinación de proteínas. Se siguió el protocolo reportado por Ghosh *et al.* 1988, utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Protocolo de medición de la actividad de la Hexocinasa. El procedimiento que se siguió es el reportado por Dai *et al.*, 1999 y adaptado por Hernández-López, 2007. El ensayo de fosforilación de las hexosas es un ensayo acoplado donde se registra la formación de NADPH según la siguiente reacción:

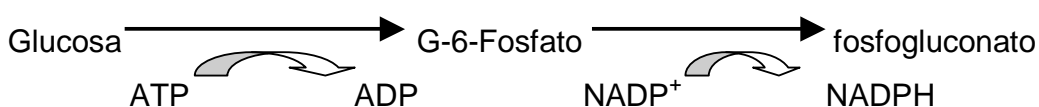


Tabla 3. Soluciones que contiene el medio de reacción para determinar la actividad de hexocinasa. Tomado de Hernández-López, 2007

Reactivo	Solución madre	Volumen agregado (ul)	Concentración final
Hepes (N-2hidroxipiperazina)/KOH pH 7.0	500 mM	15.0	30 mM
MgCl ₂	2.46 M	0.203	2.0 mM
EDTA	476 mM	0.32	0.6 mM
KCl	200 mM	11.25	9.0 mM
ATP	300 mM	0.83	1.0 mM
G6P deshidrogenasa	700U/ml	2.85	2.0 U/mL
PEP	33.3 mM	15.0	2.0 mM
Glucosa o Fructosa*	50 mM	15.0*	3.0 mM
NADP ⁺	10 mM	25.0	1.0 mM
Fofoenolpiruvato cinasa	11.7 U/mL	0.85	10.0 U/mL
Fosfoglucosa isomerasa*	2.5 U/ul	0.17*	3.5 U/mL
Volumen sin NADP ⁺		86.47	

*Solo cuando se determinó la actividad de la enzima como fructocinasa, entonces se añadió fructosa y fosfoglucosa isomerasa y se omitió la adición de glucosa.

Para realizar la determinación se mezclaron las soluciones que se indican en la Tabla 3, a la mezcla la llamamos mezcla de reacción. Generalmente se preparaban 90 veces el volumen indicado en la tabla, para realizar las determinaciones de cada muestra al menos por triplicado. El orden en que se añadieron los reactivos en la microplaca para medir la actividad de hexocinasa fue el siguiente:

Agua	Mezcla de reacción	Proteína	10mM NADP ⁺
	(86.47µg)	(40µg)	(25 µl)
Para un volumen final de 250µl			

Una vez adicionado el NADP⁺ se registró la absorbancia a 340 nm, cada minuto durante 10 min en un lector de ELISA Marca Labsystems Multiscan MCC/ 340. La reacción se condujo a 37°C. Se realizó una curva de absorbancia contra tiempo y de ella se obtuvo la pendiente (absorbancia/min) que se usó en la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = \frac{m \times \text{Volumen usado del extracto } (\mu\text{L})}{6.22 \times 10^3 \text{ (Concentración de proteína en } \mu\text{g)}} \times 1000$$

Donde m es la pendiente en unidades absorbencia min^{-1} ; el coeficiente de absorción molar del NADPH $6.22 \times 10^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$; usualmente se utilizaron 40 μg de proteína.

Determinación de la actividad de hexocinasas en geles de poliacrilamida nativos. Con la finalidad de encontrar cuál es la isoenzima que se induce por glucosa, se separaron las proteínas de los extractos citosólicos de tejido embrionario de maíz en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Los componentes del gel se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Soluciones y cantidades utilizadas para hacer un gel de poliacrilamida no desnaturizante.

Soluciones madre	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8	1.65 ml	0.265 ml
Trizma base (pH 8.8) tris-HCl	1.25 ml	0.5 ml
Glicerol	1.0 ml	0.2 ml
H ₂ O	1.1 ml	1.035 ml
Temed	5 μl	2 μl
Persulfato de amonio 10%	50 μl	20 μl

Se mezclaron 1:1, 100 μg de proteína citosólica con la solución de muestra (60mM Tris-HCl pH 8.8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.4%), se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida no desnaturizante y una vez que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel, éste se desprendió cuidadosamente de los vidrios y se colocó en una charola que contenía el sustrato ya sea 3mM Glucosa, 3mM Fructosa o bien una mezcla de ambos, en una mezcla de reacción que contuvo 50mM de HEPES/KOH pH 7.0, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, KCl 15mM y ATP 2mM. El gel se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos, pasado el tiempo de incubación se añadió una mezcla de enzimas que contenía 2 U Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, y sólo cuando se utilizaba como sustrato fructosa 3.5 U fosfoglucosa isomerasa y 0.75 mM NADP⁺, se incubó por 10 min a 37°C. Para desarrollar el color, se añadió a la mezcla anterior 0.25mg/1ml de azul

de tetrazolio (NBT del inglés "Nitroblue tetrazolium"), el gel se incubó a 37°C por 1.5h.

Fundamento. El NADPH que se produce durante la reacción de la hexocinasa con la glucosa y la posterior actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, reduce al NBT y este se precipita en formazan (Figura 5).

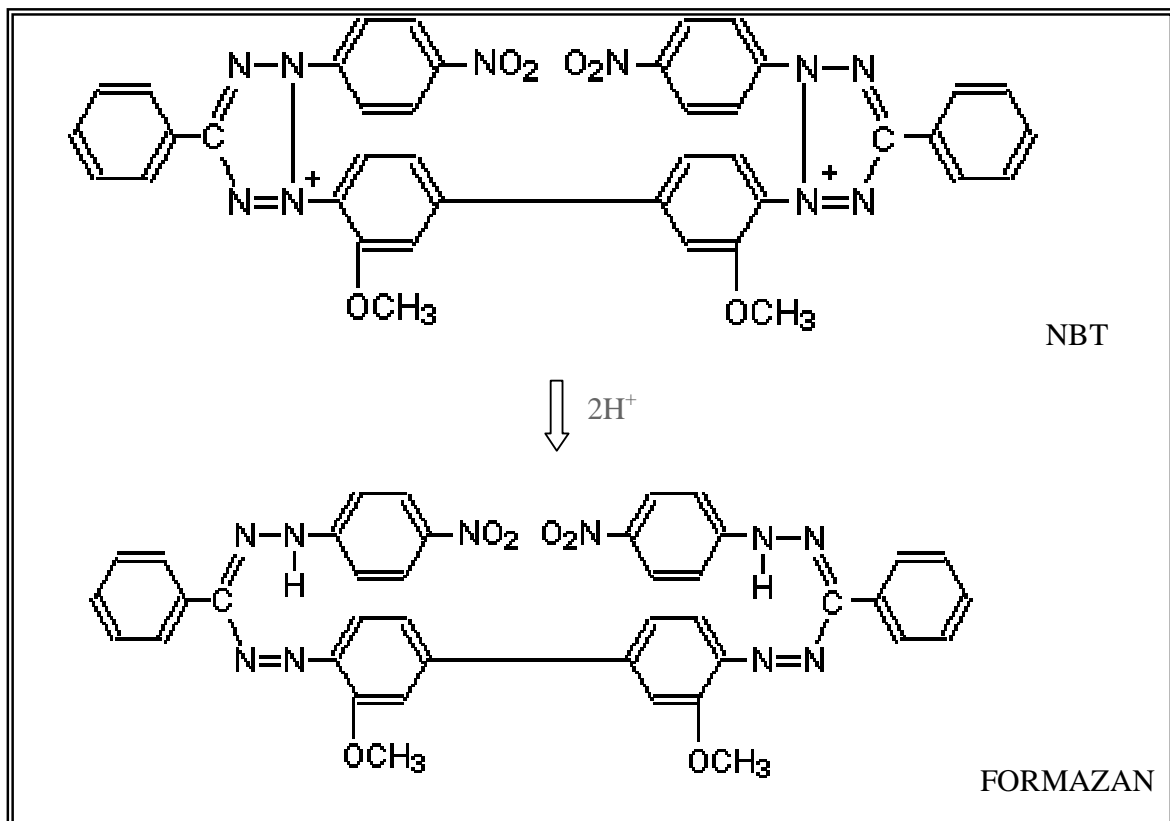


Figura 5. Reacción de reducción del NBT por protones. El precipitado que se forma es la sal de formazan. Tomado de <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/nbt.htm>.

Resultados

Perfil de la hexocinasa en tejido embrionario de maíz a lo largo de la germinación.

Se determinó la actividad de hexocinasas en el tejido embrionario del maíz, usando glucosa como sustrato se muestra en la Figura 6A. Se encontró que al inicio de la germinación la actividad de la hexocinasa es baja tanto en ejes como en embriones. Posterior a las 12h la actividad comienza a incrementarse gradualmente, siendo el aumento de 2 veces a las 24h, de 3.6 veces a las 48h y de 5.6 veces a las 60h.

Al medir la actividad de hexocinasa usando como sustrato fructosa (Figura 6B) se encontró un comportamiento similar a cuando se usó glucosa como sustrato, conforme va transcurriendo el tiempo de germinación la actividad aumenta tanto en ejes como en embriones. A pesar de que la actividad con fructosa parece ser menor a la de la actividad de la enzima con glucosa, no hay diferencias significativas entre una y otra, excepto a las 60 h en donde la actividad de los embriones con fructosa es 3.1 veces mayor a la actividad con glucosa.

Para los ensayos en los cuales se embebieron los ejes y embriones de maíz en carbohidratos, se incubó el tejido por 24h, debido a que es el punto en donde se inicia el incremento en la actividad de la enzima.

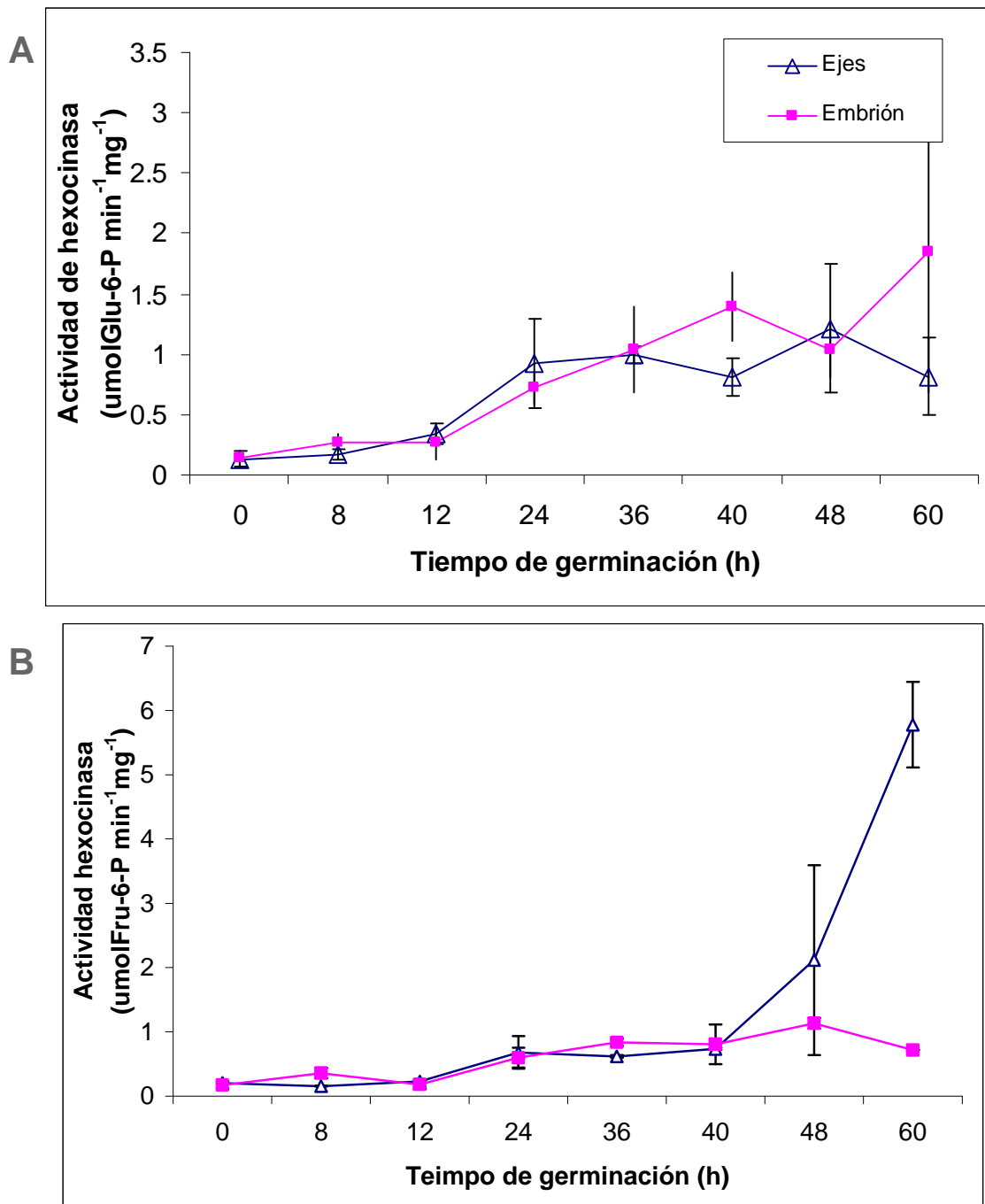


Figura 6. Actividad de las hexocinasas durante la germinación de ejes y embriones de maíz. La determinación de la actividad de las hexocinasas de la fracción citosólica se realizó utilizando dos sustratos **A)** glucosa y **B)** fructosa. El ensayo de actividad es un ensayo acoplado en el que se registró la producción de NADPH durante 10 min, por triplicado en cada muestra y el promedio de la pendiente de cada curva se usó para determinar la actividad enzimática en cada punto de la germinación, en al menos 2 preparaciones enzimáticas distintas.

Efecto de la imbibición en diferentes concentraciones y tipo de carbohidratos en la actividad de la hexocinasa.

Se embebieron ejes embrionarios de maíz durante 24h en diferentes carbohidratos y se determinó la actividad de la hexocinasa citosólica usando glucosa y fructosa como sustratos. La actividad de la hexocinasa medida con glucosa se muestra en la Figura 7A. Se utilizó como control la actividad de la enzima proveniente de los ejes embrionarios que fueron embebidos en sorbitol. La actividad de las hexocinasas en la fracción citosólica se incrementó cuando el tejido se embebió en los diferentes carbohidratos entre 0.3 a 7 veces, en todas las concentraciones probadas, excepto a 50mM de glucosa. Incrementos de al menos 2 veces en la actividad se encontraron a 25 mM sacarosa, 10 y 25 mM glucosa y 5, 10 y 50 mM fructosa.

Al realizar un ensayo similar pero ahora usando como sustrato fructosa, la actividad de la hexocinasa también se encontró que se incrementó en todas las concentraciones probadas entre 1 a 7.8 veces, excepto en 50mM sacarosa y 50mM glucosa. Incremento en la actividad de al menos 2 veces, se encontraron a las concentraciones de 10 y 25mM sacarosa, 25 mM glucosa y 10, 25 y 50 mM fructosa (Figura 7B).

La incubación con carbohidratos indujo un aumento en la actividad de las hexocinasas de los ejes, preferentemente a concentraciones menores de 50mM.

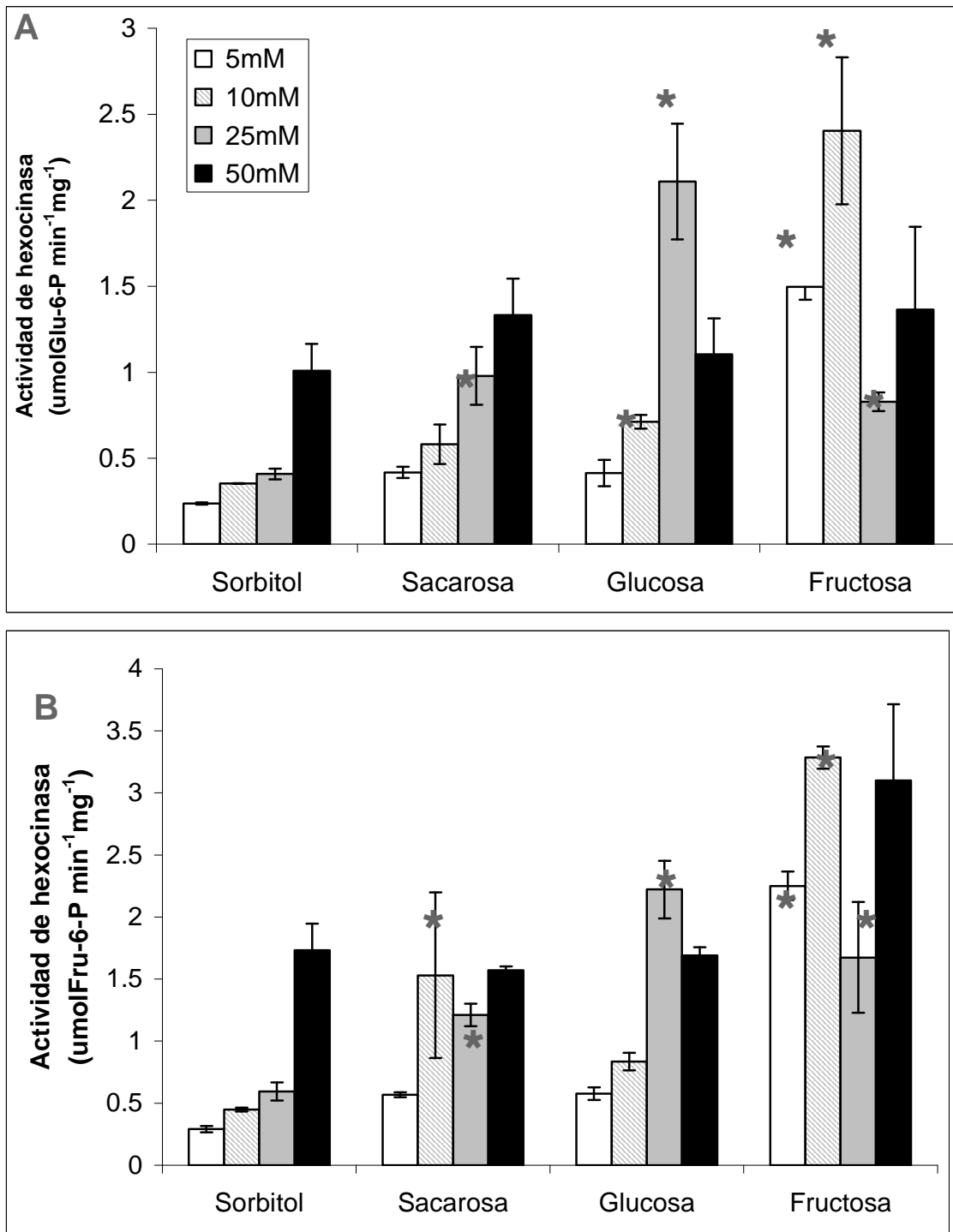


Figura 7. Efecto de la imbibición de **ejes embrionarios** de maíz en diferentes carbohidratos sobre la actividad de las hexocinasas. Usando como sustrato **A)** glucosa y **B)** fructosa. Se señala con una * en donde se encontró una diferencia de 2 veces entre la actividad en el control (tejido embebido en solución osmótica de sorbitol) y la actividad del tejido que fue embebido en los diferentes carbohidratos, se uso como control la actividad del sorbitol.

Se embebieron embriones de maíz en diferentes carbohidratos y se determinó la actividad de la hexocinasa citosólica, usando glucosa y fructosa como sustratos. La actividad de la enzima medida con glucosa se muestra en la Figura 8A. La actividad de la enzima se incrementa en todas las concentraciones de glucosa y fructosa probadas con incrementos de 2.5 a 6.5 veces cuando se embebe el tejido en glucosa y de 5.2 a 7.2 cuando se embebe en fructosa, mientras que no hubo cambio en la actividad al embeber los embriones en sacarosa.

Al realizar un ensayo similar pero ahora usando como sustrato la fructosa, la actividad de la hexocinasa aumenta sólo con las hexosas, a todas las concentraciones probadas, con aumentos de 2.2 a 5.1 cuando se embebe en glucosa y de 4.4 a 6.7 cuando se embebe en fructosa. (Figura 8B). Mientras que la imbibición en sacarosa no tiene un impacto en la actividad de la hexocinasa si lo comparamos con el control que se embebió en sorbitol.

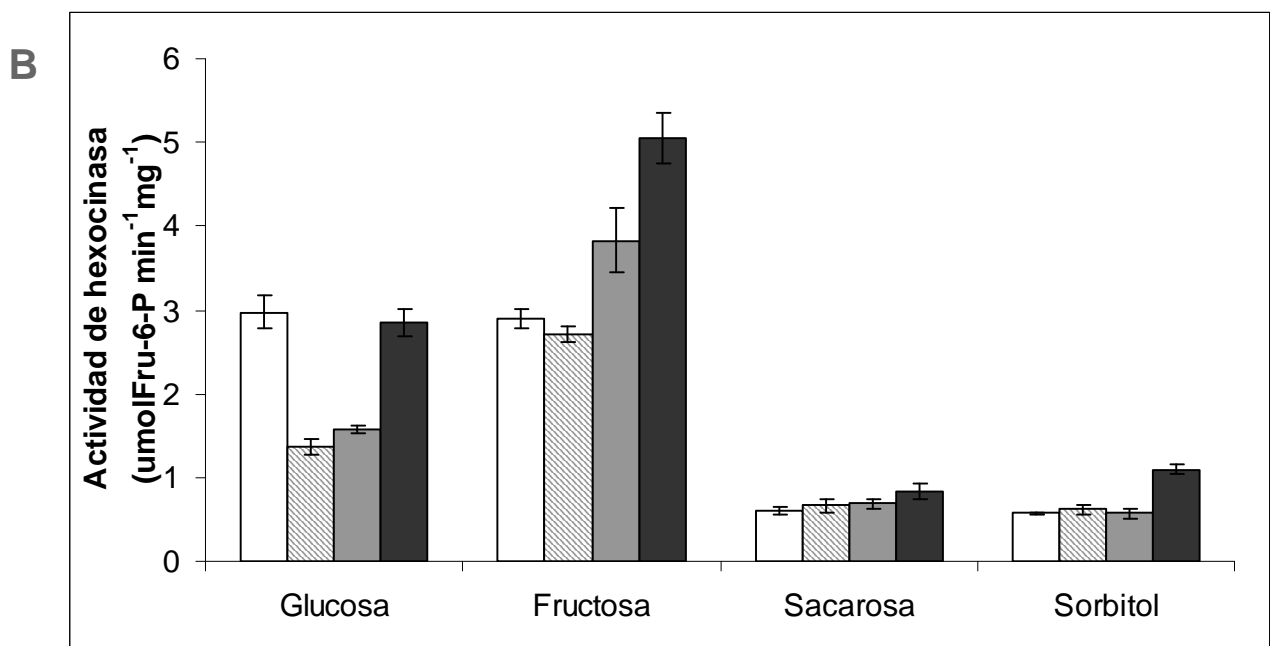
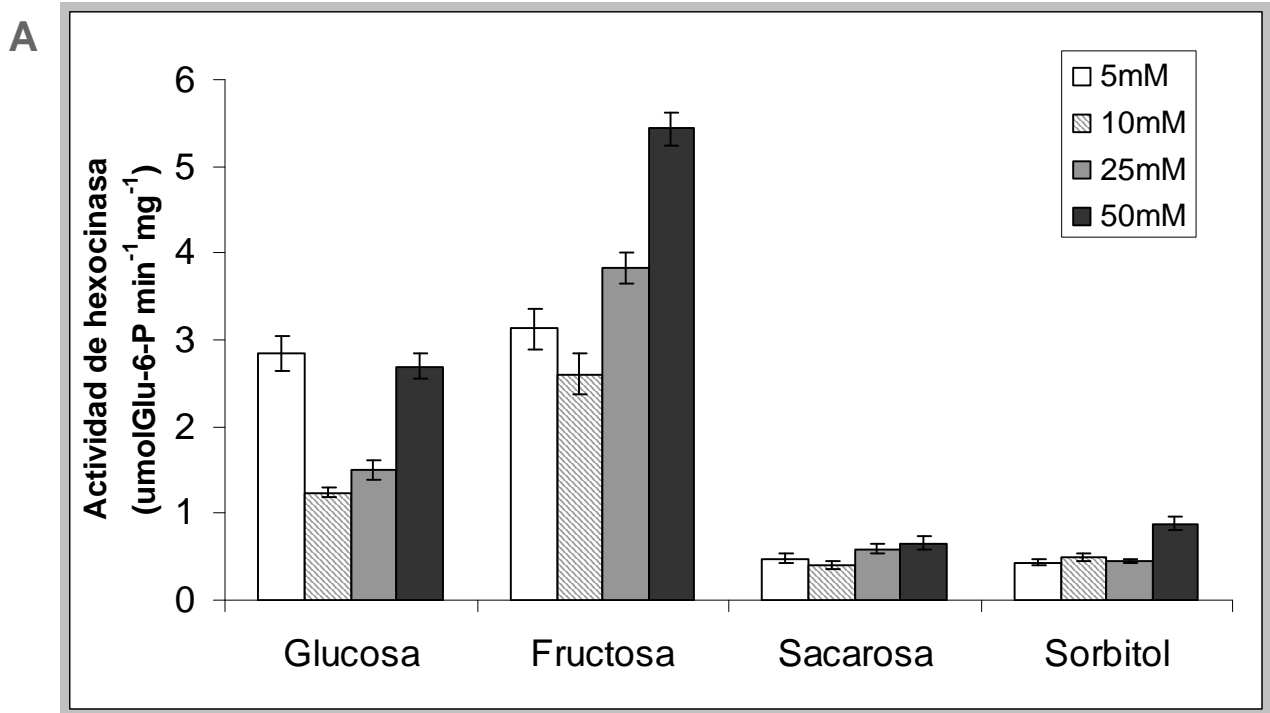


Figura 8. Efecto de la imbibición de **embriones** de maíz en diferentes concentraciones de carbohidratos sobre la actividad de las hexocinasas. Usando como sustrato **A)** glucosa y **B)** fructosa.

Determinación del perfil de las isoenzimas de la hexocinasa que fosforilan las hexosas en el tejido embrionario germinado en diferentes carbohidratos.

En la célula, hay varias enzimas que son capaces de fosforilar hexosas, como las hexocinasas, glucocinasas y fructocinasas, para identificar la o las formas de enzima que presentaban mayor actividad de fosforilación de hexosas cuando se embebe el tejido en carbohidratos, se realizó la separación de las proteínas del extracto citosólico en un gel nativo de poliacrilamida. Intentamos también obtener el perfil de isoenzimas en geles de punto isoeléctrico pero no tuvimos éxito, por lo que sólo se muestran los patrones de isoenzimas en geles nativos. La determinación de actividad de fosforilación de hexosas se realizó en el gel usando glucosa y fructosa como sustratos, solos o en combinación. En la Figura 9 se presenta un resultado representativo de la separación electroforética y detección de la actividad de fosforilación de hexosas de extractos citosólicos de ejes embrionarios de maíz embebidos en diferentes carbohidratos.

Tanto los ejes embrionarios como los embriones se embebieron en dos diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa, 5 mM y 50 mM. Se escogió 5mM debido a que a pesar de ser una concentración baja, esta sí producía un aumento en la actividad de hexocinasa, en los ejes 5 mM glucosa o sacarosa incrementaron la actividad 1.7 veces. Se usó también 50mM de los carbohidratos debido a que no producía cambios en la actividad de las hexocinasas con respecto a lo que se observa con sólo Agar o Sorbitol en los ejes embrionarios.

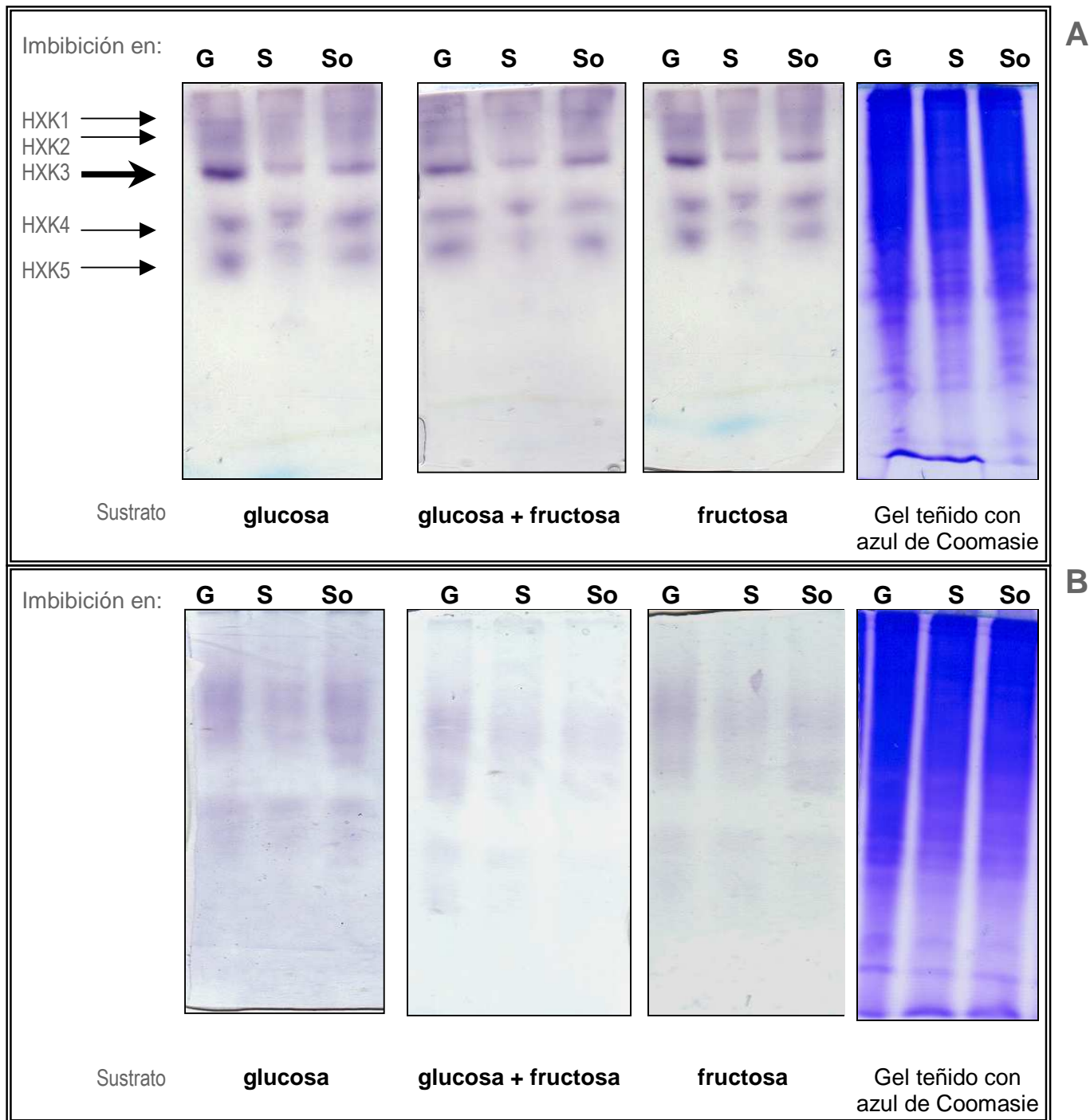


Figura 9. Patrón de enzimas que fosforilan hexosas en los ejes embrionarios. Se embebieron los ejes embrionarios 24 h en 5 (A) o 50 mM (B) de sorbitol (So), sacarosa (S) o glucosa (G), después se congelaron con N₂ líquido y se obtuvo el extracto citosólico, según se detalla en materiales y métodos. Se colocaron 100 µg de proteína de cada uno de los extractos en geles de poliacrilamida no desnaturizante y se determinó la actividad fosforilante en presencia de 3mM de glucosa, fructosa o ambos. Con flechas se indican las bandas de actividad. Un gel se tiñó un gel con azul de Coomasié.

Como se puede observar en la Figura 9, las bandas de actividad obtenidas fueron más claras y definidas en los ejes embrionarios embebidos 5 mM (Figura 9A) que cuando el tejido se embebía en 50 mM de los carbohidratos (Figura 9B). El perfil de isoenzimas al menos en los ejes embrionarios embebidos 5 mM mostró 5 bandas de actividad, 3 de ellas más intensas y definidas (HXK3 a 5) que las otras 2 que fueron difusas (HXK1 y 2). Si comparamos las tres bandas más intensas entre los tejidos obtenidos con glucosa, sacarosa o sorbitol, encontramos a las tres en cualquiera de los sustratos glucosa o fructosa, solos o en la mezcla. Lo anterior nos indica que la enzima es una hexocinasa. La intensidad de las bandas es similar entre los extractos de los tejidos que fueron incubados con glucosa y sorbitol al menos para las bandas de actividad que denominamos HXK4 y HXK5, mientras que HXK3 presentó ligeramente mayor intensidad cuando provenía del tejido que fue embebido en glucosa.

Por otra parte, el extracto que se obtuvo de ejes embrionarios embebidos en sacarosa, produce un idéntico perfil de isoenzimas al de los otros dos extractos, excepto que la intensidad de las bandas reveladas son menores. Esto puede deberse a que se hubiera cargado menos proteína de este extracto, sin embargo no se observa diferencia en la proteína obtenida de los tres extractos, aunque es difícil de apreciar ya que los controles que fueron teñidos con Coomasie fueron hechos con la proteína necesaria para poder observar la actividad, 100µg de proteína (Figura 9A).

No obstante lo anterior, sí encontramos que existen diferentes formas de enzimas que fosforilan glucosa y fructosa y que al menos la banda de HXK3 en el extracto de los ejes embebidos en glucosa es la que aumenta en comparación con el control y explica porque encontramos un aumento en la actividad del extracto total de 1.7 veces (Figura 7).

En el eje embebido 50mM no logramos obtener un patrón definido de bandas y por tanto si hubiera diferencias serían difíciles de explicar e interpretar.

El patrón de isoenzimas que fosforilan hexosas es diferente cuando el tejido es el embrión completo, tanto en su migración en el gel como en número. Cuando se embeben los embriones en 5 mM de los carbohidratos, encontramos dos bandas intensas que si corresponden a las que observamos en los ejes embebidos 5 mM de los carbohidratos. Estas bandas las denominamos HXK3 y HXK4, no encontramos la banda de la HXK5 y en la zona superior del gel se observan 4 bandas delgadas (2 dobletes) y 1 banda ancha difusa y poco intensa, que por su similitud en posición y forma a la encontrada en los ejes embrionarios decidimos denominarla HXK2 (Figura 10A). Las 4 bandas de la parte superior del gel se detectaban preferentemente cuando la actividad se medía con la mezcla de glucosa y fructosa.

El extracto citosólico de embriones de maíz embebidos en glucosa mostró una banda muy intensa y ancha y que se detecta indistintamente usando glucosa y fructosa como sustrato, por lo que asumimos que esta enzima es una hexocinasa y que marcamos como HXK4 en la Figura 10. La intensidad de la banda de HXK4 del extracto proveniente del tejido embebido en glucosa es más intensa que la HXK4 que se encuentra en el tejido que fue embebido en sorbitol (control) o en sacarosa. Lo que explica porque cuando medimos la actividad total fosforilante de hexosas del extracto total, hay una actividad de 2 hasta 6 veces mayor en el extracto obtenido del tejido embebido en glucosa (Figura 8).

La imbibición de los embriones en 50 mM de los carbohidratos también produjo cambios en el perfil de las bandas de actividad detectadas en el gel (Figura 10B). La banda de HXK4 que era intensa a 5mM de los carbohidratos ahora es tenue y las bandas tenues y delgadas que aparecían por arriba de la banda de HXK2 en los extractos a 5mM de carbohidratos, ahora se observan como una banda ancha e intensa. La intensidad de esta banda nuevamente es mayor en presencia de glucosa que con cualquiera de los otros dos carbohidratos y la banda se intensifica cuando el gel se incubaba en la mezcla de glucosa y fructosa.

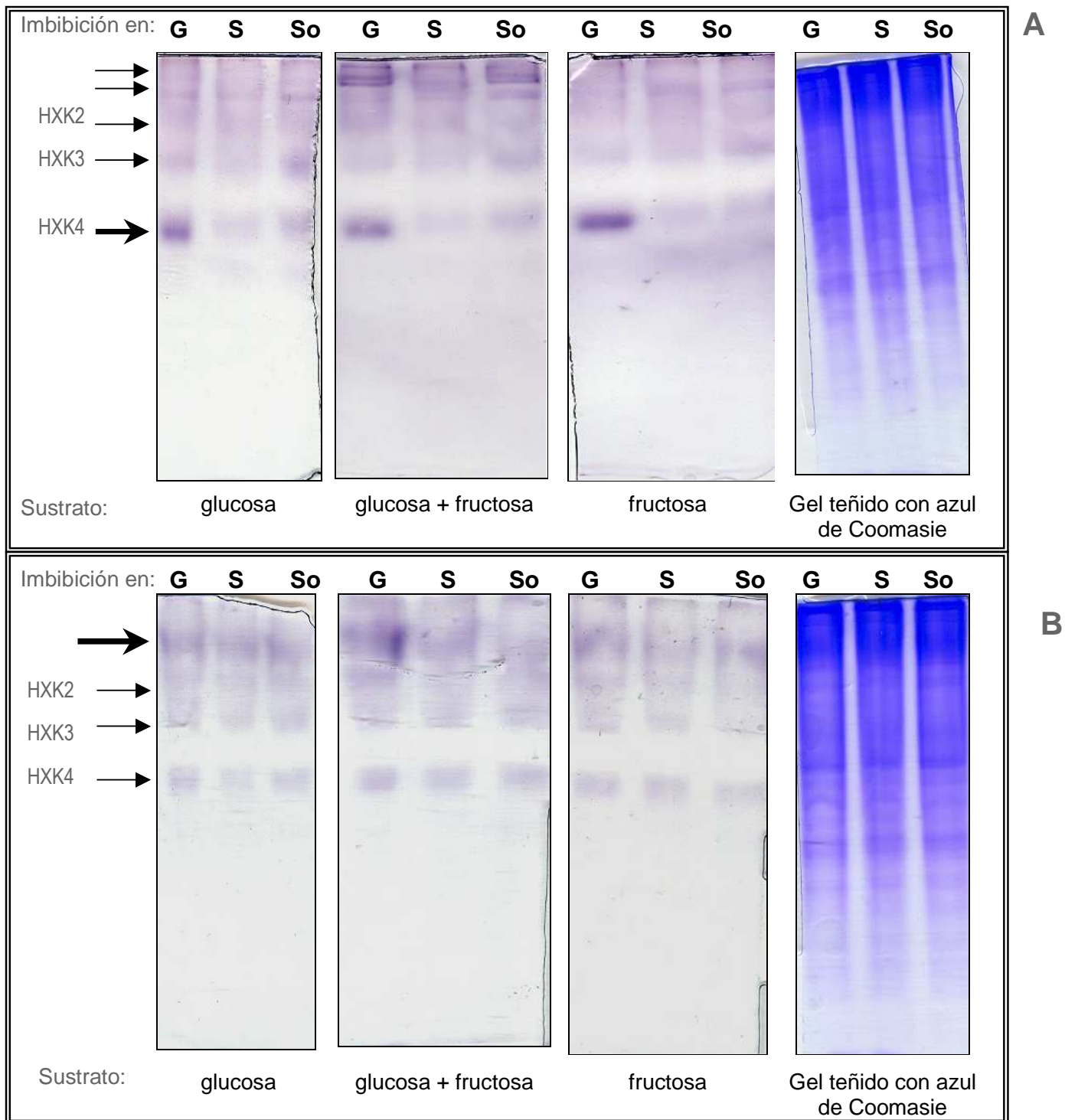


Figura 10. Patrón de enzimas que fosforilan hexosas en los embriones de maíz. La imbibición en glucosa aumenta la actividad de una isoforma de HXK citosólica en embriones de maíz. A. La imbibición del tejido se hizo en 5 (**Panel A**) o 50 mM (**Panel B**)

de sorbitol, sacarosa o glucosa. La actividad en el gel se determinó con glucosa, fructosa o en la mezcla.

Discusión

Función de la hexocinasa durante el proceso de la germinación.

El paso del estado seco al hidratado conduce a una serie de cambios estructurales y funcionales de las moléculas presentes en la semilla. Sin embargo, es un estado transitorio que lleva a reanudar las actividades celulares y el crecimiento, que se habían detenido durante la fase de maduración de la semilla. Dentro de las actividades que se incrementan durante la hidratación se encuentran la respiración y la actividad metabólica que permite la movilización de las reservas de carbono y nitrógeno (Bewley y Black, 1994). En cuanto a la actividad de la hexocinasa, se ha reportado que es alta durante el periodo final de la maduración de la semilla (Tsai *et al.*, 1970), por lo que esperábamos encontrar actividad de la enzima al inicio de la germinación.

Detectamos al tiempo cero a la actividad de hexocinasa con dos sustratos, glucosa y fructosa. La actividad que se encontró fue similar en ejes y embriones, de 0.14 a 0.17 $\mu\text{mol Gluc}^{-1}\text{mg}^{-1}$ al tiempo cero, la cual se duplicó a las 8 h. El incremento más notorio en la actividad ocurrió al tiempo de emergencia de la radícula, las 24 horas, de 5.9 a 6.7 veces cuando se determinó la actividad con glucosa y de 3.5 veces cuando se determinó la actividad con fructosa, respecto a la actividad encontrada en el tejido seco.

Para sustentar el crecimiento del tejido embrionario al inicio de la germinación se deben utilizar las moléculas que se encuentran propiamente en el tejido embrionario, mientras que a la salida de la radícula se movilizarán aquellas que se encuentran en tejidos extraembrionarios (Thomas y Rodríguez, 1994). A pesar de que se ha observado que la sacarosa se hidroliza en un 60% en las primeras 8h de la germinación, tanto en ejes como en embriones (Martínez-Marcelo, 2007), no es el único sustrato disponible para la respiración, también encontramos que los aminoácidos comienzan a degradarse (Limmami *et al.*, 2002), así como los lípidos. Respecto a los lípidos, en *Arabidopsis thaliana* se ha documentado que comienza

su degradación durante el periodo de secado de la semilla (Eastmond y Graham, 2001) y en el laboratorio han detectado que en los embriones de maíz embebidos 8 horas, ya se redujeron los niveles de lípidos totales en un 30% (Martínez-Marcelo, 2007). Tanto los aminoácidos como los productos de la degradación de lípidos como la acetil-CoA, son sustratos que alimentan al ciclo de Krebs para la producción de energía. Entonces, la escasa actividad de la hexocinasa que se detectó antes de las 24 h, sugiere que hay varias vías metabólicas que están simultáneamente trabajando para llevar a una eficiente producción de energía. Pero la presencia de actividad de hexocinasa también indica que es necesaria la hexocinasa, probablemente para la producción del metabolito de inicio de la vía de las pentosas, la glucosa-6P. La vía de las pentosas debe estar encendida durante la germinación, ya que es fuente de poder reductor en forma de NADPH y de carbohidratos como las ribosas, el primer sustrato de varias vías anabólicas y el segundo en la síntesis de coenzimas, DNA y RNA (Voet y Voet, 1995).

En nuestro sistema experimental la radícula protuye del maíz a las 24h, por lo que el incremento en la actividad de la hexocinasa a partir de ese tiempo, puede deberse al aumento en la producción de los sustratos de la enzima ya sea por el incremento en la toma o la producción interna de hexosas. Sabemos que la actividad de las invertasas ácidas aumenta tanto en el eje como en el embrión después de las 24h de la imbibición, si bien el máximo de actividad se encuentra a las 30h de la germinación, pero indica que es probable que el aumento en la actividad de las invertasas lleve a un aumento de las hexosas disponibles para fosforilarse.

Por otra parte, el perfil de utilización de sacarosa en el eje muestra que hay una degradación activa del carbohidrato, a las 24 h ya se ha degradado el 75% y a las 48 h sólo se encuentra el 4% del contenido inicial. Por su parte, el embrión completo también degrada la sacarosa a la misma tasa que el eje embrionario, pero a las 24 h en lugar de continuar disminuyendo se observa un incremento en el contenido de sacarosa. En los escutelos aislados del embrión se incrementa el

contenido de sacarosa a partir de las 24 h, 8 h después se llega a valores cercanos al del tiempo cero (Martínez-Marcelo, 2007), lo que indica que se ha establecido la función del ciclo del glioxilato. En escutelos de maíz se ha medido la actividad de las dos enzimas regulatorias del ciclo del glioxilato, iniciando su actividad a las 24h, después aumentan para alcanzar un máximo a los 4 días y finalmente después de 7 días las actividades son pequeñas (Longo y Longo, 1970). Por lo que hay sustratos para la invertasa y por tanto para la hexocinasa.

Hemos encontrado que el transportador de sacarosa se expresa exclusivamente en el escutelo (Greaves-Fernández, 2001; Zavala-Zendejas, 2001), por lo que el tejido sería capaz de transportar la sacarosa al exterior para nutrir al eje embrionario. La actividad de las invertasas ácidas de la pared celular es alta entre las 24 y 30h de la germinación, lo que indica que la sacarosa que se produce en el escutelo se transporta al apoplasto y se hidroliza, los transportadores de hexosas harían accesible al eje embrionario el carbono para contribuir a su crecimiento. Por lo que, sí es factible el aumento en la cantidad de hexosas disponibles para el metabolismo a partir de las 24h de la germinación y por tanto la actividad de las hexocinasas respondería al aumento en las hexosas.

Modulación de la expresión de la actividad de las hexocinasas por carbohidratos.

Las plantas integran factores ambientales y las señales internas para modular su crecimiento y desarrollo. Varias líneas de evidencias apoyan que una de las señales importantes en modular el desarrollo son los carbohidratos, como la glucosa, la sacarosa y la rafinosa (Rolland *et al*, 2006). Se ha planteado que al igual que en las levaduras y las células de mamíferos, ciertas isoenzimas de la hexocinasa en plantas juegan un papel central en la etapa temprana de la percepción de los carbohidratos, llevando a cambios en el patrón de expresión de

genes que modulan el metabolismo o transporte de carbohidratos (Rolland *et al.*, 2006).

Se desconoce el mecanismo por el cual las plantas reconocen y responden a los carbohidratos. En general, cuando las concentraciones de carbohidratos se incrementan hay una represión coordinada de los genes que están involucrados en la fotosíntesis, la movilización del almidón, lípidos y las proteínas de reserva. De manera coincidente, los genes que se requieren para el almacenamiento de metabolitos ricos en carbono para uso futuro, se inducen (Gibson 2005).

Las mutantes que expresan en diferentes niveles a las hexocinasas muestran desde la pérdida de la sensibilidad hasta la hipersensibilidad a los cambios en la concentración exógena de los carbohidratos, debido a la pobre o excesiva expresión de la enzima, respectivamente. Además, se observan cambios fisiológicos o morfológicos en las plantas al modificar el patrón de expresión de la enzima. Por ejemplo, plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las que la hexocinasa se redujo a través de la expresión en antisentido del gen para la enzima, presentaron una escasa sensibilidad a la adición de glucosa, se aceleró la elongación del hipocotilo y se incrementó la expresión de genes fotosintéticos (Dai *et al.*, 1999).

Se conoce que el proceso de germinación se inhibe en presencia de análogos de carbohidratos como 2-deoxiglucosa, la D-manosa y la D-glucosamina, todos ellos sustratos de la hexocinasa (Matheson y Myers, 1998). Por lo que es factible que la hexocinasa sea importante en el establecimiento de la plántula como organismo autotrófico. Adicionalmente, en el laboratorio hay evidencias que apuntan a que el transportador de sacarosa se dereprime cuando el eje embrionario se embebe en manosa. Lo anterior sugiere que es probable que la hexocinasa se encuentre implicada en la regulación de la expresión del transportador de sacarosa en el tejido embrionario de maíz y que el cambio conjunto en la expresión de ambas proteínas tiene un impacto en el crecimiento del tejido embrionario del maíz.

Con la finalidad de explorar si la expresión de la hexocinasa se modificaba al embeber el tejido en carbohidratos, se embebieron ejes y embriones de maíz a diferentes concentraciones de éstos, se obtuvo la fracción citosólica del tejido y se determinó la actividad de la enzima.

Se encontró que aumentó la actividad de la enzima en los ejes embrionarios embebidos tanto en sacarosa como en glucosa y fructosa. Ambas actividades la fosforilación de glucosa como la fosforilación de fructosa se indujeron, aunque no a todas las concentraciones probadas, por ejemplo concentraciones altas de glucosa (50 mM) no condujeron a un aumento en la actividad de la enzima en los ejes. Es probable que haya una concentración a la cuál el carbohidrato ejerce su acción moduladora y otra concentración a la cuál el tejido ya sea insensible a ésta. En el caso de los embriones se observó que solamente las hexosas producían el incremento en la actividad de la hexocinasa desde concentraciones de 5 mM hasta 50 mM.

Es evidente que ambos tejidos presentan actividades metabólicas distintas, el escutelo es un tejido que aportará de nutrimentos al eje embrionario en crecimiento hasta que se convierta en tejido autotrófico, es además el intermediario en el paso de la glucosa que proviene del endospermo y que convertirá en sacarosa antes de presentarla al eje embrionario. Mientras que este último, se encuentra activamente demandando los nutrimentos. Es probable que la capacidad de percepción de los carbohidratos sea producto de la diferente función metabólica de cada uno de los tejidos, lo que explicaría porque el embrión puede percibir y cambiar la expresión de la hexocinasa desde concentraciones bajas hasta concentraciones de 50 mM de glucosa, ya que es probable que cuando la movilización de almidón se encuentra activa se alcancen o sobrepasen estos niveles de glucosa en el tejido, por lo que responde modulando su actividad de hexocinasa en el intervalo de 5 a 50 mM. Una explicación a porque el embrión no presenta una actividad alterada de su hexocinasa al embeber el tejido en

sacarosa, podría deberse al hecho de que el embrión no recibe sacarosa del endospermo, sino que su escutelo lo dona al eje embrionario, por lo que externamente el embrión no percibe a la sacarosa. Por su parte, el eje embrionario si percibe tanto los cambios en concentración de glucosa como de sacarosa ya que estará expuesto a ambos durante su desarrollo.

Se ha observado durante el desarrollo de las semillas de *Arabidopsis* que la actividad máxima de la hexocinasa coincide con el comienzo de la actividad de degradación del almidón y la síntesis de nuevos lípidos (Baud y Graham, 2006). Adicionalmente, la movilización de lípidos durante la germinación se sabe está estrechamente relacionada con la concentración de carbohidratos en el tejido, ya que cuando se encuentra sacarosa o glucosa la degradación de lípidos se detiene, indicando que es probable que ambos o uno de estos carbohidratos este regulando los procesos metabólicos en la semilla (Graham *et al.*, 1994) y es sugerente de que la hexocinasa se encuentra redirigiendo el flujo de carbono de sacarosa o del almidón para la síntesis de lípidos.

Cox y Dickinson en 1972, reportaron que la actividad de la hexocinasa de los escutelos y endospermos de plántulas de maíz de 5 días, presentaban características cinéticas distintas. Encontraron que la actividad en el escutelo se debía a más de una enzima en la preparación y que la enzima adicional presentaba una K_m 19 veces mayor a la que se encontraba en el endospermo, además expresaba una V_{max} 50 veces más alta, sugiriendo que la capacidad del escutelo para metabolizar a la glucosa es alta durante el periodo de movilización de las reservas. En este trabajo, también intentamos determinar las V_{max} y K_m para las enzimas tanto en el eje embrionario como en el embrión a las 24 h de germinación, pero los perfiles de actividades eran muy complejos, en el sentido de que no se describía un comportamiento Michaeliano para la enzima, de manera similar a lo que Cox y Dickinson (1972) mostraban, Además cuando los datos experimentales se usaron para obtener los gráficos $1/v$ versus $1/s$, no se obtenía una recta, se realizo también el cálculo para obtener las gráficasde Hanus, pero

tampoco daba una recta por lo que no se pudo obtener las K_m y V_{max} para la enzima presentaban en algunos casos más de 3 pendientes, por lo que era difícil asignar con certeza un valor de K_m . Por lo tanto, se decidió buscar a través de la separación de los patrones electroforéticos de la enzima en geles nativos, si alguna isoenzima que fosforila a las hexosas era la que presentaba la actividad aumentada cuando se embebía el tejido en carbohidratos.

El patrón de isoenzimas obtenido de la separación de la fracción citosólica de los ejes embrionarios de maíz, mostró 5 diferentes formas de hexocinasa cuando se embebe en 5 mM de glucosa o sacarosa o sorbitol. Le dimos el nombre genérico de hexocinasas, ya que la actividad fue visible cuando se colocaba el gel en cualquiera de los sustratos de la enzima, glucosa y fructosa a concentración de 3 mM cada uno. En el arroz también se han encontrado numerosas isoformas de enzimas que fosforilan hexosas, tres glucocinasas Gk1, Gk2 y Gk3 una Fk1 y dos Hxk1 y Hxk2 (Guglielminetti *et al.* 2000). En hojas de espinaca Scharrenberg (1990) encontró dos hexocinasas, I y II y dos fructocinasas, I y II. Renz y Stitt (1993) identificaron en papa a tres Hxk (Hk1-3) y tres fructocinasas (Fk1-3). En el jitomate se han encontrado y caracterizado los genes de cuatro Hxk y dos Frk, de éstos sólo una se ha localizado en los plastidios (Kandel-Ffir *et al.*, 2006). En el sistema experimental que trabajamos no encontramos diferencias en comportamiento con los dos sustratos utilizados, probablemente porque para poder visualizar a las bandas incubamos primero el sustrato y las enzimas acopladas por 40 minutos totales y después pasaban entre 2 y 2.5h para visualizar las bandas con actividad, al reducirse el NBT, es probable que por el tiempo prolongado la enzima si haya estado en contacto de manera eficiente con los sustratos y no nos permitió distinguir si una prefería a la glucosa o fructosa de manera distinta. Por lo que como se mencionó todas las formas de enzima que encontramos las denominamos hexocinasas.

Se encontró que la actividad de una isoforma en ejes y otra en embriones presenta mayor actividad. En los ejes embrionarios fue la HXK3 la que se indujo

cuando se embebió el tejido por 24 h en glucosa. En el caso de los embriones la glucosa a 5mM también produjo un incremento en la intensidad de una banda de actividad, en este caso la HXK fue la 4, aunque cuando se embebió el tejido en 50 mM de glucosa la que apareció fue una banda gruesa arriba de la banda de la HXK2.

El aumento se puede explicar por a) un aumento en la cantidad de esa isoenzima, o b) a la modificación covalente de la enzima. En cuanto al aumento en la cantidad de la enzima hay dos posibilidades, una es que se haya inducido la traducción de la isoenzima y otra es que se haya movilizado hexocinasa de algún organelo. En esta última opción se sabe que la enzima en plantas puede localizarse tanto en la mitocondria como en la vacuola y el Golgi. En maíz se ha identificado un 30% de actividad de enzima soluble o citosólica y el resto unida a membranas (da-Silva *et al.*, 2001; Galina *et al.*, 1995). La hexocinasa de maíz unida a membranas, se ha encontrado que presenta diferentes propiedades cinéticas a la soluble. La HXK citosólica no se inhibe por ADP mientras que la unida a membranas sí, con una $K_i = 20-40 \mu\text{M}$, también la manohexulosa la inhibe con una K_i de 300 μM . Se ha sugerido que la hexocinasa mitocondrial es la que presenta la actividad de percepción y traducción de la señal por azúcares, ya que la actividad de la enzima se ve modificada al interactuar con los organelos y posiblemente con efectores, pero en plantas aún se desconoce si interactúa con alguna proteína y como se modifica su actividad.

Se ha sugerido que la hexocinasa mitocondrial de ricino (*Ricinus communis*) interactúa de manera similar a como lo hace la hexocinasa de rata, esto es la HXK se asocia a la porina VDAC de una manera reversible y dependiente de los niveles de glucosa-6P (Miernyk y Dennis, 1983). Rezende y colaboradores (2006) realizaron la purificación de la HXK mitocondrial y la compararon con la hexocinasa de arroz y rata, encontraron que la HXK mitocondrial no se separa de la mitocondria después de la adición de quimotripsina a bajas concentraciones, ni con la adición de G6P o clotrimazol, todos estos reactivos que se sabe afectan la

unión de la HXK con la VADC en rata. Los autores sugieren que es probable que por presentar un dominio altamente hidrofóbico, este podría estar interaccionando directamente con la membrana y no con el porina. Por tanto una interacción diferente con la mitocondria, o bien que por ser altamente hidrofóbico este dominio, no es accesible a la digestión por la proteasa por lo que no se separa de la mitocondria y de la VDAC.

El hecho de que encontremos más actividad en la fracción citosólica puede deberse a que la HXK se movilizó de algún organelo como la mitocondria, aunque podría ser también que ésta se encuentre localizada en otro espacio subcelular. En las células beta del páncreas la glucocinasa con función sensora, HXKIV, se sabe que se une a la proteína denominada GCKR (del inglés “glucokinase regulatory protein”), proteína que moviliza a la hexocinasa al núcleo y que lleva a una disminución de la actividad fosforilante. En este sistema una fructocinasa juega un papel central en la regulación de la actividad de la hexocinasa, ya que se conoce que la interacción de GCKR y la HXKIV disminuye en presencia de fructosa-1-fosfato, el producto de la reacción catalizada por la FRK. Por lo que la actividad de la FRK se propone que modula la actividad de sensor de glucosa de la HXKIV en las células β del páncreas (Malaise et al., 1990). Mutantes que no presentan el gene HXKIV o de una proteína que regula a la hexocinasa, producen fenotipos asociados a la diabetes juvenil o a una forma de diabetes no dependiente de insulina. Por lo que resulta interesante indagar sobre la posibilidad de la movilización de la hexocinasa cuando se embeben ejes embrionarios o embriones en glucosa, ya que su actividad posiblemente module el desarrollo del embrión al afectar el reparto de carbono en la semilla.

Otro de los factores que influye en el aumento en la actividad en una enzima es que se haya modificado covalentemente. La fosforilación de la HXK de levadura reprime la expresión del gene SUC2, gene que codifica para las invertasas citosólica y apoplástica, entonces debido a su represión le permite a la levadura utilizar primero a la glucosa, además la HXK induce la expresión del gene para el

transportador de hexosas HXT, ayudando así a la toma de glucosa (Randez-Gil *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2000). Sería interesante buscar si la fosforilación de la enzima está contribuyendo a su mayor actividad en el tejido embrionario de maíz y si esto hace una diferencia entre las isoenzimas que encontramos se inducen en los embriones y ejes embrionarios, es decir dos formas diferentes de HXK pero debido a su modificación covalente.

En el laboratorio se están realizando experimentos encaminados en identificar a las formas de enzima que aumentaron cuando se embebieron los tejidos en glucosa, para saber si son formas distintas y si están fosforiladas o tienen alguna secuencia de localización en algún organelo. Además de medir las implicaciones del aumento en su actividad en el transporte y metabolismo de los carbohidratos.

La actividad de transporte de sacarosa debe ser regulada y coordinada con la capacidad de los tejidos donadores de nutrientes, a los tejidos de demanda, regulación que se ha planteado sea a través de la disponibilidad de los fotosintatos, sin embargo, se tienen evidencias contradictorias del papel de los carbohidratos en la expresión de los transportadores de sacarosa, pero en este sistema, la germinación del maíz, hemos encontrado que el transportador se regula positivamente por glucosa en el eje embrionario y negativamente en el embrión. Por lo que explorar en la germinación del maíz si la hexocinasa está implicada en el mecanismo de transducción de señales, que lleva a la modulación de la expresión del transportador de sacarosa es una posibilidad interesante, ya que también son dos isoformas de hexocinasa distintas las que aumentan, una para el eje y otra para el embrión. Además, hay evidencias en levadura en donde la hexocinasa regula la expresión del transportador de hexosas, dependiente de la concentración de glucosa externa (Petit *et al.*, 2000) y en trigo se demostró que el gene para el traslocador de triosas fosfato/fosfato se inhibe por glucosa de una manera dependiente de la actividad de la hexocinasa (Sun *et al.*, 2006), por lo que la posibilidad de una regulación similar para el transportador de sacarosa en maíz no es remota.

CONCLUSIONES

- La actividad de la hexocinasa citosólica si es modulada por la concentración de glucosa y sacarosa en tejido embrionario de maíz.

PERSPECTIVAS

1. Hacer los zimogramas en geles de punto isoeléctrico para identificar las isoenzimas con su punto isoeléctrico aparente.
2. Obtener la secuencia del amino terminal de las proteínas que aumentan en presencia de glucosa, para obtener las secuencias de los genes de las diferentes formas de hexocinasas y comparar éstas con las bases de datos del genebank.
3. Determinar si la actividad aumentada de las hexocinasas se debe a la modificación covalente de la enzima (fosforilación) o bien a la síntesis *de novo* de la enzima o a la movilización de la enzima de la mitocondria o de otro organelo al citoplasma.
4. Establecer el papel de las isoenzimas que aumentaron con glucosa, función sensora, metabólica o ambas.
5. Relacionar la actividad de la hexocinasa con la regulación de la expresión del transportador de sacarosa en la germinación del maíz.

Referencias

- Baud S, Graham IA. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using *in situ* histochemistry. *Plant J.* 46: 155-169.
- Bewley D, Black M. 1994. *Seeds Physiology of Development and Germination* 2da. Edition, Plenum Press. E.U.A. 1-12, 147-155, 293-302, 345, 346.
- Berthillier, G., Got, R. 1974 Biosynthèse de 1'UDPglucose par les microsomes des hèpatocytes de rat. *Biochimia et Biophysica Acta* 362: 390-402,.
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3:reviews1002.1-1002.5
- Claeyssen E, Rivoal J. 2007. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochem* 68: 709-731.
- Claeyssen E, Wally O, Matton DP, Morse D, Rivoal J. 2006. Cloning, expression, purification, and properties of a putative plasma membrane hexokinase from *Solanum chacoense*. *Protein Expr Purif* 47: 329-339.
- Cortés S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM. 2003. In plants, 3-O-Methylglucose is phosphorylated by hexokinase But Not Perceived as a sugar. *Plant Physiol* 131: 824-837.
- Cox EL, Dickinson DB. 1972. Hexokinase from maize endosperm and scutellum. *Plant Physiol.* 51: 960-966.
- Dai N, Schaffer PM, Shanak G, Ratner LK, Granot A, 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- Dai N, Kandel M, Petreikov, Levine I, Richard B, Rothan C, Schaffer AA, Granot D. 2002. The tomato hexokinase Le HXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships. *Plant Sci.* 163/581-590.
- Damari-Weissler H, Jandel-Kfir M, Gidoni D, Mett A, Belausov E, Granot D. 2006. Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta* 224: 1495-1502.

- Da-Silva W, Resende LG, Galina A. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J. Exp. Bot.* 52: 1191-1201.
- Doehlert DC. 1990. Fructokinases from developing maize kernels differ in their specificity for nucleoside triphosphates. *Plant Physiol* 93: 353-355.
- Eastmond PJ, Graham IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6: 72-77
- Finkelstein RR, Lynch TJ. 2000. Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugar. *Plant Physiol.* 122: 1179-1186.
- Galina A, Reis M, Albuquerque M, Puyou A, Puyou M, Meis L. 1995. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem. J.* 309: 105-112.
- Galina A, da Silva WS. 2000. Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochem* 53: 29-37.
- Galina A, da Silva WS, Rezende GL. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and no cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J. Exp. Bot.* 52: 1191-1201.
- German MA, Asher I, Petreikov M, Dai N, Schaffer AA, Granot D. 2004. Cloning, expression and characterization of LeFRK3, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase,. *Plant Sci* 166: 285-291.
- Ghosh S, Gepstein S, Heikkila JJ, Dumbroff EB. 1988. Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem.* 169: 227-33.
- Gibson SI. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 93-102.

- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6: 761-772.
- Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión de los RNAm del transportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Guglielminetti L, Perata P, Morita A, Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A. 2000. Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. *Phytochem* 53: 195-200.
- Halford G, Purcell C, Hardie D. 1999. Is hexokinase really a sugar sensor in plants?. *Trends in plant science*. 4:3, 142-150.
- Harrington N, Bush D. 2003. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Physiol*. 15: 2493-2496.
- Hernández-López I. 2007. Efecto del estrés hídrico sobre la actividad de hexocinasa en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Hernández D, De la Fuente M. 1989. Mannose toxicity in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Cell Biol* 67: 311-314.
- Higgins TJ, Easterby JS. 1976. Wheat germ hexokinase (LII): fluorimetric measurement of the binding of substrates and products. *Eur. J. Biochem* 65: 513-516
- Iijima, K., Awazi, N. 1972. Histochemical studies on the morphology of the Golgi apparatus and on distribution of hexokinase and some enzymes concerning vitamin C synthesis in *substantia nigra* of the rabbit. *Acta Histochemia* 44: 122-136.
- Ingle J, Beevers L, Hageman RH. 1964. Metabolic changes with the germination of corn I. Changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo axis, scutelum and endosperm. *Plan Physiol*. 735-740.
- Jang JC, Sjeen J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci*. 2: 208-214.

- Kanayama Y, Granot D, Dai N, Petreikov M, Schaffer A, Powell A, Bennett AB. 1998. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. *Plant physiol* 117: 85-90
- Kandel-Kfir M, Damari-Weissler H, German MA, Gidoni D, Mett A, Belausov E, Petreikov M, Adir N, Granot D. 2006. Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular location. *Planta* 22:1341-52.
- Kim J, Dang. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 30:3, 142-150.
- Kurokawa M, Yokoyama K, Kaneko M, Ishibashi S. 1983. Difference in hydrophobicity between mitochondria-bindable and non-bindable forms of hexokinase purified from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 115: 1101-1107.
- Leszek P, Vincent D. 2002. *Zea mays* (Maize, Corn). *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7.
- Limmami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A, Hirel B. 2002. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. *Plant Physiol.* 130:1860–1870.
- Longo CP, Longo GP. 1970. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiol.* 45: 249-254.
- Loreti E., Brillis L., Alpi A. Peralta P. 2001 Why and How do plant cells sense sugars? *Annals of botany* 88: 803-812.
- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Davies DR, Vandercammen A, Van Schaftingen E. 1990. Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. *Eur. J. Biochem.* 190: 539-545.
- Martin T, Oswald O, Graham IA. 2002. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128: 472-481.
- Matheson NK, Myers D. 1998. Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. *Phytochem.* 48: 241-248.

- Martínez-Barajas E, Randall DD. 1998. Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* 205: 567-573.
- Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Menu T, Rothan C, Dai N, Petreikov m, Etienne C, Destrac-Irvine A, Schaffer A, Granot D, Richard B. 2001. Cloning and characterization of a cDNA encoding hexokinase from tomato. *Plant Sci* 160: 209-218.
- Miernyk JA, Dennis DT. 1983. Mitochondrial, plastid and cytosolic isoenzymes of hexokinase from developing endosperm of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 458-468.
- Morré DJ. 1964. Isolation of the Golgi apparatus from plant cells. *J Cell Biol* 23: 567-573.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu Y, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, Light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332-336.
- Mulichak AM, Wilson JE, Padmanabhan K, Garavito RM. 1998. The structure of mammalian hexokinase-1. *Nature Struct. Biol.* 5, 555-560.
- Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. En Colección FAO: Producción y protección vegetal, 28. ISBN: 9253044578.
- Pego JV y Smeekens SCM. 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends Plant Sci* 5: 531-536.
- Petit T, Diderich JA, Kruckeberg AL, Gancedo C, VanDam K. 2000. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 182: 6815-6818.

- Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD, Prieto JA. 1998. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol* 18: 2940-2948.
- Renz A, Stitt M. 1993. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. *Planta* 190: 166-175.
- Rezende GL, Logullo C, Meyer L, Machado LB, Oliveira-Carvalho AL, Zingalli RB, Cifuentes D, Galina A. 2006. Partial purification of bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays* L.) root membranes. *Braz. J Med. Biol. Res.* 39: 1159-1169.
- Rolland F, Sheen J. 2005. Sugar sensing and signaling networks in plants. *Biochem Soc.* 269-271.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. 2001. Glucose sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26, 310–317.
- Rolland F, Baena-González E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Salmenkalio M, Sopanen T. 1989. Amino acid and peptide uptake in the scutella of germinating grains of barley, wheat, rice and maize. *Plant Physiol* 89: 1285-1291.
- Schnarrenberger C. 1990. Characterization and compartmentation in green leaves of hexokinases with different specificities for glucose fructose and mannose and for nucleoside triphosphates. *Planta* 181: 249-255.
- Seixas da-Silva W, L, Rezende GL, Galina A. 2001. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Exp. Bot.* 359: 1191-1201
- Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, van Houwelingen AMML, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SPC, van der Geest AHM. 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the

- germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol.* 137: 354–368.
- Srivastava LM. 2001. Seed germination, mobilization of food reserves, and seed dormancy. En: *Plant growth and development*. pp447-471. Primera edición. Academic Press, San Diego, California, USA. ISBN 0-12-660570-X.
- Sun JY, Chen YM, Wang QM, Chen J, Wang XC. 2006. Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol.* 38: 1102-1113.
- Tiessen, A., Pressha, K., Branschied, A., Palacios, N., Mekibbin, R., Halford, N.G., and Geigenber, P. 2003. Evidence that SNF-1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* 35: 490-500.
- Thomas BR, Rodríguez RL. 1994. Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. 106: 1235-1239.
- Tsai CY, Salamini F, Nelson OE. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in the developing endosperm of maize. *Plant Physiol.* 46: 299-306.
- Voet D, Voet JG. 1995. *Biochemistry*. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc. pp 447-448.
- Wiese A, Groner F, Sonnewald U, Deppner H, Lerchl J, Hebbeker U, Flügge U, Weber A. 1999. *Spinach* hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids. *FEBS Lett* 461: 13-18.
- Wilson JE. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 206: 2049-2057
- Xiao W., Sheen J., Jang J., 2000 The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44: 451-461.

Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz: Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.